

**Extrazelluläre Signalableitung von Kardiomyozyten und
genetisch modifizierten HEK 293-Zellen
mit Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Essen

Von

Holger Ecken

aus Viersen

Jülich 2002

Gutachter: Prof. Dr. H. Emons

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Rehage

3. Gutachter: PD Dr. A. Offenhäusser

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2002 (Vorsitzender: Prof. Dr. P. Rademacher)

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. GRUNDLAGEN DER BIOELEKTRONIK	3
2.1. ELEKTRISCH AKTIVE ZELLEN	6
2.2. FELDEFFEKTTRANSISTOREN (FETs) UND MIKROELEKTRODENARRAYS (MEAs)	15
2.3. KOPPLUNGSMODELLE	22
3. EXPERIMENTELLES	6
3.1. OBERFLÄCHENANALYSE UND SPEZIELLE PRÄPARATIONSTECHNIKEN	26
3.1.1. <i>Lichtmikroskopie</i>	26
3.1.2. <i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i>	26
3.1.3. <i>Atomkraftmikroskopie (AFM)</i>	26
3.1.4. <i>Elektrochemische Messungen</i>	27
3.2. HERSTELLUNG UND LAYOUT DER ZELLTRÄGER	28
3.2.1. <i>Strukturiertes Silizium für Zellanwuchsversuche</i>	28
3.2.2. <i>Mikroelektrodenarrays</i>	34
3.2.3. <i>Feldeffekttransistoren</i>	40
3.3. EXPERIMENTELLER AUFBAU	43
3.3.1. <i>Meßaufbau für simultane Patch-Clamp- und Zellableitungsmessungen</i>	43
3.4. PATCH-CLAMP-TECHNIK	50
3.5. CHARAKTERISIERUNG DER MEAs UND FETs	54
3.5.1. <i>Mikroelektrodenarrays</i>	54
3.5.2. <i>Feldeffekttransistoren</i>	56
3.6. ZELLKULTUR	63
3.6.1. <i>Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen)</i>	63
3.6.2. <i>Menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney Cells)</i>	64
3.6.3. <i>Reinigung, Oberflächenbeschichtungen und Aussaat der Zellen</i>	65
3.6.4. <i>Meßlösungen</i>	66
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	26
4.1. TESTS ZUR BIOKOMPATIBILITÄT (ANWACHSVERSUCHE)	69
4.2. BIOELEKTRONISCHE KOPPLUNG	78
4.2.1. <i>Experimente mit Kardiomyozyten</i>	78
4.2.2. <i>Experimente mit HEK 293-Zellen</i>	89
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	69

6. ANHANG	103
6.1. BIOLOGISCHE ZELLPRÄPARATION FÜR DIE RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	106
6.2. NACHCHEMISCHE REINIGUNG FÜR MIKROELEKTRODENARRAYS	106
6.3. REINIGUNG DER MEAS UND FETs	107
7. LITERATURVERZEICHNIS	106
FORMELZEICHEN UND ABKÜRZUNGEN	122
DANKSAGUNG	126
LEBENS LAUF	128

1. Einleitung und Zielsetzung

In der Natur reagieren viele Lebensformen auf die Reize ihrer Umgebung mit elektrischen Signalen. Über Millionen von Jahren wurde die dafür notwendige Sensitivität und Selektivität evolutionär optimiert. Die Vision, sich diese einzigartigen Signalprozesse nutzbar zu machen und in künstlichen Systemen zu integrieren, übt eine enorme Faszination aus. Daß dieser Traum nicht bloß ein Bestandteil der Science-fiction-Literatur ist, haben die letzten Jahrzehnte gezeigt. 1976 gelang Bergveld die erste Einkopplung elektrischer Signale einer Muskelfaser in einen Feldeffekttransistor [Bergveld, 1976]. Er leitete damit eine neue Ära der Bioelektronik ein. Seit jener Zeit beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit dem Aufbau funktioneller Hybridsysteme, zu denen die Gruppen von G.W. Gross, W.G. Regehr, J. Pine, J.L. Novak, B.C. Wheeler, P. Connolly, P. Clark, P. Fromherz, A. Offenhäusser u.a. gehören (vgl. Literaturverzeichnis).

Das Verständnis der sogenannten bioelektronischen Schnittstelle zwischen Zellsystem und elektronischen Bauelement hat dabei eine zentrale Bedeutung. Die Signalübertragung von der biologischen auf die elektronische Ebene und umgekehrt ist bis heute nicht umfassend aufgeklärt. Bisher kann sie nur modellhaft beschrieben werden [Grattarola and Martinoia, 1993; Weis and Fromherz, 1997; Fromherz, 2002]. Problematisch ist vor allem der Umfang der zu kontrollierenden Parameter, da zelluläre Abläufe zum Teil sehr komplex sind. Außerdem führt die meist begrenzte Signalqualität zu einer Einschränkung der Orts-/Zeit-Auflösung. Die verwendeten Transducersysteme müssen an die Dimensionen der Zellen angepaßt und auf die biologischen Randbedingungen abgestimmt werden. Deshalb werden hauptsächlich Goldmikroelektrodenarrays (mit und ohne Platinbeschichtung), ITO (indium-tin-oxide) und TiN, sowie Feldeffekttransistoren eingesetzt. Vorteilhaft sind Mikroelektrodenarrays, da sie relativ einfach hergestellt werden können und Messungen an vielen Positionen gleichzeitig ermöglichen. Nachteilig ist jedoch, daß durch den über die Elektroden fließenden Strom unerwünschte toxische elektrochemische Effekte auftreten können [Fromherz and Stett, 1995]. Dieses Problem kann bei Verwendung von Feldeffekttransistoren umgangen werden, bei denen die Zellen auf biokompatiblen SiO₂-Schichten aufliegen und Gatepotentiale beeinflussen. Dieser als Elektrolyt-Oxid-FET (EOSFET) bekannte Feldeffekttransistor stellt eine von Fromherz und Offenhäusser realisierte Weiterentwicklung des bekannten Metall-Oxid-Feldeffekttransistors dar [Fromherz et al., 1991; Offenhäusser, 1995]. Eine Übersicht über die Klassifizierung biologisch sensibler Feldeffekttransistoren findet sich in [Schöning and Poghossian, 2002].

Die Signalübertragung an der bioelektronischen Schnittstelle ist aber nicht nur für die Grundlagenforschung von Bedeutung, sondern auch in der praktischen Anwendung. Beispielhaft sei an dieser Stelle die medizinische Prothetik erwähnt, welche mit Hilfe von Mikroelektroden eine Stimulation von Nervenfasern versucht, um natürliche Funktionen

möglichst gut nachzuahmen. Mit dem sogenannten Cochlear-Implantat, das auf dieser Methode basiert, hat man bei weltweit mehr als 40.000 tauben Patienten, die aber noch intakte Gehörnerven aufwiesen, eine Wiederherstellung der Hörfähigkeit in Bezug auf das Sprachverständnis erreicht [Rauschecker and Shannon, 2002]. Auch Patienten mit Retinadegeneration konnte man mit einem Retina-Implantat zumindest so weit helfen, daß bei ihnen wieder rudimentäre Seheindrücke erzeugt werden konnten [Zrenner, 2002]. Auch die Weiterleitung von Stimulationssignalen an das Muskelgewebe ist heutzutage schon möglich, z.B. bei Herzschrittmachern.

Nur durch Entwicklung geeigneter Zell/Halbleiter-Hybride können die Vorgänge an der bioelektronischen Schnittstelle weiter untersucht und aufgeklärt werden. Deshalb ist es wichtig, die extrazellulär gemessenen Signale mit einer konventionellen Ableittechnik, z.B. der Patch-Clamp-Technik [Neher and Sakmann, 1976], zu vergleichen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten schließlich auch für zukünftige Anwendungen im Bereich der Biosensorik, der biologisch-technischen Implantate, der medizinischen Diagnostik und der Pharmakologie genutzt werden.

Auf diesem thematischen Hintergrund aufbauend ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgaben und Ziele:

- Aufbau eines experimentellen Meßplatzes, der die simultane Durchführung von Patch-Clamp und extrazellulären Kopplungsmessungen mit Feldeffekttransistoren und/oder Mikroelektrodenarrays erlaubt. Die meßtechnischen Komponenten sollen dabei optimiert werden.
- Durchführung grundlegender Untersuchungen zur Zelladhäsion auf unterschiedlichen Siliziumsubstraten. Dabei soll darauf geachtet werden, ob und inwieweit das Wachstum der Zellen von bestimmten Parametern beeinflusst wird. Hierzu müssen geeignete Maskenlayouts entworfen und die Mikrostrukturen in Silizium gefertigt werden.
- Der Prototyp des am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) in Mainz entwickelten 64-Kanal-Verstärkers soll auf volle 64-Kanal-Funktionalität erweitert werden.
- Herstellung von Metallmikroelektrodenarrays auf Siliziumbasis als extrazelluläre Sensoren und deren elektrochemische Charakterisierung.
- Die Funktionalität des 64-Kanal-Verstärkers soll mit Kardiomyozyten (Herzzellen von Ratten) in Verbindung mit den neuen Metall-Mikroelektrodenarrays getestet werden.

- Es sollen menschliche embryonale Nierenzellen (HEK 293) für Zell-Transistor-Kopplungen verwendet werden, in die ein K^+ -Kanalen stabil transfiziert wurde. Das Gen kodiert für spannungsgesteuerte K^+ -selektive Ionenkanäle. Die Charakterisierung der Signaleinkopplung soll mit Feldeffekttransistoren erfolgen. Der ausgesuchte Ionenkanal weist dafür ausgezeichnete Eigenschaften auf. Er ist gut elektro-physiologisch charakterisiert (Frings et al., 1998), zeigt keine Inaktivierung, liefert Membranströme in der Größenordnung mehrerer nA und ist spannungsgesteuert.

Die Arbeit ist folgendermaßen aufgebaut:

- Kapitel 2 beinhaltet die Grundlagen der Bioelektronik, die für das Verständnis der bioelektronischen Kopplungsmessungen nötig sind. Insbesondere wird dabei auf den Aufbau biologischer Zellen, die Funktionsweise spannungsabhängiger Ionenkanäle, das Verstärkungsprinzip von Feldeffekttransistoren und die Theorie der Zell-Transistor-Kopplung eingegangen.
- Kapitel 3 beschreibt die Herstellung und den Aufbau der Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays. Danach erfolgt eine Beschreibung des neuen experimentellen Aufbaus und eine kurze Erläuterung der Patch-Clamp-Technik. Die Charakterisierung der Sensoren folgt im Anschluß. Der letzte Teil dieses Kapitels beschäftigt sich mit den verschiedenen Zellkulturen, den Reinigungsprozessen und Oberflächenbeschichtungen der Sensoren. Außerdem werden die verwendeten Meßlösungen tabellarisch aufgelistet.
- Kapitel 4 enthält die Ergebnisse und die zugehörige Diskussion. Zunächst werden die Ergebnisse der Anwachsversuche auf den verschiedenen Oberflächen aufgezeigt und danach die Resultate der Kopplungsexperimente mit den Kardiomyozyten und den HEK 293-Zellen.
- Kapitel 5 faßt abschließend die Ergebnisse zusammen und gibt einen Ausblick auf zukünftige Experimente und Entwicklungen.

2. Grundlagen der Bioelektronik

Für das Verständnis der Signaleinkopplung lebender, elektrisch aktiver Zellen in einen extrazellulären Sensor ist es wichtig, die elektrischen Eigenschaften der Zellen zu kennen. Diese Eigenschaften werden im folgenden näher erläutert. Außerdem wird der Aufbau und die Funktion von Feldeffekttransistoren und Mikroelektroden dargestellt, die in dieser Arbeit als extrazelluläre Transducersysteme eingesetzt werden. Am Ende dieses Kapitels werden Kopplungsmodelle vorgestellt, mit denen das gemessene Signal beschrieben werden kann.

2.1. Elektrisch aktive Zellen

Im Verlauf der Evolution haben sich zwei Zellarten entwickelt. Dies sind zum einen die eukaryotischen Zellen (s. Abbildung 2-1), die einen Zellkern enthalten und zum anderen die prokaryotischen Zellen, die keinen Zellkern besitzen.

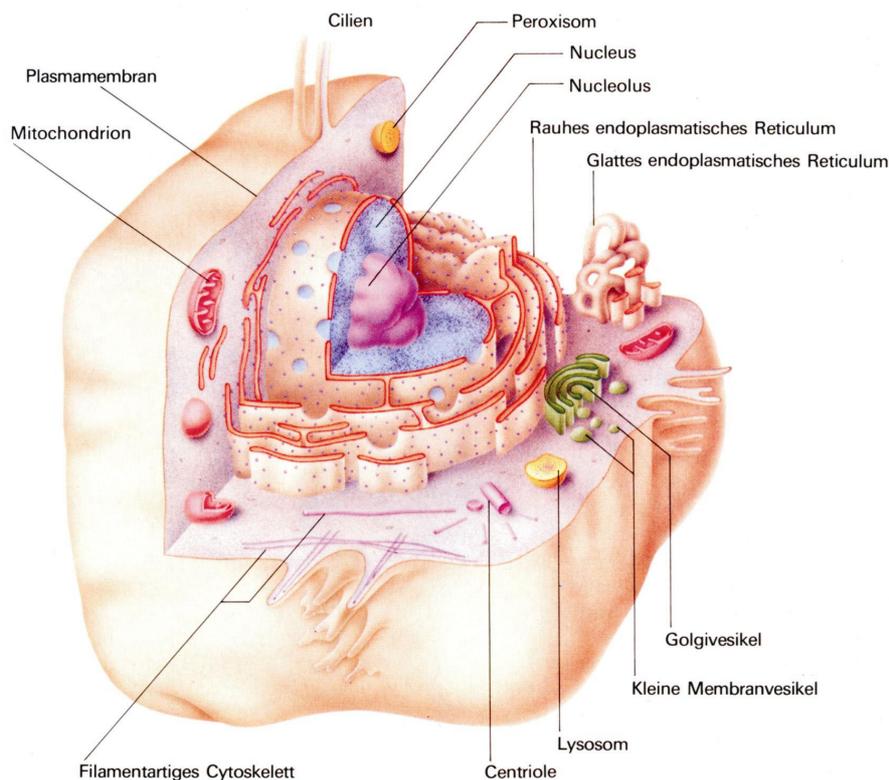


Abbildung 2-1: Zeichnung einer tierischen (eukaryotischen) Zelle [Lodish et al., 1996].

In dieser Arbeit werden nur eukaryotische Zellen verwendet. Eukaryotische Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht und für verschiedene Gase, wie z.B. Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie Wasser durchlässig ist. Die Phospholipid-Doppelschicht ist dagegen nahezu undurchlässig für die meisten Moleküle, die eine Zelle aus ihrer Umgebung aufnehmen muß. Dazu gehören Zucker, Aminosäuren und

anorganische Ionen wie K^+ , Na^+ , Ca^{2+} oder Cl^- . Membranproteine, die sich in der Plasmamembran befinden, erlauben aber bestimmten Molekülen in die Zelle zu gelangen oder sie zu verlassen. Der selektive Transport anorganischer Ionen durch die Plasmamembran erfolgt z.B. über Ionenkanäle. Die Plasmamembran bildet damit eine selektive Permeabilitätsbarriere zwischen dem Zellinneren und der Umgebung. Auf Grund dieser selektiven Permeabilität kann die Zelle die Zusammensetzung ihrer intrazellulären Lösung konstant halten, die sich oft erheblich von der Zusammensetzung der extrazellulären Lösung (s. Tabelle 2-1) unterscheidet.

Tabelle 2-1: Freie Ionenkonzentrationen und Gleichgewichtspotentiale (bei 37 °C) von Säugetier-Skelettmuskelzellen [Hille, 2001].

Ion	extrazelluläre Konzentration (mM)	intrazelluläre Konzentration (mM)	Gleichgewichtspotential (mV)
Na^+	145	12	+ 67
K^+	4	155	- 98
Ca^{2+}	1,5	100 nM	+ 129
Cl^-	123	4,2	- 90

Bei fast allen Zellen ist die K^+ -Konzentration des intrazellulären Milieus (Cytosol) viel größer als die Na^+ -Konzentration. Die freie Ca^{2+} -Konzentration des Cytosols beträgt meist weniger als 1 μ M. Der pH-Wert des Cytosols liegt bei etwa 7. Die unterschiedliche ionale Zusammensetzung des intra- und extrazellulären Milieus (Konzentrationsgradient) führt zu einem chemischen Potential, welches die Ionen durch die Plasmamembran in Richtung der geringeren Konzentration treibt. Dabei entsteht ein elektrisches Potential. Mit der Nernst-Gleichung kann die Potentialdifferenz einer Ionensorte ΔE_0 berechnet werden, wenn die Konzentration c der Ionensorte auf beiden Seiten der Membran bekannt ist (Gleichung 2-1):

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{außen}}}{a_{\text{innen}}}; \text{ mit } a = f \cdot c; a: \text{ Aktivität und } f: \text{ Aktivitätskoeffizient} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Unter Vernachlässigung interionischer Wechselwirkungen ($f = 1$) ergibt sich z.B. für K^+ :

$$\Delta E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{4 \text{ mM}}{155 \text{ mM}} = -98 \text{ mV} \quad (T = 37 \text{ °C}) \quad \text{Gleichung 2-2}$$

ΔE_K steht dabei für die Potentialdifferenz der K^+ -Ionen, $[K]_o$ und $[K]_i$ sind die K^+ -Konzentrationen außerhalb und innerhalb der Zelle, R ist die allgemeine Gaskonstante ($8,3144 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T die absolute Temperatur, F die Faraday-Konstante ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) und z die Wertigkeit des Ions.

Die Durchlässigkeit der Plasmamembran ist jedoch nicht für alle Ionen gleich. Die Leitfähigkeit der Membran für bestimmte Ionen wird durch Permeabilitätskoeffizienten P_i beschrieben. Für die Membran elektrisch aktiver Zellen, z.B. Nervenzellen, gilt, daß die

Permeabilität für K^+ -Ionen wesentlich größer ist als die Permeabilität für Na^+ - oder Cl^- -Ionen ($P_K > P_{Na} \approx P_{Cl}$; [Hille, 2001]). Permeabilitätskoeffizienten haben die Dimension einer Geschwindigkeit ($cm \cdot s^{-1}$) und sind proportional zu der Zahl der offenen Ionenkanäle und der Zahl der Ionen, die ein Ionenkanal in einer Sekunde leiten kann (Leitfähigkeit des Ionenkanals). Die Erweiterung der Nernst-Gleichung (Gleichung 2-1), führt zur Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Gleichung 2-3), in der die Ionenkonzentrationen mit den entsprechenden Permeabilitätskoeffizienten gewichtet werden:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Sind die entsprechenden Ionenkonzentrationen und –permeabilitäten bekannt, so läßt sich mit Hilfe dieser Gleichung das Membranpotential V_M zu jedem beliebigen Zeitpunkt ermitteln. Ist die Membran z.B. nur noch für K^+ -Ionen permeabel, vereinfacht sich Gleichung 2-3 wieder zu Gleichung 2-1, da $P_{Na} = P_{Cl} = 0$ ist. Wegen ihrer entgegengesetzten Ladungen, stehen $[K]_o$ und $[Na]_o$ im Zähler, während $[Cl]_o$ im Nenner erscheint. Ist der Nettostrom der Ionen gleich Null, so spricht man vom sogenannten Ruhepotential. Das Ruhepotential von Säugerzellen liegt in der Regel zwischen -60 und -90 mV. Da die Plasmamembran nur etwa 3,5 nm dick ist, resultieren enorm hohe Feldstärken. Beispielsweise bewirkt eine Potentialdifferenz von rund 70 mV ein elektrisches Feld von $0,07V/3,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$. Dies entspricht $200.000 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$! Vorübergehende Änderungen des Membranpotentials werden durch die Aktivierung von Ionenkanälen ausgelöst (Abbildung 2-2).

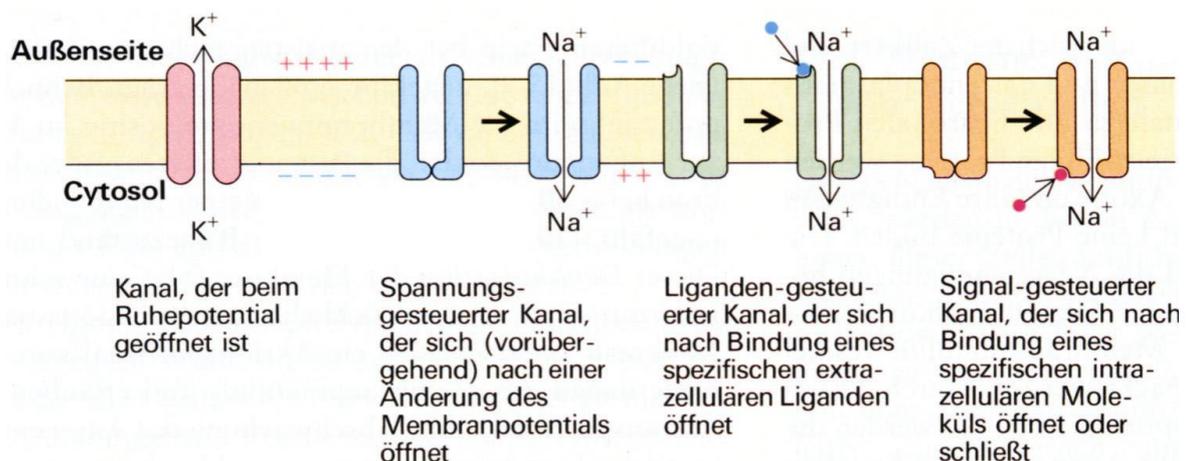


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung verschiedener Ionenkanal-Typen [Lodish et al., 1996].

Dieser Mechanismus wird bei der schnellen Informations- bzw. Signalweiterleitung in Nervenzellen genutzt. In Nervenzellen sind spannungsgesteuerte Kanäle für die Entstehung und Weiterleitung von Informationen verantwortlich, die als elektrische Impulse (Aktionspotentiale) kodiert werden. Hodgkin und Huxley haben durch grundlegende Arbeiten am

Riesenaxon des Tintenfischs gezeigt [Hodgkin and Huxley, 1952], daß für die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen Na^+ - und K^+ -Ionenkanäle notwendig sind. Das Aktionspotential wird durch die Öffnung spannungsgesteuerter Na^+ -Ionenkanäle ausgelöst (Abbildung 2-3).

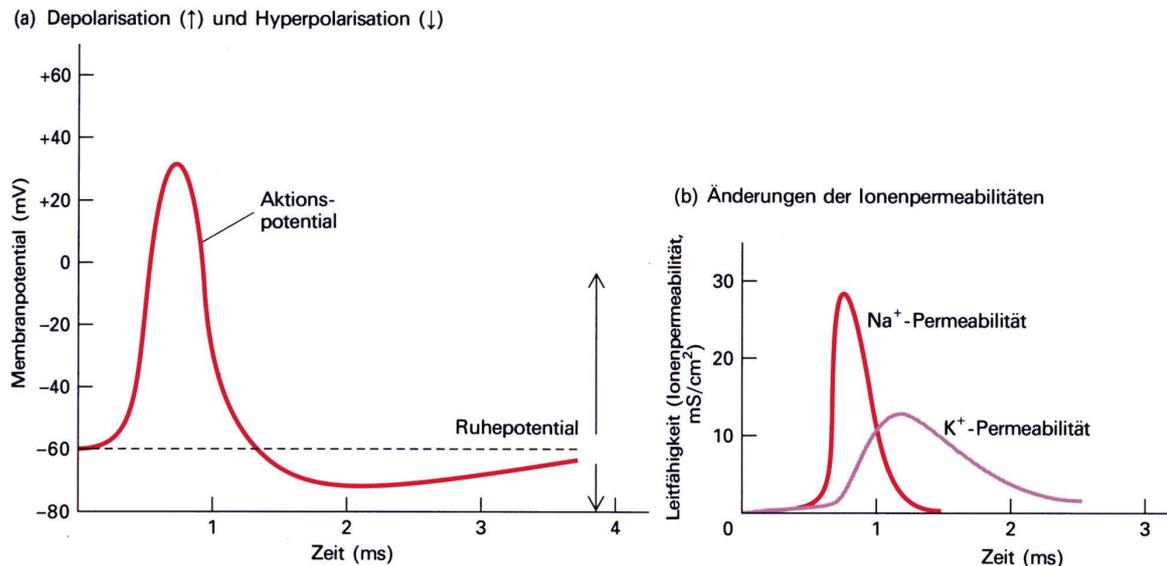


Abbildung 2-3: a) Änderung des Membranpotentials während eines Aktionspotentials, gemessen an einem Tintenfisch-Riesenaxon [Lodish et al., 1996]. b) Änderung der Leitfähigkeit der axonalen Membran für Na^+ und K^+ , die mit dem in a) dargestellten Aktionspotential einhergeht.

Die Öffnung der spannungsgesteuerten Na^+ -Ionenkanäle führt zu einem schnellen und vorübergehenden Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle. Die Zelle depolarisiert. Die Depolarisation aktiviert und öffnet weitere spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle (Selbstverstärkungsmechanismus). Innerhalb sehr kurzer Zeit wird dadurch ein lawinenartiger Einstrom von Na^+ -Ionen erreicht. Bereits während des Na^+ -Einstroms werden auch spannungsgesteuerte K^+ -Ionenkanäle aktiviert, die zu einem Ausstrom von K^+ -Ionen führen. Nach kurzer Zeit (1-2 ms) werden die Na^+ -Kanäle inaktiviert und der Nettoeinstrom der Na^+ -Ionen kommt zum Erliegen. Das Aktionspotential erreicht seinen Maximalwert (s. Abbildung 2-3). Mit dem Rückgang der Na^+ -Permeabilität auf den Ruhewert und dem erhöhten Ausstrom der K^+ -Ionen repolarisiert die Membran. Das Membranpotential erreicht mit dem K^+ -Gleichgewichtspotential einen im Vergleich zum Ruhepotential stärker negativen Wert. Nach dem Schließen der spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle stellt sich das Membranpotential wieder auf das Ruhepotential ein. Das Ruhepotential elektrisch aktiver Zellen, z.B. Neurone, liegt zwischen -50 und -70 mV, hervorgerufen durch K^+ -Kanäle, die im Ruhezustand aktiv sind.

Mitte der 80er Jahre wurden die kanalbildenden Untereinheiten spannungsgesteuerter Ionenkanäle gereinigt und kloniert [Noda et al., 1984; Noda et al., 1986; Tanabe et al., 1987

Flockerzi et al., 1986]. Dies führte zu einem wesentlichen Verständnis von Ionenkanal-Eigenschaften und zur Einordnung der entsprechenden Membranproteine in eigenständige Proteinfamilien. Da alle erregbaren Zellen eine Vielzahl von K^+ -Ionenkanäle exprimieren, die sich in ihren elektrophysiologischen und funktionellen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden, bilden die spannungsgesteuerten K^+ -Ionenkanäle im Gegensatz zu den Na^+ - und Ca^{2+} -Ionenkanälen eine strukturell und funktionell sehr große Proteinfamilie.

Spannungsgesteuerte K^+ -selektive-Ionenkanäle sind auch in dieser Arbeit von wichtiger Bedeutung. In Kapitel 4.2.2 werden Zell-Transistor-Kopplungen an menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) vorgestellt, in die ein K^+ -Kanalen stabil transfiziert wurde. Das Gen wird u.a. in der Rindernetzhaut exprimiert und gehört zur Unterfamilie der ether-à-go-go (*eag*) K^+ -Kanäle [Brüll, 1996; Frings et al., 1998]. Die HEK 293-Zellen weisen eine niedrige endogene Kationenleitfähigkeit auf [Zhu et al., 1998].

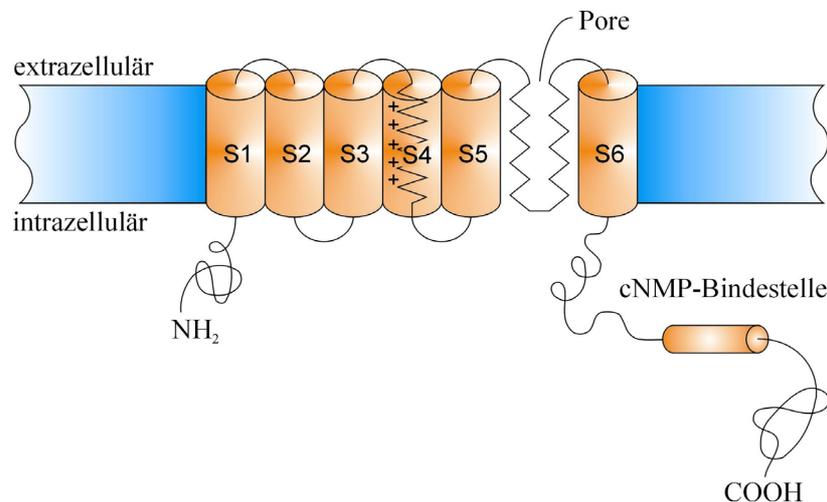


Abbildung 2-4: Schema einer Untereinheit eines *eag*- K^+ -Kanals. Die vertikalen Zylinder kennzeichnen die transmembranalen Segmente S1 bis S6. Der Spannungssensor S4 besitzt fünf positiv geladene Aminosäuren. Zwischen S5 und S6 befindet sich der Sequenzabschnitt, der die Pore des Kanals auskleidet.

Das Kanalprotein besitzt in der N-terminalen Hälfte große strukturelle Gemeinsamkeiten mit K^+ -Kanal-Untereinheiten. Dieser Proteinabschnitt weist sechs potentielle transmembranale Segmente (S1-S6), einen Spannungsfühler (S4), sowie eine Porenregion zwischen S5 und S6 auf (s. Abbildung 2-4). Die *eag*-Kanal-Untereinheiten haben im C-Terminus einen etwa 80 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt, der homolog zur Bindestelle für zyklische Nukleotide der zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG) Ionenkanäle ist [Kaupp and Seifert, 2002].

Der *eag*-Ionenkanal ist aus mehreren Gründen gut zur Charakterisierung der Zell-Transistor-Kopplung geeignet: Der Ionenkanal ist spannungsgesteuert und kann deshalb mit der Patch-Clamp-Technik kontrolliert werden (s. Kapitel 3.4). Außerdem ist der Kanal gut elektrophysiologisch charakterisiert (Frings et al., 1998). Er zeigt keine Inaktivierung, liefert Membranströme in der Größenordnung mehrerer nA (Ganzzelleableitung; s. Kapitel 3.4) und

ist K^+ -selektiv, d.h. es kommt zu keiner Überlagerung des Membranstroms durch andere Ionenkanäle wie z.B. bei Nerven- oder Herzmuskelzellen (s.u.).

Das Verhalten von Ionenkanälen kann nach der Theorie von Hodgkin und Huxley [Hodgkin and Huxley, 1952] mit einem Ersatzschaltbild der Zellmembran beschrieben werden (s. Abbildung 2-5). Dabei hängen die spezifischen Leitfähigkeiten g_{Na} und g_K für die Na^+ - und K^+ -Ionen vom Nernstpotential E_i der jeweiligen Ionenart i , der beobachteten Ionenstromdichte i_M und dem aktuellen Membranpotential V_M ab. Berücksichtigt wird die Kapazität der Zellmembran durch die spezifische Kapazität c_M . Der spannungsunabhängige Widerstand mit der spezifischen Leitfähigkeit g_L und dem zugehörigen Nernstpotential E_L beschreibt den Leckstrom, der alle anderen über der Membran fließenden Ströme zusammenfaßt.

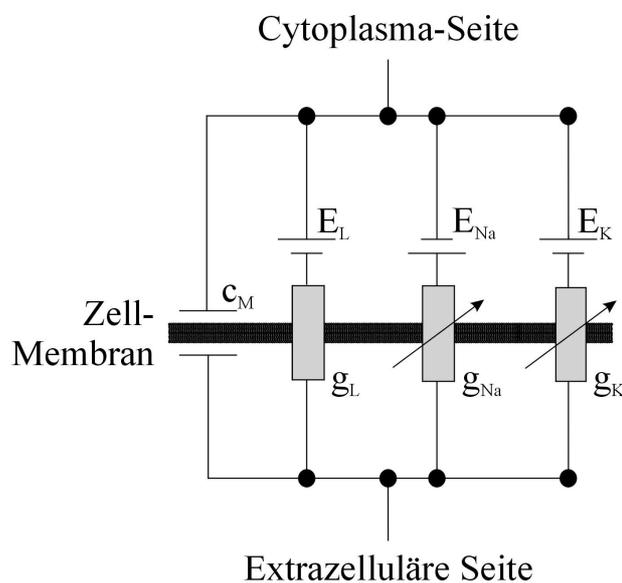


Abbildung 2-5: Das Ersatzschaltbild stellt die elektrischen Eigenschaften einer neuronalen Zelle gemäß [Hodgkin and Huxley, 1952] dar.

Die über die Zellmembran fließende Ionenstromdichte i_M ergibt sich damit als Summe aller Elemente des Ersatzschaltbildes:

$$i_M = c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{Na}(t)(V_M - E_{Na}) + g_K(t)(V_M - E_K) + g_L(t)(V_M - E_L) \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Tatsächlich sind in einer realen Zelle die Ionenleitfähigkeiten zeitlich nicht konstant. Die zeitliche Veränderung der g_i -Werte kann aber durch drei unterschiedliche, dimensionslose Parameter n , m und h beschrieben werden. Diese Parameter können Werte zwischen Null und Eins annehmen und beschreiben Bedingungen, die erfüllt sein müssen, damit sich ein Ionenkanal öffnen kann [Hille, 2001]. Ermittelt wurden sie experimentell aus Versuchen an Axonen des Tintenfischs. Nach dem Hodgkin-Huxley-Modell gilt für die Membranleitfähigkeit der K^+ -Kanäle, unter Berücksichtigung dieser Parameter, demnach:

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

Gleichung 2-5

Für die Na⁺-Kanäle gilt eine andere Bedingung [Hille, 2001]:

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

Gleichung 2-6

Somit ergibt sich für die Gleichung 2-4 eine modifizierte Version zu:

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

Gleichung 2-7

Neben K⁺-Ionenkanälen in HEK 293-Zellen, werden in dieser Arbeit auch Herzzellen (Kardiomyozyten) verwendet, bei denen Ca²⁺-Ionenkanäle eine besondere Bedeutung haben. Das Aktionspotential von Kardiomyozyten weist im Vergleich zu den Aktionspotentialen von Nervenzellen (s. Abbildung 2-3) einen etwas anderen zeitlichen Verlauf auf (Abbildung 2-6).

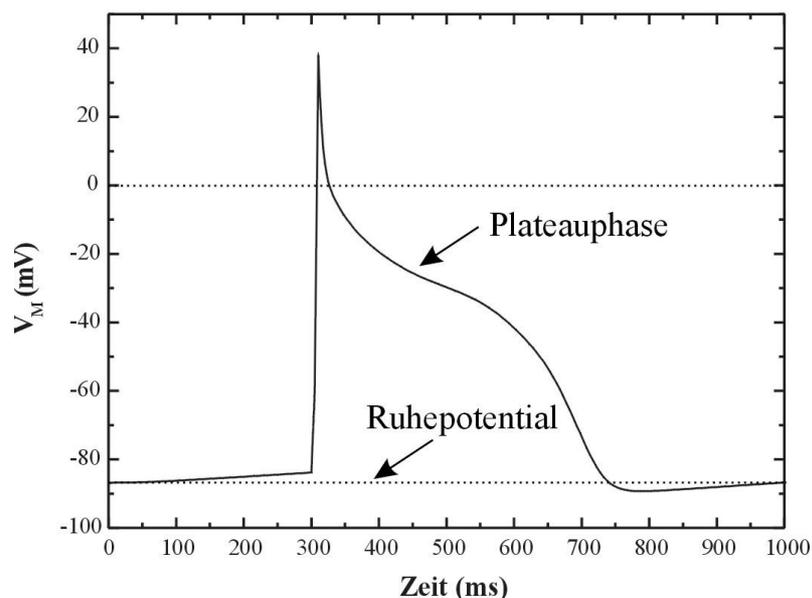


Abbildung 2-6: Aktionspotential einer Herzzelle (Purkinje-Faser) modelliert mit den Hodgkin-Huxley-Gleichungen.

Der Plateaubereich im Aktionspotential der Herzzellen (s. Abbildung 2-6) wird durch einen einwärtsgerichteten Ca²⁺-Ionenstrom verursacht, der betragsmäßig gleich dem auswärtsgerichteten K⁺-Ionenstrom ist. Das Ersatzschaltbild für Kardiomyozyten muß deshalb im Vergleich zu Abbildung 2-5 um einen spannungsabhängigen Ca²⁺-Ionenkanal erweitert werden, der im Ersatzschaltbild durch die spezifische Leitfähigkeit g_{Ca} und das Nernstpotential E_{Ca} symbolisiert wird (s. Abbildung 2-7).

Zahlreiche Filamentbündel, die als Myofibrillen bezeichnet werden, erstrecken sich der Länge nach durch die gesamte Muskelzelle. Jede Myofibrille ist in abwechselnd angeordnete hellere und dunklere Banden untergliedert, die als A- und I-Banden bezeichnet werden. Die A-Banden weisen eine dunklere Trennlinie auf, die M-Linie. Die I-Banden werden von den etwas dunkleren Z-Scheiben unterbrochen. Der Abschnitt zwischen zwei Z-Scheiben (zwei halbe I-Banden an den Rändern) und einer A-Bande (in der Mitte) wird als Sarcomer bezeichnet. Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß sich in jedem Sarcomer zwei Arten von Filamenten befinden. Die dicken Filamente bestehen aus Myosin und die dünnen Filamente aus Actin. Beide Filamente überlappen in der Mitte des Sarcomers (AI-Zone, s. Abbildung 2-8) und gleiten bei der Kontraktion des Muskels aneinander vorbei. Hierdurch wird das Sarcomer verkürzt.

Die Kontraktion wird von einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet. Die freie Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol beträgt deutlich weniger als $1 \mu\text{M}$ und wird durch spezielle Ca^{2+} -ATPasen auf diesem niedrigen Wert gehalten. Erfolgt eine Depolarisation der Zelle, so wird Calcium aus dem sarcoplasmatischen Reticulum (SR) über Ca^{2+} -Kanäle (in der SR-Membran) in das Cytosol abgegeben. Dies ist das Signal für die Muskelkontraktion. Sie endet sobald sich die Ca^{2+} -Kanäle schließen und das Calcium zurück in das SR gepumpt wird. Sogenannte „Gap-Junction“-Kanäle (zylindrische Kanäle aus 2-6 Connexinmolekülen; Cx43) erlauben den Austausch der Ca^{2+} -Ionen auch zwischen benachbarten Zellen (s. Abbildung 2-9). Dadurch wird eine synchrone Kontraktion des gesamten Muskels möglich.

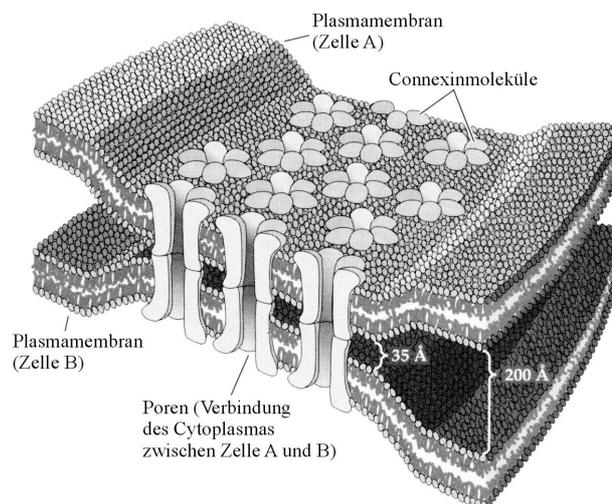


Abbildung 2-9: Gap-Junction-Kanäle „verbinden“ benachbarte Zellen und ermöglichen die schnelle und synchrone Weiterleitung elektrischer und chemischer Signale [Hille, 2001]. Jeweils sechs Connexin-Untereinheiten einer jeden Zelle verbinden sich zu einem hexagonalen Kanal.

2.2. Feldeffekttransistoren (FETs) und Mikroelektrodenarrays (MEAs)

Für die extrazelluläre Signalableitung elektrisch aktiver Zellen werden Sensoren benötigt, die Signale in einer Größenordnung von 10 bis 100 μV messen können und auf geringste Potentialänderungen reagieren. In dieser Arbeit werden dazu Feldeffekttransistoren, deren Gates nicht über Metallelektroden sondern direkt über Elektrolyte kontaktiert werden (EOSFET; electrolyte-oxide-semiconductor-FET) und Mikroelektroden benutzt, die mit den Gates sogenannter Junction-Feldeffekttransistoren (Sperrschicht-FET; [Tholl, 1978]) verbunden sind (EGE; s. Kapitel 3.3.1.1). Beiden ist aber das Meßprinzip eines Feldeffekttransistors gemein, das im folgenden erläutert wird.

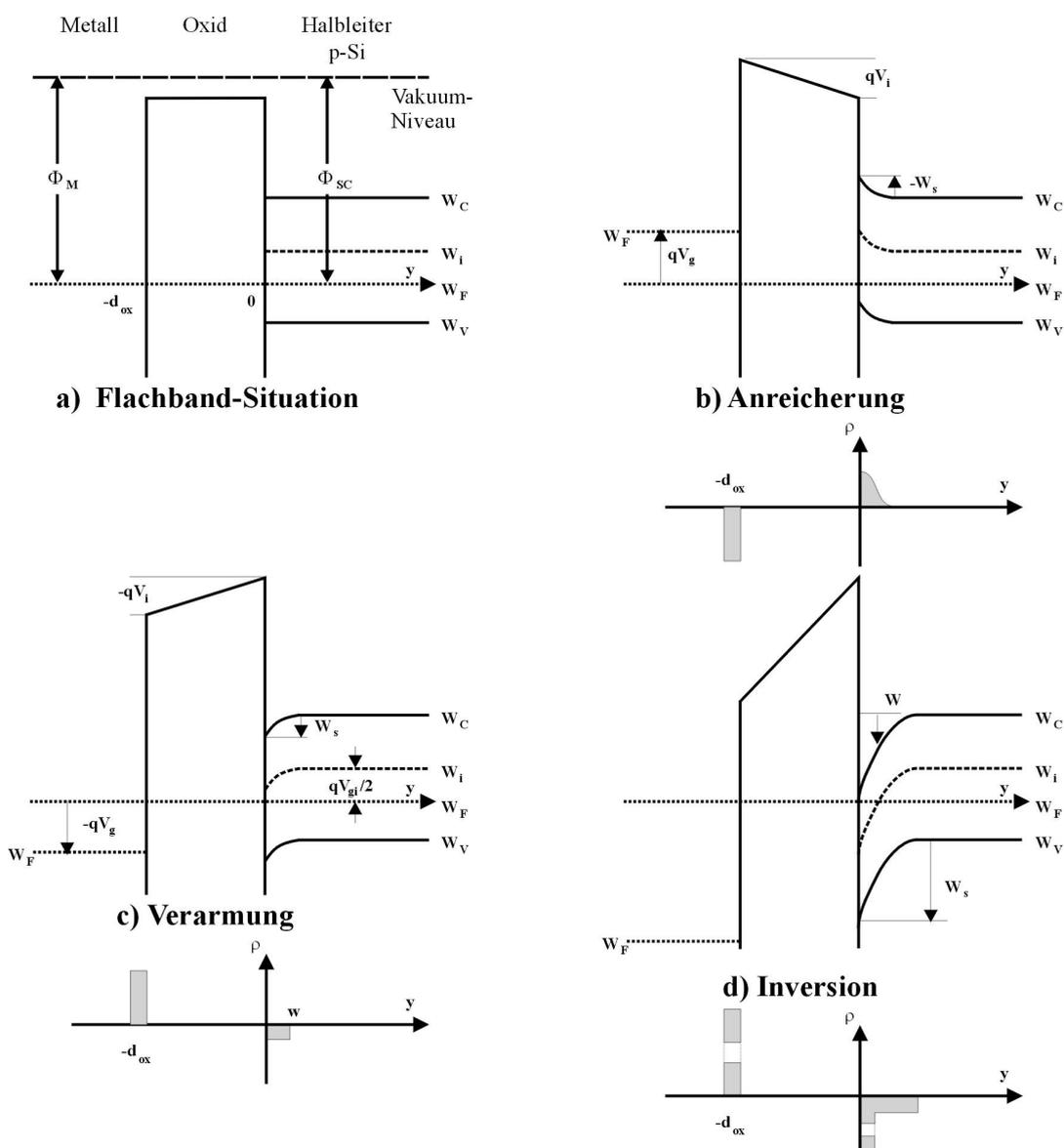


Abbildung 2-10: Bändermodell [Schlachetzki,1990]. Durch Anlegen einer externen Spannung zwischen Gate und Substrat kann die MOS-Struktur in die verschiedenen Bereiche (Anreicherung, Verarmung und Inversion) verschoben werden.

Der Feldeffekttransistor ist ein Halbleiterbauelement, das meist aus Silizium gefertigt wird. Dies liegt vor allem an den geringen Kosten und den Eigenschaften des Siliziums, da in der Siliziumtechnologie mit Siliziumdioxid ein Isolator zu Verfügung steht, der eine stabile und störstellenarme Grenzfläche zum Silizium ausbildet (geeignete Präparation vorausgesetzt). Die physikalischen Hauptvorgänge des Feldeffekttransistors finden an der Grenzfläche zwischen dem Silizium und dem Siliziumdioxid statt. Unterhalb des Siliziums bildet sich eine Raumladungszone aus, so daß das Ende des regelmäßigen Kristallgitters an der Oberfläche des Halbleiters zu einem Kontinuum von Energiezuständen (Oberflächenzuständen) im normalerweise verbotenen Bereich führt. Werden diese Zustände besetzt, so hat dies eine Oberflächenladung zur Folge, die das Gleichgewicht der Ladungsträger im Inneren des Halbleiters beeinflusst. Die Ausdehnung der Raumladungszone in den Halbleiter wird über die sogenannte Debye-Länge L_D beschrieben, die bei Halbleitern etwa 10^{-4} cm beträgt. Die Oberflächenladungen und die Raumladungszone bewirken so eine Verbiegung der Energiebänder (s. Abbildung 2-10), da die zusätzlichen Ladungen die Gleichgewichtsverteilung der Elektronen und Löcher beeinflussen.

Der MOSFET (Metall-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor), der auf den grundlegenden Arbeiten von Shockley basiert [Shockley, 1952] und 1960 erstmals auf der Basis eines thermisch oxidierten Siliziumsubstrats gefertigt wurde, ist eins der wichtigsten Bauelemente der Mikroelektronik für hochintegrierte Schaltungen wie z.B. Mikroprozessoren und Speicherchips. Der MOSFET hat in der Regel vier elektrische Anschlüsse: Source, Gate und Drain und Substrat. Ein senkrecht über dem Gateanschluß stehendes elektrisches Feld E_{St} , steuert den zwischen Source und Drain fließenden Ladungsträgerstrom I_{DS} , indem es die Ladungsträgerdichte n im oberflächennahen Bereich und damit auch die Leitfähigkeit des Stromkanals beeinflusst [Tholl, 1978, Müller, 1987, Löcherer, 1992]. Die Änderung des Ladungsträgerstroms, direkt unterhalb des dünnen Gateoxids, ist zusätzlich von der angelegten Drain-Source-Spannung V_{DS} abhängig:

$$I_{DS} \sim \sigma(E_{St})V_{DS} \sim q n \mu_n V_{DS} \sim V_{GS} V_{DS} \mu_n \quad \text{Gleichung 2-8}$$

Dabei steht $\sigma(E_{St})$ für die oberflächennahe Ladung, n für die Ladungsträgerdichte, q für die Ladung der Elektronen bzw. Löcher, V_{GS} für die Gate-Source-Spannung (s.u.) und μ_n für die Beweglichkeit der Elektronen.

Feldeffekttransistoren können hinsichtlich zweier Steuerungsarten unterschieden werden: Verarmungs- und Anreicherungssteuerung. Weist der Kanal die gleiche Dotierung wie das Drain-Source-Gebiet auf, so liegen bei der Verarmungssteuerung Ladungsträger auch ohne äußeres Steuerfeld vor. Die Regelung erfolgt über das elektrische Feld durch die Reduzierung der Ladungsträger im Kanal. Dagegen müssen die Ladungsträger im Inversionskanal bei der Anreicherungssteuerung erst durch das äußere Feld erzeugt werden. In dieser Arbeit werden

ausschließlich n- und p-Kanal-Anreicherungstypen eingesetzt. Die Funktionsweise eines Feldeffekttransistors wird im folgenden am Beispiel eines n-Kanal-Anreicherungstypen behandelt. Die nachfolgende Abbildung 2-11 zeigt ein Schema eines n-Kanal-MOSFET, wobei der industrielle Standard der Gateoxid-Dicke derzeit zwischen 3 und 4 nm liegt [Lucovsky et al., 1997; Cho et al., 1998; Cho et al., 1999; Hattori et al., 1999].

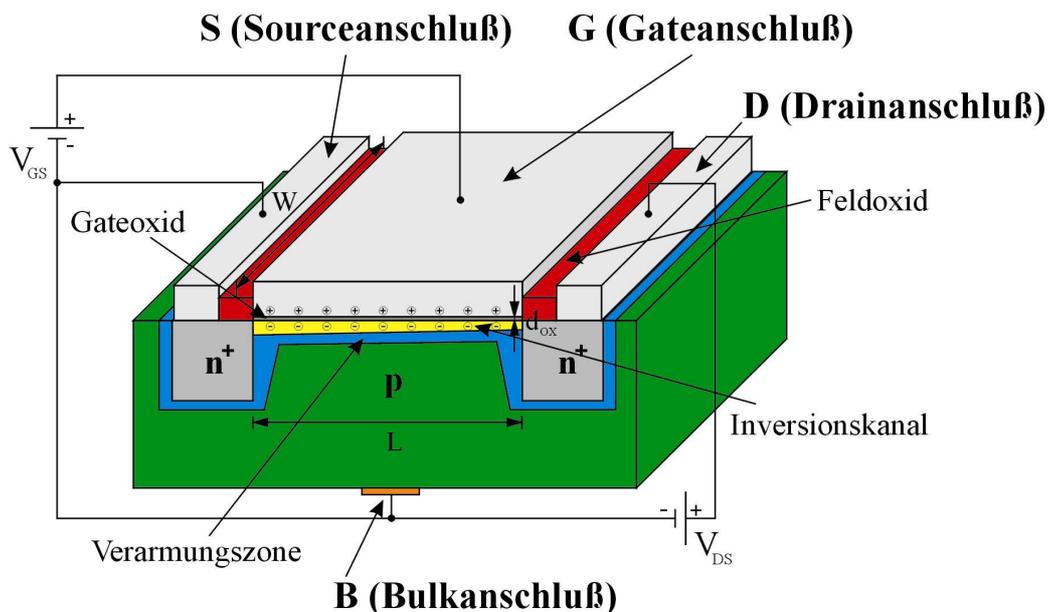


Abbildung 2-11: Das Schema zeigt einen Querschnitt durch einen n-Kanal-Anreicherungs-MOSFET. Bei positiver Gate-Source-Spannung V_{GS} wird zwischen den beiden n-dotierten Source- und Drain-Bereichen ein Inversionskanal und ein Ladungsträgerstrom I_{DS} erzeugt. Der Ladungsträgerstrom wird durch die angelegte Gate-Source-Spannung gesteuert.

Bei einem n-Kanal-Anreicherungstyp wird bei einer positiven Drain-Source-Spannung V_{DS} und einer Gate-Source-Spannung V_{GS} von 0 V kein Drain-Source-Strom I_{DS} erzeugt. Erst bei Erhöhung von V_{GS} werden durch die positiven Ladungen an der Oberfläche des Gateoxids an der Grenzfläche Oxid/p-Kanal negative Ladungen durch Influenz erzeugt. Es ergibt sich folgende Kennliniengleichung für einen n-Kanal-Anreicherungstransistor:

$$I_{DS} = \frac{k_n}{L^2} \left[(V_{GS} - V_{Th}) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad \text{mit } k_n = \mu_n c_{ox} = \mu_n \frac{\epsilon_{ox}}{d_{ox}} \quad \text{Gleichung 2-9}$$

Die Gleichung gilt analog für einen p-Kanal-Anreicherungstransistor, jedoch mit der Transistorkonstanten k_p :

$$I_{DS} = -\frac{k_p}{L^2} \left[(V_{GS} - V_{Th}) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad \text{mit } k_p = \mu_p c_{ox} = \mu_p \frac{\epsilon_{ox}}{d_{ox}} \quad \text{Gleichung 2-10}$$

Dabei steht d_{ox} für die Dicke, c_{ox} für die spezifische Kapazität und ϵ_{ox} für die Dielektrizitätskonstante des Gateoxids, μ_n und μ_p für die Mobilität der jeweiligen Ladungs-

träger und V_{Th} für die Schwellwertspannung (threshold voltage). Die Schwellwertspannung ist diejenige Spannung, bei der sich der Kanal anfängt zu öffnen. Sie ist stark abhängig vom technologischen Design des Transistors, wie z.B. Dotierungsdichte, Dicke des Gateoxids, Dimensionen des Gates, usw..

Die Drain-Source-Stromkennlinien I_{DS} in Abhängigkeit von der Drain-Source-Spannung V_{DS} bei konstanter Gate-Source-Spannung V_{GS} nennt man Ausgangskennlinien (vgl. Kapitel 3.5.2). Hingegen werden die für die Charakterisierung der Feldeffekttransistoren wichtigeren Transferkennlinien durch die Abhängigkeit des Drain-Source-Stroms I_{DS} von der Gate-Source-Spannung V_{GS} bei konstanter Drain-Source-Spannung V_{DS} beschrieben (vgl. Kapitel 3.5.2).

Wie außerdem an den Transistorkonstanten zu erkennen ist, nimmt die Oxidschichtdicke d_{ox} und die Beweglichkeit der jeweiligen Ladungsträger μ_n bzw. μ_p direkten Einfluß auf den Drain-Source-Strom I_{DS} . Bei kleinen Drain-Source-Spannungen V_{DS} wird über die gesamte Länge L ein leitender Kanal ausgebildet und I_{DS} steigt zunächst linear mit der Spannung an, später überwiegt jedoch der quadratische Term in Gleichung 2-9 bzw. Gleichung 2-10. Ab der sogenannten Abschnürspannung ($V_{DS} = V_{GS} - V_{Th} = V_{DSP}$) erlischt die Gate-Source-Spannung V_{GS} über dem Oxid am Kanalende und damit auch die Inversion. Der Drain-Source-Strom I_{DS} nähert sich dann einem konstanten Wert:

$$I_{DS}^{max} = \frac{k_n}{2L^2} V_{GS}^2 \quad \text{für } V_{DS} \geq V_{DSP} \quad \text{Gleichung 2-11}$$

Für einen p-Kanal-Transistor gilt analog:

$$I_{DS}^{max} = -\frac{k_p}{2L^2} V_{GS}^2 \quad \text{für } -V_{DS} \geq -V_{DSP} \quad \text{Gleichung 2-12}$$

Der Bereich, in dem der Drain-Source-Strom I_{DS} einen konstanten Wert erreicht, wird auch Sättigungsgebiet genannt (Kennlinienkurven verlaufen nahezu parallel; s. Abbildung 2-12). Die Sättigung des Drain-Source-Stroms I_{DS} wird als Abschnürung (pinch-off) bezeichnet. Die Sättigung des Kennlinienverlaufs entsteht dadurch, daß bei Abschnürung des Kanals und bei Source-Drain-Spannungen V_{DS} weit oberhalb der Sättigungsspannung der Hauptteil der Fermienergie zwischen dem Abschnürpunkt P (am drainseitigen Ende des Kanals) und dem Drain-Gebiet abfällt.

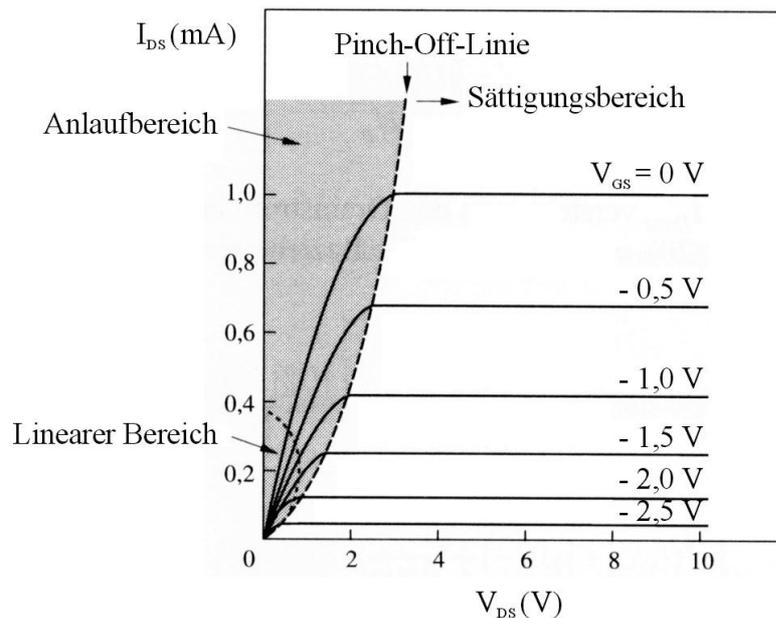


Abbildung 2-12: Ausgangskennlinienfeld eines Sperrschicht-Feldeffekttransistors mit einer Abschnürspannung $V_{DSP} = 3,2 \text{ V}$ [Schaumburg, 1991]. Der Gültigkeitsbereich der Gleichung 2-9, genannt Anlaufbereich, ist schraffiert dargestellt. Die Pinch-Off-(Abschnürungs-) Linie und der lineare Bereich sind gestrichelt eingezeichnet.

Der optimale Arbeitspunkt eines Transistors wird aus den Transferkennlinien über die Steilheit g_m (transconductance) bzw. durch die Bildung der 1. Ableitung bestimmt:

$$g_m = \frac{dI_{DS}}{dV_{GS}} \quad \text{Gleichung 2-13}$$

Wird der Transistor im Punkt mit der größten Steilheit betrieben, so werden kleine Potentialänderungen am Gate in hohe Änderungen des Drain-Source-Stroms transformiert. Beim idealen Transistor ist die Gatesteilheit g_m im aktiven Bereich (Anlaufgebiet; vgl. Abbildung 2-12) unabhängig von der Gatespannung:

$$g_m = \frac{k_n}{L^2} V_{DS} \quad \text{bzw.} \quad g_m = -\frac{k_p}{L^2} V_{DS} \quad \text{für} \quad V_{DS} \geq V_{DSP} \quad \text{bzw.} \quad -V_{DS} \geq -V_{DSP} \quad \text{Gleichung 2-14}$$

Auf Grund von Oberflächenstreuereprozessen der Ladungsträger wird die Gatesteilheit aber bei realen Transistoren mit zu- bzw. abnehmenden Gate-Source-Spannungen V_{GS} beeinflusst. Berücksichtigt werden muß außerdem, daß die bisherigen Überlegungen die physikalischen Vorgänge des Feldeffekttransistors nur sehr vereinfacht beschreiben. Die Kennlinien eines realen MOSFET weichen daher in vielen Fällen von denen eines idealen FET ab. Unberücksichtigt bleiben z.B. die nicht nur eindimensionalen Feldverhältnisse im Drain-Source-Bereich, die an der Oberfläche geringere Beweglichkeit der Ladungsträger verglichen mit der Beweglichkeit im Halbleitervolumen und die Tatsache, daß der Stromtransport nicht nur durch Drift-, sondern auch durch Diffusionsvorgänge erfolgen kann.

Wird der metallische Gatekontakt der MOS-Struktur durch einen Elektrolytkontakt ersetzt, so erhält man eine EIS (Elektrolyt-Isolator-Silizium) Struktur. Dabei dient das dünne Gateoxid als Isolatorschicht zwischen dem Elektrolyten und dem Halbleiter. Die Dicke der SiO₂-Schichten der in dieser Arbeit verwendeten Feldeffekttransistoren liegt zwischen 8 und 12 nm. Im Vergleich zur vorher behandelten MOS-Struktur entsteht an der Elektrolyt-Isolator-Grenzfläche ein zusätzlicher Potentialabfall. Im MOS-System fällt die an der Metallelektrode angelegte Spannung dagegen nur über die Oxidschicht und die Raumladungszone im Halbleiter ab.

Bei entsprechender Wahl des Isolatormaterials, z.B. Si₃N₄, Al₂O₃, Ta₂O₅, kann eine deutliche pH-Empfindlichkeit erreicht werden, die durch die Nernst-Gleichung in erster Näherung beschrieben werden kann. Einen solchen Feldeffekttransistor bezeichnet man auch als ionensensitiven Feldeffekttransistor (ISFET). Die Erfindung geht auf Bergveld zurück [Bergveld, 1970].

Mitte der 70er, Anfang der 80er Jahre wurde ein neuer theoretischer Ansatz, das sogenannte Site-Binding-Modell [Yates et al., 1974; Bousse et al., 1983; Van den Berg et al., 1985; Fung et al., 1986] entwickelt, der die pH-Sensitivität auf reine Oberflächeneffekte zurückführt. Im Kontakt mit dem Elektrolyten liegen die Oberflächengruppen in Abhängigkeit von der H⁺-Ionenkonzentration de- oder protoniert vor. Bei einem System aus thermisch oxidiertem Silizium hydrolysiert die SiO₂-Oberfläche und es bilden sich Silanolgruppen, die je nach pH-Wert der Lösung negativ, neutral oder positiv geladen vorliegen [Yates et al., 1974]. Dabei ziehen die geladenen Oberflächengruppen Gegenionen aus der Lösung an. Der pH-Wert, bei dem die Oberflächenladung gerade Null ist, wird als „Point of Zero Charge“ (pH_{pzc}) bezeichnet:

$$\text{pH}_{\text{pzc}} = -\lg \sqrt{\frac{K_A}{K_B}} \quad \text{Gleichung 2-15}$$

Dabei stellen K_A und K_B die Gleichgewichtskonstanten der De- bzw. Protonierungsreaktion dar. In der Literatur findet man für SiO₂ einen „Point of Zero Charge“ zwischen 2 und 2,5 [Bousse, 1982] und für Si₃N₄ liegt der Wert bei 5,2 [Haramé et al., 1987].

Zur Übertragung der vorgestellten Prinzipien des MOS-Systems auf das EIS-System müssen im wesentlichen nur die elektronischen Größen des Metalls beim MOSFET durch die der Elektrolytlösung beim EOSFET ersetzt werden. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß das Site-Binding-Modell keine Drift- und Hysterese-Phänomene erfaßt. Neuere Arbeiten berücksichtigen deshalb zusätzlich den Einfluß der Ionenstärke und erweitern die Theorie auf größere pH-Bereiche [Van Hal et al., 1995; Bergveld et al., 1995].

Die Ionenstärke hat auch Einfluß auf die sogenannte Helmholtz-Doppelschicht, die durch adsorbierte Gegenionen an geladenen Elektrodenoberflächen entsteht (s. Abbildung 2-13). An

die Helmholtz-Doppelschicht schließt sich nach dem Stern-Modell die diffuse Gouy-Chapmann-Schicht an (s. Abbildung 2-13).

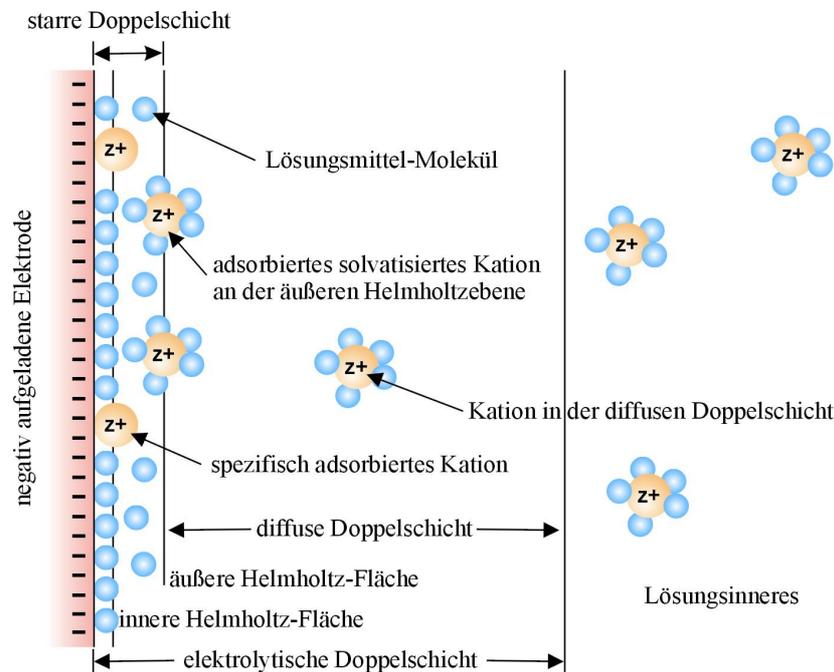


Abbildung 2-13: Modellbild zur starren und elektrolytischen Doppelschicht.

Sowohl die räumliche Ausdehnung der diffusen Schicht als auch der Potentialabfall im Elektrolyten hängen dabei von der Poisson-Boltzmann-Verteilung der Ladungsträgerkonzentrationen bzw. von der Ionenstärke der Lösung ab. Bei hinreichend hohen Ionenstärken kann die gesamte Doppelschicht aber als starr betrachtet werden.

In [Sprössler, 1997] wurde für die Feldeffekttransistoren der Potentialabfall über den Elektrolyten bei dem in der Zellkultur üblichen pH-Wert von 7,4 zu 0,19 V und die Änderung der Flachbandspannung V_{FB} zu 0,88 V bestimmt. Da aber die Kapazität der Elektrolytrandschicht C_d (etwa $20 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-1}$) die Kapazität der Oxidschicht c_{ox} (etwa $500 \text{nF}\cdot\text{cm}^{-2}$) um ein Vielfaches übertrifft, kann der Einfluß der Elektrolytrandschicht für die im folgenden beschriebenen Kopplungsmodelle ganz vernachlässigt werden. Allerdings sollte die Ionensensitivität des SiO_2 -Gates berücksichtigt werden [Liao et al., 1999; Hajji et al., 2000]. In [Sprössler, 1997; Ingebrandt, 2001] wurde folgende Werte für die Ionensensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Feldeffekttransistoren bestimmt:

- $V_{\text{gate}} = 34 \pm 2 \text{ mV/pH}$;
- $V_{\text{gate}} = 2,3 \text{ mV/pCa}$;
- $V_{\text{gate}} = 13,7 \text{ mV/pK}$;
- $V_{\text{gate}} = 94 \text{ mV/pNa}$.

2.3. Kopplungsmodelle

Zur Beschreibung der extrazellulär gemessenen Kopplungssignale aus Kapitel 4.2.2, wird das sogenannte Punkt-Kontaktmodell verwendet [Regehr et al., 1989; Fromherz et al., 1991; Grattarola and Martinoia, 1993; Schätzthauer and Fromherz, 1998; Pancrazio et al., 1999; Sprössler et al., 1999]. Dieses Modell verwendet einen Ersatzschaltkreis mit linearen elektronischen Bauteilen und geht von der Annahme aus, daß alle Ströme durch einen gemeinsamen Punkt fließen, jedoch wird die Geometrie des Kontaktes vernachlässigt (s. Abbildung 2-14).

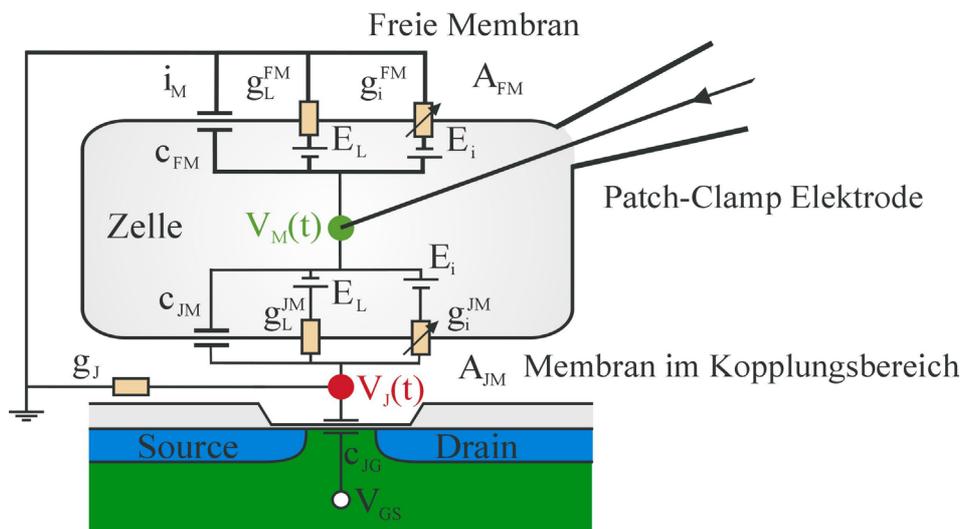


Abbildung 2-14: Schema des Punkt-Kontakt-Modells zur Beschreibung der extrazellulär gemessenen Kopplungssignale zwischen einer elektrisch aktiven Zelle und einem Feldeffekttransistor.

Die wichtigste zentrale Meßgröße stellt $V_J(t)$ dar, denn es symbolisiert die Spannungsänderung im Bereich zwischen der Zellmembran und dem Gate des Transistors. Der Drain-Source-Strom des Transistors wird zudem durch $V_J(t)$ gesteuert. Die Spannung der Zelle kann mit einer Patch-Clamp-Pipette gemessen und z.B. im Voltage-Clamp-Modus (s. Kapitel 3.4) reguliert werden. Dabei werden alle parasitären Ströme, Serienwiderstände und kapazitiven Anteile mit den Standardroutinen des Patch-Clamp-Verstärkers kompensiert (s. Kapitel 3.4). Befindet sich die Zelle unmittelbar über dem Gate eines Feldeffekttransistors, so können sowohl die Signale der Patch-Clamp-Pipette, als auch die des Transistors simultan gemessen und verglichen werden. Der resultierende Spalt zwischen der Zelle und dem Sensor wird mit der spezifischen Leitfähigkeit g_J beschrieben und als globale Seal-Leitfähigkeit pro Kopplungsfläche (junction area) A_{JM} benannt. Die Fläche der Zellmembran wird zwischen einem freien (free membrane) A_{FM} und einem anhaftenden (attached membrane) Anteil A_{JM} , mit den jeweiligen spezifischen Kapazitäten c_{JM} und c_{FM} (mit der spezifischen Membrankapazität $c_M = 1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ [Hille, 2001]), unterschieden. Die verschiedenen Ionenkanäle einer Zelle und die Leckleitfähigkeit der Zelle werden mit den spezifischen Ionenleitfähigkeiten g_i

und den zugehörigen elektrochemischen Potentialen E_i (electrochemical driving forces) beschrieben. Die zeit- und spannungsabhängigen Ionenleitfähigkeiten der Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle werden mit Hodgkin-Huxley-Elementen (Symbole von regelbaren Widerständen; [Hodgkin and Huxley, 1952]) visualisiert. Eventuell unterschiedliche Öffnungseigenschaften oder Dichten der Ionenkanäle in der Kontaktregion werden mit $g_i^{\text{JM}} = X_i \cdot g_i$ angedeutet. Dabei wird X_i als Skalierungsfaktor verwendet. Der Feldeffekttransistor wird nur über die Kapazität der Gateoxidschicht c_{JG} im Ersatzschaltkreis berücksichtigt. Durch die Anwendung der Kirchhoffschen Gesetze kann nun die zeitlich veränderliche Steuerspannung $V_{\text{J}}(t)$ in Abhängigkeit von der Membranspannung $V_{\text{M}}(t)$ berechnet werden:

$$c_{\text{JG}} \frac{dV_{\text{J}}}{dt} + g_{\text{J}} V_{\text{J}} = c_{\text{M}} \frac{d(V_{\text{M}} - V_{\text{J}})}{dt} + \sum_i g_i^{\text{JM}} (V_{\text{M}} - V_{\text{J}} - E_i^{J_0}) \quad \text{Gleichung 2-16}$$

Es bedeuten:

$c_{\text{JG}} \frac{dV_{\text{J}}}{dt}$	Verschiebestromdichte über dem Gate
$g_{\text{J}} V_{\text{J}}$	Stromdichte über dem Abdichtwiderstand
$c_{\text{M}} \frac{d(V_{\text{M}} - V_{\text{J}})}{dt}$	Kapazitive Membranstromdichte
$\sum_i g_i^{\text{JM}} (V_{\text{M}} - V_{\text{J}} - E_i^{J_0})$	Ionen- und Leckstromdichte durch die Membran im Gatebereich

Durch die folgenden drei Annahmen kann die Gleichung 2-16 weiter vereinfacht werden:

1. Das extrazelluläre Signal wird nicht vom kapazitiven Strom über das Gate beeinflusst. Der kapazitive Strom kann somit vernachlässigt werden:

$$c_{\text{JG}} \cdot dV_{\text{J}}/dt \ll g_{\text{J}} V_{\text{J}}$$

2. Die Membranspannung im Gatebereich ist ähnlich zur intrazellulären Spannung:

$$V_{\text{M}} - V_{\text{J}} \approx V_{\text{M}} \text{ bzw. } V_{\text{J}} \ll V_{\text{M}}$$

3. Die Ionenkonzentration im Spalt ändert sich nicht im Verhältnis zum restlichen Elektrolyten. Somit ergibt sich auch keine Verschiebung des Umkehrpotentials E_i^0 für jede Ionenart der Zelle:

4. Die Membranfläche im Gatebereich ist deutlich kleiner als die freie Membranfläche:

$$A_{\text{JM}}/A_{\text{FM}} \ll 1$$

Mit diesen Annahmen ergibt sich:

$$\begin{aligned} V_J &= \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_i^{JM} (V_M - E_i^0) \right) \\ &= \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i X_i g_i (V_M - E_i^0) \right) \end{aligned} \quad \text{Gleichung 2-17}$$

Die Ganzzell-Stromdichte i_M (vgl. Kapitel 3.4) lässt sich mit der Annahme einer ordnungsgemäß durchgeführten Kompensation der parasitären Parameter beschreiben zu:

$$i_M = \sum_i i_i^M = \sum_i g_i (V_M - E_i^0) \quad \text{Gleichung 2-18}$$

Mit Gleichung 2-18 kann Gleichung 2-17 umgeformt werden:

$$V_J = \frac{1}{g_J} \left(c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i X_i i_i^M \right) \quad \text{Gleichung 2-19}$$

Eine simultane Messung von V_J und i_M erlaubt bei Kenntnis der spezifischen „Seal“-Leitfähigkeit g_J Unterschiede zwischen der freien und der anhaftenden Zellmembran festzustellen. Die spezifische Seal-Leitfähigkeit g_J kann z.B. über eine frequenzabhängige Impedanzanalyse [Fromherz et al., 1993] bestimmt werden, oder wie in dieser Arbeit über die kapazitiven Signale der Spannungssprünge (voltage step pulses) während eines Voltage-Clamp-Kopplungsexperimentes. Mit den Spitzenhöhen (tip heights) der resultierenden kapazitiven Transienten im extrazellulären Signal kann dann g_J abgeschätzt werden:

$$g_J = \frac{1}{V_J^0} \left(\frac{dV_M}{dt} \right) c_M \quad \text{Gleichung 2-20}$$

Für die Ableitung des Pulses im Zellinneren (dV_M/dt) müssen sowohl der durch das Öffnen der Zellmembran entstandene Serienwiderstand R_S , als auch die zusätzlichen kapazitiven Anteile im Stromsignal (c_{slow} -Kompensation; s. Kapitel 3.4) berücksichtigt werden [Marty and Neher, 1995; Sigworth, 1995-b]. Das Aufladen dieser Kapazitäten reduziert die Steilheit des Stimulationspulses V_M im Zellinneren über ein exponentielles Gesetz:

1. Für einen positiven Pulssprung:

$$V_M = V_{Step} \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{R_S \cdot C_{Slow}}\right) \right) \quad \text{Gleichung 2-21}$$

$$\text{bzw.} \cdot \frac{dV_M}{dt} = V_{Step} \cdot \frac{1}{R_S \cdot C_{Slow}} \cdot \exp\left(\frac{-t}{R_S \cdot C_{Slow}}\right) \quad \text{Gleichung 2-22}$$

2. Für einen negativen Pulssprung:

$$V_M = V_{\text{Step}} \cdot \exp\left(\frac{-t}{R_S \cdot C_{\text{Slow}}}\right) \quad \text{Gleichung 2-23}$$

$$\text{bzw.: } \frac{dV_M}{dt} = -V_{\text{Step}} \cdot \frac{1}{R_S \cdot C_{\text{Slow}}} \cdot \exp\left(\frac{-t}{R_S \cdot C_{\text{Slow}}}\right) \quad \text{Gleichung 2-24}$$

Mit diesen beiden Gleichungen lassen sich die kapazitiv gekoppelten Spitzen am Anfang und am Ende eines Stimulationspulses voraussagen [Ingebrandt, 2001]. Die erste Spitze weist in positive und die zweite Spitze in negative Richtung.

3. Experimentelles

3.1. Oberflächenanalyse und spezielle Präparationstechniken

In diesem Kapitel werden die zur Charakterisierung und Analyse der Oberflächen benutzten Geräte und spezielle Präparationstechniken vorgestellt.

3.1.1. Lichtmikroskopie

Für die Erstellung von digitalen Photographien wurde eine Kamera der Firma Nikon eingesetzt (Nikon Coolpix 990, 3,34 Megapixel). Diese konnte bei Bedarf mit einem C-Mount und einem EH-30 AC-Adapter auf ein Mikroskop montiert werden. Die auf dem Kamerachip gespeicherten JPEG-Aufnahmen wurden mit einem handelsüblichen PC ausgelesen.

3.1.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (LEO-Gemini 1550, Deutschland) erstellt und als Tiff-Dateien gespeichert.

Da die meisten Oberflächen der in dieser Arbeit verwendeten Proben nichtleitend waren, wurde bei Bedarf eine etwa 10 nm dicke Schicht aus Gold abgeschieden (Sputter-Coater SCD004, Balzers, Deutschland). Dies verhinderte eine störende Aufladung der Oberfläche. Das Vakuum lag bei etwa $4 \cdot 10^{-3}$ mbar und die Bedampfungsrates betrug etwa $10 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der biologischen Zellen in Kapitel 4.1 mußte ein spezieller Trocknungsprozeß angewendet werden. Dazu wurde das Zellkulturmedium der Proben zunächst vorsichtig abpipettiert, mit 2,5 % Glutarialdehyd-Lösung (zur molekularen Quervernetzung) behandelt und mehrfachen Spülschritten mit Aceton unterworfen. Eine genaue Präparationsanleitung ist im Anhang 6.1 dargestellt. Die so präparierten Proben wurden anschließend einer kritischen Punkttrocknung mit superkritischem CO_2 unterzogen (BAL-TEC CPD030, Critical Point Dryer, Deutschland). Bei Anwendung dieser Präparationsvorschrift erhält man Proben bzw. Zellen, die nahezu keine „Artefakte“ aufweisen. „Artefakte“ können durch Kapillarkräfte beim Trocknungsprozeß hervorgerufen werden.

3.1.3. Atomkraftmikroskopie (AFM)

Zur Oberflächen- und Rauigkeitsanalyse der anisotrop geätzten Proben wurde ein Atomkraftmikroskop (Typ: MMAFM-2) der Firma Digital Instruments eingesetzt. Als AFM-Sonden wurden kommerziell erhältliche Cantilever der Firma Nanoprobe benutzt. Das Gerät wurde im „tapping-mode“ betrieben. Als Software wurde Nanoscope von Digital Instruments in der Version 4.1 eingesetzt.

3.1.4. Elektrochemische Messungen

Zur Erstellung der Zyklovoltammogramme in Kapitel 3.5.1 wurde ein am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entwickelter Potentiostat (Typ Schiller) mit Dreiecksgenerator eingesetzt. Zur Messdatenerfassung diente das von A. Thies entwickelte Meßprogramm Osiris [Thies, 1991]. Die Steuerung und Datenerfassung erfolgte über eine AD/DA-Einschubkarte ME-30 der Firma Meilhaus von einem IBM-kompatiblen PC aus. Als Strom-Spannungswandler wurde ein von M. Schramm am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Heinrich-Heine-Universität entwickeltes Gerät mit automatischer Meßbereichsumschaltung vom Typ Hidyn eingesetzt. Für die Kapazitätsmessungen wurde zusätzlich ein Zweiphasen-Lock-In-Verstärker der Firma HMS-Elektronik verwendet. Dieser registriert die Antwort des elektrochemischen Systems auf eine dem Potential der Meßelektrode überlagerte Sinusspannung mit einer Amplitude von 1 mV und einer Frequenz von 1013 Hz. Die Bestimmung des Widerstandes der Goldelektroden, erfolgte über eine Impedanzmessung. Dazu wurde ein Frequency-Response-Analyzer (TF2000) der Firma Voltech benutzt. Die Messung der Impedanz erfolgte bei einer üblichen Frequenz von 1 kHz.

Als Gegenelektroden wurden Golddrähte von 99,99 %-iger Reinheit und einer Dicke von 0,02 cm verwendet.

Als Bezugslektroden dienten Hg/Hg₂SO₄-Elektroden mit Haber-Luggin-Kapillare in 0,5 M H₂SO₄ ($U_0 = +680$ mV gegen SHE (Standard-Wasserstoff-Elektrode)). Bei der Auswertung der Meßergebnisse wurde keine Korrektur von Diffusionspotentialen angrenzender Meßelektrolyte vorgenommen, da diese maximal in der Größenordnung einiger 10 mV lagen.

3.2. Herstellung und Layout der Zellträger

In diesem Kapitel werden die Layouts und Herstellungstechniken der verschiedenen strukturierten Siliziumproben, die für die Anwachsversuche in Kapitel 4.1 benötigt werden, erläutert. Danach folgt eine genaue Beschreibung der neu aus Silizium gefertigten Mikroelektrodenarrays und eine Darstellung der benutzten Feldeffekttransistoren.

3.2.1. Strukturiertes Silizium für Zellanwachsversuche

Die strukturierten Siliziumproben lassen sich in zwei verschiedene Typen einteilen. Es folgen zunächst die anisotrop geätzten V-förmigen Strukturen und im Anschluß daran die Proben aus porösem Silizium.

3.2.1.1. Anisotrop geätzte V-Strukturen

Für die anisotrop geätzten Strukturen wurde eine neue Maske hergestellt, die in Abbildung 3-1 zu sehen ist.

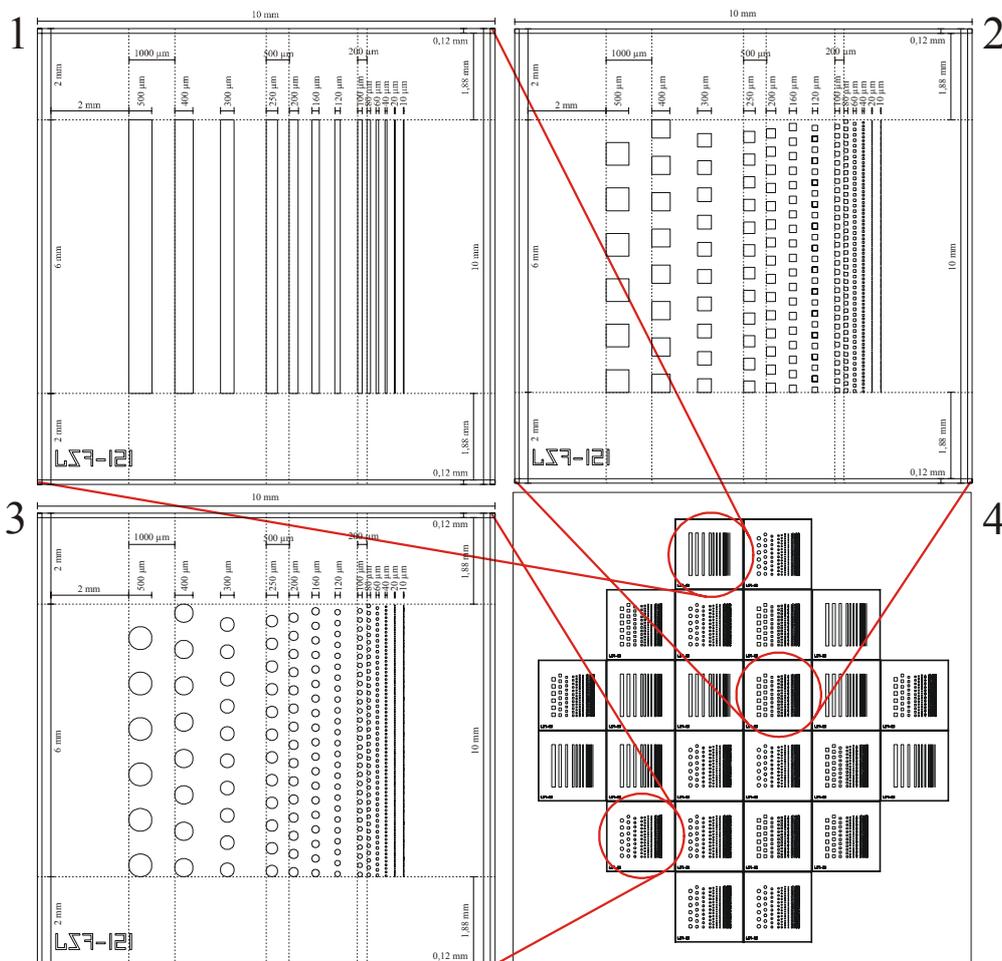


Abbildung 3-1: Maskenlayout für Zellanwachsversuche mit unterschiedlichen Größen und geometrischen Formen. Zu sehen sind in der Zeichnung 1 die bandförmigen, in Zeichnung 2 die quadratischen und in Zeichnung 3 die kreisförmigen Strukturen. Ausschnitt 4 zeigt die Anordnung der verschiedenen Struktursätze auf der Glasmaste.

Die Maske besteht aus Quarzglas, auf der sich eine mittels Elektronenstrahlolithographie photolithographisch strukturierte Chromschicht befindet. Die Maskenlayouts werden mit AutoCad von autodesk gezeichnet. Das Design der Geometrien ist quadratisch, bandförmig und rund. Die Größe dieser unterschiedlichen geometrischen Formen variiert jeweils von 500 μm über 400 μm , 300 μm , 250 μm , 200 μm , 160 μm , 120 μm , 100 μm , 80 μm , 60 μm , 40 μm , 20 μm und 10 μm . Mittels Kontaktlithographie (vgl. Kapitel 3.2.2.2) werden die Strukturen der Maske auf {100}-Silizium Wafer (International Wafer Service, Phosphor-dotiert, Widerstand 12,0-23,0 $\Omega\text{-cm}$, Dicke 331-431 μm) übertragen. Am Ende der lithographischen Prozessschritte schließt sich eine Ätzung mit 40 %-iger wäßriger alkalischer Lösung aus Kaliumhydroxid (KOH) an. Die Abbildung 3-2 zeigt eine Übersicht der einzelnen durchgeführten Prozessschritte.

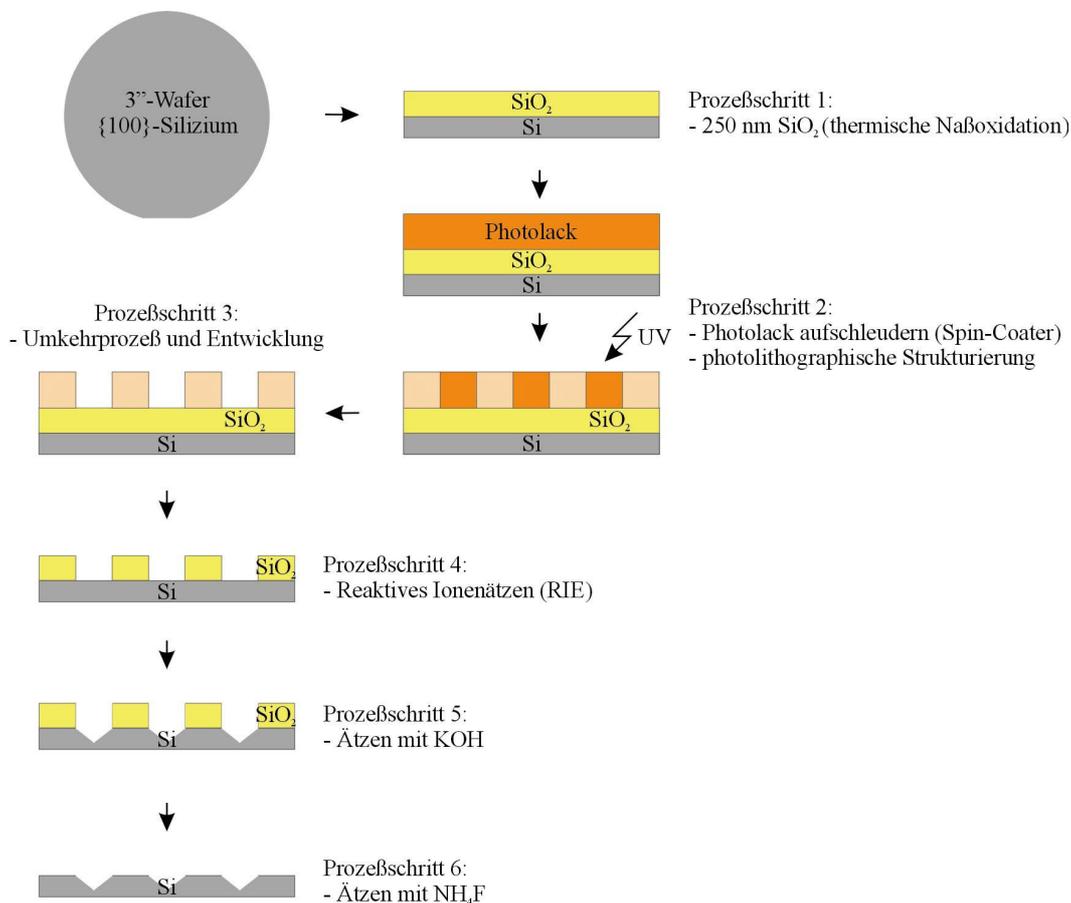


Abbildung 3-2: Schematischer Herstellungsprozess der anisotrop geätzten V-förmigen Strukturen: Prozessschritte 1 bis 4 gemäß Kontaktlithographie. Prozessschritt 5 dient zur Erzeugung der V-förmigen Strukturen unter Ausnutzung der Anisotropie der einzelnen Kristallrichtungen. Prozessschritt 6 entfernt Maskierungsschicht für den Ätzprozess.

Das SiO_2 in Prozessschritt 5 dient als Maskierungsschicht, da die Ätzrate nur etwa 60 nm pro Stunde beträgt [Lang, 1996]. Die Ätzrate des Siliziums beträgt dagegen etwa 60 μm pro Stunde (bei Verwendung einer 40 Vol.-% KOH-Lösung und einer Temperatur von 70 $^\circ\text{C}$).

Außerdem liegt die Ätzrate der $\{111\}$ -Kristallebene, die sich im Winkel von $54,74^\circ$ zur $\{100\}$ -Ebene befindet [Gerlach und Dötzel, 1997], im Vergleich zu den anderen Hauptebenen um ein bis zwei Größenordnungen niedriger (unterschiedliche Aktivierungsenergien für das Herauslösen der Siliziumatome). Infolge der Abhängigkeit der Ätzrate von der Kristallebene erhält man anisotrop geätzte V-förmige Strukturen, die in Abbildung 3-3 zu sehen sind.

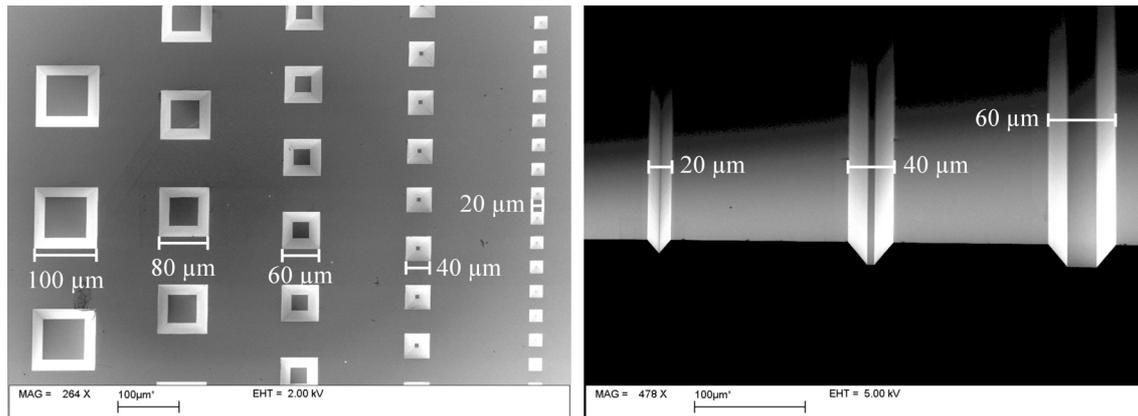


Abbildung 3-3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der erzeugten anisotropen V-förmigen Strukturen. Das linke Bild zeigt die quadratischen und das rechte Bild die band- oder grabenförmigen Strukturen.

Die Tiefe der geätzten Strukturen ist extrem abhängig von der Konzentration und der Temperatur des Ätzmittels. Außerdem wird die Ätzrate stark von dem Dotierungspegel im Silizium beeinflusst. Die Tiefe der in Abbildung 3-3 gezeigten Strukturen beträgt etwa $30\ \mu\text{m}$. Die genaue Ermittlung der Äztiefe erfolgte mit einer Dektak-Messung (Profilschan). Je nach Größe der Geometrie resultiert entweder eine pyramidale (V-förmige) oder eine trapezförmige Struktur. Dies ist in den beiden Aufnahmen der Abbildung 3-3 deutlich zu erkennen. Rein pyramidalförmige Gebilde werden erhalten, wenn die Größe der Struktur kleiner als $40\ \mu\text{m}$ ist, ansonsten resultieren trapezförmige Gebilde.

Die so hergestellten Silizium-Wafer werden nach einem anschließenden Reinigungsschritt mit Reinstwasser in 24 gleich große Stücke zersägt oder mit einem Diamantstift geritzt und gebrochen. Die Kantenlängen dieser Stücke betragen je $1\ \text{cm}$ (vgl. Abbildung 3-1).

Zusätzlich wurden unterschiedliche Isolatorschichten mittels PECVD (plasma enhanced chemical vapour deposition) oder LPCVD (low pressure chemical vapour deposition) und Metalle mittels Elektronenstrahlverdampfung auf den Wafern abgeschieden. Abbildung 3-4 zeigt die mit dem LPCVD-Verfahren hergestellten Schichten. Deutlich ist die homogene Struktur der abgeschiedenen SiO_2 -Schicht zu erkennen. Diese Homogenität wird auch bei Abscheidung einer weiteren Schicht aus Si_3N_4 (sog. Duplexschicht) nicht beeinträchtigt. Die Dicke der in Abbildung 3-4 abgeschiedenen SiO_2 -Schichten beträgt ungefähr $30\ \text{nm}$ und die Dicke der Si_3N_4 -Schicht etwa $50\ \text{nm}$. Bei den abgeschiedenen Metallschichten handelt es

sich um Goldschichten mit einer Dicke von 300 nm und um Titanschichten mit einer Dicke von 30 nm.

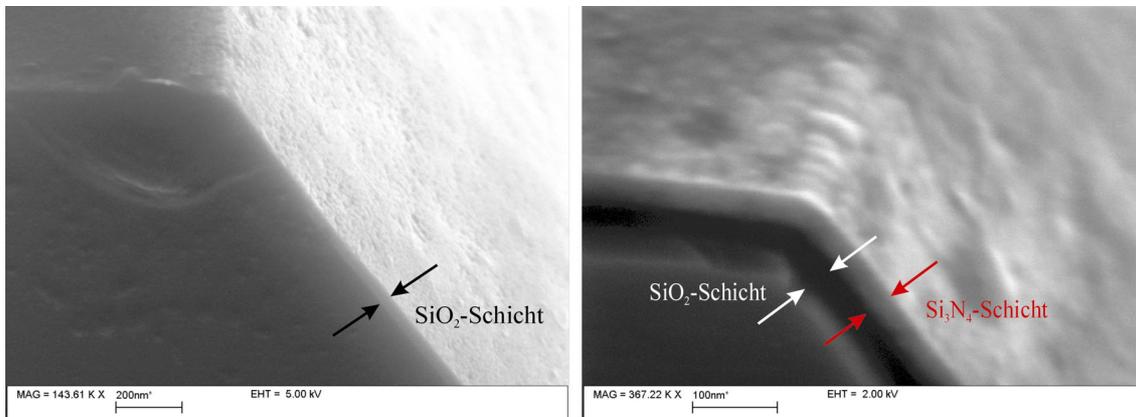


Abbildung 3-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der erzeugten anisotropen V-förmigen Strukturen.

Mit den so hergestellten und modifizierten Proben wurden Anwachsversuche durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, ob die Größe, die Geometrie oder die Oberflächenbeschichtung der verschiedenen Strukturen einen Einfluß auf das Wachstum der Zellen hat. Die Ergebnisse dieser Untersuchung beschreibt Kapitel 4.1.

3.2.1.2. Poröses Silizium

Zur Herstellung von porösem Silizium mit Makroporen (> 50 nm) wird eine Ätzzelle mit horizontalen Aufbau eingesetzt (Abbildung 3-5).

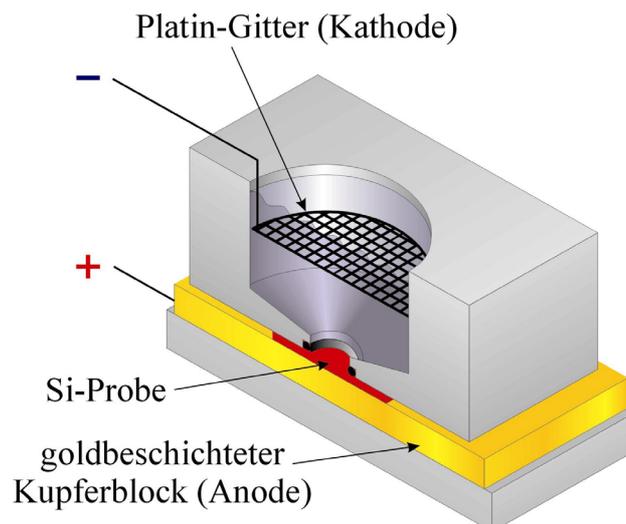


Abbildung 3-5: Ätzzelle zur Erzeugung von makroporösem Silizium. Die Ätzfläche beträgt etwa 3 cm^2 .

Zur Rückseitenkontaktierung muß zuvor ein Goldrückseitenkontakt mittels Elektronenstrahlverdampfung auf einen Silizium-Wafer aufgebracht werden (5 nm Cr, 150 nm Sb/Au,

20 nm Au). Ein 3“-Silizium-Wafer wird danach in vier gleich große Stücke gebrochen und die vereinzelt Siliziumbruchstücke werden für drei Minuten im Ultraschallbad mit Aceton und danach ebenfalls im Ultraschallbad für drei Minuten mit Isopropanol gereinigt. Zuletzt wird mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Als Gegenelektrode wird eine Platinringelektrode eingesetzt. Zur Erzeugung der Makroporen werden n-dotierte {100}-Silizium Wafer (International Wafer Service, Phosphor-dotiert, Widerstand 12-23 Ω -cm, Dicke 331-431 μ m) verwendet und eine Frontseitenbeleuchtung durchgeführt [Lehmann, 1988; Ponomarev and Lévy-Clément, 2000; Heijo et al., 2000]. Dabei werden die zur Reaktion benötigten Ladungsträger durch Licht aus einer Halogenlampe erzeugt. Der Abstand der Lampe beträgt etwa 20 cm (12 V, 4 A). Als Ätzlösung wird eine Standardätzlösung aus 25 % Flußsäure, 25 % Wasser und 25 % Ethanol benutzt. Die Stromdichte im Bad wird während des Ätzborganges (10 Minuten) auf 6 mA·cm⁻² eingestellt (Keithley 238). Nach erfolgter Ätzung werden die Waferstücke mit Reinstwasser abgespült und für 10 Sekunden in 1 M Kaliumhydroxid-Lösung getaucht (Entfernung der mesoporösen Deckschicht). Als letzter Schritt erfolgt eine erneute Spülung mit Reinstwasser und eine Trocknung mit Stickstoff. Verschiedene Modelle zum Bildungsmechanismus des porösen Siliziums finden sich in [Thönissen, 1999; Crott, 1996; Smith and Collins, 1992; Beale et al., 1985].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine neue Ätzkammer aus Teflon mit vertikaler Lage der Probe entwickelt (Abbildung 3-6).

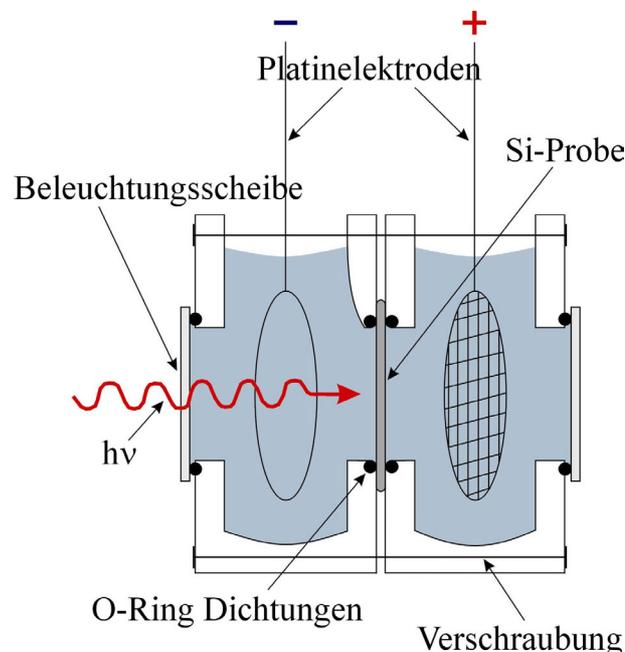


Abbildung 3-6: Zweite Ätzkammer für die Herstellung von porösem Silizium. Bei diesem Aufbau wird die Probe in vertikaler Lage gehalten. Die Ätzfläche beträgt etwa 3 cm².

Im Vergleich zu der vorherigen Ätzzelle mit horizontalem Aufbau hat dies den Vorteil, daß zur Rückseitenkontaktierung eine Flüssigkeit benutzt werden kann. Die Probe muß nicht zuvor mit einem metallischen Rückseitenkontakt versehen werden und es können, für spätere Oberflächenmodifikationen, auch Hochtemperaturprozesse wie z.B. das LPCVD- (low pressure chemical vapour deposition) Verfahren eingesetzt werden. Allerdings müssen bei Verwendung dieses Aufbaus höhere Stromdichten (mehr als $25 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) benutzt werden und es resultieren nicht so homogene Schichten wie bei Verwendung der horizontalen Ätzzelle. Dies liegt vermutlich daran, daß entstehende Gasbläschen nur langsam auf der Oberfläche nach oben gleiten und so eine kurzzeitige lokale Isolation der Oberfläche bewirken. Weitere Untersuchungen bezüglich dieses Meßaufbaus sind in [Ruge, 2001] zu finden.

Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 zeigen die erhaltenen makroporösen Strukturen, aus unterschiedlichen Blickwinkeln, nach Durchführung der zuvor dargestellten Prozessschritte.

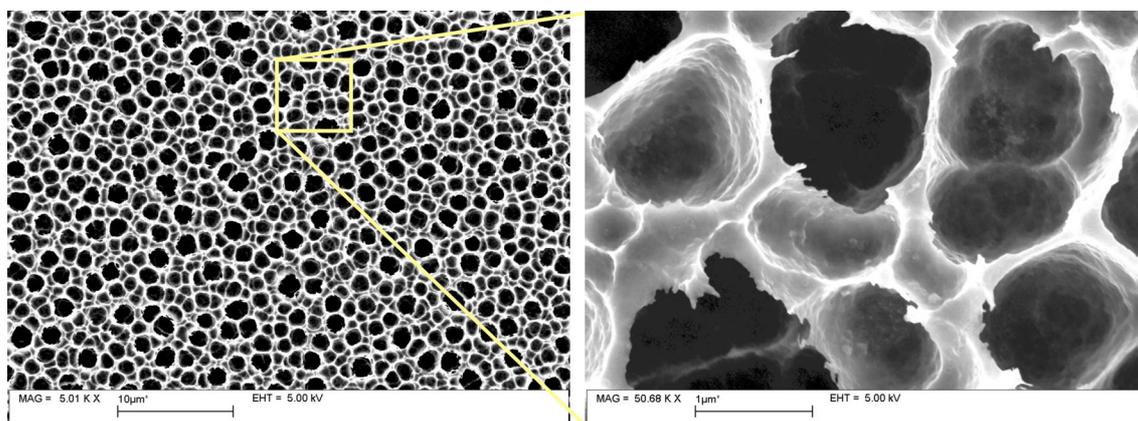


Abbildung 3-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der erzeugten makroporösen Siliziumproben. Das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der linken Aufnahme.

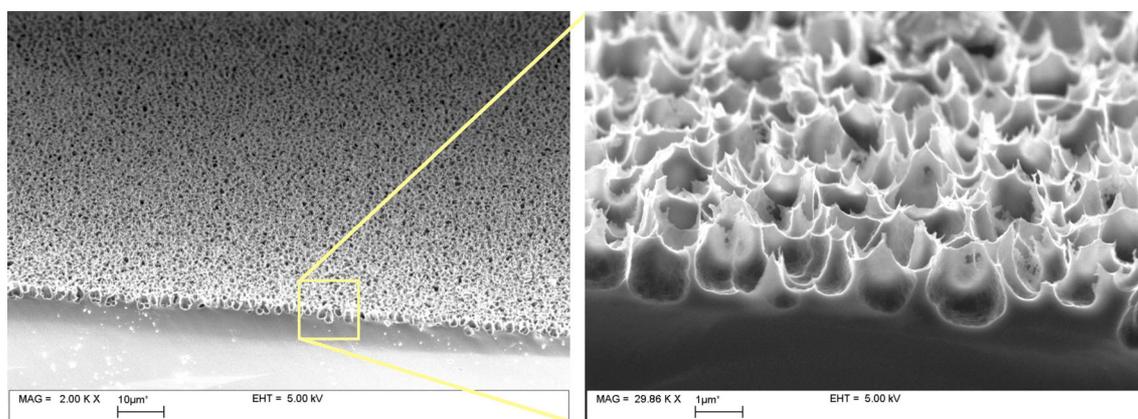


Abbildung 3-8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der erzeugten makroporösen Siliziumproben. Die rechte Aufnahme stellt einen vergrößerten Ausschnitt des linken Bildes dar (Detektor des Rasterelektronenmikroskops um 45° zur Hauptachse verschoben).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3-7 wurden von oben und die Aufnahmen aus Abbildung 3-8 aus einer um 45° zur Hauptachse verschobenen Lage des Detektors des Rasterelektronenmikroskops aufgenommen (gleiche Probe). Um das Tiefenprofil der Poren abbilden zu können, wurden die Probe zuvor entlang der $\langle 110 \rangle$ -Richtung gebrochen. Die durchschnittliche Porenbreite beträgt etwa $1,5 \mu\text{m}$ und die Porentiefe ungefähr $1,5 \mu\text{m}$.

Mit den so hergestellten makroporösen Siliziumproben wurden ebenfalls Anwachsversuche durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.1 vorgestellt.

3.2.2. Mikroelektrodenarrays

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit speziell gefertigten Mikroelektrodenarrays vorgestellt. Mit diesen Arrays wurden Messungen an Kardiomyozyten durchgeführt (Kapitel 4.2.1).

3.2.2.1. Layout

Das Layout des Mikroelektrodenarrays wurde an die bereits vorhandene Meßelektronik angepaßt. Der am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz entwickelte Verstärker ist in der Lage, Meßsignale von maximal 64 Elektroden aufzuzeichnen. Außerdem mußten die Anschlüsse (Bondpads) der Mikroelektroden kompatibel zu den Trägerplatinen sein. Diese Anforderungen berücksichtigend entstand das in Abbildung 3-9 gezeigte Layout.

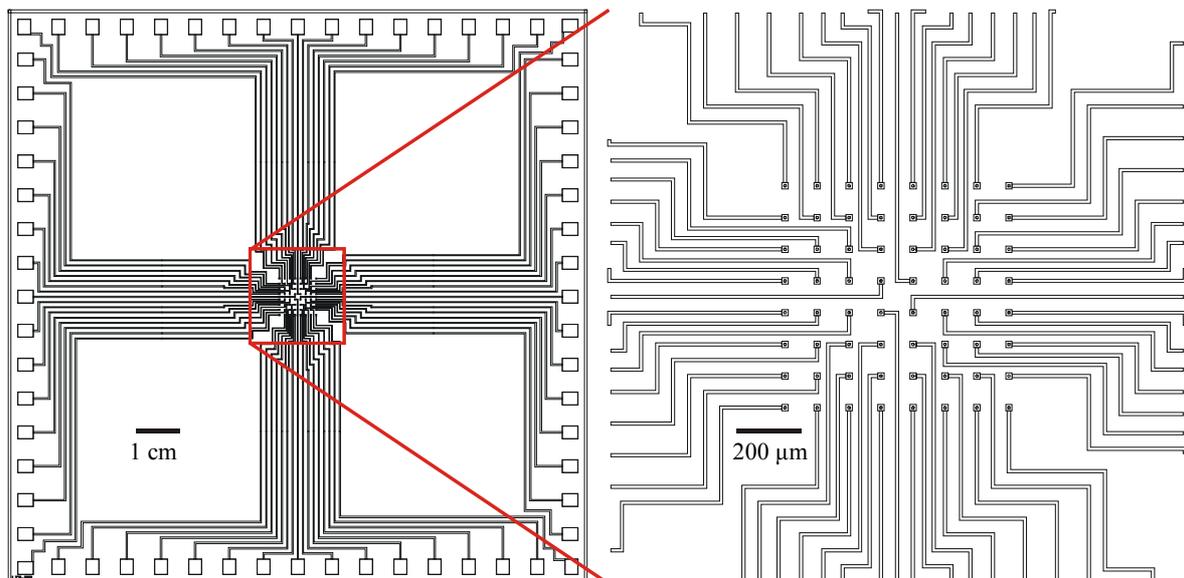


Abbildung 3-9: Layout des für diese Arbeit speziell gefertigten Mikroelektrodenarrays. Die rechte Zeichnung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Zentrums.

Das Mikroelektrodenarray besteht aus 64 Elektroden, die in einer 8x8 Matrix angeordnet sind (vgl. vergrößerten Bildausschnitt in Abbildung 3-9). Jede einzelne Elektrode hat einen Durchmesser von 8 μm . Das fertig prozessierte Array hat eine Kantenlänge von 11 mm. Der Abstand zwischen den einzelnen Elektroden beträgt jeweils 100 μm . Dieser Abstand ist groß genug um eine gegenseitige Beeinflussung (cross-talk) zwischen den einzelnen Elektroden zu verhindern und es können für zukünftige μ -Contact-Printing-Versuche bereits hergestellte Stempeldesigns verwendet werden. Jede einzelne Mikroelektrode ist über genau eine Leiterbahn mit den Kontaktbereichen (bondpads) am äußeren Bereich des Arrays verbunden (vgl. linkes Bild in Abbildung 3-9). Diese haben eine Kantenlänge von 240 μm . Auf den verwendeten 3“-Siliziumwafern befinden sich insgesamt 25 der in Abbildung 3-9 gezeigten Arrays.

3.2.2.2. Prozessierung

Die Mikroelektrodenarrays wurden in Siliziumplanartechnologie mittels Kontaktlithographie hergestellt [Steppan et al., 1982]. Ein Schema der Prozessierung ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Als Substrat dienten p-dotierte {100}-Silizium Wafer (TOPSIL, Bor-dotiert, Widerstand 1000 $\Omega\cdot\text{cm}$, Dicke 381 ± 25 μm), die zu Beginn des Prozesses einer naßchemischen Reinigung (sog. RCA Reinigung, vgl. Anhang 6.2) unterzogen wurden. Bei diesem Prozeß wurden sowohl organische als auch anorganische Verunreinigungen entfernt. Im Anschluß an den Grundreinigungsprozeß wurden die Silizium-Wafer in einem beheizten Oxidationsofen thermisch oxidiert (ca. 600 nm; Oxidationsrezept „WETOX 1050“). Als Prozeßgase wurden H_2 und O_2 im Verhältnis 2:1 bei Atmosphärendruck eingesetzt. Dabei wurde eine dielektrische SiO_2 -Schicht erzeugt, die als Isolator zwischen den im Anschluß aufzubringenden Metallschichten und dem halbleitenden Silizium-Wafer dient (Prozeßschritt 1 in Abbildung 3-10). Mit einer Lackschleuder wurde ein Photolack (AZ5214) aufgebracht und auf einer Heizplatte (hotplate) ausgehärtet (Prozeßschritt 2 in Abbildung 3-10). Die so aufgebraachte Lackschicht war etwa 1,4 μm dick. In einem ersten Photolithographieschritt wurden die Strukturen der Leiterbahnen mit einem Belichter (MA 6; Firma Karl-Süss) auf den Wafer übertragen. Danach erfolgte eine Entwicklung der belichteten Strukturen (Entwickler MIF312) und eine optische Kontrolle der so erzeugten Strukturen (Prozeßschritt 2 in Abbildung 3-10). Da die Leiterbahnen von einer anorganischen Passivierungsschicht abgedeckt werden, die gegen innere Zug- und Druckspannungen besonders anfällig ist, folgte eine optionale Grabenätzung. Mit einer Ammoniumfluoridlösung wurden die Gräben in die SiO_2 -Schicht geätzt, die später die Leiterbahnen und Elektroden aufnahmen und so die Oberfläche „glätteten“. Als Ätzmaske diente der zuvor strukturierte Photolack. Die Ätzrate betrug etwa 80 nm pro Minute (Prozeßschritt 3 in Abbildung 3-10). Mittels Elektronenstrahlverdampfung erfolgte die

Abscheidung der benötigten Metallschichten im Hochvakuum. Um eine mangelnde Haftung der Goldschicht auf dem SiO₂ und eine Diffusion in diese Schicht zu verhindern, wurde zuerst eine 30 nm dicke Titanschicht aufgedampft. Auf diese als Haftvermittler bezeichnete Schicht wurde eine 300 nm dicke Goldschicht als Leiterbahn- und Elektrodenmaterial aufgebracht. Um die Haftung zwischen dieser Schicht und der späteren Passivierung zu verbessern, erfolgte eine zusätzliche Abscheidung einer weiteren 30 nm dicken Titanschicht (Prozeßschritt 4 in Abbildung 3-10).

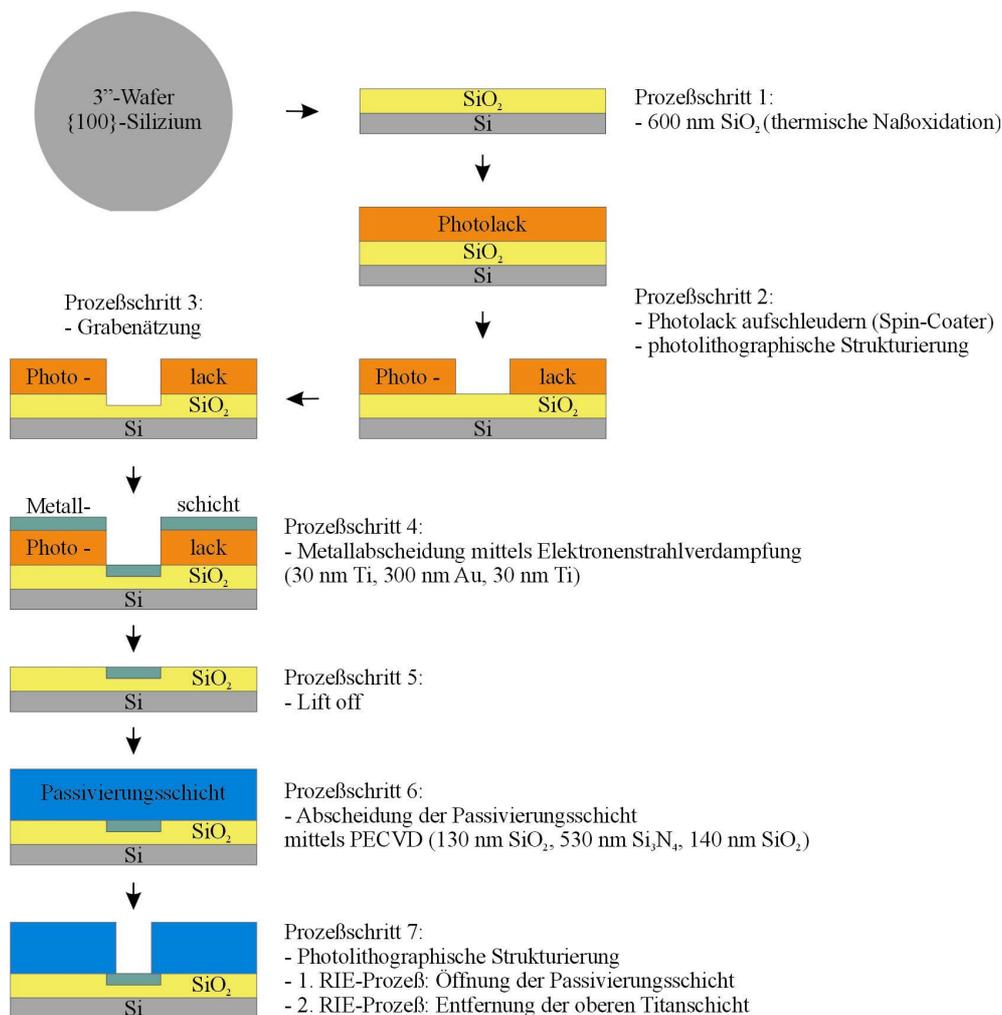


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung der einzelnen Prozessschritte zur Fertigung der Mikroelektrodenarrays.

Mittels Lift-off-Technik wurde der Photolack in einem Acetonbad entfernt. Durch Ultraschall kann der Vorgang unterstützt werden. Nur an den nicht vom Photolack bedeckten Stellen bleibt die Metallschicht erhalten (Prozeßschritt 5 in Abbildung 3-10). Im Anschluß an eine optische Kontrolle erfolgte die Abscheidung der anorganischen Passivierungsschicht mittels PECVD (plasma enhanced chemical vapour deposition; Prozeßschritt 6 in Abbildung 3-10). Als Passivierungsschicht wurde in dieser Arbeit 130 nm

SiO₂, 530 nm Si₃N₄ und 140 nm SiO₂ verwendet, da sich diese Triplexschicht als besonders korrosionsstabil erwiesen hat [Faßbender, 2000]. In einem zweiten Lithographieschritt, unter Verwendung eines Umkehrprozesses, wurden die benötigten Elektrodenöffnungen und Elektrodenkontaktfenster (bondpads) auf den Wafer übertragen. Um den belichteten Photolack als Maske für den folgenden RIE-Prozeß (reactive ion etching) verwenden zu können, wurde dieser auf einer Heizplatte für 30 Minuten ausgehärtet. Der RIE-Prozeß teilt sich in vier Prozeßschritte auf, wobei in einem ersten Prozeßschritt mit einem Sauerstoffplasma Lackschleier, die vom zuvor erfolgten Lithographieschritt übrig geblieben waren, entfernt wurden. In einem zweiten und dritten Prozeßschritt wurde die anorganische Passivierungsschicht durch die Photolackmaske über den Bereichen der Elektroden und Kontaktfenster (bondpads) geöffnet und die obere Titanschicht entfernt. Im vierten und letzten Schritt wurde die Photolackmaske in einem Sauerstoffplasma entfernt (Prozeßschritt 7 in Abbildung 3-10). Die so hergestellten Mikroelektrodenarrays wurden mit einem Lichtmikroskop abschließend kontrolliert und mit einer Säge vereinzelt.

Die Abbildung 3-11 zeigt eine Photographie des Innenbereichs eines so hergestellten Mikroelektrodenarrays mit einer Vergrößerung einer einzelnen Elektrode mit einem Durchmesser von 8 µm. Es wurden auch Mikroelektrodenarrays in einem anderen Design mit 5, 10, 20, 50, 100 und 200 µm Elektrodendurchmesser prozessiert.

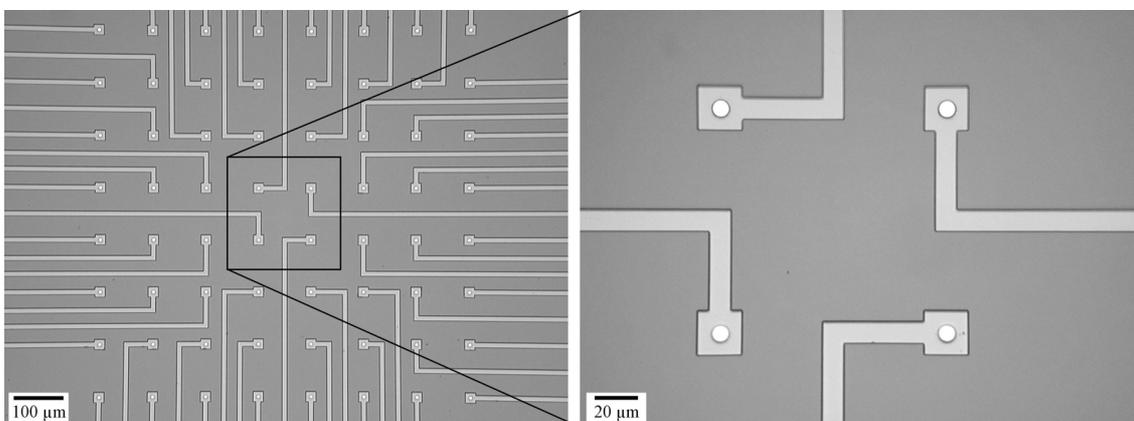


Abbildung 3-11: Photographien des Innenbereichs eines hergestellten Mikroelektrodenarrays (Durchmesser 8 µm).

Darüber hinaus fanden in dieser Arbeit auch Mikroelektrodenarrays Verwendung, die am Institut für Mikrotechnik in Mainz (IMM) hergestellt wurden. Diese Mikroelektrodenarrays, die ebenfalls in Kontaktlithographie gefertigt wurden, bestehen auch aus 64 Elektroden, die in einer 8x8 Matrix angeordnet sind, allerdings wurden bei der Produktion 5“-Glaswafer (Borofloat 33, Schott DESAG AG) als Grundsubstrat verwendet, so daß diese transparent sind. Die Elektroden weisen Abstände von entweder 100 oder 200 µm auf und die Größen der Elektroden betragen 6, 8, 10, 20 oder 30 µm. Die Arrays haben eine Kantenlänge von

11 mm. Zur Verbesserung des Zellkontaktes wurden außerdem Elektroden gefertigt, die mit ihrer aktiven Fläche bis an die Isolationsschicht reichen oder sogar über sie hinausragen. Auf diese Weise konnten die Elektroden näher an die Zellen gebracht werden [Krause, 2000].

Die Abbildung 3-12 zeigt zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen der Topologie-Elektroden, die am Institut für Mikrotechnik in Mainz (IMM) hergestellt wurden. Die Topologie entsteht durch einen Unterbau aus Si_3N_4 . Je nach Variation dieses zusätzlichen Lithographieschrittes resultieren dann entweder plateauartige (linkes Bild in Abbildung 3-12) oder spitzenförmige Elektroden (rechtes Bild in Abbildung 3-12).

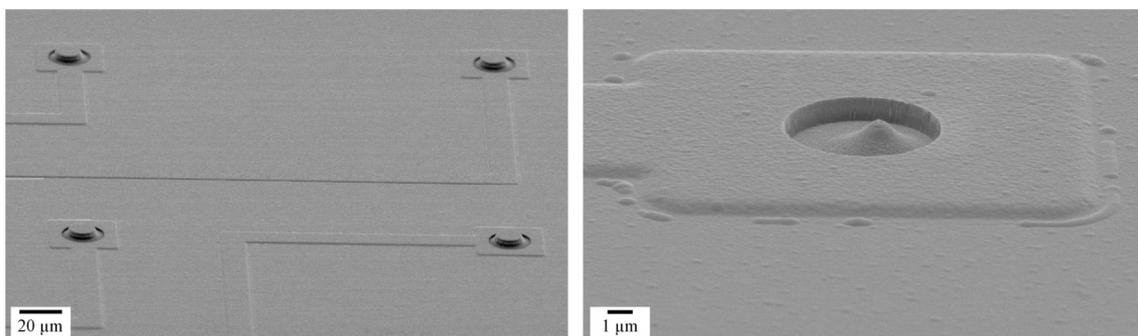


Abbildung 3-12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen anisotrop geätzter Topologie-Elektroden [Ingebrandt, 2001 und Krause, 2000].

3.2.2.3. Verkapselung

Um den Schutzlack von den Kontakt- und Elektrodenflächen zu entfernen, wurden die fertig produzierten und gesägten Mikroelektrodenarrays nacheinander mit Aceton und Isopropanol gereinigt. Die $11 \times 11 \text{ mm}^2$ großen Chips wurden dann mit der Polymer-Flip-Chip-Technologie [Lau, 1995] auf ein $24 \times 24 \text{ mm}^2$ großes PCB- (printed circuit board) Board geklebt. Das 1 mm dicke PCB-Board enthält die mit Gold aufgalvanisierten Leiterbahnen und eine $9 \times 9 \text{ mm}^2$ große Öffnung in der Mitte der Platine. Zum Aufkleben der Chips wurde in einem ersten Schritt ein Zweikomponentenkleber (Epo-Tek H20E-PFC) der Firma Epoxy Technology INC. (U.S.A.) mit einem Siebdrucker (ESSEMTEC SP-002; Abbildung 3-13 linkes Bild) der Firma ESSEMTEC AG Schweiz auf die $300 \times 300 \text{ mm}^2$ großen Klebeflächen der Platine aufgetragen. Der Drucker enthält eine transparente Polymerfolie, in die mit einem Laser 64 quadratische Öffnungen, in der Größe der Klebeflächen, gebrannt wurden. Nach der genauen Justage der 64 Löcher über den 64 vergoldeten Klebeflächen der Platine wurde mit einem Rakel der Kleber durch die Löcher der Folie gestrichen. Mit Hilfe einer Positionierungseinrichtung der Firma Finetech (Fineplacer 96 „Lambda“, Deutschland; Abbildung 3-13 rechtes Bild) wurden die Mikroelektrodenarrays deckungsgleich auf die jetzt mit Kleber bedeckten Kontaktstellen der Platine aufgeklebt. Anschließend erfolgte eine

Aushärtung des Klebers bei 150 °C für 30 Minuten. Um Kurzschlüsse zwischen den einzelnen Kontakten zu verhindern, wurden die Zwischenräume mit einem hochviskosen Underfill (U300) der Firma Epoxy Technology INC. (U.S.A.) gefüllt. Der Underfill wurde ebenfalls bei 150 °C für 30 Minuten ausgehärtet.

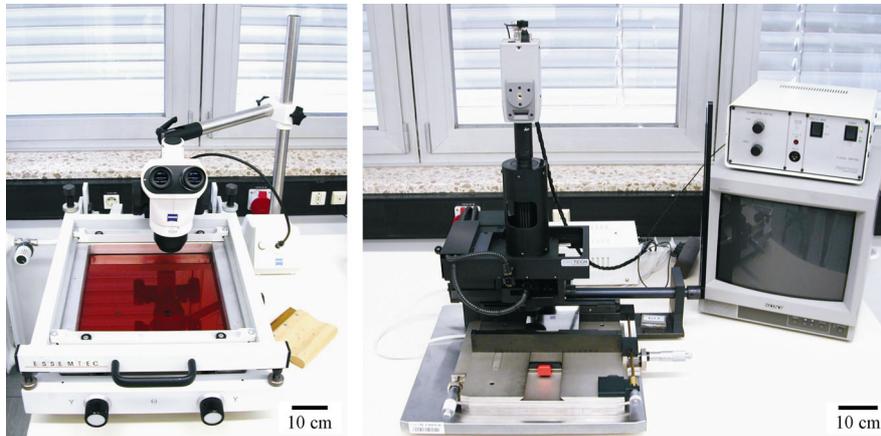


Abbildung 3-13: Aufbau der Mikroelektrodenarrays: Das linke Photo zeigt den eingesetzten Siebdrucker und das rechte Photo die verwendete Positionierungseinrichtung.

Durch Aufkleben eines Glasrings (Durchmesser 7 mm, Dicke 1 mm, Höhe 1 mm) auf die Oberseite des Mikroelektrodenarrays und eines zweiten Glasrings (Durchmesser 16 mm, Dicke 1 mm, Höhe 1,5 mm) auf die Oberseite der PCB-Platine wurde ein Zellkulturraum mit einem Volumen von 600 μ l gebildet. Das Aufkleben erfolgte mit einem Silikonkleber (Sylgard 96-083, Dow Corning, Deutschland), mit dem auch der Bereich zwischen den beiden Glasringen gefüllt wurde. Eventuell vorhandene Luftblasen im Kleber wurden mit einer Vakuumpumpe und einem Exsikkator vor dem Aushärten des Sylgards bei 150 °C (45 Minuten) entfernt. Die am Institut für Mikrotechnik (IMM) gefertigten „Glasmikroelektrodenarrays“ wurden analog aufgebaut. Das fertig verkapselte Mikroelektrodenarray ist in Abbildung 3-14 zu sehen.

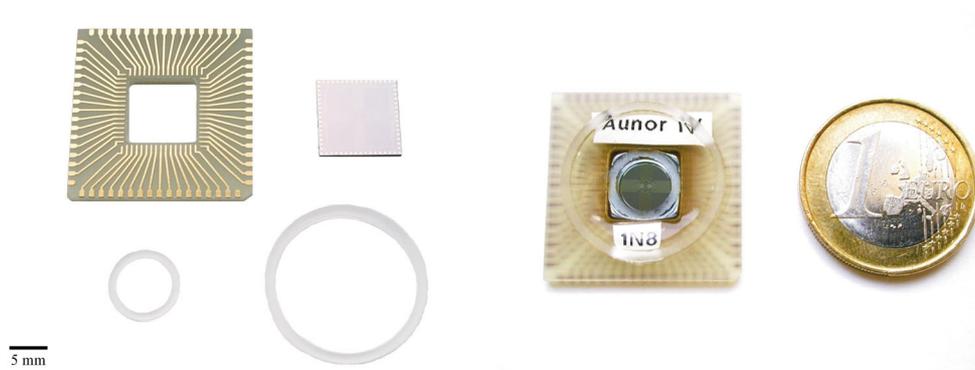


Abbildung 3-14: Photographien der vollständig verkapselten Mikroelektrodenarrays und die zum Aufbau benötigten Einzelteile (PCB-Platine, Mikroelektrodenarray, kleiner und großer Glasring).

Die Anforderungen an die Badkammer und den Aufbau, nämlich sämtliche elektrische Komponenten gegen die Elektrolyten abzudichten, resistent und biologisch neutral gegenüber den eingesetzten Chemikalien zur Reinigung und Modifizierung der Oberflächen und den Zellen zu sein, werden auf diese Weise erfüllt.

3.2.3. Feldeffekttransistoren

Die in dieser Arbeit eingesetzten Feldeffekttransistoren wurden am Institut für Mikrotechnik in Mainz (IMM) gefertigt. Die Passivierung besteht aus einer 500 nm dicken SiO_2 -Schicht, gefolgt von einer 150 nm dicken Si_3N_4 -Schicht. Bei manchen Feldeffekttransistoren wurde zusätzlich ein 100 nm dickes Oberflächenoxid aufgebracht. Weitere Details und die notwendigen Schritte zur Herstellung finden sich in [Krause, 2000]. Mit diesen Feldeffekttransistoren wurden die Messungen an den HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen in Kapitel 4.2.2 durchgeführt.

3.2.3.1. Layout

Das Feldeffekttransistorenarray besteht aus 16 einzelnen Feldeffekttransistoren, die in einer 4x4 Matrix angeordnet sind. Die Kantenlänge eines Feldeffekttransistors beträgt 5 mm. Die Gates der einzelnen Feldeffekttransistoren weisen Abstände von 100 oder 200 μm auf. Kleinere Gateabstände können nicht mehr in einer Matrix angeordnet werden, da der Abstand zwischen den Leiterbahnen mindestens 20 μm betragen muß, um eine gegenseitige Beeinflussung der Signale sicher auszuschließen. Zudem würden die Längen der Leiterbahnen zu den äußeren Kontaktflächen immer größer werden, dies würde auch zu einer Vergrößerung der Zuleitungswiderstände führen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Feldeffekttransistoren liegen die Zuleitungswiderstände zu den Drain-Bereichen für p-Kanal-FETs bei 252 Ω und für n-Kanal-FETs bei 153 Ω ; bestimmt nach der Methode von van der Pauw [Beneking, 1991 und Sze, 1985]. Der zwischen zwei benachbarten Drain-Zuleitungen auftretende Widerstand liegt im $\text{M}\Omega$ -Bereich und eine Signalbeeinflussung kann somit vernachlässigt werden. Die Abmessungen der Gates sind besonders wichtig, da sie in der Größenordnung der zu untersuchenden Zellen liegen müssen. Eine gute Signaleinkopplung ist nur dann gewährleistet, wenn die Zellen die Gates möglichst vollständig abdecken. Allerdings wurden auch schon Messungen mit sehr guter Signaleinkopplung [Ingebrandt, 2001] gezeigt, bei denen Neurone nur einen kleinen Teil eines sogenannten Triplegates abdeckten. Das Design der Gates hat außerdem einen maßgeblichen Einfluß auf die Transferkennlinien und die daraus resultierenden Steilheiten g_m der einzelnen Transistoren. Dies liegt daran, daß die Längen L (Abstand zwischen Drain und Source) und die Breiten b der Gates den Bereich festlegen, in dem die Drain-

Source-Ströme I_{DS} durch Potentialänderungen am Gate gesteuert werden. Am häufigsten wurden in dieser Arbeit p-Kanal-Transistoren mit 5 μm Gatelänge und 16 μm Gatebreite eingesetzt. Diese Abmessungen stellen den besten Kompromiß zwischen Steilheit und Größe dar.

Abbildung 3-15 zeigt das Layout des inneren Gatebereiches und die Vergrößerung eines einzelnen dieser Gates.

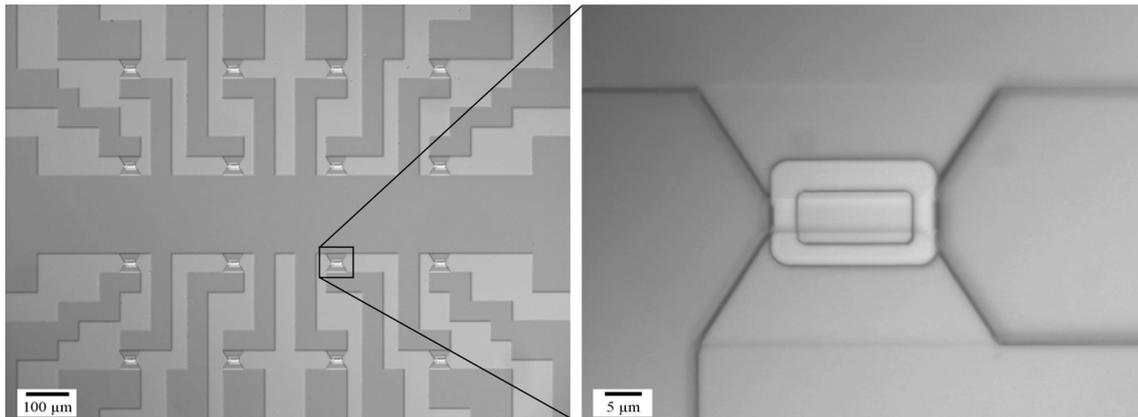


Abbildung 3-15: Photographie des Layouts des inneren Gatebereiches eines eingesetzten p-Kanal-Feldeffekttransistors und Vergrößerung eines einzelnen Gates.

3.2.3.2. Verkapselung

Zum Aufbau und zur Verkapselung der Feldeffekttransistoren wurde das Verfahren, wie es in [Sprössler, 1997, Krause, 2000 und Ingebrandt, 2001] beschrieben ist, benutzt. Dazu wurden die 5x5 mm² großen FET-Chips zunächst vom Schutzlack (auf den Kontakt- und Elektrodenflächen) mit Aceton und Isopropanol befreit. Mit dem Zweikomponentenkleber (Epo-Tek H20E-PFC) der Firma Epoxy Technology INC. (U.S.A.), wurden sie anschließend auf einen kommerziell erhältlichen 28 DIL-Keramickontakt (28LD S/B Pack, CSB02880 bzw. KD-78368-E) der Firma Spectrum (U.S.A.) geklebt und für 30 Minuten bei 150 °C ausgehärtet. Mit einem Ultraschallbinder (Kulicke & Soffa, 4500 Digital Series Manual Wire Bonders, U.S.A.) wurden die einzelnen Kontakte zwischen dem DIL-Sockel und den Drain-Zuleitungen der einzelnen Transistoren, der gemeinsamen Source-Leitung und dem Bulk-Anschluß hergestellt (25 μm Al-Draht, Mueller Feindraht AG, Schweiz). Mit Hilfe einer Abformtechnik aus Silikon (Sylgard 182, Dow Corning, Deutschland) wurde ein Trichter (Durchmesser der unteren Öffnung ca. 3mm) hergestellt und mit dem Silikonkleber (Sylgard 96-083, Dow Corning, Deutschland) auf den Chip aufgeklebt. Zur Formung des Zellkulturraumes (400 μl Volumen) wurde ein äußerer Glasring (Durchmesser 16 mm, Dicke 1 mm, Höhe 3 mm) ebenfalls mit diesem Silikonkleber (vgl. auch Kapitel 3.2.2.3) auf den Keramikträger geklebt. Der freie Bereich zwischen dem äußeren Glasring und dem

Trichter wurde anschließend mit dem Kleber aufgefüllt. Etwaige Luftblasen im Kleber wurden wieder mit Unterdruck entfernt (analog Kapitel 3.2.2.3). Der Kleber bzw. die Vergußmasse sorgt so für eine Isolierung der elektrischen Komponenten. Zum Schluß erfolgte eine Aushärtung der Vergußmasse für 45 Minuten bei 150 °C. Auch hier werden mit einem solchen Aufbau die Anforderungen bezüglich Abdichtung, Resistenz und biologischer Neutralität erfüllt. Das fertig verkapselte Feldeffekttransistorenarray ist in Abbildung 3-16 gezeigt (rechtes Bild). Die linke Photographie zeigt die zur Verkapselung notwendigen Einzelteile. Das fertig verkapselte Feldeffekttransistorenarray ist in Abbildung 3-16 gezeigt (rechtes Bild). Die linke Photographie zeigt die zur Verkapselung notwendigen Einzelteile.

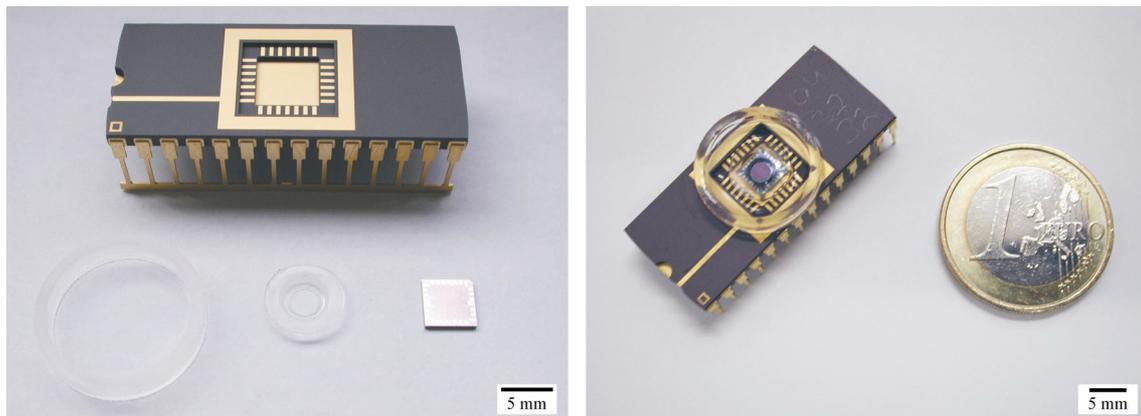


Abbildung 3-16: Photographien vollständig verkapselter Feldeffekttransistoren-Chips und der zur Verkapselung benötigten Einzelteile (DIL-Keramikträger, Glasring, Silikontrichter und Chip mit Feldeffekttransistoren).

3.3. Experimenteller Aufbau

Um Kopplungseigenschaften von Zellen im μV -Bereich erfassen zu können, bedarf es spezieller Elektronik und Ausrüstung, die in diesem Kapitel dargestellt werden. Zunächst wird der neu erstellte Meßplatz vorgestellt. Die beiden zugehörigen Verstärkerelektroniken der Mikroelektrodenarrays und Feldeffekttransistoren werden ebenfalls beschrieben.

3.3.1. Meßaufbau für simultane Patch-Clamp- und Zelleitungsmessungen

Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte computergesteuerte Meßplatz zur extrazellulären Ableitung biologischer Zellsignale ist in Abbildung 3-17 zu sehen.

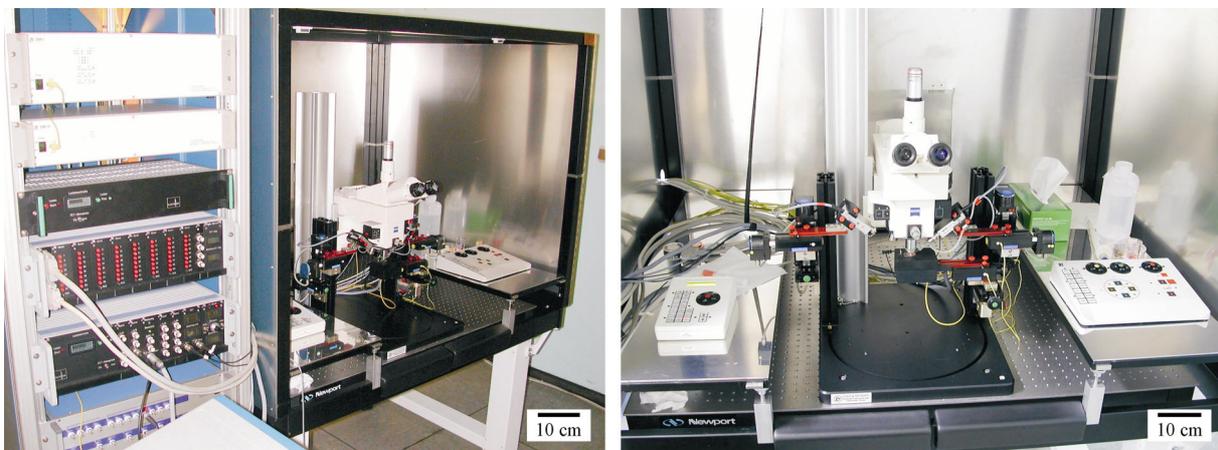


Abbildung 3-17: Photographien des neu erstellten Meßplatzes zur Ableitung biologischer Zellsignale. Das linke Bild zeigt (von oben nach unten) die beiden Steuergeräte der Mikromanipulatoreinheiten, die Hauptverstärker der Extended-Gate-Elektroden und Feldeffekttransistoren, sowie Patch-Clamp-Verstärker und Faradaykäfig. Das rechte Bild zeigt den inneren Bereich des Faradaykäfigs mit Auflichtmikroskop, Schrittmotoren (rechts und links vom Mikroskop), Mikromanipulatorsteuerungen (auf den beiden Auflagen) und die beiden Vorverstärkermeßköpfe der Patch-Clamp-Einheit und Feldeffekttransistoren (unterhalb vom Mikroskop).

Der gesamte Meßplatz läßt sich in mehrere Einheiten unterteilen, von denen die wichtigsten die Verstärkerelektronik (Eigenbau), das optische Auflichtmikroskop (Zeiss), die Mikromanipulatoreinheiten (Luigs&Neumann), der schwingungsgedämpfte Tisch (Newport), der Faradaykäfig (Eigenbau) und der Computer (DASGIP) mit diversen Meß- und Steuerkarten sind.

Die extrazellulären Zelleitungen (Kapitel 4.2) wurden entweder mit den Mikroelektrodenarrays oder den Feldeffekttransistoren gemessen. Dabei unterscheidet sich jeweils die Verstärkerelektronik. Die Unterschiede werden im folgenden erläutert.

3.3.1.1. Extended-Gate-Elektroden-Aufbau

Die Verstärkung der extrazellulär gemessenen Signale passierte in zwei Stufen. Die erste Stufe (Vorverstärkung) erfolgte im Vorverstärkermeßkopf und die zweite Stufe (Nachverstärkung und Kompensation) im Hauptverstärker. Beide Einheiten sind in Abbildung 3-18 zu sehen und bilden zusammen die Verstärkerelektronik für die Mikroelektrodenarrays.

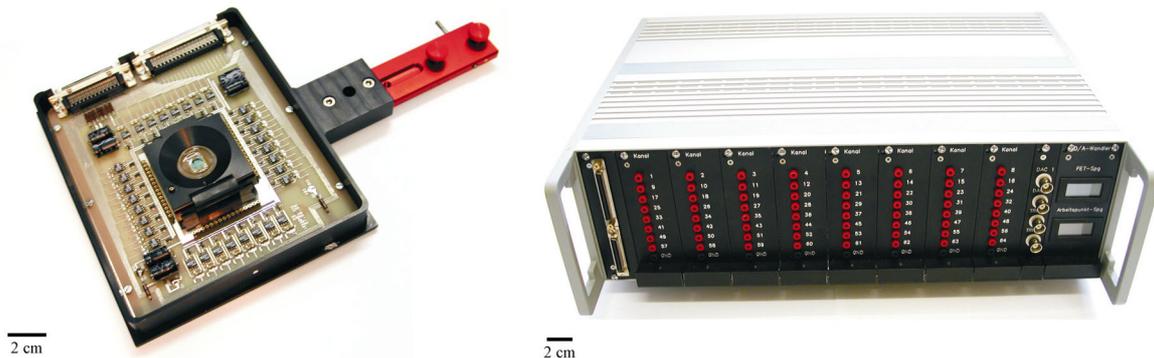


Abbildung 3-18: Links: Photographie des Vorverstärkermeßkopfes für die Mikroelektrodenarrays. Dieser dient zum einen der Aufnahme der Mikroelektrodenarrays, zum anderen ist darin die erste Stufe der Signalverstärkung enthalten. Rechts: Photographie des Hauptverstärkers für die zweite Stufe der Signalverstärkung (Nachverstärkung und Kompensation).

Der Vorverstärkermeßkopf enthält außer der ersten Stufe der Signalverstärkung auch einen modifizierten Testsockel (PLCC68 T+B IC51, YAMAICHI Inc., München) mit 68 Goldfederkontakten zur Aufnahme der Mikroelektrodenarrays. Mit diesem ist ein Wechsel der Arrays ohne Kontaktprobleme beliebig möglich. Sowohl das Gehäuse als auch der Deckel (nicht im Bild zu sehen) wurden aus eloxiertem Aluminium gefertigt. Der Deckel hat die Aufgabe die komplette Vorverstärkerelektronik abzuschirmen. Auf der eingeschraubten Platine befinden sich die Anschlüsse für die Datenleitungen (64 Sub D-Stecker) und die Spannungsversorgungen für die Operationsverstärker und die Junction-Feldeffekttransistoren (50 Sub D-Stecker). Die kommerziell erhältlichen, rauscharmen Junction-Feldeffekttransistoren (PMBF 5484, Philips Semiconductors, U.S.A.) und die Operationsverstärker (OP-97F, Analog Devices GmbH, Deutschland) stellen die Hauptbestandteile der in SMD- (surface mounted devices) Technik bestückten Platine dar. In dem für die Kopplungsmessungen relevanten Frequenzbereich (0,1 bis 10 kHz) weisen diese Junction-Feldeffekttransistoren (JFETs) ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis auf. Durch einsetzen eines Mikroelektrodenarrays in den Testsockel werden die Metall-elektroden des Arrays mit den 64 Gates der einzelnen JFETs verbunden. Deshalb wird diese Verstärkereinheit auch als Extended-Gate-Elektroden-Aufbau bezeichnet.

Über den Testsockel ist die Ag/AgCl-Referenzelektrode (Ag/AgCl-Halbzelle EP2, 4 mm Länge, 2 mm Durchmesser, World Precision Instruments, Deutschland) mit dem „Ground“ der Versorgungsleitungen auf der Platine verbunden. Die Ag/AgCl-Elektrode dient damit beim Anlegen der Gate-Source- und Drain-Source-Spannungen an den JFETs als Bezugspunkt. Die Spannungsversorgung der JFETs befindet sich im Hauptverstärker. Die kapazitiven oder aktiven Signale während eines Kopplungsexperimentes werden am Gate der JFETs direkt in Ströme (I_{DS}) konvertiert. Da die Drain-Kontakte der JFETs direkt mit den negativen Eingängen der Operationsverstärker verbunden sind, dienen diese als Strom-Spannungskonverter mit einer Wandlung von $V = 5 \text{ k}\Omega \cdot I$. Über ein Kabel, das nicht besonders abgeschirmt sein muß, werden die mit den Operationsverstärkern in Spannungssignale gewandelten und vorverstärkten Stromsignale direkt in den Hauptverstärker weitergegeben. Da im gewählten Arbeitspunkt das eingekoppelte Signal durch den großen Arbeitsstrom der JFETs überlagert ist, wird dessen nahezu konstanter DC-Anteil durch eine Regelschleife (Feedback-Loop) im Hauptverstärker kompensiert. Anschließend werden die kompensierten Signale mit einem weiteren Operationsverstärker nochmals um den Faktor 100 nachverstärkt. Die Abbildung 3-19 verdeutlicht schematisch die beiden Stufen der Signalverstärkung.

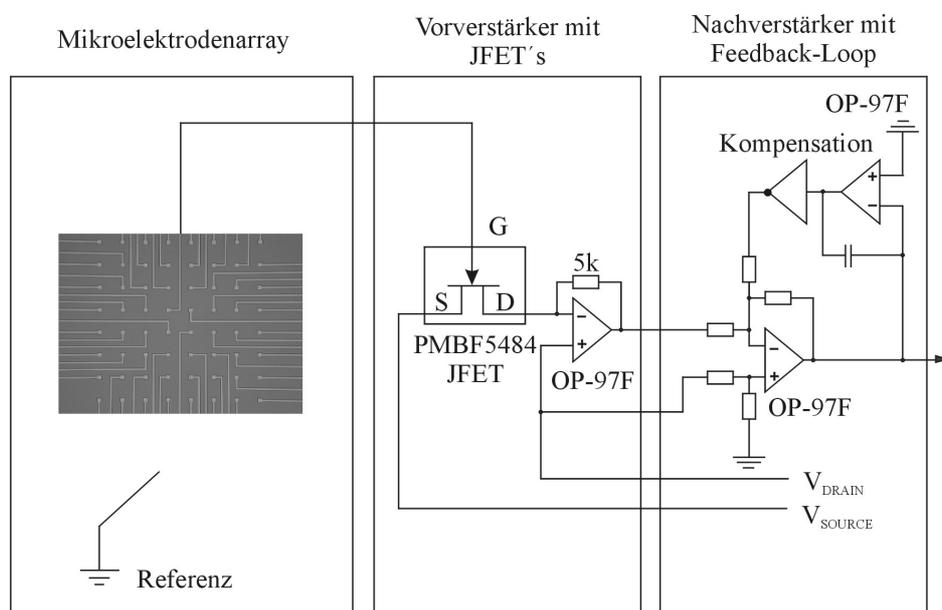


Abbildung 3-19: Schema der ersten und zweiten Signalverstärkungseinheit des Extended-Gate-Elektroden-(EGE) Aufbaus. Dargestellt sind das Mikroelektrodenarray, die Ag/AgCl-Elektrode, die Vorverstärkereinheit mit den Junction-Feldeffekttransistoren (JFETs) und die Hauptverstärkereinheit mit Feedback-Loop zur Kompensation überlagertter Signale.

Die zum Betrieb der JFETs benötigten Source- und Drain-Spannungen werden über einen im Hauptverstärker eingebauten D/A-Wandler eingestellt. Die Spannungsversorgung des Hauptverstärkers erfolgt über eine separate Batterieinheit, um eine galvanische Trennung

vom Netz zu erreichen. Die Frontseite des Hauptverstärker weist außerdem 64 Stecker-
ausgänge auf, um entweder zusätzliche Kontrollen der gemessenen und verstärkten Signale,
z.B. mit einem Oszilloskop, durchführen zu können, oder um sie direkt in die externen
Eingänge eines Patch-Clamp-Verstärkers weiterleiten zu können (nächster Abschnitt).
Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Hauptverstärker mehrfach überarbeitet und konnte
schließlich erstmals für die gleichzeitige Messung von 64 Kanälen eingesetzt werden.

3.3.1.2. Feldeffekttransistoren-Aufbau

Auch hier erfolgt die Verstärkung in zwei Stufen, allerdings übernehmen die eingesetzten
Feldeffekttransistoren im Vorverstärkermeßkopf die Aufgabe der Vorverstärkung als
einziger Signalwandler. Die eingesetzten p- und n-Kanal-FETs ersetzen damit die
Kombination aus Goldelektroden und kommerziellen JFETs, die im vorherigen Abschnitt
beschrieben wurden. Nach Strom-Spannungs-Wandlung mit $V = 10 \text{ k}\Omega \cdot I$ findet die
Nachverstärkung wieder im Hauptverstärker statt. Die Spannungsversorgung erfolgt
ebenfalls über eine Batterie, die aber im Hauptverstärker integriert ist. Der
Vorverstärkermeßkopf besteht aus Aluminium und enthält einen Nullkraftsockel zur
Aufnahme der Feldeffekttransistoren und die Hauptplatine mit den Operationsverstärkern,
die in SMD-Hybridbauweise gefertigt wurde. Auch hier übernimmt ein aufgesetzter Deckel,
der die Badkammeröffnung ausspart, die Aufgabe die komplette Elektronik abzuschirmen.
Sowohl der Vorverstärkermeßkopf als auch der Hauptverstärker sind in Abbildung 3-20 zu
sehen.



Abbildung 3-20: Links: Photographie des Meßkopfes (Vorverstärker) für die Feldeffekttransistoren. Dieser dient zur Aufnahme der FETs, die zugleich die erste Stufe der Signalverstärkung übernehmen. Rechts: Photographie des Hauptverstärkers für die zweite Stufe der Signalverstärkung (Nachverstärkung und Kompensation).

Der in dieser Arbeit verwendete Hauptverstärker wurde analog zu einem bereits
existierenden Prototypen nachgebaut. Zahlreiche Fehler, vor allem in der Kompensations-
schaltung, wurden behoben. Die Kompensationsschaltung erfolgt bei diesem Gerät über den

gleichen Feedback-Loop, der auch bei dem EGE-Verstärker eingesetzt wird. Die Zeitkonstante dieses Feedback-Loops ist sehr niedrig und der 3 dB-Punkt liegt bei 1,82 Hz [Ingebrandt, 2001]. Damit werden die Formen langsamer Zellsignale, z.B. von Herzzellen (bis 500 ms), nicht verfälscht. Der Vorteil der Kompensation liegt vor allem darin, daß sehr langsame DC-Driften der FETs und EGE's, die durch Temperaturveränderungen und Ionenpenetration am Gateoxid hervorgerufen werden können, automatisch kompensiert werden.

Abbildung 3-21 verdeutlicht das Meßprinzip zur extrazellulären Signaleinkopplung mit diesem Aufbau schematisch.

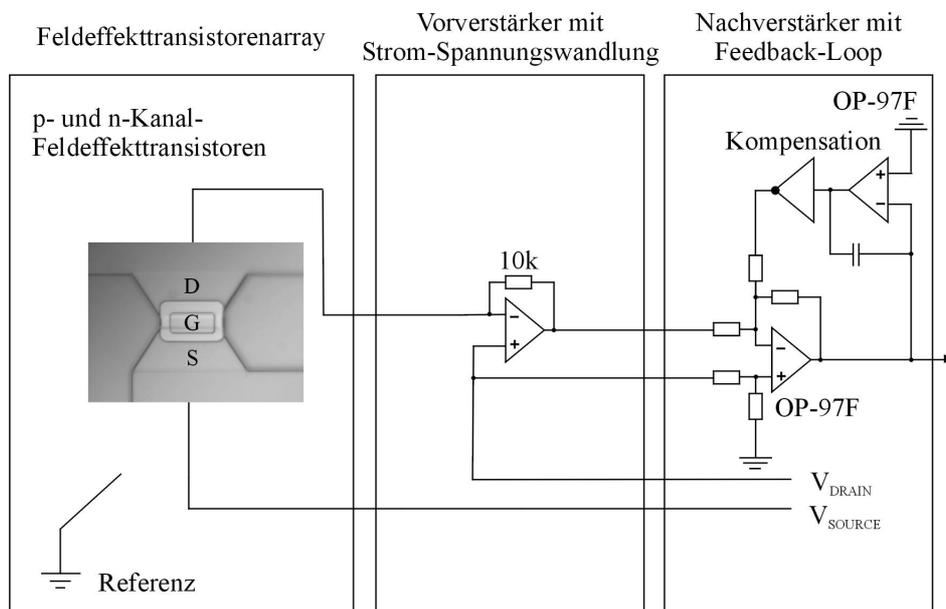


Abbildung 3-21: Schema der ersten und zweiten Signalverstärkungseinheiten des Feldeffekttransistoren-(FET) Aufbaus. Dargestellt sind die Ag/AgCl-Elektrode, ein Feldeffekttransistor, die Vorverstärkereinheit mit Strom-Spannungswandler und die Hauptverstärkereinheit mit Feedback-Loop zur Kompensation überlagerter Signale.

Die Vorverstärkermeßköpfe des Extended-Gate-Elektroden- und des Feldeffekttransistoren-Aufbaus sind so konstruiert, daß sie unter das in Abbildung 3-17 zu sehende Auflichtmikroskop (Axiotech Vario 100, Zeiss, Deutschland) passen. Über eine seitlich am Meßaufbau angebrachte horizontale Verschiebeeinrichtung kann der entsprechende Vorverstärkermeßkopf dann exakt unter dem Mikroskop justiert und befestigt werden. Um Erschütterungen während der Messungen zu vermeiden, erfolgt die Verschiebung (Fokussierung) des Auflichtmikroskops in z-Richtung elektronisch über eine Manipulatoreinheit. Der gesamte Meßaufbau steht zudem auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport VH3648W-OPT-24-41, Deutschland) und wird durch einen Faradaykäfig abgeschirmt. An das Auflichtmikroskop kann bei Bedarf über einen C-Mount-Adapter eine Digitalkamera (Nikon Coolpix 990, Deutschland) befestigt werden. Mit den eingesetzten

Zeiss- (Epiplan, 5, 10 und 20 x) und Olympus-Objektiven (Immersionsobjektiv UMTLFL, 20 x) können Vergrößerungen von 50 bis 200 x erreicht werden. Bei Bedarf kann die Gesamtvergrößerung mit Hilfe einer variablen Nachvergrößerung bis auf maximal 400 x gesteigert werden. Da sich stets ein Meniskus an der Flüssigkeitsoberfläche beim Befüllen der EGE's und FETs bildet und dadurch eine Beobachtung der Zellen, z.B. bei Patch-Clamp-Messungen, stark gestört wurde (durch die Krümmung der Flüssigkeitsoberfläche), ist die Verwendung des Immersionsobjektives stets vorzuziehen. Allerdings kann auch Abhilfe durch die Auflage von Deckgläsern auf die Badkammer geschaffen werden. Dadurch wird ein definierter Übergang des Lichts in die Lösung ermöglicht. Die verwendeten Objektive weisen außerdem einen genügend großen Arbeitsabstand auf, so daß ausreichend Platz in der Badkammer ist, um einen Zugang für Patchelektroden zu ermöglichen. Durch Verwendung einer DIC- (Differential-Interferenz-Kontrast) Optik wird zudem eine deutlich bessere Bildqualität, im Vergleich zu einer normalen Hellfeldoptik, erzielt.

Zur Kontrolle und Aufnahme der Meßdaten wurden zum einen Programme benutzt, die durch [Sprössler, 1997] mit TestPoint (Keithley, Deutschland) und ADBasic (Jäger Meßtechnik, Deutschland) erstellt wurden und zum anderen die kommerziell erhältlichen Programme TIDA (HEKA Elektronik, Deutschland) in der Version 5.0 und MED64 conductor (Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Japan) in der Version 3.1. Als Datenerfassungskarte wurde das Model 6071E von National Instruments (U.S.A.) verwendet und die Steuerspannungen für die Transistoren wurden über eine 24-Kanal digitale I/O- (input/output) Karte (PIO-24 I/O, BMC INC., Deutschland) eingestellt. Das gesamte System wird über einen SCSI-PC (PIII 1 GHz, 60 GB SCSI Festplatte) gesteuert. Mit den Programmen können sämtliche Meßkanäle ausgewählt und ausgelesen sowie die Spannungen für die Arbeitspunkte zwischen Drain-Source V_{DS} und Gate-Source V_{GS} eingestellt werden.

Die Spannungseinstellungen für den Betrieb der EGE's für die Messungen in Kapitel 4.2.1 wurden mit den TestPoint-Programmen eingestellt und die Datenakquisition erfolgte mit der Panasonic-Software MED64 conductor 3.1. Die Datenakquisition der Messungen in Kapitel 4.2.2 wurde mit der TIDA-Steuersoftware des Patch-Clamp-Verstärkers (HEKA, EPC9-2, Deutschland; [Sigworth et al., 1995-a]) durchgeführt und die Kontrolle der Arbeitspunktspannungen erfolgte ebenfalls mit den TestPoint-Programmen.

3.3.1.3. Patch-Clamp-Aufbau

Für die Messungen an den menschlichen embryonalen Nierenzellen mit den Feldeffekttransistoren in Kapitel 4.2.2 wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik EPC9-2, Deutschland) eingesetzt. Mit einem BNC-Kabel wurde das bereits verstärkte Signal am Ausgang des Hauptverstärkers abgegriffen und an einen externen

Eingang des Patch-Clamp-Verstärkers weitergeleitet. Die TIDA-Steuersoftware (HEKA Elektronik, Deutschland; Version 5) dieses Patch-Clamp-Verstärkers ermöglicht nicht nur die zur Durchführung der Patch-Clamp-Messungen notwendigen Kompensationen, sondern erlaubt es auch, durch interne Routinen Signale zu mitteln. So kann das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich verbessert werden.

Die für die Durchführung der Patch-Clamp-Messungen notwendige Steuerung der Glasspipetten im μm -Bereich erfolgte mit einer Manipulatoreinheit von Luigs&Neumann (Deutschland). Die Verschiebeeinheit besteht aus drei Schrittmotoren, die in x-, y-, und z-Richtung beweglich sind und über ein Tastenfeld gesteuert werden können. Außerdem befindet sich der Patch-Clamp-Vorverstärkermeßkopf zusammen mit dem Glaselektrodenhalter an dieser Einheit, wie in der Abbildung 3-22 zu erkennen ist.

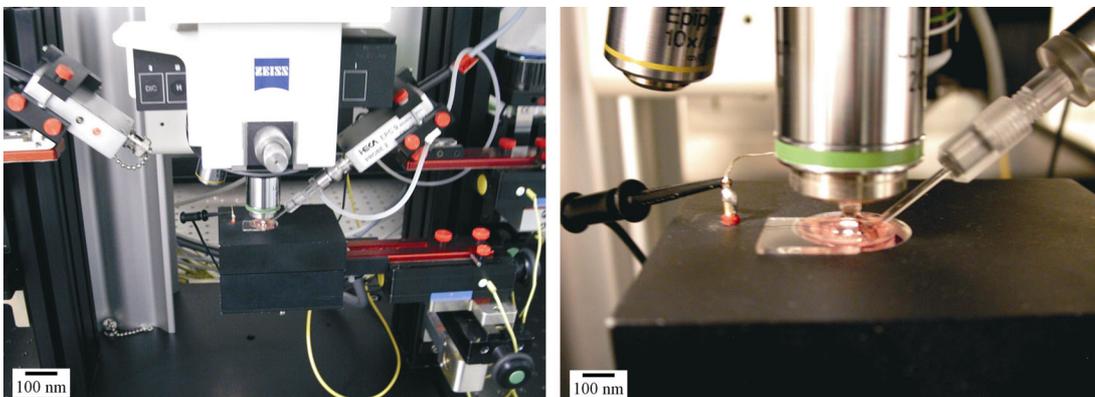


Abbildung 3-22: Photographien zur Visualisierung der Patch-Clamp-Anordnung, die zur Stimulation und Untersuchung der Zellen in Kapitel 4.2.2 benötigt wurde. Zu sehen ist die Patch-Clamp-Glaskapillare mit Schlauch (zur Erzeugung des Unterdrucks), die Ag/AgCl-Referenzelektrode, der FET-Vorverstärkermeßkopf, die Schrittmotoren, die Zeiss- und Olympus-Objektive und das Deckgläschen auf der Badkammer zur Reduzierung der Oberflächenkrümmung des extrazellulären Mediums.

Die Spannungsversorgungen für die Schrittmotoren des Patch-Clamp-Vorverstärkermeßkopfes und für das Auflichtmikroskop sind zusammen mit dem Patch-Clamp-Verstärker und den beiden Hauptverstärkern (EGE und FET) in einem Rack neben dem schwingungsgedämpften Tisch untergebracht (vgl. Abbildung 3-17). Die Glaskapillaren (Borosilikatglaskapillaren mit Filament, Hilgenberg, Deutschland; äußerer Durchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Filament 0,2 mm) für die Patch-Clamp-Messungen wurden unmittelbar vor den Versuchen mit einem horizontalen Puller (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, Deutschland) gezogen und hitzepoliert. Mit diesem Puller lassen sich unterschiedliche Spitzengeometrien und Öffnungsdurchmesser erstellen [Sakmann and Neher, 1995-b]. Die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden hatten einen Öffnungsdurchmesser von 1 μm und eine patronenkugelförmige („bullet-shaped“) Geometrie.

3.4. Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Methode [Neher and Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981; Sakmann and Neher, 1995-a] stellt im Bereich der Elektrophysiologie für die Untersuchung biologischer Zellen die Methode der Wahl dar. In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um die spannungsgesteuerten Kanäle in den genetisch modifizierten menschlichen embryonalen Nierenzellen (Kapitel 4.2.2) zu aktivieren und wichtige elektrische Parameter der Zellen zu messen, um so die Zell-Transistor-Kopplungen besser verstehen zu können.

In der Patch-Clamp-Technik werden verschiedene Patchkonfigurationen verwendet [Cahalan and Neher, 1992], von denen zwei in Abbildung 3-23 wiedergegeben sind.

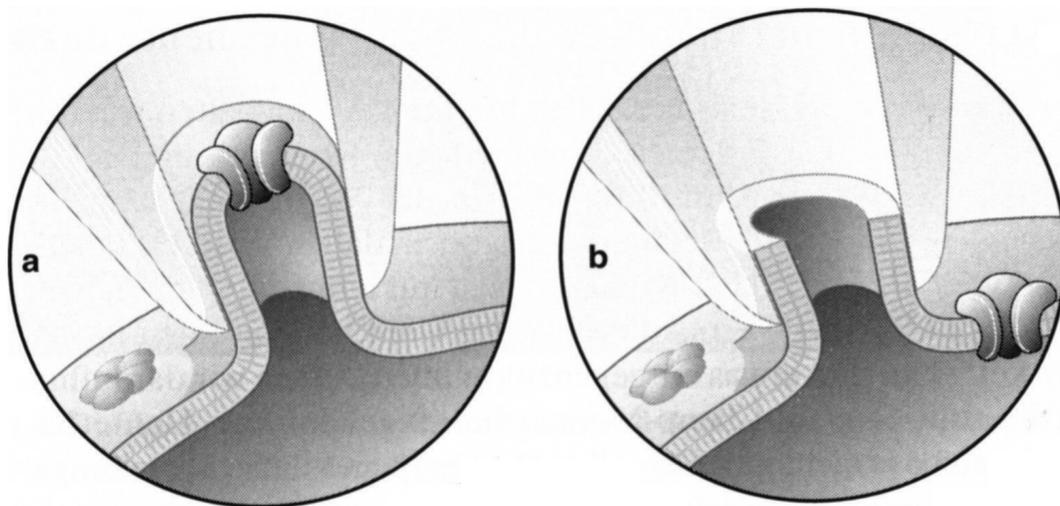


Abbildung 3-23: In dieser Arbeit verwendete Patch-Clamp-Konfigurationen: a) Cell-attached und b) Whole-Cell. [Numberger und Draguhn, 1996]

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Whole-Cell-Patchkonfiguration zur Untersuchung der Zell-Transistor-Kopplungen eingesetzt, da nur bei dieser Konfiguration eine Untersuchung der kompletten Zelle möglich ist. Außerdem wird bei der Patch-Clamp-Technik zwischen zwei Moden unterschieden: Voltage-Clamp-Modus (VC-Modus) und Current-Clamp-Modus (CC-Modus). Im Voltage-Clamp-Modus wird die Spannung der Zelle $V_M(t)$ mit einem sogenannten Command-Signal vorgegeben und der dafür benötigte Strom gemessen. Da der Strom über die gesamte Membran der Zelle abfließt, entspricht dieser dem Membranstrom $I_M(t)$. Dagegen wird im Current-Clamp-Modus der Membranstrom $I_M(t)$ durch das Command-Signal vorgegeben und das resultierende Membranpotential $V_M(t)$ gemessen. Durch den Strompuls kann die Zelle soweit depolarisiert werden, daß es zu einem Aktionspotential kommt, bei dem dann der Ionenfluß das Membranpotential verändert. Im Voltage-Clamp-Modus kann die Zelle dagegen durch Vorgabe einer frei gewählten Haltespannung V_{hold} auf einem bestimmten Potential „geklemmt“ werden. Erst durch Aktivierung eines sogenannten Stimulationsprotokolls, bei dem Spannungspulse in Zeit und

Amplitude festgelegt sind, kann die Zelle de- oder hyperpolarisiert werden. Der Ionenstrom I_M wird dann in der gewählten Zeitperiode bei genau definiertem Membranpotential V_M aufgezeichnet. Dies erleichterte die Charakterisierung der Zell-Transistor-Kopplung ganz erheblich. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der Voltage-Clamp-Modus verwendet.

Zur Durchführung der Zell-Transistor-Kopplungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik mußte ein genauer Ablauf befolgt werden, der im folgenden beschrieben wird:

Zunächst wurden die frisch ausgezogenen Glaspipetten mit dem intrazellulären Medium (vgl. Kapitel 3.6.4) befüllt. Dazu wurde in dieser Arbeit eine über dem Bunsenbrenner zu einer Kapillare fein ausgezogene Eppendorfspitze benutzt. Die befüllte Spitze wurde dann in den Pipettenhalter des Patch-Clamp Vorverstärkermeßkopfes eingespannt, so daß der Halter luftdicht verschlossen ist. Damit wurde auch gleichzeitig der Kontakt zur Ag/AgCl-Referenzelektrode im Pipettenhalter hergestellt. Durch Anlegen eines leichten Überdruckes im Pipetteninneren, so daß ein leichter Flüssigkeitsstrom kontinuierlich austrat, wurde ein Verstopfen der Pipette mit Schmutzpartikeln in der Badlösung verhindert. Der Überdruck wurde durch einen seitlich am Pipettenhalter angebrachten Schlauch erzeugt (vgl. Abbildung 3-22). Mit der TIDA-Software des Patch-Clamp-Verstärkers wurde ein repetitiver, rechteckförmiger Testpuls von 5 mV an die Pipette angelegt. Nachdem die Pipette in die Badlösung (vgl. Kapitel 3.6.4) eingeführt wurde, konnte der Widerstand der Pipette R_{pip} berechnet und der Nullwert für das Potential festgelegt werden. TIDA bietet dafür automatische Routinen an. Man spricht vom Potential „Null“, wenn zwischen der offenen Pipette und der Erdelektrode des Bades kein Strom fließt. Der Widerstand der etwa 1 μ m großen Patch-Clamp-Pipetten lag zwischen 3 und 8 M Ω . Mit dem Mikromanipulator wurde die Pipettenspitze unter Beobachtung durch das Auflichtmikroskop bis kurz über die zu untersuchende Zelle gebracht. Die Nähe der Pipette zur Zellmembran wurde durch eine leichte Abnahme der Stromamplitude des Testpulses oder durch einen charakteristischen Lichtreflex, der durch eine leichte Eindellung der Membran durch die aus der Pipette strömende Flüssigkeit entsteht (sogenanntes dimpling), registriert. Nach Lösen des angelegten Überdrucks erhöhte sich der Widerstand meist spontan bis zur Ausbildung eines sogenannten Gigaseals. Oft mußte jedoch durch einen leichten Unterdruck nachgeholfen werden. Der Gigaseal ist eine extrem hochohmige Verbindung bis in den G Ω -Bereich, bei dem im Stromsignal zusätzliche parasitäre Effekte durch Streukapazitäten entstehen. Diese wurden mit der TIDA-Software ebenfalls ausgeglichen (C_{fast} -Kompensation; [Sigworth, 1995-b; Marty and Neher, 1995]). In der Präparation befindet man sich nun in der sogenannten Cell-attached-Konfiguration (vgl. Abbildung 3-23).

Von der Cell-attached-Konfiguration gelangt man in die Whole-Cell-Konfiguration durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Pipette. Dabei wurde der Membranbereich

unterhalb der Pipette durchbrochen. Blieb der Seal erhalten (geringer Leckstrom), so wurde jetzt nicht mehr nur der Strom durch den kleinen Patch, sondern durch die gesamte verbliebende Fläche der Zellmembran, gemessen. Da die Pipettenlösung zu diesem Zeitpunkt direkt mit dem Inneren der Zelle verbunden war, wurde das Zellinnere nach einer gewissen Äquilibrierungszeit (Sekunden bis Minuten) mit der Pipettenlösung gefüllt.

Sowohl der durch das Öffnen der Membran entstandene Serienwiderstand als auch die zusätzlichen kapazitiven Anteile im Stromsignal wurden durch die Softwareroutinen des TIDA-Programms abgeglichen (C_{slow} -Kompensation; [Sigworth, 1995-b; Marty and Neher, 1995]). Der Serienwiderstand (access resistance) entspricht theoretisch dem Pipettenwiderstand, aber durch das Öffnen der Membran werden zwangsläufig Membranbestandteile in den Mündungsbereich der Pipette gezogen, so daß sich der Widerstand deutlich erhöht (etwa eine Verdopplung des reinen Pipettenwiderstandes).

Abbildung 3-24 zeigt die Stromantworten bei Ausbildung der Whole-Cell-Konfiguration und das zugehörige Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung.

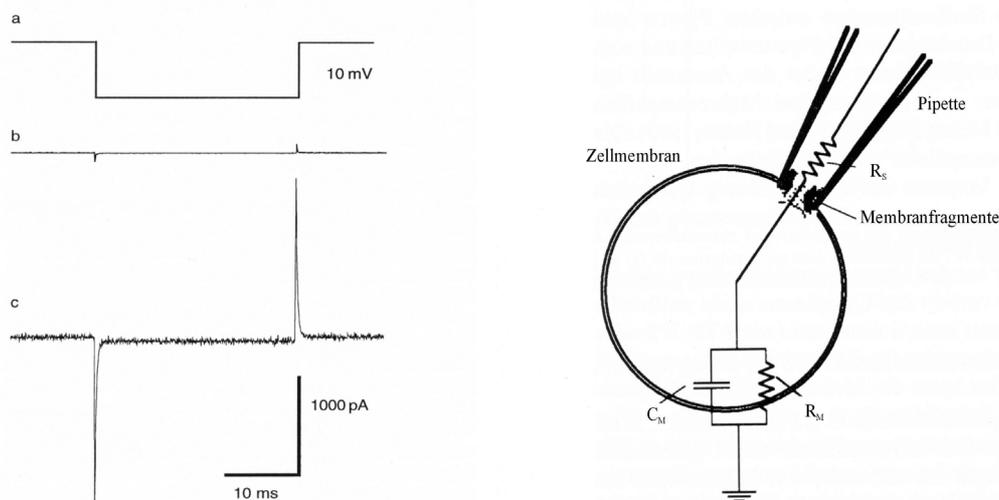


Abbildung 3-24: Das linke Schema stellt die Signale bei Ausbildung einer Ganzzelleableitung dar: a) 10 mV Kommandospulspuls, b) Stromantwort nach Ausbildung der Cell-attached-Konfiguration, c) Stromantwort nach Durchbrechen der Membran. Das rechte Schema zeigt das Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration. [Numberger und Draguhn, 1996]

Der Serienwiderstand R_S hat einen entscheidenden Einfluß auf die Patch-Clamp-Experimente. Ändert man die angelegte Spannung sprunghaft, so liegt diese neue Spannung zwischen dem Zellinneren und dem Bad erst an, wenn der Kondensator C_M (Fläche der Zellmembran) vollständig umgeladen wurde. Die Geschwindigkeit, mit der der dazu benötigte Strom in die Zelle injiziert werden kann, ist von diesem Serienwiderstand abhängig ($\tau_c = R_S \cdot C_M$, mit $\tau_c =$ Zeitkonstante). Je kleiner der Serienwiderstand und die Membrankapazität, desto schneller erfolgt die Umladung. Das Potential der Zelle weicht damit für eine gewisse Zeit vom Sollwert ab. Zudem fällt die angelegte Spannung über den gesamten Widerstand aus R_S

und R_M (Membranwiderstand) ab. Nur wenn der Serienwiderstand im Vergleich zum Membranwiderstand klein ist ($R_S \ll R_M$), liegt die Sollspannung bzw. das Kommandopotential tatsächlich an. Somit gilt: Je größer der Serienwiderstand, desto mehr weicht die Spannung im Zellinnern vom Kommandopotential ab. Als zusätzliches Resultat der Kompensation erhält man die Membrankapazität C_M , den Membranwiderstand R_M und den Serienwiderstand R_S . Die Kapazitätskompensation führt aber nicht zur einer Erhöhung der Genauigkeit oder der Geschwindigkeit der Voltage-Clamp-Messungen. Man verhindert lediglich eine Übersättigung des Verstärkers bei Spannungssprüngen. Die Aufladevorgänge mit und ohne Kompensation sind jedoch die gleichen, nur daß man sie nicht mehr (ganz) sieht. Es gibt jedoch einen aktiven Mechanismus, der die Umladung der Zellmembran beschleunigt und die Annäherung an die Kommandospannung verbessert. Bei diesem als R_S -Kompensation (R_S -Comp) bezeichneten Mechanismus wird zur Kommandospannung noch ein zusätzlicher Anteil addiert, der proportional zum gerade injizierten Strom ist und so einen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht. Durch Aktivierung dieses zusätzlichen Regelkreises mit positiver Rückkopplung nimmt das Rauschen des Stromsignals jedoch zu. Außerdem läßt sich der Fehler durch den Serienwiderstand auch nicht vollständig kompensieren, weil sonst die Rückkopplungsschaltung instabil wird und zu schwingen beginnt. Es gibt jedoch noch einen weiteren Nachteil, weshalb entschieden wurde auf die R_S -Kompensation zu verzichten: Der benutzte EPC9 Patch-Clamp-Verstärker verbirgt den zusätzlich zur Kommandospannung addierten Anteil. Dieser wird intern zum Pipettenpotential addiert und ist somit nicht zugänglich. Für die Auswertung der Zell-Transistor-Kopplungsmessungen werden die kapazitiven Transienten des Stimulationspulses aber dazu benutzt, die Seal-Leitfähigkeit (seal conductance) g_J des Spaltes zwischen Zelle und Transistor zu berechnen. Außerdem geben die mit den Feldeffekttransistoren extern gemessenen kapazitiven Transienten die Aufladung der Zellmembran, verlangsamt durch die Zeitkonstante $\tau_c = R_S \cdot C_{slow}$, vollständig wieder (s. Kapitel 2.3).

Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe weiterer Quellen, die zu Abweichungen zwischen dem angezeigten und dem tatsächlichen Potential von Zellmembran oder Patch führen können. Diese als Offsetpotentiale bezeichneten Quellen sind z.B. Polarisierungen an der Silber/Silberchlorid-Elektrode (electrode potentials) im umgebenden Elektrolyten und Übergangspotentiale (liquid junction potentials) zwischen Pipetten- und Badlösung [Neher, 1992; Neher, 1995]. Diese müssen ebenfalls stets berücksichtigt und bei Bedarf korrigiert werden.

3.5. Charakterisierung der MEAs und FETs

3.5.1. Mikroelektrodenarrays

Die fertig prozessierten und verkapselten Mikroelektrodenarrays wurden mit potentiodynamischen Strom-Spannungskurven, bei gleichzeitiger Aufnahme der Kapazitäten, sowie durch Rauschmessungen charakterisiert.

Die Strom-Spannungskurven (CV-Kurven) wurden im Potentialbereich von 0,3 V bis 1,9 V gegen SHE (Standard-Wasserstoff-Elektrode) mit einem Vorschub von $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ in $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ -Lösung aufgenommen. Gleichzeitig wurden die Kapazitäten mit einem Lock-In-Verstärker registriert. Abbildung 3-25 zeigt eine solche Messung.

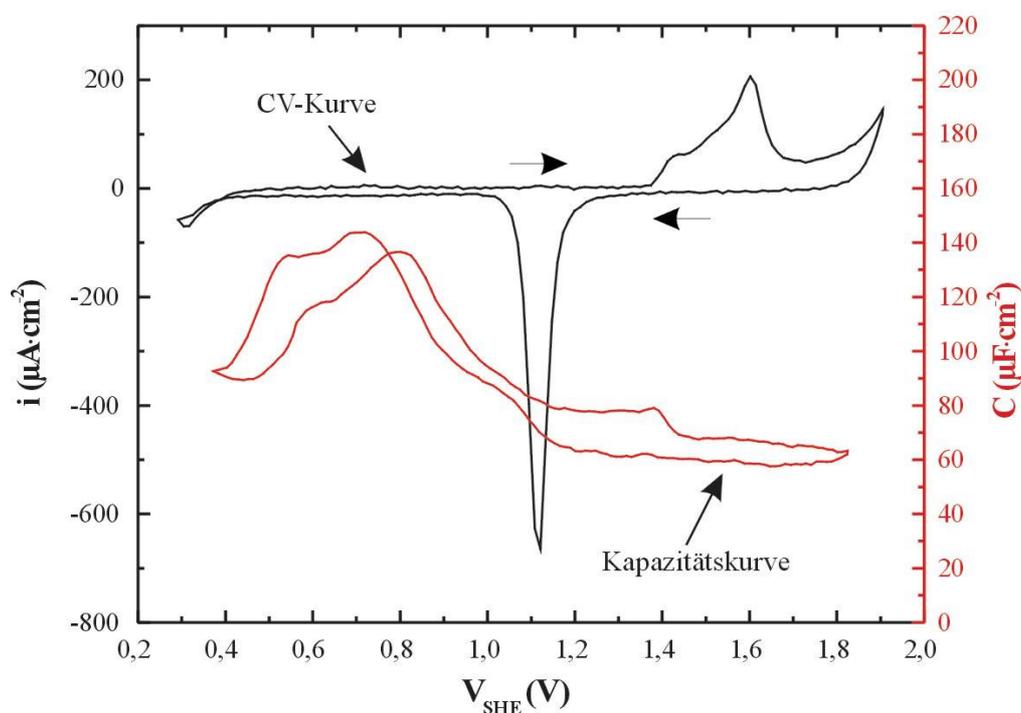


Abbildung 3-25: Potentiodynamische Strom-Spannungs- und Kapazitätskurven einer Mikroelektrodenarrays (Elektroden Durchmesser $8 \mu\text{m}$) in $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, Vorschub $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Das Zyklovoltammogramm zeigt, daß bei Potentialen größer $1,4 \text{ V}$, bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode (SHE), unter anodischem Stromfluß eine Oxidschicht gebildet wird. Bei Potentialen kleiner $1,3 \text{ V}$ wird die Schicht wieder kathodisch reduziert. Bei Potentialen größer $1,8 \text{ V}$ setzt Sauerstoff- und bei Potentialen kleiner $0,4 \text{ V}$ Wasserstoffentwicklung ein.

Die Kapazitätskurve weist im Potentialbereich zwischen $1,4 \text{ V}$ und $1,8 \text{ V}$ eine Kapazität von $60 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf. Bis zu einem Potential von $1,2 \text{ V}$ bleibt der Wert konstant (Rücklauf). Erst bei Potentialen kleiner $1,2 \text{ V}$ macht sich ein deutlicher Anstieg bemerkbar, bis bei etwa $0,7 \text{ V}$ der Maximalwert von $140 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ erreicht wird. Dieser Wert sollte der Doppel-

schichtkapazität C_d entsprechen. Eine Makroelektrode zeigt aber Werte zwischen 5 und $50 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ [Hamann und Vielstich, 1998]. Die Abweichung ist größtenteils auf Streukapazitäten C_{Streu} zurückzuführen. Die größte Streukapazität entsteht durch das Silizium-Substrat. Vor allem zwischen den Leiterbahnen werden über die 600 nm dicke SiO_2 -Schicht Kondensatoren mit der Kapazität C_{Si} gebildet. C_{Si} ist proportional zur Gesamtfläche der Elektroden, Bondpads und Leiterbahnen. Da sich die Gesamtkapazität aus der Summe aller Einzelkapazitäten ergibt, ist der experimentell bestimmte Wert für die Doppelschichtkapazität C_d somit erhöht.

Die potentiodynamischen Strom-Spannungs- und Kapazitätskurven zeigen die charakteristischen Eigenschaften „normaler“ Goldmikroelektroden. Es gibt keine Hinweise auf verbliebende Reste der Titan-Haftvermittlerschicht (s. Kapitel 3.2.2.2). Sie wurde durch den vierfachen RIE-Prozeß vollständig entfernt.

Der Widerstand der Goldelektroden wurde durch eine Impedanzmessung mit einem Frequency-Response-Analyzer (TF2000) der Firma Voltech bestimmt. Die Impedanz der $8 \mu\text{m}$ großen Elektroden betrug bei der üblichen Frequenz von 1 kHz etwa $2,8 \text{ M}\Omega$. Da bei dieser Frequenz der Phasenwinkel annähernd 90° ist, läßt sich aus dem Impedanzwert die Doppelschichtkapazität zu $57 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ abschätzen (über $Z \cong 1/\omega C$). Dieser Wert stimmt relativ gut mit den Werten aus den potentiodynamischen Strom-Spannungs- und Kapazitätskurven überein. Bei Verwendung eines spezifischen Widerstandes von $10 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$ und einer typischen spezifischen Kapazität von $30 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ für eine planare Goldelektrode läßt sich der Widerstand einer $8 \mu\text{m}$ großen Elektrode mit einer Fläche von $5,03\cdot 10^{-7} \text{ cm}^2$ auch theoretisch abschätzen zu $19,89 \text{ M}\Omega$ (über $R \cong R_z/A$) und die Kapazität zu $15,08 \text{ pF}$ (über $C \cong C_z\cdot A$). Es ergibt sich dann bei einer Frequenz von 1 kHz für die Impedanz einer $8 \mu\text{m}$ großen Elektrode ein Wert von $11 \text{ M}\Omega$ (über $Z \cong 1/2\pi fC$). Dieser Wert ist etwa dreimal größer als der gemessene. Vermutlich resultiert der Fehler aus den angenommenen Werten für den spezifischen Widerstand, die spezifischen Kapazität oder aus Streukapazitäten des Siliziums während der Impedanzmessungen. Auch eine falsch angenommene Elektrodenfläche könnte der Grund für diese Abweichung sein, da die Elektrodenoberfläche während Ätzworgangs zur Entfernung der Titan-Haftvermittlerschicht aufraucht.

Für die Kopplungsmessungen in Kapitel 4.2.1 ist das Rauschverhalten der Mikroelektrodenarrays bzw. der Extended-Gate-Elektroden mit der gesamten nachgeschalteten Verstärkerelektronik wichtig: Das Gesamtrauschen wurde durch Messung des Drain-Source-Stroms für fünf Sekunden bei einer Auflösung von 10 kHz an einer $8 \mu\text{m}$ großen Goldelektrode gemessen (nach Anlegen der entsprechenden Gate-Source- und Drain-Source-Spannungen). Die Stromänderungen wurden dabei auf die Gatespannung V_J umgerechnet. In Abbildung 3-26 ist der zeitliche Verlauf der Gatespannung V_J einer Goldmikroelektrode (Durchmesser $8 \mu\text{m}$) dargestellt. Dieser wurde aus den Source-Drain-Änderungen des

entsprechenden Junction-FET (JFET) berechnet. Die Gate-Source-Spannung V_{GS} betrug 0,2 V und die Drain-Source-Spannung V_{DS} 1 V. Der JFET hat bei diesem Arbeitspunkt eine Steilheit von $g_m = 3 \text{ mS}$ (s.u.). Die Stromänderung $I_{DS} = 200 \text{ nA}$ entspricht hier einem peak-to-peak-Verhältnis von $V_J = 100 \text{ } \mu\text{V}$. Zur Messung wurden die Gates der JFETs mit den Goldelektroden der Arrays verbunden. Dies entspricht dem Fall der kompletten Meßkonfiguration, wie sie zur Aufzeichnung der extrazellulären Signale in Kapitel 4.2.1 bei den Kopplungsexperimenten eingesetzt wurde. Das Rauschen der neuen Mikroelektrodenarrays liegt damit im gleichen Bereich, wie die alten „Glasmikroelektrodenarrays“ ($100 \text{ } \mu\text{V}$; [Ingebrandt, 2001]). Vorangegangene Messungen belegen [Krause, 2000; Ingebrandt, 2001], daß es außer den 50 Hz zu keinen signifikanten Einstreuungen bis in den kHz-Bereich aus dem Umfeld der Meßapparatur kommt und daß das Rauschen der Meßelektronik ($35 \text{ } \mu\text{V}$) deutlich geringer ist, als die für die Kopplungsexperimente eingesetzte Kombination aus Goldmikroelektrode, JFET und Nachverstärkung.

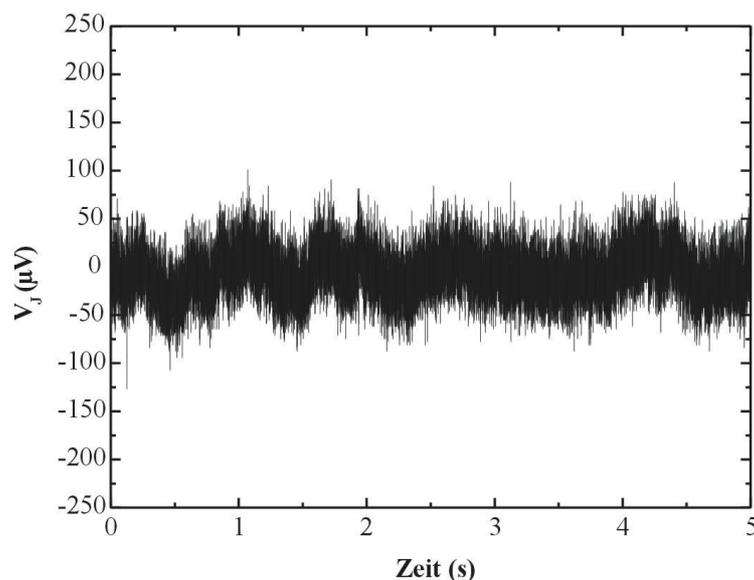


Abbildung 3-26: Zeitlicher Verlauf der Gatespannung V_J zur Bestimmung des Gesamtrauschens des Extended-Gate-Elektroden-Aufbaus ($8 \text{ } \mu\text{m}$ Mikroelektrode). Die Auflösung beträgt 10 kHz und die Meßzeit fünf Sekunden. Die Spannung V_J wurde mit der Steilheit g_m (3 mS) im Arbeitspunkt berechnet. Die angelegte Gate-Source-Spannung betrug 0,2 V und die Drain-Source-Spannung 1 V.

3.5.2. Feldeffekttransistoren

Die Feldeffekttransistoren wurden durch die experimentelle Bestimmung der typischen Ausgangs- und Transferkennlinien sowie die sich daraus ergebenden Steilheiten charakterisiert. Es folgt zunächst eine Charakterisierung der eingesetzten p- und n-Kanal-Transistoren, die für die Messungen in Kapitel 4.2.2 benötigt werden. Danach wird die Bestimmung der

Kennlinien für die in dem 64-Kanal-Vorverstärkermeßkopf eingesetzten Junction-Feld-effekttransistoren gezeigt.

3.5.2.1. p- und n-Kanal-Transistoren

In Kapitel 3.3.1.2 wurde die für die Aufnahme der Kennlinien benötigte Meßelektronik und zugehörige Steuersoftware bereits beschrieben. Um die FETs mit einer Patch-Clamp-Anordnung gleichzeitig verwenden zu können, müssen die elektrischen Kontakte, verglichen mit einem klassischen FET-Aufbau, geringfügig modifiziert werden. Dazu muß der Elektrolyt, der den metallischen Gatekontakt ersetzt (vgl. MOS- und EIS-Struktur in Kapitel 2.2), mit „Ground“ verbunden werden. Die Potentiale werden somit gemäß Abbildung 3-27 definiert.

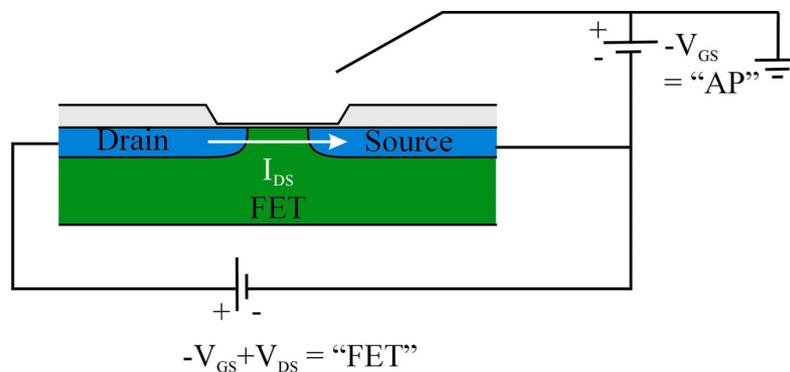


Abbildung 3-27: Elektrische Kontaktierung des Feldeffekttransistors. Die Bezeichnungen „AP“ und „FET“ werden auch an der Frontseite des Hauptverstärkers angezeigt.

Je nach Kennlinie werden die variablen und die jeweils konstant gehaltenen Potentiale an die Source-, Drain- und Gateanschlüsse definiert angelegt. Für die Aufnahme von Ausgangskennlinien wurde die Drain-Source-Spannung V_{DS} variiert, die Gate-Source-Spannung V_{GS} konstant gehalten und der resultierende Drain-Source-Strom I_{DS} gemessen. Bei den Transferkennlinien wurde die Gate-Source-Spannung V_{GS} variiert, die Drain-Source-Spannung V_{DS} konstant und der resultierende Drain-Source-Strom I_{DS} gemessen. Aus der Transferkennlinie kann durch Bildung der ersten Ableitung die Steilheit g_m des Transistors berechnet werden.

In Abbildung 3-28 sind die typischen Kennlinien für einen der verwendeten p-Kanal-Feldeffekttransistoren dargestellt. Die Gategröße des p-Kanal-FETs beträgt $6 \times 16 \mu\text{m}^2$ und die Gateoxiddicke d_i 10 nm. Die Ausgangskennlinie (oberes Bild in Abbildung 3-28) weist die erwartete Abhängigkeit des Drain-Source-Stroms I_{DS} von der Gate-Source-Spannung V_{GS} auf. Bedingt durch die Elektronik kann aber nur ein maximaler Drain-Source-Strom I_{DS} von $\pm 500 \mu\text{A}$ gemessen werden. Die Drain-Source-Spannung V_{DS} wurde zwischen 0 und -2 V variiert und die Gate-Source-Spannung V_{GS} zwischen 0 und -3 V. Da bei $V_{GS} = 0$ keine Ladungsinversion im Kanal des FET erzeugt wird, kann deshalb auch kein Drain-Source-

Strom I_{DS} gemessen werden. Das Einsetzen der Inversion kann erst durch eine Erhöhung der Gate-Source-Spannung V_{GS} hervorgerufen werden. Dies führt dann zu einer Anreicherung von positiven Ladungsträgern im Kanalbereich.

Die Transferkennlinien (mittleres Bild in Abbildung 3-28) zeigen, daß der Einsatzpunkt zur Ausbildung der Inversion bei der Schwellwertspannung (threshold voltage) von $V_{TH} = -0,2 \text{ V}$ liegt und daß der beobachtete Strom I_{DS} in Abhängigkeit von V_{GS} ansteigt. Dies liegt daran, daß sich mit größer werdendem V_{GS} auch die Anzahl der durch Inversion im Kanal erzeugten positiven Ladungsträger erhöht.

Aus den Transferkennlinien, die die Abhängigkeit des Drain-Source-Stroms I_{DS} von der Gate-Source-Spannung V_{GS} beschreiben, kann die Steilheit g_m des Transistors berechnet werden. Mit Kenntnis der Gatesteilheit wurde die Gate-Source-Spannung V_{GS} während eines Kopplungsexperimentes so gewählt, daß eine kleine Spannungsänderung am Gate eine möglichst große Änderung des Drain-Source-Stroms bewirkte. Die optimale Einstellung von V_{GS} wird als Arbeitspunkt bezeichnet. Der optimale Arbeitspunkt dieses p-Kanal-Transistors liegt bei $V_{GS} = -2 \text{ V}$ und $V_{DS} = -3 \text{ V}$, da dort eine maximale Steilheit von $g_m = 0,37 \text{ mS}$ erreicht wird (vgl. unteres Bild in Abbildung 3-28).

In Abbildung 3-29 sind die typischen Ausgangs- und Transferkennlinien für einen der verwendeten n-Kanal-Feldeffekttransistoren abgebildet. Die Gategröße des n-Kanal-FETs beträgt $7 \times 8 \text{ } \mu\text{m}^2$ und die Gateoxiddicke d_i 12 nm. Erst ab V_{GS} -Werten größer Null zeigt der hier verwendete n-Kanal-FET einen bedeutenden Anstieg des Drain-Source-Stroms I_{DS} . Es handelt sich somit um einen Anreicherungs-FET. Den Transferkennlinien (mittleres Bild in Abbildung 3-29) ist zu entnehmen, daß der Einsatzpunkt des Drain-Source-Stroms I_{DS} bei einer Schwellwertspannung von $V_{TH} = 0,5 \text{ V}$ liegt. Der optimale Arbeitspunkt des n-Kanal-Transistor liegt bei $V_{GS} = 1,95 \text{ V}$ und $V_{DS} = 2,5 \text{ V}$. Dort wird eine maximale Steilheit von $g_m = 0,6 \text{ mS}$ erreicht (vgl. unteres Bild in Abbildung 3-29).

Die Steilheit g_m der verschiedenen Transistoren wird entscheidend durch die Dicke des Gateoxids, die Länge L und die Breite b des Kanals, sowie von der Beweglichkeit der Majoritätsladungsträger beeinflusst. Deshalb zeigen vor allem die n-Kanal-Transistoren (bessere Beweglichkeit der Elektronen) mit den breiten ($16 \text{ } \mu\text{m}$) und kurzen Gates ($5 \text{ } \mu\text{m}$) und dünnen Gateoxiden ($\leq 10 \text{ nm}$) die beste Steilheit. Dafür weisen die p-Kanal-Transistoren die bessere Stabilität gegenüber den Elektrolyten auf (durch negative Gate-Source-Spannung kaum Ionenpenetration im Gateoxid). Die Steilheiten der verwendeten p-Kanal-Feldeffekttransistoren liegen zwischen $0,3$ und $0,6 \text{ mS}$ und die für die n-Kanal-Feldeffekttransistoren zwischen $0,4$ und $1,2 \text{ mS}$. In dieser Arbeit stellten die p-Kanal-Transistoren mit den Gatedimensionen $b = 16$ und $L = 5$ den besten Kompromiß dar, da sie genügend stabil, steil und noch klein genug waren, um genau unter die verwendeten HEK 293-Zellen zu passen.

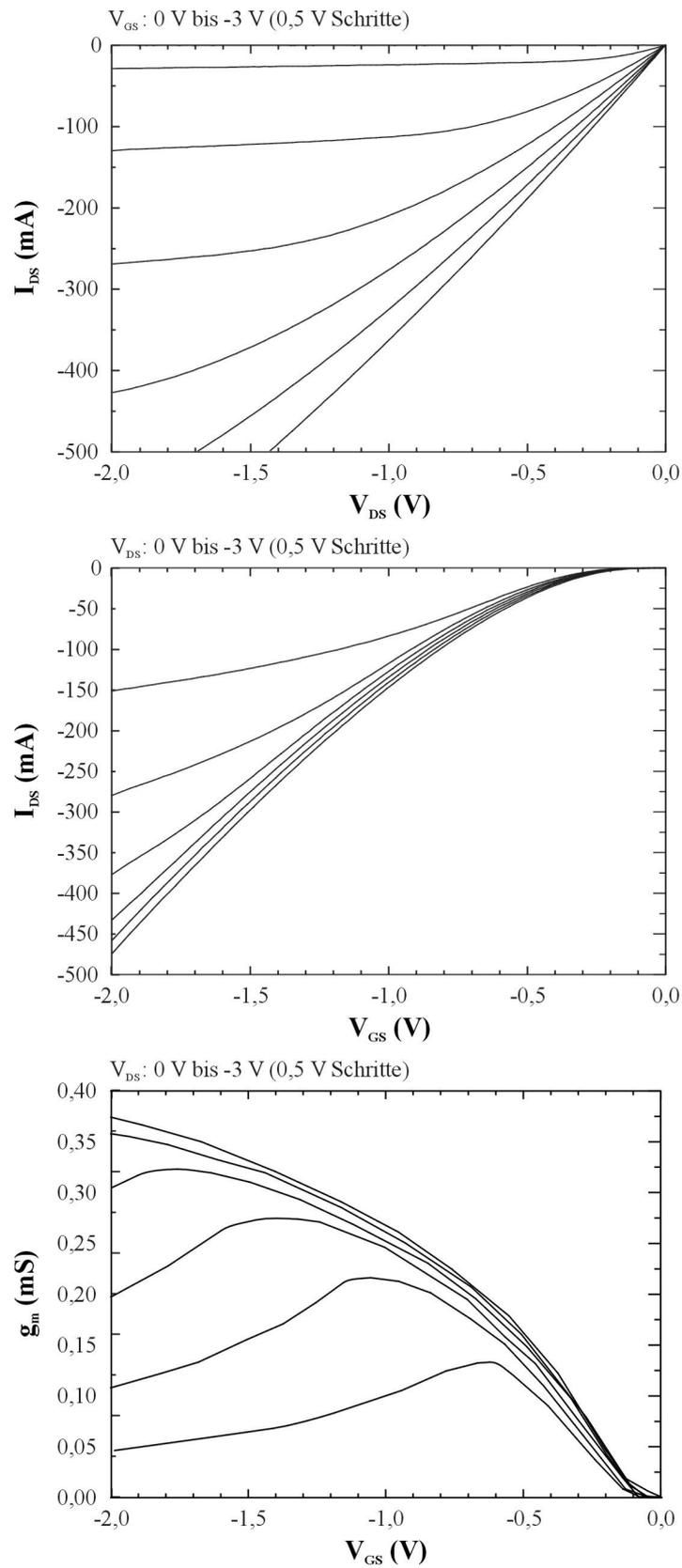


Abbildung 3-28: Kennlinien eines p-Kanal-Feldeffekttransistors. Die drei Abbildungen zeigen die Ausgangs-, die Transferkennlinien und die Ableitung der Transferkennlinien (von oben nach unten).

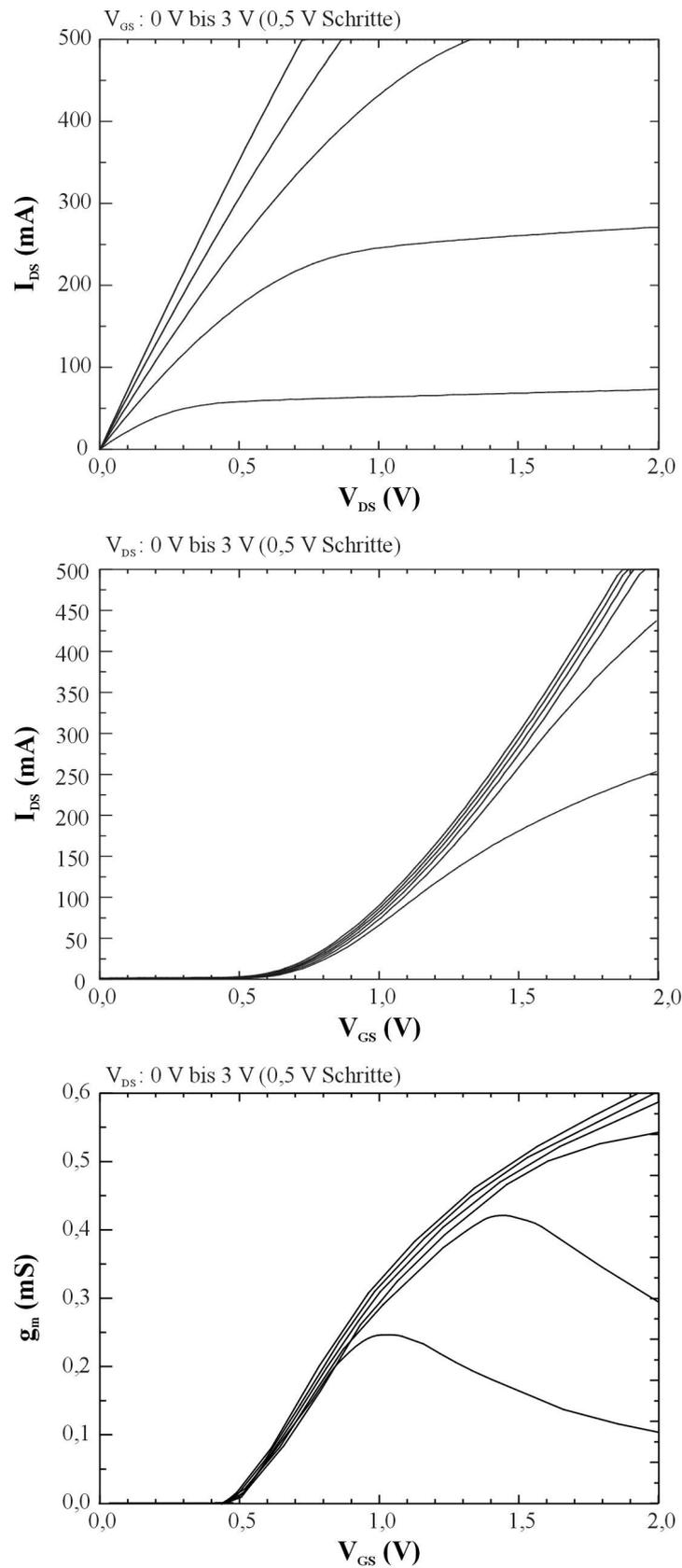


Abbildung 3-29: Kennlinien eines n-Kanal-Feldeffekttransistors. Die drei Abbildungen zeigen die Ausgangs-, die Transferkennlinien und die Ableitung der Transferkennlinien (von oben nach unten).

Das Rauschverhalten der in dieser Arbeit verwendeten Feldeffekttransistoren wurde in früheren Arbeiten bereits charakterisiert [Ingebrandt, 2001; Krause, 2000; Sprössler, 1997]. Das Rauschen der verschiedenen Transistoren ist zudem schwierig zu vergleichen, da es z.B. stark vom verwendeten Typ (p- oder n-Kanal), den Gatedimensionen, dem Gateoxid, der Temperatur, den Arbeitspunkten, usw. abhängt. Das Rauschen (peak-to-peak) der verwendeten Transistoren liegt aber in der Größenordnung zwischen 50 und 200 μV (Abtastrate 10 kHz, Meßzeit fünf Sekunden), wobei die n-Kanal-Transistoren das geringste Rauschniveau aufweisen. Die Hauptquelle des Rauschens, im für die Kopplungsmessungen biologisch interessanten Meßbereich (0,1 bis 5 kHz), ist das sogenannte 1/f-Rauschen [McWhorter, 1957], das durch das McWhorter-Modell beschrieben werden kann und sowohl frequenz- als auch temperaturabhängig ist. Darüber hinaus gibt es noch weitere Rauscharten, die zum Gesamtrauschniveau beitragen und in [Jordan and Jordan, 1964] zu finden sind. Durch Verwendung anderer Gateoxid-Materialien mit größeren Dielektrizitätskonstanten (z.B. (Ba, Sr) TiO_3 oder ZrO_2) kann das derzeitige Rauschniveau der Feldeffekttransistoren noch weiter verbessert werden.

3.5.2.2. Junction-Feldeffekttransistoren

Wie oben bereits erwähnt, wurden für die Messungen mit den Mikroelektrodenarrays die Gates der Junction-Feldeffekttransistoren mit den Goldelektroden der Arrays verbunden. Damit sich während der Kopplungsexperimente eine kleine Spannungsänderung in einer möglichst großen Änderung des Drain-Source-Stroms auswirken konnte, mußte auch für diese JFETs der optimale Arbeitspunkt aus den Transferkennlinien (bzw. Ableitungen) ermittelt werden (s. Abbildung 3-30). Für die Aufnahme der Kennlinien wurden die kommerziell erhältlichen JFETs (PMBF 5484, Philips Semiconductors, U.S.A.) mit einem „Semiconductor Parameter Analyzer“ (4155C, Agilent, Deutschland) vermessen. Dabei zeigte sich, daß die JFETs untereinander nur unwesentliche Unterschiede aufwiesen.

Der optimale Arbeitspunkt, der bei $V_{\text{GS}} = 0,2 \text{ V}$ und $V_{\text{DS}} = 1 \text{ V}$ liegt (Abbildung 3-30), wurde während der Kopplungsmessungen über die mit TestPoint (Keithley, Deutschland) selbst erstellte Software [Sprössler, 1997] für alle 64 JFETs im Vorverstärkermeßkopf gleich eingestellt. Die Steilheit erreicht in diesem Punkt einen Wert von $g_m = 3 \text{ mS}$.

Der Arbeitspunkt der JFETs kann auch alternativ mit einer anderen Methode bestimmt werden. Dazu müssen mit Hilfe der TIDA-Software des Patch-Clamp-Verstärkers definierte Testpulse auf die Stimulationseingänge des Vorverstärkermeßkopfes gegeben und mit der Panasonic-Software (s Kapitel 3.3.1.2) der Drain-Source-Strom I_{DS} aufgenommen werden. Durch Zurückrechnen des Stroms auf die Gatespannung V_{J} , bei Kenntnis des angelegten Stimulationspulses, kann auf die Steilheit g_m der Transistoren geschlossen werden. Mit dieser Methode ergeben sich aber übereinstimmend dieselben optimalen Arbeitspunkte.

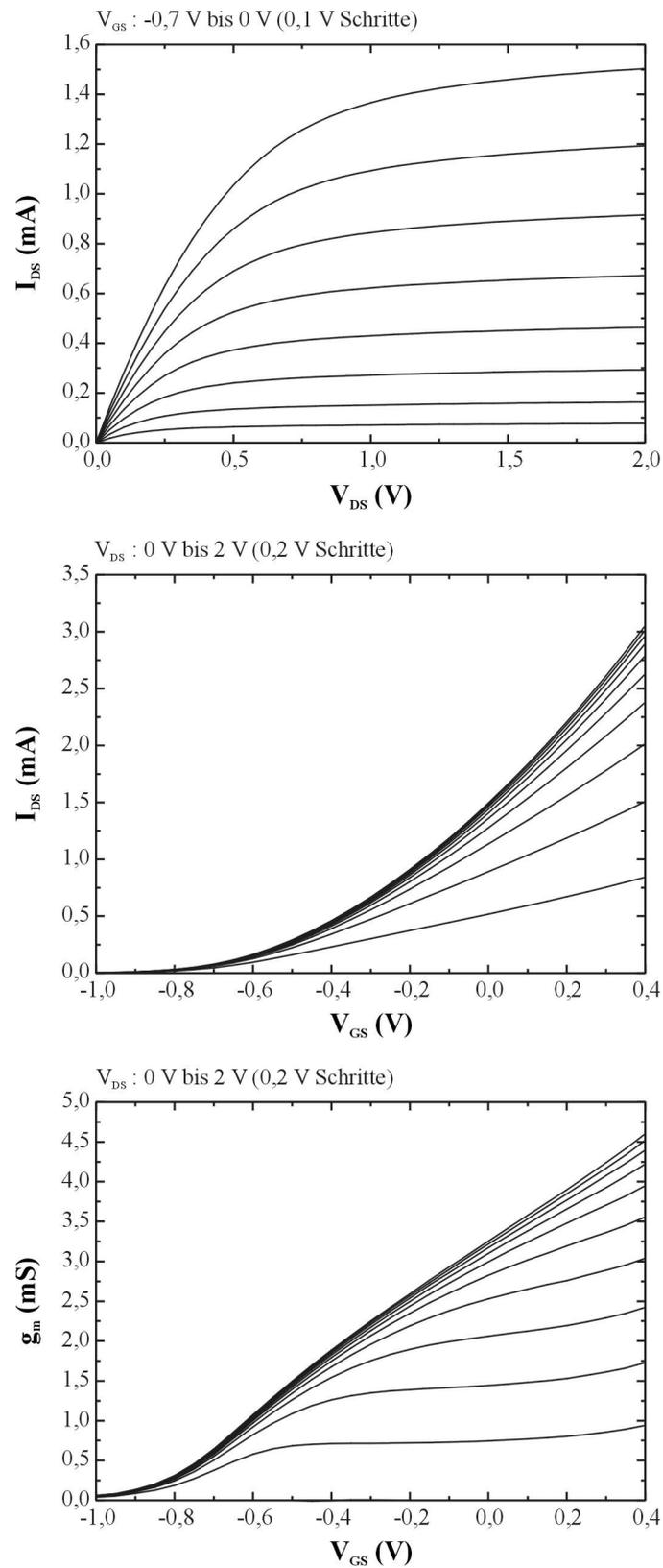


Abbildung 3-30: Kennlinien der verwendeten kommerziellen JFETs (PMBF 5484, Philips Semiconductors, U.S.A.), die im 64-Kanal-Vorverstärkermeßkopf eingebaut sind. Die drei Abbildungen zeigen (von oben nach unten) die Ausgangs-, die Transferkennlinien und die Ableitung der Transferkennlinien.

3.6. Zellkultur

In diesem Abschnitt wird die Präparation der verwendeten Kardiomyozyten und die Herstellung einer stabil mit dem Rinder-eag1-Kanalgen transfizierten HEK 293-Zelllinie beschrieben. Die Reinigung und Beschichtung der Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays und die Kultivierung der Zellen wird anschließend erläutert. Die verwendeten Meßlösungen sind tabellarisch am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

3.6.1. Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen)

Die Präparation der Kardiomyozyten¹ (Herzmuskelzellen) erfolgte in Anlehnung an [Denyer et al., 1999].

Zur Isolierung der Kardiomyozyten wurden die Herzen von acht bis zwölf embryonalen Ratten (Sprague Dawley; Embryonaltage E15-E18) steril entnommen und in Ca/Mg-freies HBSS (Hanks balanced salt solution, Invitrogen) überführt. Durch mechanisches Pumpen wurde das Blut aus den Herzen entfernt. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es wurde dreimal mit eiskaltem Ca/Mg-freiem HBSS gewaschen. Das HBSS wurde gegen Versene-Puffer (Invitrogen) mit 0,05 % Trypsin (Sigma) ausgetauscht. Es wurde für 20 Minuten bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Zellsuspension wurde DNase Typ D-Lösung (10.000 Einheiten/ml, Sigma) zum Abbau eventuell freigesetzter genomischer DNA hinzugegeben. Danach wurde erneut für 20 Minuten inkubiert. Der Überstand, in dem sich die vereinzelt Zellen befanden, wurde abgenommen und in HEPES-Puffer (HAM F10, Invitrogen) überführt. Dieser Puffer enthielt zusätzlich 0,5 Vol.-% einer Insulin-, Selenit-, Transferrin-Lösung (ITS, Invitrogen) und 25 Vol.-% fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen). Die zur enzymatischen Dissoziation notwendigen Schritte wurden so lange wiederholt, bis das Gewebe vollständig dissoziiert war. Die Zellsuspension wurde fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen gesammelt und für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Überstand reicherten sich die Kardiomyozyten an und man erhielt eine Zellsuspension mit einer hohen Anzahl von Herzzellen. Der größte Teil der Fibroblasten wurde entfernt, da sie schneller an der Zellkulturflasche adhärirten als die Kardiomyozyten.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Nach dem Einstellen der gewünschten Zellkonzentration wurde die Zellsuspension (etwa 50 µl) auf die gereinigten und vorbehandelten Mikroelektrodenarrays (vgl. Kapitel 3.6.3) pipettiert. Eine Präparation ergab 1-2 ml Zellsuspension (ungefähr 1 bis 2 Millionen Zellen). Diese Menge reichte aus, um Zellen auf 20 bis 40 Arrays Zellen auszuplattieren.

¹ Die Präparation wurde von J. Hayashi in Japan durchgeführt; Arbeitsgruppe Local Spatio; Prof. Dr. M. Hara.

3.6.2. Menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney Cells)

Zur Herstellung einer stabilen, mit beag1-transfizierten Zelllinie wurde eine menschliche embryonale Nieren-Zelllinie (HEK 293) verwendet. Am Institut für Biologische Informationsverarbeitung² wurde im Arbeitskreis von A. Baumann ein Gen aus der Rinder-netzhaut kloniert, das für einen spannungsgesteuerten, K⁺-selektiven Ionenkanal kodiert. Das Gen gehört zur Unterfamilie der ether-à-go-go (eag) K⁺-Kanäle und hat die Bezeichnung beag1 [Brüll, 1996; Frings et al., 1998].

Die cDNA, die für das vollständige beag1-Protein kodiert, wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) subkloniert. Die Bezeichnung des Konstrukts lautet pbeag1 und wurde für diese Arbeit von A. Baumann zur Verfügung gestellt.

Mit diesem Konstrukt wurden die HEK 293-Zellen transfiziert. Die HEK 293-Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus Instruments BB 6060) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde „Minimal Essential Medium“ (MEM, Sigma) verwendet, das 10 % fötales Kälberserum (Invitrogen), 10 ml/L Antibiotika/Antimykotika Lösung (100 x, Invitrogen), 10 ml/L 0,02 M L-Glutamin (Invitrogen) und 10 ml/L nicht-essentielle Aminosäuren (100 x, Invitrogen) enthielt. Die Laborbezeichnung dieses Mediums ist M10. Die Verdopplungsrate der HEK 293-Zellen betrug 24 Stunden. Die Transfektion erfolgte nach einer von [Chen and Okayama, 1987] beschriebenen Methode (mit leichten Modifikationen). Zur Transfektion wurden 2·10⁵ Zellen in eine 5 cm Petrischale ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zwei Stunden vor der Transfektion, wurden die HEK 293-Zellen mit frischem M10-Medium versetzt. Der Transfektionsansatz (8 µg DNA; ad 124 µl H₂O; 41 µl 1 M CaCl₂; 165 µl BBS (2x); insgesamt 330 µl) wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden danach wieder bei 35 °C und 3 % CO₂ für 20 bis 22 Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen entstand ein feines Präzipitat, das durch Waschen mit vorgewärmtem PBS entfernt wurde. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst, in M10-Medium resuspendiert und in einer Dichte von 2·10⁴ Zellen auf 9 cm großen Petrischalen ausgesät. Die Selektion der Zellen, die das Gen stabil in ihr Genom integriert hatten, erfolgte durch die Zugabe des Antibiotikums G418. Das Resistenzgen, das den Zellen ein Wachstum im Selektionsmedium ermöglichte, wurde von dem Vektorplasmid pcDNA3.1 mitkodiert. Nach etwa 14 Tagen wurden einzelne Zellklone mit Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst und in die Vertiefungen von 24^{er} MWP (Multiwell™ Gewebekulturplatte) überführt. Die Zellen wurden in 500 µl M10-Medium und 1000 µg/ml G418 vermehrt. Die Identifizierung der Zellklone, die das eag1-Kanalprotein exprimierten, erfolgte elektrophysiologisch.

² IBI-1 (Forschungszentrum Jülich); Institutsleiter Prof. Dr. U.B. Kaupp.

Für die in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Experimente wurde die Zelllinie beag1 II/6 verwendet. Vor der Aussaat der Zellen (30 µl Suspension) auf die gereinigten und vorbehandelten Feldeffekttransistoren (vgl. Kapitel 3.6.3) wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die mit den Zellen versehenen FETs wurden in mit H₂O (bidest; steril) gefüllte 9 cm große Petrischalen gestellt und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Vorteil einer stabilen Zelllinie ist, daß Zellen nahezu unbegrenzt verfügbar sind.

3.6.3. Reinigung, Oberflächenbeschichtungen und Aussaat der Zellen

Bevor die Arrays mit Zellen beschichtet werden konnten, mußte eine gründliche Reinigung und eine Oberflächenbeschichtung erfolgen (vgl. Anhang 6.3). Dazu wurden sie zunächst mit einem Küvettenreiniger (2 Vol.-% Hellmanex-Lösung; Hellma Optik GmbH, Deutschland) für fünf Minuten in einem Ultraschallbad behandelt und danach unter fließendem deionisiertem Wasser (Milli-Q) gespült. Anschließend wurden sie erneut mit Milli-Q Wasser ultraschallbestrahlt und einzeln unter fließendem Wasser (Milli-Q) abgespült. Verbliebene organische Rückstände wurden mit 20 Vol.-% Schwefelsäure entfernt. Die befüllten Arrays wurden für eine Stunde bei 80 °C inkubiert. Die Säure wurde danach abgesaugt und jedes Array einzeln mit fließendem deionisiertem Wasser abgespült. Die so gereinigten Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays wurden in Glasschalen gelegt und mit 70 Vol.-% Ethanol übergossen (Sterilisation).

Vor der Aussaat der Zellen, wurde der Alkohol abgesaugt und die Badkammern der FETs und MEAs mit sterilem Wasser in einer Reinraumarbeitsbank (danLAF VFR1206) gespült. Danach erfolgen die Oberflächenmodifikationen mit Fibronectin (Sigma) oder Poly-L-Lysin (Sigma).

Für die Beschichtung der Mikroelektrodenarrays mit Fibronectin wurde auf die sensitiven Bereiche 80 µl Fibronectin Lösung (5 µg/ml) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Danach wurde die Fibronectin Lösung abgesaugt und die Badkammern mehrfach mit PBS-Puffer (Dulbeco, Invitrogen) gespült. Anschließend wurde die nach Kapitel 3.6.1 frisch präparierte Kardiomyozyten-Zellsuspension auf die sensitiven Bereiche gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach etwa zwei Stunden wurden die Badkammern mit Zellkulturmedium (HAM F10) aufgefüllt. Alle zwei Tage wurde das Medium zu zwei Dritteln abgesaugt und gegen frisches, vorgewärmtes Medium ausgetauscht. Nach etwa drei bis vier Tagen bildete sich ein geschlossener Zellrasen, der die gesamte Chipoberfläche bedeckte. Unter einem Mikroskop waren dann gleichmäßige Kontraktionen des Zellrasens zu erkennen. Diese Zellpräparate wurden für die Messungen benutzt, die in Kapitel 4.2.1 beschrieben sind.

Die Beschichtung der Feldeffekttransistoren mit Poly-L-Lysin erfolgte analog. Die Konzentration des Poly-L-Lysins betrug 100 µg/ml. Die stabil mit dem beag1-Konstrukt transfizierten Zellen (s. Kapitel 3.6.2) wurden zur Ablösung mit Trypsin/EDTA für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in M10-Medium resuspendiert, in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und durch eine fünfminütige Zentrifugation pelletiert (Sigma Zentrifuge; 200 x g; 4 °C). Die Zellzahl wurde bestimmt (Neubauer-Zählkammer) und die Suspension so verdünnt, daß 8.000-10.000 Zellen in 30 µl Medium enthalten waren. Dieses Volumen wurde dann auf die freien Oberflächen der FETs pipettiert. Nach zwei Stunden wurden die Badkammern der FETs mit vorgewärmtem M10-Medium aufgefüllt. Etwa 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen auf den FETs konnten die Messungen, wie sie in Kapitel 4.2.2 beschrieben sind, durchgeführt werden. Die Zellen wurden spätestens nach drei Tagen entsorgt, da sich zu diesem Zeitpunkt zu viele Zellen auf der Oberfläche befanden.

Anmerkung: Die verkapselten Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays waren sehr robust und konnten mehrfach gereinigt und wiederverwendet werden. Bei Bedarf konnte eine mechanische Reinigung der Oberflächen mit Q-Tipps durchgeführt werden.

3.6.4. Meßlösungen

Zunächst folgt eine tabellarische Aufstellung der Lösungen, die für die Messungen mit den Kardiomyozyten benötigt wurden. Anschließend sind die Lösungen aufgeführt, die für die Patch-Clamp-Experimente mit den HEK 293-Zellen verwendet wurden.

3.6.4.1. Kardiomyozyten

Die Messungen an den Herzmuskelzellen (s. Kapitel 4.2.1) erfolgten in einer extrazellulären Lösung, gegen die das Zellkulturmedium kurz vor dem jeweiligen Experiment ausgetauscht wurde (Tabelle 3-1). Für die Stimulation der Kardiomyozyten wurden Pharmaka verwendet, die ebenfalls mit dieser extrazellulären Lösung angesetzt wurden.

Tabelle 3-1: Extrazelluläre Lösung für Messungen an Kardiomyozyten.

Nr.	Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Masse (g) (500 ml)
1	NaCl	58,44	150	4,383
2	KCl	74,56	5	0,186
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,02	2,5	0,184
4	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,31	1	0,102
5	HEPES	238,31	10	1,192
6	Glucose	180,2	10	0,901

Die extrazelluläre Lösung wurde durch Zugabe von 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (titriert) und mit 3 M Natriumchlorid-Lösung bis zur gewünschten Endkonzentration aufgefüllt.

Für die Stimulation der Kardiomyozyten mit den Pharmaka (s. Kapitel 4.2.1.4) wurden die in Tabelle 3-2 und in Tabelle 3-3 angegebenen Substanzen verwendet.

Tabelle 3-2: Stimulationslösungen für Kardiomyozyten I: Stimulanzen

Name	Molekulargewicht	Konzentration	Verdünnung
Noradrenalin	319,3 g/mol	10 nM -10 µM	extrazelluläre Lösung
Atropin	676,8 g/mol	10 nM - 10 µM	extrazelluläre Lösung

Tabelle 3-3: Stimulationslösungen für Kardiomyozyten II: Antiarrhythmika

Name	Molekulargewicht	Konzentration	Verdünnung
Lidocain	279,8 g/mol	10 nM – 1 µM	extrazelluläre Lösung

Anmerkung: Alle Substanzen wurden von SIGMA bezogen.

3.6.4.2. HEK 293-Zellen

Die Messungen an den HEK 293-Zellen (s. Kapitel 4.2.2) erfolgten ebenfalls in extrazellulärer Lösung, gegen die das Zellkulturmedium kurz vor dem jeweiligen Experiment ausgetauscht wurde (s. Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Extrazelluläre Lösung für Messungen an HEK 293-Zellen.

Nr.	Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Masse (g) (1 L)
1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,02	1,25	0,184
2	MgCl ₂ (anhyd.)	95,21	0,81	0,077
3	KCl	74,56	5,36	0,4
4	HEPES	238,31	10	2,383
5	NaCl	58,44	137,89	s. Text
6	D-Glucose	180,2	5,55	1,000
7	Phenolsulfonphthalein (Indikator)	354,4	0,031	0,011

Die extrazelluläre Lösung wurde mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt (titriert) und mit 3 M Natriumchlorid-Lösung bis zur gewünschten Endkonzentration aufgefüllt.

Auch der pH-Wert der intrazellulären Lösung wurde auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Allerdings wurde hierzu 1 M Kaliumhydroxid-Lösung verwendet. Die K⁺-Endkonzentration wurde mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung eingestellt.

Tabelle 3-5: Intrazelluläre Lösung für Messungen an HEK 293-Zellen.

Nr.	Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Masse (g) (250 ml)
1	KCl	74,56	150	s. Text
2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,31	2	0,102
3	HEPES	238,31	10	0,596
4	EGTA	380,35	1	0,095
5	Na-ATP	594,1	5	0,743
6	Na-GTP	628,2	0,3	0,047

Die intrazelluläre Lösung (Tabelle 3-5), die für die Befüllung der Patch-Clamp-Pipetten benötigt wurde, hatte eine Osmolarität von 300 mOs·kg⁻¹ (Halbmikro-Osmometer Knauer Industries Inc., Deutschland). Die Osmolarität der extrazelluläre Lösung betrug 320 mOs·kg⁻¹.

Anmerkung: Beide Lösungen wurden bei -20 °C gelagert. Dazu wurden die Stocklösungen steril filtriert (Braunrand D, 30 mm, PG 0,2 µm, VWR International GmbH, Deutschland) und aliquotiert. So standen für jeden Meßtag frische Lösungen zur Verfügung. Alle Chemikalien wurden über SIGMA bezogen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Tests zur Biokompatibilität (Anwachsversuche)

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Anwachsversuche mit HEK 293-Zellen vorgestellt und mit denen von Rattenneuronen (adult rat retinal neurones) verglichen. Das Wachstum der Zellen auf den verschiedenen Silizium-basierten Oberflächen (vgl. Kapitel 3.2.1) wurde mit Hilfe der Rasterelektronen- und Lichtmikroskopie analysiert³. Die Aussaat und Präparation der HEK 293-Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Die Präparation der Neurone wird in [Heiduschka et al., 2001] beschrieben.

Damit die Zellen erfolgreich auf Oberflächen wachsen können, müssen diese biokompatibel sein. Als biokompatibel werden allgemein Materialien bezeichnet, die keine toxischen, allergischen oder Immunabwehrreaktionen hervorrufen. Dabei wird die Biokompatibilität des Materials maßgeblich durch die Eigenschaften der Oberfläche, z.B. Hydrophilie, Hydrophobie, Topologie usw. beeinflusst. Weitere Aspekte sind Bio- und Langzeitstabilität sowie elektrische und mechanische Eigenschaften des Materials. Als Materialien werden oft anorganische Werkstoffe, z.B. Si_3N_4 , SiO_2 , aber auch Metalle, wie z.B. Gold, Platin, Iridium, Titan sowie Polymere, z.B. Polyurethane, Polymethacrylate, Polyimid, Nylon und Silikone eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Si_3N_4 , SiO_2 , Gold und Silikone verwendet. Wichtig ist, daß bei Benutzung der Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays (s. Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) der gesamte Schichtaufbau nicht von Stoffwechselprodukten angegriffen wird [vgl. Bruck, 1973, Anderson and Miller, 1984]. Die Isolatorschicht spielt dabei eine entscheidende Rolle. Sie muß nicht nur eine Adhäsion der Zellen ermöglichen, sondern gleichzeitig evtl. integrierte Schaltungen, elektrische Leitungen und Anschlüsse vor elektrochemischer Korrosion in den salzhaltigen physiologischen Lösungen schützen und eine Sterilisierbarkeit der aktiven Oberfläche z.B. durch Alkohol oder andere Verfahren (UV-Bestrahlung, Heißdampfsterilisation) ermöglichen.

Die Rasterelektronenmikroskopie bietet die Möglichkeit die Oberflächen von Substraten und Zellen gut abzubilden. So wurden aus der Topologie der Zellen Aussagen über die Zelladhäsion getroffen. Dabei wurden drei verschiedene Wechselwirkungen betrachtet:

1. Wechselwirkung der Zellen untereinander;
2. Wechselwirkung des Substrats mit den Zellen;
3. Intrinsische Form der Zellen.

Bei einem Vergleich muß aber berücksichtigt werden, daß die Zellgestalt stark vom verwendeten Zelltyp, z.B. Neurone, Fibroblasten, HEK 293-Zellen etc., abhängt. Trotzdem ist eine gute Haftung von Zellen an der Oberfläche eines Substrats nur dann möglich, wenn die

³ Teile aus diesem Kapitel sind veröffentlicht in: [Heiduschka et al., 2001]

Zell-Substrat-Anziehung stärker ist als die der Zellen untereinander. Ist die Zell-Zell-Anziehung stärker, aggregieren die Zellen zu Verbänden und die Zellen nehmen eine kugelförmige Gestalt an (s. linkes Bild in Abbildung 4-1). Ist die Anziehung des Substrats dagegen stark, liegt ein großer Anteil der Zelloberfläche auf dem Substrat auf. Die Zellen erscheinen dann ausgestreckt und flach (s. rechtes Bild in Abbildung 4-1). Eine kugelförmige Zelltopologie wurde daher mit einer schlechten Zelladhäsion und eine flache, langgestreckte mit einer guten und festen Adhäsion der Zellen assoziiert [vgl. Parak, 1999].

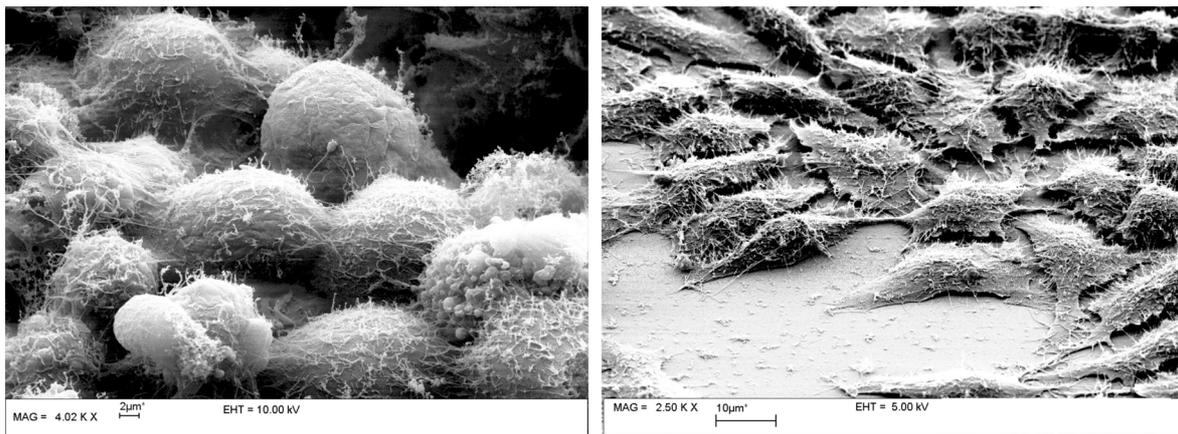


Abbildung 4-1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HEK 293-Zellen. Das linke Bild zeigt einen Teil eines Zellverbandes, in dem die Zellen keinen Kontakt zur Oberfläche haben. Die rechte Aufnahme zeigt Zellen mit Oberflächenkontakt (planares Silizium mit Poly-L-Lysin beschichtet).

Schwierigkeiten der Rasterelektronenmikroskopie bestehen darin, die Zelladhäsion aufgrund rein optischer Befunde zuverlässig zu deuten. Beispielsweise können Kapillarkräfte und Wärmeentwicklung, die während der kritischen Punkttrocknung auftreten können, zu Änderungen des Zellvolumens führen. Die geänderte Erscheinungsform der Zellen könnte dann irrtümlich auf einen Einfluß des Substrates zurückgeführt werden. Außerdem wird durch die abgeschiedene Goldschicht (s. Kapitel 3.1.2) nicht mehr die eigentliche Zelloberfläche, sondern die Goldoberfläche abgebildet. Deshalb müssen bei Untersuchungen zur Zelladhäsion mittels Rasterelektronenmikroskopie, stets mögliche „Gefahren“ der Artefaktbildung berücksichtigt werden.

Das Wachstum von Zellen auf Oberflächen kann mit Hilfe von Mikrostrukturierungstechniken beeinflusst werden. Studien zur Kontrolle des Wachstums von Zellen, v.a. Neurone, Fibroblasten und Endothelzellen, wurden in zahlreichen früheren Arbeiten bereits durchgeführt [Clark et al., 1990; Clark et al., 1993; Clark, 1994; Mrksich et al., 1996; Tatic-Lucic et al., 1997; Corey et al., 1991; Corey et al., 1996; Curtis and Wilkinson., 1997; Wheeler et al., 1999; Scholl et al., 2000; Yeung et al., 2001-a; Lauer, 2001]. Mit den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Mikrostrukturen wurde deshalb versucht, daß Wachstum der HEK 293-Zellen zu beeinflussen. Die Resultate sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

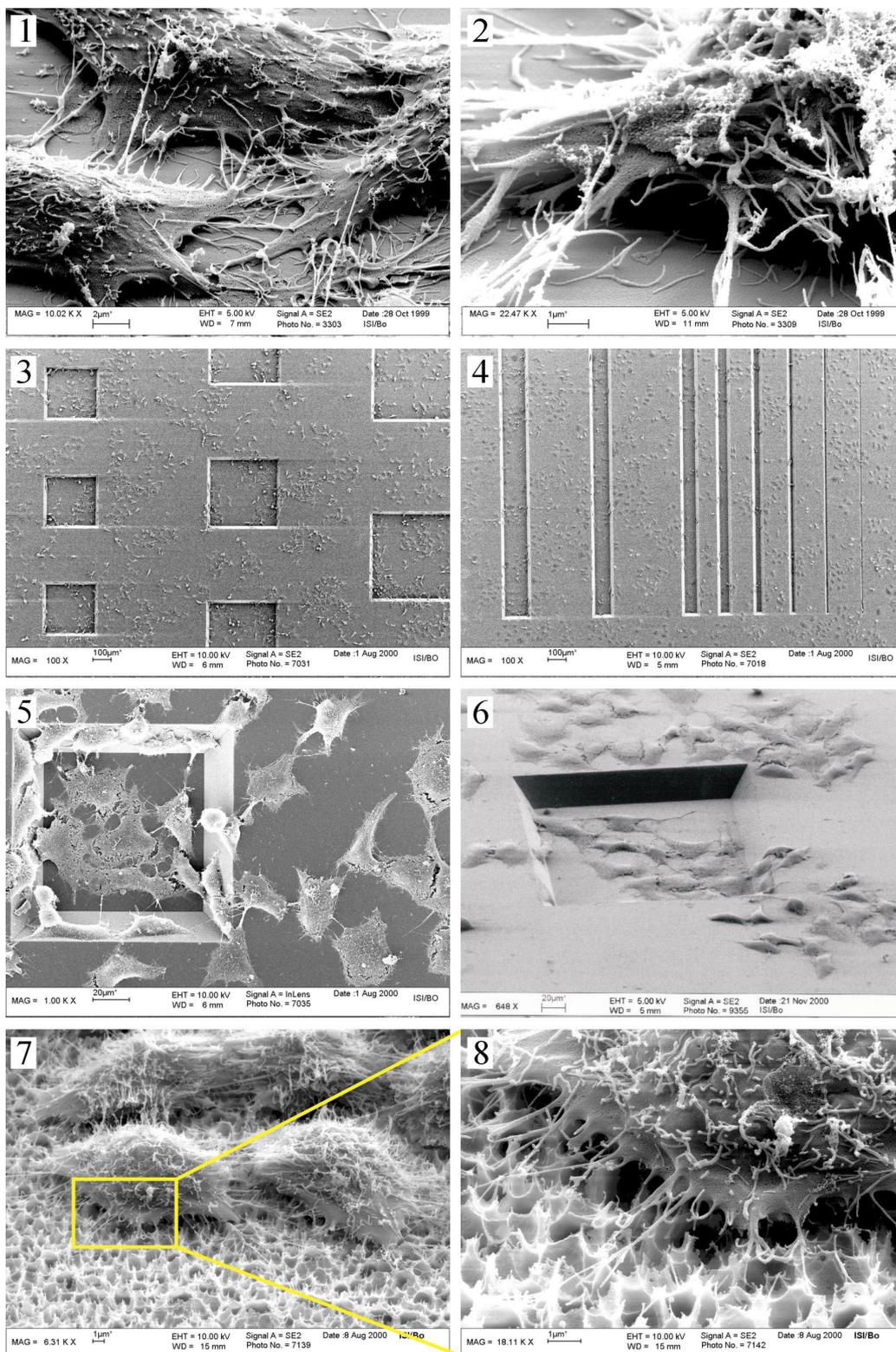


Abbildung 4-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener mikrostrukturierter Silizium-Oberflächen (Bilder 2-8) mit HEK 293-Zellen (Oberflächen mit Poly-L-Lysin beschichtet). Zum Vergleich zeigen die Bilder 1 und 2 die Zellen auf einer planaren und die Bilder 7 und 8 auf einer porösen Silizium-Oberfläche. In den Bildern 2 und 8 ist deutlich der resultierende Spalt zwischen den Oberflächen und den Zellen zu erkennen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die HEK 293-Zellen auf keiner der hergestellten Mikrostrukturen bevorzugt anwachsen. Das Wachstum der Zellen ist statistisch verteilt (s. Bilder 3 und 4 in Abbildung 4-2). Die Bilder 5 und 6 in Abbildung 4-2 zeigen außerdem, daß die Zellen sowohl auf dem Boden der geätzten Strukturen als auch auf den Wänden und der glatten (polierten) Oberfläche wachsen. Rauigkeitsmessungen mit dem Rasterkraftmikroskop (Digital Instruments MMAFM-2; s. Kapitel 3.1.3) ergaben einen mittleren Rauigkeitswert von 0,8 nm für die polierte Oberfläche (s. oberes Bild in Abbildung 4-3) und 4,4 nm für den Boden der geätzten Strukturen (s. unteres Bild in Abbildung 4-3).

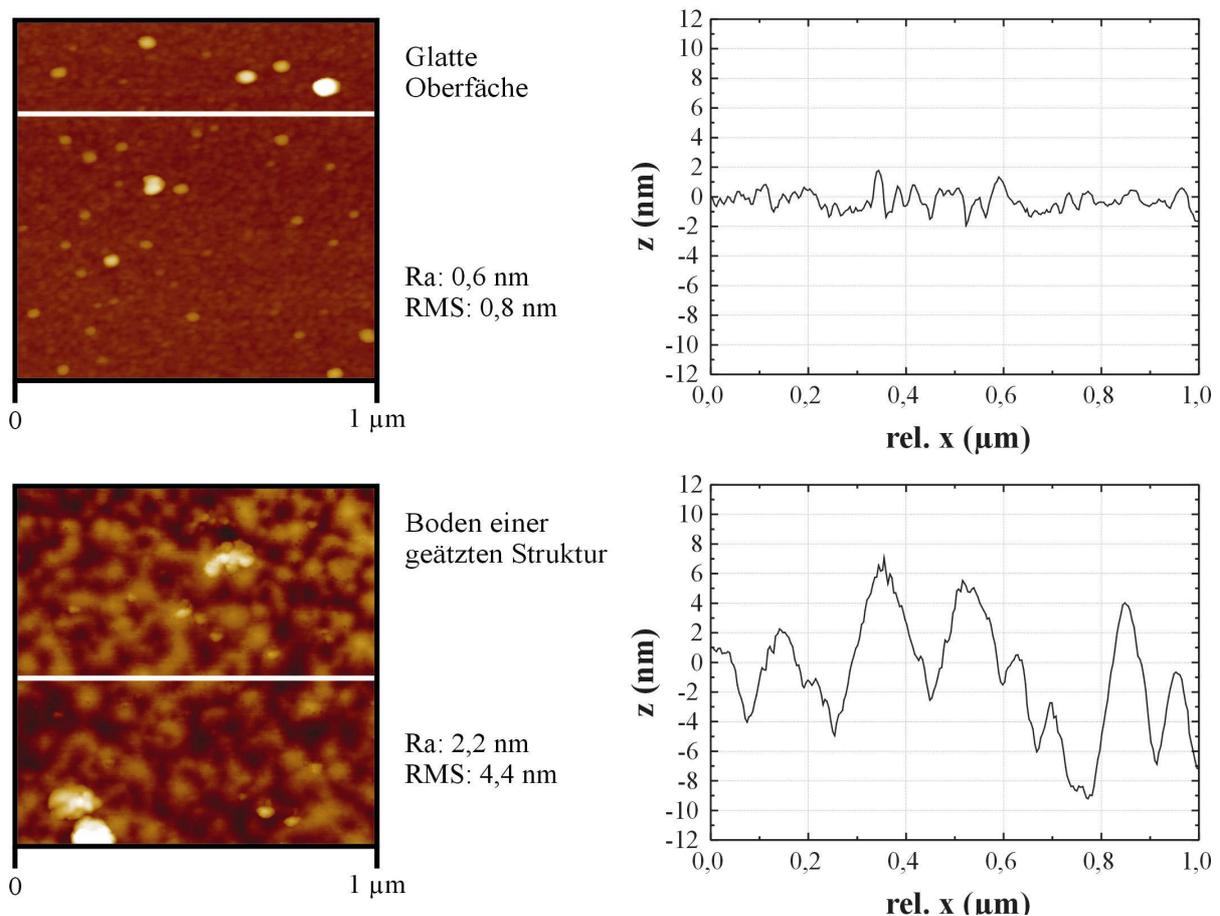


Abbildung 4-3: AFM-Rauigkeitsmessungen: Im oberen Teil ist die abgerasterte Oberfläche und der Linescan einer polierten Oberfläche zu sehen. Der untere Teil zeigt die entsprechenden Ergebnisse für den Boden einer geätzten Silizium-Struktur (s. Abbildung 4-2).

Lediglich in den kleinsten Strukturen, die eine Größe von $10 \mu\text{m}$ haben, wachsen keine Zellen. Dies liegt aber am Durchmesser der HEK 293-Zellen, der etwa $15 \mu\text{m}$ beträgt.

Fazit: Weder die Größe, Beschichtung, geometrische Form, noch die Rauigkeit der Strukturen haben einen Einfluß auf das Wachstum der HEK 293-Zellen.

Zur Unterstützung der Zelladhäsion auf den hier vorgestellten künstlichen Substraten wurden die Oberflächen modifiziert. Da Zellen untereinander starke Verbindungen eingehen können, eignen sich als adhäsionsunterstützende Beschichtung besonders solche Substanzen, die auch in den natürlichen Zellmembranen vorkommen. In der Literatur werden eine Vielzahl solcher Substanzen angegeben. Eine Übersicht über Zelladhäsionsmoleküle und deren aktive Peptidsequenzen findet sich in [Pigott et al., 1993, Heavner, 1996].

Die Adhäsion von Zellen an Oberflächen kann sowohl spezifisch als auch unspezifisch erfolgen. Die unspezifische Zelladhäsion beruht hauptsächlich auf elektrostatischen oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Grundlegende Untersuchungen wurden z.B. von Kleinfeld, Hickman u.a. durchgeführt [Kleinfeld et al., 1988; Stenger et al., 1993; Stenger et al., 1992; Georger et al., 1992; Hickman et al., 1994]. Eine oft zur unspezifischen Zelladhäsion eingesetzte Substanz ist Polylysin. Anwuchsversuche mit unbeschichteten und mit Poly-L-Lysin beschichteten Substraten zeigten jedoch keine Unterschiede, da sich die Topologie und die Verteilung der HEK 293-Zellen auf der Oberfläche nicht veränderte (s. Abbildung 4-4).

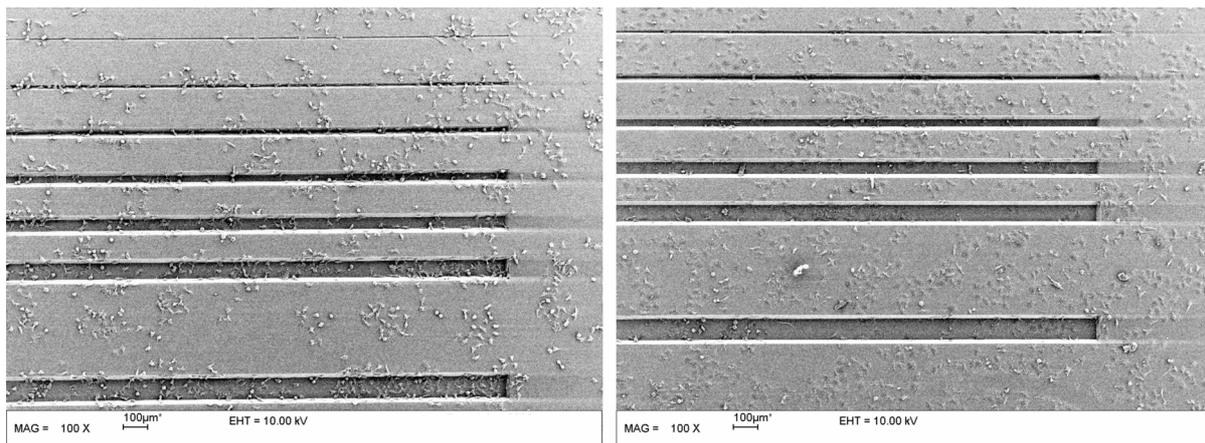


Abbildung 4-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen geätzter Silizium-Strukturen. Die linke Struktur wurde vor der Aussaat der HEK 293-Zellen nicht beschichtet. Die rechte Struktur wurde zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet.

Im Gegensatz zur unspezifischen, beruht das Prinzip der spezifischen Zelladhäsion auf Schlüssel-Schloß-Wechselwirkungen zwischen den Membranproteinen der extrazellulären Matrix (ECM), die als CAM's (cell adhesion molecules) bezeichnet werden, und ihren Komplementären (CAM-Antikörper). Wichtige Bestandteile dieser extrazellulären Matrix sind neben den Kollagenen die Multiadhäsionsproteine. Zu diesen multiadhäsiven Matrixproteinen gehört vor allem das Laminin [Beck et al., 1990; Engel, 1992], das an vielfältigen Funktionen der Zellen beteiligt ist, z.B. Wachstum, Teilung, Migration und Adhäsion [Thiery et al., 1985; Engel, 1992]. Ein Vergleich zwischen Laminin, Proteoglykan, Fibronectin und Kollagen in einer früheren Arbeit zeigte, daß Laminin jeweils die beste Wachstumsgrundlage für Neuronen darstellt [Gundersen, 1987]. Deshalb wurden in dieser Arbeit auch Anwachs-

versuche mit Laminin-beschichteten Substraten durchgeführt. Aber auch bei Verwendung von Laminin konnte kein Unterschied in der Zelltopologie, im Vergleich zu nicht beschichteten Substraten, festgestellt werden. Lediglich bei den Patch-Clamp-Experimenten (s. Kapitel 4.2.2) fiel ein anderes Zellverhalten auf, denn mit den beschichteten Substraten wurden leichter Gigaseals (vgl. Kapitel 3.4) erhalten. Dies ist vermutlich auf eine etwas stärkere Adhäsion der Zellen auf der Substratoberfläche zurückzuführen.

Schwierigkeiten, die bei einer kritischen Punkttrocknung der Zellen auftreten können, wurden bereits angesprochen. Deshalb wurde alternativ zur Aufnahmetechnik mit einem „Standard“-Rasterelektronenmikroskop, bei der die Zellen vor der Aufnahme getrocknet werden müssen (s. Kapitel 3.1.2), ein ESEM (environmental scanning electron microscope; Philips XL30; Deutschland) verwendet. Bei dieser Technik können Bilder in wäßriger Atmosphäre aufgenommen werden. Bilder, die mit dieser Technik erstellt wurden, sind in Abbildung 4-5 zu sehen.

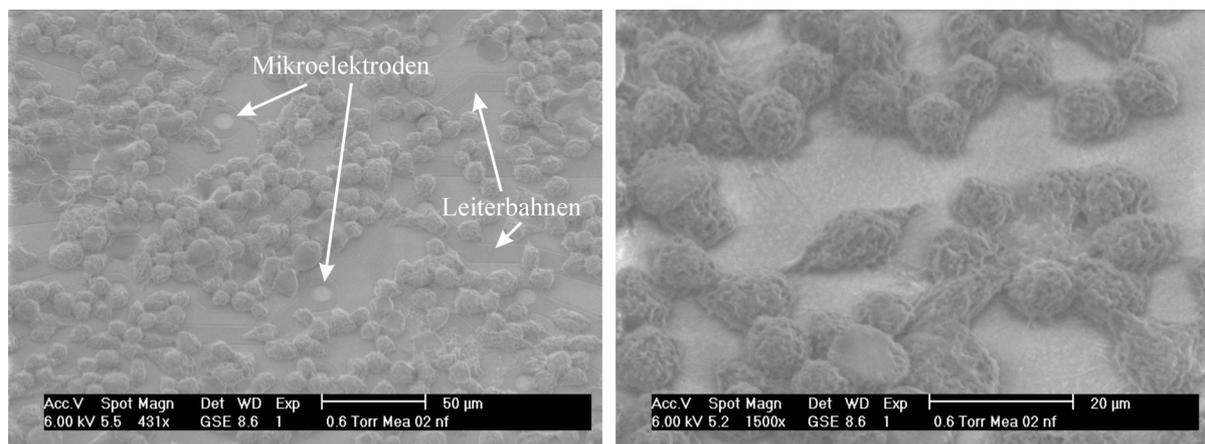


Abbildung 4-5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HEK 293-Zellen auf einem Mikroelektrodenarray (Poly-L-Lysin beschichtet) mit einem ESEM.

Ein Nachteil dieser Technik ist die begrenzte Auflösung. Außerdem ist die Einstellung der richtigen Atmosphäre, bezüglich des Drucks, schwierig. Für die Aufnahmen in Abbildung 4-5 mußte ein Druck von 0,6 Torr eingestellt werden. Bei diesem Druck lagen die Zellen bereits in einem getrockneten bzw. gefrorenen Zustand vor. Die Zellen könnten folglich bereits beschädigt worden sein. Dieses Problem kann bei Drücken größer 10 Torr umgangen werden. Jedoch konnten bei diesen Drücken keine Aufnahmen erstellt werden, da die Bilder zu kontrastarm erschienen. Ein Vergleich mit den anderen elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist daher problematisch.

Ein Teil der hergestellten Mikrostrukturen wurden Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Eine Aussaat von Neuronen (adult rat retinal neurones) auf den Substraten ergab, daß die Mikrostrukturen das Wachstum der Zellen deutlich beeinflussen [Heiduschka et al., 2001].

Werden die Neurone auf die unbeschichteten, mikrostrukturierten Substrate ausgesät, so wurde selbst nach zwei Tagen kein Wachstum auf den glatten Silizium-Oberflächen festgestellt. Dieser Befund korreliert mit dem Verhalten von Neuronen auf unbehandelten Glassubstraten [Huber et al., 1998]. Allerdings wurde überraschenderweise eine große Anzahl an Neuronen innerhalb der Mikrostrukturen gefunden (s. Abbildung 4-6). Für eine Erklärung dieses Befundes ist es denkbar, daß die Neurone in den Mikrostrukturen den Waschsritten während der Kultivierung der Zellen besser widerstehen als die Neurone, die auf der glatten Oberfläche wachsen. Adulte Neurone reagieren aber sehr sensitiv auf „Streß“ und sterben (bzw. lösen sich von der Oberfläche ab) ohne die Möglichkeit zur Adhäsion. Der Boden der geätzten Strukturen scheint jedoch eine geeignete Stelle für die unspezifische Adhäsion der Neurone darzustellen.

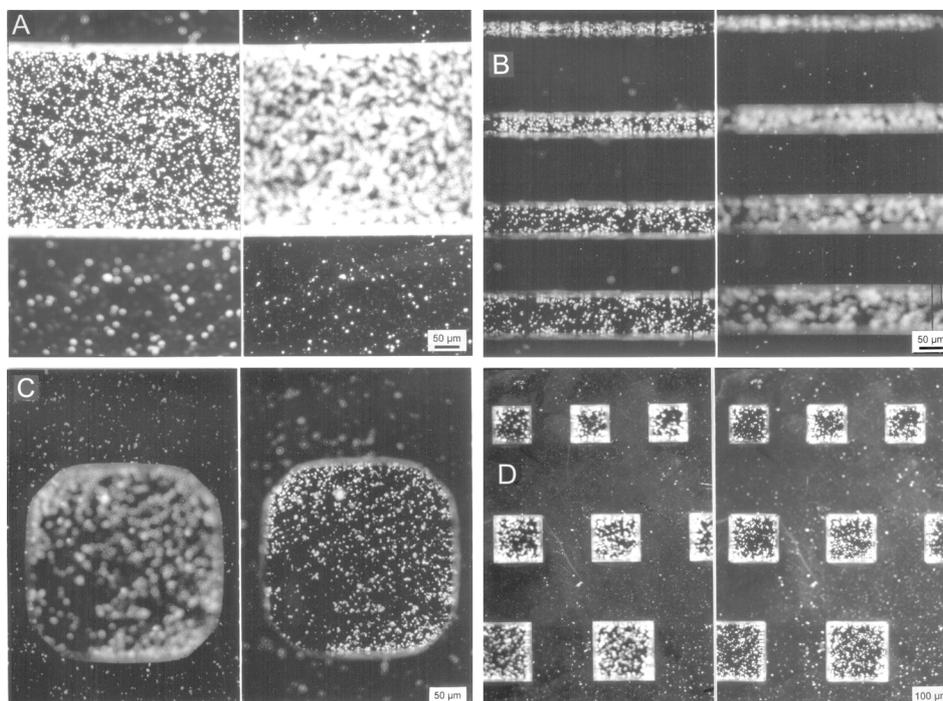


Abbildung 4-6: Neurone (adult rat retinal neurones) auf unbeschichteten Silizium-Substraten (Photographien). Die Zellen sind mit DiI (Fluoreszenzfarbstoff; Molecular Probes, Europe) angefärbt. Die linke und die rechte Seite der einzelnen Bilder unterscheidet sich nur in der Fokussierungsebene (Böden der geätzten Strukturen oder polierte Oberfläche im Fokus).

Werden die Mikrostrukturen mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtet, erhöht sich die Anzahl der Neurone auf der glatten Oberfläche, jedoch nicht innerhalb der Mikrostrukturen (s. Abbildung 4-7). Wird ein Teil des Laminins vor der Aussaat der Zellen entfernt, so wurde ein ähnlicher Befund erhalten. Obwohl die Zelldichte auf der beschichteten glatten Oberfläche wesentlich höher ist als auf der unbeschichteten Oberfläche, scheint sich die Dichte der Zellen innerhalb der Mikrostrukturen nicht zu verändern (s. Abbildung 4-7).

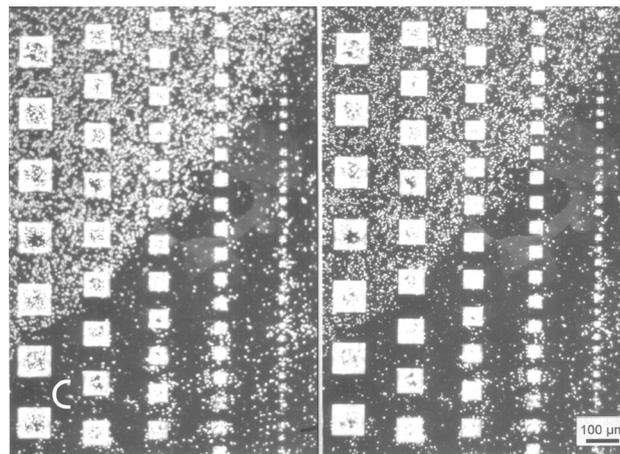


Abbildung 4-7: Neurone (adult rat retinal neurones) auf Silizium-Substraten, angefärbt mit DiI (Photographien). Der obere linke Teil der Struktur wurde mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtet. Die Beschichtung im unteren rechten Teil der Struktur wurde vor der Aussaat der Zellen entfernt. Beide Aufnahmen unterscheiden sich nur in der Fokussierung (Böden der geätzten Struktur oder polierte Oberfläche im Fokus).

Berücksichtigt man die vorgestellten Ergebnisse, so ergeben sich folgende Konsequenzen für die Aussaat der Zellen auf den Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays:

1. Experimente mit Kardiomyozyten und MEAs (s. Kapitel 4.2.1): Kardiomyozyten bilden nach einigen Tagen auf homogen mit Fibronectin beschichteten Mikroelektrodenarrays eine konfluente Zellschicht aus [Sprössler, 1997; Krause, 2000; Ingebrandt, 2001] (s. Abbildung 4-8). Eine zielgerichtete Immobilisierung der Zellen war deshalb nicht nötig.

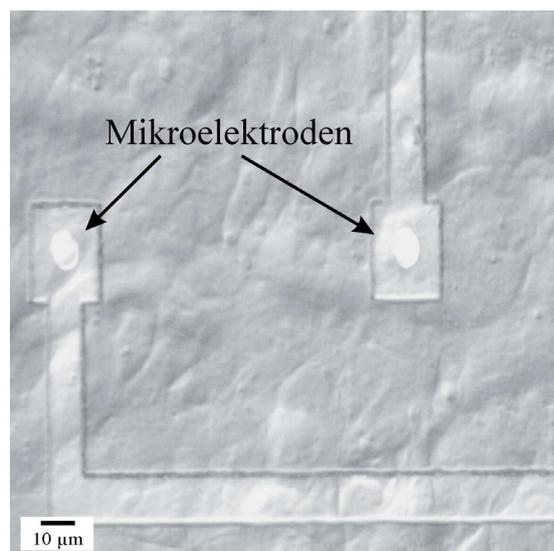


Abbildung 4-8: Konfluente Zellschicht von Kardiomyozyten auf einem Mikroelektrodenarray.

2. Experimente mit HEK 293-Zellen und FETs (s. Kapitel 4.2.2): Da nach den vorliegenden Erkenntnissen das Wachstum der HEK 293-Zellen nicht durch Mikrostrukturierung oder durch Oberflächenbeschichtung beeinflusst werden kann, mußten die Zellen in genügend hoher Dichte ausgesät werden (vgl. Kapitel 3.6.3), um eine ausreichend hohe Bedeckung der einzelnen Transistoren zu gewährleisten (s. Abbildung 4-9). Als Substratbeschichtung wurde dennoch Poly-L-Lysin gewählt, da es nicht nur die Seal-Bildung erleichterte, sondern durch die bessere Haftung der Zellen vermutlich auch den Abstand zwischen den Gates der Transistoren und den Zellen verringerte. Belege, daß Beschichtungen den Abstand verkürzen können, finden sich in [Braun and Fromherz, 1998]. Dort wurden die Abstände zwischen beschichteten Silizium-Substraten und Zellen mit einer speziell von Fromherz und Mitarbeitern entwickelten FLIC (fluorescence interference contrast)-Technik [Lambacher and Fromherz, 1996; Lambacher and Fromherz, 2002] gemessen und mit verschiedenen Beschichtungen verglichen. Der Abstand zwischen einem mit Kollagen IV beschichteten Gate und einer HEK 293-Zelle beträgt beispielsweise 45-65 nm [Straub et al., 2001]. Ein geringerer Abstand führt zu einem verringerten extrazellulären Volumen im Spalt zwischen der Zelle und dem Gate eines Transistors und damit auch zu einer geringeren spezifischen Leitfähigkeit g_J des Spaltes bzw. zu einer besseren Kopplung (s. Kapitel 2.3).

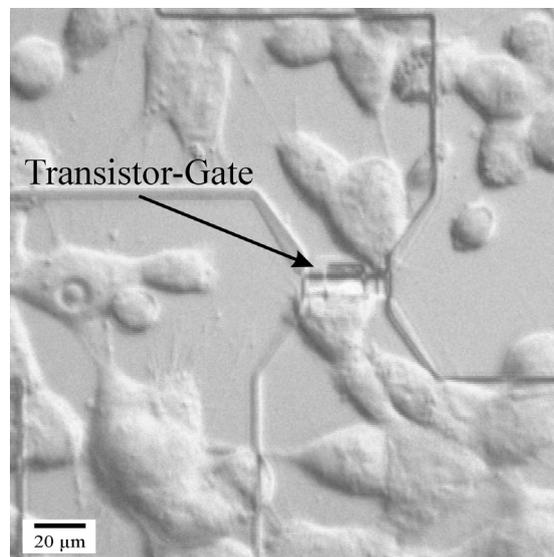


Abbildung 4-9: HEK-293 Zelle auf dem Gate eines Feldeffekttransistors.

4.2. Bioelektronische Kopplung

In diesem Kapitel werden Kopplungsexperimente mit Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) und HEK 293-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen) vorgestellt. Die Kardiomyozyten gehören zu den Primärkulturen, die vor den Experimenten aus embryonalen Ratten präpariert wurden (s. Kapitel 3.6.1). Nach etwa 2-4 Tagen „in vitro“ (2-4 DIV) bilden sie eine konfluente Zellschicht aus. In diesem Stadium sind die Zellen über Gap-Junctions verbunden (s. Kapitel 2.1) und zeigen spontane Kontraktionen. Auf eine zusätzliche externe Stimulation durch eine Patch-Clamp-Elektrode kann daher verzichtet werden. Die Stimulation wird von sogenannten Pacemaker-Zellen übernommen. Die Herzmuskelzellen stellen somit ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der Signalweiterleitung innerhalb eines Zellgeflechts mit mehreren unterschiedlich lokalisierten Mikroelektroden (Multisite-Kopplung) dar. Ein gewisser Nachteil liegt in der aufwendigen Zellpräparation, hinsichtlich der Ausbeute der Zellen und in der Trennung unterschiedlicher Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, u.a., die bei den Kopplungsexperimenten zu unerwünschten Störungen führen können und eine Auswertung erschweren. Alle Experimente wurden ausschließlich mit den Mikroelektrodenarrays durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Primärkulturen gehören die HEK 293-Zellen zu den kontinuierlichen Zelllinien. Diese Zellen haben den Vorteil einer einfacheren Zellkultivierung. Da in der vorliegenden Arbeit HEK 293-Zellen mit einem stabil transfizierten K^+ -Kanalen verwendet wurden, das für spannungsgesteuerte K^+ -selektive Ionenkanäle kodiert (s. Kapitel 3.6.2), wurde so die definierte Untersuchung des Einflusses von K^+ -Ionenströmen auf das extrazelluläre Signal möglich. Die Kopplungsexperimente mit den HEK 293-Zellen wurden ausschließlich mit den Feldeffekttransistoren durchgeführt.

4.2.1. Experimente mit Kardiomyozyten

Die nach einigen Tagen in Kultur gebildete Zellschicht (Synzytium) zeigte wegen der elektrischen Verbindung der Zellen untereinander (Gap-Junctions) eine nahezu gleichzeitige Kontraktion aller Zellen. Die Kontraktionen erfolgten spontan und regelmäßig und konnten durch ein Mikroskop gut beobachtet werden. Die Frequenz der Kontraktionen sind stark temperaturabhängig. Kühlt die extrazelluläre Lösung um nur wenige °C ab, verlangsamen sich die Kontraktionen deutlich, bis sie schließlich zum Erliegen kommen. Da die Badkammern der Mikroelektrodenarrays mit dem derzeitigen Meßaufbau nicht temperiert werden konnten, wurden die Arrays mit den Zellen dem Brutschrank erst unmittelbar vor den Experimenten entnommen. Das Zellkulturmedium wurde bei Bedarf durch eine vortemperierte extrazelluläre Lösung (37 °C) ausgetauscht.

4.2.1.1. Multisite-Kopplung

Der am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) in Mainz entwickelte 64-Kanal-Verstärker [Ingebrandt, 2001] sollte in der vorliegenden Arbeit auf volle 64-Kanal-Funktionalität erweitert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-10 dargestellt. Zu sehen sind die extrazellulär gemessenen Signale der Kardiomyozyten (4 DIV). Sie wurden parallel mit 64 unterschiedlich lokalisierten Goldmikroelektroden (Elektrodendurchmesser 30 μm) aufgezeichnet. Aufgetragen sind jeweils die zeitlichen Verläufe der Drain-Source-Ströme durch den JFET (s. Kapitel 3.3.1.1). In dem dargestellten Zeitfenster (10 Sekunden) sind je drei Signale zu erkennen. Die Signale sind regelmäßig und wiederholen sich in einem Abstand von etwa vier Sekunden. Einige Elektroden, z.B. die Elektroden 30 und 46, zeigen keine Signale. Eine unzureichende elektrische Kontaktierung dieser Elektroden ist dafür verantwortlich. Einige andere Elektroden zeigen nur sehr schwache Signale, z.B. die Elektroden 41 und 48. Die Signalamplitude bzw. die Stärke der Kopplung wird entscheidend durch die Lage und den Abstand der elektrisch aktiven Zelle auf der Elektrode beeinflusst [Sprössler, 1997; Krause, 2000; Ingebrandt, 2001]. Nur eine gute Abdichtung der Mikroelektrode führt auch zu einer guten Kopplung. Elektrode 55 zeigt z.B. eine gute Kopplung. Die Signalamplitude beträgt hier etwa 2 mV und das Signal/Rausch-Verhältnis liegt bei 11:1. Das Experiment kann auch dazu benutzt werden, um den Ursprung der Erregung zu lokalisieren (das sogenannte Schrittmacherzentrum). Von dort aus breiten sich die Aktionspotentiale als Erregungswelle innerhalb weniger Millisekunden in geordneter Weise über den gesamten Zellrasen aus. Während der Ausbreitung der Erregungswelle über die gesamte Zellschicht tritt in der Aufzeichnung der gemessenen Signale an verschiedenen Orten ein zeitlicher Versatz auf. Dieser ist in Abbildung 4-11 deutlich zu erkennen. Die Signale aus Abbildung 4-11 stammen aus dem gleichen Experiment wie Abbildung 4-10. Das Zeitfenster in Abbildung 4-11 beträgt 20 ms und ermöglicht so, die Signalausbreitung über die gesamte 8x8 Elektroden-Matrix zu verfolgen. Das erste Signal wird zunächst mit Elektrode 8 detektiert. Die Aktionspotentiale bzw. die Erregungswelle pflanzt sich nach links und zur Mitte hin fort. Anschließend registrieren auch die unteren Elektrodenreihen die Kontraktion der Zellschicht. Das Schrittmacherzentrum muß deshalb außerhalb der 8x8 Elektroden-Matrix liegen, aber der Elektrode 8 am nächsten sein. Die zeitliche Differenz der Signale zwischen Elektrode 8 und Elektrode 57 beträgt etwa 13 ms. Unter der Annahme einer isotropen Geschwindigkeitsausbreitung kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit über die Zeit- und Wegstreckendifferenz zu $0,08 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ abgeschätzt werden. In [Sprössler, 1997] wurde eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von $0,18 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ beobachtet.

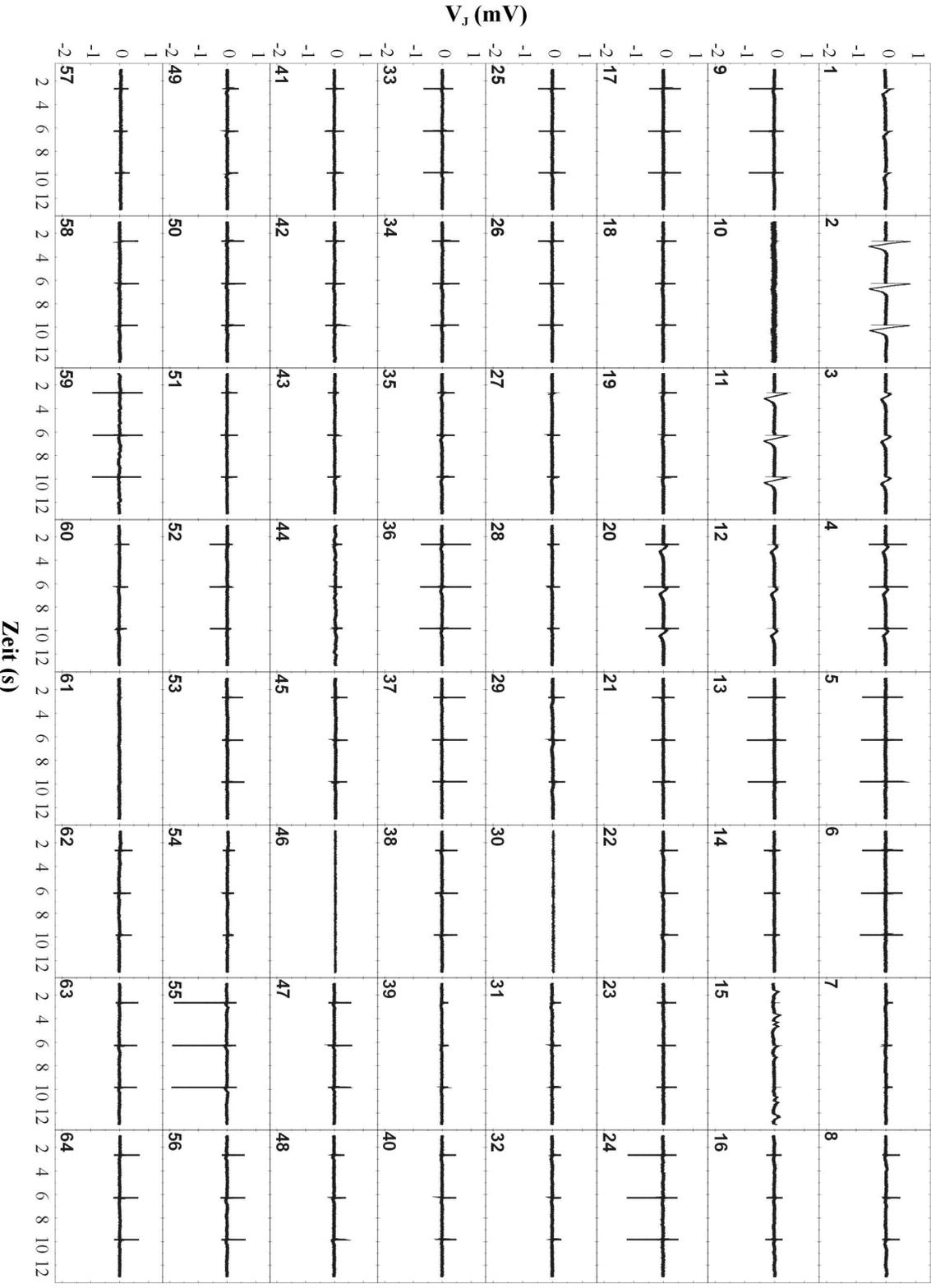


Abbildung 4-10: Extrazellulär gemessene Signale von Kardiomyozyten (4 DIV).

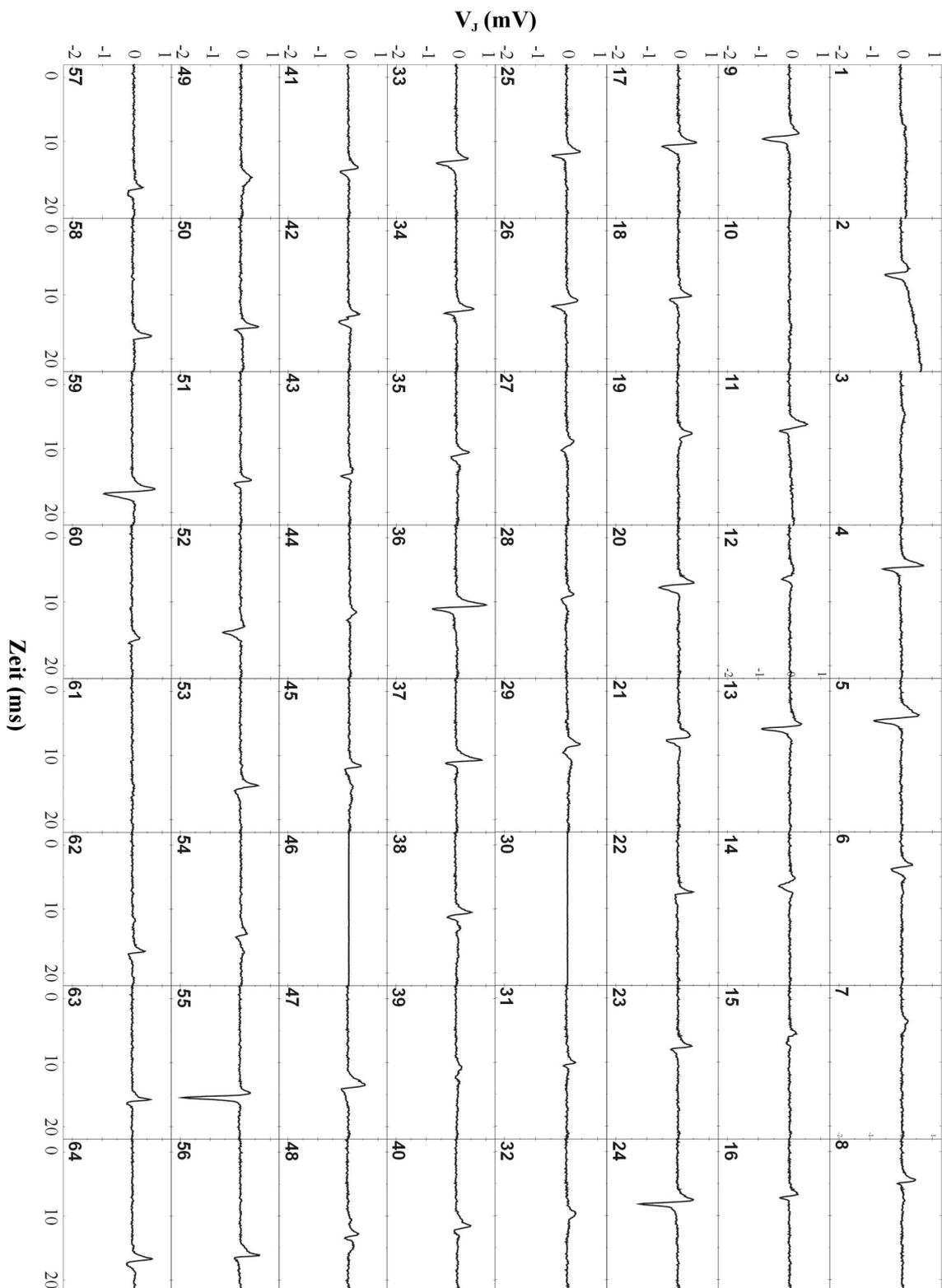


Abbildung 4-11: Ausbreitung von Aktionspotentialen in einer konfluenten Kardiomyozyten-Zellschicht (4 DIV).

4.2.1.2. Signalformen

In der vorliegenden Arbeit traten während der Kopplungsexperimente verschiedene Signalformen auf, die in Abbildung 4-12 zu sehen sind.

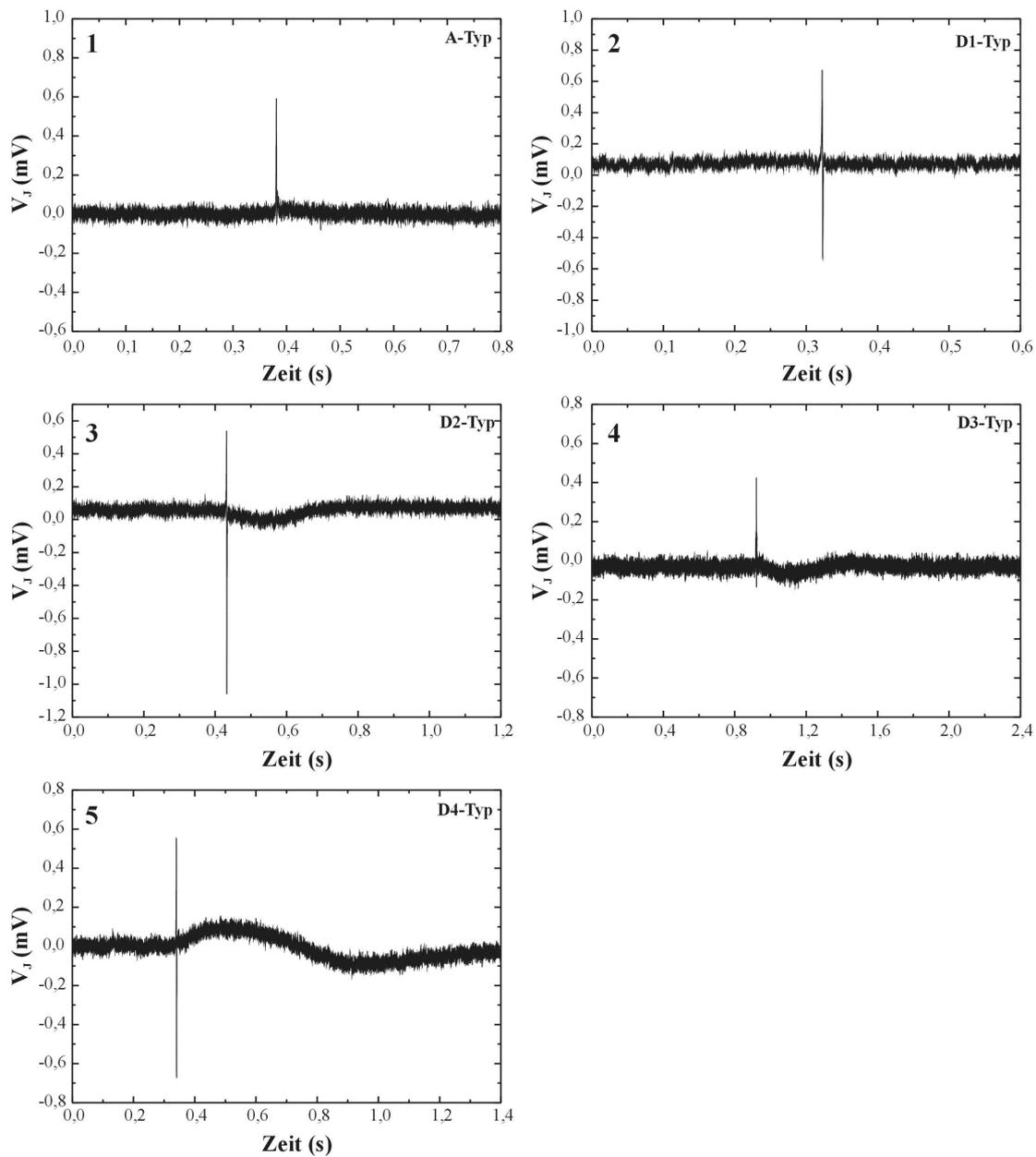


Abbildung 4-12: Beobachtete Signalformen bei Kopplungsexperimenten mit Kardiomyozyten (4 DIV).

Die einzelnen Signalformen der extrazellulär gemessenen Aktionspotentiale unterscheiden sich in ihren zeitlichen Verläufen und in ihren Amplituden. Für die Größe der Amplitude ist die Seal-Leitfähigkeit g_j entscheidend (s. Kapitel 2.1). Die bei den Kopplungsexperimenten mit Kardiomyozyten auftretenden Signalformen wurden bereits in früheren Arbeiten simuliert und klassifiziert [Sprössler et al., 1999; Krause, 2000; Ingebrandt, 2001]. Die

extrazellulär gemessenen Aktionspotentiale wurden in die Typen A, B, D1, D2, D3 und D4 eingeteilt. Die Form der Signale wird hauptsächlich durch den Einfluß der Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionenströme und durch ohmsche und kapazitive Anteile verursacht. Für die Simulation der Signale (Software: Oxsoft HEART 4.8 und OrCAD PSpice 9.1) wurden die entsprechenden Ionenströme i_i mit einem Faktor X_i gemäß Gleichung 4-1 skaliert.

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_{i=\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}} X_i i_i \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Für die Simulation der Kopplung wurde das Model einer Ventrikel-Herzzelle [DiFrancesco and Noble, 1985; Earn and Noble, 1990] und ein g_J von $1 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$ angenommen.

Für einen D1-Typ (Bild 2 in Abbildung 4-12) ist ein hoher Na^+ -Ionenstrom im Kontaktbereich charakteristisch. Beim D2-Typ (Bild 3 in Abbildung 4-12) muß ein zusätzlicher Ca^{2+} -Ionenstrom berücksichtigt werden. Der D3-Typ (Bild 4 in Abbildung 4-12) unterscheidet sich vom D2-Typ durch einen verringerten Na^+ -Ionenstrom (negativer Spike am Anfang). Ein hoher K^+ -Ionenstrom im Kontaktbereich ist für einen D4-Typ (Bild 5 in Abbildung 4-12) kennzeichnend. Ein A-Typ (Bild 1 in Abbildung 4-12) liegt dann vor, wenn nur das kapazitive Signal der ansteigenden Flanke von $V_M(t)$ gemessen wird. Am häufigsten wurden in dieser Arbeit die D1- und die D2-Typen registriert.

4.2.1.3. Messungen mit kleinen Mikroelektroden

Mit kleinen Elektroden ($2\text{-}10 \mu\text{m}$) sollte es möglich sein, hohe Abdichtwiderstände bei Kopplungsexperimenten zu erzielen. Allerdings ist die Größe einer Mikroelektrode umgekehrt proportional zur Impedanz (s. Kapitel 3.5.1). Um Kopplungssignale elektrisch aktiver Zellen mit kleinen Mikroelektroden zu erhalten, muß die Impedanz der Elektrode verringert werden. Dazu werden meist galvanisch abgeschiedene Schichten aus „Platinschwarz“ [Robinson, 1968] oder „Platinweiß“ [Thiébaud et al., 1997] eingesetzt. Ein großer Nachteil ist die mechanische Instabilität solcher Platinschichten. Die Platinierung muß deshalb kurz vor den Messungen durchgeführt werden. Der Extended-Gate-Elektroden-Aufbau, der in dieser Arbeit verwendet wurde (s. Kapitel 3.3.1.1) umgeht diese Nachteile. Die Mikroelektroden sind direkt mit den Gates der rauscharmen JFETs verbunden. Im Gegensatz zu Standard-Verstärkerschaltungen wird das Meßsignal direkt am Gate der JFETs in ein Spannungssignal transformiert. Da die Eingangsimpedanz der JFETs um mehrere Größenordnungen höher ist als die Impedanz der Mikroelektroden und sie zusammen in Serie geschaltet sind, ist die Impedanz der Mikroelektroden zu vernachlässigen. Auf eine Platinierung der Mikroelektroden kann deshalb verzichtet werden. In Abbildung 4-13 sind zwei Messungen mit Elektroden gezeigt, die einen Durchmesser von $8 \mu\text{m}$ aufweisen.

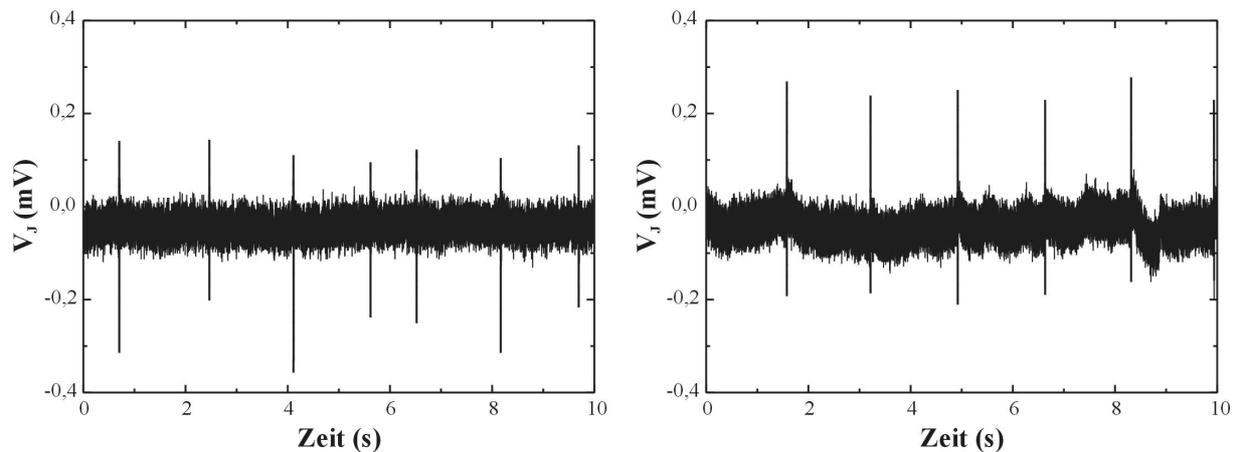


Abbildung 4-13: Extrazellulär gemessene Signale von Kardiomyozyten mit kleinen Mikroelektroden (Durchmesser $8\ \mu\text{m}$). Die Elektroden wurden nicht platinisiert.

Ohne den Einsatz aufwendiger Platinierungsverfahren wurde hier ein Signal/Rausch-Verhältnis von etwa 5:1 erzielt. Wesentlich bessere Signal/Rausch-Verhältnisse ($\geq 12:1$) konnten nur durch den Einsatz der Topologiemikroelektroden (s. Kapitel 3.2.2) erhalten werden. Dieser Befund ist vermutlich auf den verkürzten Abstand zwischen Elektrode und Zelle zurückzuführen.

4.2.1.4. Pharmakologische Experimente

Bereits in früheren Arbeiten wurden pharmakologische Experimente mit Kardiomyozyten auf Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays durchgeführt [Ingebrandt et al, 2001; Yeung et al., 2001-b]. Die Detektion der Signale erfolgte auf 16 Kanälen gleichzeitig. In dieser Arbeit konnte die Detektion auf 64 Kanäle erweitert und die Anwendbarkeit des Systems für pharmakologische Fragestellungen bestätigt werden. Es wurden extrazelluläre Kopplungen mit hohen Amplituden und guten Signal/Rausch-Verhältnissen erhalten. Die Abbildung 4-14 zeigt einen Ausschnitt (25 Sekunden) aus einem solchen pharmakologischen Experiment. Zunächst wurden die Signale der auf den Mikroelektrodenarrays kultivierten Kardiomyozyten für 60 Sekunden aufgezeichnet (gezeigt sind die letzten 10 Sekunden). Danach wurde die extrazelluläre Lösung in einem Spülschritt entfernt (Vollausschlag der Signale) und durch eine, die $10\ \mu\text{M}$ Atropin enthielt, ersetzt. Es ist deutlich die Zunahme der Kontraktionsfrequenz zu erkennen. Die Signale wurden anschließend noch eine weitere Minute aufgezeichnet. Die Chips mit den kultivierten Kardiomyozyten konnten mehrfach verwendet werden, da sich die Zellen meist nach Entfernung des Atropins (Spülen mit Zellkulturmedium) im Inkubator erholten.

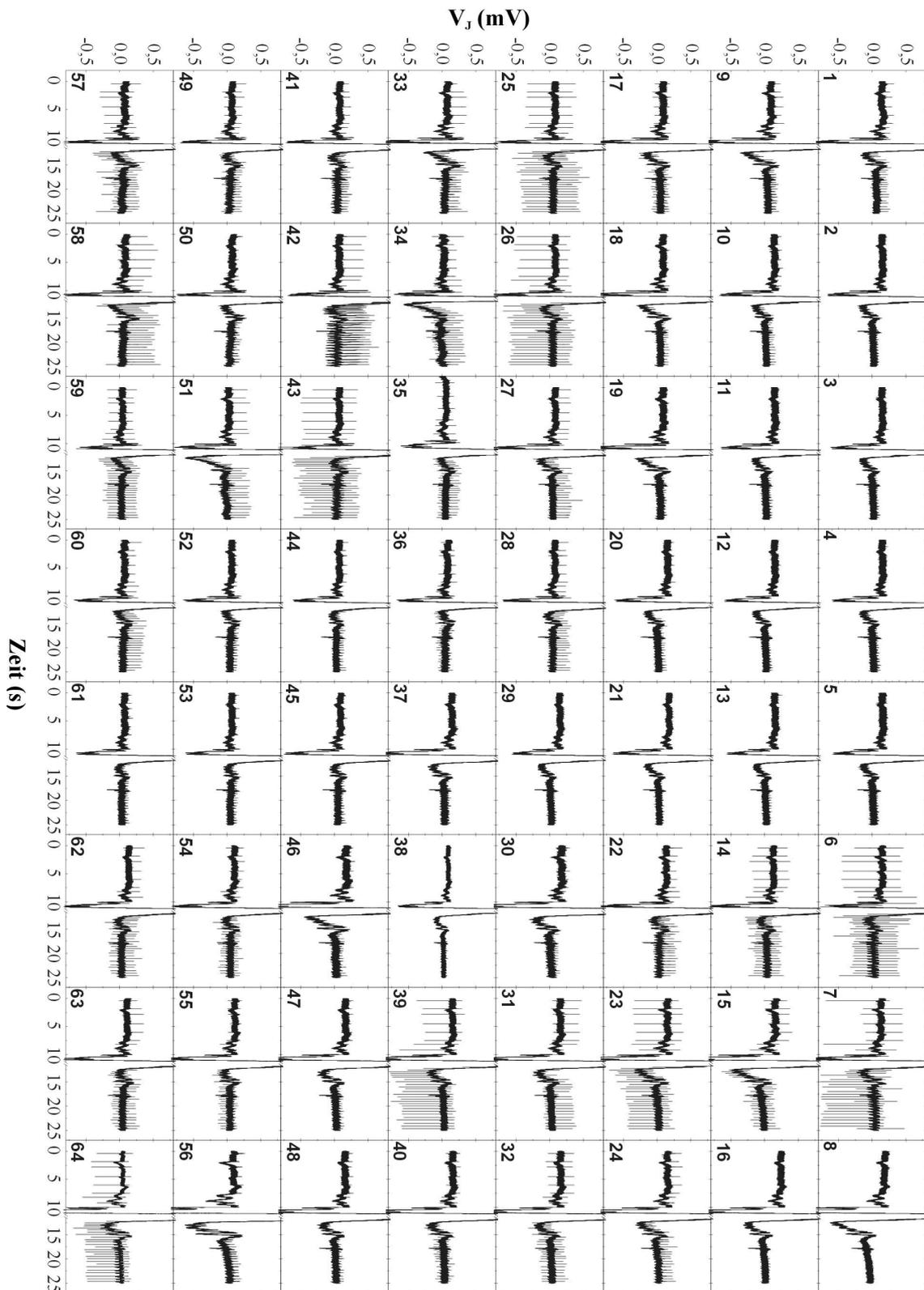


Abbildung 4-14: Extrazellulär gemessene Signale von Kardiomyozyten (4 DIV). Änderung der Kontraktionsfrequenz nach Zugabe von 10 μ M Atropin.

Atropin ist ein Parasympatholytikum, d.h., es vermindert die Wirkung des Parasympathikus, indem es Acetylcholin von seinem Rezeptor verdrängt. Am Herzen führt dies zur einer Steigerung der Herzfrequenz. Eine Erhöhung der Kontraktionsfrequenz konnte aber auch „in vitro“ festgestellt werden (s. Abbildung 4-14).

In weiteren Experimenten wurden die Herzstimulans Noradrenalin und das Antiarrhythmikum Lidocain eingesetzt. Die Konzentrationen wurden sukzessiv erhöht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-15 dargestellt.

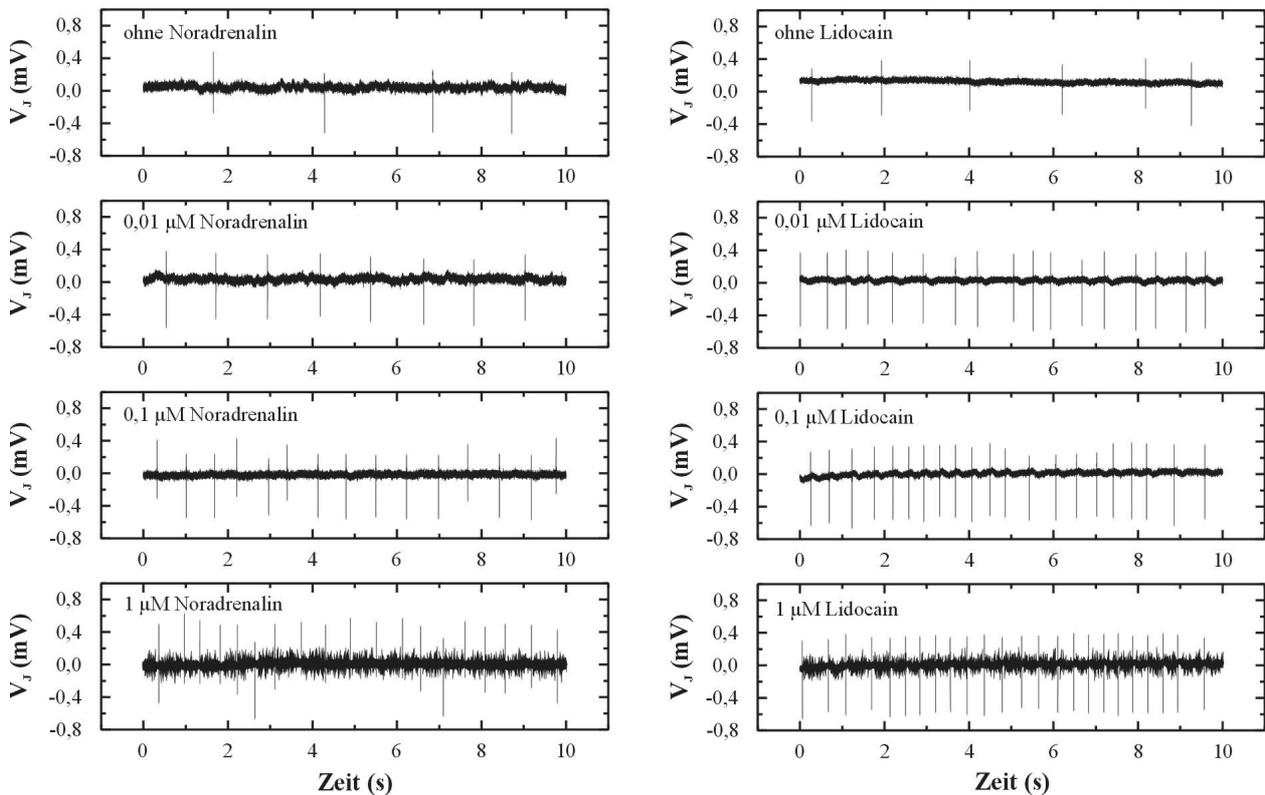


Abbildung 4-15: Extrazellulär gemessene Signale von Kardiomyozyten (4 DIV). Zugabe verschiedener Konzentrationen der Substanzen Noradrenalin und Lidocain.

Vor der Zugabe der Pharmaka wird die Kontraktionsfrequenz der Zellschicht über einen Zeitraum von einer Minute bestimmt. Nach Applikation der pharmakologischen Substanz wird erneut über diesen Zeitraum gemessen (gezeigt sind 10 Sekunden in Abbildung 4-15). Zum Schluß des Experiments wird eine Kontrollmessung durchgeführt, indem die Substanz sorgfältig ausgewaschen und die Kontraktionsfrequenz erneut bestimmt wird.

Noradrenalin gehört zur Gruppe der Katecholamine und wirkt positiv chronotrop, d.h. es steigert die Herzfrequenz. Am Herz wirkt es auf die vaskulären β -adrenergen Rezeptoren. Dabei werden G-Proteine aktiviert, was letztendlich zu einer Steigerung der Aktivität der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und zu einer Erhöhung der Kontraktionsfrequenz führt [Forth et al.,

2001]. Die Erhöhung der Kontraktionsfrequenz bei systematischer Erhöhung der Noradrenalin-Konzentration wurde bereits in früheren Arbeiten mit Feldeffekttransistoren und Mikroelektrodenarrays beobachtet [Ingebrandt et al, 2001; Yeung et al., 2001-b]. Die Ergebnisse konnten hier reproduziert und bestätigt werden (s. Abbildung 4-15, linke Seite). Als neue Substanz wurde in dieser Arbeit Lidocain eingesetzt, das ursprünglich als Lokalanästhetikum entwickelt und auch lange nur als dieses benutzt wurde. Mitte der 50er Jahre wurde die antiarrhythmische Komponente des Lidocains entdeckt. Arrhythmien sind elektrophysiologische Störungen, die als Störungen in der Impulsbildung, der Erregungsausbreitung oder in der Erregungsrückbildung entstehen. Die antiarrhythmische Wirkung beruht darauf, daß Lidocain Na^+ -Kanäle blockiert. Dies führt zu einer Verzögerung der Repolarisierungsphase. Eingesetzt wird es vor allem um tachykarde Rhythmusstörungen zu terminieren bzw. zu verhindern [Forth et al., 2001]. Die Wirksamkeit von Lidocain ist stark frequenzabhängig, im allgemeinen führt es aber zu einer Herabsetzung der Herzfrequenz. Diese Wirkung konnte „in vitro“ nicht festgestellt werden (s. Abbildung 4-15, rechte Seite). Da in dem Zellverbund verschiedenen Zelltypen vorliegen, z.B. Fibroblasten, Myozyten etc., ist es schwierig, diesen Befund näher zu deuten. Im HIS-Purkinje-Bereich führt Lidocain beispielsweise zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer, die oft von einer Herabsetzung der Refraktärzeit begleitet ist. Der Mechanismus dieser Wirkung wird kontrovers diskutiert, aber wahrscheinlich handelt es sich um keine direkte Wirkung auf einen Ionenkanal [Forth et al., 2001]. Ob dieser Mechanismus, oder ein anderer Effekt, für die deutliche Erhöhung der Kontraktionsfrequenz (s. Abbildung 4-15, rechte Seite) verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Die Änderung der Kontraktionsfrequenzen, nach Applikation verschiedener Konzentrationen von Noradrenalin und Lidocain, sind in Form von Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 4-16 dargestellt.

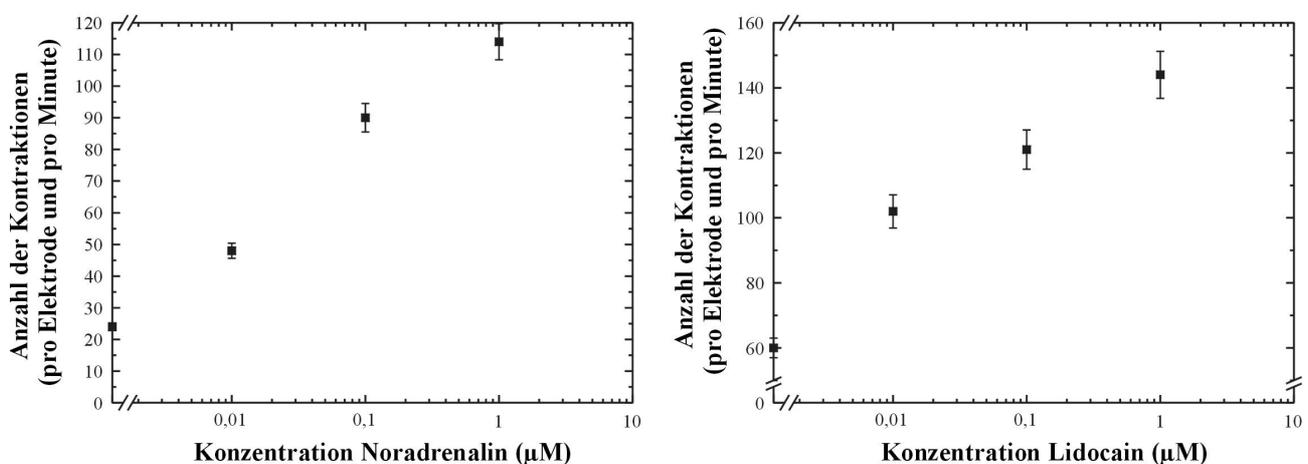


Abbildung 4-16: Dosis-Wirkungskurve (Daten aus Abbildung 4-15). Links: Noradrenalin. Rechts: Lidocain.

Die Kontraktionsfrequenz stieg beim Noradrenalin von 24 Kontraktionen pro Minute (Initialzustand) mit zunehmender Konzentration auf bis zu 114 Kontraktionen pro Minute (s. Abbildung 4-16). Beim Lidocain erhöhte sich die Kontraktionsfrequenz von 60 Kontraktionen pro Minute (Initialzustand) auf bis zu 144 Kontraktionen pro Minute (s. Abbildung 4-16). Ein direkter Vergleich zwischen Noradrenalin und Lidocain ist schwierig, da sich die Kontraktionsfrequenz der beiden Systeme schon im Grundzustand (ohne Pharmaapplikation) stark unterscheidet. Dieser Unterschied basiert hauptsächlich auf dem schon angesprochenen Problem der fehlenden Heizmöglichkeit der Badkammern. Sollte dieses System in Zukunft für pharmakologische Forschungen eingesetzt werden, so ist eine Installation einer Heizung oder eines Durchflußsystems zu empfehlen. Die Beispiele zeigen jedoch das Potential dieses Zell-Hybridsystems für den Einsatz im Pharma-Screening. Es wäre sicherlich möglich, ähnliche Experimente mit vielen Komponenten einer Substanz-Bibliothek durchzuführen.

4.2.2. Experimente mit HEK 293-Zellen

Im vorherigen Kapitel wurden Ergebnisse mit Mikroelektrodenarrays an konfluenten Zellschichten vorgestellt. Die Ergebnisse in diesem Kapitel wurden durch Einzelzell-Experimente mit Feldeffekttransistoren an genetisch modifizierten HEK 293-Zellen erhalten. Dieses Zell/Halbleiter-Hybridsystem weist viele Vorteile auf, z.B. liegt im Gegensatz zu den Kardiomyozyten nur ein Zelltyp vor (keine Fibroblasten, u.a.) und es muß nur der Einfluß eines einzelnen Ionenstroms auf das extrazelluläre Signal betrachtet werden. Außerdem können die K^+ -Ionenkanäle mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik kontrolliert geöffnet werden. Eine Aufzeichnung des Membranstroms mit der konventionellen Patch-Clamp-Technik ermöglicht zudem einen direkten Vergleich mit dem extrazellulär gemessenen Signal. Durch mehrfache Wiederholung der Stimulationspulse kann ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden.

4.2.2.1. Charakterisierung der ether-à-go-go (*eag*) K^+ -Kanäle

Nachdem ein geeigneter experimenteller Meßplatz für die Kopplungsmessungen aufgebaut worden war (s. Kapitel 3.3.1), erfolgte eine Charakterisierung der stabil transfizierten HEK 293-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik. Dazu wurden in einer Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp-Modus (s. Kapitel 3.4) Spannungspulse von -70 mV bis $+70$ mV in 10 mV Schritten an die einzelnen Zellen angelegt und die resultierenden Membranströme gemessen (s. Abbildung 4-17). Als intra- und extrazelluläre Lösungen wurden die in Kapitel 3.6.4.2 angegebenen verwendet. Zellklone, die das *beag1*-Kanalprotein erfolgreich exprimiert hatten, zeigten eine Stromspannungs-Kurve, wie sie in Abbildung 4-17 (unteres Diagramm) zu sehen ist. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die K^+ -Kanäle erst ab einer Spannung von etwa -50 mV öffnen und bei der gewählten Haltespannung V_{hold} von -70 mV geschlossen sind.⁴ Nicht alle Zellen wiesen Membranströme in der Größenordnung von 5 nA bei einer Spannung von $+70$ mV auf (mittleres Diagramm in Abbildung 4-17). Die meisten Zellen zeigten bei $+70$ mV Ströme von etwa 2 nA. Kopplungen mit Strömen unterhalb von 1 nA waren nur selten erfolgreich (s.u.). Deshalb wurden für die Kopplungsexperimente nur Spannungspulse ≥ 0 mV verwendet.

⁴ Eine ausführliche Charakterisierung transient transfizierter ether-à-go-go (*eag*) K^+ -Kanäle in HEK 293-Zellen ist in [Frings et al., 1998] zu finden.

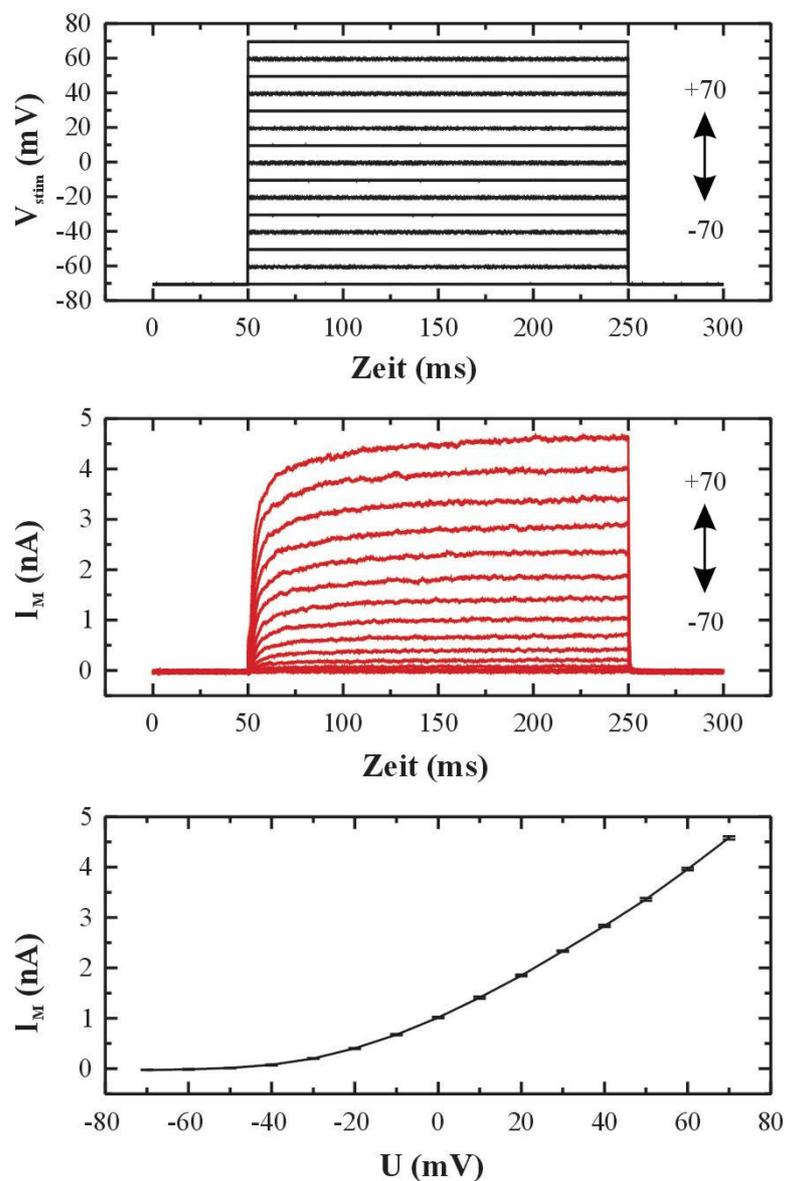


Abbildung 4-17: Oben: An die Zellen angelegte Spannungspulse. Mitte: K^+ -Ionenströme in einer Ganzzelleableitung von stabil transfizierten HEK 293-Zellen (Zelllinie beagl II/6). Unten: Zugehörige Strom-Spannungskurve.

4.2.2.2. Zell-Transistor-Kopplungen

Die ersten erfolgreichen Kopplungen wurden bei Spannungspulsen von +70 mV erhalten. Allerdings mußten die Pulse bis zu 100 mal wiederholt und gemittelt werden (s. Kapitel 3.3.1.3). Auffällig war jedoch ein fast immer linearer Abfall des FET-Signals während des positiven Spannungspulses und ein ebenso linearer Anstieg am Ende des Pulses (linkes Bild in Abbildung 4-18). Wie sich in späteren Experimenten herausstellte, wurde dieser Effekt nicht durch tatsächliche Vorgänge im extrazellulären Spalt zwischen Zelle und Transistor hervorgerufen, sondern durch eine falsch eingestellte Zeitkonstante in

der automatischen Driftkompensation des Verstärkers (s. Kapitel 3.3.1.2). Zur Überprüfung des Sachverhalts wurden verschiedene genau definierte Rechteckpulse direkt an die Eingänge des Vorverstärkermeßkopfes angelegt und die resultierenden Signale aufgezeichnet. Die Ergebnisse des Tests sind in Abbildung 4-18 dargestellt (rechtes Bild). Es sind deutlich die gleichen linearen Anteile wie in der Kopplungsmessung zu erkennen (rechtes Bild in Abbildung 4-18).

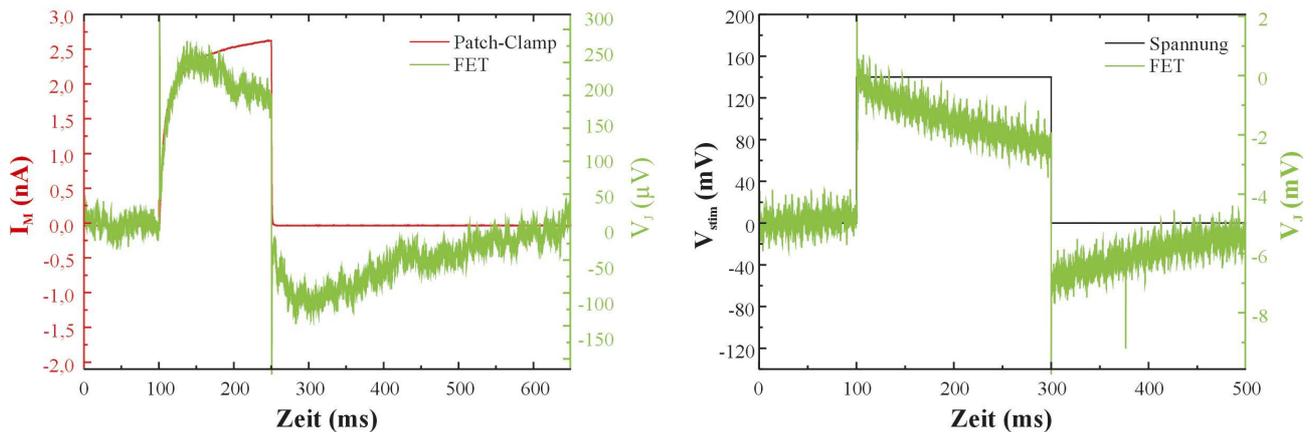


Abbildung 4-18: Links: Zell-Transistor-Kopplung mit 100-facher Signalmittelung. Rechts: Tests zur Ermittlung der falschen Zeitkonstante in der automatischen Driftkompensation des Verstärkers.

Nach Korrektur der Zeitkonstante der automatischen Driftkompensation des Verstärkers wurden Kopplungen erhalten, wie sie in Abbildung 4-19 dargestellt sind (linkes Bild). Zur Kontrolle wurden nochmals genau definierte Rechteckpulse direkt an die Eingänge des Vorverstärkermeßkopfes angelegt und die resultierenden Signale aufgezeichnet (rechtes Bild in Abbildung 4-19). Der lineare Abfall und Anstieg wurde nicht mehr beobachtet.

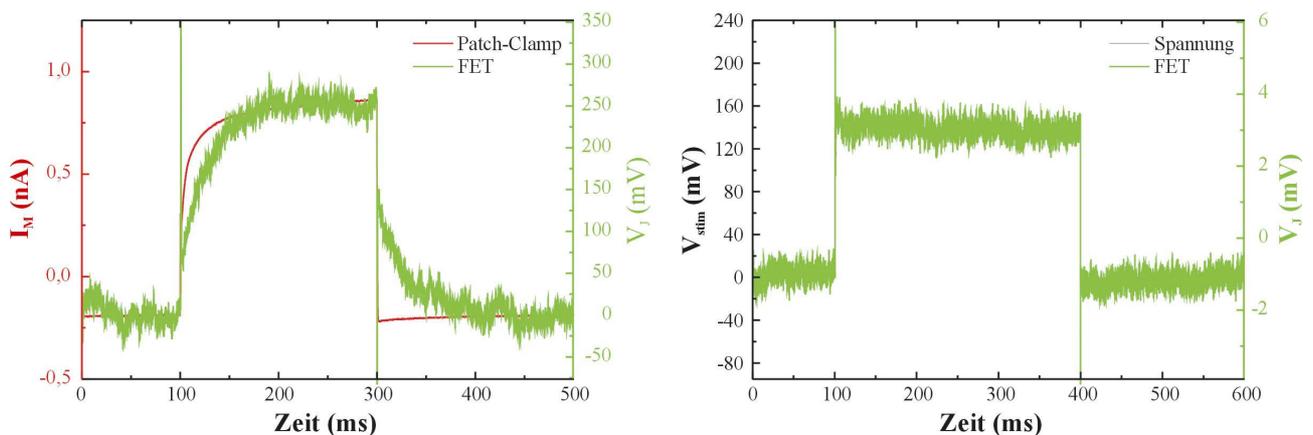


Abbildung 4-19: Links: Zell-Transistor-Kopplung mit 100-facher Signalmittelung nach Korrektur der falsch eingestellten Zeitkonstante. Rechts: Signalverlauf der Testpulse am Eingang des Vorverstärkermeßkopfes.

Aus der Form des FET-Signals in Abbildung 4-19 ist eindeutig zu schließen, daß das mit dem Feldeffekttransistor extrazellulär aufgezeichnete Signal kein rein kapazitiv gekoppelter Rechteckpuls der Kommandospannung ist (kein passives Signal). Lediglich bei den steilen Flanken zu Beginn und am Ende des Stimulationspulses handelt es sich um rein kapazitive Anteile. Der exponentielle Abfall am Ende des Stimulationspulses wird durch Änderungen der K^+ -Ionenkonzentration im extrazellulären Spalt verursacht und wegen der K^+ -Ionensensitivität des Feldeffekttransistors gemessen⁵. Der exponentielle Anstieg wird sowohl durch die Ionensensitivität des Feldeffekttransistors als auch durch die Eigenschaften des Kanals beeinflusst (s. Kapitel 0). Zahlreiche weitere Kopplungsexperimente wurden durchgeführt, um die Form der extrazellulär gemessenen Signale zu reproduzieren und zu bestätigen. Abbildung 4-20 zeigt eine dieser Messungen.

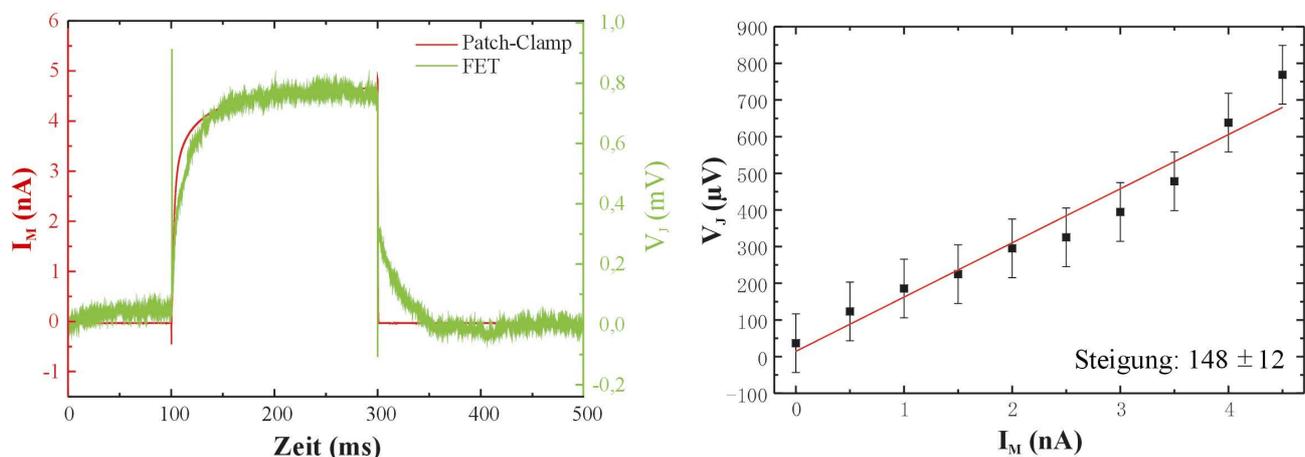


Abbildung 4-20: Links: Zell-Transistor-Kopplung mit 100-facher Signalmittelung. Rechts: Verhältnis zwischen gemitteltem FET-Signal V_J und Patch-Clamp-Strom I_M .

Das Verhältnis zwischen dem gemittelten FET-Signal V_J und dem Patch-Clamp-Strom I_M kann mit einer Geraden beschrieben werden (rechtes Bild der Abbildung 4-20). Die Steigung der Geraden beträgt $V_J/I_M \approx (148 \pm 12) \mu V/nA$. Eine Proportionalität zwischen FET- und Patch-Clamp-Signal wurde auch in einer anderen Arbeit an maxi- K_{Ca} Kanälen festgestellt ($V_J/I_M = 73 \mu V/nA$) und als eine entscheidende Anforderung für die Anwendung eines Biosensors auf ionisch/elektronischer Basis angeführt [Straub et al., 2001].

Die Signalamplituden des extrazellulär gemessenen Signals aus Abbildung 4-20 sind wesentlich höher als in der vorherigen Messung (Abbildung 4-19). Dies ist auf den höheren Membranstrom der benutzten Zelle und auf eine bessere Abdichtung des Feldeffekttransistors durch die Zelle zurückzuführen. Eine gute Abdichtung der Zelle bedeutet einen

⁵ Untersuchungen zur K^+ -Ionensensitivität der verwendeten Feldeffekttransistoren wurden in [Ingebrandt, 2001] durchgeführt.

großen Sealwiderstand R_j bzw. eine kleine Seal-Leitfähigkeit g_j . Eine allgemeine Aussage, wieviel Membranstrom einer Zelle für eine Kopplung benötigt wird, ist deshalb nicht möglich. Es konnten z.B. auch Kopplungen mit „kleinen“ Membranströmen aufgelöst werden (s. Abbildung 4-19).

4.2.2.3. Simulationen der Zell-Transistor-Kopplungen

Zur genaueren Analyse der in den Feldeffekttransistoren eingekoppelten Signale wurden Simulationen der Kopplungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Signale von drei unterschiedlichen Stimulationspulsen aufgezeichnet und mit dem Programm PSpice (Version 9.1) berechnet⁶. In Abbildung 4-21 sind die Simulationen zweier Zell-Transistor-Kopplungen dargestellt.

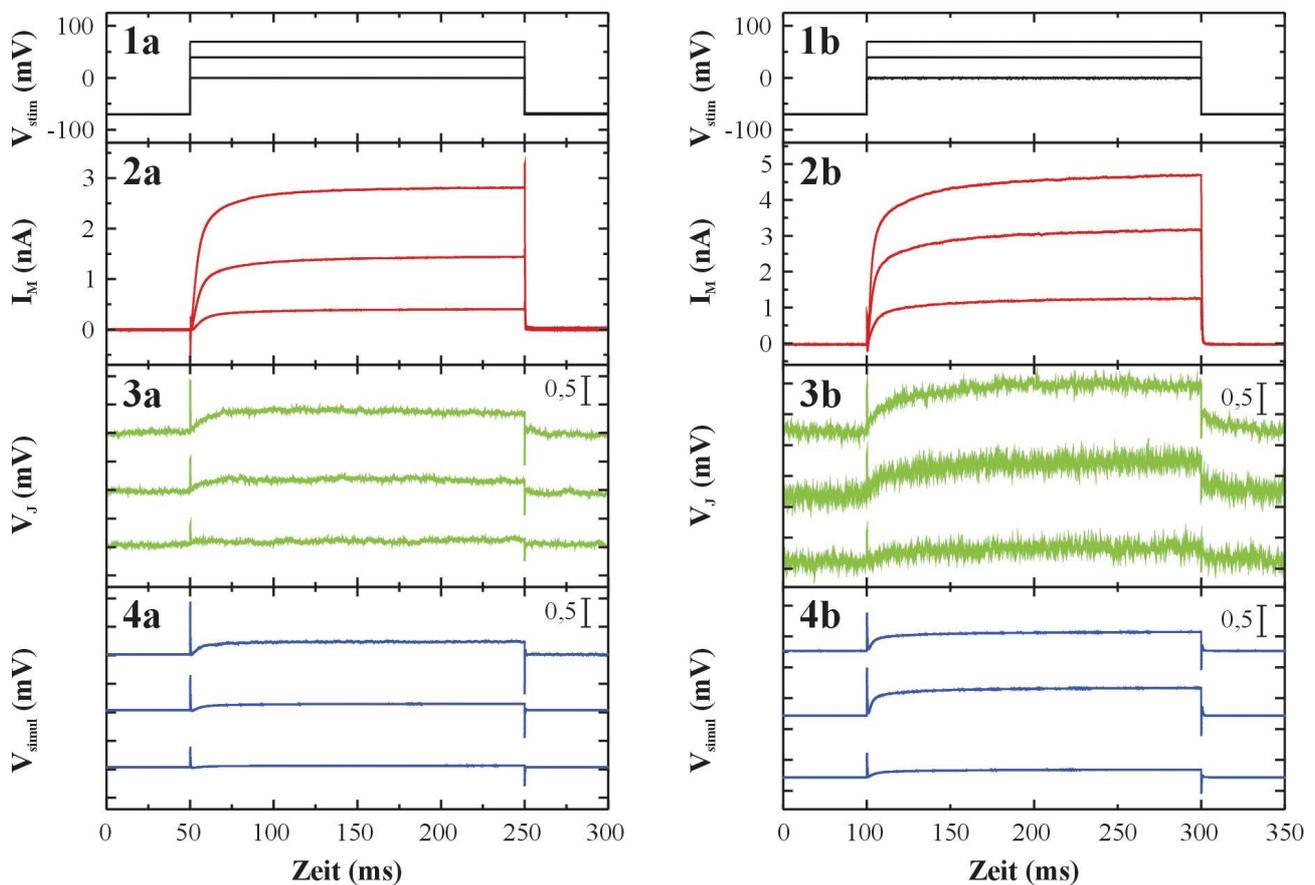


Abbildung 4-21: Zell-Transistor-Kopplungen und Simulationen der Kopplungen mit PSpice. Links: Experiment mit 100-facher Signalmittelung. Rechts: Experiment mit 10-facher Signalmittelung.

Als Stimulationsspannungen V_{stim} wurden Spannungen von +70, +40 und 0 mV gewählt (Diagramm 1a und 1b in Abbildung 4-21). In den Diagrammen 2a und 2b sind jeweils die

⁶ Der komplette Source-Code des Programms wird in [Ingebrandt, 2001] gezeigt.

mit der Patch-Clamp-Elektrode aufgezeichneten Membranströme I_M der Ganzzelleableitung zu sehen. Die mit den Feldeffekttransistoren gemessenen extrazellulären Signale sind in den Diagrammen 3a und 3b abgebildet. Die Simulationen der FET-Signale mit PSpice sind in den Diagrammen 4a und 4b zu sehen. Zur besseren Darstellung wurden die FET-Signale und die PSpice-Simulationen entlang der y-Achse verschoben. Der deutlich höhere Rauschpegel in Diagramm 3b (Abbildung 4-21) wird durch eine niedrige Anzahl von Signalmittelungen verursacht. Die Zell-Transistor-Kopplung war hier so gut, daß für die Auflösung der Kopplung eine 10-fache Signalmittelung ausreichte. Die Kopplungsmessung aus Abbildung 4-20 stammt aus dem gleichen Experiment, wurde aber 100-fach gemittelt. Für die andere Messung in Abbildung 4-21 war eine 100-fache Signalmittelung erforderlich. Für die Simulation der Signale mit PSpice wurde das in Abbildung 4-22 dargestellte Modell verwendet. Es leitet sich aus dem Punkt-Kontakt-Modell (Abbildung 2-14) aus Kapitel 2.3 ab.

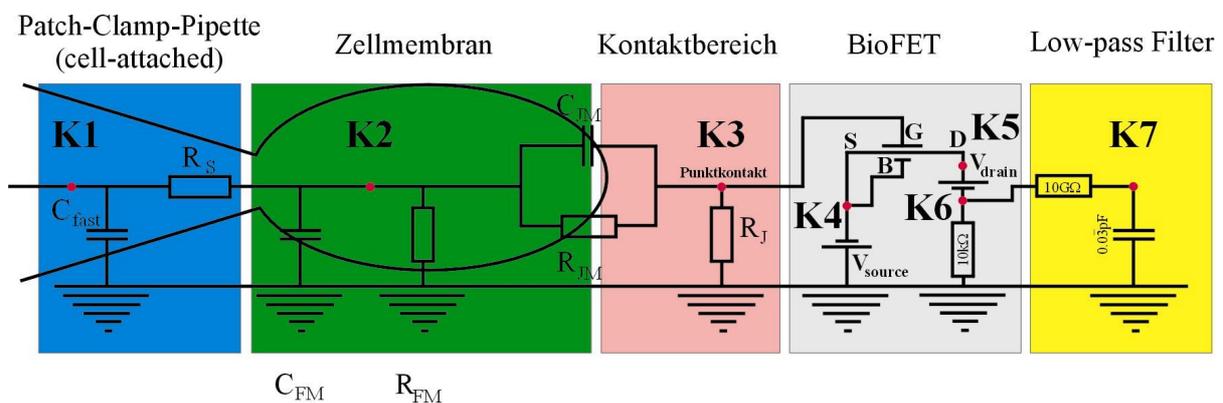


Abbildung 4-22: PSpice-Simulationsschaltkreis für die Patch-Clamp-Kopplung [Ingebrandt, 2001].

Vom Patch-Clamp-Verstärker werden folgende Werte für die Simulation benötigt:

1. R_M : Membranwiderstand;
2. i_L : Leckstrom der Zelle beim Haltepotential (-70 mV);
3. C_{fast} : kompensierter Wert der Pipetten-Streukapazität;
4. G_L : Leckleitfähigkeit der Zelle mit Pipetten-Zell-Kontakt;
5. R_S : Serienwiderstand des Pipetten-Zell-Kontakts;
6. C_{slow} : Kapazität der Zellmembran.

Die Werte für C_{fast} und R_S (s. Kapitel 3.4) werden direkt in den PSpice-Simulationsschaltkreis eingespeist. Aus C_{slow} und R_M werden mit den nachfolgenden Gleichungen die Werte für die Kapazität und den Widerstand der anhaftenden und freien Zellmembran berechnet:

$$\frac{1}{R_{FM}} = \frac{1}{0,9 \cdot R_M}; \text{ mit } R_{FM}: \text{ Widerstand der freien Membran} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

$$\frac{1}{R_{JM}} = \frac{1}{0,1 \cdot R_M}; \text{ mit } R_{JM}: \text{ Widerstand der anhaftenden Membran} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

$$C_{FM} = 0,9 \cdot C_{slow}; \text{ mit } C_{FM}: \text{ Kapazität der freien Membran} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

$$C_{JM} = 0,1 \cdot C_{slow}; \text{ mit } C_{JM}: \text{ Kapazität der anhaftenden Membran} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

$$C_{slow} = C_{FM} + C_{JM}; \text{ Parallel-Schaltkreis} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

$$\frac{1}{R_M} = \frac{1}{R_{FM}} + \frac{1}{R_{JM}}; \text{ Parallel-Schaltkreis} \quad \text{Gleichung 4-7}$$

Für die auf dem Transistor anhaftende Zellmembran wurde ein Wert von 10 % angenommen. Jedoch ist der Absolutwert für die Simulation nicht entscheidend, da das simulierte Signal unabhängig vom Anteil der anhaftenden Zellmembran ist.

Als Spannungsquelle am Knoten 1 (K1 in Abbildung 4-22) werden die Stimulationspulse der Voltage-Clamp-Messung verwendet. 10 % des gemessenen Membranstroms wird in den Schaltkreis am Knoten 2 zum Knoten 3 (Kontaktbereich) eingespeist, die restlichen 90 % am Knoten 2 zum Ground. Die resultierende Spannung kann am Knoten 3 mit einem simulierten BioFET beobachtet werden. Nach Filterung des Signals (low-pass Filter wegen Verstärkerelektronik; ermittelt in einem Kontrollexperiment) wird die endgültige Spannung am Knoten 7 ausgegeben.

Der Radius der Zelle kann mit Gleichung 4-8 aus C_{slow} berechnet werden:

$$r_{Zelle} = \sqrt{\frac{C_{slow}}{4\pi c_M}}; \text{ mit } c_M = 1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ [Hille, 2001]} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Die Fläche der Zelle ergibt sich unter der vereinfachten Annahme einer kugelförmigen Geometrie mit Gleichung 4-9 zu:

$$A_M = 4\pi r_{Zelle}^2 \quad \text{Gleichung 4-9}$$

Der bedeutendste Werte der Zell-Transistor-Kopplung, der Abdicht- bzw. Sealwiderstand R_J , läßt sich mit der absoluten Seal-Leitfähigkeit G_J nach Gleichung 4-10 und Gleichung 4-11 berechnen:

$$R_J = \frac{1}{G_J} \quad \text{Gleichung 4-10}$$

$$G_J = \frac{1}{V_J^0} \left(\frac{dV_M}{dt} \right) C_M A_{JM}; \text{ mit } A_{JM} = 0,1 \cdot A_M \quad \text{Gleichung 4-11}$$

Gleichung 4-11 wurde bereits in ähnlicher Form in Kapitel 2.3 für die spezifische Seal-Leitfähigkeit g_J angegeben. Beide Gleichungen können über Gleichung 4-12 ineinander umgerechnet werden:

$$g_J = \frac{G_J}{A_{JM}} \tag{Gleichung 4-12}$$

V_J^0 stellt die extrazelluläre Spitzenhöhe der kapazitiven Antwort auf den Stimulationspuls dar. Somit ergibt sich für den Sealwiderstand R_J (ohne Berücksichtigung des Tiefpasses) mit $dV_M/dt = V_{Stufe}/(R_S \cdot C_{slow})$:

$$R_J = V_J^0 \frac{V_{Stufe}}{R_S C_{slow}} \frac{1}{C_M A_{JM}} \tag{Gleichung 4-13}$$

Bei den Simulationen mit PSpice wird der Wert für V_J^0 derart angepaßt, daß die Amplituden der kapazitiven Transienten der simulierten und gemessenen Daten möglichst gut korrelieren. Abbildung 4-23 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der durchgeführten Simulationen für die Messungen aus Abbildung 4-21. Dargestellt ist jeweils das simulierte und das mit dem Feldeffekttransistor gemessene Signal.

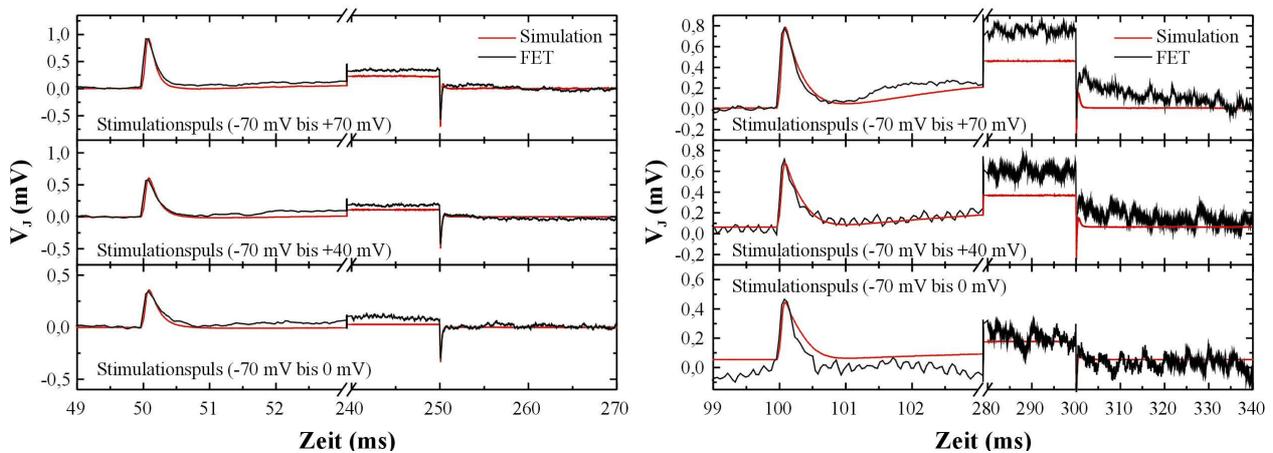


Abbildung 4-23: Vergrößerte Ausschnitte der Simulationen aus Abbildung 4-21. Gezeigt sind jeweils die simulierten und die mit dem Feldeffekttransistor extrazellulär gemessenen Signale.

Es ist deutlich die gute Übereinstimmung der simulierten und tatsächlich gemessenen kapazitiven Transienten zu erkennen. Mit den zuvor angeführten Gleichungen ergibt sich für den Sealwiderstand R_J (Seal-Leitfähigkeit g_J) für das 100-fach gemittelte Experiment ein durchschnittlicher Wert von $890 \text{ k}\Omega$ ($g_J = 0,75 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$). Für das 10-fach gemittelte Experiment wird ein durchschnittlicher Wert von $937 \text{ k}\Omega$ ($g_J = 0,58 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$) berechnet. Diese Werte bestätigen die bessere Zell-Transistor-Kopplung für das 10-fach gemittelte Experiment.

Auffällig ist in Abbildung 4-23 jedoch die nicht optimale Übereinstimmung der Signalamplituden am Ende der jeweiligen Stimulationspulse. Die FET-Signale und vor allem der langsame Abfall der extrazellulär gemessenen Signale nach Rückgang der Stimulationspulse auf die entsprechende Haltespannung können mit dem vorgestellten Punkt-Kontakt-Modell nicht simuliert werden. Eine Übereinstimmung der FET-Signale mit den simulierten Signalverläufen kann nur durch Verwendung eines zusätzlichen Skalierungsfaktors erreicht werden. In der Literatur wird beschrieben, daß Anhäufungen von Ionenkanälen, die durch Ionenänderungen im extrazellulären Raum zwischen Zelle und Transistor hervorgerufen werden („self-gating of ion-channels“), einen erhöhten Ionenstrom im extrazellulären Spalt verursachen können [Fromherz, 1997]. Deshalb soll der erhöhte Ionenstrom nur vom Feldeffekttransistor und nicht von der Patch-Clamp-Pipette erfaßt werden können. „Überhöhte“ FET-Signale wurden auch bei Kopplungsexperimenten mit maxi-K_{Ca} Kanälen in HEK 293-Zellen beobachtet und mit der Theorie von der Anhäufung der Ionenkanäle im extrazellulären Zwischenraum begründet [Straub et al., 2001]. Eine alternative Erklärung für „überhöhte“ FET-Signale wird in [Ingebrandt, 2001] angeführt. Dort wurde der Effekt auf die Ionensensitivität des Feldeffekttransistors zurückgeführt⁷ und ein erweitertes Punkt-Kontakt-Modell (Gleichung 4-14) vorgestellt. Mit diesem Modell, bei dem selbst für große Skalierungsfaktoren nur geringe Veränderungen der K⁺-Ionenkonzentration im Spalt nötig sind (Änderungen im unteren mM-Bereich) konnte eine gute Übereinstimmung der Daten erreicht werden.

$$V_J = \frac{1}{g_J} \left(C_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i i_i^M \right) + \sum_i S_i^{\text{ion}} \log \left(\frac{\Delta c_i^{\text{ion}} + c_i^0}{c_i^0} \right) \quad \text{Gleichung 4-14}$$

Die Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 geben die wichtigsten Parameter der beiden Messungen aus Abbildung 4-21 zusammenfassend wieder.

Tabelle 4-1: *Verwendete und berechnete Werte für die Zell-Transistor-Simulationen der 100-fach gemittelten FET-Signale aus Abbildung 4-21 (linke Seite).*

FET	Patch-Clamp	Puls: +70 mV	Puls: +40 mV	Puls: +0 mV
p-Kanal-FET V _{GS} = 1,8 V, V _{DS} = 2,2 V g _m = 0,25 mS Gate: 5x16 μm ² Signalmittelung: 100-fach Kontaktfläche: 10 %	V _{hold} = -70 mV C _{fast} = 5,94 pF	C _{slow} = 15,17 pF R _M = 4,97 GΩ G _L = 1,8 nS R _S = 7,2 MΩ g _J = 0,75 S·cm ⁻² R _J = 874,3 kΩ A _{JM} = 1,5·10 ⁻¹⁰ m ² r _{Zelle} = 11,0 μm	C _{slow} = 14,88 pF R _M = 3,41 GΩ G _L = 1,8 nS R _S = 9,9 MΩ g _J = 0,75 S·cm ⁻² R _J = 890,6 kΩ A _{JM} = 1,5·10 ⁻¹⁰ m ² r _{Zelle} = 10,9 μm	C _{slow} = 14,57 pF R _M = 4,97 GΩ G _L = 1,8 nS R _S = 11,3 MΩ g _J = 0,75 S·cm ⁻² R _J = 907,2 kΩ A _{JM} = 1,5·10 ⁻¹⁰ m ² r _{Zelle} = 10,8 μm

⁷ In [Ingebrandt, 2001] wird für die K⁺-Ionensensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Feldeffekttransistoren ein Wert von 13,7 mV/pK angegeben (s. Kapitel 2.2).

Tabelle 4-2: Verwendete und berechnete Werte für die Zell-Transistor-Simulationen der 10-fach gemittelten FET-Signale aus Abbildung 4-21 (rechte Seite).

FET	Patch-Clamp	Puls: +70 mV	Puls: +40 mV	Puls: +0 mV
p-Kanal-FET $V_{GS} = -2 \text{ V}$, $V_{DS} = -2,5 \text{ V}$ $g_m = 0,28 \text{ mS}$ Gate: $5 \times 8 \text{ } \mu\text{m}^2$ Signalmittelung: 10-fach Kontaktfläche: 10 %	$V_{\text{hold}} = -70 \text{ mV}$ $C_{\text{fast}} = 6,10 \text{ pF}$	$C_{\text{slow}} = 18,53 \text{ pF}$ $R_M = 0,90 \text{ G}\Omega$ $G_L = 0 \text{ nS}$ $R_S = 12,2 \text{ M}\Omega$ $g_j = 0,58 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$ $R_j = 936,8 \text{ k}\Omega$ $A_{JM} = 1,84 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ $r_{Zelle} = 12,1 \text{ } \mu\text{m}$	$C_{\text{slow}} = 18,53 \text{ pF}$ $R_M = 1,54 \text{ G}\Omega$ $G_L = 0 \text{ nS}$ $R_S = 12,2 \text{ M}\Omega$ $g_j = 0,58 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$ $R_j = 936,8 \text{ k}\Omega$ $A_{JM} = 1,80 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ $r_{Zelle} = 12,1 \text{ } \mu\text{m}$	$C_{\text{slow}} = 18,53 \text{ pF}$ $R_M = 1,31 \text{ G}\Omega$ $G_L = 0 \text{ nS}$ $R_S = 12,2 \text{ M}\Omega$ $g_j = 0,58 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}$ $R_j = 936,8 \text{ k}\Omega$ $A_{JM} = 1,80 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ $r_{Zelle} = 12,1 \text{ } \mu\text{m}$

4.2.2.4. Kinetische Betrachtung der Zell-Transistor-Kopplungen

Der K^+ -selektive Ionenkanal (beag1) in den HEK 293-Zellen weist eine weitere interessante Eigenschaft auf. Je nach gewählter Haltespannung V_{hold} verändert sich die Aktivierungskinetik des Kanals [Frings et al., 1998].

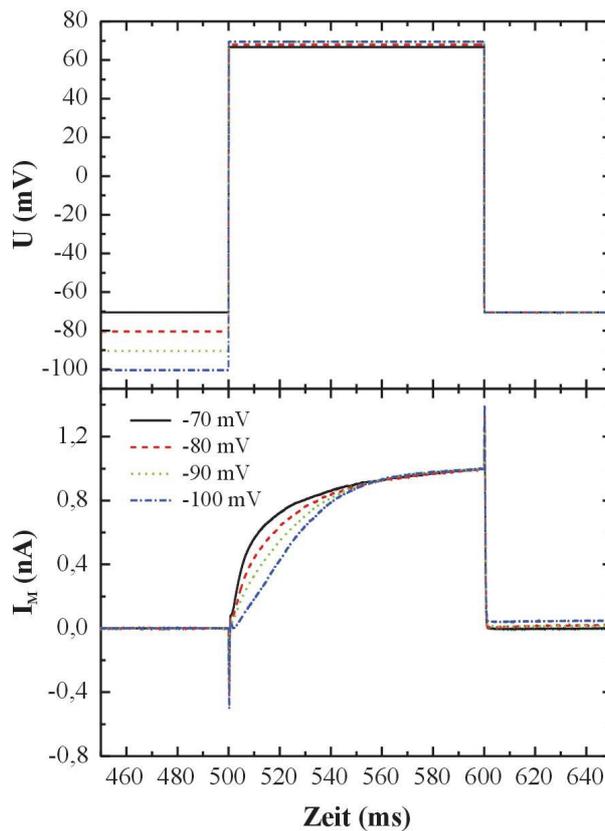


Abbildung 4-24: Änderungen in der Aktivierungskinetik des ether-à-go-go (eag) K^+ -Kanals bei Verwendung unterschiedlicher Haltespannungen. Oben: Eingesetzte Haltespannungen. Unten: Mit einer Patch-Clamp-Elektrode gemessener Membranstrom I_M .

Veränderungen in der Aktivierungskinetik des Ionenkanals wurden nur bei Verwendung negativerer Haltespannungen als -70 mV deutlich. Außerdem mußte mindestens

500-1000 ms auf dieser Spannung „vorpolarisiert“ werden. Die Reaktion ist stark von der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration abhängig. Je größer die Mg^{2+} -Konzentration, desto langsamer öffnet sich der Kanal [Terlau et al., 1996; Frings et al., 1998; Tang et al., 2000]. In [Schönherr et al., 2002] wird für diese Beobachtung eine mögliche Erklärung angeführt. Wenn die Mg^{2+} -Ionen an bestimmte extrazelluläre Domänen des Ionenkanals (S2-S3; s. Abbildung 2-4 in Kapitel 2.1) binden, unterliegt der Kanal einer Konformationsänderung. Der Kanal geht dann in einen geschlossen Zustand (resting-„locked“) über. Von diesem Zustand aus ist nur eine sehr langsame Aktivierung möglich. In Abbildung 4-24 ist eine Patch-Clamp-Messung dargestellt, die den vorgestellten Effekt deutlich zeigt. Im oberen Teil der Abbildung 4-24 ist das zugehörige Stimulationsprotokoll mit den vier Haltespannungen -70, -80, -90 und -100 mV abgebildet. Der untere Teil zeigt die resultierenden Membranströme. Die extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration betrug 0,8 mM (s. Kapitel 3.6.4.2). Um die Frage zu klären, ob die unterschiedliche Aktivierungskinetik mit einem Feldeffekttransistor gemessen werden kann wurden Kopplungsmessungen mit dem Stimulationsprotokoll aus Abbildung 4-24 durchgeführt.

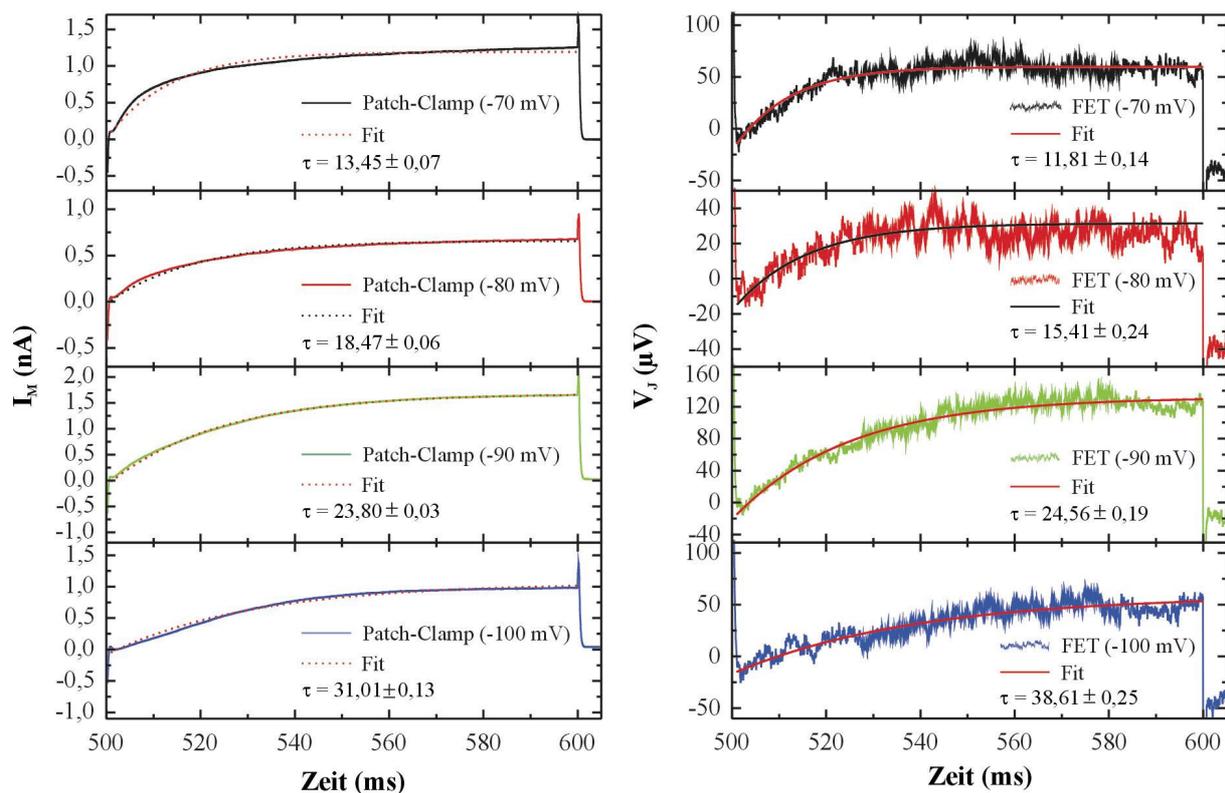


Abbildung 4-25: Zell-Transistor-Kopplungsexperiment in Abhängigkeit von der gewählten Haltespannung zur Messung der Aktivierungskinetik des Ionenkanals. Links: Mit Patch-Clamp-Elektrode gemessene Membranströme I_M . Rechts: Mit Feldeffekttransistor gleichzeitig aufgezeichnete Signale V_J .

In Abbildung 4-25 sind in Abhängigkeit von der gewählten Haltespannung sowohl die mit dem Feldeffekttransistor extrazellulär aufgezeichneten Signale V_J als auch die gleichzeitig mit der Patch-Clamp-Elektrode gemessenen Membranströme I_M abgebildet. Außerdem sind die exponentiell „angeglichenen“ Signale eingezeichnet und die zugehörigen Zeitkonstanten eingetragen. Der zeitlichen Verlauf der Kanal-Aktivierung kann mit einer Summe zweier gewichteter exponentieller Funktionen (Gleichung 4-15) beschrieben werden.

$$I_M = I_M^0 + R \cdot I_M^{\max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_{\text{fast}}}}\right) + (1-R) \cdot I_M^{\max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_{\text{slow}}}}\right) \quad \text{Gleichung 4-15}$$

Dabei stehen τ_{fast} und τ_{slow} für eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante und R gibt die entsprechenden Anteile der schnellen bzw. langsamen Komponente an.

Für die Patch-Clamp-Signale ergeben sich nach Anwendung von Gleichung 4-15 ein Anteil von ungefähr 20 % für die langsame Komponente und entsprechend 80 % für die schnelle. Da der Anteil der langsamen Komponente nur etwa 20 % beträgt und mit dem Feldeffekttransistor nicht aufgelöst werden konnte, wurden für die „angeglichenen“ Signale in Abbildung 4-25 nur die schnellen Anteile bzw. τ_{fast} berücksichtigt. In Abbildung 4-26 sind die „angeglichenen“ Signale aus Abbildung 4-25 normiert eingezeichnet. Eine exakte „Angleichung“ der FET-Signale ist wegen des hohen Rauschniveaus dennoch schwierig.

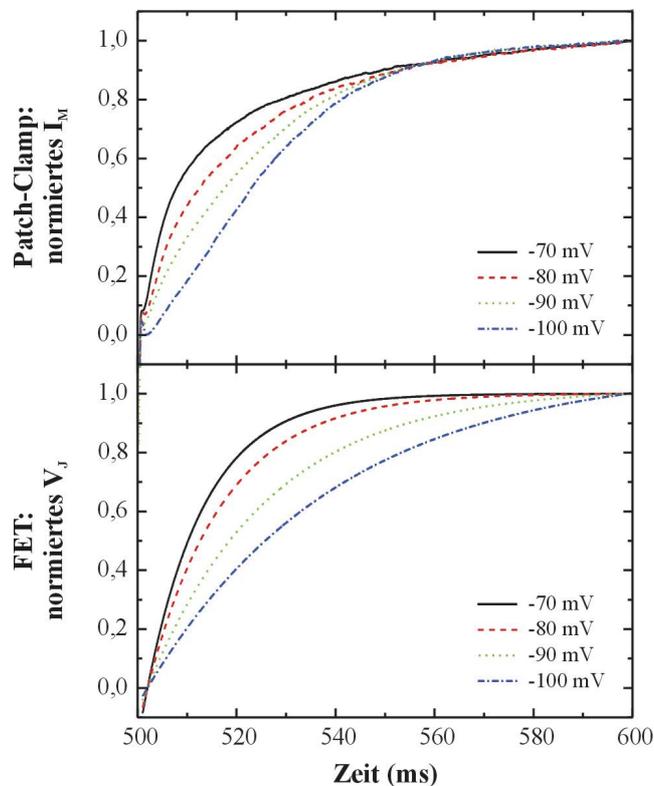


Abbildung 4-26: Vergleich der in Abbildung 4-25 berechneten „Angleichungskurven“. Oben: Normierter Patch-Clamp-Strom I_M . Unten: Normiertes FET-Signal V_J .

Der direkte Vergleich der „angeglichenen“ Patch-Clamp- und FET-Signale zeigt, daß das FET-Signal einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie das Patch-Clamp-Signal aufweist (Abbildung 4-26). Erstmals konnte damit die Aktivierungskinetik eines Ionenkanals extrazellulär mit einem Feldeffekttransistor gemessen und aufgelöst werden. Dies ist gleichzeitig der experimentelle Nachweis dafür, daß sich der unterschiedliche zeitliche Einstrom der K^+ -Ionen in den Kontaktbereich zwischen Zelle und Feldeffekttransistor deutlich auf die Signaleinkopplung auswirkt. Das hohe Rauschniveau der extrazellulär aufgezeichneten Signale erlaubt aber keine eindeutigen Schlußfolgerungen über die Diffusionsvorgänge im extrazellulären Spalt. Dies wird in Abbildung 4-27 deutlich. Aufgetragen sind die ermittelten Zeitkonstanten gegen die gewählte Haltespannung der „Vorpolarisierung“. Werden Diffusionsvorgänge im extrazellulären Raum zwischen Zelle und Transistor betrachtet, so sollten die FET-Signale den Patch-Clamp-Signalen bei schnellen Zeitkonstanten „nacheilen“. Bei langsamen Zeitkonstanten sollten die Patch-Clamp- und FET-Signale etwa gleich schnell sein. Dieser Sachverhalt kann in Abbildung 4-27 wegen der hohen Fehlerwerte nicht eindeutig geklärt werden.

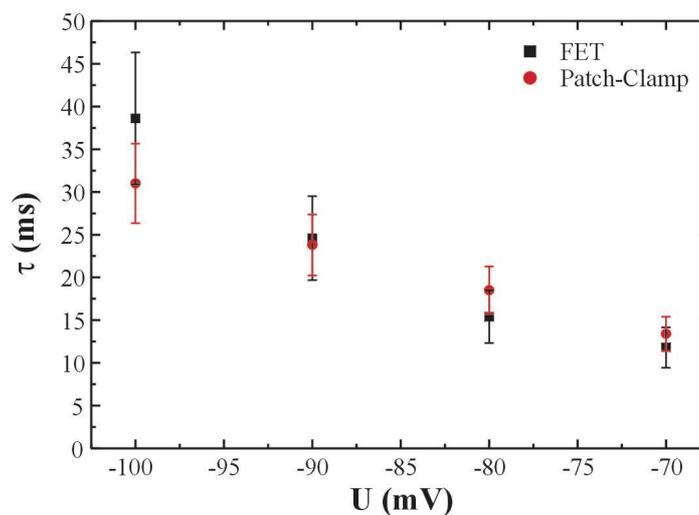


Abbildung 4-27: Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten aus Abbildung 4-25. Die Spannung U bezieht sich auf die eingesetzte Haltespannung der „Vorpolarisierung“.

Eine genauere Ermittlung der Zeitkonstanten wird zum einen durch das hohe Rauschniveau in den extrazellulär gemessenen Signalen und zum anderen durch die Signalmittelungen verhindert. Für die Auflösung der in Abbildung 4-25 gezeigten FET-Signale mußten die Stimulationspulse (Abbildung 4-24) insgesamt 100 mal wiederholt werden. Für das gesamte Experiment ergeben sich mit insgesamt vier verschiedenen Stimulationspulsen 400 Wiederholungen der jeweiligen Pulse. Diese hohe Anzahl an Stimulationen stellt eine extrem starke Belastung für die Zelle dar. Nicht alle in dieser Arbeit gemessenen Zellen hielten dieser Belastung stand. Auch wenn die Zellen dieser Beanspruchung widerstanden,

so wurde sehr häufig eine deutliche Abnahme des maximalen Membranstroms festgestellt. Zur Aufklärung der Diffusionsvorgänge im extrazellulären Zwischenraum ist es für zukünftige Untersuchungen unbedingt notwendig, die Experimente mit einer geringeren Anzahl an Signalmittelungen durchzuführen. Dies ist nur möglich, wenn entweder Zellen verwendet werden, die deutlich höhere Membranströme liefern und/oder wenn neue Transistoren entwickelt werden, die wesentlich größere Signalverstärkungen (größere Gate-Steilheiten) und geringere Rauschniveaus aufweisen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden extrazelluläre Signalableitungen elektrisch aktiver Zellen mit Mikroelektrodenarrays und Feldeffekttransistoren untersucht. Eine erfolgreiche Anbindung der Zellen auf den Transducersystemen, ausreichend empfindliche Meßsysteme und ein geeigneter experimenteller Meßplatz waren dafür notwendig.

Zur Analyse der bioelektronischen Kopplungen wurde ein elektrophysiologischer Arbeitsplatz aufgebaut und mit einem extrazellulären Meßsystem erweitert. Dieser Aufbau bot die Möglichkeit, gleichzeitig intra- und extrazelluläre Signale von Zellen zu analysieren. Als Zellsysteme wurden primär kultivierte Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) embryonaler Ratten und die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK 293 verwendet. Das Anwachsverhalten der HEK 293-Zellen wurde auf verschiedenen mikrostrukturierten Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht und mit Neuronen von Ratten (adult rat retinal neurones) verglichen. Dabei hatten die Eigenschaften der Oberfläche, z.B. Rauigkeit und Topologie einen entscheidenden Einfluß auf das Wachstum der Neuronen, nicht jedoch auf das der HEK 293-Zellen.

Die Kardiomyozyten bildeten nach etwa 2-4 Tagen „in vitro“ eine konfluente Zellschicht aus. Aufgrund elektrischer Verbindungen der Zellen untereinander (Gap-Junctions), zeigte die gesamte Zellschicht spontane Kontraktionen. Zur Analyse der Signalweiterleitung innerhalb eines solchen Zellgeflechts wurden Mikroelektrodenarrays mit 64 Goldmikroelektroden in Dünnschichttechnologie gefertigt. Zusätzlich wurde die Funktionalität eines bereits vorhandenen Meßsystems auf 64 Kanäle erweitert. Dieses System ermöglichte es, die Ausbreitung von Aktionspotentialen über den gesamten Zellrasen zeitaufgelöst und mit einem hohen Signal/Rausch-Verhältnis gleichzeitig an 64 verschiedenen Positionen zu verfolgen (Multisite-Kopplung). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektrischen Erregung über das Synzytium wurde bestimmt und die ungefähre Position des Schrittmacherzentrums lokalisiert. Eine Zugabe geringer Mengen pharmakologischer Substanzen führte zu deutlichen Änderungen der Kontraktionsfrequenzen. Mit den Zellen aus einem Tier konnten etliche Arrays beschichtet und so entsprechend viele Experimente durchgeführt werden. Ein großer Teil der Zellen konnte sogar mehrfach für Experimente eingesetzt werden. Sie „erholten“ sich nach Anwendung entsprechender Waschschriffe innerhalb weniger Stunden im Inkubator. Auch die Mikroelektrodenarrays konnten mehrfach wiederverwendet werden. Ihre Langzeitstabilität, bezogen auf die Standfestigkeit der Passivierungsschicht, erwies sich als sehr gut. Eine in vorherigen Arbeiten entwickelte Meßmethode, bei der die Elektroden des Arrays als sogenannte Extended-Gate-Elektroden an die Gates kommerzieller JunctionFETs angeschlossen werden [Krause, 2000; Ingebrandt, 2001], erlaubte den Verzicht einer Elektroden-Platinierung zur Impedanzerniedrigung.

Alle vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen das große Potential dieses Zell-Hybrid-System für einen möglichen zukünftigen Einsatz in der pharmakologischen Forschung. Als weitere zukünftige Entwicklungen in diesem Forschungsgebiet wäre die Optimierung von Strukturierungsmethoden der Chipoberfläche zum Aufbau definierter Netzwerke vorstellbar.

Zur Untersuchung der extrazellulären Signalableitung einzelner Zellen, wurden Einzelzell-Experimente an genetisch modifizierten HEK 293-Zellen mit Feldeffekttransistoren durchgeführt. Die Modifikation der Zellen bestand darin, daß in die Zellen ein Kanalgen stabil transfiziert wurde, das für K^+ -selektive Ionenkanäle kodiert. Auf diese Weise konnte der Einfluß von K^+ -Ionenströmen auf das resultierende extrazelluläre Signal gezielt untersucht werden. Da die Ionenkanäle spannungsgesteuert sind, konnten sie mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gut kontrolliert werden. Sie zeigten außerdem keine Inaktivierung und lieferten Membranströme in der Größenordnung mehrerer nA (Ganzzellableitung). Durch gleichzeitige Aufnahme des Membranstroms konnte ein direkter Vergleich zum extrazellulär gemessenen Signal durchgeführt werden. Aus der Form der Signale konnte eindeutig geschlossen werden, daß die extrazellulär aufgezeichneten Signale keine rein ohmsch gekoppelten Pulse der Kommandospannung sind. Zur genauen Analyse der gemessenen Signale wurden Simulationen der Signalableitungen durchgeführt, charakteristische elektrische Größen der Kopplungen bestimmt und Fehler in der automatischen Driftkompensation des Hauptverstärkers behoben. Besonders gute Kopplungen wurden immer dann beobachtet, wenn die Zelle das Gate des Feldeffekttransistors vollständig abdeckte. Erstmals konnte auch die Aktivierungskinetik eines Ionenkanals extrazellulär mit einem Feldeffekttransistor aufgezeichnet werden. Die Auswertung zeigte, daß die extrazellulär gemessenen Signale einen sehr ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die zugehörigen Patch-Clamp-Signale aufweisen. Damit konnte der experimentelle Nachweis erbracht werden, daß sich der unterschiedliche zeitliche Einstrom von K^+ -Ionen in den Kontaktbereich zwischen Zelle und Feldeffekttransistor deutlich auf die Signaleinkopplung auswirkt. Das hohe Rauschniveau und die hohe Anzahl der notwendigen Signalmittelungen erlaubte allerdings keine eindeutige Schlußfolgerung über genaue Diffusionsvorgänge im extrazellulären Spalt. Für zukünftige Untersuchungen ist es deshalb unbedingt erforderlich, neue Transistoren zu entwickeln, die wesentlich größere Signalverstärkungen und geringere Rauschniveaus aufweisen. Denkbar wäre z.B. ein Einsatz von „Nanotransistoren“ (Abbildung 5-1). Erste Laborexperimente und Berechnungen prognostizieren Signalverstärkungen, die um ein bis zwei Größenordnungen höher liegen als diejenigen, die in dieser Arbeit möglich waren.

Auch Entwicklungen von Oberflächenmodifikationen sollten vorangetrieben werden, um optimale Sealwiderstände und eine bessere Empfindlichkeit des Systems zu erreichen. Durch

gezielte Oberflächenmodifikationen könnte sogar eine direkte Positionierung der Zellen auf den Gates erreicht werden. Interessant wäre auch eine Untersuchung von Ionenkanälen, die über zyklische Nukleotide gesteuert werden. Erfolgreiche Signaleinkopplungen mit diesen Ionenkanälen könnten zu einer Entwicklung von Liganden-gesteuerten „Wholecell“-Biosensoren, mit ionisch/elektronischer-Schnittstelle, führen.

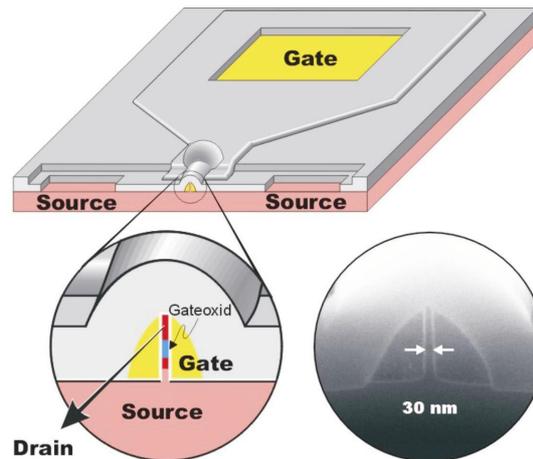


Abbildung 5-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Gates eines hergestellten „Nanotransistors“ und zugehöriges Schema.

Hybridsysteme aus Feldeffekttransistoren und genetisch modifizierten Zellen stellen somit äußerst interessante Modelle dar, um weitere Detailfragen der Zell-Transistor-Kopplung aufzuklären und die Entwicklung maßgeschneiderter biologischer Signal-Wandler-Systeme in Zukunft voranzutreiben.

6. Anhang

6.1. Biologische Zellpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie

- Medium abpipettieren
- 2,5 %-ige Glutardialdehyd-Lösung auf Proben geben und vorsichtig schwenken
- Kleine Objekte zwei Stunden und große Objekte einen Tag bei Raumtemperatur stehenlassen
- 1-2 x mit PBS waschen (Entfernung des Glutardialdehyds)
- 40 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Stunde
- 60 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Stunde
- 80 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Stunde
- 100 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Stunde
- 100 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Tag
- 100 % Aceton hinzugeben, Einwirkzeit 1 Tag
- Lagerung bis zur endgültigen Trocknung in Aceton (niemals austrocknen lassen)
- Kritische Punkt-Trocknung mit CO₂

6.2. Naßchemische Reinigung für Mikroelektrodenarrays

- 10 Minuten in einer H₂O / H₂O₂ / H₂SO₄-Mischung im Verhältnis 5:1:1 im Ultraschallbad bei 80 °C
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- 10 Sekunden in einer AF-91-09-HF-Ätzlösung
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- 10 Minuten in einer H₂O / H₂O₂ / NH₄OH-Mischung im Verhältnis 5:1:1 im Ultraschallbad bei 80 °C
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- 10 Sekunden in einer AF-91-09-HF-Ätzlösung
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- 10 Minuten in einer H₂O / H₂O₂ / HCl-Mischung im Verhältnis 5:1:1 im Ultraschallbad bei 80 °C
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- 10 Sekunden in einer AF-91-09-HF-Ätzlösung
- 5 Minuten in deionisiertem Wasser
- Trockenschleudern des Wafers („Rinser-Dryer“, Semitool)

6.3. Reinigung der MEAs und FETs

- Abspülen mit „normalem“ Wasser
- Abspülen mit deionisiertem Wasser
- Reinigung im Ultraschallbad für 10 Minuten in 2 Vol.-% Hellmanex-Lösung (Hellma Optik GmbH, Deutschland)
- Abspülen mit deionisiertem Wasser
- Abspülen mit Milli-Q-Wasser
- Reinigung im Ultraschallbad für 10 Minuten in Milli-Q-Wasser
- Badkammern der Sensoren mit 20 Vol.-% H_2SO_4 -Lösung befüllen und bei 80 °C inkubieren
- Abspülen mit Milli-Q-Wasser
- Sensoren in Glasschalen legen und mit 70 Vol.-% Ethanol übergießen

7. Literaturverzeichnis

- Anderson and Miller, 1984 J.M. Anderson and K.M. Miller, **1984**,
Biomaterial biocompatibility and the macrophage,
Biomaterials, **5**, 5-10.
- Beale et al., 1985 M.I.J. Beale, J.D. Benjamin, M.J. Uren, N.G. Chew and
A.G. Cullis, **1985**,
*An experimental and theoretical study of the formation and
microstructure of porous silicon*,
Journal of Crystal Growth, **73**, 622-636.
- Beck et al., 1990 K. Beck, I. Hunter and J. Engel, **1990**,
*Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain
glycoprotein*,
The FASEB Journal, **4**, 148-160.
- Beneking, 1991 H. Beneking, **1991**,
*Halbleiter-Technologie: eine Einführung in die Prozeßtechnik von
Silizium und III-V-Verbindungen*,
Teubner, Stuttgart.
- Bergveld et al., 1995 P. Bergveld, R.E.G. van Hal and J.C.T. Eijkel, **1995**,
*The remarkable similarity between the acid-base properties of
ISFETs and proteins and the consequences for the design of ISFET
biosensors*,
Biosensors & Bioelectronics, **10**, 405-414.
- Bergveld, 1970 P. Bergveld, **1970**,
*Development of an ion-sensitive solid-state device for
neurophysiological measurements*,
IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering, **17**, 70-71.
- Bergveld, 1976 P. Bergveld, J. Wiersma and H. Meertens, **1976**,
*Extracellular potential recordings by means of a field effect
transistor without gate metal, called OSFET*,
IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering, **23**, 136-144.
- Bousse, 1982 L. Bousse, **1982**,
*Single electrode potentials related to flat-band voltage
measurements on EOS and MOS structures*,
Journal of Chemical Physics, **76**, 5128-5133.
- Bousse et al., 1983 L. Bousse, N.F. De Rooij and P. Bergveld, **1983**,
*Operation of chemically sensitive field-effect sensors as a function
of the insulator-electrolyte interface*,
IEEE Transactions on Electron Devices, **ED-30**, 1263-1270.

- Braun and Fromherz, 1998 D. Braun nad P. Fromherz, **1998**,
Fluorescence interferometry of neuronal cell adhesion on microstructured silicon,
Physical Review Letters, **81**, 5241-5244.
- Bruck, 1973 S.D. Bruck, **1973**,
Aspects of three types of hydrogels for biomedical applications,
Journal of Biomedical Materials Research, **7**, 387-404.
- Brüll, 1996 N. Brüll, **1996**,
Klonierung und funktionelle Charakterisierung von ether-a-gogo homologen K^+ -Kanäle aus der Rindernetzhaut,
Berichte des Forschungszentrums Jülich, **3184**.
- Cahalan and Neher, 1992 M. Cahalan and E. Neher, **1992**,
Patch clamp techniques: an overview,
Methods in Enzymology, **207**, 3-14.
- Chen and Okayama, 1987 C. Chen and H. Okayama, **1987**,
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA,
Molecular and Cellular Biology, **7**, 2745-2752.
- Cho et al., 1998 W.J. Cho, E.S. Kim, J.J. Kang, K.G. Rha and H.S. Kim, **1998**,
Annealing effects of polycrystalline silicon gate on electrical properties of thin gate oxide,
Solid-State Electronics, **42**, 557-566.
- Cho et al., 1999 W.J. Cho, Y.C. Kim, E.S. Kim, H.S. Kim, **1999**,
Effects of oxidation ambient and low temperature post oxidation anneal on the silicon/oxide interface structure and the electrical properties of the thin gate oxide,
Japanese Journal of Applied Physics Part 1 - Regular Papers Short Notes & Review Papers, **38**, 12-16.
- Clark et al., 1990 P. Clark, P. Connolly, A.S.G. Curtis, J.A.T. Dow and C.D.W. Wilkinson, **1990**,
Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata,
Development, **108**, 635-644.
- Clark et. al., 1993 P. Clark, S. Britland and P. Connolly, **1993**,
Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces,
Journal of Cell Sciences, **105**, 203-212.
- Clark, 1994 P. Clark, **1994**,
Cell behaviour on micropatterned surfaces,
Biosensors & Bioelectronics, **9**, 657-661.

- Corey et al., 1991 J.M. Corey, B.C. Wheeler and G.J. Brewer, **1991**,
Compliance of hippocampal neurons to patterned substrate networks,
Journal of Neuroscience Research, **30**, 300-307.
- Corey et al., 1996 J.M. Corey, B.C. Wheeler and G.J. Brewer, **1997**,
Micrometer resolution silane-based patterning of hippocampal neurons: critical variables in photoresist and laser ablation processes for substrate fabrication,
IEEE Transactions on Biomedical Engineering, **43**, 944-955.
- Crott, 1996 M. Crott, **1996**,
Untersuchung an porösen Halbleiter-Isolator-Schichtstrukturen im Hinblick auf ihre Eignung für biochemische Sensoranwendungen,
Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Curtis and Wilkinson, 1997 A. Curtis and C. Wilkinson, **1997**,
Topographical control of cells,
Biomaterials, **18**, 1573-1583.
- Denyer et al., 1999 M.C. Denyer, M. Riehle, J. Hayashi, M. Scholl, C. Sproessler, S.T. Britland, A. Offenhäusser, W. Knoll, **1999**,
Bioassay development: the implications of cardiac myocyte motility in vitro,
In vitro cellular & developmental biology: Animal, **35**, 352-356.
- DiFrancesco and Noble, 1985 D. DiFrancesco and D. Noble, **1985**,
A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes,
Philosophical Transactions of the Royal Society of London, **B307**, 353-398.
- Earn and Noble, 1990 Y.E. Earn and D. Noble, **1990**,
A model of the single atrial cell: relation between calcium current and calcium release,
Proceedings of the Royal Society London, **B240**, 83-96.
- Engel, 1992 J. Engel, **1992**,
Laminin and other strange proteins,
Biochemistry, **31**, 10643-10651.
- Faßbender, 2000 F. Faßbender, **2000**,
Erhöhung der Beständigkeit von Sensorchips gegen Elektrolytkontakt durch Passivierungsschichten mit verbesserter Barrierewirkung,
Shaker Verlag, Aachen,
D82 (Diss. RWTH Aachen).

- Flockerzi et al., 1986 V. Flockerzi, H.J. Oeken, F. Hofmann, D. Pelzer, A. Cavalie and W. Trautwein, **1986**,
Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel,
Nature, **323**, 66-68.
- Forth et al., 2001 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann and K. Starke, **2001**,
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage
Urban & Fischer Verlag, München.
- Frings et al., 1998 S. Frings, N. Brüll, C. Dzeja, A. Angele, V. Hagen, U.B. Kaupp and A. Baumann, **1998**,
Characterization of ether-à-go-go channels present in photoreceptors reveals similarity to I_{Kx} , a K^+ current in rod inner segments,
Journal of General Physiology, **111**, 583-599.
- Fromherz et al., 1991 P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter and J. Weis, **1991**,
A neuron-silicon junction: a retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor,
Science, **252**, 1290-1293.
- Fromherz et al., 1993 P. Fromherz, C.O. Müller and R. Weis, **1993**,
Neuron Transistor: electrical transfer function measured by the patch-clamp technique,
Physical Review Letters, **71**, 4079-4082.
- Fromherz and Stett, 1995 P. Fromherz and A. Stett, **1997**,
Silicon-neuron junction: capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip,
Physical Review Letters, **75**, 1670-1673.
- Fromherz, 1997 P. Fromherz, **1997**,
Self-gating of ion channels in cell adhesion,
Physical Review Letters, **78**, 4131-4134.
- Fromherz, 2002 P. Fromherz, **2002**,
Sheet conductor model of brain slices for stimulation and recording with planar electronic contacts,
European Biophysics Journal with Biophysics Letters, **31**, 228-231.
- Fung et al., 1986 C.D. Fung, P.W. Cheung, W.H. Ko, **1986**,
A generalized theory of an electrolyte-insulator semiconductor field-effect transistor,
IEEE Transactions on Electron Devices, **ED-33**, 8-18.

- Georger et al., 1992 J.H. Georger Jr., D.A. Stenger, A.S. Rudolph, J.J. Hickman, C.S. Dulcey and T.L. Fare, **1992**, *Coplanar patterns of self-assembled monolayers for selective cell adhesion and outgrowth*, Thin Solid Films, **210/211**, 716-719.
- Gerlach und Dötzel, 1997 G. Gerlach und W. Dötzel, **1997**, *Grundlagen der Mikrosystemtechnik*, Carl Hanser Verlag, München.
- Grattarola and Martinoia, 1993 M. Grattarola and S. Martinoia, **1993**, *Modeling the neuron-microtransducer junction: from extracellular to patch recording*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, **40**, 35-41.
- Gundersen, 1987 R.W. Gundersen, **1987**, *Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro*, Developmental Biology, **121**, 423-431.
- Hajji et al., 2000 B. Hajji, P. Temple-Boyer, J. Launay, T. do Conto and A. Martinez, **2000**, *pH, pK and pNa detection properties of SiO₂/Si₃N₄ ISFET chemical sensors*, Microelectronics Reliability, **40**, 783-786.
- Hamann und Vielstich, 1998 C. Hamann und W. Vielstich, **1998**, *Elektrochemie*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Hamill et al., 1981 O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sackman and F.J. Sigworth, **1981**, *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*, Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, **391**, 85-100.
- Harame et al., 1987 D.L. Harame, L.J. Bousse, J.D. Shott, J.D. Meindl, **1986**, *Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators*, IEEE Transactions on Electron Devices, **ED-34**, 1700-1707.
- Hattori et al., 1999 T. Hattori, H. Nohira and K. Takahashi, **1999**, *The initial growth steps of ultrathin gate oxides*, Microelectronic Engineering, **48**, 17-24.
- Heavner, 1996 G.A. Heavner, **1996**, *Active sequences in cell adhesion molecules: targets for therapeutic intervention*, Drug Discovery Today, **1**, 295-304.

- Heiduschka et al., 2001 P. Heiduschka, I. Roman, H. Ecken, M.J. Schöning, W. Schuhmann and S. Thanos, **2001**, *Defined adhesion and growth of neurones on artificial structured substrates*, *Electrochimica Acta*, **47**, 299-307.
- Heijo et al., 2000 M. Heijo al Rifai, M. Christophersen, S. Ottow, J. Carstensen and H. Föll, **2000**, *Potential, temperature and doping dependence for macropore formation on n-Si with backside-illumination*, *Journal of Porous Materials*, **7**, 33-36.
- Hickman et al., 1994 J.J. Hickman, S.K. Bhatia, J.N. Quong, P.S. Shoen, D.A. Stenger, C.J. Pike and C. W. Cotman, **1994**, *Rational pattern design for in vitro cellular networks using surface photochemistry*, *Journal of Vacuum Science and Technology*, **A12**, 607-616.
- Hille, 2001 B. Hille, **2001**, *Ionic channels of excitable membranes*, 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, U.S.A..
- Hodgkin and Huxley, 1952 A.L. Hodgkin and A.F. Huxley, **1952**, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, *Journal of Physiology*, **117**, 500-544.
- Huber et al., 1998 M. Huber, P. Heiduschka, S. Kienle, C. Pavlidis, J. Mack, T. Walk G. Jung and S. Thanos, **1998**, *Modification of glassy carbon surfaces with synthetic laminin-derived peptides for nerve cell attachment and neurite growth*, *Journal of Biomedical Materials Research*, **41**, 278-288.
- Ingebrandt et al., 2001 S. Ingebrandt, C.K. Yeung, M. Krause and A. Offenhäusser, **2001**, *Cardiomyocyte-transistor-hybrids for sensor application*, *Biosensors & Bioelectronics*, **16**, 565-570.
- Ingebrandt, 2001 S. Ingebrandt, **2001**, *Charakterisierung der Zell-Transistor-Kopplung*, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Jordan and Jordan, 1964 A.G. Jordan and N.A. Jordan, **1964**, *Theory of Noise in Metal Oxide Semiconductor Devices*, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 148-156.
- Kaupp and Seifert, 2002 U.B. Kaupp and R. Seifert, **2002**, *Cyclic nucleotide-gated ion channels*, *Physiological Reviews*, **82**, 769-824.

- Kleinfeld et al., 1988 D. Kleinfeld, K.H. Kahler and P.E. Hockberger, **1988**,
Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates,
Journal of Neuroscience, **8**, 4098-4120.
- Kleinig and Sitte, 1999 H. Kleinig und P. Sitte, **1999**,
Zellbiologie, 4. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krause, 2000 M. Krause, **2000**,
Untersuchungen zur Zell-Transistor-Kopplung mittels der Voltage-Clamp Technik,
Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Lambacher and Fromherz, 1996 A. Lambacher and P. Fromherz, **1996**,
Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer,
Applied Physics A, **63**, 207-216.
- Lambacher and Fromherz, 2002 A. Lambacher and P. Fromherz, **1996**,
Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes,
Journal of the Optical Society of America B, **19**, 1435-1453.
- Lang, 1996 W. Lang, **1996**,
Silicon microstructuring technology,
Materials Science and Engineering, **R17**, 1-55.
- Lau, 1995 J.H. Lau, **1995**,
FLIP CHIP Technologies,
McGraw-Hill Professional Publishing, New York.
- Lauer, 2001 L. Lauer, **2001**,
Netzwerke von Nervenzellen auf strukturierten Oberflächen charakterisiert mit optischen und elektrophysiologischen Methoden,
Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Lehmann, 1988 V. Lehmann, **2001**,
Untersuchung der Siliziumoberfläche mit elektrochemischen Methoden,
Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Liao et al., 1999 H.K. Liao, L.L. Chi, J.C. Chou, W.Y. Chung, T.P. Sun and S.K. Hsiung, **1999**,
Study on pH_{pzc} and surface potential of tin oxide gate ISFET,
Materials Chemistry and Physics, **59**, 6-11.

- Löcherer, 1992 K.H. Löcherer, **1992**,
Halbleiterbauelemente,
Teubner, Stuttgart.
- Lodish et al., 1996 H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira and
J. Darnell, **1996**,
Molekulare Zellbiologie, 2.Auflage,
Walter de Gruyter, Berlin.
- Lucovsky et al., 1997 G. Lucovsky, A. Banerjee, H. Niimi, K.Koh, B. Hinds, C. Meyer,
G. Lüpke and H. Kurz, **1997**,
*Elimination of sub-oxide transition regions at Si-SiO₂ interfaces by
rapid thermal annealing at 900°C*,
Applied Surface Science, **117/118**, 202-206.
- Marty and Neher, 1995 A. Marty and E. Neher, **1995**,
Tight-seal whole-cell recording, 31-52,
Single-channel Recording, Second Edition,
edited by B. Sakmann and E. Neher,
Plenum Press, New York.
- McWhorter, 1957 A.L. McWhorter, **1957**,
1/f noise and germanium surface properties, 207-228
Semiconductor Surface Physics
edited by R.H. Kingston,
University of Pennsylvania Press, Philadelphia.
- Mrksich et al., 1996 M. Mrksich, C.S. Chen, Y. Xia, L.E. Dike, D.E. Ingber and
G.M. Whitesides, **1996**,
*Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-
assembled monolayers of alkanethiolates on gold*,
Proceedings of the National Academy of Sciences, **93**, 10775-
10778.
- Müller, 1987 R. Müller, **1987**,
Bauelemente der Halbleiterelektronik,
Halbleiter-Elektronik, 2, 3. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin.
- Neher and Sakmann, 1976 E. Neher and B. Sakmann, **1976**,
*Single-channel currents recorded from membrane of denervated
frog muscle fibres*,
Nature, **260**, 799-802.
- Neher, 1992 E. Neher, **1992**,
*Correction for liquid junction potentials in patch clamp
experiments*,
Methods in Enzymology, **207**, 123-131.

- Neher, 1995 E. Neher, **1995**,
Voltage offsets in patch-clamp experiments, 147-153,
Single-channel Recording, Second Edition,
edited by B. Sakmann and E. Neher,
Plenum Press, New York.
- Noda et al., 1984 M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H.
Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka and N. Minamino, **1984**,
*Primary structure of electrophorus electricus sodium channel
deduced from cDNA sequence*,
Nature, **312**, 121-127.
- Noda et al., 1986 M. Noda, T. Ikeda, T. Kayano, H. Suzuki, H. Takeshima, M.
Kurasaki, H. Takahashi and S. Numa, **1986**,
Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain,
Nature, **320**, 188-192.
- Numberger und M. Numberger und A. Draguhn, **1996**,
Draguhn, 1996 *Patch-Clamp-Technik*,
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Offenhäusser et al., 1995 A. Offenhäusser, J. Rühle and W. Knoll, **1995**,
*Neuronal cells cultured on modified microelectronic device
surfaces*,
Journal of Vacuum Science Technology, **A13**, 2606-2612.
- Pancrazio et al., 1999 J.J. Pancrazio, J.P. Whelan, D.A. Borkholder, W. Ma and
D.A. Stenger, **1999**,
Development and application of cell-based biosensors,
Annals of Biomedical Engineering, **27**, 697-711.
- Parak, 1999 W.J. Parak, **1999**,
Zell-Halbleiter-Hybride,
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Pigott and Power, 1993 R. Pigott and C. Power, **1993**,
The adhesion Molecule: Factsbook,
Academic Press, San Diego.
- Ponomarev and Lévy- E.A. Ponomarev and C. Lévy-Clément, **2000**,
Clément, 2000 *Macropore formation on p-type silicon*,
Journal of Porous Materials, **7**, 51-56.
- Rauschecker and J.P. Rauschecker and R.V. Shannon, **2002**,
Shannon, 2002 *Sending sound to the brain*,
Science, **295**, 1025-1029.

- Regehr et al., 1989 W.G. Regehr, J. Pine, C.S. Cohan, M.D. Mischke and D.W. Tank, **1989**,
Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording,
Journal of Neuroscience Methods, **30**, 91-106.
- Robinson, 1968 D.A. Robinson, **1968**,
The electrical properties of metal microelectrodes,
Proceedings of the IEEE, **56**, 1065-1071.
- Ruge, 2001 C. Ruge, **2001**,
Kapazitive Feldeffektsensoren auf der Basis von makroporösen Silizium mit thermisch abgeschiedener SiO₂- und LPCVD-Si₃N₄-Transducerschicht,
Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen, Abt. Jülich.
- Sakmann and Neher, 1995-a B. Sakmann and E. Neher, **1995**,
Single-channel Recording, Second Edition, **1995**,
edited by B. Sakmann and E. Neher,
Plenum Press, New York.
- Sakmann and Neher, 1995-b B. Sakmann and E. Neher, **1995**,
Geometric parameters of pipettes and membrane patches, 637-650,
Single-channel Recording, Second Edition,
edited by B. Sakmann and E. Neher,
Plenum Press, New York.
- Schätzthauer and Fromherz, 1998 R. Schätzthauer and P. Fromherz, **1998**,
Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents,
European Journal of Neuroscience, **10**, 1956-1962.
- Schaumburg, 1991 H. Schaumburg, **1991**,
Halbleiter,
Werkstoffe und Bauelemente der Elektrotechnik, **2**,
B.G. Teubner, Stuttgart.
- Schlachetzki, 1990 A. Schlachetzki, **1990**,
Halbleiter-Elektronik: Grundlagen und moderne Entwicklung,
B.G. Teubner, Stuttgart.
- Scholl et al., 2000 M. Scholl, C. Sprössler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll and A. Offenhäusser, **2000**,
Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces,
Journal of Neuroscience Methods, **104**, 65-75.

- Schönherr et al., 2002 R. Schönherr, L.M. Mannuzzu, E.Y. Isacoff and S.H. Heinemann, **2002**, *Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the eag K⁺ channel*, *Neuron*, **35**, 935-949.
- Schöning and Poghossian, 2002 M.J. Schöning and A. Poghossian, **2002**, *Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs)*, *Analyst*, **127**, 1137-1151.
- Shockley, 1952 W. Shockley, **1952**, *A unipolar "field-effect" transistor*, *Proceedings of the I.R.E.*, **40**, 1365-1376.
- Sigworth et al., 1995-a F.J. Sigworth, H. Affolter and E. Neher, **1995**, *Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software*, *Journal of Neuroscience Methods*, **56**, 203-215.
- Sigworth, 1995-b F.J. Sigworth, **1995**, *Electronic design of the patch clamp*, 95-127, *Single-channel Recording*, Second Edition, edited by B. Sakmann and E. Neher, Plenum Press, New York.
- Smith and Collins, 1992 R.L. Smith and S.D. Collins, **1992**, *Porous silicon formation mechanisms*, *Journal of Applied Physics*, **71**, R1-R22.
- Sprössler et al., 1999 C. Sprössler, M. Denyer, S. Britland, W. Knoll and A. Offenhäusser, **1999**, *Electrical recordings from rat cardiac muscle cells using field-effect transistors*, *Physical Review E*, **60**, 2171-2176.
- Sprössler, 1997 C. Sprössler, **1997**, *Extrazelluläre Signalableitung durch ein Sensorfeld mit Feldeffekttransistoren*, Dissertation, Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Stenger et al., 1992 D.A. Stenger, J.H. Georger, C.S. Dulcey, J.J. Hickman, A.S. Rudolph, T.B. Nielsen, S.M. McCort and J.M. Calvert, **1992**, *Coplanar molecular assemblies of amino- and perfluorinated alkylsilanes: characterization and geometric definition of mammalian cell adhesion and growth*, *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 8435-8442.

- Stenger et al., 1993 D.A. Stenger, C.J. Pike, J.J. Hickman and C. Cotman, **1993**, *Surface determinants of neuronal survival and growth on self-assembled monolayers in culture*, Brain Research, **630**, 136-147.
- Steppan et al., 1982 H. Steppan, G. Buhr, H. Vollmann, **1982**, *Resisttechnik – ein Beitrag der Chemie zur Elektronik*, Angewandte Chemie, **94**, 471-485.
- Straub et al., 2001 B. Straub, E. Meyer and P. Fromherz, **2001**, *Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing*, Nature Biotechnology, **19**, 121-124.
- Sze, 1985 S.M. Sze, **1985**, *Semiconductor devices, physics and technology*, John Wiley & Sons, New York.
- Tanabe et al., 1987 T. Tanabe, H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose and S. Numa, **1987**, *Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle*, Nature, **328**, 313-318.
- Tang et al., 2000 C.-Y. Tang, F. Bezanilla and D.M. Papazian, **2000**, *Extracellular Mg^{2+} modulates slow gating transitions and the opening of *Drosophila* ether-à-go-go potassium channels*, Journal of General Physiology, **115**, 319-337.
- Tatic-Lucic et al., 1997 S. Tatic-Lucic, J.A. Wright, Y.C. Tai and J. Pine, **1997**, *Silicon cultured-neuron prosthetic devices for in vivo and in vitro studies*, Sensors and Actuators B, **43**, 105-109.
- Terlau et al., 1996 H. Terlau, J. Ludwig, R. Steffan, O. Pongs, W. Stühmer and S.H. Heinemann, **1996**, *Extracellular Mg^{2+} regulates activation of rat eag potassium channel*, Pflügers Archiv, **432**, 301-312.
- Thiébaud et al., 1997 P. Thiébaud, N.F. de Rooij, M. Koudelka-Hep and L. Stoppini, **1997**, *Microelectrode arrays for electrophysiological monitoring of hippocampal organotypic slice cultures*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, **44**, 1159-1163.
- Thiery et al., 1985 J.P. Thiery, J.L. Duband and G.C. Tucker, **1997**, *Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation*, Annual Review of Cell Biology, **1**, 91-113.

- Thies, 1991 A. Thies, **1991**,
Rechnergestützte Messungen zur Metallabscheidung,
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Tholl, 1978 H. Tholl, **1978**,
*Bauelemente der Halbleiterelektronik - Teil 2. Feldeffekt-
Transistoren, Thyristoren und Optoelektronik*,
Leitfaden der Elektrotechnik, Moeller, **Band III, Teil 2**
B.G. Teubner, Stuttgart.
- Thönissen, 1999 M. Thönissen, **1999**,
*Spektroskopische Charakterisierung von Schichten und
Schichtsystemen aus porösem Silizium im Hinblick auf optische und
optoelektronische Anwendungen*,
Berichte des Forschungszentrums Jülich, **3628**.
- Van den Berg et al.,
1985 A. van den Berg, P. Bergveld, D.N. Reinhoudt and
E.J. Sudhölter, **1985**,
Sensitivity control of ISFETs by chemical surface modification,
Sensors and Actuators, **8**, 129-148.
- Van Hal et al., 1995 R.E.G. van Hal, J.C.T. Eijkel, P. Bergveld, **1995**,
*A novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity
and double-layer capacitance as key parameters*,
Sensors and Actuators B, **24-25**, 201-205.
- Weis and Fromherz,
1997 R. Weis and P. Fromherz, **1997**,
Frequency dependent signal transfer in neuron transistors,
Physical Review E, **55**, 877-889.
- Wheeler et al., 1999 B.C. Wheeler, J.M. Corey, G.J. Brewer and D.W. Brach, **1999**,
*Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in
culture*,
Journal of Biomechanical Engineering, **121**, 73-78.
- Yates et al., 1974 D.E. Yates, S. Levine, T.W. Healy, **1974**,
*Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water
interface*,
Journal of the Chemical Society Faraday Transactions, **70**, 1807-
1818.
- Yeung et al., 2001-a C.K. Yeung, L. Lauer, A. Offenhäusser and W. Knoll, **2001**,
*Modulation of the growth and guidance of the rat brain stem
neurons using patterned extracellular matrix proteins*,
Neuroscience Letters, **301**, 147-150.

- Yeung et al., 2001-b C.K. Yeung, S. Ingebrandt, M. Krause, A. Offenhäusser and W. Knoll, **2001**,
Validation of the use of field effect transistors for extracellular signal recording in pharmacological bioassays,
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **45**, 207-214.
- Zhu et al., 1998 G. Zhu, Y. Zhang, H. Xu and C. Jiang, **1998**,
Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line,
Journal of Neuroscience Methods, **81**, 73-83.
- Zrenner, 2002 E. Zrenner, **2002**,
Will retinal implants restore vision?,
Science, **295**, 1022-1025.

Formelzeichen und Abkürzungen

Formelzeichen:

τ	Zeitkonstante
ρ	Ladungsdichte
ΔE_0	Potentialdifferenz einer Ionensorte
ΔE_K	K^+ -Gleichgewichtspotential
μ_n	Elektronenbeweglichkeit
μ_p	Löcherbeweglichkeit
$[K]_i$	K^+ -Konzentrationen innerhalb der Zelle
$[K]_o$	K^+ -Konzentrationen außerhalb der Zelle
a	Aktivität
A_{FM}	freie Membranfläche
A_{JM}	anhaftende Membranfläche, Kopplungsfläche
A_M	Membranfläche
b	geometrische Kanalbreite
c_0	Ionenkonzentration außerhalb der Zelle
C_d	Doppelschichtkapazität
C_{Fast}	Streukapazitäten der Patch-Clamp-Pipette
C_{FM}	Kapazität der freien Membran
c_{FM}	spezifische Kapazität der freien Membran
c_i	Ionenkonzentration innerhalb der Zelle
C_{JM}	Kapazität der anhaftenden Membran
c_{JM}	spezifische Kapazität der anhaftenden Membran
c_M	spezifische Membrankapazität
C_M	Kapazität der Zellmembran
c_{ox}	Kapazität des Gateoxids
C_{Si}	Kapazität des Silizium-Substrats
C_{slow}	Kapazität der Zellmembran (Pipetten-Zell-Kontakt)
C_{Streu}	Streukapazitäten
d	Abstand Zelle-Transducersystem
d_{ox}	Dicke des Gateoxids

E_i	Nernstpotential einer Ionensorte i
E_{St}	elektrisches Steuerfeld
F	Faraday-Konstante
f	Aktivitätskoeffizient
g_{Ca}	spezifische Membranleitfähigkeit für Ca^{2+}
g_i	spezifische Membranleitfähigkeit einer Ionensorte i
g_J	spezifische (Seal-) Leitfähigkeit, Abdichtleitfähigkeit
G_J	absolute Seal-Leitfähigkeit
g_K	spezifische Membranleitfähigkeit für K^+
G_L	Leckleitfähigkeit der Zelle
g_m	Gatesteilheit
g_{Na}	spezifische Membranleitfähigkeit für Na^+
I_{DS}	Drain-Source-Strom
I_{DS}^{max}	Strom im Abschnürbereich
i_L	Leckstrom
i_M	Ionenstromdichte
I_M	Membranstrom
K_A, K_B	Gleichgewichtskonstanten
k_n	Transistorkonstante für n-Halbleiter
k_p	Transistorkonstante für p-Halbleiter
L	geometrische Kanallänge
L_D	Debye-Länge
n	Ladungsträgerdichte
pH_{pzc}	pH-Wert des „Point of Zero Charge“
P_i	Permeabilitätskoeffizient einer Ionensorte i
q	Ladung der Elektronen bzw. Löcher
R	allgemeine Gaskonstante
R_{FM}	Widerstand der freien Membran
R_J	Sealwiderstand, Abdichtwiderstand
R_{JM}	Widerstand der anhaftenden Membran
R_M	Membranwiderstand
R_S	Serienwiderstand (access resistance)

Formelzeichen und Abkürzungen

r_{Zelle}	Zellradius
T	absolute Temperatur
t	Zeit
V	Spannung
V_{DS}	Drain-Source-Spannung
V_{DSP}	Abschnürspannung
V_{J}^0	Spitzenhöhe des extrazellulären Signals
V_{FB}	Flachbandspannung
V_{GS}	Gate-Source-Spannung
V_{hold}	Haltespannung
V_{J}	Gatespannung
V_{m}	Membranpotential
V_{Stufe}	Kommandopuls-Höhe
V_{Th}	Schwellwertspannung
W	Elektronenenergie
W_{C}	Energie der Leitungsbandkante
W_{F}	Fermi-Energie
W_{i}	Fermi-Energie des Eigenhalbleiters
W_{S}	Bandverbiegung
W_{V}	Energie der Valenzbandkante
X_{i}	Skalierungsfaktor
z	Wertigkeit einer Ionensorte
Z	Impedanz

Abkürzungen:

AFM	atomic force microscopy
CC-Modus	Current-Clamp-Modus
CNG	zyklisch Nukleotid-gesteuert
CV	cyclic voltammetry
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DIV	Tage in Kultur (days in vitro)
eag	ether-à-go-go
EGE	Extended-Gate-Elektrode
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIS	Elektrolyt-Isolator-Silizium
EOSFET	Elektrolyt-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor
ESEM	environmental scanning electron microscope
FET	Feldeffekttransistor
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEK	human embryonic kidney
ISFET	Ionensensitiver Feldeffekttransistor
JFET	Junction-Feldeffekttransistor
LPCVD	low pressure chemical vapour deposition
MEA	Mikroelektrodenarray
MOSFET	Metall-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor
PBS	phosphate buffered solution
PCB	printed circuit board
PECVD	plasma enhanced chemical vapour deposition
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIE	reactive ion etching
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
SMD	surface mounted devices
SR	sarcoplasmatisches Reticulum
VC-Modus	Voltage-Clamp-Modus

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt vor allem ...

... Herrn Prof. Dr. H. Emons für die Betreuung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

... Herrn Prof. Dr. H. Rehage für die freundliche Übernahme des 1. Korreferats.

... Herrn PD Dr. A. Offenhäuser für die freundliche Übernahme des 2. Korreferats, der Betreuung und Interesse an meiner Arbeit, für eine Vielzahl an Diskussionen und für die Möglichkeit als Gastwissenschaftler in Japan arbeiten zu können.

... Herrn Prof. Dr. M.J. Schöning für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut für Schichten und Grenzflächen, für viele Diskussionen, die mich nicht nur bei dieser Arbeit weiter gebracht haben und für die Möglichkeit, Teilergebnisse dieser Arbeit auf diversen Tagungen darstellen zu können.

... Dr. S. Ingebrandt für seine Hilfe, viele wertvolle Tips und für die schöne gemeinsame Zeit in Japan.

... Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Institut für Biologische Informationsverarbeitung.

... Herrn PD Dr. A. Baumann für die unersetzliche Hilfe bei der Präparation und Kultur der biologischen Zellen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

... Herrn Dr. R. Seifert für die Einführung in die Patch-Clamp-Technik und seine stete Diskussionsbereitschaft.

... Herrn Dipl.-Ing. R. Otto am Forschungszentrum Jülich und Herrn Dipl.-Ing. D. Richter am Max-Planck Institut für Polymerforschung in Mainz für Ihre ausdauernde und existentielle Unterstützung im Bereich der Meßtechnik.

... Frau Dipl.-Ing. R. Stockmann für die Hilfe bei der Fertigung der Mikroelektrodenarrays.

- ... den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Local Spatio in Japan, besonders Prof. Dr. M. Hara, für die Gastfreundlichkeit und die Einführung in den japanischen Lebensstil und Frau J. Hayashi für die Präparation der Kardiomyozyten.
- ... allen Kolleginnen und Kollegen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre.
- ... dem Ministerium für Schule und Weiterbildung, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen im Rahmen des Projektes „Elektrochemische Mikro- und Nanosysteme ELMINOS“ für die finanzielle Unterstützung.
- ... meiner lieben Freundin Anke, für die Zeit abseits der Forschung, Ihr Verständnis und Ihre beständige Unterstützung.
- ... und nicht zuletzt meinen Eltern, die meine Ausbildung ermöglicht haben und immer für mich da waren.

Lebenslauf

Holger Ecken

geboren am 27. Januar 1974 in Viersen

- 08.1980-06.1981 Grundschule in Düsseldorf
- 08.1981-06.1984 Grundschule in Viersen
- 08.1984-06.1993 Erasmus-von-Rotterdam Gymnasium Viersen
Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife
- 07.1993-06.1994 Bundeswehr
- 08.1994-09.1999 Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
Studienabschluß: Diplom-Chemiker
- 02.1997-04.1997 Student am Forschungsinstitut CIATEJ in Guadalajara (Mexiko)
- 08.1997-04.1998 Student am Department of Chemistry an der University of California in Davis (U.S.A.)
- 01.1999-09.1999 Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Universität Düsseldorf; Thema: „Galvanische Modifizierung von Mikroelektrodenarrays“
- 10.1999-09.2002 Doktorarbeit am Institut für Schichten und Grenzflächen der Forschungszentrum Jülich GmbH
- 05.2002-07.2002 Gastwissenschaftler am Institut für Physical and Chemical Research (Riken) in Wako (Tokyo, Japan)
- 12.2002 Promotion an der Universität Essen (Fachbereich Chemie)

