

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Membran- und Neurophysik

Interface zwischen 2000-Transistoren-Chip und neuronaler Zellkultur

Markus Simon Brenner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. L. van Hemmen
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 28.11.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 12.02.2001 angenommen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein neuartiger, industriell gefertigter Halbleiter-Chip zur raumzeitlichen Messung neuronaler Aktivität an dissoziierten Zellkulturen oder an kultivierten Hirnschnitten vorgestellt. Die 64×32 Sensoren basieren auf dem Messprinzip der Neuron-Silizium-Kopplung: Ein offener Feldeffekttransistor misst die extrazelluläre Spannung unter einer einzelnen Nervenzelle, verursacht durch die Ströme im Kontaktbereich der Zellmembran. Der Chip wurde in Kooperation mit der Firma Siemens entwickelt.

Für die Datenaufnahme an dem Chip wurde ein Messstand aufgebaut und ein Messprogramm entwickelt. Der Chip wurde auf seine Funktionsfähigkeit hin untersucht, dabei wurden die kritischen Punkte bei der Konzeption eines Multiplexing-Chips herausgearbeitet: Neben einem zuverlässigen Schutz vor Korrosion im Elektrolyten sind räumliche und zeitliche Homogenität der Sensorkennlinien notwendige Voraussetzungen für Multi-Site-Messungen. Die Umschalt- und Einschwingzeit beim Wechsel der aktiven Spalte entscheidet über die zeitliche Auflösung. Die Geometrie des Kontaktbereichs muss dem Neuronendurchmesser angepasst sein. Die Funktionsfähigkeit des Sensors erfordert eine hohe Qualität der Kontaktlochauffüllung. Messungen an Rattenzellen erfordern eine Minimierung des Rauschens auf deutlich unter $100 \mu\text{V}$.

Die Chips mehrerer aufeinanderfolgender Chargen wurden gemäß dieser Kriterien charakterisiert. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen verbesserte Siemens schrittweise die Schaltung und die Prozessführung. Insgesamt durchlief der Chip eine Entwicklung von sechs Chargen. Dabei war von der ersten auf die zweite Charge ein komplettes Redesign der Masken nötig, in den folgenden Schritten wurden lediglich einzelne Masken bzw. Prozessschritte variiert.

Weitere Schwachstellen konnten durch Änderung der elektrischen Beschaltung kompensiert werden. Das Auftrennen einer Leiterbahn in Kombination mit einem angepassten Schaltprotokoll verbesserte das Umschaltverhalten erheblich.

Die Funktionsfähigkeit einzelner Sensoren wurde an aufgesetzten Blutegelneuronen demonstriert. Die dabei registrierten Kopplungssignale sind vergleichbar mit Messungen an metallfreien Feldeffekttransistoren aus früheren Arbeiten.

Auf der Chipoberfläche konnten erfolgreich Schneckenzellen kultiviert werden: In dreitägigem Wachstum bildeten sich Neuriten mit mehreren hundert Mikrometer Länge aus. Die Zellen waren elektrisch aktiv, und es wurden Kopplungssignale abgeleitet.

Als Demonstrationsexperiment eines Multi-Site-Recordings wurden an einem 5×5 -Ausschnitt des Arrays simultan FET-Signale aufgezeichnet. Einer der Sensoren koppelte an ein aufgesetztes Schneckenneuron, die Transienten benachbarter Sensoren zeigten aufgrund ihrer unterschiedlichen Einsatzspannungen gegeneinander verschobene konstante Nullpunktssignale.

Vierzehntägige Kultivierung von organotypischen Hippocampus-Hirnschnitten der Ratte ließen funktionale Eigenschaften und Oberfläche des Chips unverändert. Die Größe des Messfeldes erwies sich als ideal für die Slices. An einer zwölf Tage alten Zellkultur konnten in einem ersten echten Multi-Site-Experiment an 49 Sensoren des Chips gleichzeitig monophasische Kopplungssignale abgeleitet werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Theorie	13
2.1	Neurone und Aktionspotentiale	13
2.1.1	Zellmembran	13
2.1.2	Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle	15
2.1.3	Aktionspotential	16
2.2	Neuron-Silizium-Kontakt	17
2.3	Kopplungstypen	21
3	2048 Transistor Chip	25
3.1	Konzept	25
3.2	Design	26
3.3	Herstellung	28
3.4	Chargen	31
4	Messapparatur	35
4.1	Messstand	35
4.2	Messkammer	37
4.3	Chipbeschaltung	40
4.4	Elektrophysiologie	41

4.5	Datenaufnahme und Signalverarbeitung	44
4.6	Kennlinienmessung	46
5	Charakterisierung des Chips	47
5.1	Sensorkennlinien	47
5.1.1	Definition	47
5.1.2	Kennlinienparameter	47
5.2	Kennlinienstreuung	49
5.2.1	Offset- und Steilheitenkarten	49
5.3	Drift	50
5.4	Spaltenselektion	52
5.4.1	Schaltfunktionen	52
5.4.2	Schaltmatrix	53
5.4.3	Problemumgehung	54
5.4.4	Schaltzeit	55
5.5	Kontaktbereich	57
5.5.1	Geometrie	57
5.5.2	Kontaktlochauffüllung	58
5.6	Rauschen	59
5.6.1	Anforderungen	59
5.6.2	Rauschen der Sensorausgänge	60
5.6.3	Konsequenzen für Kopplungsmessungen	61
6	Neuron Messungen	63
6.1	Aufgesetzte Blutegelneuronen	63
6.1.1	System: Hirudo medicinalis	63
6.1.2	Präparation und Versuchsdurchführung	64

6.1.3	Erste Kopplungen an ausgewählter Sensorspalte	66
6.1.4	Kopplungen an willkürlich ausgewählter Sensorposition	70
6.1.5	Vergleichbarkeit mit metallfreien FET	73
6.2	Kultur von Schneckenneuronen	75
6.2.1	System: <i>Lymnaea stagnalis</i>	75
6.2.2	Zellkultur	77
6.2.3	Wachstumsexperimente	78
6.3	Multi-Site-Recording	81
6.4	Slice Kulturen	86
7	Ausblick	91
	Anhang	93
A	Die RauschkenngroÙe V_{LFN}	93
B	Messstand	95
C	Messkammer	97
D	Zellkultur – Schnecke	100

Kapitel 1

Einleitung

Die Hirnrinde besteht aus 10 Milliarden Nervenzellen, deren Neuritenfortsätze sehr dicht miteinander verbunden sind, so dass ein engmaschiges und stark rückgekoppeltes Neuronennetz entsteht. Die Informatik versucht durch Nachahmung des Prinzips der massiven Vernetzung, neue Lösungen für komplexe Probleme wie die Mustererkennung, Segmentierung und die Realisierung lernfähiger Systeme zu finden. Die dabei verwendeten Modellneurone besitzen im Vergleich zu biologischen Nervenzellen stark vereinfachte Eigenschaften: Signalformen, Codierung, Synapsengewichtung und Plastizität sind im biologischen Netzwerk weitaus komplizierter, die Art der Vernetzung ist im organischen Gewebe wesentlich undurchsichtiger als in den definiert aufgebauten und nach Ebenen abgestuften Computernetzen. Während sich durch solche künstlichen „Neuronalen Netze“ interessante Anwendungen in der Informatik ergeben, tragen die theoretisch gewonnenen Erkenntnisse nur wenig zur Klärung biologischer Fragestellungen bei.

Um mehr über das Neuronennetz der Hirnrinde zu lernen, sind Experimente an biologischen Systemen unerlässlich. Während neurobiologische Experimente am lebenden Tier einen groben Überblick über die funktionale Aufteilung des Gehirns geben, werden zur Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen Ansätze auf drei niedrigeren Ebenen verfolgt:

Auf der Ebene des Neurons kann mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik die Aktivität einzelner Ionenkanäle in der Membran in Realzeit beobachtet werden. Auf einer weiteren Ebene erlauben spannungssensitive Farbstoffe die optische

Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit in den Neuriten. Um Experimente auf dieser zweiten Ebene – kleiner geometrischer Netzwerke – reproduzierbar zu machen, kann die Geometrie des auswachsenden Netzwerkes durch chemische Strukturierung des Substrats und das Anlegen elektrischer Felder bestimmt werden. Diese Experimente sind hervorragend für räumlich beschränkte Messungen an einzelnen oder wenigen Neuronen geeignet und haben zu einem guten Verständnis der Entstehung und Fortleitung von Aktionspotentialen geführt. Zur Beobachtung der Aktivität von komplexeren Nervennetzen in dichten Zellkulturen eignen sie sich aber nicht: Aufgrund des Platzbedarfs können nur wenige Patch-Pipetten gleichzeitig verwendet werden, die Zahl der Messstellen für eine simultane Messung im Netzwerk ist daher stark begrenzt. Spannungssensitive Farbstoffe sind meist toxisch, Langzeitbeobachtungen an Zellkulturen sind daher problematisch.

In dieser Arbeit wird ein neuartiger Chip mit 2048 Kontaktstellen zur gleichzeitigen Messung neuronaler Aktivität vorgestellt. Die Zahl der Sensoren ist um ein Vielfaches höher als bei den bislang in der Literatur bekannten größten Multi-Site-Arrays, den Metallelektroden-Arrays (MEA) mit bis zu 60 Messpunkten [8]. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass das Prinzip der Neuron-Silizium-Kopplung [9] – ein offener Feldeffekttransistor detektiert extrazellulär den Strom durch die Membran des aufliegenden Neurons – mit moderner CMOS-Halbleitertechnologie kombiniert wird. Da Feldeffekttransistoren Standardbauteile im industriellen Chipdesign sind, konnte der Neuro-FET nahtlos in eine individuelle Verstärkerzelle, und diese wiederum in eine Auswahllogik integriert werden. Die SiO_2 -Glasoberfläche solcher Chips stellt eine geeignete Grundlage für Zellkulturen dar.

Folgende Einsatzgebiete des Chips sind vorgesehen:

Dissoziierte Zellkultur: Durch die Kultivierung einer hohen Dichte von embryonalen Neuronen auf der homogenen Chipoberfläche können die aus dem Zellverband herausgelösten Neuronen erneut zu einem ungeordneten Netzwerk zusammenwachsen. Man kommt so zu einem flächenhaft ausgedehnten Modellsystem, bei dem zu erwarten ist, dass sich Signale in ähnlicher Form ausbreiten werden wie im Organismus [27], [28]. Die hohe Zahl der kultivierten Zellen kombiniert mit der großen Sensordichte auf dem Chip stellt eine Art

„Schrotschussexperiment“ dar, in dem es eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Zustandekommen mehrerer Neuron-Sensor-Kopplungen über die Flächenausdehnung des Chips hinweg gibt.

Organotypische Kultivierung von Slices: Hippocampus-Schnitte der Ratte können in zweiwöchiger Kultur auf einer Glasoberfläche anwachsen. Dabei bleibt die Struktur der Hirnregion im Wesentlichen erhalten. Daher ist zu erwarten, dass die beobachtete Signalausbreitung derjenigen im lebenden Organismus vergleichbar ist. Im Allgemeinen wird der Kopplungsbereich eines FET-Sensors nicht vollständig von einem einzigen Neuron abgedeckt. Anstelle von Einzelsignalen beobachtet man daher eine Superposition der Zellaktivität vieler benachbarter Neurone. Andererseits ist man damit nicht von einer hundertprozentigen Abdeckung des Sensors durch die Einzelzelle abhängig. Durch die gleichzeitige Signalaufnahme eines Rechtecks von Sensoren können raum-zeitliche Aktivitätsmuster mit der vollen Auflösung des Sensorrasters aufgezeichnet werden.

Die vorliegende Arbeit ist in fünf Unterbereiche gegliedert:

Kapitel 2 behandelt die zum Verständnis der Arbeit nötigen theoretischen Grundlagen. Ausgehend von der Ionen- und Ladungsverteilung an der Zellmembran wird die Rolle der spezifischen, spannungsabhängigen Ionenkanäle an der Entstehung und Form des Aktionspotentials dargestellt. Anhand des Punktkontakt-Modells zur Beschreibung der Neuron-Silizium-Kopplung werden die auftretenden Kopplungstypen abgeleitet und kategorisiert.

Kapitel 3 vermittelt das Konzept des 2048-Sensor-Chips: Der funktionale und modulare Aufbau wird vorgestellt und die Herstellung in moderner CMOS-Technologie skizziert. Vor diesem Hintergrund werden die bei der Prozessierung und Weiterentwicklung aufgetretenen Probleme anhand der sechs aufeinanderfolgenden Chargen erläutert.

Kapitel 4 beschreibt die individuell aufgebaute und zusammengestellte Messapparatur. Es wird der Einbau der vereinzelt Chips in Messkammern gezeigt und ihre elektrische Beschaltung beschrieben. Bei der Beschreibung der benötigten Messgeräte wird auch auf die Problematik bei der Datenaufnahme und Verarbeitung des Multiplexings eingegangen.

In **Kapitel 5** erfolgt eine Charakterisierung der vorliegenden Chips nach ihren funktionalen Eigenschaften: Anhand der 2048 Sensorkennlinien werden Homogenität und Drift der Sensorzellen analysiert. In weiteren Unterabschnitten werden Schaltverhalten, Geometrie und technische Ausführung des Kontaktbereichs sowie das Rauschen anhand geeigneter Kriterien untersucht.

Kapitel 6 zeigt experimentelle Resultate bei der Erprobung des Chips an verschiedenen Systemen. An willkürlich aufgesetzten Blutegelneuronen wird die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Chip-Sensoren demonstriert: Kopplungssignale konnten in beliebigen Spalten und Zeilen des Arrays abgeleitet werden. Das erneute Auswachsen von extrahierten Schneckenzellen beweist die Zellkulturtauglichkeit: die Neurone waren nach drei Tagen Kultur elektrisch aktiv und zeigten Kopplungssignale. In einem Demonstrationsexperiment für Multi-Site-Messungen an dissoziierten Zellkulturen wurden die Signale von 25 Sensoren simultan aufgezeichnet. Der Chip erwies sich als resistent gegen zweiwöchige Kultur von Hippocampus-Hirnschnitten der Ratte. In einem ersten echten Multi-Site-Experiment konnten gleichzeitig an 49 Positionen des Arrays Kopplungssignale zwischen Slice und Chip abgeleitet werden.

Kapitel 2

Theorie

2.1 Neurone und Aktionspotentiale

Die Informationsverarbeitung im Gehirn erfolgt über den Austausch von elektrischen Signalen zwischen Neuronen. Aktionspotentiale entstehen an der Zellmembran durch Umladeprozesse von Ionen, gesteuert durch das spannungsabhängige Verhalten der in die Membran eingelagerten Ionenkanäle und angetrieben durch die Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Ionensorten zwischen Membraninnen- und außenseite. Ihre Form ist charakteristisch für den Typ des Neurons: Aufeinanderfolgende Aktionspotentiale besitzen dieselbe Amplitude und Länge. Information ist also nicht durch die Form der Signale, sondern durch Frequenz oder Anzahl der in „Spike-Trains“ wiederholten Aktionspotentiale kodiert.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Messungen an Einzelneuronen durchgeführt; im Vordergrund steht das einzelne Aktionspotential am Zellsoma. Deshalb wird vorwiegend auf die zum Verständnis der Neuron-Silizium-Kopplung nötigen Grundlagen eingegangen.

2.1.1 Zellmembran

Die Zellmembran besteht aus einer wenige Nanometer dicken Doppelschicht aus Lipidmolekülen. Sie trennt das Zellinnere vom Außenraum ab, und bil-

det aufgrund des amphiphilen Aufbaus eine hochwirksame Barriere gegen den Durchtritt von Ionen (Bild 2.1).

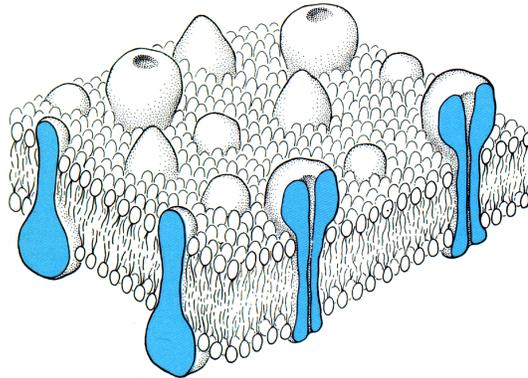


Bild 2.1: Im Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran sind amphiphile Lipidmoleküle zu einer flexiblen Doppelschicht angeordnet, in der Membranproteine lateral ungehindert diffundieren können. Einzelne Proteine können durch ihre strukturelle Untergliederung in hydrophile und lipophile Teile die Membran überbrücken, und bilden selektive Ionenkanäle oder -pumpen [18].

In die Zellmembran sind Membranproteine eingelagert, die für die elektrischen Eigenschaften der Nervenzelle verantwortlich sind:

Ionenpumpen sorgen für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten über die Zellmembran hinweg: Die Kaliumkonzentration in der Zelle ist gegenüber dem Außenraum erhöht, die Natriumkonzentration verringert.

Spezifische Ionenkanäle sind für jeweils eine Ionensorte i durchlässig. Durch Konformationsänderungen infolge äußerer Einflüsse können sie ihre Leitfähigkeit verändern. Für die Signalübertragung an Synapsen sind besonders die transmittergesteuerten Rezeptoren wichtig, für die Entstehung des Aktionspotentials betrachten wir im folgenden spannungsabhängige Kanäle.

Aufgrund des Konzentrationsunterschiedes zwischen Zellinnen- und Außenraum fließt ein Diffusions-Ionenstrom durch die geöffneten Ionenporen. Dieser Ladungsträgerfluss über die Membran baut gleichzeitig eine Spannung an dem Membrankondensator c_M auf, die dem Diffusionsstrom entgegenwirkt. Bei konstanter Leitfähigkeit führt dies zu einem dynamischen Gleichgewicht zwischen

Diffusions- und Driftstrom (Nernst-Planck-Gleichung). Das Umkehrpotential E_i bezeichnet die Gleichgewichtsspannung für den Fall, dass nur eine Ionensorte i vorliegt, G_i die Gesamtleitfähigkeit der Kanäle i (Bild 2.2).

Im Allgemeinfall tragen verschiedene Ionensorten und -kanäle zur Änderung des Membranpotentials V_M in der Zelle bei. Neben dem ionischen Stromfluss durch die Kanäle müssen im elektrischen Ersatzschaltbild auch die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran durch Parallelschaltung eines Kondensators berücksichtigt werden.

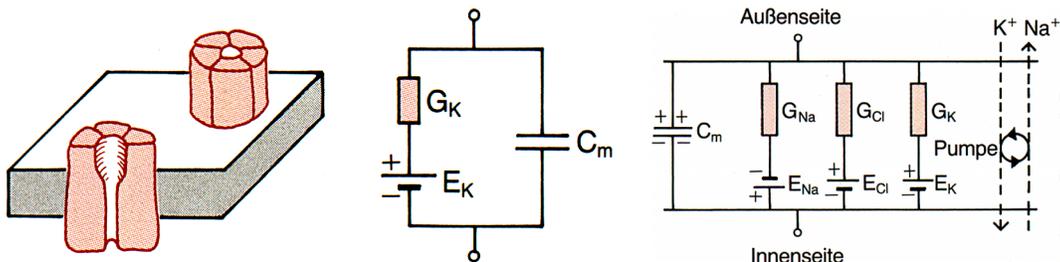


Bild 2.2: Links und Mitte: Das elektrische Ersatzschaltbild der Kaliumkanäle ist eine zur Membrankapazität parallel liegende Serienschaltung aus Kanalleitfähigkeit und Nernstpotential. **Rechts:** Das Modell lässt sich für zusätzliche Kanaltypen einfach erweitern. Zur Beschreibung der aktiven Membraneigenschaften muss das spannungsabhängige Verhalten der Leitfähigkeiten G_i berücksichtigt werden [19].

2.1.2 Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle

Die Leitfähigkeit der Na^+ - und K^+ -Kanäle und damit der Stromfluss durch die Zellmembran ist spannungsabhängig. Hodgkin und Huxley untersuchten durch Voltage-Clamp-Experimente am Tintenfisch erstmals den quantitativen Verlauf der Ionenströme infolge eines Spannungssprungs an der Zellmembran. Sie formulierten daraus ein Modell zur vollständigen Beschreibung der Ionenkanalleitfähigkeit [12].

Na^+ -Kanäle besitzen vereinfacht drei Zustände: ruhend, aktiviert und inaktiviert [16]. Wird die Zellmembran depolarisiert, geht der Kanal vom ruhenden (geschlossenen) in den aktivierten Zustand über und wird dadurch leitfähig. Bleibt die Depolarisation bestehen, wechselt der Kanal in den inaktivierten geschlossenen Zustand. Dieser bleibt bis zu einer Repolarisierung der Membran

erhalten; erst dann kann der Kanal wieder in den aktivierbaren Ausgangszustand übergehen.

K^+ -Kanäle besitzen dagegen nur zwei Zustände: Auf eine Depolarisation hin wechseln sie ebenfalls in einen aktivierten Zustand, öffnen jedoch langsamer als Na^+ -Kanäle. Dagegen existiert für sie kein inaktivierter Zustand, sie bleiben auch bei länger anhaltender Depolarisierung geöffnet.

Das unterschiedliche Verhalten von Na^+ - und K^+ -Kanälen wird detailliert durch ein Modell mit vier funktionalen Untereinheiten, oder Klappen, für jeden Kanaltypen beschrieben: Ein Kanal ist dann leitfähig, wenn alle vier Klappen gleichzeitig offen sind. Das Öffnen und Schließen der Einzelklappe gehorcht einer Ratengleichung, die Spannungsabhängigkeit vom Membranpotential steckt dabei in den Ratenkonstanten.

Ein Na^+ -Kanal besitzt demnach drei gleiche Klappen, die mit zunehmender Membranspannung öffnen und eine vierte Klappe, das Inaktivierungstor, mit entgegengesetztem Verhalten. Die Inaktivierung erklärt sich durch ein verzögertes Schließen dieser vierten Klappe auf dem Höhepunkt des Aktionspotentials.

K^+ -Kanäle besitzen dagegen vier identische Klappen, deren Öffnungskinetik durch eine flachere Gatingkurve der Ratenkonstanten langsamer ist als die der öffnenden Na^+ -Teilchen. Eine Inaktivierungsklappe existiert für sie nicht.

Die Gesamtzahl der für den Ionentransport offenen Kanäle gehorcht folglich einer Statistik, abhängig von der Membranspannung und deren zeitlichen Änderung. Die Gesamtleitfähigkeit für die Na^+ - bzw. K^+ -Ströme bestimmt sich aus der Anzahl der jeweils offenen Kanäle einer Kanalsorte und der Leitfähigkeit des geöffneten Einzelkanals.

2.1.3 Aktionspotential

Im Ruhezustand dominiert die Leitfähigkeit der K^+ -Kanäle, das Membranpotential befindet sich daher nahe dem negativen Nernst-Potential der K^+ -Kanäle. Findet nun eine Depolarisation der Membran statt, so reagieren viele der Na^+ -Kanäle auf die Spannungsänderung durch ein schnelles Öffnen. Das einströmende Na^+ erhöht zusätzlich das Membranpotential. Durch diese

Selbstverstärkung der Depolarisation werden weitere Na^+ -Kanäle aufgerissen. Es bildet sich ein Aktionspotential aus, das über das Nullpotential hinauschießen kann (Bild 2.3).

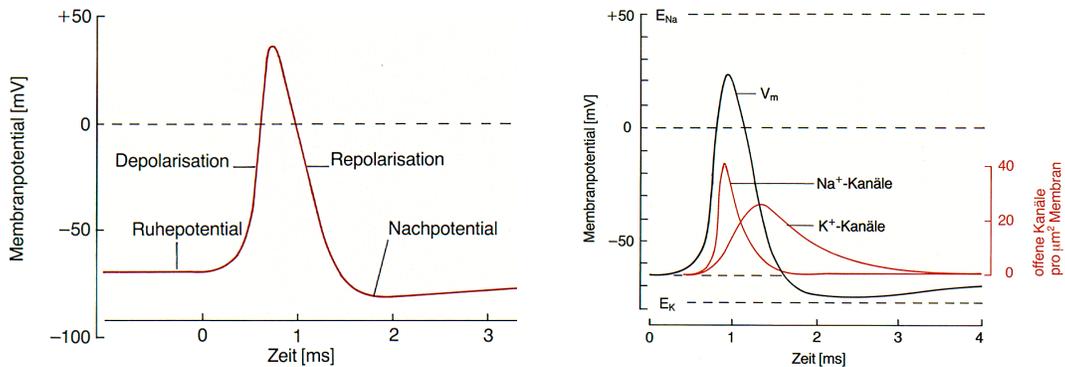


Bild 2.3: Links: Verlauf eines Aktionspotentials. **Rechts:** Beitrag der Ionenströme. In der ersten Phase des Aktionspotentials dominiert der einwärts gerichtete Natrium-Strom und depolarisiert dadurch die Membran, zeitverzögert bewirkt der Kaliumstrom die Repolarisation [19].

Die Dauer des Aktionspotentials wird auf zwei Weisen begrenzt: Mit anhaltender Depolarisation tritt der Inaktivierungsmechanismus der Na^+ -Kanäle in Kraft, die Na^+ -Leitfähigkeit sinkt damit wieder ab. Zeitverzögert öffnen nun aber aufgrund der Spannungsänderung auch die K^+ -Kanäle, und es kommt zu einem verstärkten Ausstrom von K^+ -Ionen aus der Zelle. Das Membranpotential sinkt in der Repolarisation wieder ab, meist folgt darauf sogar eine kurze Hyperpolarisation durch die erst langsam wieder schließenden K^+ -Kanäle.

In der nun folgenden Refraktärzeit relaxieren die Kanalleitfähigkeiten in ihren Ausgangszustand. Währenddessen ist das Neuron nicht oder nur mit erhöhter Depolarisierung zu einem weiteren Aktionspotential erregbar.

2.2 Neuron-Silizium-Kontakt

Die elektrische Aktivität eines Neurons kann extern von einem offenen Feldeffekttransistor unter der Zelle aufgezeichnet werden. Voraussetzung dafür ist, dass das 10–100 μm große Neuron auf der Chipoberfläche haftet und dadurch

ein Elektrolytkompartiment vom umgebenden Badpotential elektrisch isoliert. Abhängig vom Zelltyp und der Oberflächenbeschichtung bildet sich beim Neuron-Silizium-Kontakt ein 10–100 nm hoher Spalt zwischen Zellmembran und Siliziumdioxid. Elektrisch ist dies ein zweidimensionaler Kern-Mantel-Leiter; aufgrund des Stroms von der Zelle ins umgebende Bad bildet sich ein Spannungsprofil gemäß der Kabelgleichung aus [33].

Da das Gate des Transistor-Sensors eine Äquipotentialfläche darstellt, genügt es, den Kontaktbereich zwischen Zellmembran und Silizium als punktförmig zu betrachten, um zu einer Beziehung zwischen intrazellulärem Membranpotential und extrazellulär detektierter Spannung zu gelangen. Die folgende Darstellung des Punktkontakt-Modells folgt [10].

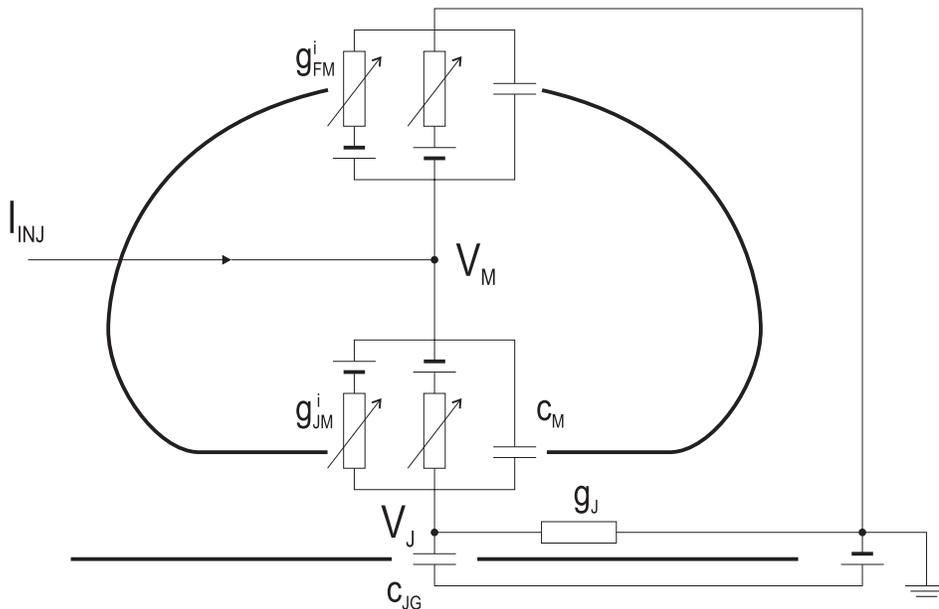


Bild 2.4: Punktkontakt-Modell der Neuron-Silizium-Kopplung. Zwischen freier Membran und Kontaktmembran wird unterschieden, indem den Ionenkanälen in beiden Bereichen der Zelloberfläche verschiedene Leitfähigkeiten zugeordnet werden [10].

Bild 2.4 zeigt das elektrische Ersatzschaltbild für den Kontaktbereich: Die Ionenkanäle in der freien Membran A_{FM} und der Kopplungsmembran A_{JM} werden durch die spezifischen Leitfähigkeiten g_{FM}^i und g_{JM}^i getrennt charakterisiert. Die spezifische Membrankapazität c_M ist über die ganze Membran

konstant. Die Abdichtqualität des Kopplungsbereichs unter der Membran gegen das Bad wird beschrieben durch die spezifische Leitfähigkeit $g_J = G_J/A_{JM}$ (Gesamtleitfähigkeit dividiert durch Kopplungsfläche). Die spezifische Kapazität der Gateelektrode ist c_{JG} .

Das Verhältnis zwischen intrazellulärem Membranpotential V_M und extrazellulärem Potential V_J über dem Transistor wird durch die Bilanzen der Ströme in das Neuron, vom Neuron in die Junction und von der Junction ins Bad bzw. in den Chip bestimmt.

Die Aktivität V_M der Zelle kann experimentell mittels einer Mikropipette aufgezeichnet und gleichzeitig durch einen Injektionsstrom I_{INJ} kontrolliert werden. V_J wird vom Transistor aufgezeichnet.

Die mathematische Beschreibung des Punktkontaktmodells ergibt sich aus der Anwendung der Kirchhoffschen Regel auf die Stromknoten V_J und V_M :

$$g_J V_J = \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_0^i - V_J) + c_M \frac{dV_M}{dt} - (c_{JG} + c_M) \frac{dV_J}{dt}. \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{I_{INJ}}{A_{FM}} &= \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_0^i) + c_M \frac{dV_M}{dt} + \\ &+ \frac{A_{JM}}{A_{FM}} \left(\sum_i g_{JM}^i (V_M - V_0^i - V_J) + c_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} \right). \end{aligned} \quad (2)$$

Um zu einer vereinfachten Darstellung des Differentialgleichungssystems zu gelangen, werden folgende drei Näherungen eingeführt [10]:

Schnelle Relaxation des Kopplungssignals

Der kapazitive Strom im Kopplungszweig ist klein, es gilt:

$(c_{JG} + c_M)dV_J/dt \ll g_J V_J$. Dies bedeutet eine schnelle Relaxation des Kopplungssignales gegenüber der Zelldynamik. Die Annahme ist zulässig für Signale im Millisekundenbereich mit $c_{JG} + c_M \approx 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $g_J \approx 1000 \text{ mS}/\text{cm}^2$ [28].

Schwache Kopplungssignale

Die Leitfähigkeit der aufliegenden Membran im Kopplungsbereich ist klein mit $\sum g_{JM}^i \ll g_J$. Damit fällt auch im Kopplungsbereich der Großteil der Spannung

über die Membran ab, und es gilt: $V_M - V_J \approx V_M$, oder $V_J \ll V_M$ (schwache Kopplung). Bei einer schwachen Kopplung ändern sich die Ionenkonzentrationen im Kopplungsbereich gegen das Bad nicht. Damit sind auch die Umkehrpotentiale V_0^i der Kopplungsmembran gegenüber der freien Membran unverändert.

Kleiner Kopplungsbereich

Der tatsächliche Kopplungsbereich unter der aufliegenden Membran ist klein: $A_{JM}/A_{FM} = \beta \ll 1$.

Mit den aufgeführten Näherungen ergeben sich folgende vereinfachte Gleichungen:

$$g_J V_J = \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_0^i) + c_M \frac{dV_M}{dt}. \quad (3)$$

$$\frac{I_{INJ}}{A_{FM}} = \sum_i (g_{FM}^i + \beta g_{JM}^i) (V_M - V_0^i) + c_M \frac{dV_M}{dt}. \quad (4)$$

Gleichung (3) beschreibt den Strom durch den Kopplungsbereich als Summe der ionischen Ströme durch die Kanäle im Kopplungsbereich und des kapazitiven Stroms über die Kopplungsmembran. Aufgrund der Spannungsabhängigkeit der beteiligten Ionenkanäle ist der Zusammenhang zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Spannung nichtlinear.

Die Dynamik des Membranpotentials $V_M(t)$ (*Gleichung (4)*) entsteht durch die Ionenströme der freien Membran. Sie kann über den Injektionsstrom kontrolliert werden. Die Kopplungsmembran spielt bei kleiner Fläche $\beta \ll 1$ nur dann eine Rolle, wenn sie extreme lokale Leitfähigkeiten $g_{JM}^i \gg g_{FM}^i$ aufweist.

Bei Abwesenheit oder Anliegen eines konstanten Injektionsstroms I_{INJ} (current clamp) erzeugt die freie Membran nach (4) das Signal V_M , das in der Kopplung als V_J beobachtet wird. Zusammenfassen von (3) und (4) durch Substitution des Ladestroms und $\beta \ll 1$ liefert

$$g_J V_J = \sum_i (g_{JM}^i - g_{FM}^i) (V_M - V_0^i) + \frac{I_{INJ}}{A_{FM}}. \quad (5)$$

Der kapazitive Strom in *Gleichung (3)* tritt nicht mehr explizit auf. $V_J(t)$ ist neben dem Injektionsstrom eine reine Superposition aus den ionischen Strömen. Die Kopplungsantwort ist abhängig von den Unterschieden der ionischen Leitfähigkeiten $g_{JM}^i - g_{FM}^i$ zwischen koppelnder und freier Membran.

Eine Differenz in den Ionenkanalleitfähigkeiten zwischen freier und aufliegender Membran ist also Voraussetzung für die Messung eines Kopplungssignals. Solche Unterschiede können etwa durch geänderte Moleküleigenschaften der Ionenkanäle, unterschiedliche Aktivierung und durch Ansammlung oder Verarmung von Ionenkanälen entstehen. Die Ursache dieser Leitfähigkeitsdifferenz bestimmt dabei die Form des Kopplungssignals.

2.3 Kopplungstypen

Lineare Kopplung

Im Fall der linearen Kopplung sind die Ionenkanäle in der Kopplungsmembran im Gegensatz zur freien Membran inaktiv, d. h. sie zeigen kein spannungsabhängiges Gating. Nach dem Thévenin'schen Theorem [13] können in diesem Fall die verschiedenen Ionenkanalleitfähigkeiten und Umkehrpotentiale in der Membran zu einer einzigen ohmschen Leitfähigkeit g_{JM} in Serie mit einer Spannungsquelle V_0 zusammengefasst werden. Bei Abwesenheit eines Injektionsstroms und mäßig großer Leitfähigkeit g_{JM} ergeben sich aus (3) und (4):

$$g_J V_J = g_{JM}(V_M - V_0) + c_M \frac{dV_M}{dt}. \quad (6)$$

$$c_M \frac{dV_M}{dt} = - \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_0^i). \quad (7)$$

Die freie Membran erzeugt nach (7) ein Aktionspotential $V_M(t)$, das gemäß (6) als Kopplungssignal V_J gemessen wird.

Für den Grenzfall sehr kleiner Leitfähigkeiten g_{JM} in der Kopplungsmembran ergibt sich eine rein kapazitive Antwort. V_J folgt dann der ersten Ableitung des Signals. Dieser Kopplungstyp wird in Experimenten als **A-Typ** bezeichnet [14].

Im zweiten Grenzfall ist der kapazitive Strom klein gegen den ohmschen Strom, etwa infolge eines Lochs in der Kopplungsmembran: $c_M dV_M/dt \ll g_{JM}(V_M - V_0)$. Die Folge ist eine schnelle Relaxation der Kopplung. Nach (6) ist das Kopplungssignal $V_J(t)$ dann proportional zu $V_M(t)$. Dies entspricht dem experimentell auftretenden **B-Typ**.

Skaliert nichtlineare Kopplung

Dieser Fall behandelt eine gleichzeitige Anhäufung oder Verarmung aller auftretenden Ionenkanalarten im Kopplungsbereich der Membran. Dann sind die Leitfähigkeiten der freien und der koppelnden Membran über einen einzigen Skalierungsfaktor verknüpft: Mit $g_{JM}^i = \mu_J g_{FM}^i$ lassen sich alle Ionenströme aus (3) und (4) eliminieren. Ohne Injektionsstrom ergibt sich:

$$V_J = \left(1 - \frac{\mu_J}{1 + \beta\mu_J}\right) \frac{C_M}{g_J} \frac{dV_M}{dt} \quad (8)$$

Trotz der Anwesenheit von aktiven Ionenkanälen, die die Leitfähigkeit der Kopplungsmembran spannungsabhängig verändern, ergibt sich wiederum ein linearer Zusammenhang zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Spannung. Der Grund dafür ist, dass sich die Ionenkanäle in der freien und in der Kopplungsmembran identisch verhalten; die Stromflüsse durch die freie und die Kopplungsmembran unterscheiden sich daher nur durch den Skalierungsfaktor der Anhäufung bzw. Verarmung.

Bei vollständiger Blockierung der Ionenkanäle in der Membran ist $\mu_J = 0$ und man beobachtet kapazitive Kopplung. Auch teilweise Verarmung $\mu_J < 1$ führt zu einer kapazitiven Antwort, allerdings mit verkleinerter Amplitude.

Durch Anhäufung der Ionenkanäle in der Kopplung $\mu_J > 1$ ergibt sich ebenfalls kapazitive Kopplung, jedoch mit invertiertem Vorzeichen. Dies stellt einen dritten Signaltyp dar, den **C-Typ**.

Selektive nichtlineare Kopplung

Falls die Anhäufung bzw. Verarmung der Kanäle in der Kopplungsmembran für jede Ionenkanalart verschieden ist, erhält man eine ganze Fülle neuer

möglicher Kopplungssignale. Die Beschreibung erfolgt dann durch individuelle Skalierungsfaktoren: $g_{JM}^i = \mu_J^i g_{FM}^i$. Einsetzen in (5) ergibt mit $I_{INJ} = 0$

$$V_J = \frac{1}{g_J} \sum_i (\mu_J^i - 1) g_{FM}^i (V_M - V_0^i). \quad (9)$$

Das Kopplungssignal resultiert aus der Superposition der Ionenströme in der freien Membran, jeweils gewichtet mit den Faktoren μ_J^i . Entsprechend dem Verlauf der Na^+ - und K^+ -Ströme (*Bild 2.3*) sind dies im Wesentlichen zwei zeitversetzt auftretende Hügel, deren Vorzeichen von den Faktoren μ_J^{Na} und μ_J^{K} abhängen.

Wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, dominiert in der ersten Phase der in die Zelle einwärts gerichtete Na^+ -Strom (*Bild 2.3*): $g_{FM}^{\text{Na}} \gg g_{FM}^{\text{K}} \approx 0$. Wegen $V_M < V_0^{\text{Na}}$ ergibt sich für Verarmung $\mu_J^{\text{Na}} < 1$ ein positives, für Anreicherung $\mu_J^{\text{Na}} > 1$ ein negatives Kopplungssignal. Der Natrium-Einstrom ist auf nur kurze Zeit begrenzt, im Kopplungssignal resultiert daher ein kurzer, starker Peak zu Beginn des Aktionspotentials.

Im weiteren Verlauf des Aktionspotentials werden auch die Kalium-Kanäle geöffnet, es kommt zum verstärkten K^+ -Ausstrom. Aufgrund $V_M > V_0^{\text{K}}$ sind alle Vorzeichen gegenüber dem Natrium-Fall invertiert, Verarmung führt daher zu einem negativen, Anreicherung zu einem positiven Beitrag im Kopplungssignal. Der Hügel des Kalium-Ausstroms ist gegenüber dem Natrium-Hügel zeitversetzt und besitzt sein Maximum während der Repolarisation. Außerdem ist er deutlich breiter, daher ist sein Anteil am Kopplungssignal vor dem Hintergrund des Rauschens schwieriger zu detektieren, meist erst nach Mittelung mehrerer Signaldurchläufe.

Aufgrund unterschiedlicher Anhäufung oder Verarmung μ_J^i der Na^+ - und K^+ -Kanäle sowie durch unterschiedliche Aktivierung der Spannungsabhängigkeit können nahezu beliebige Kopplungssignale $V_J(t)$ entstehen. Vergleiche der gefundenen Signale mit den Strömverläufen beim von der Mikroelektrode aufgenommenen Aktionspotential sowie Simulationen des Hodgkin-Huxley-Modells geben Rückschlüsse auf die im Einzelfall vorliegenden Mechanismen (*Bild 2.5*).

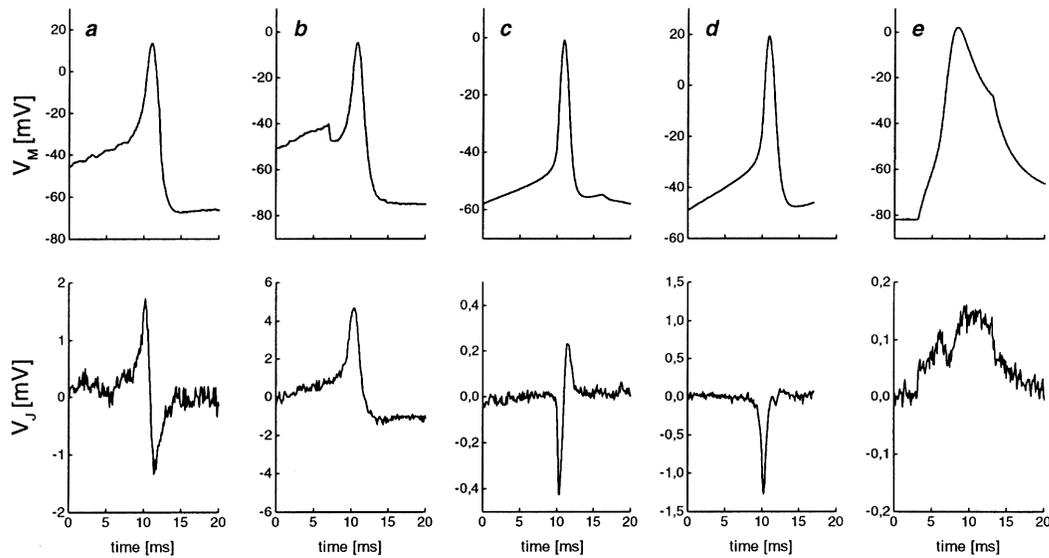


Bild 2.5: Verschiedene experimentell beobachtete Kopplungstypen. **Obere Reihe:** Mikroelektrodensignale des intrazellulären Membranpotentials. **Untere Reihe:** Extrazellulär vom Transistor aufgezeichnete Kopplungssignale. **a:** Kapazitive Kopplung aufgrund einer geringen ohmschen Leitfähigkeit in der Kopplung (Soma eines Blutegelneurons). **b:** Monophasisches Kopplungssignal als Folge einer hohen, spannungsunabhängigen Leitfähigkeit (Soma eines Blutegelneurons). **c:** Anti-kapazitive Kopplung durch Anhäufung von Na^+ - und K^+ -Kanälen in der Kopplungsmembran (Axonstumpf eines Blutegelneurons). **d:** Frühe negative Spannungsantwort als Folge einer Anhäufung von Na^+ -Ionen in der Kopplung (Axonstumpf eines Blutegelneurons). **e:** Früher kapazitiver Peak, gefolgt von einem zweiten, breiteren Hügel. Erklärung: Verarmung von Na^+ -Kanälen und Anhäufung von K^+ -Kanälen (Rattenneuron) [10].

Kapitel 3

2048 Transistor Chip

3.1 Konzept

Mit dem Konzept des 2048-Transistor-Chips sollten zwei Schritte auf dem Weg zu einem massiv parallel auslesbaren Neurochip realisiert werden:

- 2048 offene Feldeffekt-Transistoren zur Detektion neuronaler Aktivität werden in einem Array aus 64 Spalten und 32 Zeilen angeordnet. Die Zeit zum Auslesen aller Signale soll weniger als eine Millisekunde betragen. (**schnelles Multiplexing**).
- Die Chips werden in **industrieller Chipproduktion** gefertigt. Die Anpassung des Neuro-Transistor-Messprinzips an die Designstandards und Fertigungsmethoden moderner CMOS-Architektur ermöglicht die benötigte Komplexität und Hochintegration der Schaltung.

Die Umsetzung des Konzepts in ein konkretes Chiplayout ergab folgenden Aufbau (*Bild 3.1*):

- Beim verwendeten Standard-CMOS-Prozess liegt das Polysiliziumgate unter Passivierungs- und Leiterbahnebenen im Chip verborgen. Es wird mit Hilfe von Wolframnägeln an die Oberfläche geführt. Diese Metallnägeln liegen blank im Elektrolyten. Ein Neuron kann die Spannung im Elektrolytspalt zwischen Zelle und Wolframnagel verändern.

- In jeder Sensorzelle ist der eigentliche Neuro-Transistor in eine lokale Operationsverstärkerschaltung eingebettet. Der zweite Verstärkereingang jeder Sensorzelle dient dem Offsetabgleich aller 2048 Sensorkennlinien gleichzeitig.
- Die Spaltenadressierung wird über eine binär codierte 1-aus-64-Auswahllogik realisiert: Nur die 32 Sensorenzellen der aktiven Spalte sind elektrisch eingeschaltet und an die Ausgangsleitungen angekoppelt.
- Die 32 Ausgangsleitungen werden durch externes Multiplexing sequentiell ausgelesen.

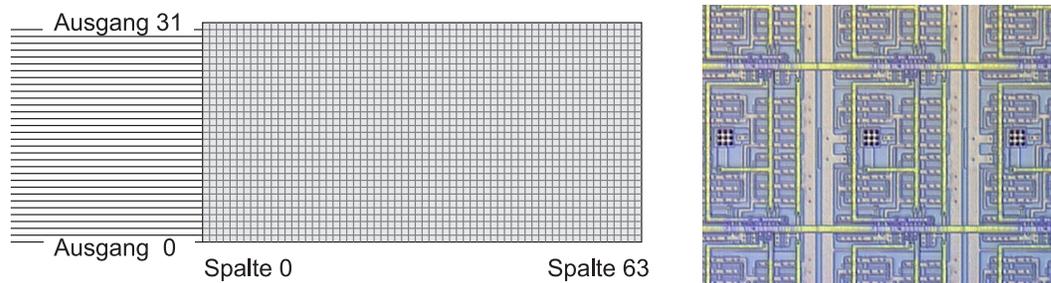


Bild 3.1: Aufbau des 64×32 -Arrays. **Links:** Aufteilung in Spalten und Zeilen. Die Spaltenauswahl findet über eine 1-aus-64-Selektionslogik statt. **Rechts:** Ausschnitt aus dem Sensorfeld

3.2 Design

Kontaktbereich

Die Einbindung in das CMOS-Design machte es erforderlich, den Neuro-Transistor unter mehreren Oxid- und Leiterbahnebenen im Chip zu vergraben. Den Kontaktbereich zum Neuron bilden Wolframnägel, die das Gate an die Oberfläche führen (*Bild 3.2*). Damit unterscheidet sich das System wesentlich von den bisher in der Arbeitsgruppe Fromherz verwendeten Transistoren. Bei diesen liegt das Neuron unmittelbar auf dem metallfreien Gateoxid eines Feldeffekttransistors [30], [26].

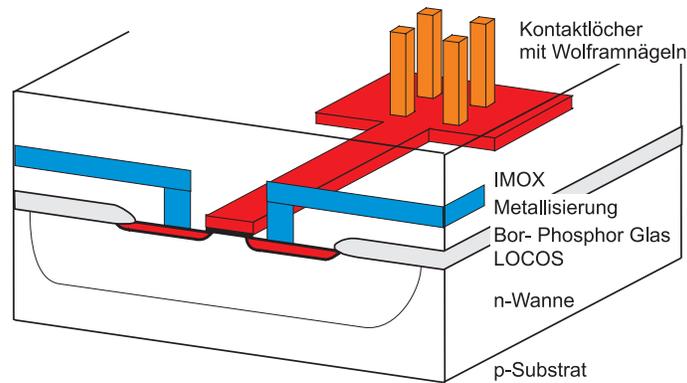


Bild 3.2: Neuro-Transistor, schematisch. Das Polysilizium-Gate ist in Form eines Steges über den eigentlichen Transistorbereich hinaus verlängert. Wolframnägeln führen das Gate an die Oberfläche (hier sind vereinfacht nur vier der neuen Nägel eingezeichnet).

Abmessungen

Die einzelne Sensorzelle besitzt eine quadratische Ausdehnung von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Die Fläche wird durch die Komplexität der Verstärkerschaltung mit insgesamt neun Transistoren je Einheit bedingt. Der eigentliche Neuro-FET belegt davon mit $15 \times 10 \mu\text{m}^2$ vergleichsweise wenig Platz.

Im Messfeld sind 64×32 Sensoren periodisch angeordnet, dies ergibt eine Gesamtgröße von $3.2 \times 1.6 \text{ mm}^2$. Die Neuron-Kontakte besitzen einen Raster-Abstand von $50 \mu\text{m}$.

Bondkontakte

Das Chip wird durch 44 metallisierte $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ große Bondpads kontaktiert. Sie sind aus Platzgründen doppelreihig in U-Form angeordnet. Ein 8 mm großer Abstand zwischen Bondpads und Messfeld ist nötig, damit eine Plexiglaswanne aufgeklebt werden kann, die das Nährmedium für die Zellen aufnimmt und gleichzeitig die Bondkontakte vor dem Elektrolyten schützt.

Modularer Aufbau

Das gesamte Chiplayout ist modular: Im Array sind identische Sensorzellen periodisch aneinandergereiht. Jede Sensorzelle besteht aus einzelnen Transis-

toren. In der Auswahllogik sind zwei gleiche Untereinheiten miteinander verschaltet, und auch die Verschaltungspunkte sind alle identisch ausgeführt.

Zu Testzwecken wurden neben der Hauptstruktur alle wesentlichen Untereinheiten noch einmal zusätzlich vereinzelt auf dem Maskensatz angeordnet und mit separaten Bondkontakten versehen. Dies war sehr hilfreich bei der Charakterisierung und Fehlersuche der verschiedenen Chargen: einzelne Funktionsgruppen konnten so systematisch untersucht und dadurch Fehlerquellen ausgeschlossen werden.

Teststrukturen gibt es zu allen in der Verstärkerschaltung verwendeten Transistoren, einer einzelnen Verstärkerzelle und einem 1-aus-8-Auswahlblock.

3.3 Herstellung

Die Chips wurden von Siemens in $0.5\ \mu\text{m}$ -CMOS-Technologie hergestellt. Im Folgenden wird die Herstellung lediglich skizziert [34]; die Details des verwendeten Prozesses unterliegen dem Betriebsgeheimnis der Firma Siemens.

Ausgangsmaterial sind p-dotierte Siliziumwafer der Dicke $700\ \mu\text{m}$. Ein CMOS-Schaltkreis besitzt sowohl n- als auch p-Kanal-Transistoren. Während n-Kanal-Transistoren durch einfaches n-Dotieren der Source- und Drain-Regionen im p-Bulk erzeugt werden können, müssen die p-Kanal-Transistoren in eine n-Wanne eingebettet werden damit pnp-Übergänge gebildet werden können.

Im ersten Schritt werden daher zunächst die n-Wannen eindotiert. Um eine selektive Dotierung vornehmen zu können, wird der Wafer zunächst mit einer Si_3N_4 -Schicht bedeckt, die nach einem Photolithographieschritt an den Stellen abgeätzt wird, an denen die p-Kanal-Transistoren entstehen sollen. Die eigentliche n-Dotierung der Wanne erfolgt durch Ionenimplantation von Phosphor mit anschließender $2.5\ \mu\text{m}$ tiefer thermischer Diffusion der Dotieratome in das Si-Substrat (drive in). Nach Rückätzung der Si_3N_4 - und SiO_2 -Schichten ist die Chipoberfläche wieder plan.

Nun wird das Silizium des Wafers lokal oxidiert, um Kurzschlüsse und die Bildung parasitärer Transistoren zu verhindern. Solche unerwünschten Transistoren entstehen an Halbleiterübergängen im Silizium, wenn darüber hinwegführende Metallleiterbahnen ungenügend abgeschirmt sind. Daher werden

alle inaktiven Bereiche der Oberfläche durch ein in LOCOS-Technik (**LOC**al **O**xidation of **S**ilicon) thermisch aufgewachsenes Oxid von 700 nm Dicke abgedeckt.

In den nächsten Prozessschritten entstehen die eigentlichen Transistoren: Zunächst wird durch Ionenimplantation von Bor die Kanaldotierung der n-Kanal-MOS-Transistoren eingestellt. Anschließend werden die n-FET-Bereiche photolithographisch abgedeckt, so dass durch die folgende Ionenimplantation mit Arsen und Bor die Kanaldotierung der p-Kanal-FET eingestellt werden kann.

Zum Aufwachsen des 9 nm dicken thermischen Gateoxids wird der Wafer bei 900 °C oxidiert. Im Niederdruck-CVD-Verfahren wird darauf eine Schicht aus polykristallinem Silizium (Polysilizium) abgeschieden, die später die Gateelektroden der Transistoren bildet. Da reines Polysilizium sehr hochohmig ist, folgt ein Dotierschritt, um der Schicht die nötige Leitfähigkeit zu geben. Zur Isolierung der Gates wird mit dem TEOS Verfahren noch eine dritte Schicht aus SiO₂ abgeschieden (TEOS = **T**etra-**E**thyl-**O**rtho-**S**ilicate).

Nach Photolithographie mit der Gatemaske werden die zuletzt aufgebrachten SiO₂- und Polysiliziumschichten bis auf das Gateoxid zurückgeätzt, so dass nur noch das eigentliche Gate bedeckt bleibt. Nach der Herstellung von horizontalen TEOS-Oxid Spacern dient die Gesamtstruktur aus Polysilizium, SiO₂-Isolation, Spacern und LOCOS-Oxid als autojustierende Maske für die Ionenimplantation der Source- und Drain-Dotierungen. Die Strukturen der jeweils komplementären Transistoren sind bei der Dotierung photolithographisch abgedeckt.

Damit sind die Hauptelemente der Transistoren fertiggestellt. Im Folgenden entstehen mehrere Isolationsschichten mit eingelagerten metallischen Leiterbahnebenen, die über Kontaktnägel einerseits untereinander, andererseits auch mit den Source-, Drain- und Gatebereichen der FET elektrisch verbunden sind.

Zunächst wird über den Bereich der gesamten Struktur eine 800 nm dicke BPSG (**B**or**P**hosphorsilikat**g**las) Schicht abgeschieden. Diese Schicht verfließt bei 800 °C, und kann so Kanten in der Waferoberfläche abflachen. Eine solche Einebnung der Topologie ist wichtig, um bei den nachfolgenden Metallisierungsschritten Kurzschlüsse zwischen den Schichten zu verhindern.

Nach einem weiteren Maskenschritt folgt die Kontaktlochätzung von der Ober-

fläche hinunter auf das Silizium von Source, Drain und Gate der Transistoren. Die Auffüllung dieser Kontaktlöcher mit Wolfram erfolgt in einem CVD-Abscheidungsprozess von den Wänden her. Dabei verhindert eine Ti/TiN-Barrierschicht unerwünschte Wolfram-Silizium-Reaktionen an der Grenzschicht.

Nach Rückätzung des überschüssigen Wolframs auf der Oberfläche erfolgt die Sputter-Abscheidung einer 400 nm dicken AlSiCu-Legierung für die 1. Metall-Ebene. Die Leiterbahnen werden photolithographisch mit der Alu-1-Maske definiert und rückgeätzt.

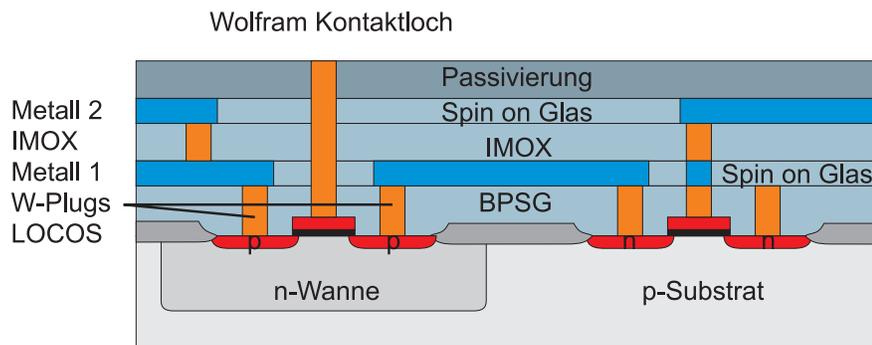


Bild 3.3: CMOS-Chip im Querschnitt, schematisch. Die Schichtdicken sind nicht maßstäblich.

Um die erste Metallebene von einer zweiten zu isolieren wird in einem mehrstufigen Prozeß ein SiO_2 -IMOX-Oxid von insgesamt 1400 nm aufgebracht (IMOX = Inter-Metall-OXid). Die Einebnung der Oberfläche kann hier nicht mehr wie oben beschrieben durch BPSG erfolgen, da die bereits vorhandene Aluminiumschicht in der ersten Leiterbahnebene keine Prozesstemperaturen über 500°C mehr zulässt. Die nötige Kantenabflachung wird stattdessen durch homogenes Aufschleudern von Spin-On-Glas mit anschließendem Rückätzen erreicht.

Da zur Verschaltung zwischen Metall-1 und Metall-2 leitende Verbindungen nötig sind, müssen auch in der zuletzt hergestellten Isolatorschicht Kontakte (VIAs) hergestellt werden, die die beiden Leiterbahnebenen verbinden. Die Technik bei der Herstellung dieser Kontaktnägel ist im Wesentlichen dieselbe wie zuvor bei der Kontaktierung der Transistorbereiche Source, Drain und Gate mit der Metall-1-Ebene; die Vias werden nach Ätzen der Kontaktlöcher mit Wolfram gefüllt.

Auch die zweite Al-Leiterbahnebene ist 400 nm dick und wird analog zur ersten Ebene erzeugt.

Speziell für diesen Chip wurde ein zusätzlicher Planarisierungsschritt der Metall-2-Oberfläche eingeschoben; dieser hatte sich in einer frühen Charge als notwendig herausgestellt, da bei einer unbereinigten Topologie die später folgende Wolframbeschichtung für die Neuron-Kontaktlöcher nicht ordentlich zurückgeätzt werden konnte und so Kurzschlüsse entstanden. Zur Einebnung wird wie zuvor eine 1300 nm dicke IMOX-Oxidschicht verwendet.

Als Schutz gegen den Elektrolyten wird abschließend eine Passivierungsschicht aus 300 nm CVD-Plasmaoxid (SiO_2) und 550 nm Plasmanitrid (Si_3N_4) abgeschieden.

Es folgt ein Litographieschritt mit anschließender Ätzung der Passivierungs- und IMOX-Schichten zur Freilegung der Bondkontakte auf der Metall-2-Ebene.

In einem letzten Spezialschritt erfolgt die Kontaktierung des Neuro-Transistors durch die Wolfram-Nägel. Diese müssen von der Oberfläche des Chips bis hinunter auf die Polysiliziumpfanne reichen. Dazu werden zunächst Löcher geätzt und diese anschließend durch CVD-Abscheidung von Wolfram aufgefüllt. Dies erwies sich aufgrund des ungünstigen Aspektverhältnisses (Kantenlänge des Lochs: $1\ \mu\text{m}$, Höhe des Lochs: ca. $3\ \mu\text{m}$) als überaus kritischer Prozessschritt.

In einer Testcharge wurde zusätzlich über der gesamten Chipstruktur – einschließlich der Kontaktlöcher – noch eine Si_3N_4 -Schicht von 14 nm (Wafer #7) bzw. 23 nm (Wafer #14) abgeschieden.

3.4 Chargen

Der 2048-Sensor-Chip stellt eine komplexe Schaltung mit insgesamt über 10000 Transistoren dar. Beim Design wurden technologisch einige neue Wege beschritten, um den speziellen Anforderungen gerecht zu werden und einen Einsatz der Chips zur Messung von Neuron-Silizium-Kopplungen unter Kulturbedingungen zu ermöglichen. In einer schrittweisen Entwicklung erfolgte bei der Firma Siemens die Prozessierung von sechs unterschiedlichen Chipchargen; von der ersten auf die zweite Charge wurde ein vollständiges Masken-Redesign

durchgeführt, in den anderen Chargen wurden jeweils einzelne, spezielle Probleme behoben.

1. Charge – Januar 1995

Aufgrund einer verletzten Designregel fielen sämtliche p-Kanal-Transistoren auf dem Chip aus. Vor dem Redesign der Schaltung und einer Neuprozessierung wurde das gesamte Layout einer gründlichen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden weitere Layoutmängel – fehlende Via-Kontakte und eine unterbrochene Leiterbahn – aufgefunden und behoben [3].

2. Charge – Dezember 1995

Bei der Übertragung auf ein neues Computer-Layoutsystem blieb neben den anstehenden Korrekturen das funktionelle Layout der Schaltung unverändert. Die konsequente Verwendung von Design-Rule-Prüfprogrammen bot zusätzliche Sicherheit gegen Eingabefehler und Geometrieverletzungen beim Entwurf des Maskensatzes am Computer.

Im Dezember 1995 wurde an einer der isolierten Teststrukturen die erste Kennlinie einer Verstärkerzelle aufgezeichnet.

Eine Messung innerhalb der eigentlichen Arraystruktur war dagegen mit dieser Charge noch nicht möglich: Ein falsch dimensionierter Widerstand in der Verstärkereinheit verhinderte das Abschalten der inaktiven Sensoren und damit den Betrieb des Gesamtarrays. Um dennoch Tests an Array-Sensoren durchführen zu können, wurden durch LASER-Auftrennung einer Leiterbahn bei jedem Chip 63 der 64 Spalten permanent von der Stromversorgung abgetrennt, so dass nur genau eine aktive Spalte im Array für Messzwecke verblieb.

Doch auch mit dieser Modifikation konnten im Elektrolyten keine Kennlinien aufgenommen werden, weil die Auffüllung der Kontaktnägel mit Wolfram aufgrund des ungünstigen Aspektverhältnisses misslungen war.

Bei den Messungen an der isolierten Verstärkerzelle kam es gelegentlich zu einer Selbstabschaltung, die auf einen CMOS-typischen Latch-up Effekt schließen lässt. Latch-up Effekte können unbeabsichtigt an pnpn-Strukturen entstehen: Wenn solche parasitären Halbleiterübergänge nicht durch genügend hohe

Sperrspannungen geschützt sind, kann es durch kurze Störpulse in Form von Spannungsspitzen zu selbstverstärkenden Kurzschlüssen kommen.

3. Charge – Mai 1996

Gegenüber der zweiten Charge wurden die Parameter für den Wolframprozess variiert, um eine bessere Auffüllung der Kontaktlöcher zu erzielen.

In Verbindung mit diesem Spezielschritt erwies sich die unebene Oberfläche der Passivierung aufgrund der darunterliegenden Schichtstruktur aus Leiterbahnebenen und Oxiden als kritisch: Die zuletzt abgeschiedene Wolframschicht wurde nicht vollständig zurückgeätzt, so dass es in der Folge auf allen Modulen der Schaltung zu Kurzschlüssen kam.

4. Charge – August 1996

Gegenüber der Standardprozessierung wurde ein zusätzlicher Planarisierungsschritt hinzugefügt, um die Chipoberfläche nach Herstellung der zweiten Leiterbahnebene erneut einzuebnen und so den speziellen Ansprüchen bei der Kontaktnagelauffüllung Rechnung zu tragen. Die Rückätzung der überschüssigen Wolframschicht verlief nun einwandfrei, die Kurzschlüsse der letzten Charge konnten wirksam verhindert werden.

REM-Aufnahmen an Längsschnitten zeigten noch immer Mängel an einem Teil der Wolframnägel. Insgesamt war die Kontaktlochauffüllung aufgrund der Variation des CVD-Prozesses aber deutlich besser als an den bisher produzierten Scheiben.

An Chips dieser vierten Charge wurden erstmalig Kennlinien an Sensorzellen innerhalb des Arrays unter Elektrolytkontaktierung aufgenommen. Aufgrund des weiterhin bestehenden Umschaltproblems in Zusammenhang mit dem Abschaltwiderstand verblieb zunächst die Beschränkung auf eine von 64 Spalten der Gesamtschaltung.

Im Dezember 1996 gelang die erste Kopplung eines aufgesetzten Blutegelneurons an dieser isolierten Spalte des Arrays.

5. Charge – Februar 1997

In der fünften Charge erfolgte die Korrektur des Abschaltwiderstands in der Verstärkereinheit. Damit wurde ein erstmaliger Betrieb aller 64 Spalten des Arrays möglich. Zusätzlich gelang durch eine Kombination von Überbelichten der Kontaktlochmaske und dem Aufbringen einer dickeren Ti/TiN-Barriere vor dem eigentlichen Wolfram-CVD-Prozess eine homogen gute Kontaktlochauffüllung.

Durch sequentielle Aufnahme der Kennlinien aller 64 Spalten konnten an allen 2048 Sensoren eines Arrays Kennlinien aufgenommen und verglichen werden. Zeitlich wiederholt aufgenommene Offsetkarten erlaubten die Beobachtung einer Drift.

Willkürlich aufgesetzte Blutegelneurone koppelten mit Sensoren in verschiedenen Spalten und Zeilen des Arrays.

Es verblieb ein Fehler in der Spaltenselektion, der ein schnelles Umschalten der Spalten im Normalbetrieb verhinderte (Kapitel 5). Das Problem konnte durch manuelles Auftrennen einer Leiterbahn und durch Einführung eines geeigneten Schaltprotokolls eingeschränkt kompensiert werden.

6. Charge – Juli 1998

Durch Aufbringung einer zusätzlichen Nitridschicht sollte versucht werden, Oberflächeneffekte wie Korrosion oder Ionenanlagerungen und die damit verbundene Drift der Einsatzspannungen zu unterdrücken. Dabei wurde je ein Wafer mit 14 nm (Wafer #7) bzw. 23 nm (Wafer #14) Nitrid prozessiert.

Die Überzahl der Sensoren dieser Charge war allerdings schadhaft, da bei der Kontaktlochauffüllung die geänderte Prozessführung nicht korrekt eingehalten wurde. Die Alterungsmessungen an diesen Chips waren dementsprechend fehlerbehaftet, es konnten deshalb keine konkreten Aussagen über einen Nutzen der Nitridschicht gemacht werden.

Kapitel 4

Messapparatur

4.1 Messstand

Bild 4.1 zeigt die modular aufgebaute Versuchsapparatur. Die empfindlichsten Geräte befinden sich zur Abschirmung gegen elektromagnetisch eingestrahelte Störungen in einem Faradaykäfig aus Aluminium.

Die Messkammerhalterung, Spannungsversorgung und -filter, Digitalkonverter, Signal-Vorverstärker und Mikroelektroden-Headstages sind auf einer 1 cm starken, schwarz eloxierten Aluminiumplatte aufgebaut, die eine zusätzliche Abschirmung nach unten bewirkt. Der Tisch ruht auf einer 8 cm dicken, schweren Marmorplatte, die auf vier Schwingungsdämpfern gelagert ist. Angestochene Neurone sind so gegen Trittschall und Gebäudeschwingungen geschützt.

Das Positionieren und Anstechen der Neurone findet unter einer Stereolupe bei 200 bis 2000-facher Vergrößerung statt. Die Messkammer wird dazu auf einem horizontal verfahrbaren Objektisch in das Gesichtsfeld der Lupe verschoben, die fix auf dem Experimentiertisch montiert ist. Zusätzlich erfasst eine CCD-Kamera das Mikroskopbild. Es kann auf einem Monitor beobachtet und zur Dokumentation auf einem Videoprinter ausgedruckt werden. Eine zweite Lupe dient dem Übersetzen von vereinzelt Neuronen aus einem Zellkulturschälchen in die Messkammer.



Bild 4.1: Experimenteller Aufbau. Die Kopplungsexperimente werden zur Abschirmung gegen eingestrahlte Störungen innerhalb eines Faradaykäfigs durchgeführt. Rechts im Bild das Rack mit der Videoanlage und der Elektronik für die Elektrophysiologie, links der PC zur zentralen Datenerfassung.

Zur Kontrolle der Neuron-Silizium-Kopplung werden Mikroelektroden in die Zellen eingestochen. Nach experimentellem Bedarf kann mit einer einzelnen oder mit zwei Mikroelektroden gleichzeitig gearbeitet werden. Die Positionierung erfolgt mit mechanischen oder elektrischen Mikromanipulatoren. Der erste Manipulator (Leitz, mechanisch) befindet sich rechts neben der Messzelle, der zweite (Eppendorf, elektrisch) ist von vorne an die Aluminiumplatte angeschraubt.

Während Anstechelektrode und Eingangsstufe („Headstage“) direkt auf den Mikromanipulatoren befestigt sind, befinden sich die beiden zugehörigen Brückenverstärker (npi) außerhalb des Faradaykäfigs im Messgeräte-Rack. Das Rack beherbergt außerdem zwei Funktionsgeneratoren, die zur Erzeugung von Reizsignalen für die Mikroelektroden genutzt werden. Weiterhin sind in dem Rack die Videoausrüstung sowie die elektronische Manipulatorsteuereinheit und ein Oszilloskop untergebracht.

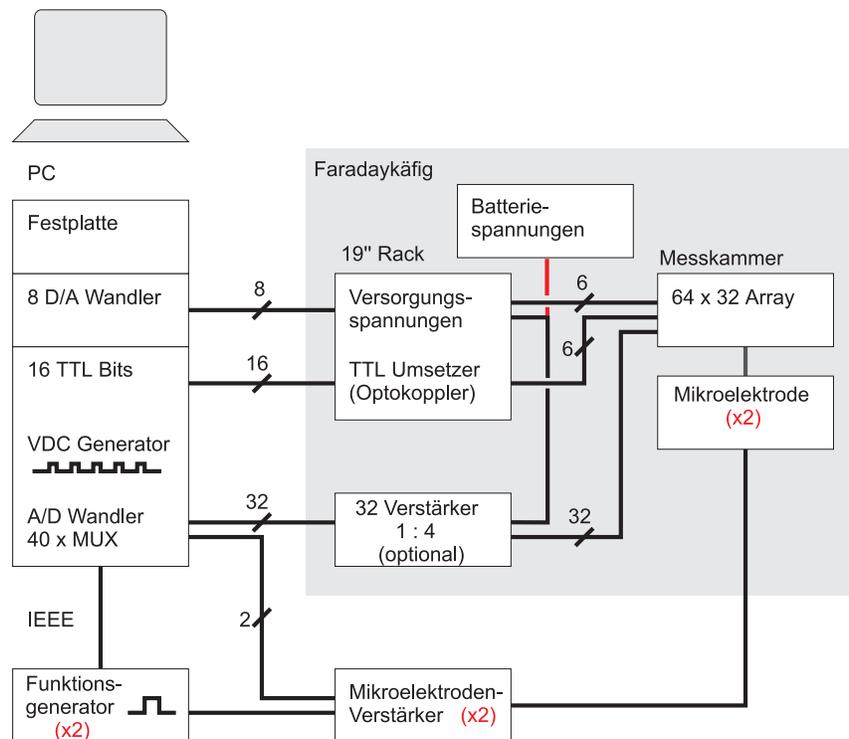


Bild 4.2: Blockschaltbild des Versuchsaufbaus. Optionale bzw. alternative Komponenten sind rot eingezeichnet.

Die Datenaufnahme findet zentral am PC statt. Hier werden die Steuerworte für die Spaltenwahl generiert, synchron dazu geschieht die Analog-Digital-Wandlung nach Multiplex-Auswahl eines der 32 Chipausgänge oder der 4 Mikroelektrodensignale. Zu Beginn eines jeden Messintervalls kann ein Mikroelektroden-Reizsignal an den beiden Funktionsgeneratoren ausgelöst werden, indem ein Triggerimpuls über einen IEEE/GPIB-Signalbus erfolgt.

4.2 Messkammer

Die 2048-Transistor-Chips wurden in Messkammern eingebaut, die für die Experimente an die Apparatur angesteckt sind. Sie können rasch ausgetauscht werden, sind portabel, einfach zu reinigen und zellkulturtauglich.

Die komplett prozessierten Siliziumchips wurden von Siemens in Scheiben zu je 30 Strukturen der FET-Arrays geliefert. Die Wafer wurden im abteilungsei-

genen Reinraum zu rechteckigen Chips der Größe $12 \times 13.3 \text{ mm}^2$ zersägt. Aus der Seriennummer des Wafers und der Position des Chips innerhalb des Wafers wurde jeder Messkammer gemäß *Bild 4.3* eine Kennnummer zugeordnet.

Charge	Wafer
Charge 1	Bei SIEMENS vereinzelt
Charge 2	PF 552731/13, PF 552731/12
Charge 3	PF 552731/16
Charge 4	PF 552731/18
Charge 5	PF 642023/04, PF 642023/03, PF 642023/01, PF 642023/02
Charge 6	PF 642023/07, PF 642023/14

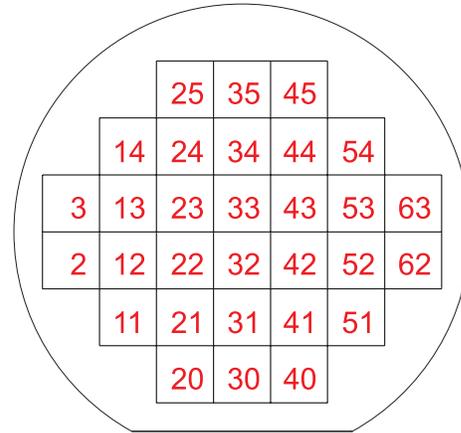


Bild 4.3: Nummerierung der Messkammern. **Links:** Seriennummern, chronologisch angeordnet. **Rechts:** Positionen der einzelnen Chips auf dem Wafer.

Als Grundlage für die Messkammer dient eine einseitig geätzte Leiterbahnplatte, auf die der Chip mit Universalklebstoff aufgeklebt wird. Die Anordnung der Leiterbahnen auf der Platine ist der Lage der Kontaktstellen auf dem Chip angepasst. Um die Messkammer später auf den Versuchstisch aufstecken zu können, wurden zuvor vier Löcher in die Ecken der Platine gebohrt. Ein aufgelöteter doppelreihig gewinkelter 44-Pol-Verbindungsstecker dient zur Kontaktierung der Messkammer. Damit die Chipoberfläche mit den Kupferbahnen der Platine eben liegt, wurde das Platinenmaterial rechteckig auf eine Tiefe von 0.7 mm ausgefräst. Dies erleichtert die Kontaktierung des Chips mit einem Ultraschall-Wedgebinder. In diesem Prozess werden die 44 Kontaktstellen auf dem Chip mit den Kupferleiterbahnen auf der Trägerplatine verbunden. Dazu wird ein $33 \mu\text{m}$ starker Draht aus einer Aluminium-Silizium-Legierung an beiden Enden nach einem festen Bondplan (siehe Anhang) kalt verschweißt.

Die empfindlichen Bondkontakte sind durch eine zweiteilige Wannenkonstruktion aus Plexiglas geschützt, die bei Experimenten mit Neuronen das Zellkulturmedium aufnimmt. Die Innenwanne wird auf dem Chip aufgeklebt; sie besitzt eine rechteckige Auflagefläche, die lediglich eine Aussparung für das

Sensorarray offen lässt. Die Außenwanne umschließt mit ihrem Innenrand die Innenwanne, während der Außenrand auf der Trägerplatine aufgeklebt ist. Zusammen verkapseln Innen- und Außenwanne die elektrisch und mechanisch empfindlichen Bondkontakte und schützen sie vor dem Elektrolyten.

Zur Montage wird zuerst die Auflagefläche der Außenwanne mit medizinischem Klebstoff bestrichen. Die Innenwanne wird zunächst nur lose in die Außenwanne eingeklemmt, so dass die zweiteilige Wannenkonstruktion über dem Array positioniert werden kann. Dann wird die Außenwanne durch Herunterdrücken auf die Platine festgeklebt. Nach einem Tag Trocknen wird die Innenwanne eingeklebt. Der Klebstoff wird sparsam eingesetzt, um ein Verkleben der Sensoren und eine Beeinträchtigung der Zellkultur durch abgelösten Klebstoff zu vermeiden.

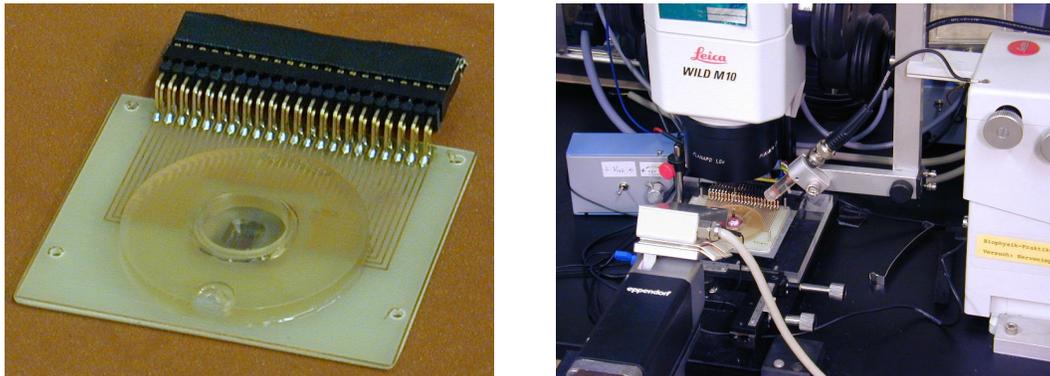


Bild 4.4: Links: Komplette Messkammer mit Wanne und Schutzstecker. Rechts: Detailaufnahme der Apparatur mit Messkammer.

Zur besseren Abdichtung der Messkammer wird das Volumen zwischen Innen- und Außenwanne mit Epoxidharz ausgefüllt. Frisch angesetztes Epon ist nach kurzem Erwärmen leichtflüssig und strömt beim Einfüllen um die filigranen Bonddrähte herum ohne sie zu beschädigen. Im Umluftofen härtet es bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 90 Minuten zu einem massiven Block aus und verhindert so zuverlässig das Eindringen von Elektrolyt.

CMOS-Chips sind sehr empfindlich gegenüber elektrostatischen Entladungen. Daher wird bereits bei der Herstellung der Messkammer ein Schutzstecker aufgesteckt, der alle Chipkontakte miteinander kurzschließt. Er wird erst unmit-

telbar vor dem Experiment abgenommen. Dazu wird mit einer Metallklemme ein geerdeter Moosgummistreifen über alle Leiterbahnen der Platine gedrückt, bis der Schutzstecker entfernt und die Messkammer an die Apparatur angesteckt ist. Entsprechend wird nach Beendigung der Experimente der Schutzstecker wieder aufgesteckt.

4.3 Chipbeschaltung

Die Chip-Schaltung beinhaltet Analog- und Digitalelemente. Beide Schaltkreise arbeiten mit getrennten Spannungsversorgungen. Dies verhindert ein Übersprechen der digitalen Schaltflanken auf den Analogteil. Außerdem gestattet die Trennung eine große Flexibilität in der Auswahl der Betriebsspannungen. Sämtliche am Chip anliegenden Spannungen werden von Batterien gespeist und können über Potentiometer angepasst werden.

Funktion	Vorgesehen	Verwendet	Bemerkungen
$V_{ss}(\text{analog})$	-1.2 V	-1.2 V	Zusammengeführt mit $V_{ss}(\text{digital})$
$V_{dd}(\text{analog})$	+2.1 V	+2.1 V	
V_{akt}	0.7 V	0.2 V	Negativere Spannung verflacht Kennlinie
V_{ref}	0.0 mV	± 500 mV	± 500 mV Offsetkorrektur
$V_{ss}(\text{digital})$	-1.2 V	-1.2 V	
$V_{dd}(\text{digital})$	+2.1 V	+3.5 V	>2.1V zur Überwindung der Schwellspannung
V_{off}	-1.2 V	-1.2 V	
V_{on}	+2.1 V	+3.5 V	>2.1V zur Überwindung der Schwellspannung

Tabelle 4.5: Beschaltung des Chips. Teilweise mussten die ursprünglich vorgesehenen Spannungen für den Betrieb variiert werden.

Die Operationsverstärker der FET-Sensoren werden in 3.3 V-Technik mit den Analogspannungen $V_{ss}(\text{analog})$ und $V_{dd}(\text{analog})$ betrieben. Die Einsatzspannung der Verstärkerschaltung liegt gegenüber V_{ss} bei +1.2 V. Da das Badpotential im Elektrolyten über dem Chip per elektrophysiologischer Konvention auf Masse liegt, ergeben sich $V_{ss}(a) = -1.2$ V und $V_{dd}(a) = +2.1$ V.

Die Spannung V_{akt} stellt den Stromfluss durch die Verstärkerzelle ein, durch Variation kann die Steilheit der Kennlinie eingeschränkt verflacht werden.

V_{ref} ist der zweite Eingang des Operationsverstärkers. Das Anlegen einer Offsetspannung an V_{ref} bewirkt eine gleichzeitige Verschiebung der Nullpunkte aller Kennlinien. Vor und während der Messung kann so der Messbereich an einem Einzelsensor optimal eingestellt bzw. nachjustiert werden.

Der Digitalteil dient der Spaltenselektion. Er wird von den Betriebsspannungen $V_{\text{ss}}(\text{digital}) = -1.2 \text{ V}$ und $V_{\text{dd}}(\text{digital}) = +3.5 \text{ V}$ gespeist. Obwohl der Chip in 3.3 V-Technik hergestellt wurde, musste die positive Versorgungsspannung $V_{\text{dd}}(\text{d})$ von $+2.1 \text{ V}$ auf $+3.5 \text{ V}$ erhöht werden, da sonst die Ausgangskennlinie abgeschnitten wird. (Die Spannungserhöhung muss mindestens so groß sein wie die Schwellspannung des Transistors, der den Sensorausgang an die Ausgangsleitung des Arrays ankoppelt.)

Zur Auswahl der aktiven Spalte wird ein 6 Bit breites Selektionswort vom Computer generiert. Die von den D/A-Wandlern im PC erzeugten 5 V-Signalamplituden werden von sechs Optokopplern auf die extern von Batterien erzeugten Spannungspegel $V_{\text{ss}}(\text{d})$ und $V_{\text{dd}}(\text{d})$ der Digitalschaltung umgesetzt. Durch die galvanische Trennung von PC und Chip werden außerdem hochfrequente Störsignale aus den Selektionsleitungen herausgefiltert und die Entstehung von Erdschleifen verhindert.

Die elektrische Trennung zwischen Analog- und Digitalteil auf dem Chip ist nicht perfekt: $V_{\text{ss}}(\text{analog})$ und $V_{\text{ss}}(\text{digital})$ sind über 100 Ohm miteinander verbunden. Daher wurde letztendlich für die beiden Schaltkreise nur eine gemeinsame Spannung $V_{\text{ss}}(\text{analog}) = V_{\text{ss}}(\text{digital})$ erzeugt und verwendet.

4.4 Elektrophysiologie

Der elektrophysiologische Aufbau in Form einer Penetrations-Mikroelektrode und des zugehörigen Verstärkers hat mehrere Kontrollaufgaben:

Durch Anlegen eines konstanten Injektionsstroms kann das Membranpotential einer Zelle unterhalb ihres Ruhepotentials „geklemmt“ werden. Dies dient der Unterdrückung von spontaner Aktivität während der Messung und verhindert

ein verfrühtes Ermüden eines beim Anstechen verletzten Neurons. Durch Loslassen der Stromklemme oder Anlegen eines Reizstroms können in einer derart heruntergeklemmten Zelle gezielt Aktionspotentiale ausgelöst werden.

Gleichzeitig zeichnet der Mikroelektrodenverstärker das intrazelluläre Membranpotential auf. Damit können Aktionspotentiale in der Zelle sicher nachgewiesen werden. Dies dient insbesondere der Erkennung und Verifikation von FET-Kopplungssignalen. Aus dem Vergleich von FET- und Mikroelektrodenverlauf lassen sich wichtige Rückschlüsse auf die Natur und Parameter des vorliegenden Kopplungstyps ziehen.

Für den Vergleich von Kopplungsmessungen mit Simulationen ist ferner die Kenntnis der Zellparameter C_M und R_M wichtig. Sie können aus der Relaxationsantwort der Zelle auf ein Anlegen von definierten Stromstufen-Impulsen ermittelt werden [31].

Durch vertikales Verfahren der eingestochenen Elektrode mit dem Mikromanipulator kann das Neuron auf die Kopplungsfläche angedrückt werden. Mit dieser Technik wird oft eine Vergrößerung des Kopplungssignals erzielt [14].

Im Folgenden wird der elektrophysiologische Aufbau für eine einzelne Penetrations-Mikroelektrode erklärt. In Experimenten war teilweise auch der Einsatz einer zweiten Elektrode erforderlich, dazu wurde der Aufbau um ein zweites, im Wesentlichen identisches System erweitert.

Eine frisch gezogene Mikroelektrode wird mit 4 M KAc-Lösung gefüllt und anschließend auf den chlorierten Silberdraht des Elektrodenhalters aufgesteckt. Die Gegenelektrode ist ein in das Bad getauchtes Ag/AgCl-Pellet; es befindet sich auf Massepotential. Der Elektrodenhalter ist in unmittelbarer Nähe zum Vorverstärker (Headstage) direkt auf dem Mikromanipulator montiert.

Der eigentliche Current-Clamp-Verstärker befindet sich außerhalb des Faradaykäfigs. Dessen Ausgangssignale – Membranpotential und Strominjektion – werden vom PC parallel zu den FET-Signalen über zusätzliche A/D-Kanäle erfasst und verarbeitet und können auf dem Bildschirm in Form einer Oszilloskopdarstellung angezeigt werden. Die Reizung der Zelle erfolgt durch Rechteckpulse, die auf einem Funktionsgenerator computergesteuert erzeugt werden. Der Brückenverstärker übersetzt diese Signale in Injektionsströme (bis 5 nA).

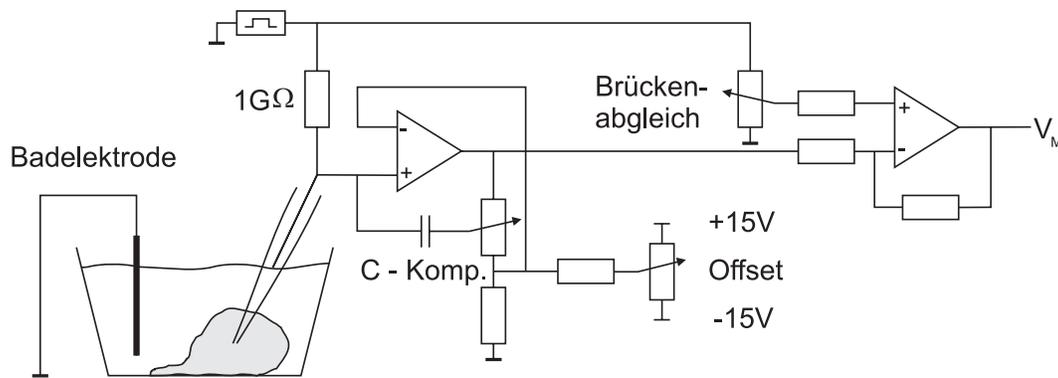


Bild 4.6: Beschaltung der Mikroelektrode mit einem Brückenverstärker. Über den $G\Omega$ -Widerstand wird Strom in die Zelle injiziert. Gleichzeitig wird das intrazelluläre Membranpotential aufgenommen und kann am Verstärkerausgang abgegriffen werden (nach [17]).

Über die Bedienelemente auf dem Brückenverstärker erfolgt nach dem Eintauchen jeder Elektrode ins Bad der individuelle Mikroelektrodenabgleich. An einem Potentiometer wird zunächst das Nullpotential eingestellt. Das Anlegen des Injektionsstroms an die angestochene Zelle erfolgt über einen $G\Omega$ -Widerstand in Serie zur Mikroelektrode. Das Membranpotential wird als Spannung am Widerstand abgegriffen und zur Anzeige verstärkt. Der Zugangswiderstand der Mikropipette verfälscht das Ergebnis der Potentialmessung, da an ihm ein Teil der Membranspannung abfällt. Daher erfolgt in einem zweiten Schritt der Abgleich des Elektrodenwiderstands mittels einer Wheatstoneschen Brückenschaltung: Rechteckströme werden in die Mikroelektrode injiziert; da während der Abgleichphase der Strom durch die Pipette direkt ins Badpotential abfließt, muss die Brücke so abgeglichen werden, dass auf dem Ausgangssignal keine Rechteckstufen zu sehen sind. Zuletzt muss noch die Streukapazität der Elektrode, die dem Spannungssignal künstliche Relaxationskurven aufprägen kann abgeglichen werden. Dies geschieht durch die C-Kompensation, die dafür sorgt, dass sich die Elektrodenkapazität beschleunigt auf- bzw. entladen kann (Bild 4.6).

Alle drei Abgleichschritte werden unter Beobachtung der Oszilloskopdarstellung am PC solange durchgeführt, bis im Spannungssignal der Elektrode keine Sprünge oder Unebenheiten mehr auftreten.

4.5 Datenaufnahme und Signalverarbeitung

Ein PC steuert zentral die Auswahl der aktiven Chipspalte und erfasst gleichzeitig die Daten der Transistor- und Mikroelektrodensignale. Die aufgenommenen Werte werden in Echtzeit am Bildschirm in der Darstellung eines Speicheroszilloskops angezeigt und bei Tastendruck auf Festplatte abgespeichert. Zusätzlich kann zu einem definierten Zeitpunkt innerhalb eines Sweeps ein Reizstrom auf die Mikroelektrode gegeben werden, um ein Aktionspotential in der angestochenen Zelle auszulösen.

Vor der Messung findet die Auswahl der Transistor- und Mikroelektrodenkanäle statt. Unter der Stereolupe werden diejenigen Sensoren nach ihrer Lage in Spalte und Zeile des Arrays vorgemerkt, die unter den aufgesetzten oder angewachsenen Neuronen liegen. Die Programmierung dieser Kanäle erfolgt am Bildschirm anhand einer graphischen Repräsentation des Sensorfeldes, in der alle 2048 Sensoren einzeln an- oder ausgeschaltet werden können. Je nach Verwendung der Mikroelektroden werden Strom- und Spannungssignal der beiden Brückenverstärker mit in die Kanalliste der A/D-Messkarte aufgenommen.

Da das Auslesen eines Arraypixels in die Programmierung der Spaltenpalte und die Auswahl des Eingangskanals zerfällt, wird die Kanalliste zu Beginn der Messung nach Spalten sortiert und in zwei getrennten Listen für Spalten und Zeilenselektion aufgeteilt. Spaltenworte und A/D-Kanäle liegen nun in zwei zyklischen Datenpuffern gleicher Länge vor.

Wesentlich für den Messablauf ist die exakte Synchronisation der eben angesprochenen Spaltenprogrammierungs- und Auslesevorgänge. Beide Funktionen werden von einer high-speed Multifunktionsmesskarte mit integriertem Zeitgeber bearbeitet: Der programmierbare Taktgenerator generiert ein regelmäßiges Rechtecksignal, das als zentraler Synchronisationspuls dient. Mit ansteigender Flanke schreibt die Messkarte ein Spaltenselektionswort aus dem zyklischen Datenpuffer an den Chip. Auf die absteigende Flanke folgt nach einer definierten Zeitverzögerung die Analog-Digital-Wandlung eines der 40 Eingangskanäle, gemäß der Kanalliste zur Zeilen- und Mikroelektrodenauswahl.

Taktrate und Tastverhältnis zwischen aufsteigender und absteigender Flanke können innerhalb gewisser Grenzen frei gewählt werden: Die Apparatur wurde

ursprünglich auf eine maximale Samplingrate von 0.5 MSamples/s ausgelegt. Die minimale Flankenlänge beträgt dabei $1 \mu\text{s}$.

Aufgrund eines konstruktionsbedingten Fehlers der verwendeten Multifunktionsmesskarte konnte diese Datenrate nur bedingt eingesetzt werden: Im zyklischen Betrieb arbeitet die Ausgabe der Digitalwerte für die Spaltenselektion nicht zuverlässig. Nach mehrmaligem Durchlauf des Digitalwertpuffers werden bei hohen Datenraten unkontrolliert einzelne falsche Datenwerte eingefügt, was zu einem Zusammenbrechen der Synchronisation führt. Bei Messungen über mehrere Arrayspalten hinweg musste daher die Taktfrequenz von $1 \mu\text{s}$ auf über $20 \mu\text{s}$ angehoben werden.

Die Darstellung der aufgenommenen Datenpunkte am Bildschirm erfolgt im Stil eines Oszilloskops. In horizontaler Richtung ist die Zeitachse aufgetragen, vertikal werden die Transienten von bis zu 5 Kanälen übereinander angeordnet. Vor der Messung wird dazu die Anzahl der anzuzeigenden FET- und Mikroelektrodensignale festgelegt, typischerweise sind dies 1–30 Kanäle. Die zeitliche Auflösung bestimmt sich aus der gewählten Samplingfrequenz und der Länge der gesamten Kanalliste.

Die Datenaufnahme vollzieht sich entweder kontinuierlich oder in Einzelmessungen zu je 800 Datenpunkten pro Kanal. Im ersten Fall wird die Bildschirmdarstellung wie bei einem echten Oszilloskop ständig aktualisiert, im Einzelsweepmodus werden in jedem Durchlauf 800 Datenpunkte pro Kanal aufgezeichnet und am Bildschirm angezeigt. Durch Tastendruck wird selektiv entweder der aktuell am Bildschirm angezeigte Sweep gespeichert oder eine neue Messung ausgelöst.

Mit dem Beginn eines jeden Bildschirmdurchlaufs kann optional ein Reizsignal auf den Mikroelektrodenverstärker gegeben werden, um zu einem definierten Zeitpunkt ein Aktionspotential in der Zelle auszulösen. Das Reizsignal ist durch seine Vorlaufzeit, Dauer und Amplitude definiert. Die Parameter werden bereits vor der Messung festgelegt und an den Funktionsgenerator übermittelt; während der Messung genügt dann ein einfacher Triggerimpuls vom PC zum Auslösen des programmierten Pulses.

4.6 Kennlinienmessung

Durch die Einbindung des Neuro-Transistors in eine Verstärkerschaltung besteht eine charakteristische Beziehung zwischen Eingangs- und Ausgangsspannung. Dieser Kennlinienverlauf muss für jede Sensoreinheit im Array bekannt sein, damit vom Messsignal auf Potentialdifferenzen über dem Gate des Transistors zurückgerechnet werden kann.

Zur Aufnahme einer Kennlinie wird das Badpotential über den Sensoren variiert. Hierzu legt man an die Badelektrode, die sich im gewöhnlichen Messbetrieb auf Massepotential befindet, den gefilterten Ausgang einer Digital-Analog-Karte.

Die Kennlinienaufnahme erfolgt Spalte für Spalte in aufsteigender Reihenfolge an jeweils 32 Sensoren gleichzeitig. Obwohl das Messfenster der Einzelkennlinien nur etwa 25 mV beträgt, muss bedingt durch eine starke Streuung in den Einsatzspannungen der Kennlinien (siehe Abschnitt 5.1) ein relativ großer Spannungsbereich von 400 mV in 1.25 mV Schritten durchlaufen werden, um alle Kennlinien jeweils vollständig aufzeichnen zu können.

Wegen schaltungstechnischer Mängel in der Selektionslogik der Chips (siehe Abschnitt 5.4) sprachen die Sensoren vielfach erst nach einer Verzögerung auf einen Wechsel der aktiven Spalte an. Als Gegenmaßnahme wurden die Spannungen bei der Kennlinienaufnahme relativ langsam durchfahren und bei jedem Spaltenwechsel eine zusätzliche Verzögerungszeit bis zur Aufnahme der nächsten Sensorkennlinien abgewartet. Die Aufzeichnung einer Spalte dauerte daher eine Minute, die Messung des kompletten Kennlinienfeldes eines Chips eine Stunde.

Kapitel 5

Charakterisierung des Chips

5.1 Sensorkennlinien

5.1.1 Definition

In jeder der 64×32 Sensorzellen im Array ist der Neuro-Transistor – die eigentliche Potentialsonde – in eine eigene Verstärkerschaltung eingebettet. Die direkte Messgröße, der Strom durch den Transistor, wird dadurch vor Ort verstärkt und in ein Spannungssignal gewandelt. An den Chip-Ausgangsleitungen wird folglich ein Spannungssignal abgegriffen, das über eine schaltungscharakteristische Funktion mit dem Eingangssignal über dem Gate verknüpft ist.

Die **Sensorkennlinie** ist definiert durch die Abbildung der Eingangsspannung auf das Ausgangssignal (*Bild 5.1*). Ihr sigmoider Kurvenverlauf erklärt sich aus dem verwendeten Verstärkertyp: Das Gate des Neuro-FET ist einer der beiden Eingänge eines Operationsverstärkers. Ein solches Bauteil verstärkt innerhalb seines Arbeitsbereichs kleine Potentialdifferenzen zwischen seinen beiden Eingängen sehr hoch.

5.1.2 Kennlinienparameter

Bild 5.1 zeigt die Kennlinie eines Einzelsensors. Aufgrund von Fertigungs-

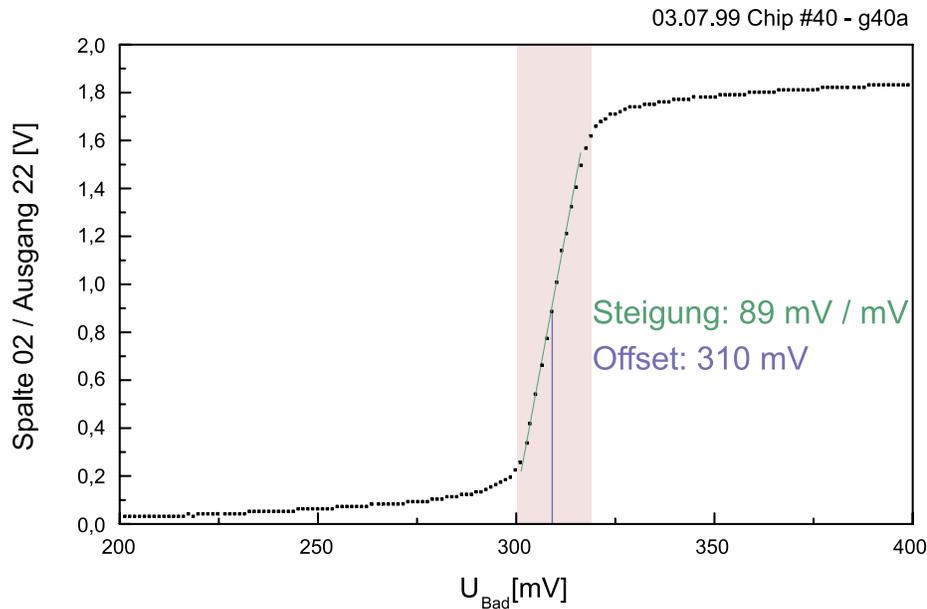


Bild 5.1: Charakterisierung der Kennlinien durch Steigung und Offset. Das 20 mV breite Messfenster ist farbig unterlegt.

schwankungen und Asymmetrien im Chipaufbau weichen die Kennlinien aller 2048 Sensoren im Array teils erheblich voneinander ab. Sie werden deshalb nach zwei Kriterien charakterisiert:

- Der **Offset** bezeichnet die horizontale Verschiebung gegenüber einer Idealkennlinie, die ihre maximale Verstärkung bei 0 mV besitzt (= Badpotential). Eine Nullpunktkorrektur dieser Einsatzspannung kann über eine Offsetspannung V_{ref} nur für alle 2048 Sensoren gleichzeitig durchgeführt werden.
- Die **Steigung** im linearen Bereich bestimmt die Gesamtverstärkung. Größere Steilheit bedeutet zwar bessere Auflösung, zugleich wegen der Begrenzung der Ausgangsspannung aber auch eine Verkleinerung des dynamisch verstärkten Eingangsbereichs.

Offset und Steigung einer Sensorzelle sind wichtige Randbedingungen für die Messung einer Neuron-Silizium-Kopplung: Kopplungssignale können innerhalb des Messfensters nur dann bis zu einer Maximalamplitude von ca. 20 mV aufgelöst werden, wenn die Nullpunktverschiebung des Arbeitsbereichs optimal durch die Offsetkorrektur abgeglichen wurde.

5.2 Kennlinienstreuung

5.2.1 Offset- und Steilheitenkarten

Zur systematischen Untersuchung der Kennlinienstreuung im Sensorfeld wurden bei Erstinbetriebnahme jedes Chips sämtliche 2048 Kennlinien gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Offset- und Steilheitenverteilungen in Karten (Bild 5.2).

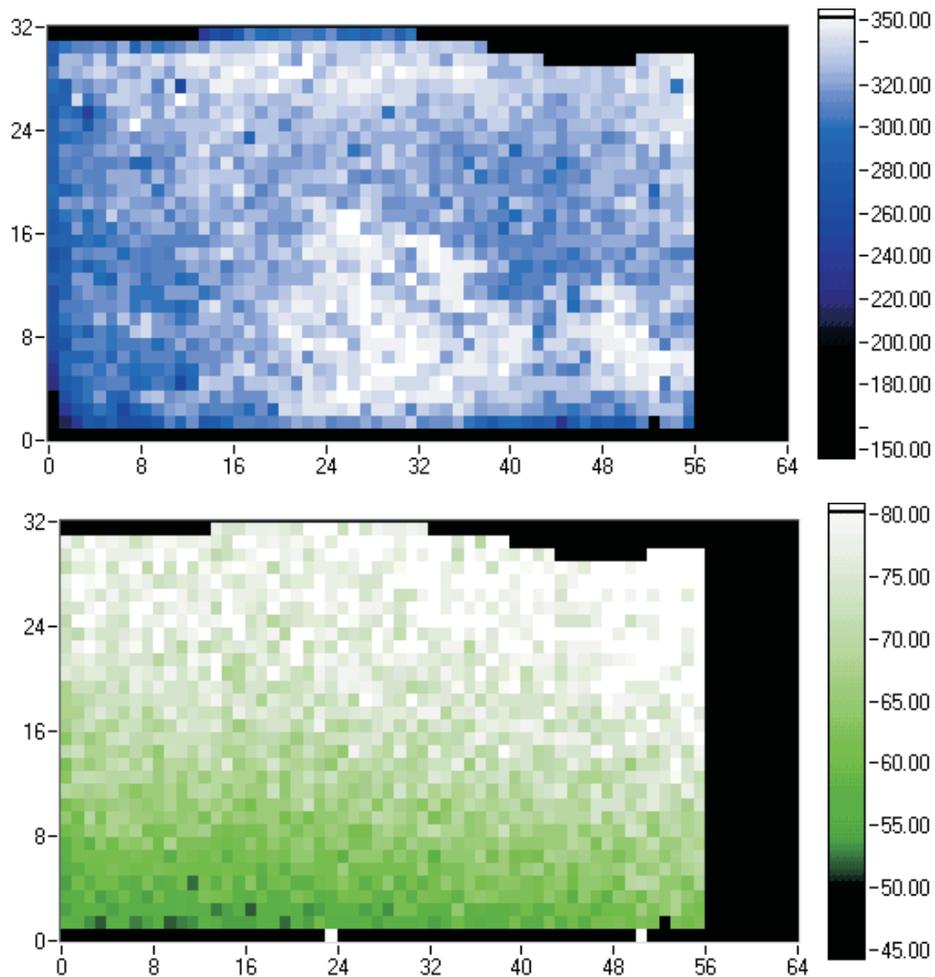


Bild 5.2: Kennlinienkarten eines Chips. Spalten 56–63 wurden permanent deaktiviert (Siehe Abschnitt 5.4). **Oben:** Die Offsets streuen über das ganze Array hinweg bis zu 100 mV um den Mittelwert. **Unten:** Die Steilheiten ändern sich systematisch entlang der Diagonalen.

Offsetstreuung

Die Kennlinien besitzen durchwegs positive Offsets, die Einsatzspannungen betragen typischerweise 200–300 mV. Zu den Rändern hin (Spalte 0, Zeilen 0 und 31) sind die Offsets auffällig kleiner, ansonsten ist keine Systematik erkennbar. Die Breite der Verteilung liegt je nach verwendetem Chip und Vorgeschichte bei 50–100 mV (siehe auch nächster Abschnitt: Drift). Da das Messfenster des Einzelsensors nur 20 mV beträgt, ist die Streuung innerhalb des Arrays für die gleichzeitige Messung an einer beliebigen Kombination von Sensoren zu groß.

Steilheitenstreuung

Die Steilheitenkarte aller Chips weist einen typischen Anstieg entlang der Diagonalen vom Sensor 0/0 hin zur Position 63/31 auf. Dabei liegen die Steigungen zwischen 55–100 mV/mV. Dieser Verlauf kann durch eine Änderung der Beschaltung von außen nicht beeinflusst werden, und ist über mehrere Stunden konstant. Die Steilheitenstreuung ist bei allen untersuchten Chips sehr ähnlich, tritt also zu regelmäßig auf, als dass sie auf äußere Parameter wie etwa die Lage des Chips auf dem Wafer zurückzuführen wäre. Sie ist eine direkte Folge des Chipdesigns; Ursache ist vermutlich die Asymmetrie der Sensorpositionen im Arrayfeld bezüglich der Anordnung und Länge der Versorgungsleitungen: Die Sensoren mit längeren Versorgungsleitungen besitzen höhere Steilheit.

5.3 Drift

Während die Verteilung der Steilheiten auch bei anhaltender Beschaltung des Chips stabil bleibt, beobachtet man unter dem Einfluss der Nährlösung eine zeitliche Verschiebung der Transistoroffsets. Zur Untersuchung der Drift im Elektrolyten (u. a. 40 mM NaCl, siehe Anhang) wurden an einem zuvor gereinigten Chip im zeitlichen Abstand von einer Stunde Kennlinienfelder aufgenommen. Die Offsets wurden als Karten aufgetragen, ihre Häufigkeitsverteilungen zusätzlich in Histogrammen dargestellt.

Die erste Karte in *Bild 5.3* täuscht eine große anfängliche Inhomogenität vor. Tatsächlich erfolgt in den ersten Minuten eine rasche Verschiebung des Offsets. Da die Spalten von links nach rechts im Abstand von einer Minute aufgenommen wurden, ist die Offsetkarte mit einem Zeitverlauf behaftet (Abschnitt 4.6).

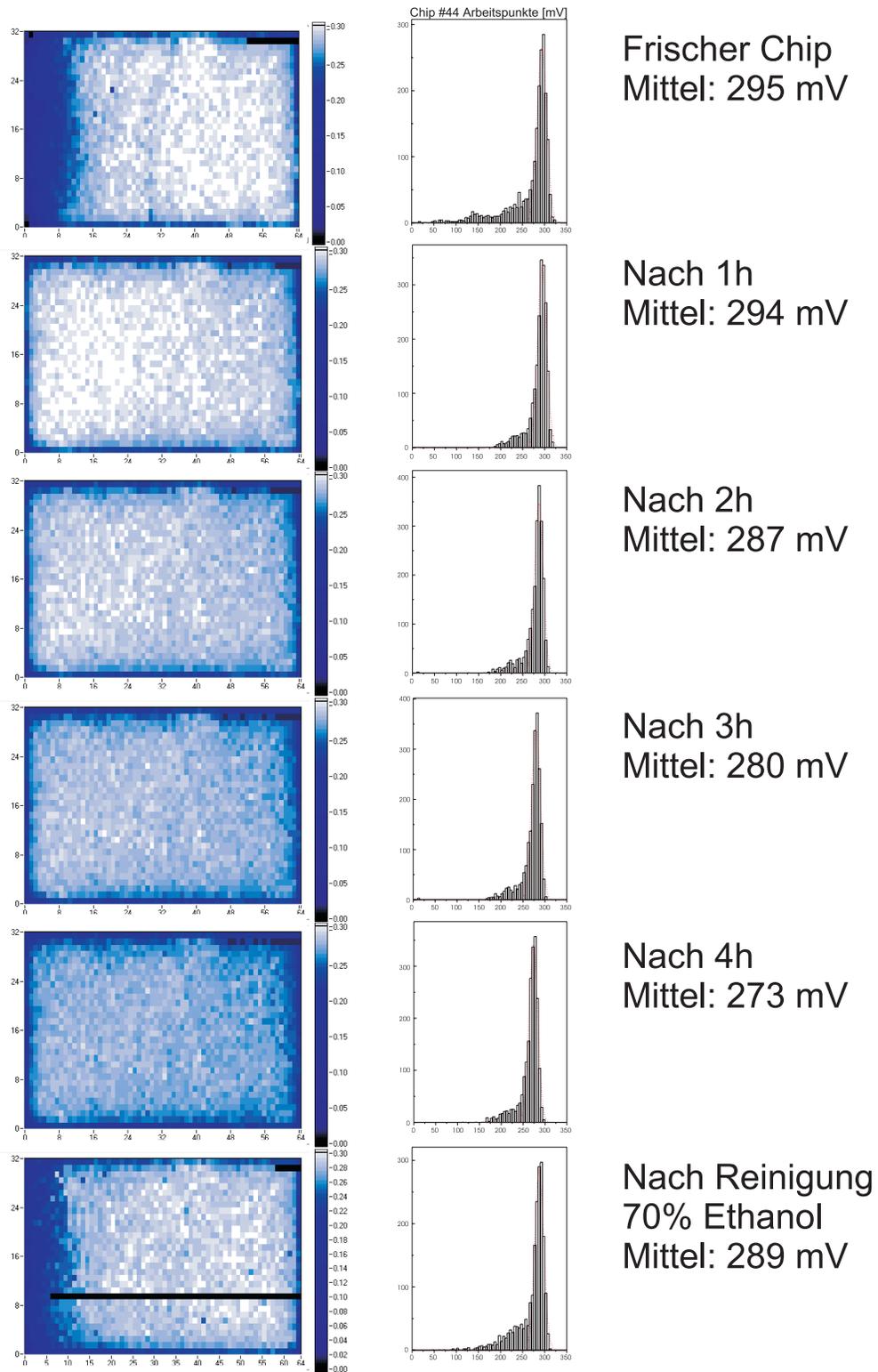


Bild 5.3: Zeitliche Entwicklung der Kennlinienoffsets. Ganz oben der frisch geputzte Chip, dann Messungen im Abstand je einer Stunde.

In den folgenden Stunden relaxiert das Kennlinienfeld zu einer relativ stabilen Verteilung: Nach 5 Stunden streuen die Offsets etwa 50 mV um den Mittelwert. Nach Reinigung ergibt sich ein ähnlicher Verlauf wie beim ersten Einschalten.

Ursache für die Drift ist vermutlich ein Eindringen von Na^+ -Ionen in die Zwischenräume zwischen Wolframnägeln und Kontaktlöcher. Die eindringenden Ionen verändern dabei die Einsatzspannungen der floatenden Transistoren.

Zur Begegnung der Drift muss bei zukünftigen Chipgenerationen auf eine bessere Auffüllung der Kontaktlöcher geachtet werden (siehe hierzu auch Abschnitt 5.5). Außerdem sollte die Oberfläche durch Aufbringen einer zusätzlichen Passivierungsschicht versiegelt werden, um einen direkten Kontakt des Elektrolyten mit den Kontaktnägeln zu vermeiden. Ein Versuch von Siemens, in Charge 6 nachträglich eine isolierende Si_3N_4 -Schicht auf die fertig prozessierten Chips aufzubringen, schlug fehl, so dass keine konkrete Aussage über den Nutzen einer solchen Schicht gemacht werden konnte. In der nächsten Chipgeneration muss der zusätzliche Prozessschritt deshalb bereits in der Planung fest vorgesehen werden. Zukünftige Layouts sollten außerdem eine Resetleitung besitzen, über die die Gates der Neuro-Transistoren geerdet werden können; angesammelte Ladungen könnten so abfließen, und die Einsatzspannungen der Transistoren damit zurückgesetzt werden.

5.4 Spaltenselektion

5.4.1 Schaltfunktionen

Gemäß der Unterteilung des Sensorfelds in eine 64×32 -Matrix ist zu jedem Zeitpunkt eine von 64 Spalten aktiv, die 32 Sensorausgänge der aktiven Spalte können prinzipiell gleichzeitig ausgelesen werden. Im Multi-Site-Recording-Experiment soll eine Anzahl von Sensoren in schneller Reihenfolge zyklisch ausgelesen werden, daher ist ein schnelles und sicheres Umschalten der aktiven Spalte nötig.

Auf dem Chip befinden sich zwei Standard CMOS-Dekodierschaltungen, die bei hoher Taktrate jeweils aus einem vorgegebenen 3-Bit-Wort eine 1-aus-8-

Leitungsauswahl vornehmen. Die beiden Stränge zu je 8 Partialexlektionsleitungen sind über eine 8×8 -Matrix verschaltet. Jeder der 64 Verknüpfungspunkte wird als Spaltenselektionsleitung in das Array hineingeführt und schaltet dort lokal die einzelnen Verstärker dieser Spalte ein und aus (Bild 5.4).

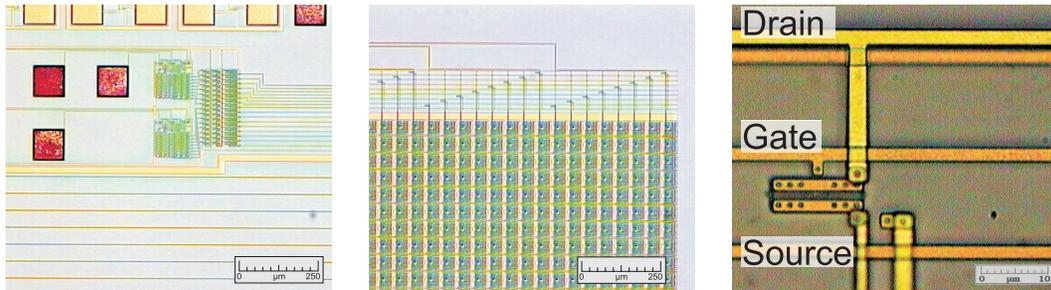


Bild 5.4: Links: Die beiden 1-aus-8-Auswahlblöcke mit ihren 16 Partialexlektionsleitungen. Mitte: Ausschnitt der 8×8 -Schaltmatrix. Rechts: Eine der 64 Verknüpfungsstellen der beiden Achterblöcke. Die Verschaltung in Form eines einfachen n-Kanal-Transistors anstelle eines echten UND-Gatters verhindert ein schnelles Abschalten der selektierten Spalte.

5.4.2 Schaltmatrix

Jeder der 64 Verknüpfungspunkte der 8×8 -Matrix stellt eine logische Operation zwischen den beiden Eingangssignalen dar. Damit zu jedem Zeitpunkt genau eine der 64 Selektionsleitungen aktiv ist, muss diese Verschaltung durch ein UND-Gatter erfolgen.

In der vorliegenden Implementierung des Chips wurde stattdessen ein n-Kanal-Feldeffekttransistor eingebaut. Gate und Drain sind die beiden Partialexlektionsleitungen (Eingänge des logische Gatters), Source ist die Spaltenselektionsleitung (Bild 5.5). Das Umschalten der aktiven Drainleitung funktioniert problemlos: Die zuletzt aktive Selektionsleitung entlädt sich über den durchgeschalteten Transistor, die neue lädt sich auf.

Dagegen ergibt sich beim Umschalten der Gateleitung ein Problem: Beim Abschaltvorgang ändert sich der logische Zustand der zum Gate führenden Partialexlektionsleitung von 1 auf 0, die Gatespannung fällt damit schnell auf die negative Spannung ab. Der Source-Drain-Kanal „macht zu“ und wird hoch-

ohmig. Damit können die vorher angesammelten Ladungen auf der zuletzt aktiven Selektionsleitung hinter dem Transistor nicht abfließen und die Spalte wird nicht abgeschaltet.

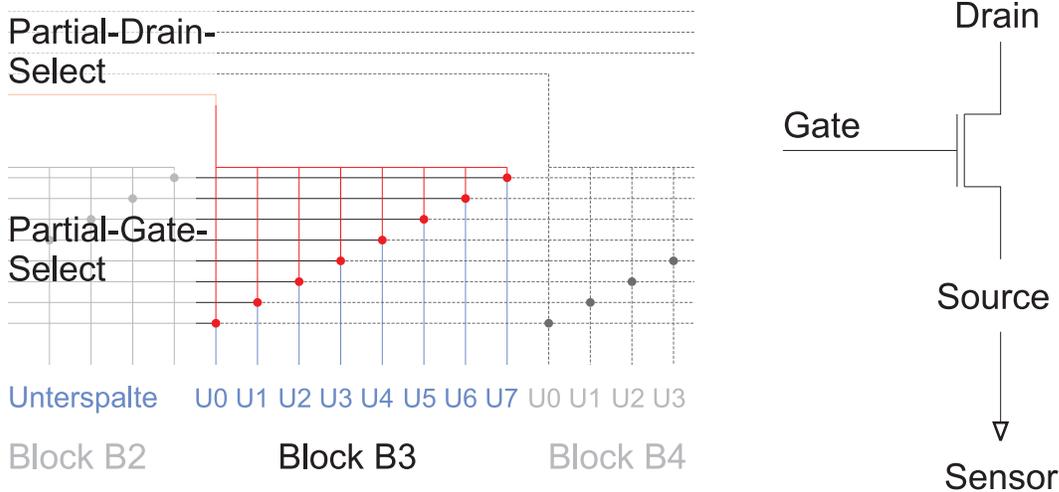


Bild 5.5: Links: Schematische Darstellung der Verknüpfungsmatrix. Die Partialselektionsleitung für das Gate adressiert den Block, die Drainleitung die Unterspalte innerhalb des Blocks. **Rechts:** Die Verknüpfungspunkte der Matrix sind n-Kanal-Transistoren. Damit sich die selektierte Spalte (Source) entladen kann, muss die Gateleitung auf High, die Drainleitung auf Low liegen.

Das Nichtabschalten der alten Spalte ist extrem problematisch, da nach diesem Schaltvorgang nicht mehr nur eine, sondern jeweils zwei aktive Spalten an jede der 32 Ausgangsleitungen angekoppelt sind. Im vorgesehenen Betrieb folgen viele solcher Schaltvorgänge aufeinander, so dass im Allgemeinen bis zu acht Sensoren aus acht Spalten das Signal der Ausgangsleitung überlagern.

5.4.3 Problemumgehung

Ausgehend von der Verschaltung der 8×8 -Matrix (Bild 5.5) ist das Arrayfeld aufgeteilt in

- 8 Blöcke (B0–B7), adressiert durch das High-Tripel des Selektionswortes. In der 8×8 -Matrix sind dies die Drainleitungen.

- 8 benachbarte Unterspalten (U0–U7) innerhalb des selektierten Blocks, adressiert durch das Low-Tripel, die Gateleitungen der Matrixtransistoren.

Wie im letzten Abschnitt erklärt, wird beim Umschalten der Gateleitung eine neue Unterspalte selektiert, ohne dass die alte Spalte abgeschaltet wird. Um das Problem zu umgehen, wurde ein Achterblock (B7) durch Auftrennen der Gate-Selektionsleitung permanent inaktiviert. Ein darauf angepasstes Schaltprotokoll garantiert, dass zu jedem Zeitpunkt maximal eine Spalte von Sensoren aktiviert ist.

Vor jedem Umschalten der Gateleitung wird zuerst durch das sichere Umschalten der Drainleitung in diesen inoperativen Block die alte Spalte definiert abgeschaltet. Da der geopfert Block auf allen acht Selektionsleitungen permanent elektrisch inaktiv ist (Drain „offen“ wird als „Low“ interpretiert), kann die Gateleitung jetzt problemlos umgeschaltet werden, ohne dass dabei eine neue Selektionsleitung aufgeladen wird. Erst durch Zurückschalten der Drainleitung in einen der operativen Unterblöcke wird wieder eine Spalte von Sensoren aktiviert.

5.4.4 Schaltzeit

Die Leiterbahnauftrennung des Chips erfolgt am bereits gesägten Wafer unter dem Mikroskop. Mit einem geerdeten Skalpell wird dabei die äußerste der 16 Partialektionsleitungen durchgeschnitten. Nach der Auftrennung sind die letzten 8 Spalten permanent deaktiviert, es verbleiben 56 nutzbare Spalten.

Das bereits angesprochene „sichere“ Umschaltprotokoll gewährleistet, dass zu jedem Zeitpunkt der Messung genau eine der 56 Spalten aktiv ist. Es wird vom Messprogramm folgendermaßen implementiert:

1. Vor Beginn der Messung erfolgt definiertes Abschalten aller 56 aktiven Spalten durch Programmieren der Spaltenfolge 56, 57, . . . , 63 im inoperativen Block (Block B7, Unterspalten U0, U1, . . . , U7).
2. Wird während der Messung das Low-Tripel der aktiven Spalte und damit die Gate-Partialeitung geändert, so wird zunächst immer auf die korrespondierende Unterspalte im inoperativen Block geschaltet. Dabei entlädt sich die alte

Selektionsleitung und die Sensoren der betreffenden Spalte werden deaktiviert. Innerhalb des Umschaltblocks kann die Unterspalte sicher umgeschaltet werden. Abschließend erfolgt die Programmierung der Zielspalte. Ein kompletter Schaltvorgang erfordert also drei Schaltschritte.

Bild 5.6 dokumentiert die Umschaltproblematik und ihre Lösung durch Zwischenschalten auf den inoperativen Auswahlblock. Das Signal der Ausgangsleitung ändert sich bei direktem Umschalten der aktiven Spalte nicht. Erst durch sicheres Umschalten gemäß dem Umschaltprotokoll wird die alte Sensorzelle von der Ausgangsleitung getrennt und die neue Sensorzelle aktiviert. Aufgrund der Offsetstreuung in den Sensorkennlinien ergeben sich unterschiedliche Levels in den Ausgangssignalen.

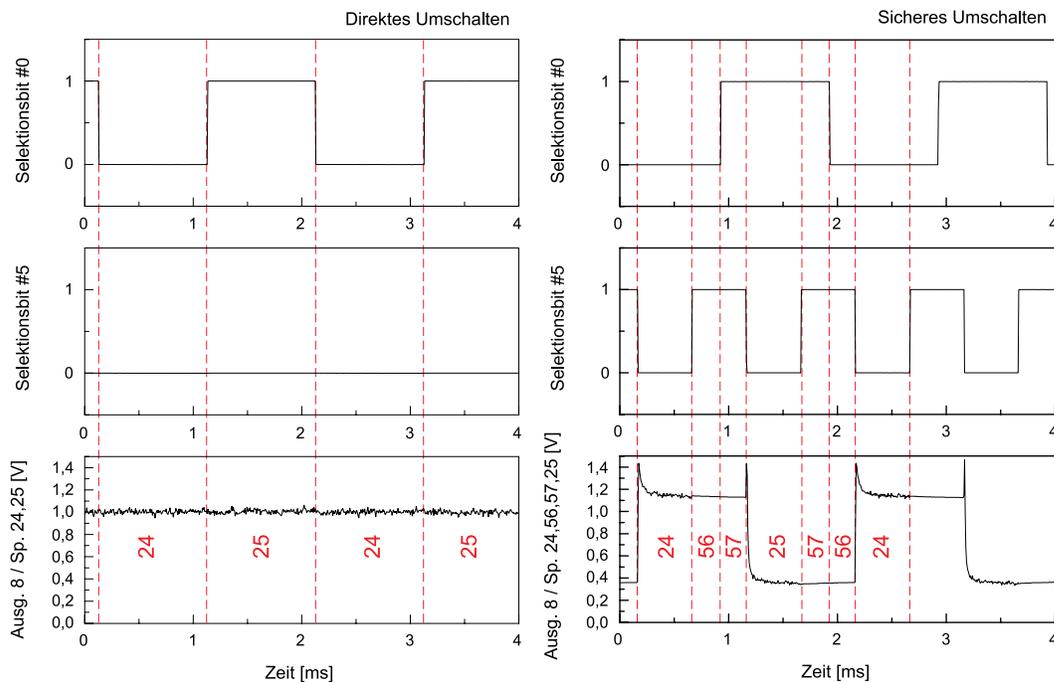


Bild 5.6: Links: Wiederholter Spaltenwechsel durch direktes Umschalten bleibt ohne Auswirkung auf das Ausgangssignal. **Rechts:** Beim sicheren Umschalten wird zuerst durch einen Zwischenschritt die alte Spalte definiert abgeschaltet. Eine aktive Spalte wird jeweils auf die absteigende Flanke von Bit #5 selektiert, wenn vom deaktivierten Block B7 zurück in den aktiven Block geschaltet wird. Erst dann liegt der neue Sensor am Ausgangssignal an.

Im rechten Diagramm erkennt man nach dem Umschalten kleine Überschwin- ger mit anschließender Relaxation ($< 10 \mu\text{s}$), bevor sich die Signale stabilisiert

haben. Dies stellt bei der aktuellen Kombination von Chip und Apparatur die tatsächliche Einschwingzeit dar. Aufgrund des dreifachen Umschaltprozesses ergibt sich daraus eine Minimalumschaltzeit von $30 \mu\text{s}$ für jeden „kritischen“ Spaltenwechsel. Diese Zeit ließe sich durch eine Verkürzung der zusätzlichen „sicheren“ Schaltschritte reduzieren, allerdings ist eine solche individuelle Programmierung einzelner Schaltzeiten bei der momentanen Apparatur nicht vorgesehen. Zusätzlich kann durch Minimierung der Kabellänge zwischen Chip und PC die Kapazität der Ausgangsleitungen vermindert und damit die Relaxationszeit reduziert werden.

Eine deutliche Verbesserung des Schaltverhaltens ist in künftigen Chips durch Implementierung der Matrixverknüpfungen als echtes UND-Gatter zu erzielen.

5.5 Kontaktbereich

5.5.1 Geometrie

Das Polysiliziumgate des Neuro-Transistors wird von neun quadratisch angeordneten Wolframnägeln an die Oberfläche geführt (*Bild 5.7*). Der Kontaktbereich für ein Neuron ist dadurch über $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ausgedehnt, alle Wolframkontakte sind leitend miteinander verbunden (Abschnitt 3.3).

Dies beeinträchtigt die Kopplungsausbeute. Damit eine Kopplung zwischen Zelle und Sensor zustande kommt, muss die Zellmembran den Kontaktbereich gut abdecken, d. h. vom Bad elektrisch isolieren. Dies gelingt mit zunehmender Flächenausdehnung des Kontaktbereichs schlechter: Bei der hier verwendeten 9-Nagel-Geometrie macht ein einziger unbedeckter Wolframkontakt die Kopplung zunichte. Der Abdichtwiderstand des durch die Zelle abgetrennten Kompartiments wird kurzgeschlossen, der Sensor misst Badpotential.

Mit Zelldurchmessern von etwa $50 \mu\text{m}$ (Blutegel, Schnecke) wird bei günstiger Lage die Kopplungsfläche abgedichtet, bei den deutlich kleineren Säugetierneuronen mit Durchmessern von $10 \mu\text{m}$ (Ratte) ist ein Abdichten dieser Nagelstruktur aber ausgeschlossen.

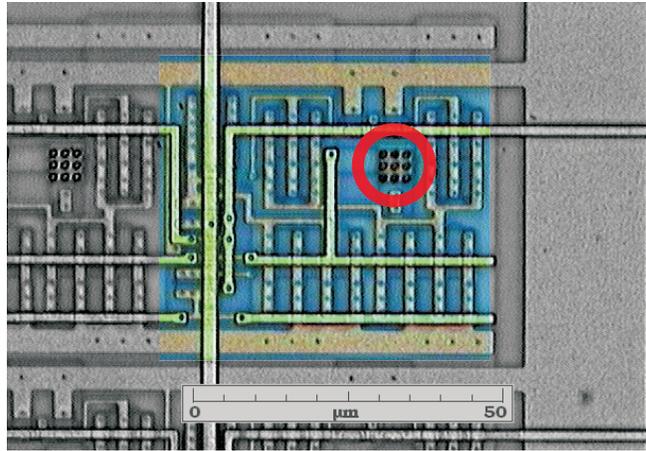


Bild 5.7: Sensoreinheit mit integrierter Verstärkerschaltung. Der rot markierte Kontaktbereich besitzt eine Ausdehnung von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, der zugehörige Neuro-Transistor liegt rechts des Kontaktbereichs. Benachbarte Sensoreinheiten besitzen einen Rasterabstand von $50 \mu\text{m}$.

5.5.2 Kontaktlochauffüllung

Die Kontaktlöcher haben einen quadratischen Querschnitt von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ bei einer Tiefe von $2 \mu\text{m}$. Die Auffüllung mit Wolfram erfolgt in einem CVD-Prozess, der ursprünglich nicht für ein solch enges Aspektverhältnis ausgelegt war.

Daher waren unvollständig aufgefüllte Kontaktlöcher ein Dauerproblem bei der Prozessierung der Wafer. Typische Fehler sind gänzlich leere Kontaktlöcher, trichterförmige Löcher in den Wolframnägeln, oder nur oberflächliche Füllungen in Form von Wolframpfropfen, die nicht hinunter bis zum Polysilizium reichen (*Bild 5.8*).

Um dennoch mit dem vorliegenden Maskensatz brauchbare Chips herstellen zu können, wurde mit der Variation verschiedener Prozessparameter experimentiert. Das Aspektverhältnis konnte durch starkes Überbelichten der Kontaktlochmaske verbessert werden. Zusätzlich wurde die Abscheidungsstärke der Ti/TiN-Kontakt/Barrierschicht im CVD-Prozess vergrößert, um auch in der Tiefe eine vollständige Bedeckung zu erreichen.

Damit gelang es bei den vier Wafern der 5. Charge, gute Wolframnägeln herzustellen. Trotzdem gab es aufgrund der beschriebenen Probleme nie vollständige

Sicherheit für die korrekte Ausführung aller Kontakte eines Arrays. Die Kontaktlochauffüllung war deshalb immer eine potentielle Fehlerquelle für defekte oder unregelmäßige Sensorkennlinien.

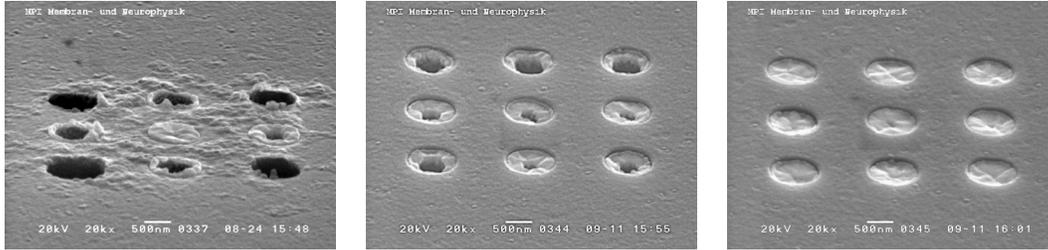


Bild 5.8: Links: Defekte Kontaktnägel. Mitte: Unvollständig aufgefüllte Kontaktnägel. Rechts: Gute Kontakte.

In zukünftigen Chips sollte anstelle der neun miteinander verbundenen Kontaktpunkte nur ein einzelner Nagel mit größerem Querschnitt verwendet werden. Wegen der verminderten Gesamtausdehnung wird damit sowohl die Kopplungsausbeute beim Neuron-Silizium-Kontakt erhöht, als auch das für die Auffüllung der Kontaktlöcher maßgebliche Aspektverhältnis verbessert.

5.6 Rauschen

5.6.1 Anforderungen

Damit extrazellulär mit FET-Sensoren Aktionspotentiale detektiert werden können, muss das Rauschen des Gesamtsystems deutlich kleiner sein als die zu erwartenden Kopplungssignale. Während die intrazellulär gemessenen Signale von 50–80 mV bei allen Neuronen vergleichbare Größe besitzen, hängt die vom Gate des Transistors „gesehene“ Spannungsamplitude unter anderem stark von der Kopplungsfläche zwischen Neuron und Silizium, und damit vom Durchmesser der Zelle ab [33].

Für Blutegel- und Schneckenneurone mit über 50 μm Zelldurchmesser ergeben sich typischerweise Kopplungen bis zu mehreren mV [14]. Dagegen fallen die Signale bei den neurobiologisch interessanteren Hippocampuszellen der Ratte

wegen ihres deutlich kleineren Durchmesser von $10\ \mu\text{m}$ wesentlich geringer aus: In [28] wurden durch Mittelung über viele Sweeps FET-Signale von $150\ \mu\text{V}$ an einer Rattenzelle nachgewiesen.

Aus diesen Daten ergeben sich die Anforderungen an das Signal-Rausch-Verhältnis der FET-Sensoren: Rausch- und Störsignale müssen deutlich kleiner als $100\ \mu\text{V}$ sein, damit per Sensor einzelne Aktionspotentiale an Rattenkulturen detektiert werden können.

5.6.2 Rauschen der Sensorausgänge

Die Messung des Rauschens erfolgte mit einer speziell für solche Zwecke entwickelten Messapparatur von Moritz Völker [29]. Dazu wurde eine der Ausgangsleitungen des Chips an den A/D-Wandlereingang der Rauschmessapparatur geführt. Um Erdschleifen zu vermeiden, wurden die Chipausgänge von der normalerweise für die Kopplungsexperimente verwendeten Messkarte getrennt; die Programmierung der aktiven Spalte erfolgte aber auch für die Rauschexperimente vom Standard-Mess-PC aus. Die Spannungsversorgung des Chips wurde aus Batterien gespeist (Kapitel 4.3).

Die Rauschmessung wird im steilen Bereich des Kennlinie durchgeführt. Dazu wird die Offsetspannung so eingestellt, dass das Ausgangssignal des selektierten Sensors zwischen $0.6\text{--}0.8\ \text{V}$ beträgt. Die spektrale Leistungsdichte und die Rauschkennzahl werden über die Kennliniensteigung auf gatebezogene Spannungen umgerechnet und aufgetragen (Zur Definition der spektralen Leistungsdichte $S_V(f)$ und der Rauschkennzahl V_{LFN} siehe Anhang und [29]).

Die spektrale Leistungsdichte in *Bild 5.9* ist eine Überlagerung von Kurvenformen: Im niederfrequenten Bereich bis $1\ \text{kHz}$ fällt $S_{V_g}(f)$ in etwa mit $1/f$ ab. In der doppeltlogarithmischen Auftragung entspricht das einem linearen Abfall mit Steigung -1 . Dieser Verlauf lässt sich für MOSFET-Transistoren direkt aus dem Modell der Beweglichkeitsfluktuationen herleiten [29].

Das Verhalten für höhere Frequenzen ist komplex. Ab $10\ \text{kHz}$ fällt die Rauschkurve stark ab. Tatsächlich handelt es sich um einen frequenzabhängigen Abfall der Übertragungsfunktion der sensoreigenen Verstärkerschaltung. Die Bandbreitenbeschränkung für hohe Frequenzen wirkt sich direkt auf die Rauschleistung aus.

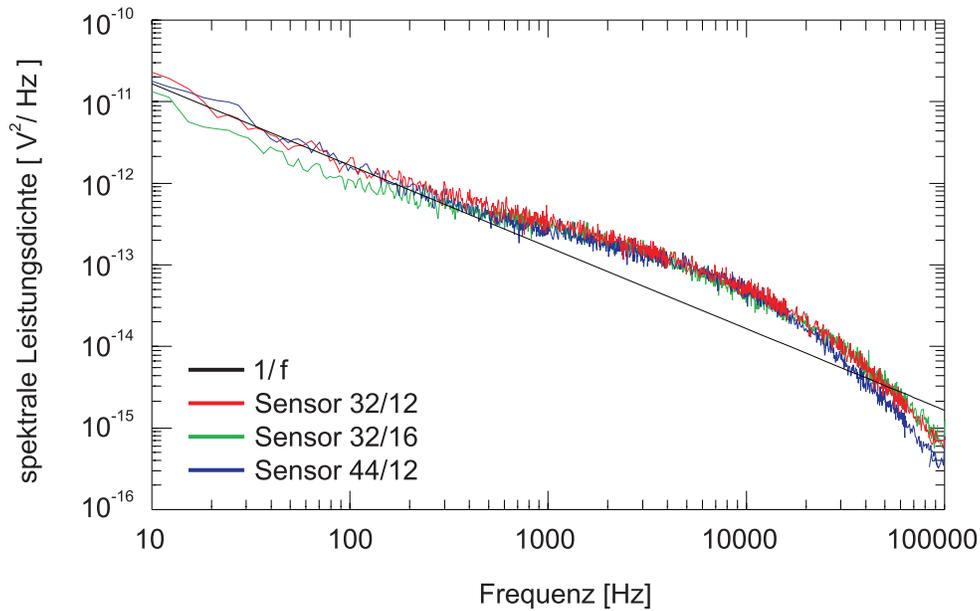


Bild 5.9: Rauschen von drei der 2048 Array-Sensoren. Im niederfrequenten Bereich bis 1 kHz entspricht die spektrale Leistungsdichte in etwa dem erwarteten $1/f$ -Verlauf eines Feldeffekttransistors. Ab 10 kHz tritt durch die Bandbreitenbeschränkung der chipeigenen Verstärkerschaltung ein starker Abfall ein.

Aus der Integration über die spektrale Leistungsdichte im Frequenzbereich 100 Hz–2 kHz ergeben sich für die Messungen aus *Bild 5.9* die gatebezogenen Rauschkennzahlen $V_{\text{LFN}} = 29 \mu\text{V}$ (rot), $26 \mu\text{V}$ (grün) und $24 \mu\text{V}$ (blau). Bei insgesamt 9 Messungen an verschiedenen Sensorausgängen von zwei Chips streute dieser Wert zwischen 20–40 μV .

5.6.3 Konsequenzen für Kopplungsmessungen

Die Rauschkennzahl von $V_{\text{LFN}} \leq 40 \mu\text{V}$ bedeutet eine theoretische Rauschamplitude von $V_{\text{pp}} = \sqrt{2} \cdot V_{\text{LFN}} \leq 113 \mu\text{V}$.

Tatsächlich beobachtet man bei Kopplungsmessungen eine Rauschamplitude von 200 – 300 μV (siehe Messungen in Kapitel 6).

Die Diskrepanz erklärt sich aus der verwendeten Abtastrate der Digitalisierungskarte bei der Messung: Gemessen wurde typischerweise bei Samplingraten von 5–10 kHz. Nach dem Abtasttheorem von Shannon beträgt die maximal

auflösbare Frequenz bei Abtasten eines Signals genau die Hälfte der Samplingfrequenz. Alle höheren Frequenzen können nicht korrekt erfasst werden und erscheinen als Spiegelfrequenzen in den niedrigeren, im Bereich der erfassbaren Frequenzen liegenden Werte. Das Problem ist als Aliasing bekannt. Normalerweise wird ihm durch Vorschalten eines Tiefpassfilters begegnet, der genau jene Frequenzen herausfiltert, die oberhalb der Nyquist-Frequenz liegen.

Im Falle des Siemens-Arrays ist dies aber nicht so ohne weiteres möglich: Da dieselben A/D-Wandler innerhalb einer Multisite-Recording-Messung für das sequentielle Auslesen mehrerer Spalten genutzt werden, ergibt sich insgesamt eine höhere Summenabtastrate für jede Ausgangsleitung. Das chipexterne Zwischenschalten eines Antialiasing-Filters, der an die effektive Samplingrate des Einzelsensors angepasst wäre, würde daher ein Multiplexing zunichte machen.

Eine Bandbreitenbegrenzung muss in künftigen Layouts sinnvollerweise schon auf der Chipseite bei der internen Verstärkung der Signale erfolgen.

Kapitel 6

Neuron Messungen

6.1 Aufgesetzte Blutegelneuronen

6.1.1 System: *Hirudo medicinalis*

Retziuszellen aus dem Blutegel *Hirudo Medicinalis* (Bild 6.1) sind ein gut erprobtes System zum Test der Neuron-Silizium-Kopplung an neuen Chips [9], [26], [32]. Aufgrund ihres großen Durchmessers von $50\ \mu\text{m}$ können sie den Kopplungsbereich des Neuron-Silizium-Kontakts sehr gut abdecken. Dadurch wird eine hohe und qualitativ gute Kopplungsausbeute erzielt.

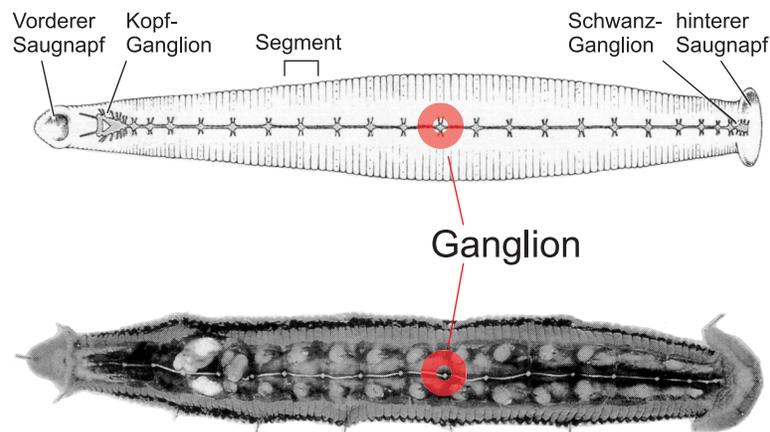


Bild 6.1: Nervensystem des Blutegels. Einige der 21 Ganglien an Kopf und Schwanzende sind miteinander verschmolzen [23].

Retziuszellen treten in den 21 Ganglien des Blutegels paarweise auf. Sie sind sich in Aufbau, Größe und Signalform sehr ähnlich und erlauben dadurch reproduzierbare Experimente.

6.1.2 Präparation und Versuchsdurchführung

Die beiden Retziuszellen eines Ganglions sind anhand ihrer Größe leicht zu identifizieren (*Bild 6.2*) und können mit einer Saugpipette von 100 μm Durchmesser extrahiert werden [23], [24].

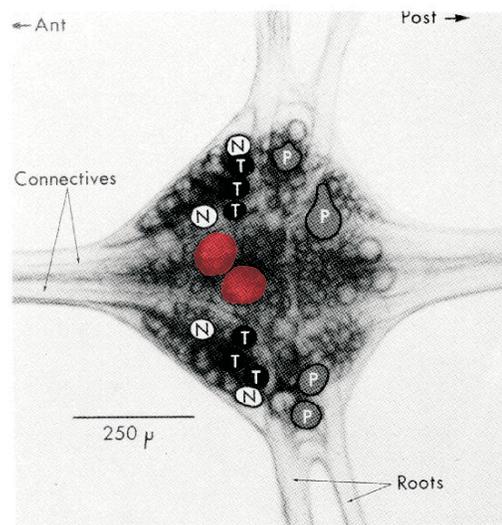


Bild 6.2: Lage der Nervenzellen in einem Blutegel-Ganglion. Für die Experimente wurden die zentralen, besonders großen Retziuszellen (rot hervorgehoben) verwendet [23].

Für die hier vorgestellten Experimente wurden die Neurone üblicherweise am Vortag der Experimente aus dem Egel herauspräpariert, teilweise verstrichen zwischen Präparation und Messung auch zwei Tage. Die Lagerung erfolgte in einem mit Leibovitz L15-Medium gefüllten Zellkulturschälchen bei 20 °C im Brutschrank.

Die Reinigung des Chips vor den Experimenten erfolgt mittels Ethanol (70%) in mehreren Durchgängen. Dafür wird die Wanne über dem Chip mit heißem Ethanol gefüllt. Mechanisches Reiben mit einem Wattestäbchen unterstützt

den Reinigungsvorgang. Nach Abspritzen des Ethanol mit Millipore-Wasser wird der Vorgang zwei- bis dreimal wiederholt. Abschließend werden Chip und Messkammer nochmals gründlich mit Reinstwasser gespült. Insbesondere ist dabei auf das Abfließen des Wassers von der Chipoberfläche zu achten: Ein gleichmäßiges Haften des Wasserfilms bedeutet eine hydrophile Oberfläche, wichtig für ein gutes Anhaften der Zellen beim Aufsetzen und ein Indiz für einen sauberen Chip. Nach erfolgreicher Reinigung werden die Chips mit der Stickstoffpistole trockengeblasen.

Bild 6.3 zeigt das experimentelle Vorgehen: Zunächst wird durch Eintauchen einer Saugpipette (Durchmesser $75\ \mu\text{m}$) in eine Poly-L-Lysinlösung (siehe Anhang) etwas Haftvermittler aufgenommen. Durch vorsichtiges Aufsetzen der Pipettenöffnung spreitet auf der hydrophilen Oberfläche ein kleiner Polylysin-Tropfen. In wenigen Sekunden trocknet der Tropfen zu einem kreisförmigen Flecken auf den Sensoren aus, der Chip ist für Neurone nun extrem „klebrig“.

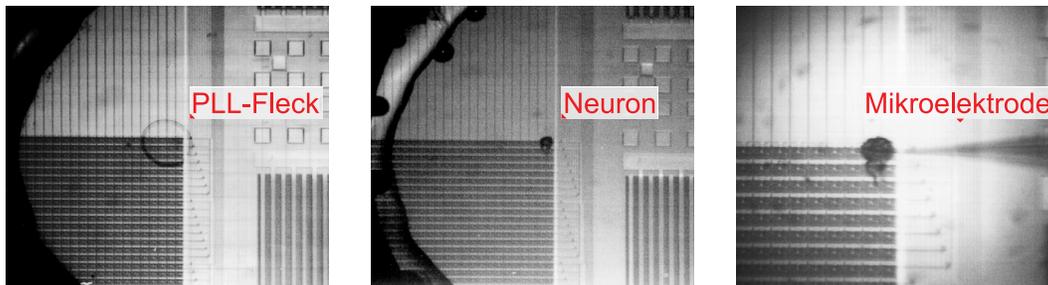


Bild 6.3: Aufsetzen eines Blutegelneurons. **Links:** Eintrockneter Poly-L-Lysin-Tropfen auf Spalte 0 des Arrays. **Mitte:** Ein Neuron wurde auf Spalte 0, Ausgang 30 aufgesetzt. Da zuvor L15-Medium eingefüllt wurde, ist der Polylysinfleck nicht mehr sichtbar. **Rechts:** Das Anstechen des Neurons erfolgt bei höherer Verstärkung der Lupe als das Aufsetzen.

Im nächsten Schritt wird die Wanne mit etwa 1 ml Medium-Lösung gefüllt, die Badelektrode an der Halterung befestigt und in den Elektrolyten getaucht. Es ist wichtig, das Aufsetzen der Neurone möglichst zügig nach Einfüllen des Mediums durchzuführen, da die Wirkung des eingetrockneten Polylysins rasch nachlässt.

Hierfür wird das Schälchen mit den extrahierten Zellen unter eine zusätzliche

Lupe gelegt. Unter der Übersetzlupen wird jeweils ein Neuron mit einer Saugpipette aufgenommen. Unter Beobachtung durch die Experimentierlupe wird die Zelle behutsam über dem Chip ausgeblasen. Durch vorsichtig dosiertes Saugen und Blasen während des Absinkens wird das Neuron über dem Zielsensor positioniert.

Das Einstechen der Mikroelektrode erfolgt unter Beobachtung des Elektrodensignals am PC. Die Anstechpipette wird mit dem Mikromanipulator unmittelbar über dem Neuron positioniert und dann solange vorsichtig abgesenkt, bis entweder ein deutlicher Spannungssprung im Elektrodensignal auftritt oder spontane Aktionspotentiale der verletzten Zellmembran detektiert werden. Um die Zelle vor einem vorzeitigen Ermüden durch wiederholtes Feuern zu bewahren, wird ihr Membranpotential durch Anlegen eines hyperpolarisierenden Injektionsstroms soweit heruntergeklemmt, dass keine spontanen Aktionspotentiale mehr auftreten.

Mit Hilfe der Stereolupe kann nun die Position des FET-Sensors unter dem Neuron nach Spalte und Zeile ermittelt und in der Kanalliste des Messprogramms eingetragen werden. Für die erste Runde der Blutegelmessungen wurde hier immer Spalte 0 eingegeben, in späteren Messungen war die Spaltenauswahl beliebig (siehe folgende Abschnitte).

Bevor am ausgewählten Sensor gemessen werden kann, muss dessen Kennlinie abgeglichen werden. Anhand eines Potentiometers kann manuell die am Chip anliegende Offsetspannung variiert werden. Die Spannung wird unter Beobachtung des Ausgangssignals am Bildschirm solange variiert, bis das Nullsignal des Sensors in der Mitte des Messfensters liegt. Dadurch wird sichergestellt, dass der volle Messbereich des FET-Sensors für die Messung genutzt werden kann.

6.1.3 Erste Kopplungen an ausgewählter Sensorspalte

Vierte Chipcharge

Die erste Serie Messungen an Blutegeln wurde im Dezember 1996 und Januar 1997 primär zum Test der 4. Chipcharge durchgeführt. Um trotz eines Fehlers in der Auswahllogik an Chips dieser Charge messen zu können, nahm Siemens eine Leiterbahnauftrennung an der Spannungsversorgung des

Arrays vor (Abschnitt 3.4 gibt eine genauere Beschreibung des Problems und bietet eine Übersicht über alle Chargen). Dadurch wurden 63 der 64 Spalten permanent abgeschaltet, als einzige aktive Spalte verblieb Spalte 0. Sämtliche Messungen dieser Serie wurden daher an den 32 Sensoren dieser einen Spalte durchgeführt.

In dieser ersten Messreihe gelangen acht Kopplungen. Soweit klassifizierbar wiesen alle Chipsignale typisches biphasisches (A-Typ) Kopplungsverhalten auf.

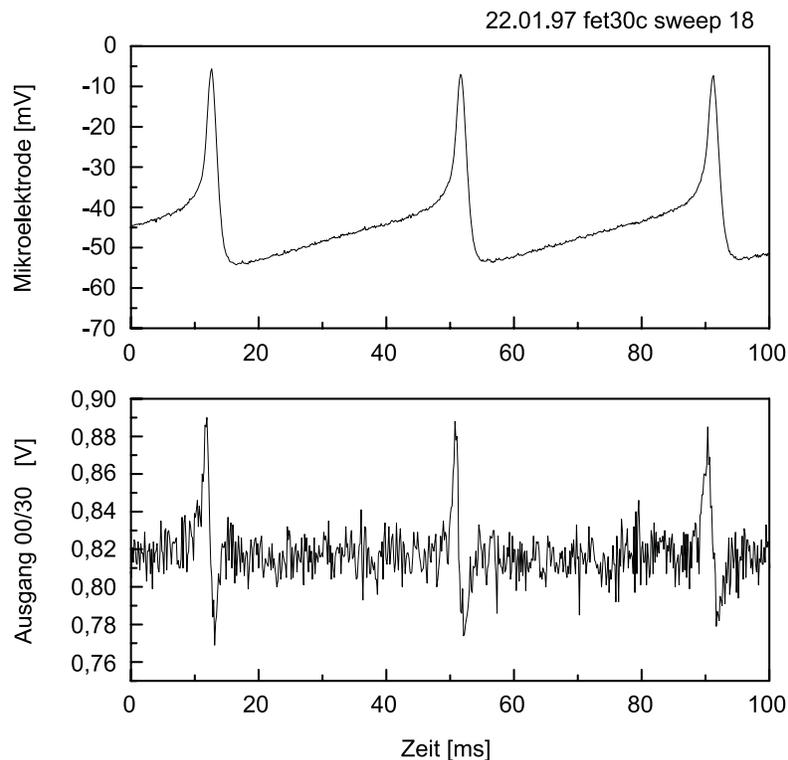


Bild 6.4: Signal des Neurons aus *Bild 6.3*, gemessen an einem Chip der vierten Charge. Die biphasische A-Typ-Kopplungsantwort folgt der ersten Ableitung des Mikroelektrodensignals.

Bild 6.4 zeigt eine solche Messung: Das Neuron liegt nahe der Ecke des Arrays auf Position: Spalte 0, Zeile 30. Die Zelle feuert spontan eine Reihe von 50 mV großen Aktionspotentialen, die von der Mikroelektrode sauber aufgelöst werden. Der FET-Sensor unter dem Neuron zeichnet zu jedem Puls eine deutlich über dem Rauschen sichtbare Antwort auf. Die Signalform entspricht dabei

der ersten Ableitung des Aktionspotentials, typisch für eine biphasische A-Typ-Kopplung. Die Signalamplitude ist in Volt aufgetragen, sie bezeichnet die Ausgangsspannung des integrierten Verstärkers im Sensor. Um zu einer relevanten Größe – der tatsächlich vom Sensor „gesehenen“ Signalamplitude – zu gelangen, muss die Verstärkerspannung über die sensorcharakteristische Kennliniensteilheit auf die Spannung über dem Gate zurückgerechnet werden. Die Kenntnis der individuellen Verstärkerkennlinie ist daher Voraussetzung für die Umrechnung.

Aufgrund der Natur der Messungen als Funktionsüberprüfungen für die Chips und dem damaligen frühen Stand der Messapparatur wurden zu diesen ersten Signalen noch keine individuellen Kennlinien aufgezeichnet. Die Signale in *Bild 6.4* und *Bild 6.6* sind daher nicht quantitativ zu verstehen. Sie sind ein qualitativer Funktionsbeweis der Sensoren.

Fünfte Chipcharge

Im April 1997 lagen die Wafer der neuen fünften Charge vor. Der Hauptunterschied zur vierten Charge war die Neudimensionierung eines Entladewiderstandes, der bisher das Ausschalten der Sensoren nach Umschalten der aktiven Spalte verhindert hatte. Damit konnte die Limitierung auf eine Spalte mit Einschränkungen aufgehoben werden. Es verblieb der zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärte Designfehler an der Schaltmatrix (Kapitel 5.4). Dies hatte zur Konsequenz, dass ein Umschalten der Spalte eine längere Wartezeit im Sekundenbereich erzwang und selbst dann störende Artefakte durch mangelhaft abgeschaltete Spalten nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

Dies verursachte insbesondere auch Probleme bei der Kennlinienaufnahme: Da bei Aufnahme des gesamten Kennlinienfeldes die Spalten der Reihe nach adressiert werden, kommt es unter Umständen durch solche unvollständig abgeschalteten Sensorzellen zu einer Überlagerung von mehreren Signalen. Aus diesen Gründen zeigten die ersten Kennlinienaufnahmen am Gesamtarray ein sehr uneinheitliches Verhalten, es traten Oszillationen, Sprünge und andere Unstetigkeiten auf. Messungen von vollständigen Sätzen aller Kennlinien eines Chips waren zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Später zeigte sich empirisch, dass sich das Schaltverhalten des Chips und damit auch die Form der Kennlini-

en drastisch dadurch verbessern ließ, dass eine Mindestbeleuchtung des Chipfeldes gewährleistet wurde. Zuvor war zur Vermeidung des Photoeffektes auf den Feldeffekttransistoren bei völliger Dunkelheit gemessen worden.

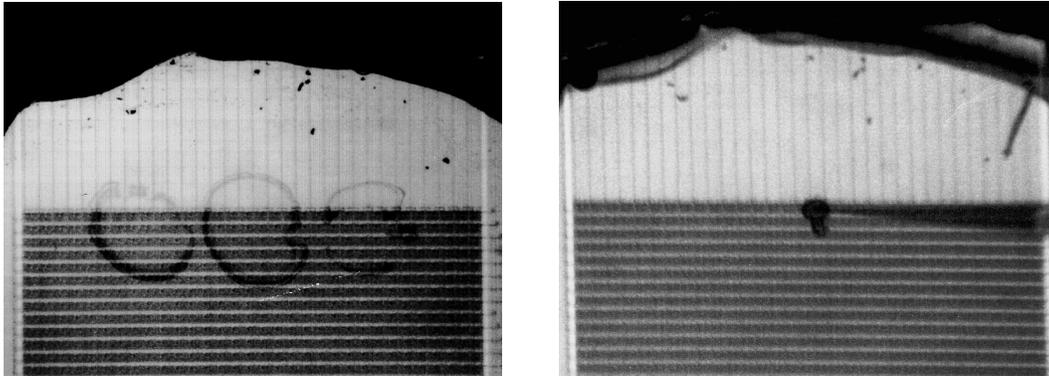


Bild 6.5: Poly-L-Lysin-Flecken und positioniertes Neuron auf einem Chip der fünften Charge. Das Neuron befindet sich auf Spalte 0, Ausgang 16 des Arrays.

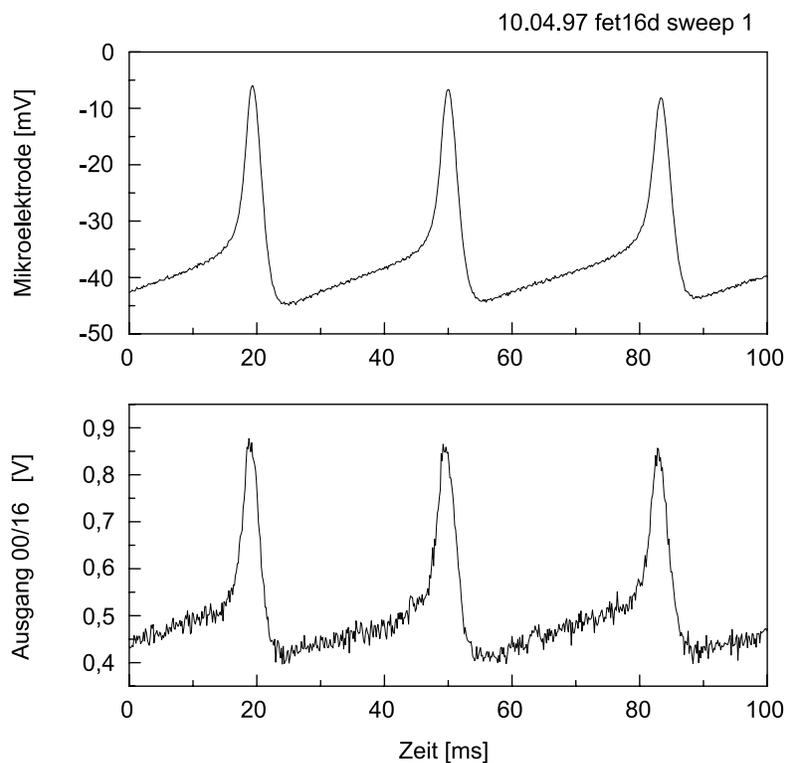


Bild 6.6: Kopplung des Neurons aus *Bild 6.5* an einem Chip der fünften Charge. Das große monophasische B-Typ-Kopplungssignal ist direkt proportional zum Mikroelektrodensignal.

Auch auf den Chips der fünften Charge erfolgte die Positionierung der Neurone zunächst nur auf Spalte 0. Im Vergleich zu den bisherigen Messungen wurde also nur ein Parameter geändert: Erstmals konnten die Chips unter voller Beschaltung des Arrays betrieben werden, während die Umschaltproblematik auf die anderen Spalten vorerst weitgehend ausgeklammert blieb.

Bild 6.5 zeigt ein Neuron auf Position 0/16. Das Mikroelektrodensignal zeigt eine Reihe von 50 mV großen Aktionspotentialen, die nach Zurücknahme des Klemmstroms spontan und regelmäßig auftraten. Auch hier ist das Kopplungssignal als Ausgangsspannung der Sensorverstärker aufgetragen. Aufgrund der fehlenden systematischen Kennlinienmessung ist die individuelle Umrechnung auf die Gatespannung nicht möglich. Eine Abschätzung mit einer typischen Kennliniensteigung von 75 mV ergibt eine Amplitude von ca. 6 mV. Signalform und große Amplitude sind typisch für eine monophasische B-Typ-Kopplung.

6.1.4 Kopplungen an willkürlich ausgewählter Sensorposition

Mit Verfügbarkeit der fünften Charge konnten erstmals auch Messungen an unterschiedlichen Arrayspalten durchgeführt werden. Dazu wurden Blutegelneurone zufällig über den Spalten 0–15 aufgesetzt und nach individuellem Anstechen mit der Mikroelektrode auf Kopplungsaktivität hin untersucht. Gegebenenfalls konnte durch vertikales Verfahren des Mikromanipulators mit der Penetrations-Mikroelektrode Druck auf das Neuron ausgeübt werden, um Kopplungen zu induzieren bzw. zu verstärken [14].

Insbesondere wurden für diese, wie für alle weiteren Experimente, konsequent Kennlinien aufgezeichnet. Zu diesem Zweck erfolgte bei Erstinbetriebnahme die Charakterisierung des Chips durch eine Messung des gesamten Arrays. Zusätzlich wurden die Einzelkennlinien aller an Kopplungen beteiligten Sensoren direkt nach Ende der Kopplungsexperimente aufgenommen. Durch Auswertung der Kennliniensteigung konnten daraus die Verstärkersignale am Sensorausgang auf Potentialänderungen am Gate zurückgerechnet und in den Diagrammen als gatebezogene Signale aufgetragen werden.

In dieser Serie wurden sechs Kopplungen registriert. Fünf der Kopplungen wa-

ren wiederum biphasisch (A-Typ), in einem Fall ergab sich erneut eine starke, monophasische Kopplung.

Bild 6.7 zeigt ein Experiment mit drei Zellen, die beim Aufsetzen willkürlich auf verschiedenen Spalten und Zeilen positioniert worden waren. Die drei Zellen wurden der Reihe nach auf elektrische Aktivität und Kopplungseigenschaften hin untersucht.

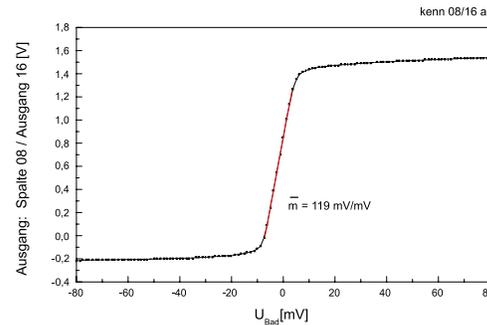
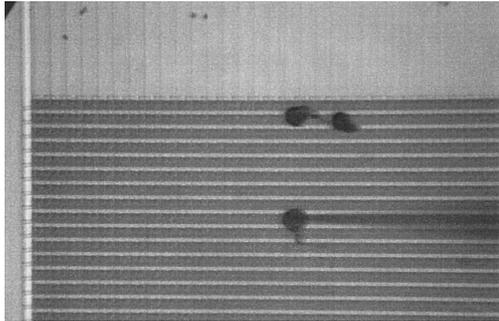


Bild 6.7: Links: Willkürlich aufgesetzte Blutegelneurone auf Chip PF642023/04 #20. Zunächst wurde am Neuron auf Sensor 08/16 gemessen. **Rechts:** Zugehörige Kennlinienmessung des Sensors 08/16.

Zunächst wurde das Neuron auf **Position 08/16** betrachtet. Unmittelbar nach dem Anstechen mit der Mikroelektrode war das Neuron spontan aktiv. Der FET-Sensor unter der Zelle zeigte von Beginn an ein schwaches biphasisches Kopplungssignal. Im Verlauf des Experiments wurde dann durch Absenken der Mikroelektrode der Druck auf die Zelle erhöht, wodurch sich die Kopplungsstärke zunehmend verbesserte. Das linke Diagramm in *Bild 6.8* zeigt das schwache Kopplungssignal zu Beginn des Experiments.

Das zweite Diagramm in *Bild 6.8* demonstriert die Wirkung des Andrückens: Trotz eines leichten Rückgangs der Aktionspotential-Amplitude ist das Kopplungssignal etwa viermal so groß wie zu Beginn der Messung.

Wie oben erklärt, wurden bei diesem Experiment die individuellen Kennlinien der verwendeten Sensoren aufgezeichnet (*Bild 6.7*). In *Bild 6.8* sind daher gatebezogene Spannungen aufgetragen, d. h., die gemessenen Ausgangssignale wurden über die Kennliniensteigung auf die Spannungsdifferenzen in der Kopplung zurückgerechnet. \bar{m} bezeichnet die Mittelwerte aus jeweils vier Kennliniennmessungen.

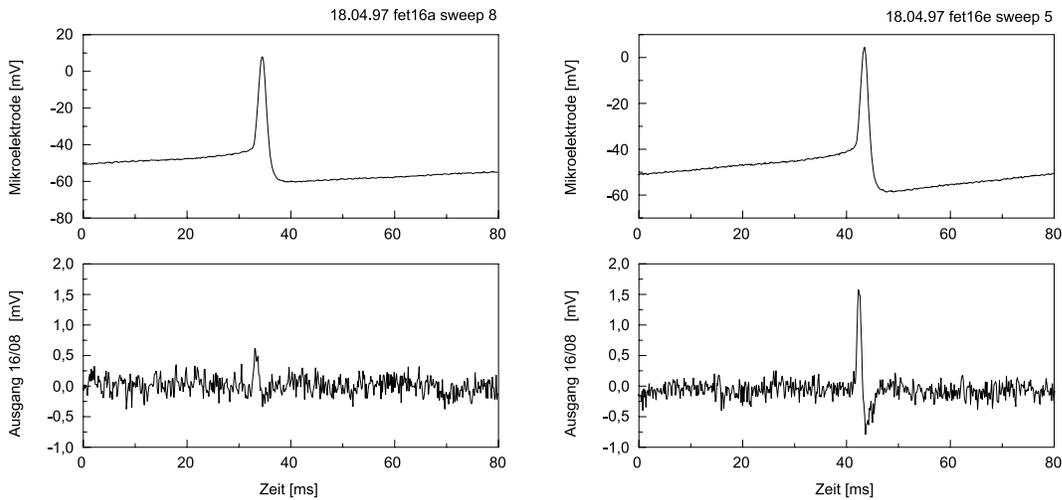


Bild 6.8: Kopplung an Sensor 08/16. **Links:** Schwache biphasische Kopplung zu Beginn der Messung. **Rechts:** Durch Andrücken der Zelle mittels Absenken der eingestochenen Mikroelektrode wurde eine Verstärkung des Kopplungssignals erreicht.

Auch das zweite Neuron auf **Position 01/16** war elektrisch aktiv und zeigte beim Einstechen der Mikroelektrode spontane Aktionspotentiale. Eine Kopplung kam hier aber erst nach Andrücken mit der Mikroelektrode zustande. *Bild 6.9* zeigt das angestochene Neuron und die Kennlinie des zugehörigen Sensors. Auch diese Kopplung ist vom biphasischen B-Typ mit einer Amplitude von 2.5 mV (*Bild 6.10*).

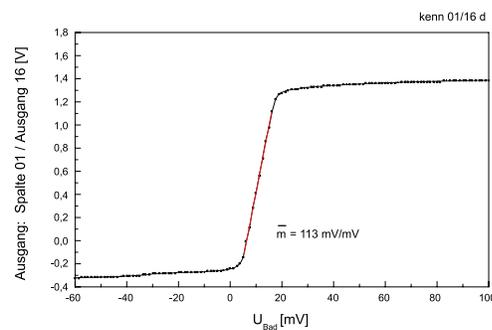
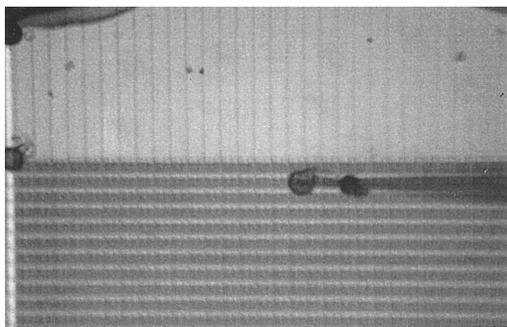


Bild 6.9: Kopplungsexperiment an einer zweiten Zelle auf demselben Chip. **Links:** Das angestochene Neuron befindet sich auf Sensor 01/16. **Rechts:** Zugehörige Kennlinienmessung des beteiligten Sensors 01/16.

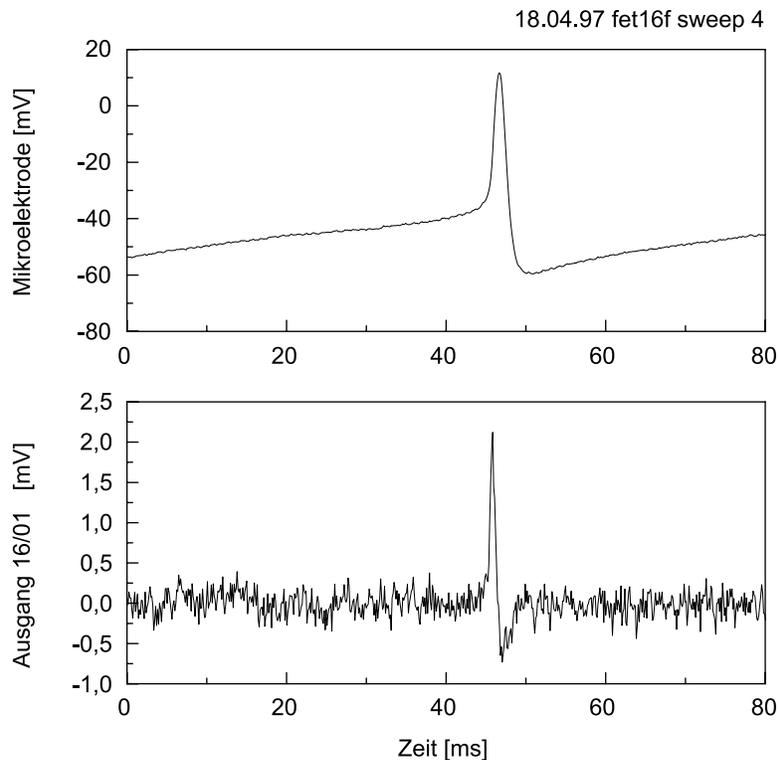


Bild 6.10: Auch die Messung an der zweiten Zelle aus *Bild 6.7* und *Bild 6.9* zeigte ein biphasisches Kopplungssignal.

6.1.5 Vergleichbarkeit mit metallfreien FET

Der Aufbau der Sensoren im 2000-Transistoren-Array unterscheidet sich erheblich von den in bisherigen Arbeiten vorgestellten Chips zur Neuron-Silizium-Kopplung: Die Messungen in [9], [14], [28] wurden an metallfreien Feldeffekttransistoren durchgeführt, bei denen das Neuron direkt auf dem dünnen Gateoxid des Transistors lag. Bei den Array-Sensoren hingegen ist der Kontaktbereich ein flächenmäßig ausgedehnter Bereich aus neun Wolframnägeln, die über die Gateelektrode aus Polysilizium leitfähig miteinander verbunden sind. Ein zweiter entscheidender Unterschied zu bisher verwendeten Chips liegt in der Einbindung des Transistors in eine individuelle Verstärkerzelle und die digitale Adressierung der Sensoren.

Mit den Chips der fünften Charge konnten Kopplungsmessungen an zufällig ausgewählten Arraypositionen auf sämtlichen Spalten und Zeilen durchgeführt werden. Retziuszellen des Blutegels sind groß genug, die 3×3 -Nagelstruktur

des Kontaktbereichs hinreichend gut abzudecken um gute Kopplungssignale zu erzielen. Es traten die von früheren Arbeiten her bekannten Typ-A und Typ-B-Kopplungen auf. Es wurde zu jedem Zeitpunkt immer nur an einem einzelnen Sensor gemessen, eine gleichzeitige Messung an mehreren Sensoren war aufgrund des bis dato noch ungelösten Problems der Spaltenumschaltung nicht durchführbar.

Die Streuung bzw. Drift der Sensorkennlinien erforderte einen individuellen Offsetabgleich der FET-Sensoren vor und mitunter auch während der Experimente. Insbesondere drifteten die Arbeitspunkte kurz nach der Kontaktierung des Chips sehr stark, bis zu mehreren Millivolt pro Minute. Ein schlechter Offsetabgleich in Kombination mit dem schmalen Verstärkerfenster führte bei einem Experiment zu einer Verzerrung des Signals: Die Peaks einer starken monophasischen Kopplung rutschten in den Übergangsbereich der sigmoiden Kennlinie, in dem der steile, näherungsweise lineare Bereich in den horizontal asymptotischen Bereich ausläuft. Dadurch wurden Form und Amplitude der Kopplungssignale stark beeinträchtigt.

Aufgrund der hohen Verstärkung ergab sich hingegen für die kleineren, biphasischen Signale eine gute Auflösung. Der Offsetabgleich ist hier aufgrund der kleinen Signalamplituden nicht so kritisch wie bei den Typ-B-Kopplungen.

Fazit: Zwei Eigenschaften des Chips sind entscheidend für die Messungen: Aufgrund des ausgedehnten Kopplungsbereichs von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ dürfen die Zelldurchmesser der verwendeten Neuronen nicht zu klein sein. Das enge Messfenster von nur 20 mV erzwingt bei großen Kopplungssignalen einen sehr genauen Abgleich des Verstärkeroffsets. Die Spitzen von Aktionspotentialen werden sonst wegen der sigmoiden Kennlinienform nicht vollständig übertragen.

Ansonsten sind die Neuron-Silizium-Kopplungen von Blutegelneuronen am industriell gefertigten 2000-Sensoren-Chip vergleichbar mit Messungen früherer Arbeiten. Der unterschiedliche Aufbau der Sensoren spielt für die Form und Größe der auftretenden Kopplungssignale keine Rolle: es wurden beide Standard-Kopplungstypen – der schwache biphasische A-Typ und der starke monophasische B-Typ – detektiert [14].

6.2 Kultur von Schneckenneuronen

Vorgesehene Haupteinsatzgebiete für den 2000-Sensor-Chip sind die Messung von Feldpotentialen in Hirnschnitten sowie die Aufnahme von Einzelsignalen aus Neuron-Silizium-Kopplungen an dichten Zellkulturen. Es wurde daher die Zellkulturtauglichkeit des Chips und der Messkammern getestet.

Für die erfolgreiche Durchführung solcher Experimente gibt es zwei Grundvoraussetzungen: Da die Messkammer während der gesamten Kulturzeit mit Medium gefüllt ist, muss die Passivierungsschicht die elektrischen Bauteile auch bei mehrwöchiger Bedeckung zuverlässig vor eindringenden Ionen schützen. Zweitens muss die Oberfläche Biokompatibilität in Bezug auf die verwendete Zellkultur aufweisen.

Bei den konventionellen Neuro-Chips wurden beide Anforderungen durch eine isolierende SiO_2 -Glasoberfläche in Form einer Gateoxid- bzw. Feldoxid-Deckschicht über dem Neuro-Transistor erfüllt. Im Falle des 2000-Sensor-Arrays besteht die Passivierung aus einem Schichtsystem von SiO_2 -Oxid und Si_3N_4 -Nitrid. Außerdem sind die Wolfram-Kontaktnägel der Transistoren bis an die Oberfläche geführt, so dass keine durchgehend homogene Oberfläche vorhanden ist (siehe Abschnitt 3.3).

Rattenzellen scheiden als Testsystem für die Zellkulturtauglichkeit aus, weil sie mit Durchmessern von etwa $10\ \mu\text{m}$ den ausgedehnten Kontaktbereich der vorliegenden Chips nicht vollständig abdecken können und daher keine Kopplungssignale zu erwarten sind. Stattdessen wurde auf Neurone der Schlamm-schnecke *Lymnaea stagnalis* zurückgegriffen. Dieses System ist in der Literatur gut dokumentiert, insbesondere wegen des Central Pattern Generators zur Steuerung der rhythmischen Lungenkontraktion. Dieses minimale Neuronen-Netz besteht aus nur wenigen Neuronen und konnte in Zellkulturexperimenten funktionell nachgebildet werden. Es dient daher als Vorbild für ein „Schaltungsdesign“ mit Neuronen.

6.2.1 System: *Lymnaea stagnalis*

Die Neurone in *Lymnaea stagnalis* weisen je nach Lage in den Ganglien sehr unterschiedliche Größen von $10\text{--}150\ \mu\text{m}$ auf. Für die Experimente wurden die

40–70 μm großen Neurone der A-Cluster in den Pedalganglien verwendet. Mit diesen Durchmessern sind sie den Bluteigelzellen vergleichbar und können den Kopplungsbereich eines Sensors gut abdecken.

Die Präparation der Schnecken folgt im Wesentlichen der Technik von Ridgway [20]:

Im ersten Teil der Präparation wird der zentrale Ganglienring – das „Gehirn“ der Schnecke – herauspräpariert. Die verwendeten Tiere stammen aus eigener Zucht; für die Experimente wurden den Aquarien erwachsene Schnecken mit einer Länge von etwa 3 cm entnommen. Das Gehäuse wird durch vorsichtiges Abbrechen mit einer groben Pinzette entlang der Wendelung entfernt, ohne dabei die Schnecke zu verletzen. Anschließend wird die Schnecke fünf Minuten in einer 25% antibakteriellen Mundwasserlösung gebadet. Dadurch werden Schleim und Bakterien auf der Oberfläche der Haut entfernt, zusätzlich wirkt die Lösung betäubend. Das Tier wird in eine mit antibiotischer Salzlösung gefüllten Aufsteckschale übersetzt und mit vier Nadeln auf dem Silikonboden der Schale fixiert. Die Schnecke wird durch einen dorsalen Längsschnitt geöffnet und die Organe zur Seite gesteckt. Nach Durchschneiden des Schlunds und der Speichelleiter mit einer Augenschere kann die buccale Masse entfernt werden, und das Gehirn liegt frei. Um den Ganglienring herauslösen zu können, müssen nun noch alle Roots abgeschnitten werden. Anschließend kann das Hirn mit einer Pinzette herausgehoben werden.

Im zweiten Teil der Präparation werden dem Hirn einzelne Neurone entnommen. Hierfür wird der Ganglienring in eine kleinere, silikonbeschichtete Aufspannschale übersetzt. Die Schale ist ebenfalls mit antibiotischer Salzlösung gefüllt. Der Ganglienring wird mit Minutiennadeln so aufgespannt, dass die dorsale Seite wiederum nach oben zeigt. Mit einer feinen Pinzette wird anschließend das äußere Häutchen um die Ganglien gelöst. Das Hirn verbleibt zur Abtötung von Bakterien 15 Minuten in der antibiotischen Lösung. Anschließend wird die Salzlösung gegen einen Enzymcocktail getauscht, um die extrazelluläre Matrix zwischen den Zellen anverdauen zu lassen und so die Entnahme der Neurone zu erleichtern. Nach 30-minütiger Enzymbehandlung wird das Hirn dreimal mit definiertem Medium gespült, 15 Minuten mit Trypsin-Inhibitor inkubiert und anschließend wiederum dreimal gespült. Zur Zellextraktion wird das definierte Medium gegen hochosmolares DM getauscht. Mit

einer Mikronadel werden die beiden Pedalganglien geöffnet, so dass die Neurone zugänglich werden. Mittels einer feuerpolierten und beschichteten Saugpipette können nun die 40–70 μm großen Zellen einzeln extrahiert und auf den Chip übersetzt werden.

6.2.2 Zellkultur

In Vorbereitung auf die Zellkultur werden die Chips wie in 6.1.2 beschrieben gereinigt und anschließend in eine Glaspetrischale gelegt. Die Sterilisation der Messkammern erfolgt durch 45-minütige UV-Bestrahlung in der Flowbox.

Anschließend wird die Chipoberfläche mit einer Poly-L-Lysinlösung beschichtet. Dazu werden die Wannen mit einer 1 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung gefüllt. Polylysin adsorbiert über Nacht an der Chipoberfläche, die Lösung verbleibt bis zum Aufsetzen der Neurone am nächsten Tag in der Messkammer. Die Beschichtung besitzt eine Doppelfunktion: Einerseits werden Wachstumsfaktoren an die Substratoberfläche gebunden, wo sie von auswachsenden Neuronen benötigt werden. Andererseits vermittelt das Polylysin eine Haftung zwischen der Oberfläche und den Neuronen selber, und verhindert so ein Verutschen der frisch aufgesetzten Zellen in der frühen Phase der Zellkultur.

Während das verwendete definierte Medium eine Zellkultur mehrere Tage am Leben erhalten kann, benötigen die Neurone für ein neues Ausbilden und Wachstum von Neuriten zusätzliche Wachstumsfaktoren. Diese Stoffe werden normalerweise vom Schneckenhirn selber produziert. Ihre Zusammensetzung ist für *Lymnaea* nicht bekannt; anstelle der gezielten Zugabe einzelner Stoffe wurden stattdessen zu jedem Chip in Kultur zwei Co-Kultur-Hirne zugegeben. Während der Inkubation der Zellkultur produziert die Co-Kultur dann die Wachstumsfaktoren und sondert diese an das Medium ab. Die Extraktion der Co-Kultur-Hirne entspricht dem ersten Teil der oben beschriebenen Präparation, die Hirne werden bis zum Übersetzen auf die Chips in antibiotischer Ringerlösung gehalten. Zur Sterilisation wird die Lösung 10-mal ausgewechselt.

Unmittelbar vor dem Aufsetzen der Neurone wird die Polylysinlösung über dem Chip abpipettiert und dreimal mit autoklaviertem Reinstwasser gespült, ohne dass der Chip dazwischen trocken fällt. Zur Kultur wird die Messkammer mit 1 ml definiertem Medium aufgefüllt. Es folgt die zügige Extraktion und das

Aufsetzen der Schneckenneurone. Durch vorsichtiges Ausblasen und Ansaugen mit der Saugpipette werden die Zellen über dem Array positioniert, bevor sie absinken und anhaften. Nachdem alle Neurone aufgesetzt sind, werden zwei Co-Kultur-Hirne je Zellkultur zugegeben. Um ein Hineinrutschen der Hirne auf den Sensorbereich des Chips zu verhindern, werden diese auf der Stufe der Innenwanne, nahe dem äußeren Rand, abgelegt. Abschließend wird ein wassergetränkter Wattebausch in die Petrischale gelegt, um ein Austrocknen der Kultur während der Inkubation im Brutschrank zu verhindern.

Ein erstes Wachstum von Neuriten tritt nach ein bis zwei Tagen Kultur im Brutschrank (20 °C) ein. Messungen wurden üblicherweise am dritten Tag nach der Präparation durchgeführt.

6.2.3 Wachstumsexperimente

Die erste Serie von Wachstumsexperimenten fand von Mai–Juli 1998 an Chips der fünften Charge (Wafer PF642023/03) statt. Bei jeder Präparation wurden auf zwei Chips Neurone aus zwei Schneckenhirnen kultiviert. Insgesamt wurden im Wechsel vier Messkammern benützt. In 16 von 34 Kulturen der ersten Serie trat Wachstum von Neuriten auf.

Eine zweite Serie von Experimenten folgte von Oktober–Dezember 1998, ebenfalls an Chips der fünften Charge (Wafer PF642023/03 und PF642023/04). Diese Experimente waren wesentlich weniger erfolgreich, bei 20 Kulturen konnte nur einmal schönes Wachstum beobachtet werden.

Die Zellen wurden beim Aufsetzen willkürlich auf dem Sensorarray platziert, zusätzlich bewegten sich die Neurone beim Wachstum über die Oberfläche. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein ausgewachsenes Neuron über der Sensorfläche eines Transistors liegt, ist deshalb ziemlich klein; die Ausbeute an koppelnden Neuronen nicht besonders groß. Insgesamt wurden bei den Wachstumsexperimenten nur drei deutliche Kopplungen aufgezeichnet.

Bild 6.11 zeigt ein auf dem Sensorfeld angewachsenes Schnecken-Neuron. Das von drei Punkten des Zellsomas ausgehende Neuritenwachstum verästelt sich mit zunehmendem Abstand weiter bis zu einer Länge von mehreren hundert Mikrometern. Die Länge kann anhand der 50 μm -Periodizität des Rasters gut

abgeschätzt werden. Gleichzeitig aber erschwert der durch den Aufbau der Sensorzellen gemusterte Untergrund das Erkennen der dünnen Neuriten. Dies behindert gerade im ersten Stadium der Zellkultur das Einschätzen der Qualität des Wachstums beträchtlich.

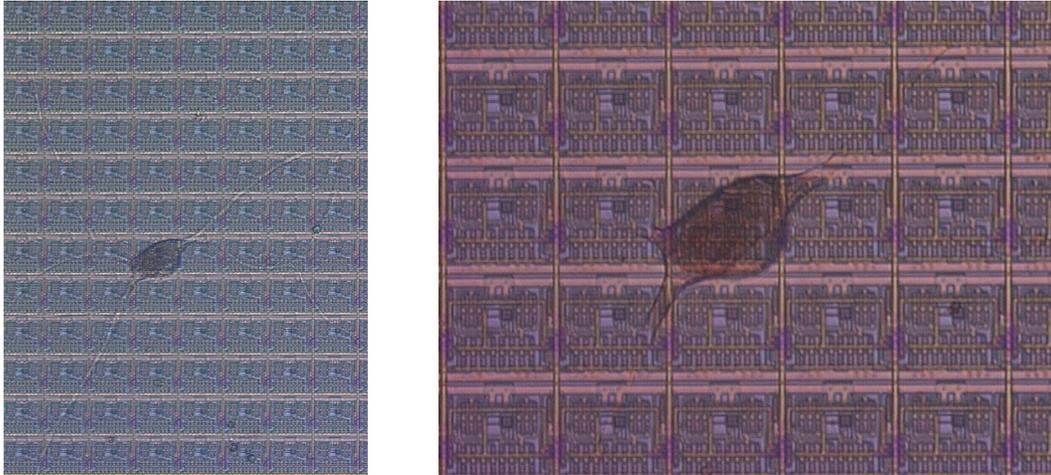


Bild 6.11: Angewachsene Schneckenzelle, Detailaufnahmen. Während das Zellsoma mit $50 \mu\text{m}$ Durchmesser noch relativ gut zu erkennen ist, sind die feinen Neuriten auf dem gemusterten Untergrund des Sensorfeldes nur schwer zu verfolgen.

In dem vergrößerten Bildausschnitt von *Bild 6.11* ist zu erkennen, dass die Sensorstruktur gut vom Zellsoma abgedeckt wird, insbesondere liegt der Kontaktbereich des Neuro-Transistors unter der Zelle (vergleiche dazu *Bild 5.7*). Tatsächlich ließen sich mit dem Sensor Kopplungssignale ableiten, nachdem das Neuron beim Anstechen mit der Mikroelektrode spontane Aktivität zeigte.

Das FET-Sensor-Signal in *Bild 6.12* wird von einem kurzen, biphasischen Puls zu Beginn des Aktionspotentials dominiert. Dies lässt zunächst einen biphasischen kapazitiven A-Kopplungstyp vermuten; bei näherer Betrachtung erkennt man aber, dass die negative Flanke des Kopplungssignals bereits vor dem Maximum des Aktionspotentials auftritt. Genauere Aussagen sind aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses aus der Einzelmessung nicht herauszulesen.

Zur Verbesserung des Signals wurden acht Messungen gemittelt (zweites Diagramm von *Bild 6.12*). Dies wurde dadurch möglich, dass die aufgezeichneten Aktionspotentiale in allen Sweeps nach einem definierten Zeitversatz zum Start der Messung ausgelöst wurden. Durch die Mittelung wird das Signal-Rausch-Verhältnis drastisch verbessert, zudem findet man neben dem bereits im Einzelsweep erkennbaren ersten schnellen Peak nach einem kurzzeitigen Einbruch des Signals noch einen zweiten langsameren Anteil im Kopplungssignal. Die verschiedenen Signalanteile lassen sich anhand der Dynamik der beiden Kanaltypen für die Na^+ - und K^+ -Ströme erklären: Der erste Peak entspricht hierbei dem schnellen Anstieg des Aktionspotentials, verursacht durch den eintretenden Na^+ -Strom. Der langsamere, zweite Hügel ist dem zeitverzögerten, zellauswärts gerichteten K^+ -Strom zuzuordnen.

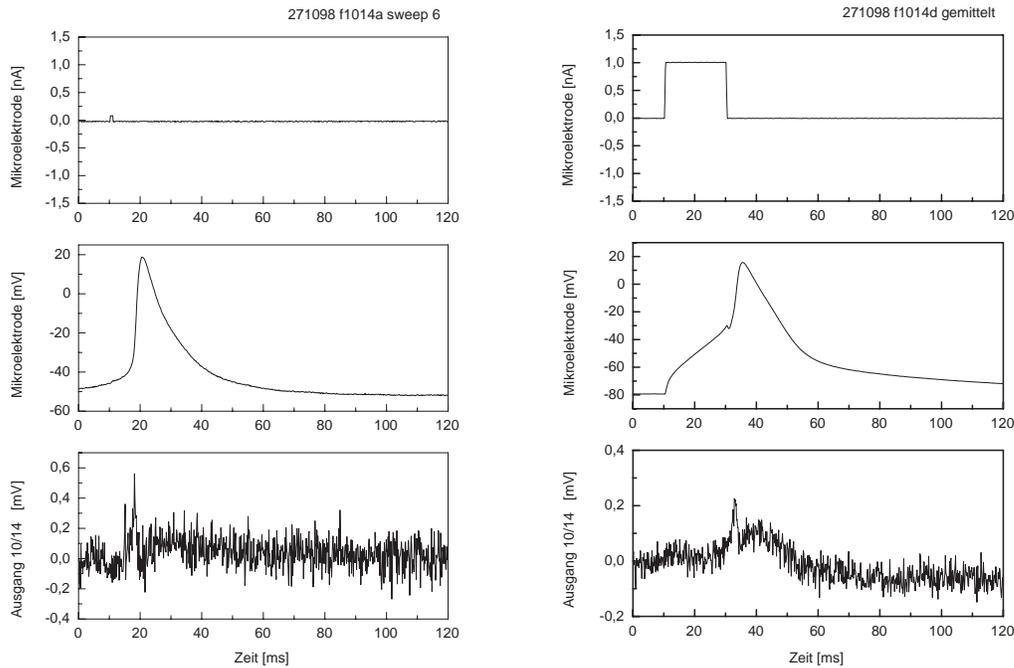


Bild 6.12: Kopplungsmessungen an angewachsener Schneckenzelle. **Links:** Einzelaufnahme eines spontanen Aktionspotentials. **Rechts:** Mittelung über acht Sweeps, ausgelöst und synchronisiert durch einen Mikroelektrodenpuls. Neben dem schnellen Peak aus dem frühen Na^+ -Strom wird im gemittelten Kopplungssignal ein zweiter, langsamerer Buckel aus der Überlagerung mit dem K^+ -Strom sichtbar.

Mittels der Kopplungstheorie kann das Auftreten beider Peaks im Sensorsignal durch eine Verarmung bzw. Anhäufung von Ionenkanälen in der Kopplungsmembran erklärt werden. Nach **Gleichung (9)** (Selektive nichtlineare Kopplung, Abschnitt 2.3) ist der positive Na^+ -Peak als Verarmung von Na^+ -Kanälen im Kontaktbereich zu interpretieren. Bei den K^+ -Kanälen sind aufgrund des invertierten Vorzeichens des Gleichgewichtspotentials g_K der K^+ -Kanäle die Verhältnisse umgekehrt: Der positive K^+ -Buckel lässt demnach auf eine Anreicherung der K^+ -Kanäle im Kopplungsbereich schließen.

Fazit: Es wurde gezeigt, dass die Oberfläche der industriell gefertigten Siemens-Chips prinzipiell zellkulturable ist: In dreitägiger Zellkultur wuchsen Neurone neu aus, indem sie mehrere hundert Mikrometer lange Neuriten bildeten. Die Musterung des Chips, bedingt durch den komplexen Aufbau der Sensorzellen, erschwert die optische Kontrolle des Wachstums und die Beobachtung der Neuritenverästelung. Die Chips waren nach drei Tagen Zellkultur elektrisch noch immer voll funktionsfähig. Die Kopplungssignale von angewachsenen Neuronen sind im Allgemeinen schwächer als die von frisch aufgesetzten Zellen. Durch die Aufnahme und Mittelung mehrerer Signaldurchläufe konnten das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert und Details der Kopplungsform sichtbar gemacht werden. Die gefundenen Kopplungstypen sind wiederum aus älteren Arbeiten an anderen Transistortypen bekannt, sind also keine Eigenschaft des Siemens-Chips [15], [24].

6.3 Multi-Site-Recording

Im August und September 1999 wurden verschiedene Versuche unternommen, ein fundamentales Multi-Site-Experiment an Chips der fünften Charge durchzuführen. Gleichzeitig sollten die Auswirkungen der in Kapitel 5 vorgestellten Limitierungen auf ein solches Messvorhaben erörtert und nach möglichen Problemumgehungen gesucht werden. Während es innerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht gelang, Kopplungssignale an zwei oder mehr Neuronen gleichzeitig aufzuzeichnen, wurde folgendes Modellexperiment realisiert:

Als System wurden wiederum Neurone der Schlamm Schnecke *Lymnaea stagnalis* verwendet. Im Gegensatz zu Abschnitt 6.2 wurden die einzeln herauspräpa-

rierten Neurone aber nicht auf den Chips kultiviert, sondern analog zu den Blutegelexperimenten unmittelbar vor der Messung aufgesetzt (Bild 6.13).

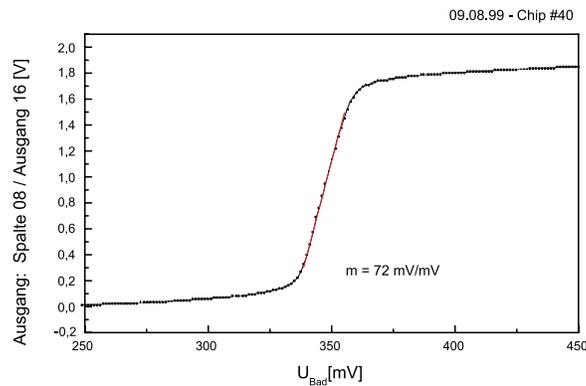
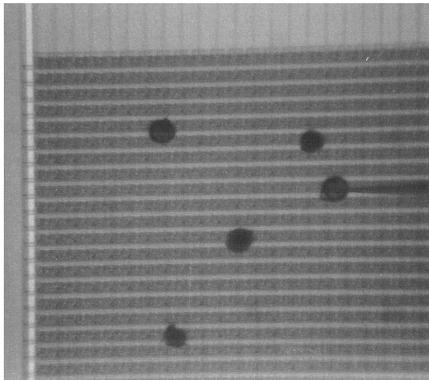


Bild 6.13: Aufgesetzte Schneckenzellen. **Links:** Das von der Mikroelektrode angestochene Neuron befindet sich auf Spalte 8, Zeile 16 des Rasters. **Rechts:** Kennlinie des Sensors unter der Zelle.

In einem Vorexperiment wird die Zelle nach Einstechen einer Mikroelektrode zunächst auf elektrophysiologische Aktivität überprüft. Die Arrayposition des aktiven Neurons wird mit Hilfe der Stereolupe nach Spalte und Zeile ermittelt und der entsprechende FET-Sensor in der Kanalliste programmiert. Nach Durchführung des Offsetabgleichs wird durch Einzelsweepmessungen festgestellt, ob das Neuron an den ausgewählten Sensor koppelt. Verläuft der Test positiv, so wird mit dem eigentlichen Experiment begonnen.

Zusätzlich zu der bereits überprüften und koppelnden Transistoreinheit werden weitere, benachbarte Sensoren in die Kanalliste des Messprogramms aufgenommen. Auf diese Weise entstehen Abtastraster von 3×3 bis hin zu 5×5 Sensoren. Die Einstellung des gemeinsamen Kennlinienoffsets erfolgt unter Beobachtung der ausgewählten Ausgänge derart, dass möglichst viele der Ruhesignale innerhalb des Messfensters liegen.

Anschließend wird die Messung gestartet. Mit dem Beginn der Datenaufzeichnung wird das Triggersignal für den Injektionsstrom ausgelöst. Nach einer programmierbaren Zeitverzögerung von wenigen Millisekunden wird mittels des Stromstimulus ein Aktionspotential im Neuron ausgelöst.

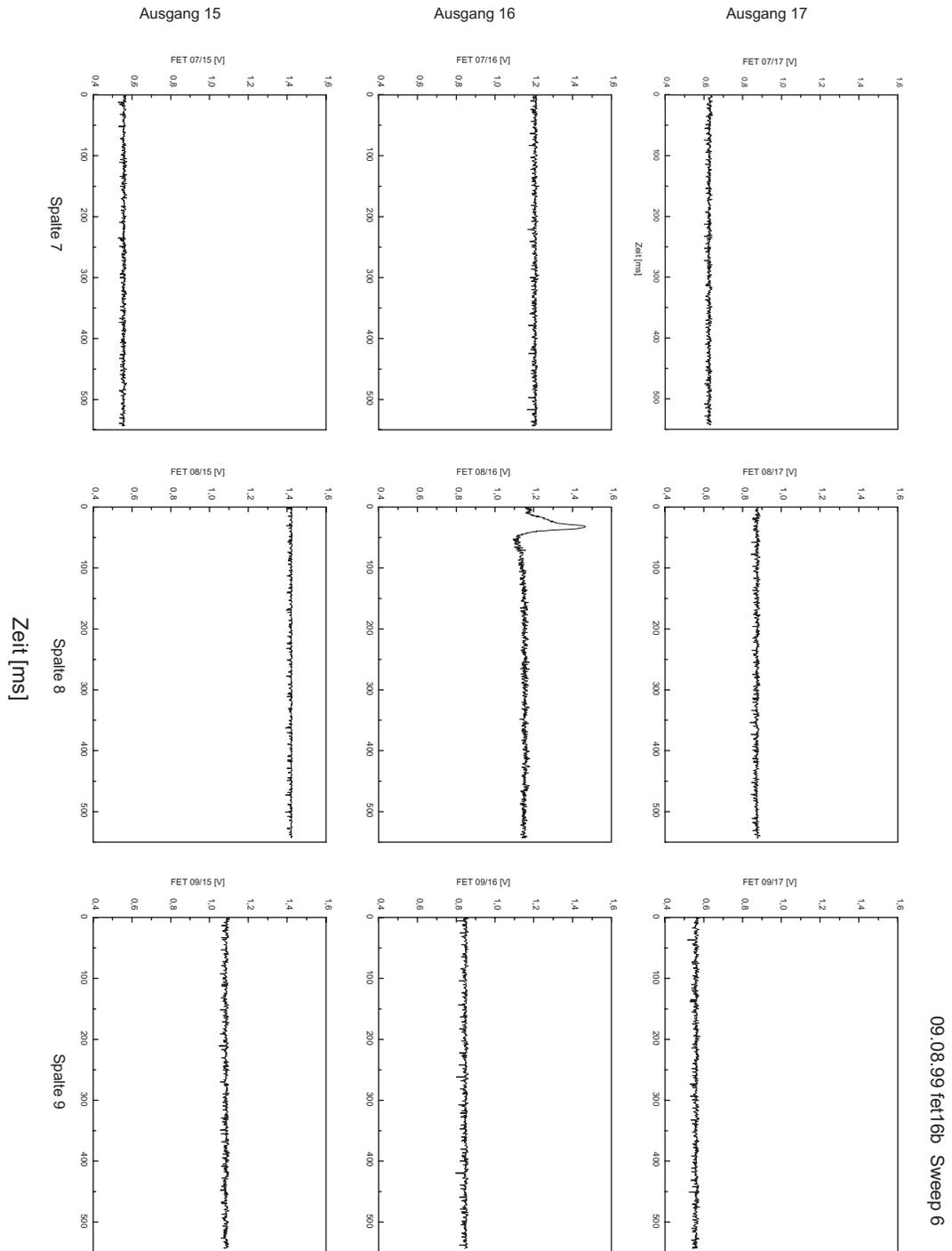


Bild 6.14: Multi-Site-Recording an einem 3×3 -Raster von Sensoren. Der Transistor auf Spalte 8, Ausgang 16 koppelt an ein Schneckenneuron, die anderen Ausgänge zeigen entsprechend ihrer Kennlinienoffsets verschobene Nullsignale.

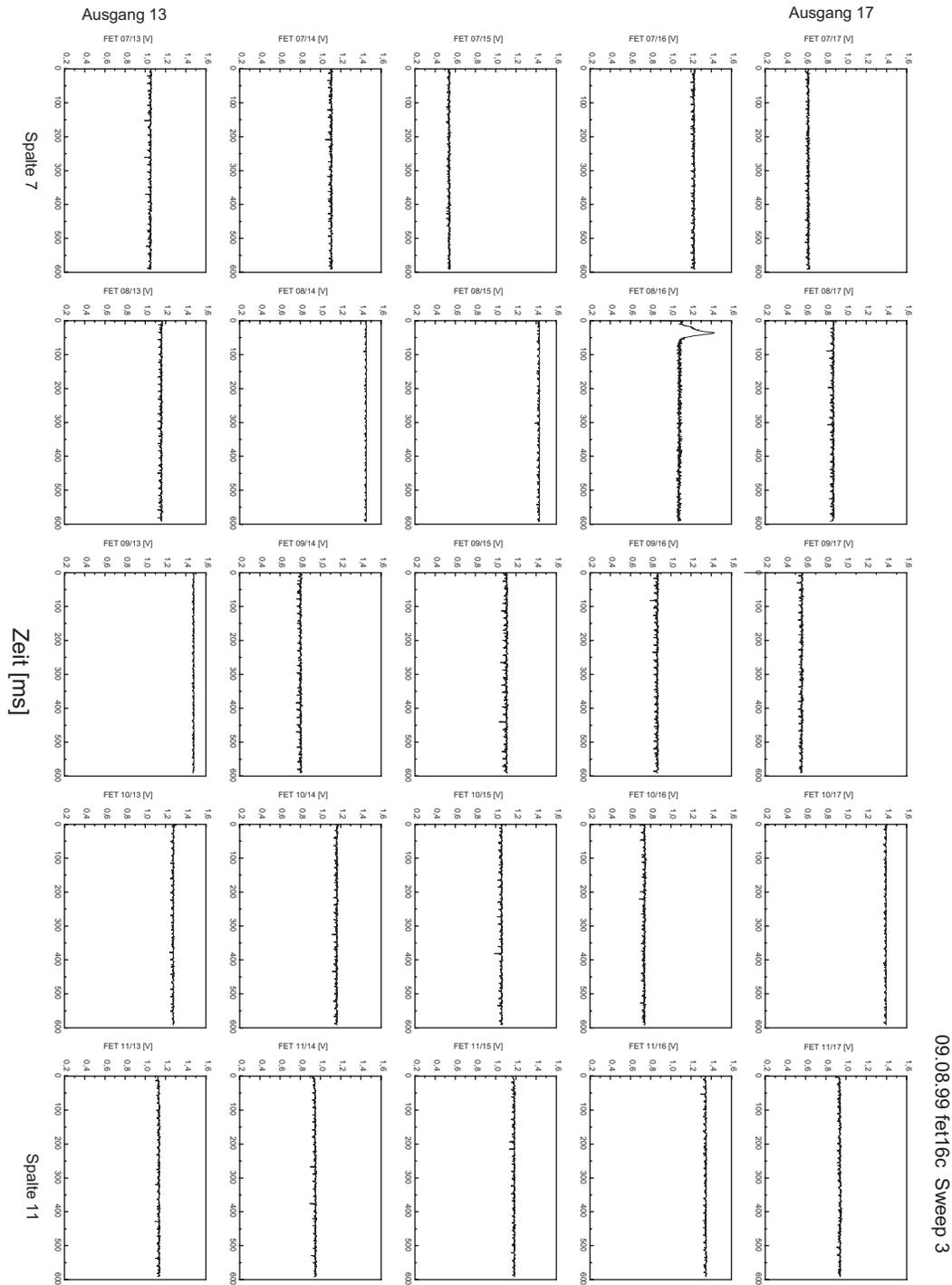


Bild 6.15: Erweiterung der Messung auf ein 5×5 -Raster. Sensor 8/16 zeigt wiederum das Kopplungssignal, die umliegenden Ausgänge konstante Nullsignale, teilweise im Bereich der oberen oder unteren Begrenzung der Kennlinie.

Das Experiment wurde insgesamt an vier Zellen vollständig durchgeführt. Zweimal war das Kopplungssignal in der Multi-Sensor-Messung zweifelsfrei zu erkennen. *Bild 6.14* zeigt die neun simultan aufgenommenen Signale eines solchen 3×3 -Sensor-Rasters. Das aktive Neuron aus *Bild 6.13* deckt dabei den Transistor in der Mitte ab, sein Kopplungssignal ist deutlich zu erkennen. Die umliegenden Sensoren zeigen über die gesamte Zeitspanne konstante Ausgangswerte.

Um die Leistungsfähigkeit und die Grenzen der Apparatur auszuloten, wurde das Messfeld um das Neuron aus *Bild 6.13* zu einem quadratisches Raster aus 5×5 Sensoren erweitert. Bei der verwendeten Taktfrequenz von $20 \mu\text{s}$ beträgt die Zeitauflösung $740 \mu\text{s}$. Sie addiert sich aus den Zeitintervallen für die Datenaufnahme von 25 Sensorkanälen, den fünf benötigten „sicheren“ Spaltenumschaltungen sowie der Aufnahme von 2 Mikroelektrodensignalen (*Bild 6.15*).

Obwohl nur ein einzelnes Neuron tatsächlich an einen Sensor koppelt, während die umliegenden Transistoren im Bad blank auf konstantem Massepotential liegen, beinhaltet dieses Experiment wesentliche Elemente einer echten Multi-Site-Messung an einer Anzahl von Zellen:

- Aus der Gesamtzahl der 2048 Pixel wird ein bis zu 5×5 Sensoren großer Unterblock gemäß der willkürlichen Position eines Neurons ausgewählt.
- Das Auslesen aller 25 Sensorsignale in der Auswahl erfolgt simultan.
- Die zeitliche Auflösung des Einzelsignals von $720 \mu\text{s}$ in der Multi-Site-Messung ist ausreichend, um das Kopplungssignal eines Schneckenneurons aufzulösen.

Diese Messung zeigt aber gleichzeitig sehr deutlich alle Schwachstellen des Chips hinsichtlich eines Multi-Site-Recording-Experiments mit einer hohen Zahl von Sensoren (≥ 100) auf:

Überbreite Offsetverteilung: Die Kontaktstellen aller nicht an der Kopplung beteiligten FET-Sensoren liegen konstant auf Nullpotential. Ihre Ausgangssignale sind jedoch aufgrund der unterschiedlichen Einsatzspannungen stark gegeneinander verschoben. Teilweise befinden sie sich sogar im unempfindlichen Sättigungsbereich der Kennlinie. Diese Sensoren wären in einem echten Multi-Site-Experiment „blind“ für Kopplungssignale.

Gemeinsamer Offsetabgleich: Da ein Offsetabgleich immer alle Sensor-kennlinien gleichzeitig betrifft, kann das Messfenster nur einem einzelnen Sensor optimal angepasst werden. Soll an mehreren Pixeln gleichzeitig gemessen werden, so muss der Offset möglichst auf den Mittelwert der Einsatzspannungen eingestellt werden.

Schaltfrequenz: Die Anzahl der gleichzeitig abtastbaren Kanäle bzw. deren zeitliche Auflösung wird von der Umschaltzeit beim Wechsel des aktiven Sensors bestimmt. Aufgrund der in Abschnitt 4.5 angesprochenen Synchronisationsprobleme der Multifunktionsmesskarte ergab sich apparativ eine minimale Taktfrequenz von $20 \mu\text{s}$. Das sichere Umschaltprotokoll erzwingt zwei zusätzliche Takte bei jeder Spaltenumschaltung. Es ergeben sich dadurch Umschaltzeiten von $20 \mu\text{s}$ innerhalb einer Spalte und $60 \mu\text{s}$ beim Umschalten zwischen zwei Spalten. Diese apparativ bedingte Umschaltzeit ließe sich durch die Verwendung einer besseren Messkartenkombination deutlich verkürzen: Die durch den Chip vorgegebene Minimalumschaltzeit zwischen zwei kritischen Spalten liegt bei unter $30 \mu\text{s}$ (siehe Abschnitt 5.4), die 32 Ausgänge einer bereits selektierten Spalte können parallel quasi gleichzeitig ausgelesen werden.

6.4 Slice Kulturen

Mit einer Ausdehnung des Sensorfeldes von $3.2 \times 1.6 \text{ mm}^2$ beim Rasterabstand $50 \mu\text{m}$ eignet sich der Chip ideal für die Kultivierung von Hippocampus-Schnitten aus dem Rattenhirn. *Bild 6.16* zeigt einen organotypischen Hippocampus-Slice auf dem Sensorfeld des Chips nach zwei Wochen Zellkultur [5], [6]. Deutlich erkennbar ist die typische Struktur des Hippocampus, die durch Nissl-Anfärbung des Slices sichtbar gemacht wurde. Im linken Bild von *Bild 6.16* bedecken die beiden Bögen des Hippocampus und des Gyrus Dentatus das Sensorfeld nahezu hundertprozentig.

Für die Messung von Feldpotentialen an organotypischen Slice-Kulturen sind einige der designbedingten Schwachstellen des Chips unproblematisch oder lassen sich durch geeignete Maßnahmen kompensieren, so dass sich folgende Situation ergibt:

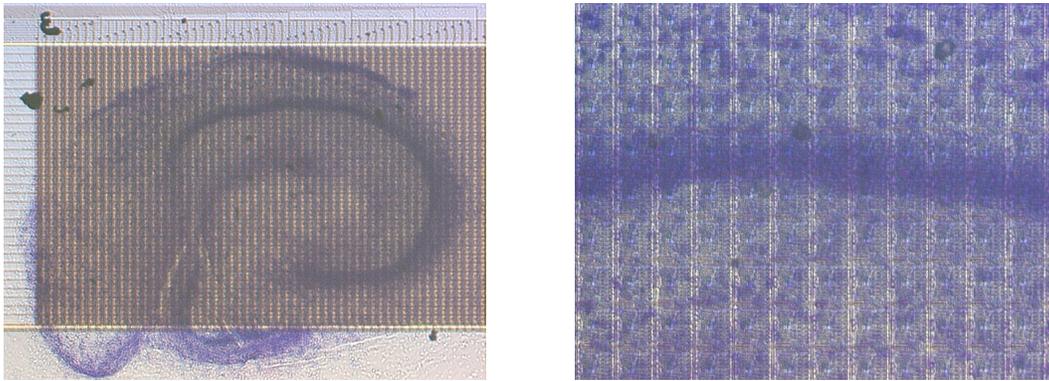


Bild 6.16: Organotypische Hippocampus-Slicekultur auf dem 2000-Transistoren-Chip. **Links:** In der Anfärbung erkennt man die typische Struktur des Hirnschnitts aus den beiden Bögen des Hippocampus und des Gyrus Dentatus. Der Slice deckt die Sensorfläche nahezu hundertprozentig ab. **Rechts:** Auf der stark strukturierten Oberfläche sind Einzelzellen schwer auszumachen. Die Zelldichte ist deutlich höher als die Sensordichte.

- Erste Kulturversuche ergaben, dass der Slice die Oberfläche und Eigenschaften unverändert läßt: Auch nach zweiwöchiger Zellkultur ließen sich an dem Chip die typischen Kennlinienfelder ableiten.
- Beschränkt man sich bei den Messungen auf Feldpotentiale, so hat man es mit einer Messgröße zu tun, die räumlich nicht auf Einzelsomata begrenzt ist. Damit ist die **räumliche Ausdehnung der Detektorfläche** von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ unproblematisch.
- Die zu erwartenden Signale sind in der Größenordnung $400 \mu\text{V} - 3 \text{mV}$, das **Signal-Rausch-Verhältnis** der Chips ist daher ausreichend [1].
- Die Slicekultur kann trotz unsteriler Umgebung während der Messung durch laufendes Durchpumpen von frischem Medium durch die Messkammer über mehrere Stunden hinweg am Leben erhalten werden. Nach Abschnitt 5.3 relaxiert die **Offsetstreuung** nach längerer Zeit in eine stabile, relativ homogene Verteilung.
- Die Probleme bei der **Spaltenumschaltung** können durch Abtrennen eines Achterblocks von Spalten entsprechend Abschnitt 5.4.3 umgangen werden.

- Es verbleibt die Begrenzung der **Abtastrate** durch die Limitierung der in der Apparatur eingesetzten Messkarte. Im Demonstrationsexperiment für das Multi-Site-Recording lag die maximal erreichbare Abtastrate bei 50 kHz bzw. 20 μ s pro Kanal. Um eine vernünftige Auflösung der Signale zu erzielen, ergibt sich eine Beschränkung auf etwa 25 gleichzeitig abgeleitete Sensoren.

Um zu einer Performance von etwa 100 gleichzeitig abtastbaren Signalen zu gelangen, wurde das Messprogramm gegen Ende dieser Arbeit von Martin Jenkner unter Beibehaltung der oben beschriebenen Funktionalität auf ein leistungsfähigeres Computer/Messkartensystem übertragen. Mit dem neuen System gelang eine erste 49-Sensoren-Multi-Site-Kopplung an einem von Brigitte Besl präpariertem Slice:

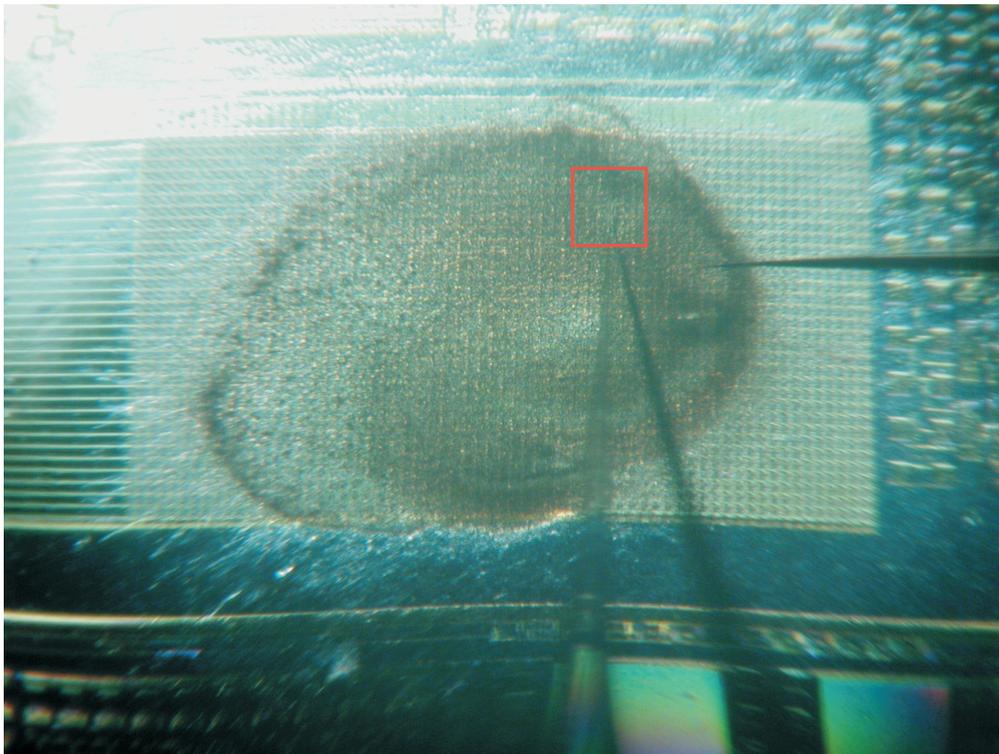


Bild 6.17: Slice-Experiment: Der Hirnschnitt wird von einer Wolframelektrode (rechts) gereizt. Die Glasmikroelektrode (unten) misst lokalisiert das Feldpotential im Slice und dient als Referenz und Kontrolle für die 49 Kopplungssignale der FET-Sensoren unter der Elektrodenspitze.

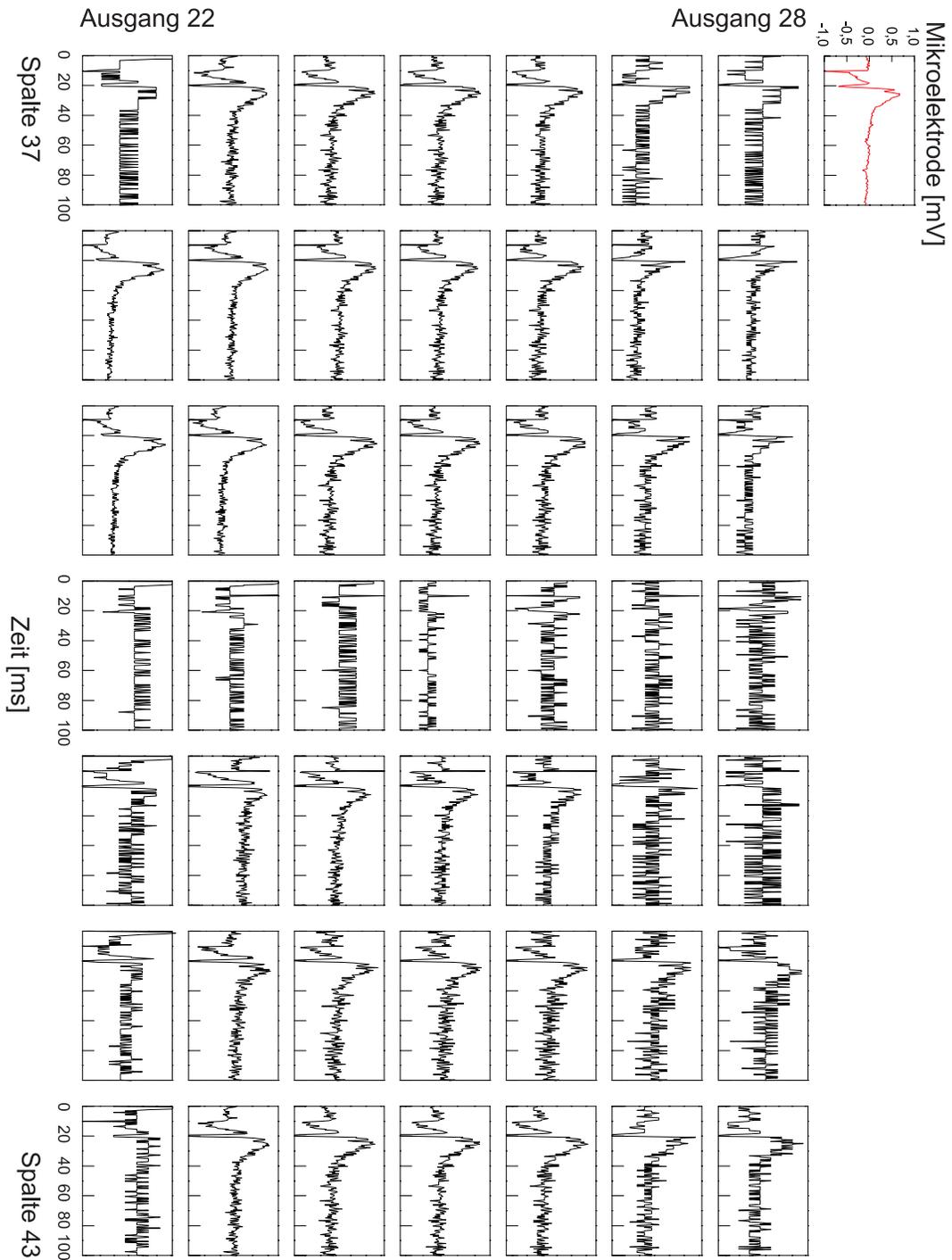


Bild 6.18: Multi-Site-Recording von 49 FET-Sensoren an der Slicekultur aus Bild 6.17. Aufgrund der inhomogenen Einsatzspannungen der Sensoren ergeben sich unterschiedlich gute Signal-Rausch-Verhältnisse.

Bild 6.17 zeigt die Lage des Hirnschnitts auf dem Chip. Der Slice wird in der Region CA3 durch die rechts im Bild sichtbare Wolframelektrode gereizt. Zur Kontrolle wird das Feldpotential lokal mit einer Glasmikroelektrode (unten) in CA1 abgetastet. Für die Messung wurde ein Bereich von 7×7 benachbarten FET-Sensoren ausgewählt (rot markiert).

Das Mikroelektroden- und die 49 Sensorsignale sind in *Bild 6.18* aufgetragen. Im Mikroelektrodensignal sind deutlich der scharfe Peak des Reizes bei 20 ms sowie die 10 ms breite Antwort der Zellkultur zu erkennen. Die Slicekultur dichtet den Kopplungsbereich der Sensoren sehr gut ab, so dass deutliche monophasische Kopplungssignale abgeleitet werden. Zeitpunkt und Form der Mikroelektroden- und Sensorsignale stimmen gut überein.

Das unterschiedlich gute Signal-Rausch-Verhältnis erklärt sich aus den inhomogenen Einsatzspannungen der Sensoren. Der vor der Messung erfolgte Offsetabgleich wurde so durchgeführt, dass sich die an der Messung beteiligten Sensoren im Mittel am steilen Punkt ihrer Kennlinien befinden. Dies bedeutet, dass die Sensoren mit den extremsten Offsets am Rande ihres Auflösungsvermögens operieren, daher zeigen ihre hochskalierten Signale bereits die Digitalisierungsschritte des A/D-Wandlers.

Eine Umrechnung der Signale auf effektive Gatespannungen wurde in *Bild 6.18* nicht durchgeführt, da eine Kennlinienmessung zum Messzeitpunkt nicht vorliegt und eine offsetabhängige Umrechnung der Signale mit der Kennlinie im Messprogramm zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht implementiert ist.

Die effektive Abtastrate betrug 2.2 kHz. Dies genügt für eine gute Auflösung der relativ langsamen Feldpotentiale. Eine Verdopplung der gleichzeitig ausgelesenen Sensorzahl auf 100 bei einer Halbierung der Abtastrate sollte damit problemlos möglich sein.

Kapitel 7

Ausblick

In dieser Arbeit wurde anhand von Kopplungsmessungen an Bluteigel- und Schneckenneuronen gezeigt, dass die Grundelemente und die Geometrie des Chips – der einzelne Neuro-Transistor ist eingebettet in eine individuelle Verstärkerzelle, unter Ansteuerung einer aus einer Vielzahl von Spalten mit Sensoren – prinzipiell funktionieren und aufgrund ihres modularen Aufbaus in späteren Chipentwürfen problemlos erweiterbar sind.

Bei der Charakterisierung der vorliegenden Chips wurden grundlegende Erkenntnisse für das Design eines Multiplexing-Chips gewonnen: Neben einem zuverlässigen Schutz vor Korrosion im Elektrolyten sind räumliche und zeitliche Homogenität der Sensorkennlinien notwendige Voraussetzungen für Multi-Site-Messungen. Die Umschalt- und Einschwingzeit beim Wechsel der aktiven Spalte entscheidet über die zeitliche Auflösung. Die Geometrie des Kontaktbereichs muss dem Neurondurchmesser angepasst sein. Die Funktionsfähigkeit des Sensors erfordert eine hohe Qualität der Kontaktlochauffüllung. Messungen an Rattenzellen erfordern eine Minimierung des Rauschens auf deutlich unter $100 \mu\text{V}$.

Die Kooperation mit Siemens/Infineon wird fortgesetzt. Derzeit fließen die in dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen in die Entwicklung einer neuen Chipgeneration ein. Neben der räumlichen Ausweitung des Sensorfeldes bei gleichzeitiger Verkleinerung des Rasterabstands werden die größten Probleme des vorliegenden Designs adressiert: – Inhomogenität der Einsatzspannungen, Rauschen, Schaltverhalten und Kontaktbereich –. Die Prozessierung der er-

sten Testmuster des neuen Chips beginnt voraussichtlich bereits im nächsten Frühjahr, so dass gegen Mitte 2001 mit dem Vorliegen der ersten Chips gerechnet werden kann.

Die gleichzeitige Aufnahme von 49 Kopplungssignalen zwischen Chip und einer organotypischen Hippocampus-Schnittkultur der Ratte beweist grundsätzlich die Anwendbarkeit der Neuron-Silizium-Kopplung zur raumzeitlichen Messung neuronaler Aktivität. Gleichzeitig eröffnet das Experiment Perspektiven zur Verwendung derartiger Array-Chips von der Grundlagen-Hirnforschung bis hin zum pharmazeutischen Medikamenten-Screening.

Anhang A

Die Rauschkenngroße V_{LFN}

Typisches Merkmal einer Rauschgröße $a(t)$ ist, dass ihr zeitlicher Verlauf nicht vorhersehbar ist. $a(t)$ ist mathematisch daher als eine Wahrscheinlichkeitsfunktion aufzufassen. Es besteht aber im Allgemeinen eine Korrelation zwischen dem Wert der Rauschgröße t_1 zu einem gegebenen Zeitpunkt und zu einem späteren Zeitpunkt $t_2 = t_1 + \tau$. Mathematisch ist dies die Autokorrelationsfunktion $\rho(\tau)$

$$\rho(\tau) := \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T a(t)a(t + \tau)dt. \quad (1)$$

Sie beschreibt die mittlere Änderung der Schwankungsgröße in einem Zeitintervall τ [29].

Um zu einer prägnanteren Darstellung der Rauschanteile zu gelangen, wechselt man in den Frequenzraum und definiert die spektrale Leistungsdichte $S(f)$

$$S(f) := 2 \int_{-\infty}^{\infty} \rho(\tau)e^{-2\pi if\tau} d\tau. \quad (2)$$

Aus dieser Formel lassen sich die spektralen Leistungsdichten für definierte Rauschtypen mathematisch ableiten. Das thermische Rauschen eines ohmschen Widerstandes R hat beispielsweise einen konstanten Wert $S_V(f) = 4kTR$, das Transistorrauschen von OSFETs besitzt einen charakteristischen $1/f$ -Verlauf.

Nach dem Faltungstheorem ist die Fouriertransformierte des Faltungsprodukts zweier Funktionen gleich dem Produkt der Fouriertransformationen der einzelnen Funktionen. Damit läÙt sich (2) umschreiben in

$$S(f) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \left| \int_{-T}^T a(t) e^{2\pi i f t} dt \right|^2. \quad (3)$$

Mit dieser Form kann die spektrale Leistungsdichte aus einem experimentell gemessenen Signal berechnet werden.

Um zu einer relevanten Aussage über das Rauschen zu gelangen, muss eine geeignete KenngröÙe gefunden werden, die den Eigenschaften des zu messenden Nutzsignals Rechnung trägt. Der typische Verlauf eines Aktionspotentials umfasst nur einen begrenzten Frequenzbereich von etwa 100 Hz bis 2 kHz. Als KenngröÙe des tatsächlich störenden Rauschens wird daher die KenngröÙe V_{LFN} als Integral über die spektrale Leistungsdichte in diesem Frequenzintervall definiert:

$$V_{\text{LFN}} := \sqrt{\int_{100\text{Hz}}^{2000\text{Hz}} S_{V_g}(f) df}. \quad (4)$$

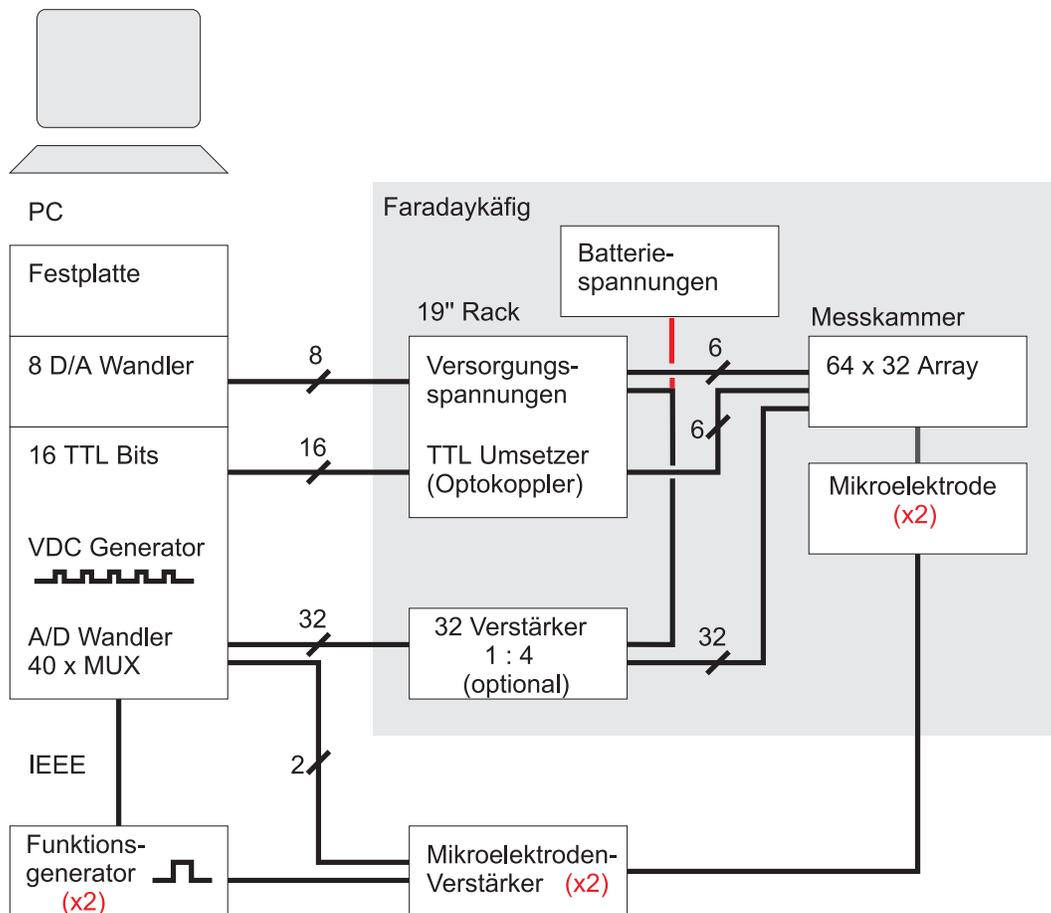
Die KenngröÙe besitzt die Dimension einer Spannung und stellt den Effektivwert des störenden Rauschens dar. Der Index LFN steht für „Low Frequency Noise“.

Zum Vergleich mit der Amplitude des Nutzsignals wird gelegentlich anstelle des Effektivwerts der anschaulichere Spitze-Spitze Wert V_{pp} verwendet. Die Umrechnung für ein Sinussignal lautet

$$V_{\text{pp}} = 2\sqrt{2} \cdot V_{\text{eff}}. \quad (5)$$

Anhang B

Messstand



Aufbau		
Tisch, Käfig		Zentralwerkstatt MPI
Marmorplatte	9 cm	Georg Halbig, München
Schwingungsdämpfer		Spindler & Hoyer
Stereolupe	Wild M10	Leica
Übersetzupe	Z3	Leica
Kaltlichtquelle		Schott
B/W CCD-Kamera		Sony
B/W Video Monitor		Sony
B/W Video Printer		Sony
Hardware		
PC: P60/EISA/PCI-Bus	PCD-5T	Siemens
Multifunktionsmesskarte	PCI-20501C-1	Intelligent Instrumentation
A/I-Multiplexer Karten	PCI-20368M-1	Intelligent Instrumentation
D/A-Wandlerkarte	DA 1250	Erma
GPIB-Karte		Keithley
Software		
Messprogramm in C/C++	(C/C++)	Eigenentwicklung
Kennlinienprogramm	(Labview)	Eigenentwicklung
Betriebssystem	MS-DOS 7.0	Microsoft
Betriebssystem	Windows 95	Microsoft
Borland C++ Compiler	Version 4.5	Borland
Plotsoftware Origin	Version 6.0	Microcal
LabView	Version 4.0	National Instruments
Elektronik		
Spannungen/6 V-Akkus		Eigenbau/Sonnenschein
TTL-Umsetzer/Optokoppler	Auwahllogik	Eigenbau
Filterkarte	V_{ref}	Eigenbau
32 Verstärker 1:4	(optional)	Eigenbau
Elektrophysiologie		
Brückenverstärker	BA-1S	npi
Funktionsgenerator	HP-33120 A	Hewlett-Packard
Mikromanipulator	(mechanisch)	Leitz
Mikromanipulator	(elektrisch)	Eppendorf

Anhang C

Messkammer

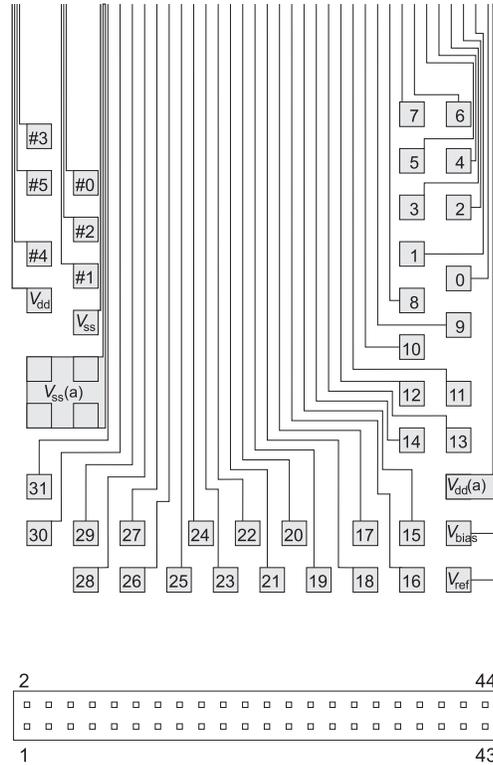
Die Basis für die Messkammern bilden gewöhnliche, einseitig kupferbeschichtete Platinen, die nach eigenem Layout in der Elektronikwerkstatt geätzt wurden. In die vier Ecken sind Löcher zum Fixieren der Messkammer auf dem x-y-Schlitten gebohrt. Zur Aufnahme des Chips ist das Platinenmaterial auf eine Tiefe von 0.7 mm ausgefräst, so dass die Oberfläche des eingeklebten Chips mit den Leiterbahnen eben liegt. Zur elektrischen Kontaktierung ist ein doppelreihiger, 44-Pin-Pfostenstecker auf die Endpunkte der Leiterbahnen aufgelötet.

Beim Entwurf der Plexiglaswannen wurde den Abmessungen des Sensor-Feldes auf dem Chip, der Entfernung der Bondkontakte vom Array, der Höhe der Bond-Loops und der Anordnung der platinenseitigen Kupferkontakte Rechnung getragen. Die zweiteiligen Wannens wurden von der Zentralwerkstatt auf einer computergesteuerten Drehbank gefertigt. Zur späteren Verkapselung des Volumens zwischen Innen- und Außenwanne mit Epon werden zwei Löcher an der Oberseite der Außenwanne an gegenüberliegenden Positionen gebohrt. Vor der Verarbeitung werden die Wannens gründlich in einer 5%-Lösung von *Tickopur*, *RP 100*, *Bandelin*, *Berlin* in Millipore bei 80 °C in der Ultraschallwanne gereinigt. Es folgt ein Ultraschallbad in reinem Millipore-Wasser, anschließend werden die Zellen über Nacht in frischem Millipore-Wasser gelagert.

Zum Aufkleben wurde handelsüblicher Universalklebstoff – *Pattex*, *Henkel* und *top-fit Klebstoff*, *Renia*, *Köln* – verwendet. Nach dem Aufkleben ist unbedingt eine Pause von mindestens zwei Stunden einzulegen, bis der Klebstoff abgebunden hat. Ansonsten besteht die Gefahr, dass die Chips beim anschließen-

den Bondprozess verschoben werden. Dabei können bereits kontaktierte Bonddrähte beschädigt oder neue Bondkontakte mangelhaft ausgeführt werden.

Steckerbelegung			
1	Select #3	2	Select #0
3	Select #5	4	Select #2
5	Select #4	6	Select #1
7	$V_{dd}(\text{digital})$	8	$V_{ss}(\text{digital})$
9	$V_{ss}(\text{analog})$	10	Ausgang 31
11	Ausgang 30	12	Ausgang 29
13	Ausgang 27	14	Ausgang 28
15	Ausgang 26	16	Ausgang 24
17	Ausgang 25	18	Ausgang 22
19	Ausgang 23	20	Ausgang 21
21	Ausgang 20	22	Ausgang 19
23	Ausgang 18	24	Ausgang 17
25	Ausgang 16	26	Ausgang 15
27	V_{ref}	28	V_{bias}
29	$V_{dd}(\text{analog})$	30	Ausgang 14
31	Ausgang 13	32	Ausgang 12
33	Ausgang 11	34	Ausgang 10
35	Ausgang 9	36	Ausgang 8
37	Ausgang 0	38	Ausgang 1
39	Ausgang 2	40	Ausgang 3
41	Ausgang 4	42	Ausgang 5
43	Ausgang 6	44	Ausgang 7



Das Bonden erfolgte mit einem semi-automatischen Ultraschall-Wedge-Bonder. Der Bonddraht aus einer Al/Si-Legierung besitzt einen Durchmesser von $33 \mu m$. Der Bondvorgang erfolgt immer vom Chip auf die Platine. Dadurch kann der erste Bond auf dem Chip auch auf engem Raum sehr exakt positioniert und eine optimale Spreizung der Bonddrähte vom Chip zur Platine erreicht werden.

Zum Aufkleben der Plexiglaswannen wurde der medizinische Silikonkleber *MK3, Nr. 53300-04, Sulzer Osypka GmbH, Grenzach-Wyhlen* benutzt. Zunächst wird die äußere Wanne auf die Platine aufgeklebt, die lose eingesetzte Innenwanne dient zur Justage. Vor dem Einkleben der Innenwanne sollten mehrere Stunden vergehen, um sicherzugehen, dass der Klebstoff abgetrocknet und die Außenwanne fixiert ist. Üblicherweise wurde die Innenwanne am nächsten Tag eingeklebt und dann eine weitere Nacht abgewartet.

Zuletzt erfolgt die Verkapselung der Bonddrähte durch *Epoxydharz*. Das Epon muss frisch aus den beiden Stammlösungen angesetzt werden und erreicht eine optimale Viskosität, wenn es vor dem Einfüllen in den Wannenzwischenraum kurz angewärmt wird. Das Epon wird mit einer 50 ml Kunststoffspritzflasche von der bondkontaktfernen Seite der Außenwanne her langsam eingefüllt. Das Epon härtet in 90 Minuten bei 80 °C im Umluftofen aus.

Epon (Abdichten der Messkammern)		
Stammlösung I	12 g	
Stammlösung II	8 g	
Tris(dimethylaminomethyl)phenol	0.5 g	
Stammlösung I		
Glycid ether 100	62 g	
Dodecenylsuccinic acid anhydride	100 g	
Stammlösung II		
Glycid ether 100	100 g	
Methylnadic anhydride	89 g	
Chemikalien		
Glycid ether 100	Nr. 21045	Serva/Boehringer
Dodecenylsuccinic acid anhydride	Nr. 20755	Serva/Boehringer
Methylnadic anhydride	Nr. 29452	Serva/Boehringer
Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Nr. 36875	Serva/Boehringer

Anhang D

Zellkultur – Schnecke

Defined Medium (DM)

Das für die Zellkultur verwendete Definierte Medium (DM) basiert auf dem Leibovitz L-15 Medium. Es wurde in Spezialzusammensetzung bei PAN (PAN Systems GmbH, Aidenbach) bestellt. Vor Verwendung wird dem Rohmedium Glutamin zugegeben.

Zur Entnahme der Zellen wurde DM durch hochosmolares Medium (HODM) ersetzt.

Defined Medium (DM)		
L-15 Spezialmedium	500 ml	P 04-27049, PAN
Glutamin (200mM)	20 µg/ml	K0202, Biochrom
High Osmolarity Defined Medium (HODM)		
Defined Medium		
D(+)-Glucose	30 mM	G-7021, Sigma
pH-Abgleich auf 7.9, steril filtrieren		

Definiertes Medium	
NaCl	40.00 mM
KCl	1.70 mM
CaCl ₂	4.10 mM
MgCl ₂	1.50 mM
HEPES	10.00 mM
D(+)-Galactose	450.00 mg/l
Na-Pyruvat	275.00 mg/l
Phenolrot	5.00 mg/l
L-Alanin	112.50 mg/l
L-Arginin	250.00 mg/l
L-Aspargin	125.00 mg/l
L-Cystein	60.00 mg/l
Glycin	100.00 mg/l
L-Histidin	125.00 mg/l
L-Isoleucin	125.00 mg/l
L-Leucin	62.50 mg/l
L-Lysin	37.50 mg/l
L-Methionin	37.50 mg/l
L-Phenylalanin	62.50 mg/l
L-Serin	100.00 mg/l
L-Threonin	150.00 mg/l
L-Thryptophan	10.00 mg/l
L-Tyrosin	150.00 mg/l
L-Valin	50.00 mg/l
D-Ca-Pantothenat	0.50 mg/l
Cholinchlorid	0.50 mg/l
Folsäure	0.50 mg/l
i-Inosit	1.00 mg/l
Nicotinamid	0.50 mg/l
Pyridoxin · HCl	0.50 mg/l
Riboflavin-5-Phosphat-Na	0.05 mg/l
Thiaminmonophosphat	0.50 mg/l

Normal Saline (NS) und Antibiotic Saline (ABS)

Die Präparation der Schnecken und das Spülen der Hirne fand in antibiotischer Ringerlösung ABS statt. Das Antibiotikum Gentamycin wird eingefroren aufbewahrt und der Ringerlösung Normal Saline (NS) erst unmittelbar vor der Präparation zugegeben.

Normal Saline (NS)		
Reinstwasser		Millipore
NaCl	51.3 mM	S-5886, Sigma
KCl	1.7 mM	P-4504, Sigma
CaCl ₂	4.1 mM	C-7902, Sigma
MgCl ₂	1.5 mM	M-2393, Sigma
HEPES Buffer (1M)	5.0 mM	H-0887, Sigma
Antibiotic Saline (ABS)		
Normal Saline		
Gentamycin	150.0 mg/ml	G-3632, Sigma
pH-Abgleich auf 7.9, steril filtrieren		

Listerine

Nach Entfernen des Gehäuses werden die Schnecken zum Ablösen von Schleim und Bakterien fünf Minuten in einer antibakteriellen Mundwasserlösung (*Listerine Coolmint Mundwasser*) gebadet. Die Lösung wirkt auf die Tiere betäubend.

Listerine-Lösung	
Listerine	25%
Normal Saline	75%

Enzyme und Inhibitor

Der Enzymcocktail dient zum Anverdauen der extrazellulären Matrix vor der Extraktion der Neurone. Um eine Beschädigung der Zellen zu verhindern, werden die Ganglien nach der Enzymbehandlung mehrfach mit DM gespült und einer anschließenden Inhibitor-Behandlung unterzogen.

Enzyme		
Defined Medium		
Collagenase/Dispase	1.33 mg/ml	269 638, Boehringer
Trypsin	0.67 mg/ml	T-4665, Sigma
Trypsin-Inhibitor		
Defined Medium		
Trypsin-Inhibitor	0.67 mg/ml	T-9003, Sigma
Abportionieren und Schockgefrieren		

Polylysin-Beschichtung

Die Poly-L-Lysin Lösung adsorbiert über Nacht auf den Siliziumchips und verbleibt bis unmittelbar vor dem Aufsetzen der Neurone in der Messkammer. Vor dem Übersetzen der Neurone wird die Messkammer mehrfach mit autoklaviertem Milliporewasser gespült.

Poly-L-Lysin		
Poly-L-Lysin	1 mg/ml	P-6516, Sigma
Tris-Puffer, pH 8.4	150 mM	Sigma

Präparationsbesteck

Präparationsbesteck	
Grobe Pinzette No. 2	Dumont
Feine Pinzette No. 5	Dumont
Augenschere, gebogen, 5 cm	Fa. Martin, Tübingen
Skalpell No. 24	BAYHA, Tuttlingen
Silikonsubstrat Sylgard 184	
Mikronadeln aus Wolfram 10130-10	Fine Science Tools
Mikronadel-Halter 26018-17	Fine Science Tools

Saugpipetten und Mikroelektroden

Die im Elektrodenpuller gezogenen Saugpipetten besitzen einen Durchmesser von etwa 100 μm . Sie werden vor der Verwendung feuerpoliert, sterilisiert und

mit einer Silikonlösung (*Sigmacote*, *Sigma*) beschichtet, um ein Anhaften der Neurone an der Glasoberfläche der Pipette zu verhindern.

Die Anstechpipetten werden unmittelbar vor der Messung mit einer KAc-Lösung (4 M) gefüllt.

Präparationsbesteck		
Universalpuller	Zeitz DMZ	Zeitz, Augsburg
Saugpipetten: Hämatokritglas	No. 564	Assistent
Silikonlösung: Sigmacote	SL-2	Sigma
Mikroelektroden: Borosilikatglas	No. 1403547	Hilgenberg
Mikroelektrodenfüllung: KAc	4 M	

Literaturverzeichnis

- [1] Besl B., Fromherz P. *Organotypic Hippocampal Slices Cultured on a Silicon Chip*. Eur. Biophys. J. **29**, 354 (2000)
- [2] Besl B. *Elektrische Kopplung von Gehirnschnitten der Ratte mit Feldeffekttransistoren*. Dissertation, Technische Universität München, in Vorbereitung (2000)
- [3] Brenner M. *Messung Neuronaler Aktivität mit einem 2048 Transistoren Chip*. Diplomarbeit, Universität Ulm (1995)
- [4] Brenner M., Weis R., vom Felde A., Bertagnolli E., Fromherz P. *Neuron-Chip with 2000 Coupling Sites*. Eur. Biophys. J. **26**, 76 (1997)
- [5] Caesar M. *Zellkulturen als in vitro Modell in der Neurobiologie*. Dissertation, Universität Tübingen (1989)
- [6] Caesar M., Aertsen A. *Morphological Organization of Rat Hippocampal Slice Cultures*. J. Comp. Neurol. **307**:87–106 (1991)
- [7] Dertinger S. *Kontrolle des neuronalen Wachstums durch elektrische Felder auf chemisch mikrostrukturiertem Silizium*. Dissertation, Technische Universität München (1998)
- [8] Egert U., Schlosshauer B., Fennrich S., Nisch W., Fejtl M., Knott T., Müller T., Hämmerle H. *A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays*. Brain Research Protocols **2**, 229-242 (1998)

- [9] Fromherz P., Offenhäusser A., Vetter T., Weis J. *A Neuron-Silicon Junction: A Retzius Cell of the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor*. *Science* **252**, 1290–1293 (1991)
- [10] Fromherz P. *Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane*. *Eur. Biophys. J.* **28**, 254–258 (1999)
- [11] Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*. *Pflüger Arch.* **391**, 85–100 (1981)
- [12] Hodgkin A. L., Huxley A. F. *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952)
- [13] Horowitz P., Hill W. *The art of electronics.*, 2nd ed., Cambridge University Press (1989)
- [14] Jenkner M., Fromherz P. *Bistability of Membrane Conductance in Cell Adhesion Observed in a Neuron Transistor*. *Phys. Rev. Lett.* **79**:4705–4708 (1997)
- [15] Jenkner M. *Hybride Netzwerke aus Neuronen von Lymnaea stagnalis und Silizium-Chips*. Dissertation, Technische Universität München (1999)
- [16] Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996) ISBN 3-86025-391-3
- [17] Neher E. *Elektronische Meßtechnik in der Physiologie*. Springer-Verlag, Berlin (1974)
- [18] Nicholls J. G., Martin A. R., Wallace B. G. *Vom Neuron zum Gehirn*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York (1995) ISBN 3-437-20517-X
- [19] Reichert H. *Neurobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York (1990) ISBN 3-13-745301-1

- [20] Ridgway R. L., Syed N. I., Lukowiak K., Bulloch, A. G. M. *Nerve Growth Factor (NGF) Induces Sprouting of Specific Neurons of the Snail, Lymnaea stagnalis*. J. Neurobiol. **22**:377–390 (1991)
- [21] Prinz A. A., Fromherz P. *Electrical synapses by guided growth of cultured neurons from the snail Lymnaea stagnalis*. Biol. Cybern. **82**:L1–L5 (2000)
- [22] Prinz A. *Towards Defined Networks: Guided Growth, Cable Transmission and Electrical Synapses of Cultured Snail Neurons*. Dissertation, Technische Universität München (2000)
- [23] Sawyer, R. T. *Leech biology and behaviour*. Oxford University Press (1986) ISBN 0-19-857377-4
- [24] Schätzthauer R. *Elektrische Charakterisierung des Adhäsionsgebiets wachsender Nervenzellen mit Feldeffekttransistoren*. Dissertation, Technische Universität München (1998)
- [25] Schätzthauer R., Fromherz P. *Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents*. Eur. J. Neurosci., **10**:1956–1962 (1998)
- [26] Schneider J. *Zur Neuron-Silizium-Kopplung mit Feldeffekttransistoren unterschiedlicher Struktur*. Diplomarbeit, Universität Ulm (1993)
- [27] Vassanelli S., Fromherz P. *Neurons from rat brain coupled to transistors*. Appl. Phys. A **65**:85–88 (1997)
- [28] Vassanelli S., Fromherz P. *Transistor records of excitable neurons from rat brain*. Appl. Phys. A **66**:459–463 (1998)
- [29] Völker M. *Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei Neurotransistoren*. Diplomarbeit, Technische Universität München, Max-Planck-Institut für Biochemie (2000)
- [30] Weis J. *Neuron-Silizium-Kopplung: Nervenzelle auf Gateoxid steuert Feldeffekttransistor durch Aktionspotentiale*. Diplomarbeit, Universität Ulm (1990)
- [31] Weis R. *Neuron-Transistor-Kopplung: Bestimmung der elektrischen Übertragungseigenschaften*. Dissertation, Universität Ulm (1994)

- [32] Weis R., Müller B., Fromherz P. *Neuron Adhesion on a Silicon Chip Probed by an Array of Field-Effect Transistors*. Phys. Rev. Lett. **76**:327–330 (1996)
- [33] Weis R., Fromherz P. *Frequency Dependent Signal Transfer in Neuron Transistors*. Phys. Rev. E **55**:877–889 (1997)
- [34] Widmann D., Mader H., Friedrich H. *Technologie hochintegrierter Schaltungen – 2. Aufl.* Springer-Verlag, Berlin (1996)

Danke

allen, die mir durch Diskussionen, Tipps oder praktische Unterstützung bei dieser Arbeit geholfen haben. Im Besonderen gilt mein Dank:

Prof. Dr. Peter Fromherz	für das einzigartige Projekt und viel Motivationshilfe,
Dr. v. Felde	für die Initiative und den ursprünglichen Entwurf des Chips,
Dr. Roland Thewes	für die spontane Hilfe und viele gute Ratschläge bei der Beschaltung des Chips,
Den Forschungsabteilungen von SIEMENS und Infineon Technologies	für die Flexibilität beim Entwurf, der Herstellung und Weiterentwicklung der Chips jenseits der CMOS-Standardprozesse,
Brigitte Besl	für die Präparation der Hippocampus Slices,
Martin Jenkner und Alfred Vogel	für kritisches Gegenlesen der Arbeit,
meinen Eltern und Annette	für ihren Rückhalt.

Die Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (**BMBF**).

Lebenslauf

Name	Markus Simon Brenner
geboren am	21.06.1968 in Ulm
Eltern	Gerlinde und Sieghard Brenner
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1974-1978	Besuch der Grundschule Neu-Ulm West
1978-1979	Besuch der Hauptschule Neu-Ulm Süd
1979-1988	Besuch des Gymnasiums Neu-Ulm
Wehrpflicht	
1988-1989	Ableistung des Grundwehrdienstes in der 1./PzGrenBtl 242 Feldkirchen
Studium	
1989-1995	Studium der Physik an der Universität Ulm
1994-1995	Diplomarbeit bei Prof. Fromherz in der Ab- teilung Membran- und Neurophysik am Max- Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Thema: Messung Neuronaler Aktivität mit einem 2048 Transistoren Chip
seit 1995	Wissenschaftlicher Angestellter in der Abtei- lung Membran- und Neurophysik am Max- Planck-Institut für Biochemie, Martinsried