

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

Elektrische Kopplung zwischen Lipidvesikeln und Siliziumchips

Christian Figger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

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

Elektrische Kopplung zwischen Lipidvesikeln und Siliziumchips

Christian Figger

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. M. Kleber
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 10.07.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 25.08.2003 angenommen.

Zusammenfassung

Zum näheren Verständnis der extrazellulären Neuron-Silizium-Kopplung wird ein Modellsystem benötigt, das durch intrazelluläre Techniken kontrolliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Methode zum Kontaktieren von Riesenvesikeln mittels Mikroelektroden entwickelt. Das neuartige Verfahren konnte anschließend zur Bestimmung der elektrischen Eigenschaften der Kopplung von Vesikeln an Silizium-Chips angewendet werden.

Die Etablierung der Elektrophysiologie wurde durch die Kombination von drei Techniken ermöglicht: Zum einen mussten die Riesenvesikel mittels Albuminbeschichteter Plastikgefäße in einem entspannten Zustand fixiert werden. Zum anderen wurden die Mikroelektroden zur Vermittlung eines elektrostatischen Membrankontaktes unter sehr hohem Innendruck beschichtet, um einer Verstopfung entgegenzuwirken. Schließlich wurde der Membrandurchbruch durch Fluorescein-Injektionen verifiziert. Es stellte sich heraus, dass die dichten Kontakte zwischen Vesikeln und Mikroelektroden großflächig durch rollende Membranen gebildet werden. Die Abdichtungswiderstände erreichten dabei anfänglich den Gigaohm-Bereich. Mit steigender Membrananspannung fielen sie über einen maximalen Zeitraum von einer halben Stunde ab.

Die entwickelte Methode wurde im zweiten Teil der Arbeit zur Messung der Signalübertragung von einer Mikroelektrode in ein unter dem Vesikel befindliches lineares Array aus 32 Feldeffekttransistoren angewandt. Das Sinus-Signal konnte mit Hilfe der Lock-In-Technik sowohl frequenz- als auch orts aufgelöst detektiert werden. Diesen intrazellulären Experimenten wurden zum Vergleich ähnlich ablaufende Messungen mit extrazellulärer Anregung des Elektrolyten gegenübergestellt. Das Übertragungsverhalten des Vesikel-Chip-Kontakts wird weitestgehend durch eine dünne Elektrolytschicht bestimmt, die sich zwischen den beiden Einzelsystemen befindet. Um den Kontakt zu verbessern, wurde ein extrem hochohmiger Elektrolyt verwendet. Zur Interpretation der Messungen musste deshalb die theoretische Beschreibung des als zweidimensionalen Kern-Mantel-Leiter beschreibbaren Kontakts immens erweitert werden. Als Ergebnis wurde einerseits eine erhöhte Leitfähigkeit der Kontaktmembran festgestellt, die entweder auf die Membrananspannung oder die Albumin-Beschichtung des Chips zurückzuführen ist. Andererseits war der Widerstand des Elektrolyten im Spalt niedriger als im Außenraum, was mit einer leitfähigen diffusen Doppelschicht an der oxidierten Siliziumoberfläche begründet werden kann.

Das Anstechen von Riesenvesikeln brachte zwei interessante oszillierende Nebeneffekte mit sich. Riss der Kontakt an der Mikroelektrode, so zeigten sich sowohl optisch als auch elektrisch vermessbare Membranporen. War der Effekt der rollenden Membran gut ausgeprägt, so konnten abwechselnd die Ausbildung eines zweiten kleineren Vesikels um die Mikroelektrode und die erneute Fusion mit dem Muttervesikel beobachtet werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vereinigung von Biologie und Halbleitertechnik	1
1.2	Der Riesenvesikel: das ideale Modellsystem	2
1.3	Zielsetzung und Messprinzipien	3
2	Anstechen von Riesenvesikeln	5
2.1	Grundlagen	5
2.1.1	Zellmembranen	5
2.1.2	Elektrophysiologie	7
2.1.3	Riesenvesikel	9
2.1.4	Messprinzip	12
2.2	Vorbereitende Arbeiten	18
2.2.1	Messaufbau	18
2.2.2	Herstellung von Riesenvesikeln	24
2.2.3	Reinigung durch Filterung	28
2.2.4	Immobilisierung in Polyimid Käfigen	30
2.2.5	Adhäsion und Abstandsbestimmung	36
2.3	Anstechen mit unbeschichteten Pipetten	40
2.3.1	Erste Messungen	40
2.3.2	Verifizierung des intrazellulären Kontakts durch Farbstoffinjektion	42
2.4	Anstechen mit beschichteten Pipetten: Gigakontakt	46
2.4.1	Beschichtung von Pipetten unter hohem Innendruck	46
2.4.2	Zeitliche Verlaufsanalyse des intrazellulären Kontakts	48
2.4.3	Dimethyldichlorsilan-Beschichtung	51
2.4.4	Aminosilan-Beschichtung	54
2.4.5	Poly-L-Lysin-Beschichtung	58
2.4.6	Poly-L-Lysin-Beschichtung: Abwechselnde Puls- und Lock-In-Messungen	62
2.4.7	Fazit	66
2.5	Spreading	70
2.5.1	Ein neuartiger Membran-Pipetten-Kontakt	70
2.5.2	Lipid-Barrieren gegen das Spreading	75
2.5.3	PMMA-Barrieren gegen das Spreading	77
2.6	Poren und Budding	81
2.6.1	Poren	81
2.6.2	Budding	87

3	Riesenvesikel auf Chips	93
3.1	Theorie des Vesikel-Chip-Kontakts	93
3.1.1	Metallfreie Feldeffekttransistoren	93
3.1.2	Grundlagen und Nomenklatur des Vesikel-Chip-Kontakts	96
3.1.3	Intrazelluläres Punktkontaktmodell	99
3.1.4	Extrazelluläres Punktkontaktmodell	107
3.1.5	Intrazelluläres Flächenkontaktmodell	115
3.1.6	Extrazelluläres Flächenkontaktmodell	125
3.2	Messapparatur	133
3.2.1	Messaufbau	133
3.2.2	Der Adhesios 1.1 Chip	136
3.2.3	SU-8 Strukturen	137
3.3	Versuchsvorbereitungen	142
3.3.1	Reinigung und Beschichtung der Chips	142
3.3.2	Positionierung der Vesikel	142
3.4	Messung extrazellulärer Übertragungsfunktionen	144
3.4.1	Durchführung	144
3.4.2	Vesikel mit salzhaltiger Saccharoselösung	146
3.4.3	Vesikel mit reiner Saccharoselösung	154
3.5	Messung intrazellulärer Übertragungsfunktionen	159
3.5.1	Durchführung	159
3.5.2	Experimente	161
3.6	Fazit	171
4	Ausblick	173
A	Zusatzexperimente	A-1
A.1	Vesikelentstehung an Polyimidstrukturen	A-1
A.2	Patchversuche an Riesenvesikeln	A-2
A.3	Pearling	A-3
B	Selffocusing	A-5
C	Lösung des Punktkontaktmodells	A-7
C.1	Intrazelluläres Punktkontaktmodell mit Bad und Pipette	A-7
C.2	Extrazelluläres Punktkontaktmodell mit Bad	A-8
D	Lösung des Flächenkontaktmodells	A-9
D.1	Extrazelluläres Flächenkontaktmodell ohne Bad	A-9
D.2	Extrazelluläres Flächenkontaktmodell mit Bad	A-11
E	Materialien	A-13

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Vereinigung von Biologie und Halbleitertechnik

Eine der größten Herausforderungen, die es für die moderne Wissenschaft gibt, ist die Verbindung von toter Materie und lebendem Gewebe, von Technik und Biologie. Beide bisher getrennten Gebiete haben ihre Stärken auf unterschiedlichen Gebieten. Ziel ist es durch die Konstruktion hybrider Systeme die Vorteile beider Systeme miteinander zu verbinden. Die Fähigkeiten lebender Zellen werden von der heutigen Technik bei weitem noch nicht erreicht. Durch eine elektrische Anbindung wäre es möglich, sie technisch zu nutzen. Eine mögliche Anwendung ist die Biosensorik. Hier könnten Zellen die Applikation biochemischer Reagenzien detektieren und diese Information an ein Halbleiterbauelement weitergeben. Auch die Nutzung der parallelen Verarbeitung lebender neuronaler Netzwerke durch angekoppelte Chips wäre denkbar. Andererseits könnten in ferner Zukunft Lebewesen von der digitalen Präzision eines Halbleiter-Chips in ihrem Gehirn profitieren.

Wie so oft steckt die Forschung trotz visionären Ziele auch hier noch in den sprichwörtlichen Kinderschuhen. Ein vielversprechender Ansatz ist aber dennoch im letzten Jahrzehnt gelungen: Die Verbindung einzelner Neuronen sowie einfachster neuronaler Netzwerke mit Siliziumchips. Der Grundstein hierfür wurden durch die Realisierung der Einzelkomponenten gelegt: Die Detektion der elektrischen Signale einer Nervenzelle durch einen metallfreien Feldeffekttransistor [Fro91] sowie die Erregung von Nervenzellen des Blutegels durch Stimulation mit einem Chip [Fro95b]. Nach diesen ersten Experimenten folgte bald die Kopplung von Rattenneuronen an Siliziumchips [Vas99]. Die Kontrolle kleiner Netzwerke wurde anschließend mit Hilfe von Schneckenneuronen verwirklicht. Der entscheidende Schritt dabei war die Fixierung der Einzelzellen durch Käfige aus Plastiksäulen, die das Wandern der Neuronen während der Ausbildung von Neuriten verhindern. Abbildung 1.1, A zeigt ein durch einen Käfig fixiertes Neuron. Elektrische Rückkopplungsschleifen zwischen einem Chip und zweier miteinander verbundener Nervenzellen konnten so realisiert werden [Pri00, Jen01, Zec01]. Die Entwicklung des Neurotransistors ist heute noch in erster Linie für die Forschung interessant. Bisher wurden Zelleigenschaften überwiegend durch die Techniken des Patchen und des Anstechen ergründet [Ham81]. Beide kontaktieren das Zellinnere mit feinen Glaspipetten. Diesen invasiven intrazellulären Messungen steht mit der Neuron-Silizium-Kopplung eine extrazelluläre Methode gegenüber, mit der sich die Zellen zerstörungsfrei untersuchen lassen. Dies ist besonders im Hinblick auf Langzeituntersuchungen von Interesse.

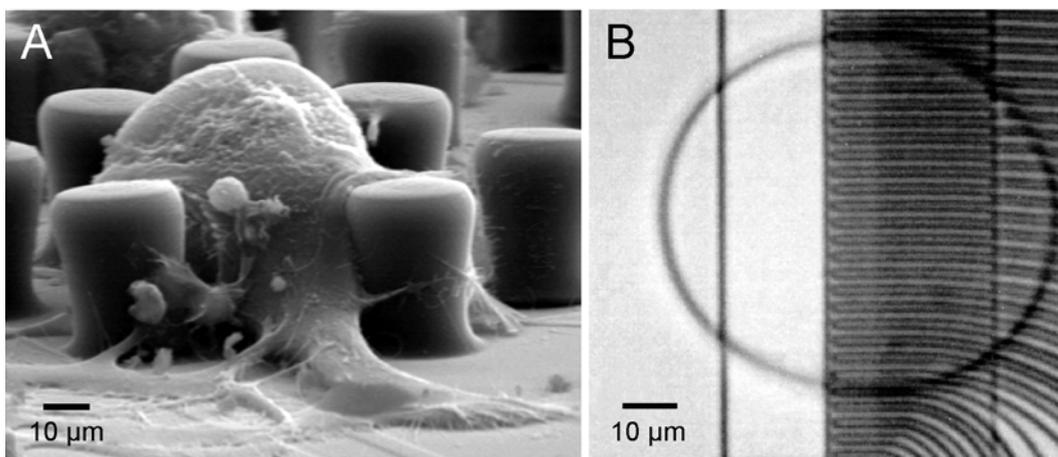


Abbildung 1.1: Das Neuron und sein ideales Modellsystem: der Riesenvesikel. **A:** Durch Plastiksäulen über der Sensorregion eines Siliziumchips fixiertes Schneckenneuron (REM-Aufnahme von G. Zeck [Zec01]). **B:** Riesenvesikel über linearem Transistor-Array (Auflichtaufnahme von V. Kießling [Fro99]).

1.2 Der Riesenvesikel: das ideale Modellsystem

Eine wichtige Voraussetzung für eine fortschreitende Optimierung des Neuron-Chip-Kontakts ist das genaue Verständnis der physikalischen Grundlagen. Dazu ist es unabdingbar, mit Modellsystemen zu arbeiten, die nicht die immense Komplexität lebender Zellen besitzen. Die Zellmembran besteht aus mehreren tausend verschiedenen Lipiden und Proteinen. Die elektrischen Eigenschaften des Neurons beruhen auf einer Vielzahl von sogenannten Ionenkanälen. Dies ist eine Familie von integralen Membranproteinen, die leitfähig für Ionen ist. Bisher wurden drei Modellsysteme im Hinblick auf die Zell-Chip-Kopplung verwendet. Hierbei handelt es sich um embryonale Nierenzellen (HEK-293), Erythrozyten sowie um *Xenopus*-Oozyten [Str01, Kie00, Vas02]. Sie enthalten in der Plasma-Membran normalerweise keine Ionenkanäle. Durch Transfektion ist es jedoch möglich, gezielt bestimmte Ionenkanalarten in diese Zellen einzubringen und zu studieren.

Trotzdem besteht weiterhin der Bedarf nach einem exakter definierten Modellsystem, in dem das Verhalten von Ionenkanälen in der Kontaktmembran zum Chip ohne die Beeinflussung durch unbekannte Bestandteile der Zellmembran untersucht werden kann. Als optimales System bietet sich hier der sogenannte Riesenvesikel (*giant vesicle*) an. Dabei handelt es sich um eine sphärische Membranblase ohne störende Zellorganellen. Seine Lipidzusammensetzung ist aufgrund der künstlichen Herstellung genau definierbar. Außerdem enthält er keine unerwünschten Bestandteile wie zum Beispiel die Lösungsmittel, die in den schon länger bekannten *black lipid membranes* (BLM) enthalten sind [Mue62].

Erste Untersuchungen an Riesenvesikeln, die mittels Poly-L-Lysin auf FET-Arrays adhärirt waren, wiesen auf eine elektrisch dichte Kontaktmembran hin [Fro99]. Abbildung 1.1, B zeigt das beschriebene System. Der gemessene spezifische Widerstand von mehr als $1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ kann durchaus mit gestützten Membranen (*supported bilayers*) konkurrieren [Hil02, Sac96]. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die Beweglichkeit und Funktionsfähigkeit bestimmter Ionenkanäle (Gramicidin) in der Kontaktzone erhalten bleibt.

1.3 Zielsetzung und Messprinzipien

Diese Arbeit diente der Etablierung des Riesenvesikels als Modellsystem für den Zell-Chip-Kontakt. Sie ist in zwei große Abschnitten unterteilt.

Obwohl es sich bei der Zell-Silizium-Kopplung um eine extrazelluläre Methode handelt, ist es zu ihrem Studium unerlässlich, die elektrische Spannung über der Membran durch eine intrazelluläre Mikroelektrode zu kontrollieren. Da dies ebenso für Riesenvesikel gilt, wurde im ersten Teil der Arbeit ein Verfahren zur Kontaktierung des Vesikelinneren mittels Anstechen entwickelt. Vorweg genommen werden soll hier die Erkenntnis, dass die Fixierung der Riesenvesikel bei intrazellulären Experimenten mit der oben erwähnten Adhäsion auf Poly-L-Lysin nicht möglich ist, da die Vesikel durch die Anspannung zu instabil sind. Desweiteren ist es im Gegensatz zu Zellen nicht selbstverständlich, eine hochohmige Abdichtung zwischen der Vesikelmembran und den als Messelektroden verwendeten Glaspipetten herzustellen. Ein weiterer großer Unterschied von Riesenvesikeln gegenüber Zellen ist die hohe Flexibilität ihrer reinen Lipidmembranen, die zu hinderlichen, aber auch interessanten Phänomenen führt.

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich der Charakterisierung des Vesikel-Chip-Kontakts. Seine Eigenschaften werden im wesentlichen durch den mit einem leitfähigen Elektrolyten gefüllten Spalt bestimmt, der sich zwischen der adhärenierten Membran und dem oxidierten

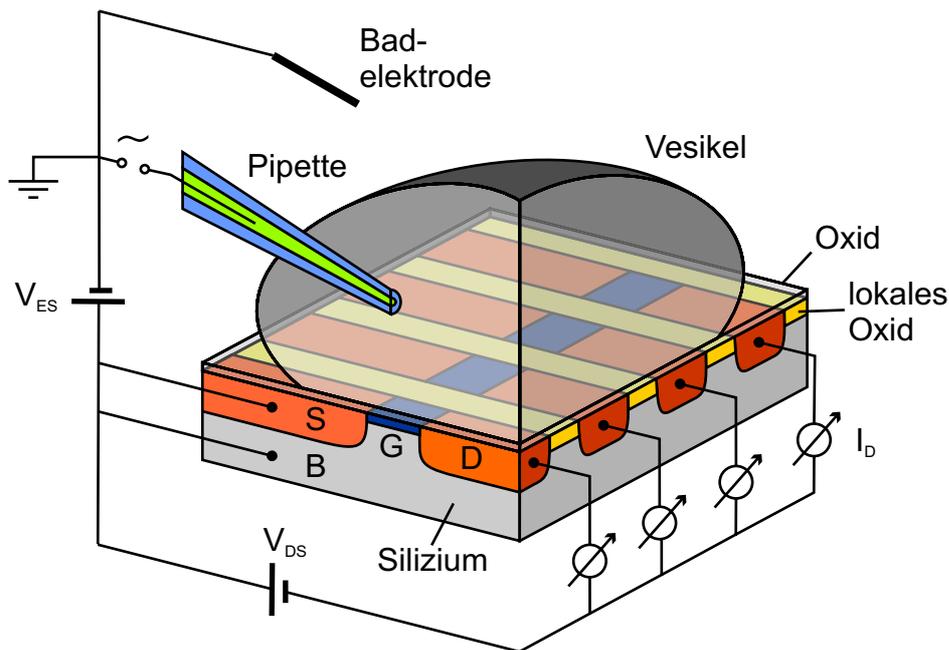


Abbildung 1.2: Die intrazelluläre Messmethode: Eine Pipette wird in einen Riesenvesikel eingestochen. Unter dem Vesikel befindet sich ein Array aus Transistoren, die gegeneinander durch ein dickes lokales Oxid isoliert sind. Die Source- (S) und Drainbereiche (D) der Sensoren sind an die Arbeitsspannungen V_{DS} und V_{ES} angeschlossen. Die über der Vesikelmembran anliegende Wechselspannung wird über die Pipette kontrolliert. Durch Messung des über das Gate (G) fließenden Drainstromes I_D kann auf die im Spalt zwischen Vesikel und Siliziumchip abfallende Spannung geschlossen werden. Der Siliziumchip (B) besitzt eine oxidierte Oberfläche, um ohmsche Ströme ins Bad zu verhindern.

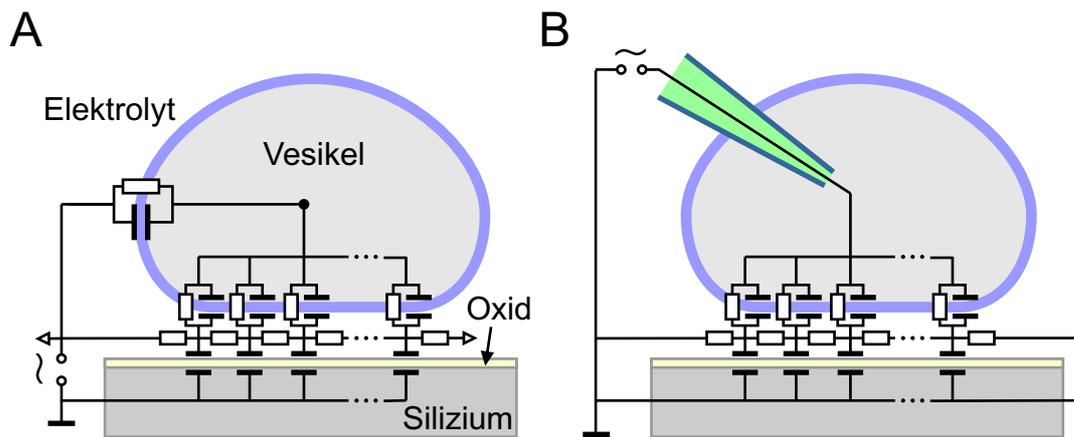


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der in den Transistor-Messungen verwendeten Messprinzipien. Beide Modellen zeigen einen Riesenvesikel, der auf dem dünnen Oxid eines Siliziumchips adhärirt ist. **A:** Extrazelluläre Messmethode: Die anregende Wechselspannung wird zwischen dem Elektrolyten und dem Chip angelegt. **B:** Intrazelluläre Messmethode: Über die Pipette wird das Vesikelinnere gegenüber dem Bad moduliert. Der Spalt wird jeweils durch einen Kern-Mantel Leiter dargestellt. Dabei werden dem Elektrolyten ohmsche Widerstände, dem Oxid Kapazitäten und der Vesikelmembran beides zugeordnet.

Siliziumchip befindet. Der durch einen zweidimensionalen Kern-Mantel-Leiter beschreibbare Kontakt lässt sich mit Hilfe eines linearen Feld-Effekt-Transistor-Arrays, auf dem der Vesikel adhärirt ist, untersuchen. Abbildung 1.2 stellt die primär anvisierte intrazelluläre Messmethode dar. Sie wurde 1996 erstmals von R. Weis verwendet. Mit Hilfe eines Arrays aus acht Transistoren konnte er das örtliche Spannungsprofil unter einem gepatchten Blutegelneuron messen [Wei96]. Die Methode beruht auf der Bestimmung des komplexen Verhältnisses von gemessener Spaltspannung und angelegter sinusförmiger Pipettenspannung. Aus Betrag und Phase dieser ermittelten frequenzabhängigen Übertragungsfunktion lässt sich auf die Leitfähigkeiten des Spalts und der adhärirten Membran schließen. Parallel dazu wurden zum Vergleich extrazelluläre Messungen durchgeführt. Diese Methode, die auf V. Kießling zurückgeht, benötigt keinen intrazellulären Kontakt und ist somit experimentell wesentlich einfacher durchzuführen [Fro99]. Sie basiert stattdessen auf der Messung des komplexen Verhältnisses von Spaltspannung zur ebenfalls sinusförmigen Spannung des Elektrolytbades. Aus Betrag und Phase der extrazellulären Übertragungsfunktion ist es ebenfalls möglich, die Leitfähigkeiten des Spalts zu bestimmen. Beide verwendeten Messverfahren werden in Abbildung 1.3 noch einmal schematisch verdeutlicht.

Kapitel 2

Anstechen von Riesenvesikeln

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Methode zum elektrischen Kontaktieren des Innenraums eines Riesenvesikels. Ausgegangen wurde dabei von der Grundtechnik des Anstechens. Da diese Standardmethode aber nicht zum Erfolg führte, musste sie erheblich erweitert werden. Letztendlich zeigte sich, dass das neuartige intrazelluläre Verfahren zu einem bisher unbekanntem Membran-Glaspipetten-Kontakt führt. Bevor aber ab Kapitel 2.3 auf die eigentlichen Verfahren und Experimente eingegangen werden kann, müssen erst einige Grundlagen und vorhergehende Arbeiten näher erläutert werden.

2.1 Grundlagen

2.1.1 Zellmembranen

Eines der primären Ziele der heutigen Biophysik ist, die genaue Funktionsweise der einzelnen Bestandteile der Zellmembran zu klären. Erster Schritt hierzu ist die genaue Kenntnis ihres Aufbaus.

Eine Zellmembran ist etwa 5 nm dick [Alb02]. Sie besteht hauptsächlich aus Phospholipiden. Diese sind amphiphil, was bedeutet, dass sie einen hydrophilen Kopf und einen hydrophoben Schwanz besitzen. In der Zellmembran sind die Lipide in einer Doppelschicht angeordnet. Ihre Schwänze zeigen ins Innere der Membran, während ihre Köpfe entweder dem Zytoplasma oder dem Außenraum, auch als *Bad* bezeichnet, zugewendet sind. Zytoplasma und *Bad* werden in Bezug auf die Zelle auch intra- und extrazelluläres Medium genannt. In der Doppellipidschicht diffundieren viele verschiedene Proteine wie in einer zweidimensionalen Flüssigkeit. Dieses Modell wird deswegen auch *Flüssig-Mosaik-Modell* genannt [Sin72].

Da die Doppellipidschicht für Ionen undurchlässig ist, verdient eine Sorte von integralen Membran-Proteinen besonderes Interesse: die *Ionenkanäle*. Sie verbinden Zytoplasma und *Bad* durch einen wassergefüllten Kanal, der meist nur bestimmte Arten von Ionen selektiv hindurchlässt. Eine Ionenkanalsorte wird nach der durchgelassenen Ionenart benannt. Die wichtigsten Kanalsorten sind Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle. Die meisten Kanäle besitzen die Fähigkeit sich zu schließen. Sie fluktuieren ständig zwischen einem geschlossenen und einem offenen Zustand. Die statistische Öffnungswahrscheinlichkeit kann dabei je nach Ionenkanalsorte durch elektrische Spannungen (*voltage-gated*), chemische Reize

(*ligand-gated*) oder mechanische Einflüsse (*mechanically-gated*) gesteuert werden. Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau eines Phospholipids, eines Ionenkanals und einer Zellmembran.

Ein weiterer wichtiger Membranbestandteil ist die *Ionenpumpe*. Sie transportiert aktiv Ionen durch die Membran. Die *Natrium-Kalium-Pumpe* beispielsweise befördert gleichzeitig Kalium in die Zelle und Natrium heraus. Diese Verschiebung von Ionen führt für jede Ionensorte zu einem Konzentrationsgradienten über die Membran. Durch den daraus entstehenden Diffusionsstrom der Ionen durch die Kanäle wird die Membran wie ein Kondensator aufgeladen und es entsteht eine Spannung. Sie verursacht einen Driftstrom durch die Kanäle, welcher der Diffusion entgegenwirkt. Die im Gleichgewicht anliegende Spannung heißt *Gleichgewichtspotential* V_X der Ionensorte X. Da in einer Zelle aber mehrere Ionenkanalsorten vorhanden sind, gleichen sich die Potentiale zum gemeinsamen *Ruhepotential* V_R aneinander an.

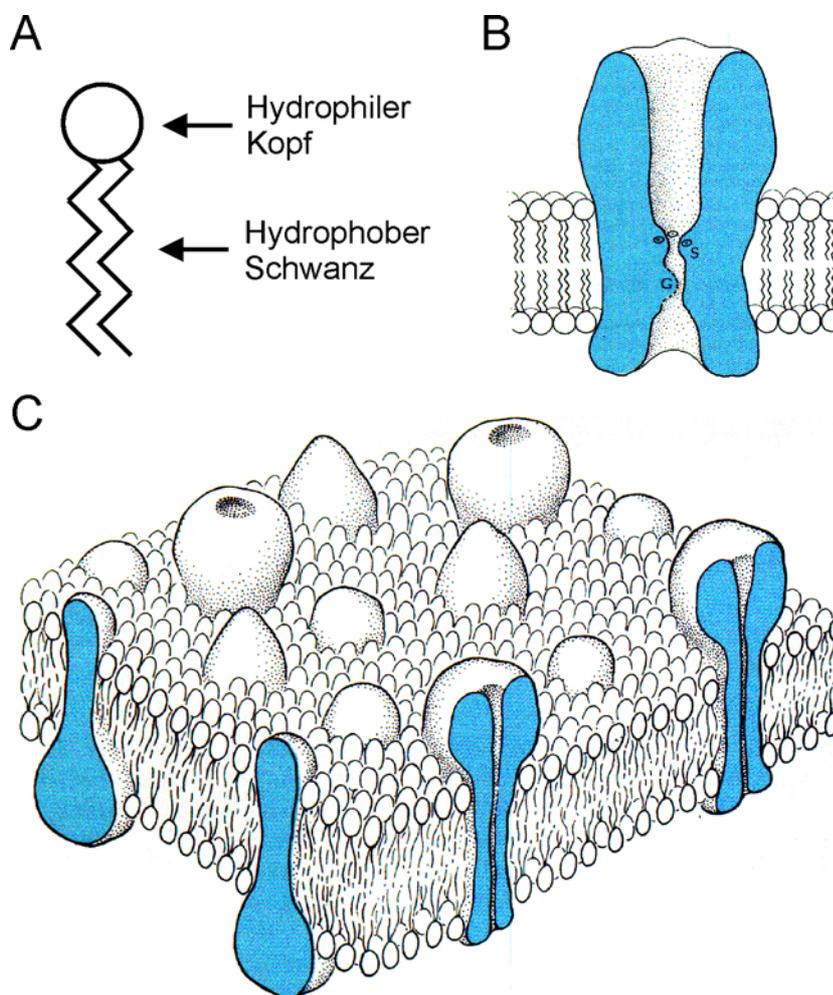


Abbildung 2.1: Aufbau einer Zellmembran: **A:** Phospholipid mit hydrophilem Kopf und hydrophobem Schwanz. **B:** Ionenkanal mit einem Tor (G, gate), das über einen Selektivitätsfilter (S) gesteuert wird [Nic95]. **C:** Doppellipidschicht mit eingelagerten Ionenkanälen und anderen Transmembranproteinen [Sin72].

2.1.2 Elektrophysiologie

Zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen muss sowohl ihre Außen- als auch ihre Innenseite kontaktiert werden. Bei Zellen haben sich dazu zwei Haupttechniken etabliert: Das *Anstechen* und das *Patchen*. In beiden Techniken werden feine Glaspipetten verwendet, die mit einer leitfähigen Salzlösung gefüllt sind. Sie sind in Abbildung 2.2 zu sehen. In ihnen befindet sich wiederum eine chlorierte Silberelektrode (Ag/AgCl-Elektrode). Das Potential des die Zelle umgebenden extrazellulären Mediums lässt sich analog über eine zweite chlorierte Silberelektrode kontrollieren.

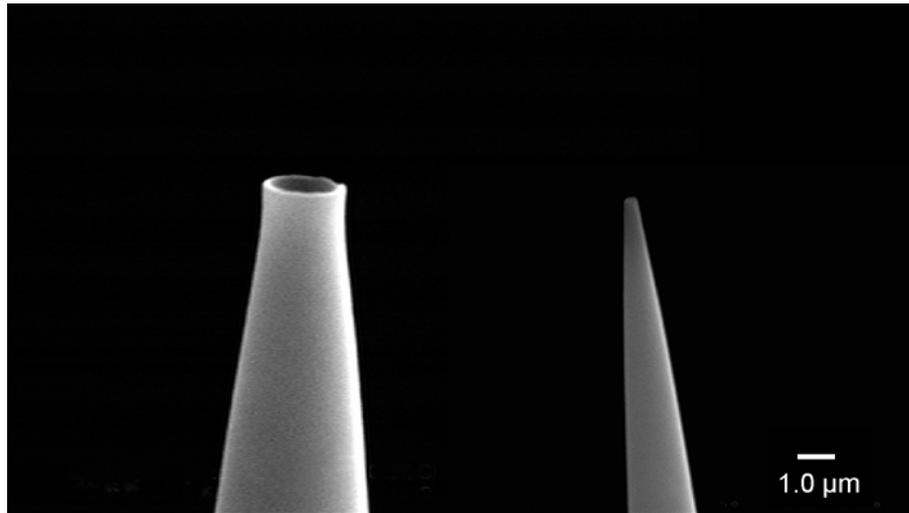


Abbildung 2.2: Gegenüberstellung von Patchpipette und Anstechpipette: Photomontage aus zwei REM-Aufnahmen von einer Patchpipette (links, Aufnahme von M. Ulbrich) mit einer Öffnung von $1.5\ \mu\text{m}$ und einer Anstechpipette (rechts) mit einem Öffnungsdurchmesser von $360\ \text{nm}$.

Für das Anstechen werden die auch *Mikroelektroden* genannten Glaspipetten sehr fein ausgezogen. Der Innendurchmesser der Spitze einer Anstechpipette liegt bei nur $360\ \text{nm}$. Sie wird mit einer hochkonzentrierten Salzlösung gefüllt. Innendurchmesser und Leitfähigkeit der Füllung bestimmen den Widerstand der Pipetten, der beim Anstechen zwischen 20 und $100\ \text{M}\Omega$ variiert. Die Grundtechnik des Anstechens ist einfach durchzuführen, da die Pipette nur vorsichtig durch die Zellmembran hindurch gestochen werden muss.

Beim Patchen dagegen benützt man breitere stumpfe Pipetten mit einem Innendurchmesser von $1.5\ \mu\text{m}$ an der Spitze. Dort werden sie zusätzlich leicht angeschmolzen, um eine möglichst glatte, reine und anziehende Oberfläche zu erhalten. Sie werden mit einer dem Zytoplasma ähnlichen Lösung gefüllt und haben einen Widerstand von $1 - 5\ \text{M}\Omega$. Beim Patchen wird die Zellmembran nur vorsichtig mit der stumpfen Spitze berührt. Nach leichtem Saugen stellt sich meist ein guter Kontakt zur Zellwand ein. Dieser Zustand wird als *cell-attached patch* bezeichnet. Man spricht auch aufgrund des hohen Abdichtwiderstandes zwischen Pipettenrand und Membran ($10 - 100\ \text{G}\Omega$) von einem *Gigaseal*. Mit einem geeigneten Verstärker können nun Ströme gemessen werden, die durch das kleine Membranstück innerhalb der Pipettenspitze fließen. Auf diese Weise konnten erstmals die rechteckigen Stromamplituden von einzelnen Ionenkanälen gemessen werden [Ham81]. Außer dieser Basistechnik gibt es noch weitere Varianten des Patchens. Aus dem cell-attached Zustand kann man einerseits durch Wegreißen des Patches von der Zelle einen *inside-out*

patch erreichen, bei dem die innere Membranseite ins Bad weist. Andererseits kann die Zellmembran durch stärkeres Saugen durchbrochen werden, so dass die ganze Zelle vermesen wird. Von diesem *whole-cell patch* kann nun schließlich ein *outside-out patch* erreicht werden, indem die Pipette weggezogen wird. Die entstehende Membranausstülpung reißt ab und dichtet sich wieder ab, so dass die Membranaußenseite ins Bad weist. Die beiden Patchtechniken *outside-out patch* und *inside-out patch* werden auch als *excised patch* bezeichnet. Alle Techniken sind in Abbildung 2.3 nochmals dargestellt.

In Hinblick auf die an Riesenvesikeln geplanten Transistormessungen im Rahmen dieser Arbeit sind nur zwei der oben beschriebenen Techniken von Interesse: das Anstechen und der *whole-cell patch*.

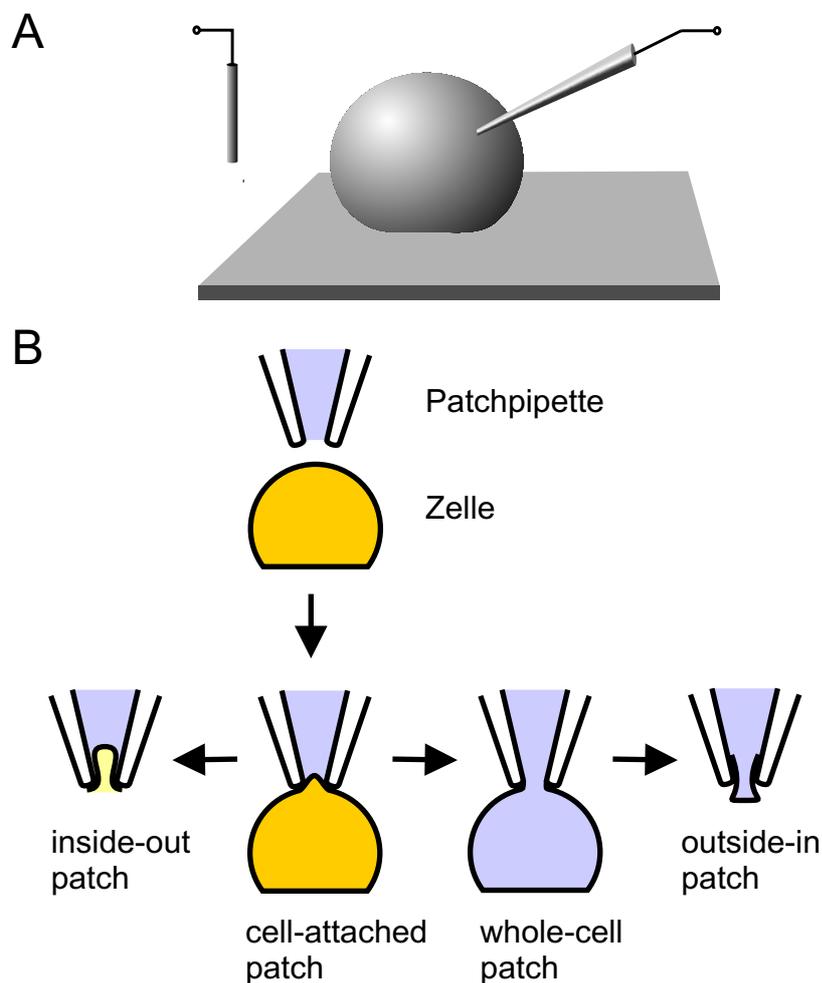


Abbildung 2.3: Anstechen und Patchen: **A:** 3D-Darstellung von angestochener Zelle mit Bad-elektrode. **B:** Überblick über die verschiedenen Patchtechniken. Nach dem Annähern an die Zelle (oben) gelang man durch Saugen in einen *cell-attached* Zustand. Durch weiteres Saugen wird ein *whole-cell patch* erreicht. Gleichzeitiges Wegziehen führt zu einem *inside-out patch*. Ein *outside-in* Zustand entsteht aus einem *whole-cell patch* durch Wegziehen der Pipette und ein umgedrehtes Ausheilen der Membran.

2.1.3 Riesenvesikel

Die Lipidvesikel oder Liposome wurden 1911 von O. Lehmann entdeckt [Leh11]. Er veröffentlichte nicht nur erste Bilder von langen Lipid tubuli am Rande hydratisierter Phospholipid-Filme [Las93], sondern beobachtete auch Vesikel-Strukturen, die er „künstliche Zellen“ nannte. Erst viele Jahre danach wurden sie Mitte der sechziger Jahre von A. Bangham wiederentdeckt [Ban64, Ban95].

Heute werden Vesikel nach ihrer Morphologie unterschieden. Einerseits werden sie nach ihrer Größe eingeteilt in die Klassen small (S, 30–50 nm), large (L, 100–200 nm) und giant (G, 0.5 – 300 μm), andererseits nach der Anzahl ihrer Membranen in die uni- (U), oligo- (O) und multilamellare (ML) Untergruppe. Häufige Verwendung finden Abkürzungen wie SUV (small unilamellar vesicle) und LUV (large unilamellar vesicle).

Inzwischen gewinnt die Forschung an Riesenvesikel, auch GUVs (giant unilamellar vesicles) genannt, immer mehr an Bedeutung. Diese Entwicklung spiegelt sich in dem Erscheinen einiger Übersichtsartikel [Döb00, Hot99, Men98] sowie eines Buches zur ersten internationalen Konferenz [Lui00] wider.

In erster Linie sind Riesenvesikel geschlossene Membranhüllen ohne Inhalt. Sie werden künstlich aus reinen Lipiden oder wahlweise auch Lipidmischungen hergestellt. Je nach Herstellungsmethode decken sie das gesamte Größenspektrum von Zellen und Zellorganellen ab, wodurch sie als Modellsystem geradezu prädestiniert sind. Von großem Vorteil ist, dass ihre Zusammensetzung aufgrund der künstlichen Herstellung genau kontrollierbar ist, und so die Eigenschaften der einzelnen Bestandteile der Zellmembran getrennt voneinander studiert werden können.

Morphologie der Vesikel

Beim Beobachten der Riesenvesikel fällt auf, dass sie nicht nur rein sphärische Formen annehmen können. Viele verschiedene Formen sowie Formveränderungen können unter dem Lichtmikroskop verfolgt werden. Dies ist auf die hohe Flexibilität der Membran zurückzuführen, die durch das gegenüber Zellen fehlende Zytoskelett begründet ist. Sie ist so weich, dass ihre Fluktuationen unter dem Mikroskop sichtbar sind, falls die Lipidmischung sich in der flüssigen Phase befindet.

Vesikelmembranen sind semipermeabel, das heißt einerseits undurchlässig für Ionen und andererseits relativ durchlässig für Wasser. Typisch für osmotische Ströme sind 10 – 100 $\mu\text{m}/\text{s}$ [Döb00]. Das Volumen eines Vesikels verändert sich also immer derart, dass interner und externer osmotischer Druck gleich sind.

Durch Applikation chemischer Substanzen, Temperatur- und Druckänderungen sowie mechanische, elektrische und magnetische Reize ist es möglich, Formtransformationen der Vesikel hervorzurufen. [Las93, Lip95, Lui00, Deu76, Käs91]. Beobachtet wurden das Knospen kleiner Vesikel aus größeren (*Budding*), Übergänge zwischen Discocyten und Stomatocyten, prolate und oblate Formen sowie die Bildungen von Hanteln (*dumbbell*), Birnen (*pear*) und Fäden (*tether*). Auch bekannte morphologische Veränderungen von Zellen, wie zum Beispiel Endozytose und Exozytose [Men98], oder von Zellbausteinen, wie des Golgiapparates und des endoplasmatischen Reticulums [Hot84], konnten analog bei Vesikeln ausgelöst werden. Die wohl erstaunlichste bisher produzierte Form ist der sogenannte Seestern (*starfish*) [Win96].

Die meisten Transformationen lassen sich auf die Änderung von zwei Parametern

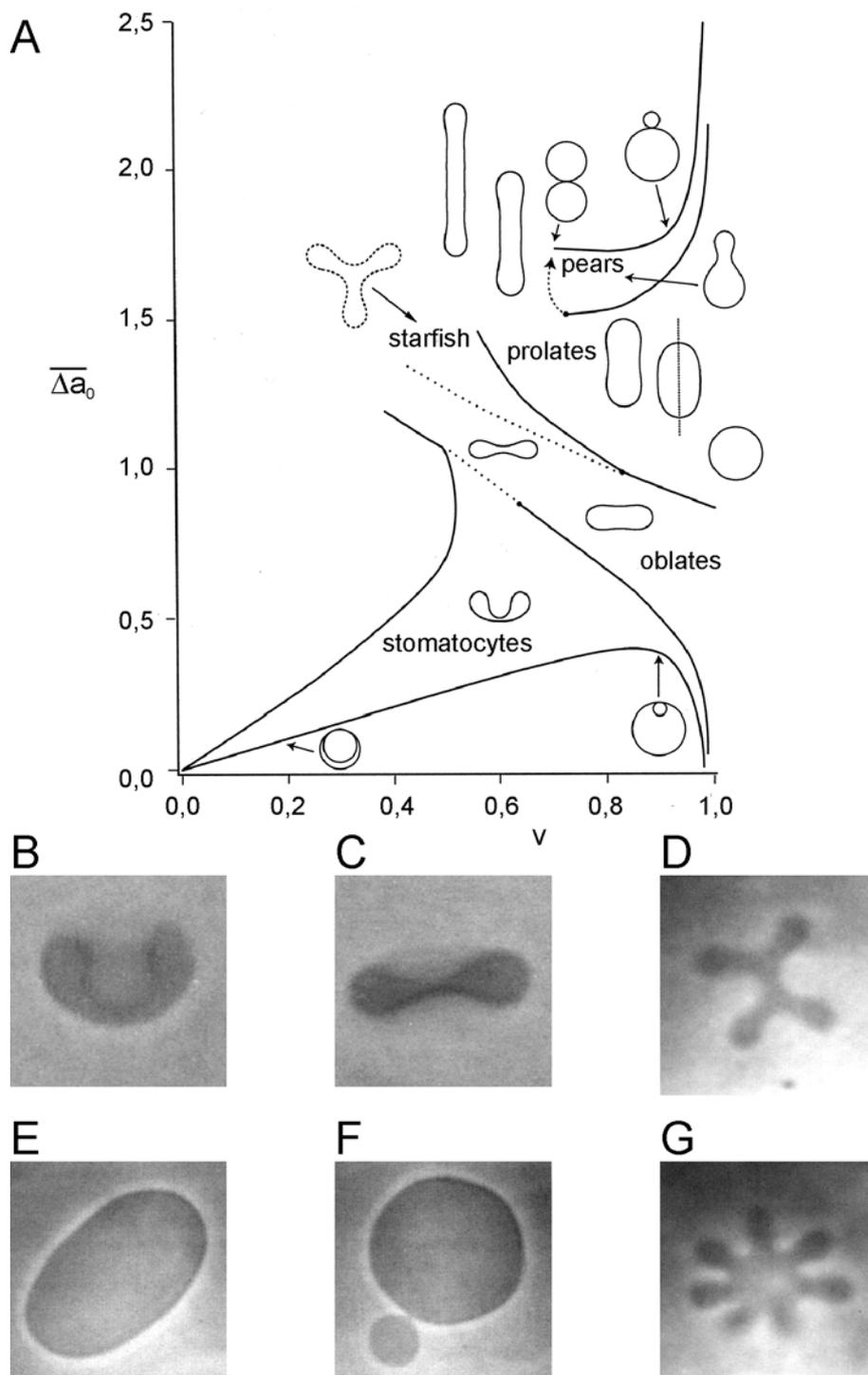


Abbildung 2.4: Verschiedene Vesikelformen: **A:** Phasendiagramm: Die verschiedenen Vesikelformen werden der effektiven differentiellen Fläche $\overline{\Delta a_0}$ und dem Verhältnis v von Volumen zu Fläche zugeordnet [Döb00]. Sie folgen aus der Minimierung der mechanischen Energie. **B - G:** Phasen-Kontrast-Aufnahmen von Vesikeln: Zu sehen sind ein Stomatocyt (B), ein Diskozyt (C) [Döb98], eine prolate Form (E, $5\ \mu\text{m}$), Budding (F, $5\ \mu\text{m}$) [Döb97], ein vierarmiger (D) und ein siebenarmiger Starfish (G) [Win96].

zurückführen. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis v von Volumen zur Fläche des Vesikels (*volume-to-area ratio*) und um die effektive differentielle Fläche $\overline{\Delta a_0}$ (*effective differential area*), die der Oberflächenkrümmung entspricht. Eine Temperaturveränderung führt zum Beispiel aufgrund der unterschiedlichen Ausdehnungskoeffizienten von Wasser und Lipid zu einer Änderung von v . Die Vesikelformen lassen sich entsprechend dieser beiden Parametern in ein Phasendiagramm einordnen [Döb97], das in Abbildung 2.1 zu sehen ist.

Zur physikalischen Beschreibung der Vesikelformen wurden mehrere theoretische Modelle entwickelt, die auf den Grundkonzepten der Krümmungsenergie (*bending energy*) und der gebrochenen Symmetrie der Doppellipidschicht basieren [Lip95, Deu76, Sve89, Ber90, Sei97].

Adhäsionsuntersuchungen

Zellen stehen meist in Kontakt zu anderen Zellen oder zu einem Substrat. Die Grundprinzipien der Annäherung, auch als Adhäsion bekannt, lassen sich optimal anhand von Riesenvesikeln untersuchen [Sei97].

Adhäriert ein Vesikel auf einem beschichteten Substrat, so lässt sich der Abstand durch zwei etablierte Verfahren bestimmen: RICM und FLIC.

RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) [Zil87, Räd92, Räd95b] kann den Abstand von Vesikeln zu einem durchsichtigen Substrat mit der Genauigkeit von bis zu einem Nanometer bestimmen. Außerdem ist es möglich, Fluktuationen der Kontaktmembran zu beobachten und die Membrankrümmung am Kontaktrand zu bestimmen.

FLIC (Fluorescence Interference Contrast Microscopy) [Bra97, Lam96, Lam02] wird benutzt, um Abstände von Membranen zu reflektierenden oxidierten Siliziumoberflächen zu bestimmen. Es besitzt ebenfalls eine Genauigkeit von einem Nanometer. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet. Auf sie wird in Kapitel 2.2.5 genauer eingegangen.

Um die Adhäsion zweier Vesikel aneinander zu studieren, ist es notwendig, sie zu fixieren und kontrolliert in Kontakt zu bringen. Dies ist mit Hilfe der Mikropipettentechnik (*micropipet aspiration*) möglich [Eva84a, Eva84b]. Die beiden Vesikel werden dazu vorher teilweise in eine Mikropipette eingesaugt. Durch Änderung des Druckes in einer der beiden Pipetten kann die Adhäsionsfläche zwischen den Vesikeln verändert werden. Durch Messung der Adhäsionsfläche in Abhängigkeit vom Pipettendruck kann auf die effektive Kontaktenergie (*effective contact energy*) zweier freier Membranen geschlossen werden. Durch Veränderung der Zusammensetzung der Vesikelmembranen lassen sich die Eigenschaften neutraler, geladener, schwach oder stark hydratisierter, nackter oder polymerbeschichteter Membranen untersuchen. Auch die Einflüsse von Rezeptoren, Antigenen und Antikörpern können bestimmt werden [NS96]. Nebenbei bemerkt ist es mit Hilfe der Mikropipettentechnik möglich, Materialeigenschaften von Vesikelmembranen wie Dehnungsmodul (*elastic area expansion modulus*) und Reißfestigkeit (*tensile strength*) zu bestimmen [Nee90].

Patches, Anstechen und Injektion

Im Hinblick auf die elektrophysiologische Untersuchung von reinen Lipidmembranen sowie spezieller interessanter Membranbestandteile wie Ionenkanälen ist es notwendig, ins Innere

von Vesikeln zu gelangen. Die hierzu in Frage kommenden Standardverfahren wurden schon in Kapitel 2.1.2 beschrieben.

Relativ einfach lässt sich mit einer Pipette ein Stückchen Membran aus einem Vesikel reißen. Die anerkannte Methode des excised patch wurde schon 1982 von Tank et al. auf Riesenvesikel angewendet [Tan82]. Er konnte außer den Einzelkanalströmen von Gramicidin und Alamedicin auch die eines im Lipidvesikel rekonstituierten Chlorid-Kanals, der aus Zellen des elektrischen Organs eines Zitterrochen stammte, messen. Die Methode wurde unter anderem von Higashi et al. und Keller et. al verbessert [Hig87, Kel88] und etablierte sich als Standardmethode, um Ionenkanäle isoliert von ihrer natürlichen Umgebung frei von Störfaktoren zu untersuchen.

Der einzige erwähnte Versuch, beim Patchen von Vesikeln eine whole-cell-Konfiguration zu erreichen, befindet sich in [Kel88]. Hier wird darauf hingewiesen, dass nach dem Durchbrechen der Vesikelmembran im Gegensatz zu Zellen der gemessene Membranwiderstand stark abfällt.

Erste Versuche, Riesenvesikel anzustechen, wurden 1987 von Higashi et al. unternommen [Hig87]. Er fixierte die Vesikel durch eine Saugpipette. Nach dem Einstechen beobachtete er die Spannungsantwort auf applizierte rechteckige Strompulse. Aus den exponentiellen kapazitiven Aufladungskurven konnte er auf eine spezifische Membrankapazität von $0.99 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ schließen, die für Lipidmembranen typisch ist. Auch hier ergab die Auswertung einen sehr geringen Membranwiderstand von $8 \text{M}\Omega$.

Weitere Versuche, Glaspipetten in Riesenvesikel einzustechen, wurden später nicht aus Interesse an den elektrischen Membraneigenschaften unternommen, sondern um Stoffe in einen Vesikel zu inkorporieren. 1995 wurden zum ersten Mal Fluoreszenzfarbstoffe und Salze in Riesenvesikel injiziert. Bei den Salzen ließen sich morphologische Veränderungen der Vesikel feststellen [Men95b].

Kurz darauf wurde ein Enzym (snake venom phospholipase A2) in und auf Riesenvesikel injiziert [Wic96]. In Echtzeit konnte die jeweilige Reaktion mit der Vesikelmembran beobachtet werden. Während das externe Applizieren des Enzyms zum Explodieren (*Burst*) des Vesikels führte, führte die Injektion ins Innere zu einem kontinuierlichen Schrumpfen. Auch die wiederholte Injektion von DNA wurde wenig später erfolgreich gezeigt [Buc98].

Die Idee, Vesikel als Mikroreaktoren zu verwenden, brachte 2000 eine weitere Gruppe um Owe Orwar dazu, in zwei aufeinander folgenden Injektionen T2-DNA und YOYO-1 in denselben Vesikel einzubringen. Aus den beiden Reaktionspartnern entstand wenig später ein detektierbarer Fluoreszenz-Farbstoff [Kar00]. Desweiteren gelang es ihnen, 30 nm große fluoreszierende Latexkugeln sowie 100 nm große Vesikel (SUVs) zu injizieren.

Die ersten hochohmigen elektrophysiologischen Leitfähigkeitsmessungen zur Untersuchung von Membranporen fanden an mit Poly-L-Lysin-fixierten Vesikeln statt [San99]. Die Zeitkonstanten der Messungen (10 – 30 ms) lassen aber trotz gegenteiliger Behauptung des Artikels eher auf cell-attached-Zustände als auf whole-cell-Konfigurationen schließen.

2.1.4 Messprinzip

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Entwicklungsschritte einer Methode beschrieben, um das Innere eines Vesikels elektrisch zu kontaktieren. Bei allen Versuchen wird versucht, so mit einer Glaspipette in das Innere vorzustossen, dass der Vesikel einerseits stabil bleibt und andererseits eine gute Abdichtung zwischen Glaspipettenspitze und Vesikelmembran entsteht. Deshalb folgen sie alle demselben elektrischen Messprinzip, das

an dieser Stelle näher erläutert werden soll.

Die durch die Pipette und den Riesenvesikel fließenden Ströme liegen zwischen 10 – 100 pA. Deshalb muss an die Pipette ein empfindlicher Verstärker angeschlossen werden. Er besteht üblicherweise aus einem Vorverstärker (*headstage*) direkt an der Messapparatur und einem Hauptverstärker.

Das System aus Riesenvesikel, Pipette und Verstärker kann durch ein einfaches Ersatzschaltbild beschrieben werden. Dabei bildet die Pipette mit dem Verstärker einen Tiefpass, der sich aus der Streukapazität C_S und dem Pipetten- oder Zugangswiderstand R_A (*access resistance*) zusammensetzt. C_S beinhaltet sowohl die Pipettenkapazität als auch die Streukapazität des Vorverstärkers. Meist beträgt sie 10 pF. Der Widerstand der Pipette R_A hängt stark von der Pipettengeometrie und der Salzlösung in ihrem Inneren ab. Bei Anstechpipetten liegt er zwischen 20 und 100 M Ω , während bei Patchpipetten 1 bis 10 M Ω üblich sind.

Da ein reiner Lipidvesikel weder Ionenkanäle noch -pumpen enthält, kann auch er durch ein einfaches RC-Glied beschrieben werden. Dieses besteht aus dem Membranwiderstand R_M und der Membrankapazität C_M . Der spezifische Widerstand einer Vesikelmembran r_M beträgt 1 M Ω cm² [Fro99]. Die spezifische Kapazität c_M wird auf 0.6 μ F/cm² geschätzt. Dieser Wert wurde an lösungsmittelfreien gestützten Membranen gemessen [Dam86]. Für sphärische Riesenvesikel mit einem Durchmesser von 50 – 150 μ m würde man also bei einer Oberfläche von 7800 bis 70000 μ m² Membranwiderstände R_M von 12.7 bis 1.4 G Ω und Membrankapazitäten C_M von 0.08 bis 0.7 nF erwarten.

Je nach Güte des Verfahrens, ins Innere eines Riesenvesikels zu gelangen, muss noch eine weitere Größe berücksichtigt werden: der Leckwiderstand R_L . Dieser beinhaltet sämtliche Undichtigkeiten. Hierbei kann es sich um Poren in der Vesikelmembran oder Kontaktundichtigkeiten zwischen Pipette und Vesikel handeln.

Die Spannung der Pipette gegenüber dem Bad wird als Pipettenspannung V_P , die über der Vesikelmembran abfallende Potentialdifferenz als Membranpotenzial V_M und der in die Pipette einfließende Strom als Injektionsstrom I_P bezeichnet. Das Ersatzschaltbild für einen angestochenen oder gepatchten Riesenvesikel ist in Abbildung 2.5 zu sehen.

Je nach Typ beherrschen die Verstärker verschiedene Messmethoden. Zur elektrischen Charakterisierung der Vesikelmembranen kommen zwei Methoden in Frage: *current clamp* und *voltage clamp*. Beim *current clamp* wird der Strom durch die Membran kontrolliert und die Spannung beobachtet, während beim *voltage clamp* die Spannung geklemmt und der Strom gemessen wird. Im ersten Teil dieser Arbeit wird der current clamp Modus verwendet, um die Eigenschaften der kontaktierten Vesikel sowie des elektrophysiologischen Kontaktes zu bestimmen. Im zweiten Teil dagegen kommen beide Methoden zum Einsatz.

Anhand des Ersatzschaltbildes in Abbildung 2.5 lässt sich die Spannungsantwort $V_P(t)$ auf eine Stromstufe $I_P(t)$ zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ berechnen. Dabei wird vorerst der Leckwiderstand R_L vernachlässigt. Für die Stromstufe gilt:

$$I_P(t) = I_0 \Theta(t) \tag{2.1}$$

wobei $\Theta(t)$ die Stufenfunktion ist. Durch Laplacetransformation erhält man im Frequenzbereich:

$$I_P(s) = \frac{I_0}{s} \quad , \quad s = iw \tag{2.2}$$

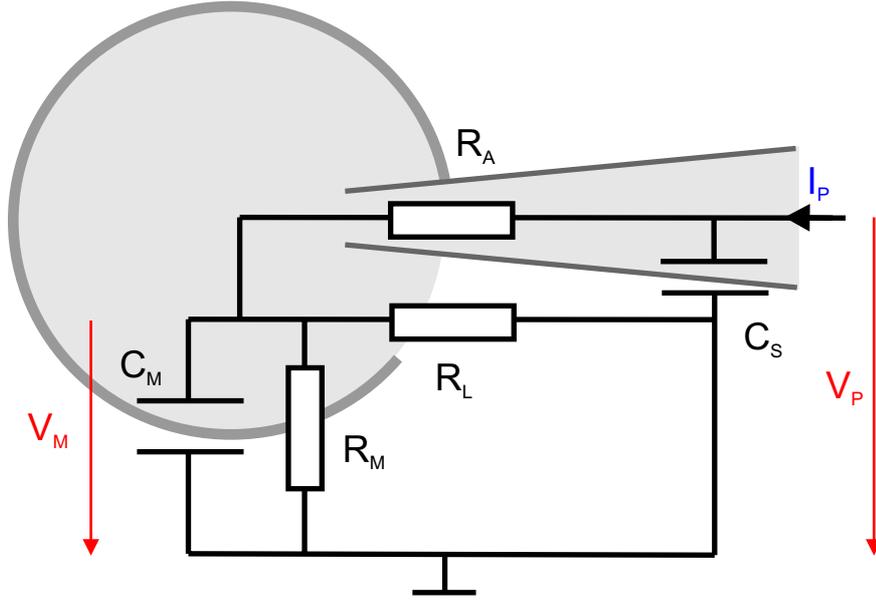


Abbildung 2.5: Ersatzschaltbild für einen angestochenen oder gepatchten Vesikel: Pipette und Vorverstärker bilden einen Tiefpass. Er besteht aus dem Zugangswiderstand R_A und der Streukapazität C_S . Die Vesikelmembran kann durch Membranwiderstand R_M und -kapazität C_M dargestellt werden. Leckströme durch die Membran oder einem fehlerhaften Kontakt zwischen Pipette und Membran wird durch einen Leckwiderstand R_L Rechnung getragen. Zusätzlich eingezeichnet sind Pipettenspannung V_P , Membranspannung V_M und der Injektionsstrom I_P .

Aus den Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregeln ergibt sich im Frequenzraum folgende Übertragungsfunktion:

$$\frac{V_P(s)}{I_P(s)} = \frac{R_A + R_M + C_M R_M R_A s}{1 + s(C_M R_M + C_S R_A + C_S R_M) + s^2 C_M R_M C_S R_A} \quad (2.3)$$

Multipliziert man $V_P(s)/I_P(s)$ mit der Stromstufe $I_P(s)$ aus Gleichung 2.2, so erhält man die Spannungsantwort $V_P(s)$ auf eine Stromstufe im Frequenzraum.

$$V_P(s) = \frac{I_0 (R_A + R_M + C_M R_M R_A s)}{s + s^2 (C_M R_M + C_S R_A + C_S R_M) + s^3 C_M R_M C_S R_A} \quad (2.4)$$

Durch Laplacerücktransformation ergibt sich die Spannungsantwort auf eine Stromstufe im Zeitraum.

$$V_P(t) = I_0 \left(R_A + R_M - A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} - A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \quad (2.5)$$

mit den Amplituden A_1 und A_2 sowie den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 :

$$A_1 = \frac{-k_2 + \frac{1}{2}k_4(k_1 + W)}{W} \quad A_2 = \frac{k_2 + \frac{1}{2}k_4(-k_1 + W)}{W} \quad (2.6)$$

$$\tau_1 = \frac{k_3}{k_1 + W} \quad \tau_2 = \frac{k_3}{k_1 - W} \quad (2.7)$$

wobei folgende Konstanten definiert wurden:

$$\begin{aligned}
 W &= \sqrt{-4\tau_M\tau_{AS} + (\tau_M + \tau_{AS} + \tau_{MS})^2} \\
 k_1 &= \tau_M + \tau_S + \tau_{MS} \\
 k_2 &= R_A(\tau_{AS} + 2\tau_{MS}) + R_M(\tau_M + \tau_{MS}) \\
 k_3 &= 2\tau_M\tau_{AS} \\
 k_4 &= R_A + R_M
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

Verwendet werden dabei die Zeitkonstanten $\tau_M = R_M C_M$, $\tau_{AS} = C_S R_A$ und $\tau_{MS} = C_S R_M$.

Die Membrankapazität ist bei Riesenvesikeln wesentlich größer als die Pipettenkapazität ($C_M \gg C_S$). Daraus folgt, dass $\tau_M \gg \tau_{MS} > \tau_{AS}$. Durch Potenzreihenentwicklung der Amplituden A_1 und A_2 sowie der inversen Zeitkonstanten $1/\tau_1$ und $1/\tau_2$ in Gleichung 2.6 lässt sich Gleichung 2.5 deutlich vereinfachen:

$$V_P(t) = I_0 \left(R_M - R_M e^{-\frac{t}{\tau_M}} + R_A - R_A e^{-\frac{t}{\tau_{AS}}} \right) \tag{2.9}$$

Diese Gleichung zeigt, dass gleichzeitig die Pipette mit der Zeitkonstante τ_{AS} und der Vesikel mit der Zeitkonstante τ_M der Membran aufgeladen werden. Dabei erfolgt die Aufladung der Pipette wegen $\tau_M \gg \tau_{AS}$ wesentlich schneller als die des Vesikels. Sie erscheint im Experiment fast schon als Stufe. Deswegen kann aus der Höhe der anfänglichen Stufe auf R_A und aus der zusätzlichen Höhe der Vesikelaufladung auf R_M geschlossen werden.

Abbildung 2.6 zeigt die Simulation einer Spannungsantwort $V_P(t)$ in der Pipette auf eine Stromstufe $I_P(t)$ mit der Höhe $I_0 = 10$ pA für den Fall einer optimalen Kontaktierung des Inneren eines Vesikels. Das bedeutet, dass der Leckwiderstand R_L vernachlässigt wird. Dargestellt sind Aufladungskurven für unterschiedliche Vesikelradien a_V . Je größer der Vesikel, desto höher ist seine Membrankapazität und desto niedriger ist sein Membranwiderstand. Der schnelle kleine Spannungsanstieg zu Beginn der Stromstufe wird zusätzlich vergrößert, um die Existenz der beiden unterschiedlich großen Zeitkonstanten τ_{AS} und τ_M zu demonstrieren. Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Kapazitäten von Pipette und Vesikel lassen sich im Spannungssignal die unterschiedlich schnellen Aufladungen von Pipette und Vesikel leicht trennen.

Auffallend in Abbildung 2.6 ist auch, dass die Aufladung der Vesikel trotz unterschiedlicher Oberfläche A_M mit derselben Zeitkonstante τ_M erfolgt. Dies ist leicht einzusehen, wenn mit $R_M = r_M/A_M$ und $C_M = c_M A_M$ für τ_M folgt:

$$\tau_M = C_M R_M = c_M r_M \approx 1 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2} \cdot 1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2 = 1 \text{ s} \tag{2.10}$$

τ_M hängt also in der Theorie nicht von der Vesikelgröße, sondern nur von der spezifischen Membrankapazität c_M und dem spezifischen Membranwiderstand r_M ab und sollte deshalb für alle Vesikel gleich sein.

Im realen Experiment werden kontinuierlich rechteckige Strompulse mit einer Höhe von $I_0 = 10 - 250$ pA an die Pipette angelegt. Durch Anfitzen der ansteigenden Aufladungskurve lassen sich die Parameter des Systems bestimmen. Der Leckwiderstand R_L ist meist so klein, dass er nicht vernachlässigt werden darf. Für obige Formeln bedeutet das,

dass der Membranwiderstand R_M durch den effektiven Membranwiderstand R_M^* ersetzt werden muss, der sich folgendermaßen ergibt:

$$R_M^* = \frac{R_M R_L}{R_M + R_L} \quad (2.11)$$

In der Praxis führt das zu kürzeren Aufladungszeitkonstanten τ_M^* der Membran und zu geringeren Sättigungsamplituden $I_0(R_A + R_M^*)$. Auch die Größenunabhängigkeit der Aufladungszeitkonstanten τ_M geht damit verloren. Abbildung 2.7 zeigt die Simulation ei-

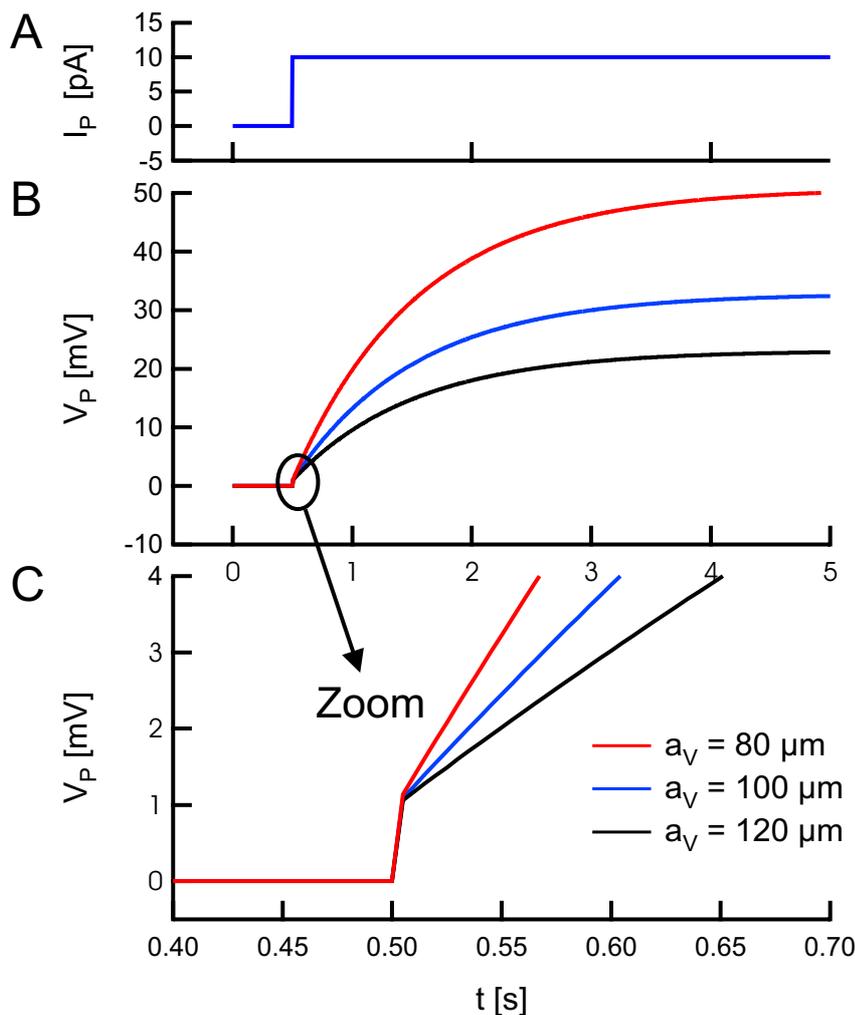


Abbildung 2.6: Current clamp Simulationen: Ein rechteckiger 10 pA Strompuls $I_P(t)$ (A) verursacht eine exponentielle Aufladungskurve $V_P(t)$ (B). Simuliert wurden drei Aufladungskurven für Riesenvesikel mit unterschiedlichen Radien a_V . Sie besitzen zwei Zeitkonstanten, was deutlich am Knick im Zoom des Spannungsgraphen (C) zu sehen ist. Der schnelle Anstieg am Anfang ist hauptsächlich durch den Zugangswiderstand R_A und die Streukapazität C_S bestimmt, die verlangsamte Aufladung danach durch Vesikelwiderstand R_M und -kapazität C_M . Verwendete Parameter: $R_A = 100 \text{ M}\Omega$, $C_S = 10 \text{ pF}$, rot = ($a_V = 40 \text{ }\mu\text{m} \Rightarrow R_M = 5.0 \text{ G}\Omega$, $C_M = 0.20 \text{ nF}$), blau = ($a_V = 50 \text{ }\mu\text{m} \Rightarrow R_M = 3.2 \text{ G}\Omega$, $C_M = 0.31 \text{ nF}$), schwarz = ($a_V = 60 \text{ }\mu\text{m} \Rightarrow R_M = 2.2 \text{ G}\Omega$, $C_M = 0.45 \text{ nF}$)

ner Spannungsantwort $V_P(t)$ in der Pipette auf einen Strompuls $I_P(t)$ mit der Höhe $I_0 = 100 \text{ pA}$ bei einem Leckwiderstand R_L von $1 \text{ G}\Omega$. Deutlich zu erkennen sind dabei die schnellen Auf- und Entladungen der Pipette zu Beginn und Ende des Pulses.

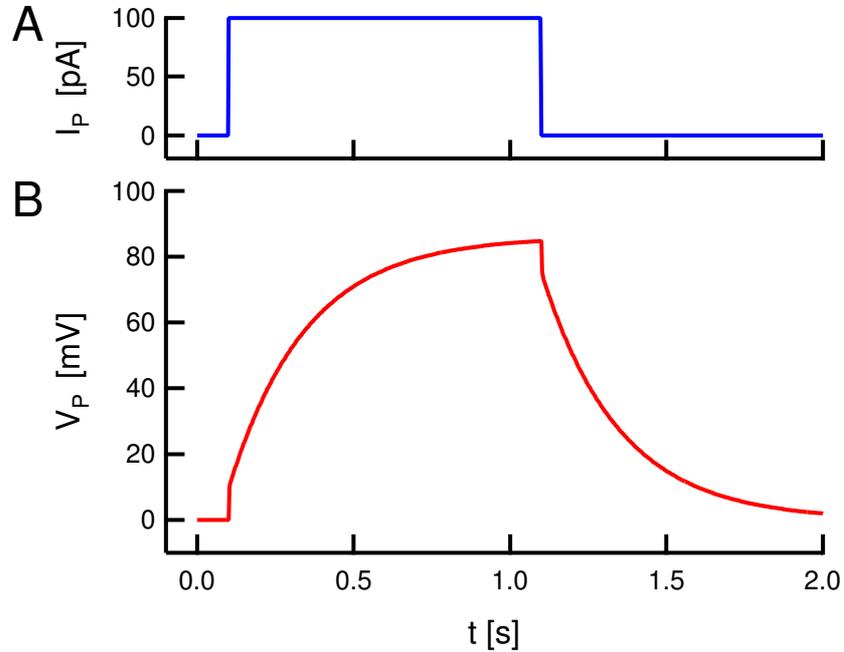


Abbildung 2.7: Current clamp Simulation: Ein rechteckiger 100 pA Strompuls $I_P(t)$ (**A**) verursacht ein charakteristisches Spannungssignal $V_P(t)$ in der Pipette (**B**). Der verwendete Vesikelradius a_V beträgt $50 \mu\text{m}$. Daraus ergibt sich ein Membranwiderstand von $R_M = 3.2 \text{ G}\Omega$ und eine Membrankapazität von $C_M = 0.31 \text{ nF}$. Ein Leckwiderstand von $R_L = 1.0 \text{ G}\Omega$ führt zu $R_M^* = 760 \text{ M}\Omega$ und damit zu einer wesentlich geringeren Amplitude und kürzeren Zeitkonstante $\tau_M^* = R_M^* C_M = 240 \text{ ms}$ als für einen optimal kontaktierten Vesikel erwartet würde. (weitere Parameter: $R_A = 100 \text{ M}\Omega$, $C_S = 10 \text{ pF}$)

2.2 Vorbereitende Arbeiten

2.2.1 Messaufbau

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen zwei Messapparaturen zum Einsatz. An dieser Stelle wird lediglich auf die Erste eingegangen. Die Zweite ist eine Verschmelzung der ersten Apparatur mit dem Aufbau von V. Kießling und wird in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Grundaufbau

Die in Abbildung 2.8 schematisch dargestellte erste Apparatur hatte zum Zweck, sowohl Elektrophysiologie als auch Farbstoffinjektion in Riesenvesikeln zu ermöglichen. Kernstück der Apparatur war ein blanker Siliziumchip mit Käfigen aus Polyimid zur Immobilisierung der Riesenvesikel. Dies wird genauer in Kapitel 2.2.4 erläutert. Auf dem in einem Plastikschälchen fixierten Chip wurden die Riesenvesikel in passende Käfige positioniert. Die Anstechexperimente wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Injectman, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Durch ihn konnte der Pipettenhalter mikrometergenau bewegt werden. Abbildung 2.9 zeigt Photos vom Messaufbau.

Die Pipette, die mit leitfähiger hochkonzentrierter Salzlösung gefüllt war, wurde über einen chlorierten Silberdraht kontaktiert und mit dem Vorverstärker (*headstage*) eines Einzel-Elektroden-Verstärkers (*single electrode system*) verbunden, der sowohl voltage als auch current clamp Modi besaß. Der Verstärker (SEC-10L, npi electronic, Tamm) selbst wurde über einen Messrechner (450 MHz, Pentium 3, 250 MB RAM, Windows 98 SE) gesteuert, der mit einer Messkarte (AT-MIO-16E-2, National Instruments, Austin, USA) zur

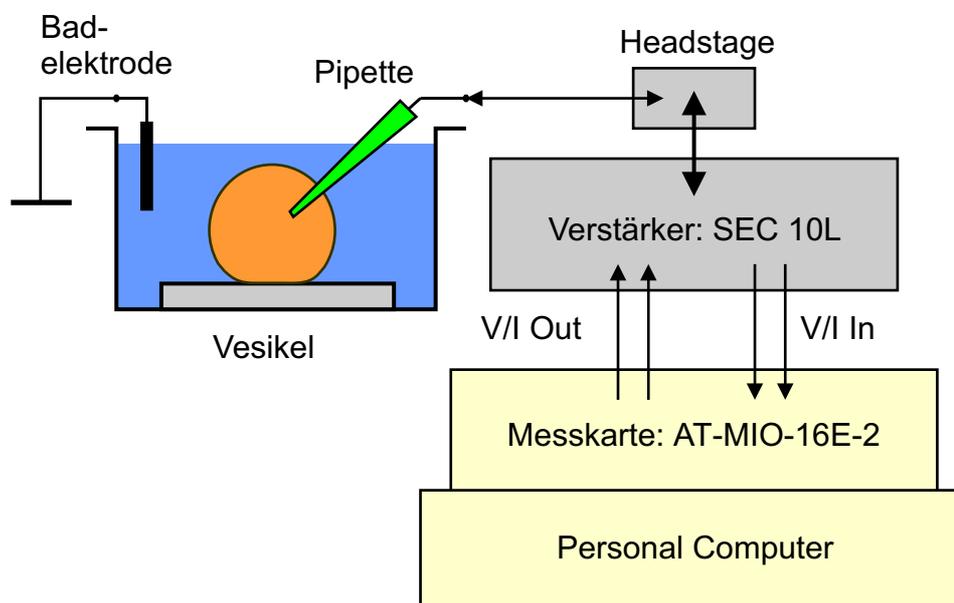


Abbildung 2.8: Schema des ersten Messaufbaus zur Elektrophysiologie an Riesenvesikeln: Die Badelektrode liegt auf Masse. Die Pipette wird über die Headstage vom Verstärker kontrolliert, der wiederum mit der Messkarte im Computer verbunden ist. Je nach Messmethode, ob current clamp oder voltage clamp, kann entweder Strom (I out) oder Spannung (V out) von der Messkarte vorgegeben werden. Bei beiden Modi wird gleichzeitig Strom und Spannung gemessen.

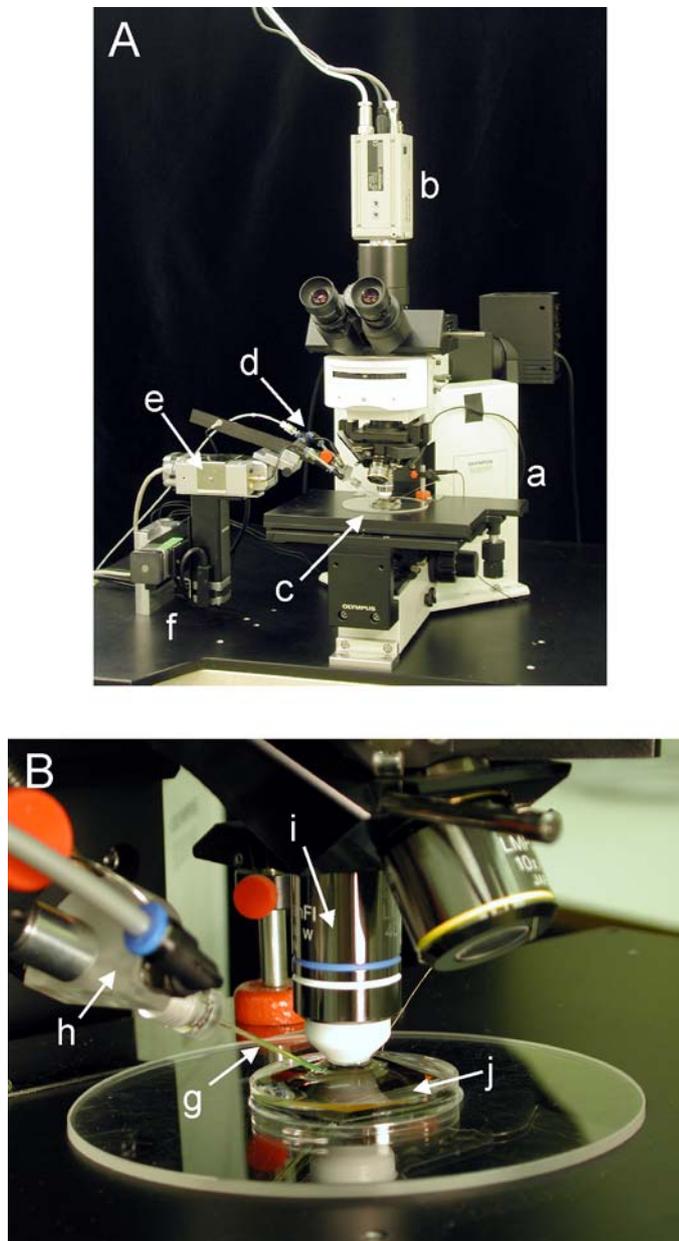


Abbildung 2.9: Erster Messaufbau zur Elektrophysiologie an Riesenvesikeln: **A:** Überblick: Basis des Aufbaus war ein Auflichtmikroskop (**a**), auf dem eine CCD-Kamera (**b**) montiert war. Unterhalb der Objektivseite befand sich die Messkammer (**c**) auf einem x-y-Tisch. Der Pipettenhalter (**d**) mit Vorverstärker (**e**) konnte über einen Mikromanipulator (**f**) verfahren werden. **B:** Zoom auf die Messkammer: Die im Pipettenhalter (**h**) fixierte Pipette (**g**) musste im engen Abstand von 3 mm zwischen dem 40x-Wasserobjektiv (**i**) und dem im Bad (**j**) befindlichen Chip manövriert werden.

analogen Ein- und Ausgabe ausgerüstet war. Für die Kontrolle der Messungen wurde ein umfangreiches Programm verwendet, das eigens zu diesem Zweck in LabVIEW (National Instruments, Austin, USA) programmiert wurde.

Alle Experimente fanden unter einem Mikroskop (BX-50-WI, Olympus, Tokyo, Japan) mit Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung (BX-FLA) statt. Bei der Auswahl der beiden Objektive wurde auf einen großen Arbeitsabstand geachtet. Verwendung fanden ein 10x Luftobjektiv (LMPlanFL 10x, Numerische Apertur = 0.25) mit einem Arbeitsabstand von 21.0 mm und ein 40x Wasserobjektiv (LUMPlanFL 40x W, Numerische Apertur = 0.8) mit einem Arbeitsabstand von 3.3 mm. An das Mikroskop wurde eine Farb-CCD-Kamera (HV-C20E/K-S4, Hitachi, Tokyo, Japan) montiert. Zur Aufnahme von Filmen und Bildern war die Kamera an einen separaten Videorechner (300 MHz, 250 MB RAM) angeschlossen. Das Videosignal konnte sowohl mit einer Frame-Grabber-Karte (PCEYE 2, ELTEC, Mainz) als auch einer Videoschnitt-Karte (miroVIDEO DC30 plus, Pinnacle Systems, Mountain View, USA) digitalisiert werden. Erstere war für die Aufnahme scharfer Bilder, zweitere für kurze hardware-komprimierte Filme gedacht.

Pipettenhalter

Da industriell gefertigte Pipettenhalter den Anforderungen nicht genügten, wurde in Zusammenarbeit mit der abteilungseigenen Werkstatt ein modifizierter Pipettenhalter konzipiert. Dieser musste in der Lage sein, bei Injektionsdrücken von bis zu 7 bar die Pipette stabil zu halten, Elektrophysiologie zu ermöglichen und trotzdem extrem dicht zu sein. Wie sich herausstellte, war das Stabilitätskriterium das größte Problem. Herkömmliche Elektrophysiologie-Pipettenhalter verformen sich meist asymmetrisch beim Anlegen von höheren Drücken. Dies liegt daran, dass die Luftzufuhr der Halter von der Seite erfolgen muss, da die Achse des Halters für die Durchführung der Metallelektrode benötigt wird. Der asymmetrische Aufbau führt beim Druckaufbau zu einer Verformung der Halter und damit zu einem Ausreißen der Pipette. Um dies zu vermeiden, wurde ein Pipettenhalter mit symmetrischer Luftzufuhr gebaut. Aufgrund der hohen Drücke ist die Grundstruktur aus PMMA konstruiert. Die Kontaktzonen der Schraubverbindungen im Halter sind jedoch wegen der Dichtigkeit aus Teflon gefertigt. Für besonders festen Halt der Pipette sorgen zwei O-Ringe und ein Teflonring. Der Halter ist in Abbildung 2.10 zu sehen.

Lichtquellen

Als Lichtquellen für das Auflichtmikroskop standen eine Halogenlampe (U-LH100L, Olympus) sowie eine Xenon Kaltlichtquelle (LQX 1800, Linos, Göttingen), die über einen Flüssigkeitslichtleiter (LLG 5 VIS, Linos) angeschlossen war, zur Verfügung. Mit Hilfe eines klappbaren Spiegels konnte zwischen den beiden Lampen umgeschaltet werden. In den Messungen wurde aufgrund der höheren Lichtintensität immer die Xenonlampe verwendet. Die hohe Apertur des Wasserobjektives konnte durch Schließen der Aperturblende stark verkleinert werden. Dadurch wurden die Riesenvesikel auch im normalen Auflicht (*bright field*) sichtbar. Über die Tatsache, dass darunter die optische Auflösung litt, konnte aufgrund der enormen Größe der Vesikel hinweggesehen werden. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde dagegen auf maximale Intensität geachtet und die Aperturblende nicht verkleinert.

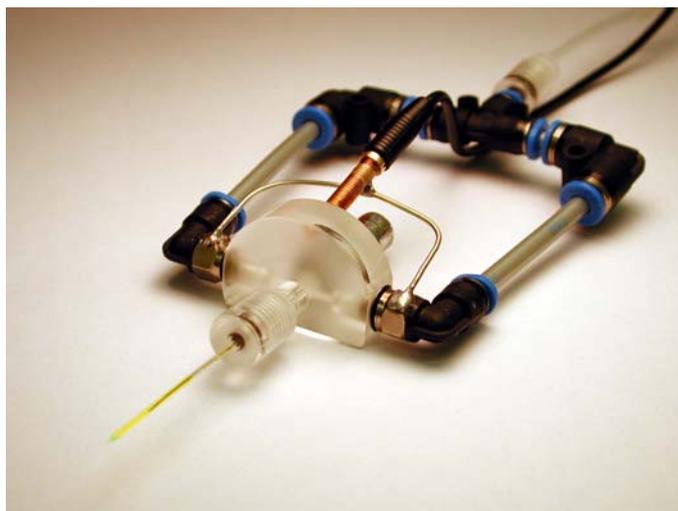


Abbildung 2.10: Pipettenhalter: Speziell gefertigt, um auch bei Injektionsdrücken von bis zu 7 bar ein Ausreißen der Pipette zu verhindern. Dies wird durch die symmetrische Druckzufuhr ermöglicht (graue Schläuche, schwarz-blaue Eckführungen). Um Rauschen zu vermeiden, mussten die beiden vorderen Schrauben auf Masse gelegt werden (silberner Draht, schwarzes Kabel). Die Pipette (vorne) ist mit Fluorescein (grün-gelb) gefüllt. In ihrem Inneren ist die Silberchloridelektrode zu erkennen, die mit dem BNC-Stecker (silbern) an der Halterrückseite verbunden ist.

Fluoreszenz-Farbstoffe und Filtersätze

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet:

Natriumfluorescein: (103992, Merck, Darmstadt) Dieser grüngelb fluoreszierende Standard-Farbstoff wurde wegen seiner guten Wasserlöslichkeit verwendet, um die Injektion in Riesenvesikel zu beobachten. Er besitzt einen relativ hohen Extinktionskoeffizienten von circa $80000 \frac{1}{\text{cm mol}}$ und eine sehr hohe Quantenausbeute. Seine Fluoreszenz ist pH-abhängig und verringert sich deutlich bei einem pH-Wert unter 7.0.

DiI, DiIC₁₈(3): (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat, D-282, Molecular Probes, Eugene, USA) Dieser Cyaninfarbstoff zeichnet sich durch einen hohen Extinktionskoeffizienten von $148000 \frac{1}{\text{cm mol}}$ aus. Allerdings verfügt er nur über eine geringe Quantenausbeute von 0.38 [Lam02]. Er zeichnet sich durch eine niedrige Flip-Flop-Rate von einer Seite der Membran auf die andere aus. Deshalb eignet er sich optimal für FLIC. In der vorliegenden Arbeit wird er meistens zum reinen Anfärben der Vesikelmembran verwendet.

DiD, DiIC₁₈(5): (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine-perchlorat, D-307, Molecular Probes) Der Chromophor ist ein Derivat des DiI. Sein Extinktionskoeffizient ist mit $260000 \frac{1}{\text{cm mol}}$ ebenfalls sehr hoch. Seine Spektren sind aber gegenüber DiI aufgrund des längeren Chromophors zu größeren Wellenlängen verschoben. DiD wird in dieser Arbeit aber nicht zum Anfärben von Membranen, sondern zum Anfärben von PMMA verwendet, um es von der mit DiI angefärbten Vesikelmembran zu unterscheiden. Näheres hierzu findet sich in Kapitel 2.5.3.

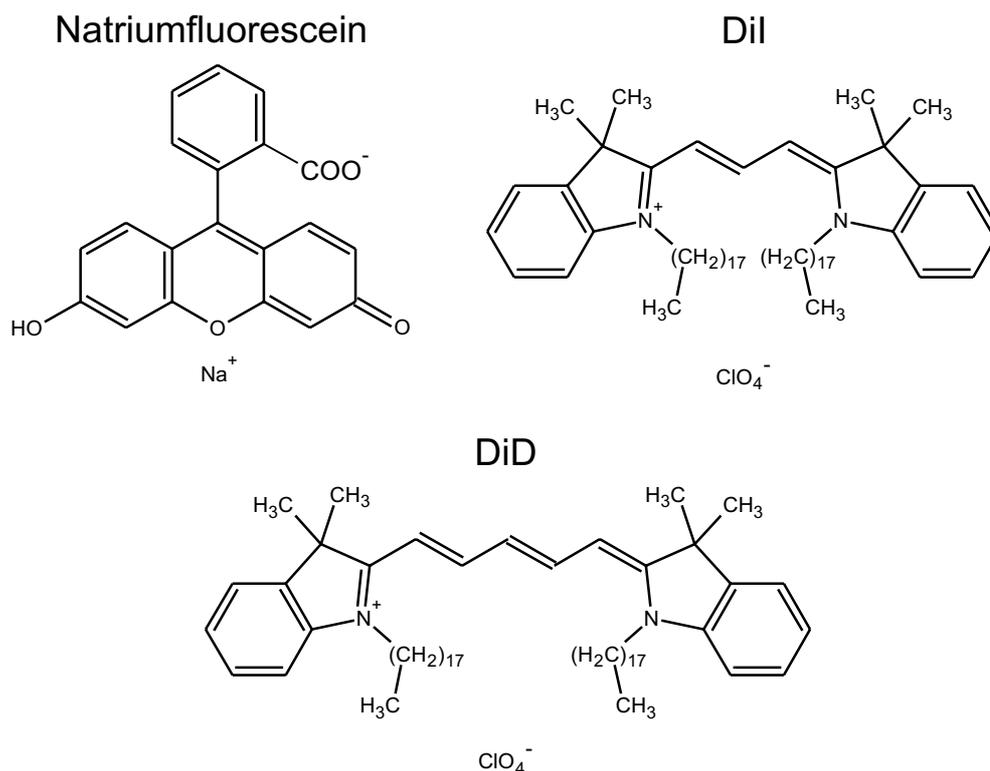


Abbildung 2.11: Strukturformeln von Natriumfluorescein, DiI und DiD.

Die Strukturformeln der Farbstoffe sind in Abbildung 2.11 dargestellt, während Abbildung 2.12 die Absorptions- und Emissionsspektren zeigt. Dabei wurden die Absorptionsspektren mit einem Spektrophotometer (Cary 3E, Varian, Palo Alto, USA) aufgenommen und die Emissionsspektren mit einem Spektrofluorometer (SLM-Aminco, Rochester, New York, USA). DiI und DiD wurden in Ethanol gelöst, Natriumfluorescein in einem Tris/HCl Puffer (10 mM, pH 8.0). Die Konzentrationen lagen immer bei 0.01 mM. Alle Spektren wurden auf ihr Maximum normalisiert.

Die Aufricht-Fluoreszenz-Einheit des Mikroskops erlaubt den Einbau von vier verschiedenen Filtersätzen. Außer einem Hellfeld-Modul (BF) wurden drei spezielle Fluoreszenz-Filtersätze verwendet. Alle bestehen aus je einem Anregungsfilter (AF), einem Strahlteiler (ST) und einem Sperrfilter (SF). Die verwendeten bekannten Filter sind von AHF Analytentechnik (Tübingen). Bei zwei Filtern aus dem Abteilungsfundus lies sich die Herkunft nicht klären. Sie werden im Folgenden mit einem Stern gekennzeichnet (*). Eingesetzt wurden folgende Filtersätze:

DiI/Fluorescein Filtersatz: Dieser Satz wurde konzipiert, um die Injektion von Fluorescein-Lösung in mit DiI angefärbte Riesenvesikel zu studieren. Sichtbar sind dabei auch die verwendeten Vesikelkäfige, welche aus Polyimid oder SU-8 bestehen. Der Filtersatz besteht aus der Kombination AF = HQ 495/50, ST = Q 525 LP und SF = HQ 615/170.

DiI Filtersatz: Ein Filtersatz zur selektiven Beobachtung von mit DiI angefärbten Membranen ohne störenden Hintergrund durch die Käfigsäulen. Optimal geeignet auch

für FLIC. Verwendet werden die Filter AF = HQ 535/50 LP, ST = Q 570 LP und SF = HQ 6

DiD Filtersatz: Mit diesem Satz kann mit DiD angefärbtes PMMA selektiv beobachtet werden. Die Säulen aus Polyimid und SU-8 sind nicht zu sehen. Eingesetzt werden hier AF = 615/70 (*), ST = Q 660 LP und SF = LP 665 (*).

Abbildung 2.13 zeigt die Transmissionsspektren der einzelnen Filterelemente. Sie wurden ebenfalls mit dem Spektrophotometer vermessen.

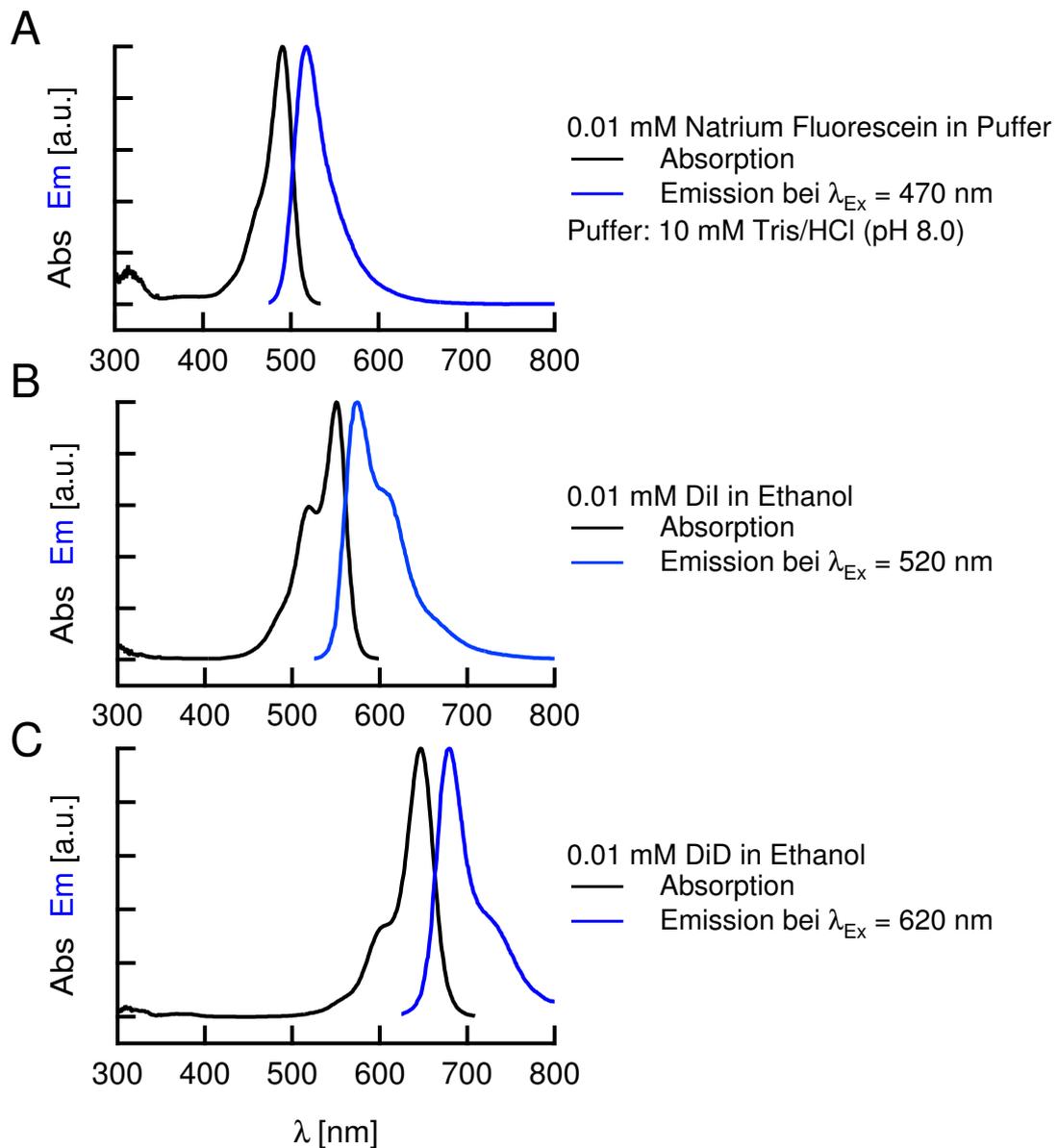


Abbildung 2.12: Absorptions- und Emissionsspektren von Natriumfluorescein (A), DiI (B) und DiD (C).

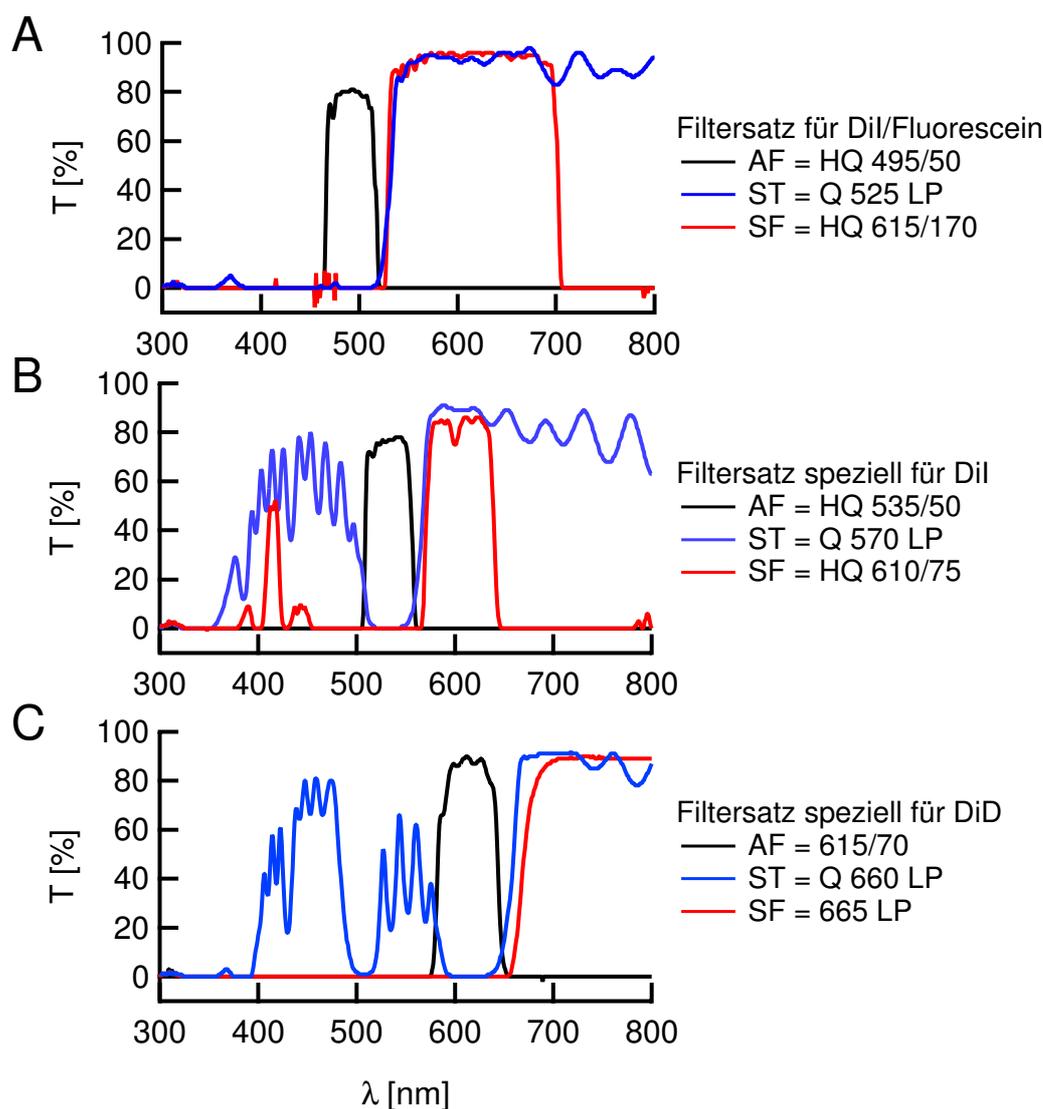


Abbildung 2.13: Transmissionsspektren der verwendeten Filtersätze: Zusammengestellt wurde ein Filter für Fluorescein und DiI (A), einer speziell für DiI (B) und einer speziell für DiD (C). Jeder Filtersatz setzt sich aus Anregungsfilter (AF), Strahlteiler (ST) und Sperrfilter (SF) zusammen.

2.2.2 Herstellung von Riesenvesikeln

Riesenvesikel werden aus wenigen hochreinen Lipidsorten hergestellt. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das sogenannte *Electroswelling* benutzt. Die Grundlagen zu diesem Verfahren wurden 1986 von M. I. Angelova und D. S. Dimitrov [Ang86, Dim88] geschaffen. Sie trockneten Lipidlösungen auf Elektroden ein und beeinflussten nach der Zugabe von Wasser das Ablösen von Membranen und das Bilden von Vesikeln durch elektrische Felder. Im Laufe der Jahre kamen zahlreiche Verbesserungen hinzu und die Methode etablierte sich als Standardverfahren. In unserer Abteilung wurde dieses Verfahren von K. Kottig eingeführt und so verbessert, dass bei korrekter Ausführung des Prozesses die Herstellung von unilamellaren Riesenvesikeln fast fehlerfrei funktionierte [Kot00]. Die entscheidende

Verbesserung gegenüber alternativen Verfahren ist die Verwendung einer planaren Elektrodenanordnung, die aus Indium-Zinn-Oxid (indium tin oxide, ITO) lithographisch auf einem Objektträger erzeugt und anschließend mit Quarz bedampft wird. Auf ihre Herstellung wird deshalb zuerst eingegangen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von K. Kottig übernommene Prozessführung nur geringfügig modifiziert.

Herstellung der ITO-Kammern

Die Verwendung der ITO-Kammern beim Electroswelling ist der wohl entscheidende Punkt bei der Herstellung der Riesenvesikel. Für ihre komplette Fertigung ist das Arbeiten in einem Reinraum eine unerlässliche Voraussetzung. Der schematische Aufbau einer ITO-Kammer ist in Abbildung 2.14 zu sehen. Die Idee, ITO anstatt der ursprünglich verwendeten Platindrähte als Elektrodenmaterial zu benutzen, stammt aus [Ang92]. Sie wurde von K. Kottig aufgegriffen und um eine Beschichtung mit Quarz erweitert. Es bewirkt ein besseres Spreitverhalten des Lipids auf den Elektroden.

Für die Erstellung einer fehlerfreien und homogenen ITO Schicht müssen die Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) vorher mit einem Propanol getränkten Reinraumtuch kräftig abgerieben werden. Danach kommen sie zur weiteren Reinigung für 15 min in ein Ethanol-Bad (Ultraschall). Anschließend werden immer vier Objektträger in einen speziellen Drehteller eingespannt und jeder in der Mitte durch eine 0.9 mm breite Blende in zwei gleich große Bereiche unterteilt.

Die Halterung mit den vier Objektträgern wird in eine Aufdampfanlage (Univex 450, Leybold, Hanau) eingebaut. Dort rotiert sie langsam über einem ITO-Target, um die Herstellung homogener Schichten zu ermöglichen. Nach dem Abpumpen auf $p < 10^{-5}$ mbar (3 h) werden 70 nm ITO in einer Argon/Sauerstoff Atmosphäre (v/v: 85:15) bei $3.0 \cdot 10^{-3}$ mbar aufgesputtert. Dabei wird eine Sputterleistung von 110 W und ein Argon/Sauerstoff Fluss von 13.75 sccm (Einstellung an der Maschine: 55 %) verwendet. Dieser Prozess wurde von G. Ostertag [Ost98] eingefahren.

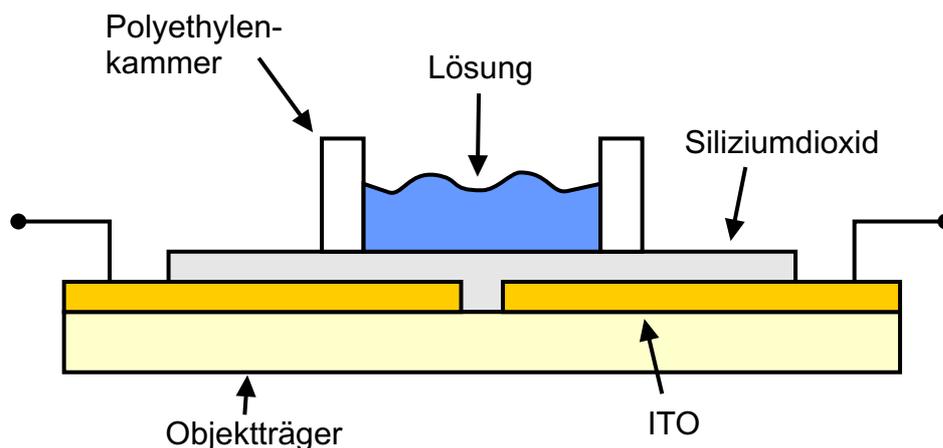


Abbildung 2.14: Aufbau einer ITO-Kammer (nicht maßstabsgetreu): Auf einem Objektträger werden übereinander 70 nm ITO und 70 nm Quarz aufgebracht, so dass zwei getrennte ITO-Elektroden entstehen, die jeweils an den Rändern frei von Quarz sind und dort kontaktiert werden können. Über beiden Elektroden ist in der Mitte eine Polyethylenkammer aufgeklebt, in welche Lipide und Lösungen appliziert werden.

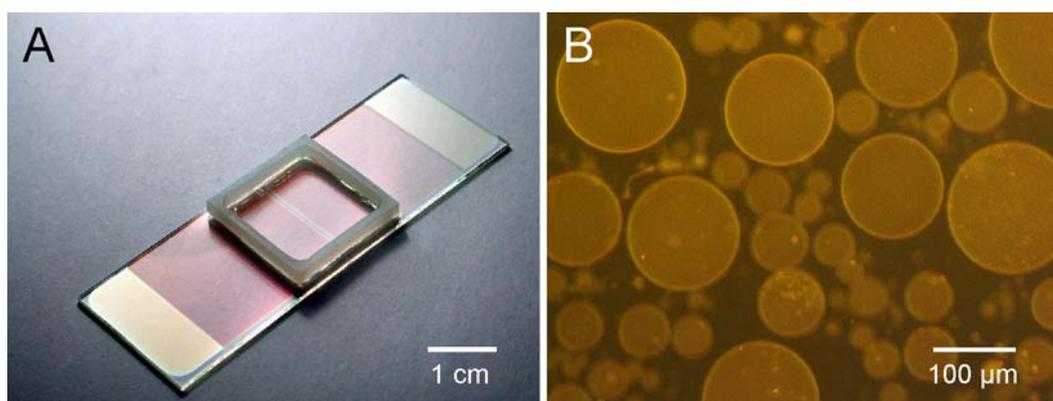


Abbildung 2.15: Herstellung der Riesenvesikel mittels *Electroswelling* in einer ITO-Kammer. **A:** Photo einer ITO-Kammer: In der Mitte der Kammer ist deutlich der Abstand zwischen den beiden aufgesputterten ITO-Elektroden zu sehen. Der gesamte Objektträger ist zusätzlich bis auf 1 cm an beiden Enden mit Quarz bedampft, so dass nur am Rande das golden schimmernde ITO zum Vorschein kommt. **B:** Fluoreszenz-Aufnahme von Riesenvesikeln bestehend aus POPC:DOPME:DiI (DiI/Fluorescein-Filtersatz).

Nach dem Auswechseln der Strichblenden gegen Blenden, die an den Enden der Objektträger je 1 cm für die spätere Kontaktierung abdecken, werden zusätzlich noch 70 nm Quarz aufgedampft. Dies geschieht mit Hilfe einer Elektronenkanone bei $p < 10^{-5}$ mbar.

Abschließend wird auf jedem Objektträger über dem Mittelbereich eine quadratische Kammer aus Polyethylen (20 mm x 20 mm x 3 mm) mit dem medizinischen Silikonkleber MK3 (Dr. Osypka, Rheinfelden-Herten) aufgeklebt. In diese Kammern kommen bei der Vesikelherstellung Lipide und Lösungen. Abbildung 2.15 zeigt ein Photo einer ITO-Kammer sowie hergestellte Vesikel.

Der Erfolg einer Vesikelherstellung hängt stark von der Reinigung der ITO-Kammern ab. Gute Erfahrungen wurden mit folgender empirischen Prozedur gemacht: Die in Reinstwasser (Millipore, Molsheim, Frankreich) aufbewahrten Kammern werden zuerst mit einem Präzisionswischtuch (Kimwipes Lite, Kimberly-Clark, Neenah, USA) trocken gerieben. Danach wird die Kammer mit einem mit Ethanol getränkten Tuch sanft abgerieben und anschließend mit einem frischen Tuch getrocknet. Dieser Vorgang wird ein- bis zweimal wiederholt. Auf die Sauberkeit des Ethanols ist dabei besonders zu achten.

Schwellen der Riesenvesikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Riesenvesikel bestehen aus drei verschiedenen Grundkomponenten. Die Basislösung ist eine 2 mM Lösung des neutralen Lipids POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero- 3-Phosphocholin, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) in einer Mischung aus Methanol und Diethylether im Verhältnis 1:9 (v/v). Diese Lösungsmittelmischung führt gegenüber reinem Methanol zu einem verbesserten Spreitverhalten der Lipidlösung und begünstigt das Entstehen unilamellarer Riesenvesikel [Wic96]. Hinzuge-mischt wird dieser POPC-Lösung eine 2 mM Lösung des negativ geladenen Lipids DOPME (1,2-Dioleoyl-phosphatidsäure-monomethylester, Ammoniumsalz, P-0791, Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis POPC:DOPME=100:1. Das DOPME ist in einer Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:12.7 (v/v) gelöst. Es vermittelt einen engen

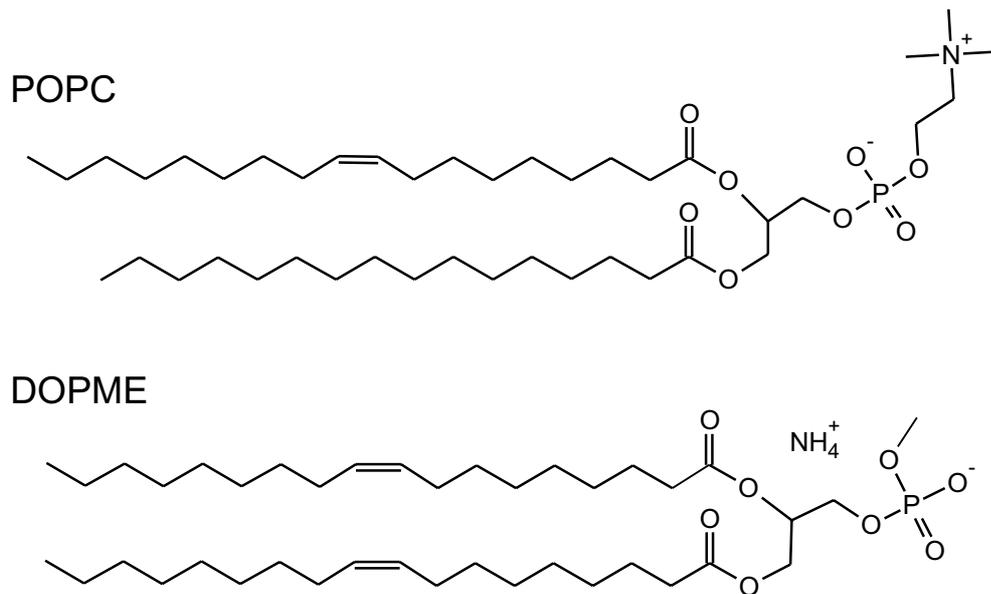


Abbildung 2.16: Strukturformel der Lipide POPC und DOPME.

Kontakt der Vesikelmembran zu Glasoberflächen, die mit positiv geladenem Poly-L-Lysin beschichtet sind. Als letztes kommt eine 2 mM DiI-Lösung in Methanol im Verhältnis POPC:DiI=200:1 (Molverhältnis) hinzu. Die Strukturformeln von POPC und DOPME sind in Abbildung 2.16 gezeigt.

Zur Herstellung der Riesenvesikel werden je 5 μl Lipidlösung mit einer Mikroliterspritze (10 μl , Hamilton Co., Reno, USA) möglichst großflächig in vier ITO-Kammern verteilt. Die Lösung spreitet aufgrund der Siliziumdioxid-Oberfläche sowie des hohen Diethylether-Anteils sehr gut. Obwohl der Großteil des Lösungsmittels sofort verdampft, werden die Kammern dennoch über Nacht in einen Vakuum-Recipienten ($p < 0.1$ mbar) gestellt, damit alle Reste ausgetrieben werden. Am nächsten Tag werden die Objektträger mit einer Kupferlitze an beiden Enden kontaktiert und an einen Funktionsgenerator (HP 33120A, Hewlett-Packard, Böblingen) angeschlossen. Außerdem wird in jede ITO-Kammer entweder 2 ml SA-Lösung oder SB-Lösung gegeben. Bei der SA-Lösung handelt es sich um eine 300 mM Saccharoselösung (1.07653, Merck, Darmstadt) in Reinstwasser, während bei der SB-Lösung zusätzlich noch 0.5 mM NaCl (Merck, Darmstadt) hinzukommen. Nach der Applikation der Lösung durchläuft der Funktionsgenerator ein mehrstufiges Wechselspannungsprogramm. Am Anfang wird bei 10 Hz innerhalb von 20 Minuten eine Spannungsrampe von 0.1 V auf 6.0 V hochgefahren [Wic96]. Danach folgt ein 20-minütiges Plateau bei 6.0 V. Die entstandenen Riesenvesikel werden abschließend durch drei niederfrequente 6.0 V Plateaus abgelöst [Mat96]. Dabei werden 20 Minuten 4 Hz, 10 Minuten 1 Hz und 10 Minuten 0.1 Hz verwendet.

Die Riesenvesikel können nun mit einer 3 ml Einweg Pasteurpipette (Öffnungsdurchmesser = 2 mm, Elkay Éireann, Galway, Irland) direkt in den verwendeten Puffer oder zur Aufbewahrung in G-Lösung umgesetzt werden. Die G-Lösung ist eine 300 mM Glucoselösung in Reinstwasser. Die Vesikel halten sich in ihr mehrere Tage. Es stellte sich heraus, dass ältere Vesikel zwar problemlos für Adhäsionsexperimente verwendet werden können, bei Anstechexperimenten jedoch eine hohe Instabilität zeigen. Aus diesem Grund

wurden in der vorliegenden Arbeit nur Vesikel benutzt, die maximal zwölf Stunden alt waren. Nach dem Absaugen der Vesikel darf die Glucoselösung nicht eintrocknen. Deswegen müssen die ITO-Kammern möglichst bald in Reinstwasser gelagert werden. Ansonsten ist die Ausbeute nachfolgender Herstellungen deutlich geringer.

Die Verwendung von unterschiedlichen Zuckersorten mit verschiedenen Dichten im Inneren der Vesikel und in dem sie umgebenden Bad bewirkt innerhalb weniger Minuten eine Sedimentation [Mat96]. Ein weiterer Vorteil ist die differierende optische Dichte der Flüssigkeiten. Sie bewirkt eine zusätzliche Brechung des Lichtes beim Übergang vom Bad in den Vesikel. Bei kleiner Apertur des Mikroskops führt das zu einer sehr guten Sichtbarkeit der Vesikel im Auflicht (ohne Fluoreszenz).

Als Puffer-Lösung bei den Elektrophysiologie-Experimenten in Kapitel 2 wird nur die sogenannte PA-Lösung verwendet. Dabei handelt es sich um eine 350 mM Glucose-Lösung in Reinstwasser, der 40 mM Natriumchlorid zugesetzt werden. Ihr pH-Wert ist mit 5 mM Tris/HCl auf pH 7.4 eingestellt. Das entspricht insgesamt einer Osmolarität von circa 400 mOsm, was 100 mOsm mehr sind als im Inneren der Vesikel. Dies führt zu einer Inflation des Vesikels, hat aber noch keine Formveränderung zur Folge. Die bei den Feld-Effekt-Transistor-Messungen in Kapitel 3 eingesetzte PB-Lösung besitzt dieselbe Osmolarität wie die PA-Lösung, ist aber weniger leitfähig. Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen werden in Anhang E noch einmal aufgelistet.

2.2.3 Reinigung durch Filterung

Nach dem Übersetzen der Riesenvesikel ins Bad bleibt unklar, wieviel des vorhandenen Lipids in Form von kleineren Vesikeln (SUV und LUV) oder als Lipidfilm an der Oberfläche vorliegt. Bei größeren Mengen würde das in beiden Fällen zu einer Verschmutzung der Pipettenspitze führen, sobald diese ins Bad eingetaucht wird. Ein guter Membran-Pipetten-Kontakt wäre dann nicht mehr möglich.

Bei näherer Untersuchung unter dem Mikroskop konnte im Fluoreszenz-Modus kein Lipidfilm an der Oberfläche des Bades entdeckt werden. Was allerdings nicht als Gegenbeweis ausreicht, da geringe Lipidkonzentrationen eventuell nicht zu erkennen sind. Dagegen waren am Boden oft kleinere, im Mikrometerbereich liegende Lipidreste zu sehen.

Um diesen Fall ausschließen zu können, wurde die Möglichkeit geschaffen, Riesenvesikel zu filtern. Die Hauptschwierigkeit bestand darin, einen fast vollständigen Austausch des äußeren Mediums zu erreichen, ohne die Vesikel dabei zu zerstören oder zu verlieren. Es wurde der in Abbildung 2.17 dargestellte Aufbau konstruiert. Hauptelement ist ein zylindrischer zweiteiliger Teflonhalter, in den ein Nylon-Filternetz (Bückmann, Mönchengladbach) mit 30 μm Maschenweite eingeklemmt wird. Das Filternetz muss vorher durch Ultraschall von allen Luftbläschen befreit und für drei Stunden in BSA-Lösung (2 mg/ml) gelegt werden. Die Lösung mit den Vesikeln wird mit einer Einweg-Pasteurpipette direkt aus den ITO-Kammern vorsichtig in die Mitte des Halters auf das Filternetz gegeben. Durch sehr langsame Zugabe von 20 – 80 ml Glucose-Lösung kann man alle Vesikel und Vesikelreste mit einer Größe unter 40 μm wegspülen. Der Halter muss dabei leicht erhöht auf einem Podest in einem Polypropylen-Schälchen positioniert werden, damit die Vesikel zu keinem Zeitpunkt trocken fallen können. Der Teflonhalter hat nur wenig Spiel in dem Schälchen, um das Volumen im Außenbereich des Filters möglichst gering zu halten, da es beim abschließenden Absaugen der Vesikel mitgenommen wird. Abbildung 2.18 zeigt die Nahaufnahmen von einem 30 μm Filternetz sowie von ungefilterten Vesikeln im Vergleich

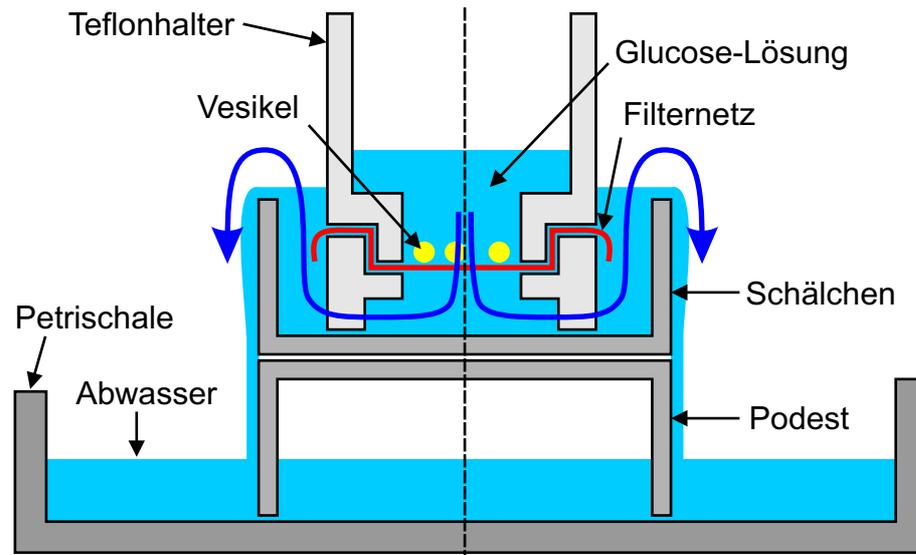


Abbildung 2.17: Filterung von Riesenvesikel. Von oben wird Glucoselösung hinzugegeben, welche die Lipidreste durch einen im Teflonhalter fixierten Filter in ein Schälchen presst. Durch das enge Anliegen des Schälchens am Halter läuft dieses rasch über und wirkt so als Rücklaufsperr für das „verschmutzte Abwasser“ (nicht maßstabsgetreu).

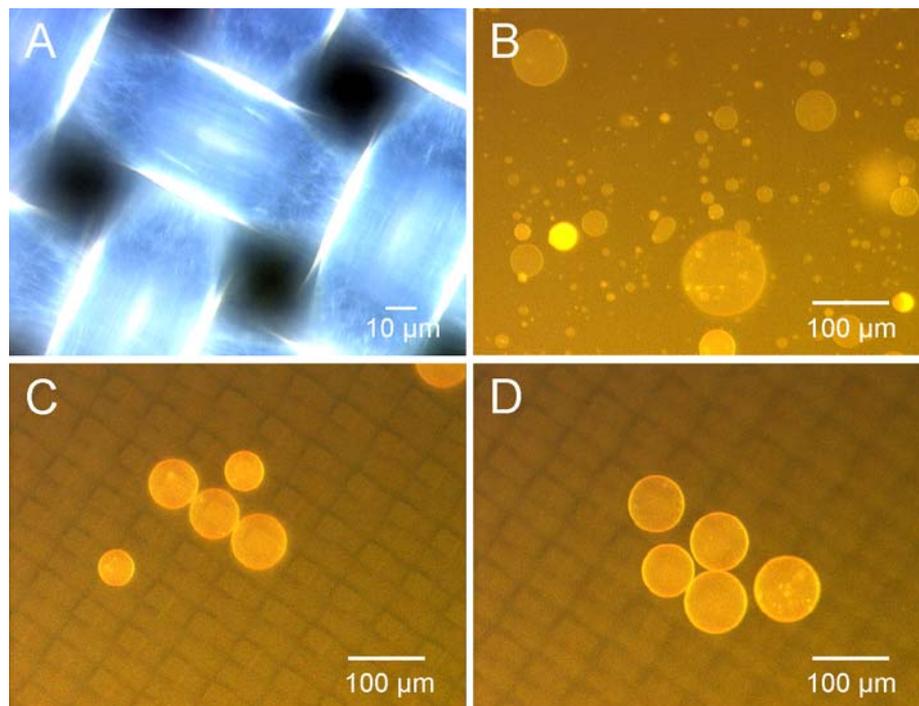


Abbildung 2.18: Demonstration der Effizienz eines Vesikelfilters: Bei Verwendung eines Nylon-Filternetzes mit 30 µm Maschenweite (A) lassen sich frische Lösungen mit Vesikeln (B) so filtern, dass alle Lipidreste und Vesikel, die kleiner als 40 µm sind, herausgefiltert werden. Die übrigen Vesikeln bleiben scheinbar geordnet über den Maschen liegen (C, D). (A: Auflicht-Aufnahme, B-D: Fluoreszenz-Aufnahme mit Fluorescein/DiI Filter)

zu zwei Photos von gefilterten Vesikeln auf einem Nylonnetz.

Trotz der guten Filter-Ergebnisse konnte bei den Anstechexperimenten keine Verbesserung des Membran-Pipetten-Kontaktes festgestellt werden. Bei den später folgenden Experimenten wurde deshalb auch meist mit ungefilterten Riesenvesikeln gearbeitet. Es wurde aber darauf geachtet, möglichst wenig Lösung ins Bad überzusetzen, um eine hohe Verdünnung zu gewährleisten.

2.2.4 Immobilisierung in Polyimid Käfigen

Um Riesenvesikel anstechen zu können, ist es notwendig, sie an Ort und Stelle zu fixieren. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Polyimid-Säulen bewerkstelligt. Bevor aber auf ihre Herstellung eingegangen wird, werden im Folgenden zuerst alternative Methoden vorgestellt.

Test von bisher bekannten Methoden

Es ist fast unmöglich, eine Anstech-Pipette in einen frei beweglichen Vesikel zu stechen. Aufgrund seiner Elastizität federt er bei jedem Anstechversuch zurück und lässt sich vor der Pipette herschieben. Trotzdem gelang es 1995 Menger zum ersten Mal Fluoreszenzfarbstoffe und Salze in freie Vesikel zu injizieren [Men95b]. Die Erfolgswahrscheinlichkeit dieser Methode ist allerdings viel zu gering, als dass sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden konnte.

Zur Fixierung von Riesenvesikeln wurden mehrere alternative Methoden entwickelt. Die Einfachste ist wohl die von Wick et al. [Wic96]. Er injizierte Farbstoffe und Enzyme in Vesikel direkt am Ort ihres Entstehens. Die Liposome wurden durch die von Angelova et al. [Ang86, Dim88] entwickelte Methode des Electroswellings mit Hilfe von Platinelektroden hergestellt. Am Ende des Verfahrens kleben die Vesikel an den Platindrähten fest, was zur Fixierung bei der Injektion ausreicht. Für unsere geplanten Chipexperimente ist dieses Verfahren jedoch nicht geeignet, da die Vesikel nicht auf den Chips hergestellt werden können.

Die bisher am häufigsten angewandte Methode zur Vesikelmanipulation besteht darin, sie teilweise in eine Mikropipette größeren Durchmessers ($5 - 10 \mu\text{m}$) einzusaugen. Sie wurde ursprünglich angewendet, um anhand der Adhäsion von Vesikeln ihre Membraneigenschaften zu studieren [Eva84a, Eva84b]. Wenig später wurde die Technik von Higashi et al. eingesetzt, um Vesikel zu fixieren und anzustechen [Hig87]. Auch Menger benutzte diese Methode teilweise [Men95a]. Die Photos in seiner Veröffentlichung lassen aber darauf schließen, dass die Vesikel nur sehr wenig oder gar nicht in die Mikropipetten eingesaugt waren und die Fixierung eher durch bloßes Quetschen der Vesikel zwischen Mikro- und Injektionspipette geschah. Der Grund hierfür zeigte sich in unseren eigenen Experimenten. Leicht in eine Mikropipette eingesaugte Vesikel stehen so stark unter Spannung, dass sie schon bei der leichtesten Berührung mit einer scharfen Anstechpipette platzen. In unserem Fall wurden Saugpipetten (Mikro-Hämatokritröhren, Hecht-Assistent, Sondheim) mit einem Öffnungsdurchmesser von $40 \mu\text{m}$ verwendet. Sie wurden mit einem Puller (Zeitz-Instruments, Augsburg) gezogen und anschließend angeschmolzen. Die Saugpipetten waren über einen Schlauch mit einem Nadel-Ventil verbunden. Dadurch war es möglich, den Kapillarsog der Pipetten zu begrenzen und so einen definierten Unterdruck zu erreichen. Die Mikropipetten-Methode mag zwar im Einzelfall funktionieren, ist aber für unsere

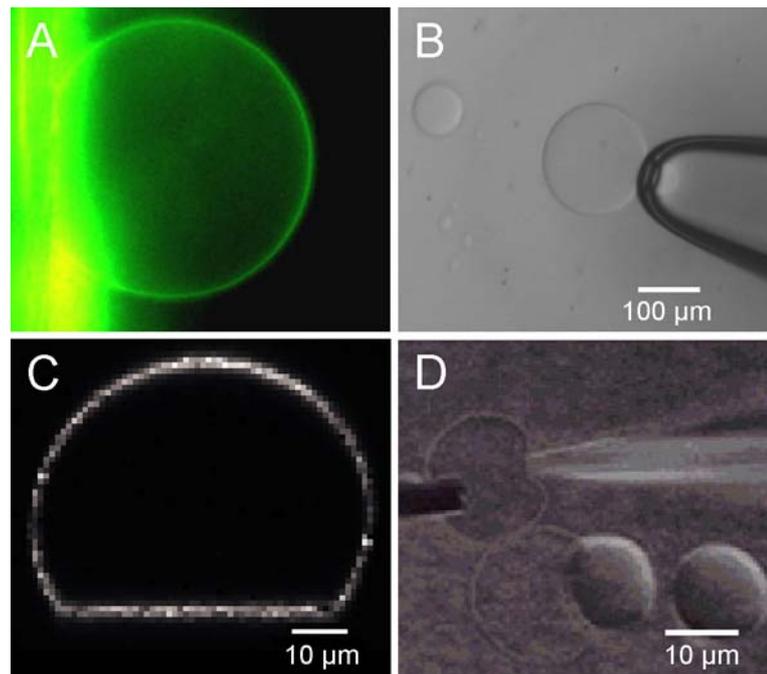


Abbildung 2.19: Verschiedene Methoden der Vesikelfixierung: **A:** Fluoreszenzaufnahme eines Vesikels, der an einer Platin-Elektrode (links) klebt (Größe unbekannt) [Buc98]. **B:** Aufsicht-Aufnahme eines Vesikels mit Saugpipette (Photo unter Mitutoyo Mikroskop (Kawasaki, Japan)). **C:** Senkrechter Schnitt durch ein Vesikel, der auf einem mit Poly-L-Lysin beschichteten Chip adhärert ist (Fluoreszenz-Aufnahme mit FCS-Mikroskop) [Kot00]. **D:** DIC-Aufnahme von einem unilamellaren Vesikel, der an einem Carbon-Fiber (links) adhärert ist. In ihn wird von rechts eine Mikroelektrode gestochen. Zwei multilamellare Vesikel sind rechts unten zu sehen [Kar00].

Zwecke zu unzuverlässig.

Große Hoffnung wurde anfangs in die Immobilisierung von Riesenvesikeln auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Chips gesteckt. Vesikel adhäreren an diesen so stark, dass sie ohne Beschädigung nicht mehr zu entfernen sind. Der Abstand der adhärerten Membran zum Substrat beträgt nur $1.1 \pm 0.2 \text{ nm}$ [Fro99]. Diese Methode wurde in unserer Abteilung bereits erfolgreich bei extrazellulären Feld-Effekt-Transistor-Messungen [Kie99] sowie bei Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen (FCS) zur Bestimmung der Diffusionskonstanten von Lipiden und Farbstoffen verwendet [Kot00, Fro99]. Ebenfalls angewendet wurde dieses Verfahren von Sandre et al. [San99]. Zum dauerhaften Anstechen von Riesenvesikeln ist aber auch diese Technik nicht geeignet. Bei unseren Experimenten standen die Vesikel wie bei der Mikropipettentechnik so unter mechanischer Spannung, dass die Vesikel sofort oder maximal drei Minuten nach dem Anstechen platzten. Als Substrat wurden unstrukturierte oxidierte (100 nm SiO_2) Siliziumchips verwendet. Sie wurden zuerst durch viermaliges Abreiben mit Wattestäbchen (Hartmann, Heidenheim) in 80°C heißer alkalischer Tikopur-Lösung (RP 100, Bandelin Elektronik, Berlin) gereinigt und dann 30 Minuten in Poly-L-Lysin-Lösung ($25 \mu\text{g/ml}$ in Reinstwasser) beschichtet (P-6516, MW=4000-15000, Sigma-Aldrich, Steinheim).

Zuverlässig dagegen scheint das von Karlsson et al. entwickelte Verfahren zu sein [Kar00]. Sie ließen ihre Riesenvesikel an Kohlefaser-Elektroden (*carbon fiber electrodes*)

adhärieren. Die so gefangenen Vesikel können über weite Strecken in der Probenkammer transportiert und anschließend auch mit Injektionspipetten angestochen werden. Diese Methode wurde von uns nicht getestet, da sie erst nach der Herstellung unserer Säulen publiziert wurde. Abbildung 2.19 zeigt Darstellungen der vier vorgestellten Methoden.

Herstellung von Polyimid Käfigen auf Siliziumchips

Die Idee, Zellen mit Hilfe von sterischen Käfigen zu fixieren, geht ursprünglich auf Maher et al. [Mah99] zurück und wurde dann von G. Zeck erfolgreich übernommen und modifiziert. Er verwendete Käfige, die aus sechs $40\ \mu\text{m}$ hohen Polyimid-Säulen bestanden. Sie sollten wachsende Schnecken-Neuronen daran hindern, durch ihre eigenen Neuriten weggezogen zu werden [Zec01]. In der vorliegenden Arbeit sollten die Säulen verhindern, dass Riesenvesikel während des Anstechvorgangs platzen oder wegrutschen. Da Vesikel bis zu einer Größe von $150\ \mu\text{m}$ verwendet wurden, mussten die Säulen deutlich höher sein als die für $40 - 60\ \mu\text{m}$ große Nervenzellen konstruierten Käfige. Bei Herstellung der Säulen stößt man bei einer angepeilten Höhe von $80\ \mu\text{m}$ an die Grenzen des photolithographischen Verfahrens. Deshalb wurde in diesem Projekt eine andere Polyimid-Sorte (Durimide 7020, Arch Chemicals, Zwijndrecht, Belgien) verwendet. Durimide 7020 besitzt bessere Haftungseigenschaften als das von G. Zeck verwendete Polyimid (HTR3-200, Olin, München), die aber durch eine schwierigere Prozessführung erkaufte werden müssen. Besonders hinderlich ist beispielsweise, dass der Prozess komplett unter Rotlicht ($\lambda < 550\ \text{nm}$) durchgeführt werden muss, um das stark lichtempfindliche Polyimid nicht vorzupolymerisieren.

Bei Durimide 7020 handelt es sich um die Lösung eines vernetzbaren Polyimid-Precursors, die zusätzlich mit einem Photo-Initiator, einem Crosslinker und einem Adhäsions-Promotor versetzt ist. Der Adhäsions-Promotor formt eine chemische Bindung zwischen dem Polyimid und der Siliziumoxid-Oberfläche. Durch UV-Belichtung des Photo-Initiators entsteht ein Radikal, das die Quervernetzung des Precursors durch den Crosslinker auslöst. Das Polyimid wird dadurch an den belichteten Stellen unlöslich. An den unbelichteten Stellen kann jedoch der Precursor wegentwickelt werden. Bei einer abschließenden Erhitzung der Strukturen werden die quervernetzenden Crosslinker ausgetrieben und ein unvernetztes Polyimid, das aber immer noch unlöslich ist, bleibt zurück.

Bei dem im Folgenden beschriebenen Prozess werden auf quadratische Silizium-Chips mit einer Seitenlänge von $25\ \text{mm}$ Polyimid-Käfige aufgebracht. Die Chips sind mit einer dünnen Oxidschicht bedeckt. Das Ergebnis des Prozesses wird in Abbildung 2.20 vorweggenommen.

Maskenherstellung: Geplant war, fast die gesamte Chipoberfläche mit Käfigen unterschiedlicher Größen zu bedecken. Mit AutoCad Lt 97 wurde deshalb am Computer eine Maske mit 4600 sechseckigen Käfigen entworfen, die sich in einem quadratischen Bereich mit $15\ \text{mm}$ Kantenlänge im Zentrum des Chips befinden. Die Käfige bestehen jeweils aus sechs hexagonal angeordneten Säulen mit einem Durchmesser von $25\ \mu\text{m}$. Der Innendurchmesser des eingegrenzten Bereichs variiert dabei von $70\ \mu\text{m}$ bis $150\ \mu\text{m}$. Die hohe Anzahl an Käfigen auf den einzelnen Chips sollte die Positionierung der Vesikel vereinfachen. Die Maske wurde um einen Faktor 30 vergrößert und auf eine durchsichtige Folie gedruckt. Dann wurden die Folien auf einen Leuchtschirm geklebt und auf eine Dia (AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien) belichtet (22 s). Nach dem Entwickeln (G282c, AGFA-Gevaert) und Fixieren (G333c, AGFA-Gevaert) war

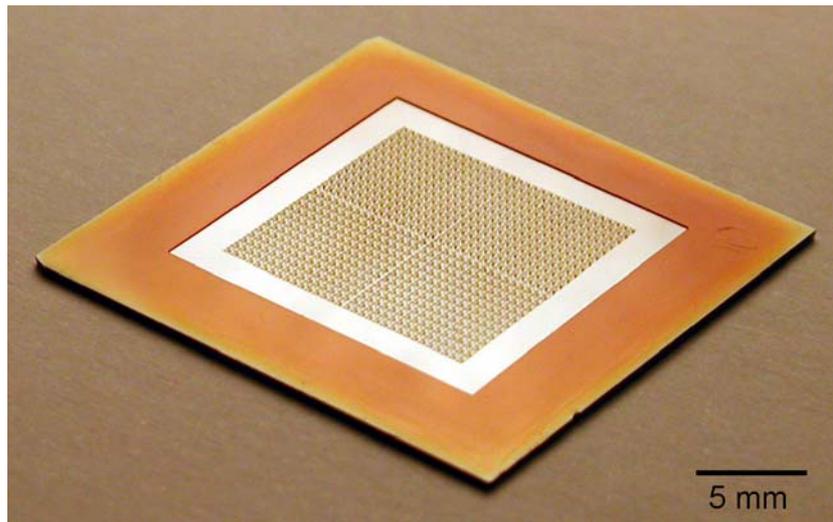


Abbildung 2.20: Übersicht über einen quadratischen Siliziumchip mit 4600 hexagonalen Käfigen im Zentrum. Die quadratische Säulenzone wird von 1.5 mm blankem Siliziumoxid umrahmt. Am Rand befindet sich 4.5 mm lückenloses braunes Polyimid. Der Chip hat eine Kantenlänge von 25 mm.

die Dia-Maske fertig. In Vergleichsexperimenten waren die Diamasken im benötigten Auflösungsbereich gekauften Chrommasken (ML&C, Erfurt) ebenbürtig.

Dehydratisierung: Um die Haftung des Polyimidlacks nach dem Aufschleudern zu verbessern, müssen die Chips zu Beginn des Prozesses dehydratisiert werden. Gute Ergebnisse wurden mit einer fünf-minütigen Vorbehandlung durch ein Sauerstoffplasma (Plasma-Ätzanlage, Oxford, Oxon, Großbritannien) erzielt.

Aufschleudern: Möglichst bald nach der Dehydratisierung muss der Polyimidlack auf die Chips aufgeschleudert werden. Pro Chip werden 0.5 ml Lack verwendet. Durch ein 10 Sekunden dauerndes Schleuderprogramm mit 1500 rpm wird eine gleichmäßige Verteilung des Lacks erreicht. Problematisch an der Kombination aus kleinen Chips und dicken Lackschichten ist eine inhomogene Verteilung des Lackes am Rande der Chips. Dort bildet sich beim Aufschleudern ein Wall, der danach wieder nach innen fließt. Die Käfige wurden deshalb mit einem Sicherheitsabstand von 10 mm zum Rand platziert.

Prebaking: Bevor das aufgeschleuderte Polymer belichtet werden kann, muss ein Großteil des Lösungsmittels durch Erhitzung ausgetrieben werden. Bei dicken Schichten muss das sogenannte Pre- oder Softbaking möglichst schonend und langsam geschehen, um ein Abheben und Einreißen des Materials zu vermeiden. Verwendet wird deshalb ein mehrstufiges Programm, während dessen die Chips für je 30 Minuten auf 35 °C, 50 °C, 75 °C, 90 °C und 105 °C in einem Trockenofen (Heraeus, Hanau) erhitzt werden.

Belichten: Anschließend werden die Chips einzeln durch die oben erstellte Dia-Maske 115 s lang belichtet. Hierzu wird ein Maskaligner (MA 4 BSA, Karl Suss, Garching bei München) mit einer UV-Linie bei 436 nm verwendet. Die Strahlungsleistung liegt bei

21 mW/cm^2 . Die lange Belichtungszeit von 115 s ist durch die dicke Schicht bedingt und bewirkt eine leichte Überbelichtung. Sie wirkt einer späteren Unterätzung durch den Entwickler entgegen. Das eingestrahlte Licht führt zu einer Reaktion der einzelnen Precursor-Moleküle mit dem Crosslinker und verursacht damit eine Vernetzung der gesamten Struktur. Da diese Reaktion auch nach dem Belichten noch andauert, müssen die Chips 15-20 Minuten liegengelassen werden, bevor mit dem Entwickeln begonnen werden kann.

Tauchentwicklung: Zur Entfernung der unbelichteten Bereiche des Polyimids werden die Chips für 17-22 Minuten in Entwickler (HTR-D2, Arch Chemicals, Zwijndrecht, Belgien) getaucht und dort langsam und vorsichtig mit der Hand gedreht. Anschließend werden Reste durch 10 Sekunden Eintauchen in einem 1:1 (v/v) Gemisch aus Entwickler und Rinser (RER 600, Arch Chemicals) sowie 20 s in reinen Rinser weggespült. Noch im feuchten Zustand muss der Rinser von den Chips durch Eintauchen in Ethanol entfernt werden. Dieses wird dann selbst in einem 30-sekündigen Tauchbad durch Diethylether (Merck, Darmstadt) ersetzt. Der abschließende Austausch ist nötig, da Diethylether das einzige Lösungsmittel ist, das nicht beim Verdunsten die Käfigsäulen umknickt. Der Grund dafür ist seine geringe Oberflächenspannung (17 mN/m). Lösungsmittel mit höheren Werten wie zum Beispiel Wasser (72 mN/m) bilden um die Käfige Tröpfchen, welche die Käfige beim Schrumpfen eindrücken.

Hardbaking: Um die fertigen Strukturen vollständig zu polymerisieren und die übrigen Lösungsmittel zu verdampfen, werden die Chips über Nacht in einen Quarzrohrföfen (Heraeus) gestellt. Das Hardbaking beinhaltet ein 110 Minuten dauerndes Plateau bei 300°C und findet unter Stickstoff-Atmosphäre statt. Im Hinblick auf eventuell später zu beschichtende strukturierte Chips wurde auf ein Plateau mit der optimalen Temperatur von 400°C verzichtet. So sollte ein Eintreiben des Aluminium der Bondkontakte in das Silizium vermieden werden. Die Höhe der Strukturen schrumpft während des Ausheizens um fast 30 Prozent.

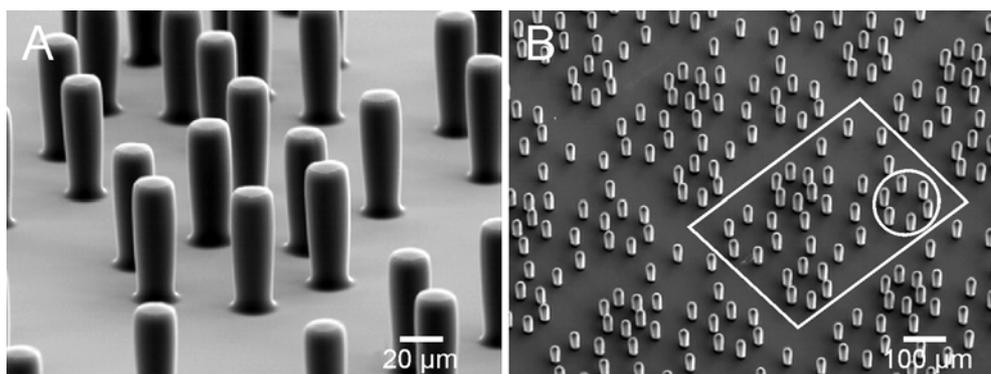


Abbildung 2.21: REM-Aufnahmen der Säulenchips: **A** Blick auf einen einzelnen hexagonalen Käfig mit Innendurchmesser von $70 \mu\text{m}$, bestehend aus sechs Säulen mit einem Säulendurchmesser von $25 \mu\text{m}$ und einer Säulenhöhe von $80 \mu\text{m}$ (Aufnahmewinkel zur Oberfläche: 20°) **B** Überblick über mehrere Käfige. Zu erkennen ist die Wiederholung eines aus sechs Käfigen bestehenden Grundmusters (weißes Viereck, der weiße Kreis markiert einen einzelnen Käfig) (Aufnahmewinkel zur Oberfläche: 60°).

Bei eventuellen Fehlprozessierungen kann das Polyimid sehr einfach durch 10-15 Minuten in CARO-scher Säure (H_2SO_4 (96%) : H_2O_2 (30%) = 3 : 1) entfernt werden. Da das Polyimid während des gesamten Prozesses stark schrumpft, kann nicht jede beliebige Struktur hergestellt werden. Bei der benötigten Dicke von $80\ \mu\text{m}$ ist es nur möglich, kleinere zusammenhängende Bereiche, wie zum Beispiel eine Säule, zu fabrizieren. Größere Strukturen stehen so unter Spannung, dass sie entweder einreißen oder sich komplett vom Chip abheben.

Nach dem erfolgreichen Prozessieren werden die Chips mit einem kleinen Tropfen des medizinischen Silikonklebers MK3 in einer Polypropylen-Kammer fixiert. Verwendet wird hierzu der Deckel eines Standard-Zellkultur-Schälchens (Falcon 3001, Becton Dickinson, Plymouth).

Abbildung 2.21 zeigt Detailaufnahmen der Käfige, die mit einem Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) gemacht wurden.

Reinigung, BSA-Beschichtung und Positionierung

Alle Experimente des ersten Teils der vorliegenden Arbeit wurden mit nur zwei Chips durchgeführt. Dies war nur deswegen möglich, weil Vesikel im Gegensatz zu Neuronen nach ihrem Entfernen nur geringe Mengen an Lipidresten auf dem Chip zurücklassen. Vor jedem Experiment musste nur die Beschichtung erneuert werden. Das neue Polyimid (Durimid 7020) war in der Lage, längere Zeit Ultraschall zu widerstehen. Dies war bei dem früher verwendeten HTR3-200 von G. Zeck nicht der Fall. Als Reinigungsmethode wurde deshalb ein fünfminütiges Ultraschallbad in einer 2-prozentigen alkalische Tickopur-Lösung (RP100, Badelin, Berlin) in Reinstwasser verwendet. Es konnte nur mit $20\ ^\circ\text{C}$ warmer Lösung gearbeitet werden, da heißere Lösung ($60\text{--}80\ ^\circ\text{C}$) die Säulen zerstört hätte. Besonders wichtig war nach der Tickopur-Reinigung eine gründliche Spülung des Chips und der Kammer. Aufgrund der großen mechanischen Stabilität der Säulen konnte dies mit einem starken Wasserstrahl aus einer PET-Flasche erfolgen. Bei größeren Verschmutzungen wurden die Chips auch für 30 Sekunden in abgekühlte CARO-sche Säure getaucht. Nach einer intensiven Spülung mit Reinstwasser wurde diese Prozedur einmal wiederholt und erneut gespült. Abschließend wurden die Chips mit einem Stickstoffstrahl getrocknet.

Schon bei den ersten Anstechversuchen stellte sich heraus, dass eine Chipbeschichtung mit Poly-L-Lysin ungeeignet ist (siehe Kapitel 2.2.4). Die Membran der Vesikel wurde vom Chip so stark angezogen, dass sie die Form einer Halbkugel annahmen. Da dies zu einer stark angespannten Membran führte, waren die Vesikel sehr labil und platzten kurz nach dem Anstechen. Aus diesem Grund wurden alle Versuche in dieser Arbeit mit BSA-beschichteten Chips durchgeführt. BSA (bovine serum albumine, Fraction V Powder, A-4503, Sigma-Aldrich, Steinheim) ist ein globuläres Molekül mit einer Größe von $4\ \text{nm}$. Die Beschichtung fand mit einer $2\ \text{mg/ml}$ BSA-Lösung in PBS (phosphate buffered saline, 14040-091, Life Technologies/GIBCO, Paisley, Schottland) statt. Die Lösung wurde für mindestens drei Stunden auf den Chips gelassen. Nach einer intensiven Spülung mit Reinstwasser wurde der Puffer (PA-Lösung) dazugegeben. BSA zieht die Vesikel nicht an. Sie lagen entspannt auf der Chipoberfläche und konnten dort über einen langen Zeitraum problemlos manipuliert und angestochen werden.

Nachdem der Chip auf dem x-y-Tisch unter dem Mikroskop platziert worden war, wurden die in Puffer oder Glucose-Lösung gelagerten Vesikel mit einer Einweg-Pasteurpipette

auf den Chip gebracht. Dabei wurde darauf geachtet, ein möglichst kleines Volumen zu übertragen, um wenig Lipidreste mit überzusetzen. Üblich war eine Menge von $100\ \mu\text{l}$. Nachdem die Vesikel sich abgesetzt hatten, konnten sie durch leichtes Wackeln am x-y-Tisch in einen passenden Käfig positioniert werden. Dies dauerte aufgrund der großen Anzahl an Käfigen auf den Chips nur wenige Minuten. Bei diesem Verfahren konnte davon ausgegangen werden, dass die Vesikel vollkommen unbeschädigt blieben.

2.2.5 Adhäsion und Abstandsbestimmung

Um den Einfluss der Säulen auf das Adhäsionsverhalten der Vesikel zu studieren, wurden FLIC-Messungen durchgeführt. FLIC (Fluorescence Interference Contrast Microscopy) [Bra97, Lam96, Lam02] ist ein optisches Messverfahren zur Abstandsbestimmung von angefärbten Membranen zu oxidierten Siliziumchips mit einer Messgenauigkeit von 1 nm. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) [Cur64, Izz76, Lan85] oder TIRF (Total Internal Fluorescence Microscopy) [Bai88, Tru92, Bur94] hängt sie kaum von den nicht genau bekannten optischen Eigenschaften der Membran wie Dicke und Brechungsindex ab.

Bei FLIC-Messungen werden Farbstoffe, die in einer auf einem oxidierten Siliziumchip adhären Membran inkorporiert sind, zur Fluoreszenz angeregt. Sowohl die Anregung als auch die Emission findet aufgrund der reflektierenden Grenzfläche zwischen Silizium und Oxid in Form von stehenden Wellen statt. Misst man die Intensität des emittierten Lichtes für unterschiedliche Oxidhöhen, so kann mit Hilfe eines optischen Fit-Modells auf den Abstand der Membran zur Oberfläche des Oxides geschlossen werden.

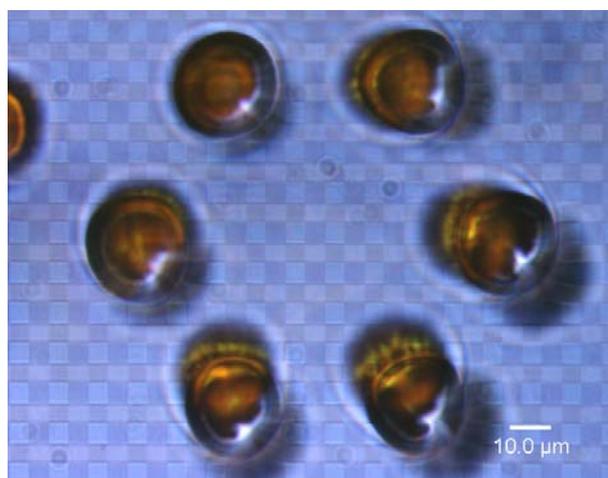


Abbildung 2.22: Ein Käfig bestehend aus sechs Säulen auf einem FLIC-Chip mit vier verschiedenen Oxidstufen. Jedes Oxidquadrat ist $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ groß. Der Innendurchmesser des Käfigs beträgt $70\ \mu\text{m}$. Die Säulen besitzen einen Durchmesser von $25\ \mu\text{m}$.

In den Experimenten fanden nur Vesikel Verwendung, die aus POPC und DiI bestanden (200:1 (Molverhältnis)). Für die Messungen wurden Säulen mit dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Verfahren auf FLIC-Chips prozessiert. Die Chips wurden freundlicherweise von Y. Iwanaga zur Verfügung gestellt. Abbildung 2.22 zeigt einen Käfig auf einem FLIC-Chip. Die Oberfläche der Chips war in quadratische Einheitszellen mit $10\ \mu\text{m}$ Kantenlänge unterteilt. Jede Zelle besaß vier quadratische Oxidterrassen mit unterschiedlichen Dicken.

Die Oxiddicken konnten an speziellen Referenzzonen ($500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$) mit einem Ellipsometer (SD 2000, Plasmos, München) mit einer Genauigkeit von 0.3 nm bestimmt werden. Die verwendeten Chips hatten folgende Oxiddicken: $d_{Ox} = 14.7, 54.4, 103.3, 146.0$ nm. Die Beschichtung mit BSA wurde wie oben beschrieben vorgenommen. Vor jeder Messung mussten die Oxidterrassen anhand ihrer Interferenz-Farben in rotem Auflicht identifiziert werden.

Die Abstandsmessungen fanden an einer gesonderten Apparatur statt, die speziell für FLIC konzipiert war. Hierbei handelte es sich um ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen) mit einem Wasser-Immersion-Objektiv (Achromplan, 100x, Numerische Apertur 1.0, Zeiss). Angeschlossen waren eine Quecksilber-Dampf-Lampe (HBO 100W/2, Osram) mit einer Emissionswellenlänge von 546 nm zur Beleuchtung und eine CCD Kamera (ICX039AL HRX, Theta Systems, München) zur Detektion [Bra97]. Die Bilder wurden mit einer 8-bit Frame-Grabber-Karte (ITEX AFG, Stemmer, München) in den Computer eingelesen. Verwendet wurde ein DiI-Filtersatz.

Nachdem die Riesenvesikel in passende Käfige positioniert worden waren, dauerte es auf BSA beschichteten Chips zwischen 5 und 20 Minuten, bis sie für FLIC-Messungen optimal adhärirt waren. Hierbei wurden drei Phasen der Adhäsion beobachtet:

Ring-Phase: Kurz nach der Positionierung liegt der Vesikel nur auf einem Kreis auf. Die adhärirte Membran fluktuiert so stark, dass keine FLIC-Messung möglich ist.

Ruhe-Phase: Der Ring geht in eine Phase über, in welcher der Vesikel flächig aufliegt und die adhärirte Membran weniger fluktuiert. Eine FLIC-Messung ist durchführbar.

Fluktuation: Die Auflagefläche des Vesikels wächst und die Fluktuationen nehmen gleichzeitig zu. Abstandsmessungen können nicht vorgenommen werden.

Allerdings kam es bei vielen Vesikeln auch vor, dass die Ruhe-Phase nicht auftrat und keine FLIC-Messung möglich war. Ebenfalls beobachtet wurde nach einer Ring- oder Ruhe-Phase das Abheben eines Vesikels, so dass er den Chip nur noch punktuell im Zentrum berührt. Die verschiedenen nicht auswertbaren Adhäsionsarten sind in Abbildung 2.23 zu sehen. Das unterschiedliche Adhäsionsverhalten ist wahrscheinlich auf eine stark unterschiedliche Spannung der Vesikelmembranen nach der Herstellung zurückzuführen.

In den auswertbaren Bildern der Ruhephase wurden vier rechteckige Bereiche auf den unterschiedlichen Oxidterrassen ausgesucht, die keine Verunreinigungen und nur wenige Fluktuationen aufwiesen. Die Häufigkeit der Intensitäten werden in einem Histogramm aufgetragen und Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Trägt man die vier Mittelwerte gegenüber den Oxiddicken der Terrassen auf, so lässt sich der Graph mit einer Theoriekurve fitten. Die freien Parameter sind dabei die Dicke des Spalts d_J , der Skalierungsfaktor der Kurve und die Hintergrundintensität. Eine FLIC-Aufnahme sowie der zugehörige Graph ist in Abbildung 2.24 dargestellt. Für die Adhäsion von Riesenvesikeln auf BSA in Polyimidkäfigen ergab sich im Mittel ein Abstand von $d_J = 93 \pm 14$ nm. Messungen mit Vesikeln außerhalb der Käfige ergaben demnach ähnliche Abstände. Die Käfige beeinflussten das Adhäsionsverhalten also nicht.

Der Adhäsionsabstand von Riesenvesikeln auf BSA-beschichteten Chips wurde schon einmal von G. Zeck bestimmt [Zec03]. Es ergaben sich Abstände von $d_J = 51 \pm 2$ nm.

Die große Differenz zwischen den beiden Messergebnissen mag auf einem der folgenden Unterschiede beruhen:

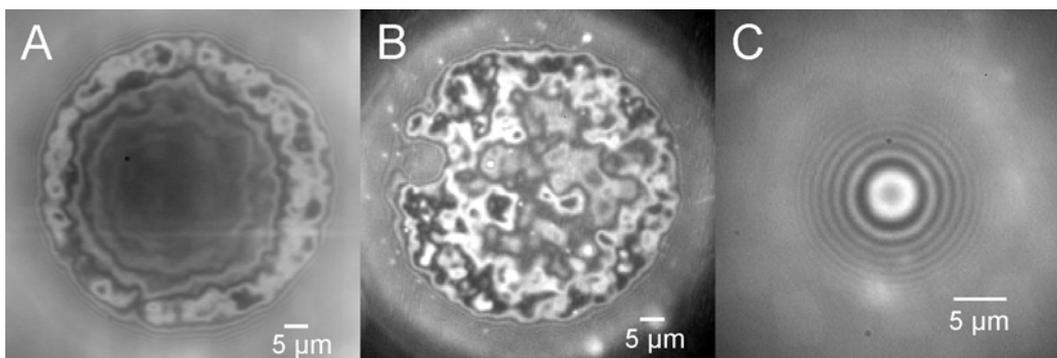


Abbildung 2.23: Beispiele für schlechte Adhäsion. **A:** Unmittelbar nach dem Aufsetzen berührt der Vesikel den Chip auf einer ringförmigen Fläche. **B:** Darauf folgt entweder nach einer Ruhephase mit guter Adhäsion oder direkt die abgebildete Fluktuationsphase. **C:** Ein seltener Fall ist das erneute Abheben des Vesikels bis zu einer punktuellen Adhäsion nach einer Ring- oder Ruhe-Phase.

- Im Gegensatz zu G. Zeck, der reine 300 mM Glucose-Lösung benutzte, wurde hier ein 400 mOsm Puffer mit 40 mM NaCl verwendet. Dadurch lagen einerseits andere Ionenkonzentrationen im Außenraum vor, andererseits änderte sich auch die Membranspannung durch das Angleichen der Osmolarität im Inneren der Vesikel.
- Die Prozeduren zur Beschichtung mit BSA unterscheiden sich. Während G. Zeck die Chips vor der Zugabe der BSA-Lösung mit Dimethyldichlorsilan hydrophobisierte, wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet. Die Silanisierung eines Säulen-chips würde dazu führen, dass die BSA-Lösung nicht in die Käfige vordringen könnte. Kleine Luftbläschen würden in den Käfigen verbleiben und eine Beschich-

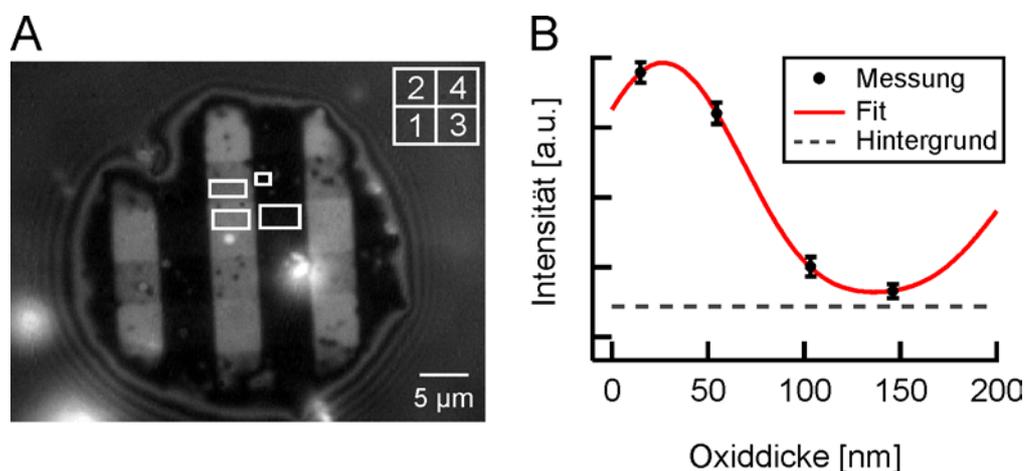


Abbildung 2.24: FLIC Messung: Abstandsmessung an Riesenvesikeln auf BSA. **A:** Auf einem Photo der Adhäsionsfläche wird für jede Oxidhöhe ein fehlerfreier Bereich ausgewählt (Die Bereiche 1 bis 4 entsprechen Oxidhöhen von 14.7, 54.4, 103.3, 146.0 nm). **B:** Die Mittelwerte der Intensitäten werden gegen die Oxiddicke aufgetragen und gefittet. Als Fitparameter werden der Adhäsionsabstand von 91.17 ± 1.12 nm, der Skalierungsfaktor der Kurve und die Hintergrundintensität ermittelt.

tung verhindern. Eine Entfernung mit Ultraschall ist auf gebondeten Chips nicht mehr möglich.

Auf eine genaue Klärung der Ursache für die unterschiedlichen Messergebnisse wurde verzichtet. Wichtig für diese Arbeit war in erster Linie die Tatsache, dass die Polyimid-Käfige eine Adhäsion nicht behinderten. Ein Kontrollexperiment zeigte hingegen, dass die Vesikel in Poly-L-Lysin-beschichteten Käfigen den Chip nicht berühren, da sie vorher im oberen Käfigteil an einer der Säulen haften blieben.

2.3 Anstechen mit unbeschichteten Pipetten

Nachdem mit den Polyimidkäfigen die ideale Methode gefunden worden war, Vesikel auf Siliziumchips zu fixieren, konnte der Fokus auf die Elektrophysiologie gelegt werden. Hierbei wurde in erster Linie versucht, die Vesikel anzustechen. Auf die erfolglosen Versuche, Riesenvesikel zu patchen, wird in Anhang A.2 eingegangen. Bei den zuerst vorgestellten Anstechversuchen mit unbeschichteten Pipetten wurde anfangs davon ausgegangen, dass der Kontakt zwischen Pipette und Vesikelmembran wie bei Neuronen dicht sei. Dies trifft aber nicht zu, wie im Folgenden erläutert wird.

2.3.1 Erste Messungen

Nachdem ein Vesikel, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, in einem passenden Käfig positioniert worden war, wurde er mit einer leitfähigen Mikroelektrode angestochen. Hierbei kamen als erstes unbeschichtete Anstechpipetten zum Einsatz. Sie wurden vor jedem Experiment an einem sogenannten Puller (Zeitz-Instruments, Augsburg) aus 10 cm langen Borosilicatglaskapillaren mit Filament frisch gezogen (Außendurchmesser = 1.0 mm, Innendurchmesser = 0.58 mm, Hilgenberg, Malsfeld oder Science Products, Hofheim). Der Öffnungsinwenddurchmesser der feinen Spitzen betrug 360 nm (siehe Abbildung 2.2). Die Pipetten wurden anschließend von hinten mit einer Spritze durch eine feine Quarz-Kapillare (MicroFil MF34G, World Precision Instruments, Sarasota, USA) 1 cm weit mit Salzlösung gefüllt. Verwendet wurde eine 1 M Kaliumchlorid Lösung, die im Pipettenhalter durch eine chlorierte Silberelektrode kontaktiert wird. Ein angestochener Vesikel ist in Abbildung 2.25 zu sehen. Bei diesen ersten Experimenten wurden Vesikel aus den Lipidmischungen POPC, DOPC, POPC:DOPME (100:1 (v/v)), POPC:DOPME:DiI (200:2:1 (v/v)) und POPC:DiI (200:1 (v/v)) verwendet. Die Zusammensetzung der Membran schien jedoch keinen Einfluss auf den Erfolg beim Anstechen zu haben.

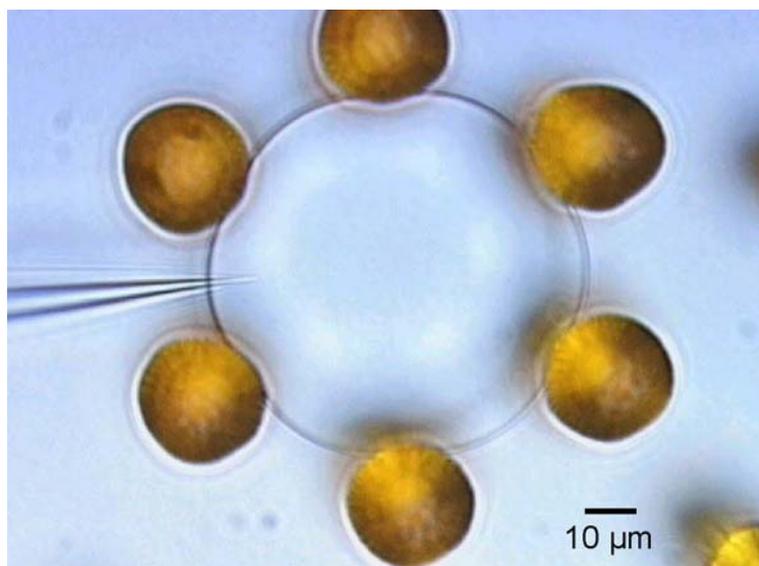


Abbildung 2.25: Auflichtaufnahme eines angestochenen Vesikels in einem Käfig bestehend aus sechs Säulen. Die Pipette ist links im Bild zu sehen.

Während des gesamten Anstechvorgangs wurden über den Verstärker im current clamp Modus Strompulse an die Pipette angelegt. Die rechteckigen Pulse besaßen Amplituden von 10–100 pA sowie Pulsdauern von 100–2000 ms. Der verwendete Verstärker besitzt die Möglichkeit, den Einfluss der Pipetten auf das detektierte Spannungssignal zu kompensieren. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf allerdings verzichtet, da sich der Widerstand der Pipetten während der Experimente drastisch änderte. Es war nicht möglich, die Kompensation während der Experimente nachzuregeln.

Sobald sich die Pipette im Bad befand, ergaben sich exponentielle Aufladungskurven als Spannungsantworten auf die positiven Stromstufen. Verantwortlich dafür war die Streukapazität C_S , bestehend aus der Pipettenkapazität und der Streukapazität des Vorverstärkers, die über den Pipettenwiderstand R_A aufgeladen wurden. Für die Spannung $V_P(t)$ gilt als Antwort auf eine rechteckige Stromstufe mit der Amplitude I_0 zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ s:

$$V_P(t) = I_0 R_A \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{AS}}}\right) \quad (2.12)$$

mit der Zeitkonstanten $\tau_{AS} = C_S R_A$. Für unbeschichtete Pipetten ergaben sich vor dem Anstechen durch Anfitten der Messkurven mit Gleichung 2.12 Pipettenwiderstände von $R_A = 20 - 40 \text{ M}\Omega$ und Streukapazitäten von $C_S = 8 - 12 \text{ pF}$.

Nach dem Einstechen der Pipetten in die Vesikel würde man, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, eine exponentielle Aufladungskurve mit zwei Zeitkonstanten als Spannungsantwort erwarten. Näherungsweise gilt bei dichtem Membran-Pipetten-Kontakt als Spannungsantwort auf eine rechteckige Stromstufe mit der Amplitude I_0 :

$$V_P(t) = I_0 \left(R_M - R_M e^{-\frac{t}{\tau_M}} + R_A - R_A e^{-\frac{t}{\tau_{AS}}} \right) \quad (2.13)$$

mit den Zeitkonstanten $\tau_M = R_M C_M$ und $\tau_{AS} = C_S R_A$.

Für sphärische Riesenvesikel mit einem Durchmesser von 50–150 μm erwartet man Membranwiderstände R_M von 12.7 bis 1.4 $\text{G}\Omega$ und Membrankapazitäten C_M von 0.08 bis 0.7 nF. Bei Anstechpipetten liegt der Pipettenwiderstand zwischen 20 und 100 $\text{M}\Omega$. Die Streukapazität C_S liegt bei circa 10 pF. Für die Zeitkonstanten ergeben sich also $\tau_M = R_M C_M = 1 \text{ s}$ und $\tau_{AS} = C_S R_A = 0.2 - 1 \text{ ms}$.

In den Experimenten zeigte sich jedoch, dass beim Einstechen der Mikropipetten drei verschiedene Signaltypen auftraten, von denen keine dem erwarteten Signal vollständig entsprach und die erwarteten Zeitkonstanten aufwies.

Signalform A: Eine exponentielle Aufladungskurve mit nur einer Zeitkonstanten von maximal 100 ms taucht auf. Anfitten mit Formel 2.12 ergibt Widerstände bis zu $R_A = 8.8 \text{ G}\Omega$ und Kapazitäten von $C_S = 10 - 12 \text{ pF}$.

Signalform B: Als Spannungsantwort ergibt sich eine exponentielle Aufladungskurve mit zwei Zeitkonstanten. Während die erste gut $\tau_{AS} = 0.2 - 1 \text{ ms}$ entspricht, ist die zweite mit 10–170 ms deutlich kleiner als der erwartete Wert von $\tau_M = 1 \text{ s}$. Anfitten mit Gleichung 2.5 ergibt plausible Werte für die Kapazitäten $C_M = 0.1 - 0.4 \text{ nF}$. Die erhaltenen Widerstände lagen bei $R_M = 40 - 430 \text{ M}\Omega$ und damit weit unter den erwarteten 1.4–12.7 $\text{G}\Omega$.

Signalform C: Das Signal ist identisch mit den außerhalb des Vesikels erhaltenen Messkurven. Es kann durch eine exponentielle Aufladekurve mit einer Zeitkonstanten angefüttet werden. Dabei ergeben sich Kapazitäten um 10 pF und Widerstände bis zu 100 M Ω .

Bei welcher Signalform wird das Innere des Vesikels nun erfolgreich kontaktiert? Bei Signalform A liegt der Widerstand in der richtigen Größenordnung, bei Signalform B die Kapazität. Aber bei keiner ergeben sich beim Anfitten mit Gleichung 2.5 alle erwarteten Parameter. Alle drei Signalformen wurden mit einer circa 10 μm tief in den Vesikel eingeführten Pipette gemessen. In allen Fällen lag die Membran dicht an der Pipette an. Sowohl im Auflicht als auch in Fluoreszenz waren keine Lecks erkennbar.

Welcher physikalische Verbindungszustand der Pipette mit der Membran entspricht den jeweiligen Signalformen? Ist die Membran bei den Anstechversuchen überhaupt durchbrochen worden? Diese Fragen sollen im Folgenden geklärt werden.

2.3.2 Verifizierung des intrazellulären Kontakts durch Farbstoffinjektion

Um die aufgetauchten Signalformen besser interpretieren zu können, wurde die Apparatur um die Möglichkeit erweitert, fluoreszierende Lösungen durch die Pipette in die Vesikel zu injizieren. Eine Verbindung zum Vesikelinneren konnte auf diese Art direkt nachgewiesen werden.

Als erstes wurde der Pipettenlösung der Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein hinzugefügt. Wie in allen restlichen Experimenten in der vorliegenden Arbeit bestand sie nun aus einer Lösung von 1 M Kaliumchlorid sowie 1 mM Natriumfluorescein in Reinstwasser. Der Pipettenhalter wurde an einen Mikroinjektor (Transjector 5246, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) mit einem maximalen Druck von 7 bar angeschlossen. Durch ihn konnte die Pipettenlösung ins Bad oder in die Vesikel injiziert werden. Bei Verwendung des DiI/Fluorescein Filtersatzes im Mikroskop erscheint das Fluorescein grün und die mit DiI angefärbte Membran gelb. Nach dem Einstechen in die Vesikel konnte durch diese Methode für jede der erhaltenen Signalformen geklärt werden, ob die Pipettenspitze die Membran durchbrochen hatte oder nicht. Abbildung 2.26 zeigt den deutlichen Unterschied zwischen Injektionen auf die Oberfläche des Vesikels und in sein Inneres. In beiden Fällen ist die Pipette weit in den Vesikel eingeführt worden. Während der Farbstoff sich im erfolgreich angestochenen Vesikel radial frei ausbreitet, bilden sich im anderen Fall kleine Membranblasen um die Pipettenspitze. Sie wachsen, laufen an der Pipette nach außen und ergießen ihren Inhalt schließlich in die Umgebung. Das Ausbilden von Taschen bei nicht erfolgreichen Injektionen wurde schon von Menger et al. beobachtet, als das erste Mal Fluoreszenzfarbstoffe und Salze in Riesenvesikel injiziert wurden [Men95b].

Anhand der Farbstoffinjektion konnten nun die drei vorkommenden Signalformen erklärt werden:

Erklärung Signalform A: Eine exponentielle Aufladungskurve mit nur einer Zeitkonstanten, an die ein hoher Widerstand von 1 – 8.8 G Ω und eine kleine Kapazität von 8 – 12 pF angefüttet werden kann, weist auf eine verschlossene Pipette hin. Die Kapazität ist die Streukapazität der Apparatur C_S . Eine Injektion geht immer in den Außenraum. Es handelt sich hierbei also um einen cell-attached Zustand wie beim Patchen (siehe Kapitel 2.1.2). Manchmal weist diese Signalform auch auf eine verstopfte Pipette hin.

Erklärung Signalform B: Aufladungskurven mit zwei Zeitkonstanten weisen immer auf eine erfolgreiche elektrische Kontaktierung des Vesikelinneren hin. Eine Injektion geht auf jeden Fall in das Innere des Vesikels. Die schnelle erste Zeitkonstante wird durch die Aufladung von C_S über R_A verursacht. Die langsame zweite Zeitkonstante ist auf die Aufladung der Membrankapazität C_M über den Membranwiderstand R_M sowie parallel über ein nicht sichtbares Leck mit Widerstand R_L zurückzuführen. Der effektive Membranwiderstand $R_M^* = \frac{R_M R_L}{R_M + R_L}$ ist somit viel kleiner als R_M , was eine viel kürzere zweite Zeitkonstante als erwartet zur Folge hat. (siehe Kapitel 2.1.4)

Erklärung Signalform C: Tritt die gleiche Signalform wie außerhalb des Vesikels auf, so gibt es zwei Möglichkeiten. In der Regel wurde die Membran durchbrochen und die Injektion geht ins Innere des Vesikels. Das Leck ist jedoch so groß, dass die Auf-

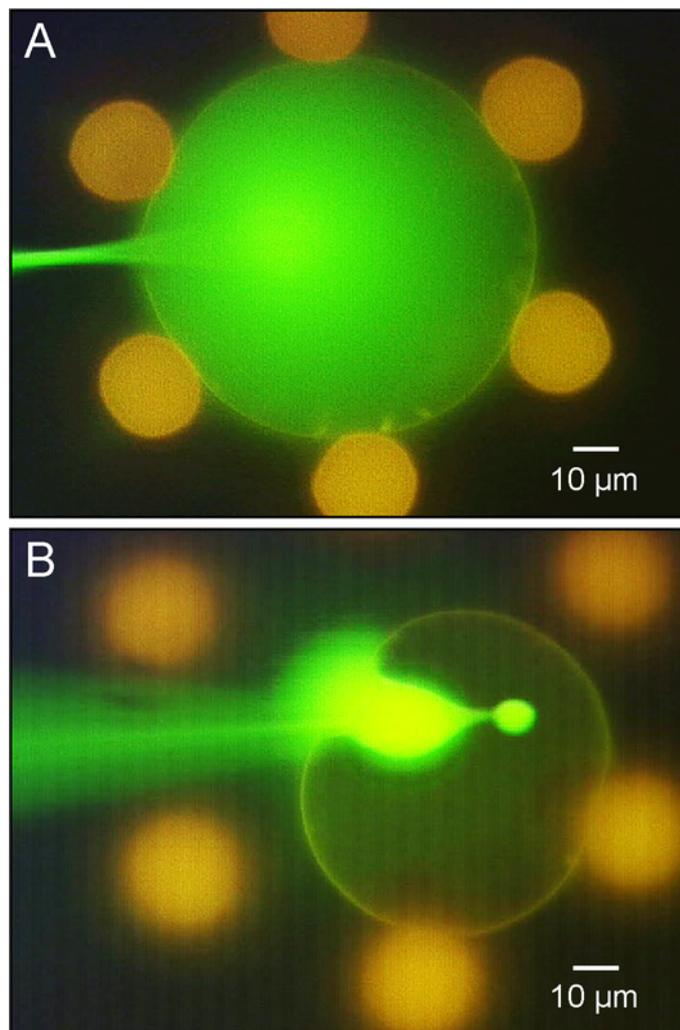


Abbildung 2.26: Mit einer Farbstoffinjektion ist eindeutig erkennbar, ob die Pipettenspitze die Vesikelmembran durchbrochen hat: **A:** Beim erfolgreichen Eindringen in den Vesikel breitet sich der Farbstoff von der Pipettenspitze aus gleichmäßig im Inneren aus. **B:** Obwohl die Pipettenspitze sich fast $40\ \mu\text{m}$ tief in dem Vesikel befindet, wird die Membran nicht durchbrochen. Die Injektion erzeugt kleine Bläschen, die an der Pipette entlang zurück laufen und sich in die Umgebung entladen.

ladung der Membran nicht beobachtet werden kann. Nur die Aufladung der Pipette ist messbar. Es handelt sich hierbei also um den Extremfall von Signalform B. In sehr wenigen Fällen wurde der Vesikel durch die Pipette nur „eingedellt“ und die Injektion ging nicht ins Innere.

Obige Erklärungen sind auch in Hinsicht auf die Interpretation von Übergängen zwischen den einzelnen Signalformen plausibel. Bei einem erfolgreichen Einstechvorgang ging im Normalfall der cell-attached Zustand (Signalform A) in die Kontaktierung des Vesikellinneren mit einem kleinem Leck (Signalform B) über. Meist wuchs dieses Leck so schnell, dass bald keine Aufladung der Membran mehr zu erkennen war (Signalform C). Abbildung 2.27 zeigt für jede Signalform ein Beispiel mit den gefitteten Parametern.

Insgesamt wurden 45 Vesikel mit frisch gezogenen unbeschichteten Pipetten angestochen. Nur bei 20 Prozent konnten anhand von Signalform B effektive Membranwiderstände bestimmt werden. Diese waren außerdem bei annehmbaren Widerständen von maximal 430 M Ω entweder nur wenige Sekunden lang stabil oder hielten bei Widerständen von 40 bis 150 M Ω höchstens drei Minuten. Die durchschnittliche Dauer des messbaren Kontakts lag bei 66 Sekunden.

Um später erfolgreiche Chip-Messungen mit angestochenen Vesikeln durchführen zu können, wird jedoch deutlich mehr Zeit als 3 min benötigt. Auch ist ein höherer Kontaktwiderstand als 150 M Ω über einen längeren Zeitraum wünschenswert.

Versuche mit Riesenvesikeln, die aus anderen Lipiden und Lipidmischungen wie DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, 42492, Fluka, Buchs, Schweiz) oder 80:20 (v/v) Mischungen von POPC mit Cholesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) bestanden, brachten keine Verbesserung. Einer Verringerung der Pulsamplituden während des Eindringens von 100 pA auf 10 pA führte nicht zu stabileren Kontakten. Stattdessen fiel das Durchbrechen der Membran eher schwerer. In einigen Fällen musste das Durchbrechen der Membran durch die sogenannte Buzz-Funktion des Verstärkers unterstützt werden. Diese im Verstärker eingebaute Funktion löst zu diesem Zweck kurze Spannungsspitzen aus.

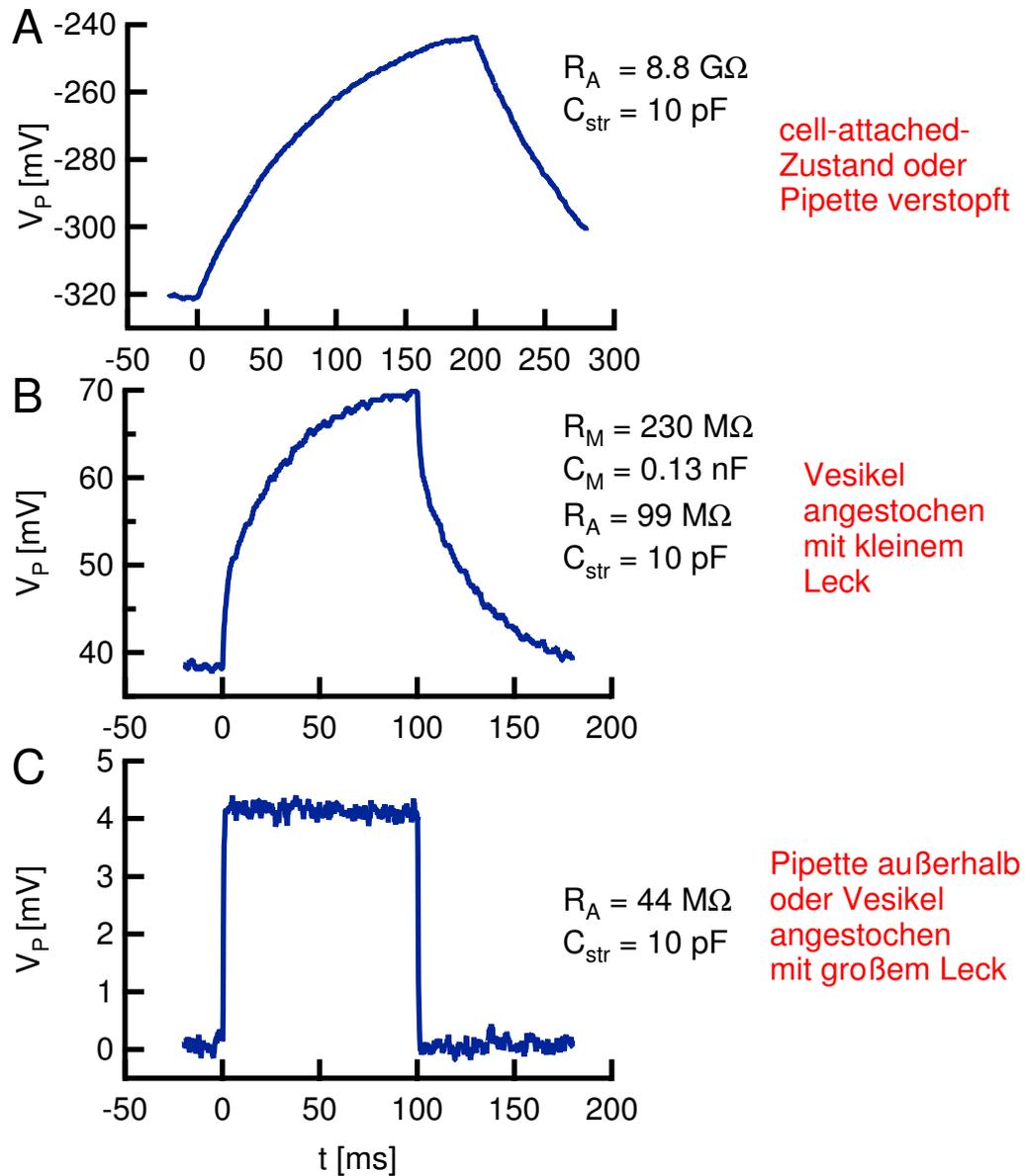


Abbildung 2.27: Beim Einstechen von Pipetten in Vesikel wurden drei Signalformen als Spannungsantwort $V_P(t)$ auf rechteckige Strompulse (Amplitude= I_0 , Pulslänge= t_P , Vesikelradius= a_V) beobachtet. Zu sehen sind drei Beispiele sowie ihre Interpretation und mögliche Fitparameter. **A:** Exponentielle Aufladung der Streukapazität C_S über den durch einen cell-attached Zustand auf bis zu $8.8 \text{ G}\Omega$ erhöhten Zugangswiderstand R_A der Pipette ($I_0 = 10 \text{ pA}$, $t_P = 200 \text{ ms}$, $a_V = 40 \mu\text{m}$). **B:** Das Innere des Vesikels wurde kontaktiert. Nach der schnellen Aufladung der Streukapazität C_S über den Pipettenwiderstand R_A erfolgte die langsame Aufladung der Membrankapazität über den effektiven Membranwiderstand R_M^* ($I_0 = 100 \text{ pA}$, $t_P = 100 \text{ ms}$, $a_V = 40 \mu\text{m}$). **C:** Hatte der Vesikel ein großes Leck, dann war keine Membranaufladung mehr zu erkennen. Wie außerhalb des Vesikels konnte nur die Aufladung der Streukapazität C_S über den Pipettenwiderstand R_A beobachtet werden ($I_0 = 100 \text{ pA}$, $t_P = 100 \text{ ms}$).

2.4 Anstechen mit beschichteten Pipetten: Gigakontakt

Die niedrigen effektiven Membranwiderstände R_M^* sind entweder auf eine undichte Vesikelmembran oder ein Leck zwischen Glaspipette und Membran zurückzuführen. Extrazelluläre Leitfähigkeitsmessungen auf Silizium-Chips ergaben aber, dass die Membran eines Riesenvesikels mit einem spezifischen Widerstand von $r_M > 1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ als dicht anzusehen ist [Fro99, Kie99]. Deswegen wurde angenommen, dass der effektive Membranwiderstand R_M^* durch eine Verbesserung des Membran-Pipetten-Kontakts erhöht werden könne. Obwohl dies zutraf, schien es beim Anstechen zusätzlich noch zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit des Membranteiles zu kommen, der den Chip berührt. Dies folgt später aus den in Kapitel 3.5 beschriebenen intrazellulären Chipmessungen.

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, führte eine Veränderung des Lipidgemisches zu keiner Verbesserung des Membran-Pipetten-Kontakts. Deshalb musste die Oberfläche der Pipette modifiziert werden. Durch eine Veränderung der Oberflächenladung oder der Hydrophilie des Glases mit bestimmten Beschichtungen sollte die Bindung der Membran an die Pipette verbessert werden können. Von Vorteil ist dabei die Tatsache, dass Anstechpipetten nach dem Ziehen sehr sauber sind. An die Hydroxyl-Gruppen der Glasoberfläche können viele verschiedene chemische Reagenzien binden.

Durch die Beschichtung der Glaspipetten mit den drei Reagenzien Dimethyldichlorsilan, Aminosilan oder Poly-L-Lysin konnte der Membranwiderstand deutlich gesteigert und die Stabilität des Systems verbessert werden. Besonders bei Aminosilan und Poly-L-Lysin zeigte sich jedoch, dass ein Großteil der Pipetten während der Beschichtungsreaktionen verstopfte. Um dies zu verhindern, wurde ein spezieller Druckhalter für die Beschichtung von Pipetten entwickelt.

2.4.1 Beschichtung von Pipetten unter hohem Innendruck

Beim Eintauchen einer Glaspipette in eine Beschichtungslösung wird ein wenig davon durch die Kapillarwirkung in der Pipette hochgesaugt. Dies führt bei Aminosilan-Lösungen oft und bei Poly-L-Lysin-Lösungen immer zu einer irreversiblen Verstopfung der Pipette. Durch Anlegen von hohen Drücken an das Pipetteninnere lässt sich aber ein Eindringen des Lösungsmittels verhindern. Zu diesem Zweck wurde ein spezieller Druckhalter konstruiert.

Mit dem Halter ist es möglich, sechs Anstechpipetten bis zu einem Innendruck von 40 bar zu fixieren. Als Druckquelle dient eine Gasflasche (200 bar), die mit Stickstoff 5.0 (Linde Gas, Höllriegelskreuth) gefüllt ist. Sie ist mit dem Druckhalter über einen Druckminderer (Hornung, Isenburg) und einen speziellen Hydraulikschlauch (Nenndruck 250 bar) verbunden. Mit einem Ventil am Halter kann der durch den Stickstoff aufgebaute Druck wieder abgelassen werden. Der Aufbau des aus Aluminium gefertigten Halters wird in Abbildung 2.28 dargestellt. Ein Glasgefäß enthält die Beschichtungslösung. Es wird gegen den Halter durch ein Bandgummi abgedichtet. Für den Aufbau und den Ablass einer Argon-Atmosphäre (Linde Gas, Höllriegelskreuth) sind im Halter spezielle Bohrungen vorhanden. Die durchströmende Argonmenge kann über einen Druckminderer und ein Druckregelventil (Festo AG & Co, Esslingen) eingestellt werden. Das Hauptproblem bei der Konstruktion bestand in der Fixierung der Pipetten. Bei einem Druck von bis zu 40 bar reichen die bei normalen Pipettenhaltern in der Elektrophysiologie üblichen O-Ringe nicht mehr aus. Stattdessen werden sie durch ein 12 mm langes Stück eines Silikonschlauches (Durchmesser 3 mm) ersetzt. Ein Ende des Stückes wird auf einer Länge von 7 mm auf

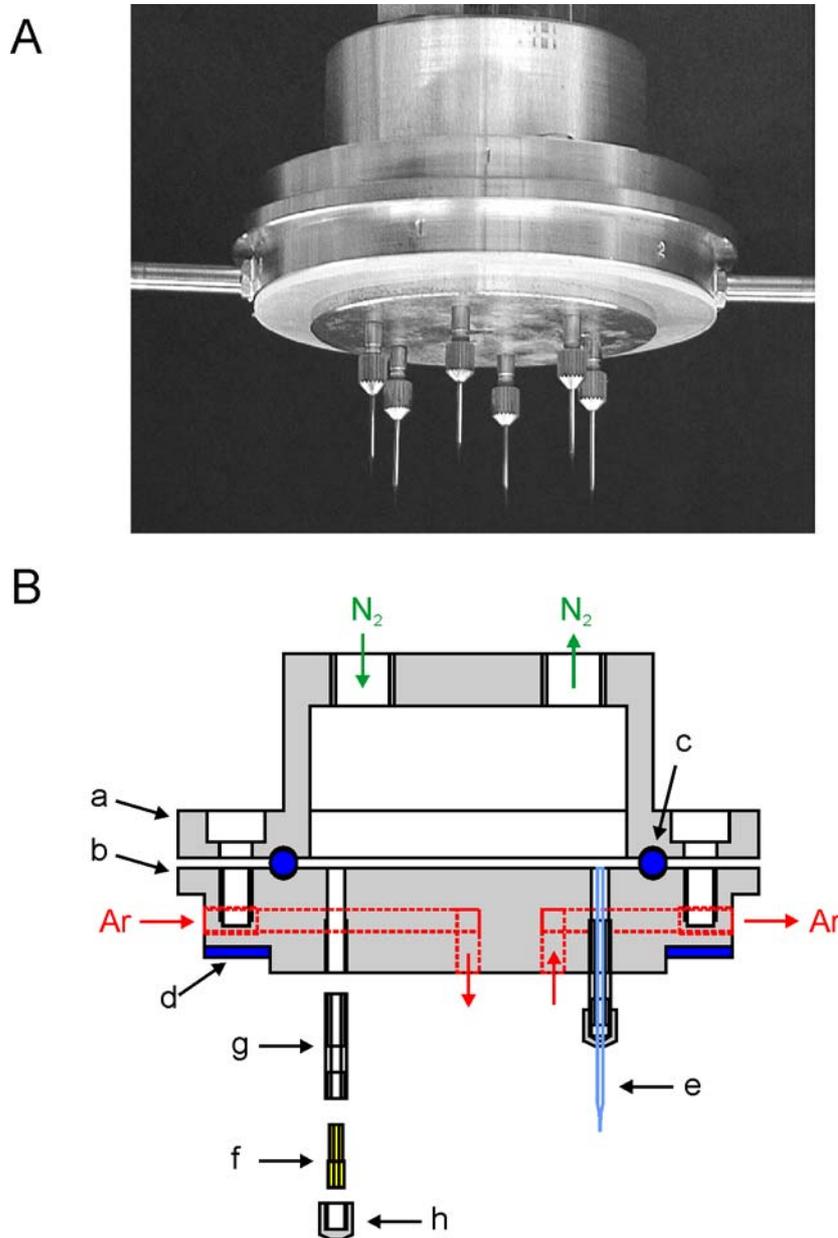


Abbildung 2.28: Aufbau des Druckhalters: **A:** Photo des Druckhalters. **B:** Im Schnittbild des Halters ist der zweiteilige Aufbau (a, b) sowie die Abdichtung der beiden Komponenten durch einen Gummiring (c) deutlich zu erkennen. Der obere Teil (a) enthält zwei Bohrungen für den Stickstofffluss durch den Halter, der untere (b) zwei Bohrungen für den Argonfluss über das Glasgefäß, das durch Anpressen an ein Gummiband (d) abgedichtet werden kann. Die Pipetten (e) werden durch das Zusammenpressen eines Silikonschlauches (f) zwischen Pipettenaufnahme (g) und Schraubverschluss (h) fixiert.

einen Durchmesser von 2.5 mm verjüngt und passt damit in die Pipettenaufnahme. Der überstehende Schlauchteil (5 mm Länge) wird beim Zudrehen der Schraubköpfe so zusammengepresst, dass seine Ausdehnung für eine optimale Fixierung der glatten Glaspipetten sorgt.

Für die Beschichtungen wird der Druckhalter mit sechs frisch gezogenen Pipetten bestückt und in eine Klammer eingespannt. Mit einem höhenverstellbaren Tisch wird ein Glasgefäß mit 100 ml Beschichtungslösung von unten gegen das Bandgummi des Halters gepresst, sodass die Pipetten in die Lösung eintauchen. Der Druck im Halter wird dabei so gewählt, dass aus den Pipetten kleine Luftblasen aufsteigen. Theoretisch muss zur Bildung kleiner Gasblasen maximal deren Innendruck erreicht werden. Dieser hängt von ihrem Radius, welcher derselbe wie in der Pipette ist ($a = 360 \text{ nm}/2 = 180 \text{ nm}$), und der Oberflächenspannung σ der Lösung ab. Es gilt für den theoretischen Druck p_{theo} in einer Gasblase:

$$p_{theo} = \frac{2\sigma}{a} \quad (2.14)$$

In der Praxis zeigte sich jedoch, dass die erforderlichen Drücke wesentlich höher gewählt werden mussten. Tabelle 2.1 listet für einige Lösungsmittel ihre Oberflächenspannungen sowie die theoretisch und experimentell ermittelten Drücke auf.

Flüssigkeit	σ [mN/m]	p_{theo} [bar]	p_{exp} [bar]
Ethanol	22.3	2.5	11
Aceton	23.3	2.6	11
Toluol	28.5	3.2	11
Schwefelsäure	55.1	6.1	22
Reinstwasser	72.7	8.1	33

Tabelle 2.1: Oberflächenspannungen von Lösungsmitteln sowie die theoretisch und experimentell ermittelten Drücke, um Gasblasen aus Pipetten auszustoßen.

2.4.2 Zeitliche Verlaufsanalyse des intrazellulären Kontakts

Bei allen Versuchen mit beschichteten Pipetten wurden über den im current clamp Modus betriebenen Verstärker kontinuierlich Strompulse an die Pipette angelegt. Um den zeitlichen Verlauf des effektiven Membranwiderstandes R_M^* , der Membrankapazität C_M und des Zugangswiderstandes R_A dokumentieren zu können, wurde die Spannungsantwort für jeden einzelnen Puls angefittet. Da es sich dabei je nach Dauer des Experiments um bis zu mehrere tausend Pulse handeln kann, wurde zur Auswertung ein halbautomatisches LabVIEW Programm (National Instruments, Austin, USA) erstellt. Je nach Abweichung des Fits von der Messkurve wurde er akzeptiert oder der Benutzer um eine Parameterkorrektur gebeten. Messkurven mit Spannungsschwankungen wurden dabei nicht ausgewertet, um Parameterverfälschungen zu vermeiden. Nicht zu fittende Kurven finden sich außerdem oft zu Beginn des Anstechens, unmittelbar vor dem Durchbruch der Membran. Ebenfalls ignoriert wurden die öfters auftretenden sehr großen Zugangswiderstände beim Auftreten eines cell-attached Zustandes (Signalform A), um den restlichen Verlauf des Zugangswiderstandes besser darstellen zu können.

Die Messkurven wurden je nach Zeitpunkt mit zwei unterschiedlichen nichtlinearen Fitfunktionen ausgewertet. Welche Fitfunktion verwendet wurde, ist in den später folgenden zeitlichen Verlaufsgraphen durch einen Balken farbkodiert (siehe beispielsweise Abbildung 2.33). Innerhalb der Vesikel tritt bei gutem Membran-Pipetten-Kontakt Signalform B auf. Diese Messkurve weist zwei Zeitkonstanten auf und kann mit Formel 2.5 (S. 14) gefittet werden (rote Kodierung). Außer dem Zugangswiderstand R_A und der Streukapazität C_S können Membrankapazität C_M und effektiver Membranwiderstand R_M^* bestimmt werden. Nach dem Verschwinden des Glas-Pipetten-Kontakts sowie vor dem eigentlichen Anstechen besitzt das Signal keine langsame Komponente. Nur Signalform C ist zu sehen. Als Fitfunktion findet dann Formel 2.12 (S. 41) ihre Anwendung (blaue Kodierung). In diesem Fall können natürlich nur Zugangswiderstand R_A und Streukapazität C_S ermittelt werden. R_M^* und C_M werden dagegen in den Graphen auf Null gesetzt. In allen Fits der hier gezeigten Messungen wurde die Streukapazität C_S konstant auf 10 pF gehalten. Ihr Verlauf taucht deshalb auch nicht in den Graphen auf.

Verfälschung der Messkurven:

Um während des Anstechvorgangs schnell auf Änderungen reagieren zu können, wurde zu Beginn der Messungen die Pulslänge sowie die Zeit zwischen den Pulsen kurz gehalten. Sobald anhand der Messkurven zu erkennen war, dass das Innere des Vesikels kontaktiert war, konnte auf längere Pulse umgestellt werden. Aufgrund dieses Vorgehens ist die Bestimmung der Membranparameter am Anfang viel ungenauer als im späteren Verlauf der Experimente. Verantwortlich dafür ist hauptsächlich die geringe Krümmung der Messkurven bei kurzen Pulsdauern. Besonders die Bestimmung von R_M wird dadurch erschwert, weil der Sättigungswert der Aufladung nicht erreicht wird. Da die Pulse zudem schnell aufeinander folgen mussten, reichte die Zeit bis zum nächsten Puls meist nicht für eine vollständige Entladung der Membrankapazität aus. Dieser Effekt führte zu einer Verfälschung der Messkurven, die sich in erhöhten Membrankapazitäten C_M und erniedrigten effektiven Membranwiderständen R_M^* bemerkbar macht.

Korrektur der Messkurven:

Um trotzdem die richtigen Parameter zu Beginn des Anstechens bestimmen zu können, wurden die Spannungskurven $V_P(t)$ vor dem Anfitzen korrigiert. Hierzu wurde der Spannungsabfall des vorhergehenden Pulses $V_{Ex}(t)$ angefitet, extrapoliert und von der Messkurve abgezogen. Das Auswerten der korrigierten Kurve $V_{Cor}(t) = V_P(t) - V_{Ex}(t)$ mit der üblichen Fitfunktion aus Formel 2.5 brachte nun plausible Werte. Problematisch hierbei ist allerdings, dass die Ungenauigkeit der Parameterbestimmung bei sehr kurzen Pulsen noch erhöht wird. Dies kommt durch die Verwendung von zwei Fits pro Puls an Stelle von nur einem zu Stande. Abbildung 2.29 zeigt die Spannungsantwort auf mehrere zu kurz aufeinanderfolgende Pulse und verdeutlicht die Entstehung des korrigierten Spannungssignals $V_{Cor}(t)$. Die Verfälschung des Messsignals wird noch einmal in Abbildung 2.30 verdeutlicht. Dort werden zwei einzelne Spannungsantworten $V_P(t)$ auf unterschiedlich lange Pulse sowie die korrigierte Kurve des kurzen Pulses $V_{Cor}(t)$ übereinander gelegt. Im Experiment folgte der lange Puls unmittelbar auf den kürzeren, die Membranparameter sollten sich deshalb zwischen den beiden Pulsen nur sehr geringfügig verändert haben. Trotzdem ist die kurze Messkurve nicht deckungsgleich zu der langen. Durch die noch nicht abgeklunge-

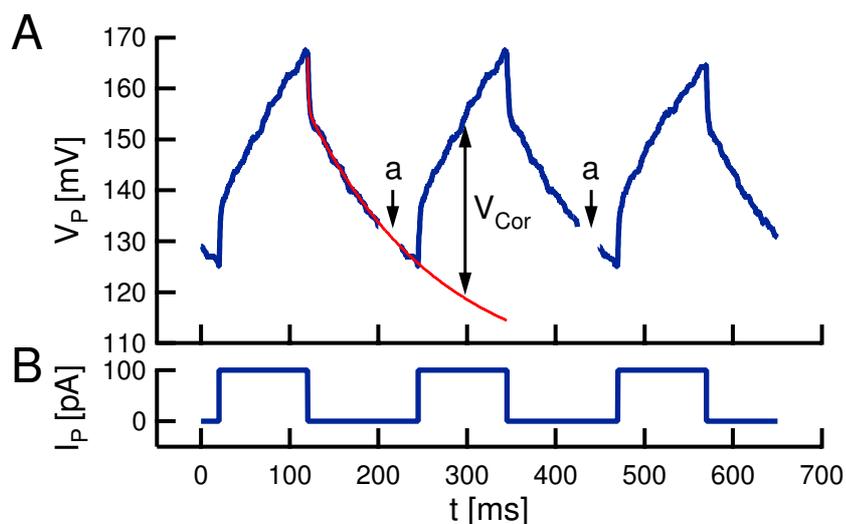


Abbildung 2.29: Korrektur des Messsignals: Zu sehen ist die Spannungsantwort $V_P(t)$ (**A**) auf drei unmittelbar aufeinander folgende, vorgegebene Strom-Pulse $I_P(t)$ mit einer Pulsdauer von 100 ms (**B**). Die Zeit zwischen den Pulsen ist mit 125 ms zu kurz. Die Membran hat sich zu Beginn der nachfolgenden Pulse noch nicht wieder vollständig entladen. Um den mittleren Puls richtig fitten zu können, muss er vorher berichtigt werden. Dazu zieht man im Zeitbereich dieses Pulses vom Messsignal $V_P(t)$ (blau) die extrapolierte Membranentladung $V_{Ex}(t)$ (rot) des vorherigen Pulses ab und erhält damit das korrigierte Messsignal $V_{Cor}(t)$ (schwarzer Pfeil). Die 25 ms langen Messlücken zwischen den einzelnen Pulsen sind messtechnisch bedingt (**a**).

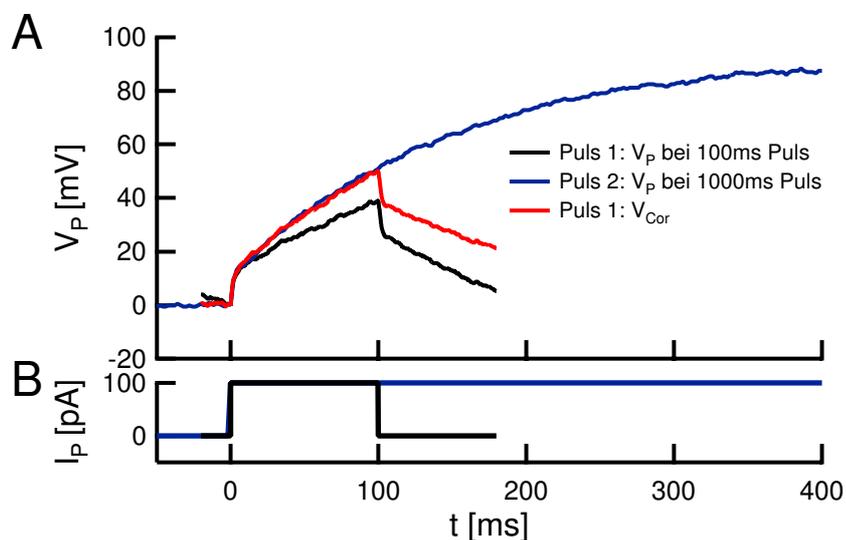


Abbildung 2.30: Gegenüberstellung der Spannungsantworten $V_P(t)$ (**A**) auf zwei unmittelbar aufeinander folgende, vorgegebene Strom-Pulse $I_P(t)$ (**B**) mit unterschiedlichen Pulsdauern von 100 ms und 1 s. Zum Vergleich sind die Messkurven übereinander gelegt worden. Vom langen Puls sind nur die ersten 400 ms dargestellt (blau). Da die kurzen Pulse (schwarz) zu schnell aufeinander folgen, ist die Membranladung noch nicht abgeklungen. Dadurch wird das Signal abgeflacht. Nach der Korrektur deckt sich die kurze Spannungsantwort mit der langen (rot).

ne Aufladung der Membran ist sie gegenüber dem langen Signal deutlich abgeflacht. Nach der Korrektur liegen kurzer Puls und langer Puls übereinander. Es ist nun möglich, aus der korrigierten Kurve die richtigen Fitparameter zu ermitteln.

Als Fitfunktion für den Spannungsabfall des vorhergehenden Pulses $V_{Ex}(t)$ wurde folgende Funktion verwendet:

$$V_{Ex}(t) = -I_0 \left(R_1 - R_1 e^{-\frac{t}{R_1 C_1}} + R_2 - R_2 e^{-\frac{t}{R_2 C_2}} \right) \quad (2.15)$$

wobei I_0 die Amplitude des vorhergehenden Strompulses ist. Die Funktion beschreibt eine Entladung mit zwei Zeitkonstanten. Für die Widerstände R_1 und R_2 sowie die Kapazitäten C_1 und C_2 gibt es keine physikalische Deutung. Die Korrektur mit der Extrapolation der Funktion $V_{Ex}(t)$, in der Art wie sie oben beschrieben wurde, wurde nur akzeptiert, wenn sich für die Parameterliste (R_1, C_1, R_2, C_2) Werte in derselben Größenordnung wie für (R_M, C_M, R_A, C_S) ergaben. Aufgrund zu geringer Krümmung der Messkurven war dies jedoch nicht immer möglich.

2.4.3 Dimethyldichlorsilan-Beschichtung

Als erstes Beschichtungsreagenz wurde Dimethyldichlorsilan ausgewählt. Durch eine dadurch erreichte Hydrophobisierung der Glasoberfläche sollte eine Bindung der ebenfalls hydrophoben Fettsäurenreste der Membranlipide an die Pipettenoberfläche erreicht werden.

Prozessführung:

Zuerst wurden die frisch gezogenen Pipetten mit Pipettenlösung gefüllt. Dann wurden ihre hinteren Enden in 3 mm lange Stücke eines Silikonschlauchs eingeführt, an denen sie mit der Spitze nach unten in einem Teflonhalter hängen konnten. Nach 15 Minuten in einer zweiprozentigen Dimethyldichlorsilanlösung in Toluol, 15 Minuten in reinem Toluol und 5 Minuten in Reinstwasser waren die Pipetten einsatzbereit. Abbildung 2.31 zeigt die Silanisierungsreaktion.

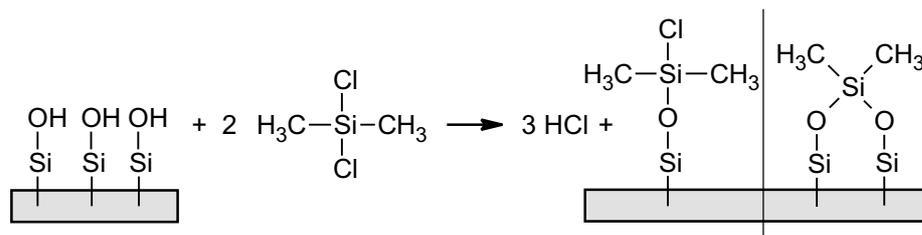


Abbildung 2.31: Reaktion von Dimethyldichlorsilan mit einer Glasoberfläche in Toluollösung. Über die beiden reaktiven Chloratome kann das Dimethyldichlorsilan sowohl ein als auch zwei Bindungen mit der Glasoberfläche eingehen.

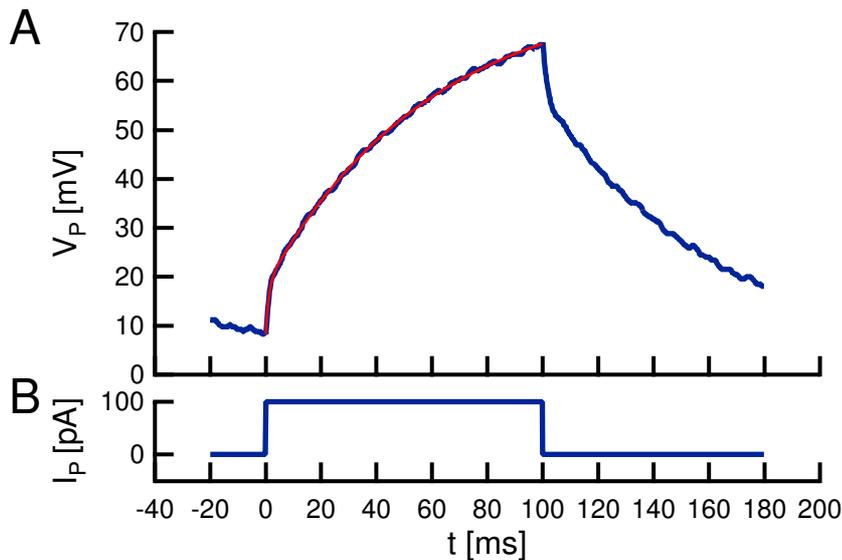


Abbildung 2.32: Spannungsantwort $V_P(t)$ auf einen vorgegebenen Strompuls $I_P(t)$. Zum Anstechen wurde eine mit Dimethyldichlorsilan beschichtete Pipette verwendet. Dieser nicht korrigierte Testpuls wurde Messung A1 entnommen. Durch Anfitzen der Aufladung (Messung: blau, Fit: rot) lassen sich die Membran- und Pipettenparameter bestimmen. Bei konstanten $C_S = 10$ pF ergeben sich hier $R_M^* = 590$ M Ω , $C_M = 0.09$ nF und $R_A = 120$ M Ω .

Detaillierte Beschreibung von Messungen:

Dargestellt werden hier zwei ausgewählte Messungen mit anfänglich hohem effektiven Membranwiderstand R_M^* und längerer Dauer. In Abbildung 2.32 wird der Fit einer einzelnen Messkurve aus der ersten Messung (A1) gezeigt. Abbildung 2.33 und Abbildung 2.34 stellen den zeitlichen Verlauf der aus den Fits gewonnenen Parameter dar.

Messung A1: Zum Zeitpunkt $t = 0$ dieser Messung erreicht der effektive Membranwiderstand R_M^* sein Maximum von 585 M Ω . Er fällt jedoch innerhalb von 8 s auf 250 M Ω ab. Das weitere Absinken auf 160 M Ω dauert mit 85 s dagegen deutlich länger. Dann springt R_M^* auf 260 M Ω . Bei $t = 150$ s wird eine Injektion durchgeführt, die ein sofortiges Absinken von $R_M^* = 230$ M Ω auf 190 M Ω zur Folge hat. Danach verschlechtert sich der Kontakt innerhalb von 10 s auf 110 M Ω und bricht anschließend nach insgesamt $t = 160$ s komplett zusammen. Für die Membrankapazität C_M ergibt sich während der gesamten Zeit ein annähernd konstanter Wert von 0.085 nF. Der Zugangswiderstand der Pipette R_A steigt zum Zeitpunkt des Anstechens $t = 0$ von 15 M Ω auf 120 M Ω . Dann sinkt er langsam. Nach der Injektion fällt R_A wieder auf circa 10 M Ω ab.

Messung A2: Nach dem Anstechen ($t = 0$) steigt der effektive Membranwiderstand R_M^* anfänglich innerhalb von 8 s von 190 M Ω auf 930 M Ω . Anschließend erfolgt in weiteren 15 s ein schneller Abfall auf unter 500 M Ω . Das Absinken auf 120 M Ω bei $t = 375$ s dagegen geschieht deutlich langsamer. Dann verschwindet der Kontakt für 450 ms und kehrt mit nur 30 M Ω zurück. Höchstwahrscheinlich ist dies auf eine Pore in der Vesikelmembran zurückzuführen (mehr dazu in Kapitel 2.6.1). Bei $t = 480$ s

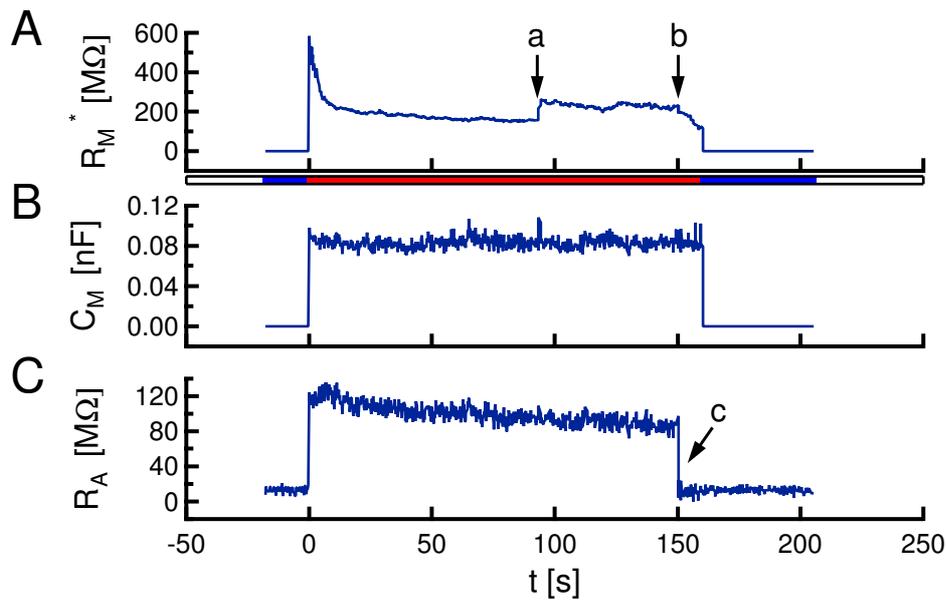


Abbildung 2.33: Verlaufsanalyse von Messung A1 mit Dimethyldichlorsilan-beschichteter Pipette. **A:** R_M^* sinkt zuerst in 8s von 585 M Ω auf 250 M Ω , dann langsamer in 85s auf 160 M Ω und steigt plötzlich auf 260 M Ω (a). Erst eine Injektion bei $t = 150$ s (b) initiiert das Ende des Seals nach 160s. **B:** C_M bleibt immer konstant. **C:** R_A steigt sprunghaft beim Anstechen an ($t = 0$ s), sinkt langsam und fällt bei der Injektion wieder ab (c).

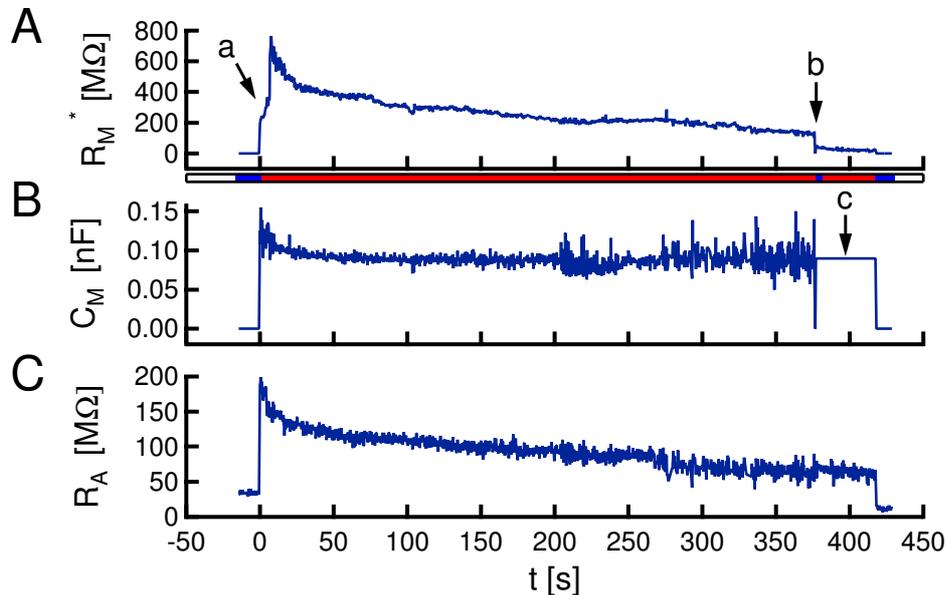


Abbildung 2.34: Verlaufsanalyse von Messung A2 mit Dimethyldichlorsilan-beschichteter Pipette. **A:** Nach einer Steigerung von 190 M Ω auf 930 M Ω in 8s (a), fällt R_M^* in 15s auf 500 M Ω und sinkt bis $t = 375$ s auf 120 M Ω . Nach einer Pore (b) hält der Kontakt bei 30 M Ω bis $t = 480$ s. **B:** C_M muss nach der Pore auf 0.09 nF konstant gehalten werden (c). **C:** R_A steigt beim Anstechen an ($t = 0$ s), sinkt langsam und fällt am Ende ab.

endet der Kontakt aufgrund einer Injektion. Trotz einer zwischenzeitlich größeren Ungenauigkeit bleibt die Membrankapazität C_M während der Messung konstant bei circa 0.09 nF. Nach dem Auftreten der Pore muss C_M wegen der geringen Amplitude des Signals bei kleinen R_M^* auf 0.09 nF konstant gehalten werden, um brauchbare Fits zu erzeugen. Der Zugangswiderstand R_A zeigt ein ähnliches Verhalten wie in Messung A1. Er steigt beim Eindringen von 35 M Ω auf 200 M Ω , fällt während der Messung langsam auf 60 M Ω und sinkt bei Verschwinden des Kontakts plötzlich auf 10 M Ω ab.

Ergebnis und Diskussion:

- Es zeigte sich, dass bei 52 Versuchen, Riesenvesikel mit hydrophoben Pipetten anzustechen, 30 erfolgreich waren und eine Aufladung der Membran beobachtbar war. Die Erfolgsquote von 58 % ist eine gute Verbesserung gegenüber unbeschichteten Pipetten. Während der Maximalwert des effektiven Membranwiderstand R_M^* nur geringfügig auf 930 M Ω gesteigert werden konnte, wurde die durchschnittliche Dauer auf 175 s verlängert. Der längste messbare Kontakt hatte einen Maximalwert von $R_M^* = 320$ M Ω und dauerte 730 s.
- Der Pipetten-Membran-Kontakt verschlechtert sich meist zweistufig. Während der erste Abfall von R_M^* in wenigen Sekunden stattfindet, dauert das anschließende langsame Absinken einige Minuten. Seltener ist ein kurzer anfänglicher „Heilungsprozess“ zu beobachten (Messung A2).
- Injektionen führen meistens innerhalb weniger Sekunden zu einer Zerstörung des Pipetten-Membran-Kontakts.
- Da die Pipetten vor dem Einstechen leichten Unterdruck haben, saugen sie ein wenig von der Puffer-Lösung ein. Diese ist weniger leitfähig als die Pipettenlösung. Deswegen ist der Zugangswiderstand der Pipette R_A zu Beginn der Messungen höher als nach einer Injektion. R_A steigt beim Anstechen sprunghaft an. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Leitfähigkeit der Saccharose-Lösung im Inneren des Vesikels zurückzuführen. Aufgrund der Diffusion von Ionen aus der Pipette in den Vesikel fällt R_A dann im Laufe der Messung langsam ab. Bei einer Injektion steigt die Leitfähigkeit im Vesikel sprunghaft an und R_A sinkt sofort ab.

2.4.4 Aminosilan-Beschichtung

Die Beschichtung der Pipetten mit Aminosilan wird mit der Verwendung von Vesikeln aus einem Lipidgemisch von POPC, DOPME und DiI (Molverhältnis 200:2:1) kombiniert. Die protonierten Aminogruppen des Silans haben in Lösung eine positive Ladung, die Membranaußenseite durch den Bestandteil DOPME eine negative Ladung. Durch die elektrostatische Wechselwirkung sollten sich die beschichtete Pipette und die Vesikelmembran stark anziehen und so einen dichten Kontakt erzeugen.

Prozessführung:

Die verwendete Aminosilanisierung von Glaspipetten ist ein aufwendiger Vorgang und dauert bis zu 25 Stunden. Sie beruht in großen Teilen auf einem von A. J. Schütz ent-

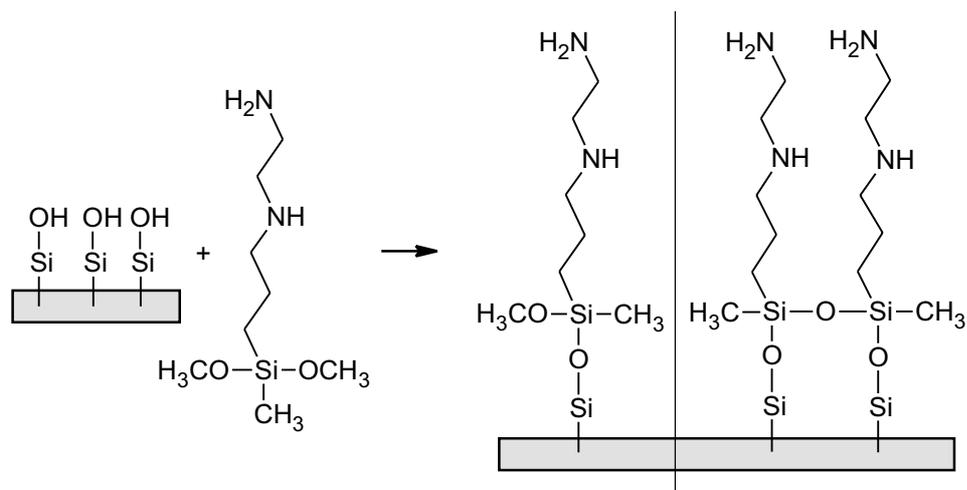


Abbildung 2.35: Reaktion von Aminosilan mit einer Glasoberfläche in Toluollösung. Über die beiden reaktiven Methoxygruppen kann das verwendete 2-(Aminoethyl)-3-aminopropylmethyldimethoxysilan nicht nur mit der Glasoberfläche eine Bindung eingehen, sondern auch eine Quervernetzung mit anderen Aminosilanen bilden. So wird eine homogene Beschichtung erreicht.

wickelten Prozess [Wel99]. Abbildung 2.35 zeigt die Silanisierungsreaktion. Während der Experimente zeigte es sich, dass durch die lange Dauer der Beschichtung viele Pipetten verstopften. Um dies zu verhindern, wurde der bereits oben beschriebene Druckhalter entwickelt und bei der zweiten Hälfte der Versuche auch verwendet. Der verwendete Druck wird möglichst schon vor dem Eintauchen in die jeweilige Lösung angelegt, um jegliches Eindringen zu verhindern.

Begonnen wird mit einer intensiven Reinigung der Pipetten. Dazu werden sie nach dem Anlegen eines Drucks von 22 bar für 30 Minuten in reines Ethanol (Merck, Darmstadt) getaucht. Anschließend wird der Druck auf 33 bar erhöht und das Bad gegen frisch angesetzte Piranha Lösung, bestehend aus einer Mischung von 30 prozentigem Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) und 97 prozentiger Schwefelsäure (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:2 (v/v), ersetzt. Nach 30 Minuten wird die stark oxidierende Lösung entfernt, die Pipetten mit einem Wasserstrahl abgespült und für 30 Minuten in Reinstwasser gestellt, das zweimal gegen frisches Wasser ausgetauscht wird. Um zu verhindern, dass ein Wasserfilm auf den Pipetten verbleibt, werden sie bei unverändertem Druck 30 Minuten lang bei 140 bis 320 °C mit einem Heizlüfter (Hotwind S, Leister, Kägiswil, Schweiz) ausgeheizt. Parallel dazu wird die eigentliche Beschichtungslösung frisch hergestellt. Dazu werden 100 ml Toluol (Riedel-de Haen, Seelze) mit 100 μ l Reinstwasser eine Stunde lang verrührt. Das mit Wasser gesättigte Toluol wird dekantiert und für 10 Minuten mit 1 ml 2-(Aminoethyl)-3-aminopropylmethyldimethoxysilan (06667, Fluka, Buchs, Schweiz) vermischt. In diese Lösung werden die abgekühlten Pipetten für 22 Stunden eingetaucht. Dazu kann der Druck auf 20 bar abgesenkt werden. Um das Entstehen eines Silan-Films an der Oberfläche der Lösung zu verhindern, wird der Hohlraum des Gefäßes über der Lösung mit Argon gespült. Abschließend werden die Pipetten zur Spülung für je 30 Minuten in reines Toluol bei 22 bar und Reinstwasser bei 33 bar getaucht. Die fertig beschichteten Pipetten wurden möglichst sofort in den Experimenten eingesetzt.

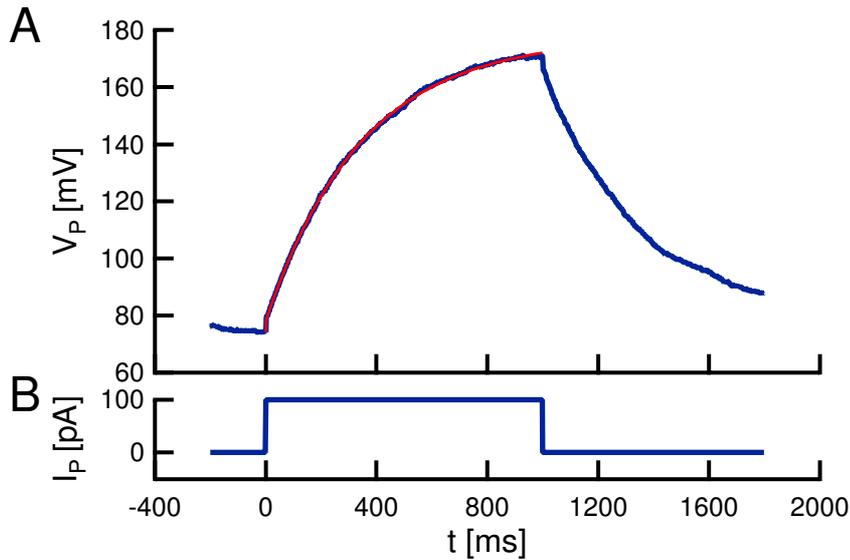


Abbildung 2.36: Spannungsantwort $V_P(t)$ auf einen vorgegebenen Strompuls $I_P(t)$. Zum Anstechen wurde eine mit Aminosilan beschichtete Pipette verwendet. Dieser nicht korrigierte Testpuls wurde Messung B1 entnommen. Durch Anfitzen der Aufladung (Messung: blau, Fit: rot) lassen sich die Membran- und Pipettenparameter bestimmen. Bei konstanten $C_S = 10 \text{ pF}$ ergeben sich hier $R_M^* = 990 \text{ M}\Omega$, $C_M = 0.34 \text{ nF}$ und $R_A = 40 \text{ M}\Omega$.

Detaillierte Beschreibung von Messungen:

Zur genaueren Analyse werden zwei Experimente mit hohem Membranwiderstand R_M^* und längerer Dauer ausgewählt. In Abbildung 2.36 wird der Fit einer einzelnen Messkurve aus der ersten Messung (B1) gezeigt. Die Verlaufsanalysen beider Experimente sind in Abbildung 2.37 und Abbildung 2.38 dargestellt.

Messung B1: Die Membran wird nach einem cell-attached Zustand um die $1.5 \text{ G}\Omega$ durch einen negativen Buzz durchbrochen ($t = 0 \text{ s}$). Anfangs lässt sich der effektive Membranwiderstand R_M^* aufgrund der kurzen Testpulse von 100 ms nur sehr schlecht bestimmen. Im Durchschnitt ergibt sich in dieser kurzen anfänglichen Phase von 7 s für R_M^* ein Wert von $1020 \text{ M}\Omega$. Ein schneller Abfall von R_M^* kann nicht beobachtet werden. Nach dem Umschalten auf längere Pulse ($1 - 1.5 \text{ s}$) unterschreitet R_M^* die $500 \text{ M}\Omega$ Grenze erst bei $t = 200 \text{ s}$. Bis zum Auftreten einer Unterbrechung des Kontakts bei $t = 850$ fällt R_M^* langsam auf $100 \text{ M}\Omega$. Diese Unterbrechung dauert 3.3 s . Hier handelt es sich um eine Pore, die durch eine Injektion ausgelöst wurde (siehe Kapitel 2.6.1). Danach erholt sich R_M^* auf $30 \text{ M}\Omega$ und verschwindet nach $t = 870 \text{ s}$ vollständig. Die Membrankapazität C_M beträgt während des gesamten Experimentes 0.28 nF . Der Zugangswiderstand R_A liegt wegen einer Testinjektion anfangs nur bei $8 \text{ M}\Omega$, steigt jedoch vor dem Anstechen auf die üblichen $30 \text{ M}\Omega$ an. Im Vesikel ergeben sich dann während der kurzen Pulse $40 \text{ M}\Omega$. Dieser Wert muss dann bis $t = 310 \text{ s}$ konstant gehalten werden, da in diesem Bereich durch die langen Pulse und die hohen R_M^* eine genaue Bestimmung von R_A nicht möglich ist. Bei den anschließenden kürzeren Pulsen kann R_A wieder ermittelt werden und fällt bis $t = 840 \text{ s}$ auf $30 \text{ M}\Omega$ ab. 6 s vor dem Ende des Kontakts kommt es aufgrund der Injektion 10 s

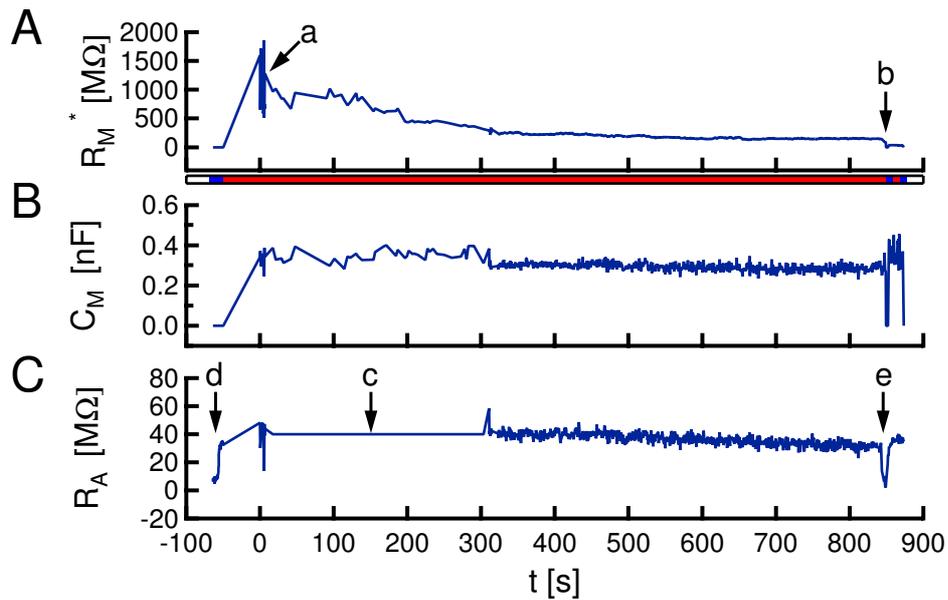


Abbildung 2.37: Verlaufsanalyse von Messung B1 mit Aminosilan-beschichteter Pipette. **A:** Zu Beginn sinkt R_M^* in 200s von durchschnittlich 1020 $M\Omega$ (a) auf 500 $M\Omega$ und bis $t = 850$ s auf 100 $M\Omega$. Nach einer Pore (b) erholt sich R_M^* auf 30 $M\Omega$ und endet bei $t = 870$ s. **B:** $C_M \approx 0.28$ nF. **C:** R_A beträgt 30 $M\Omega$ und steigt beim Anstechen ($t = 0$ s) um 10 $M\Omega$ an. Injektionen zu Beginn (d) und am Ende (e) erniedrigen R_A . Beim Zeitpunkt (c) ist $R_A = 40$ $M\Omega$.

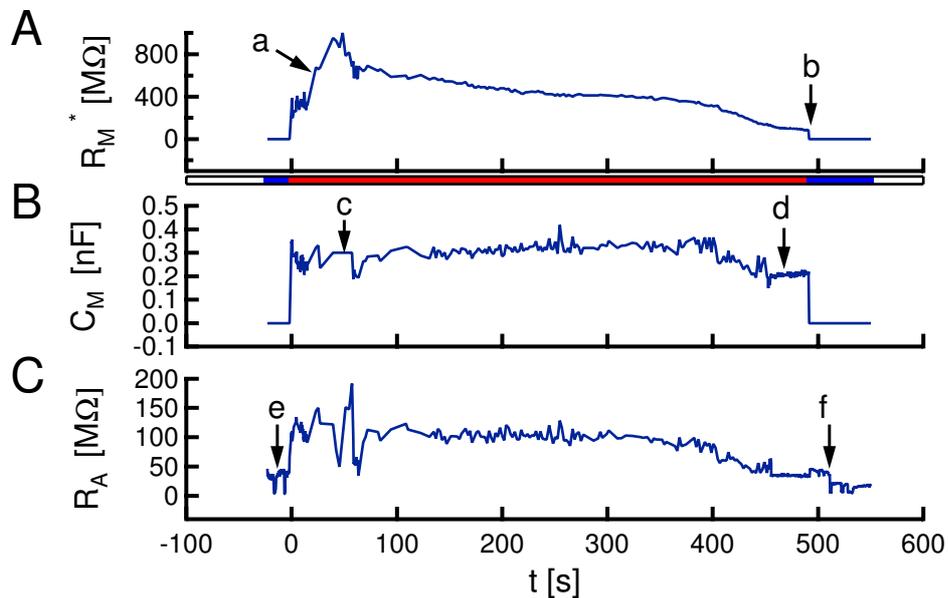


Abbildung 2.38: Verlaufsanalyse von Messung B2 mit Aminosilan-beschichteter Pipette. **A:** Zu Beginn steigt R_M^* von 330 $M\Omega$ auf 1 G Ω (a). Einem schnellen Abfall auf 650 $M\Omega$ folgt ein langsamerer auf 80 $M\Omega$ bis $t = 490$ s (b). **B:** $C_M \approx 0.3$ nF bis $t = 400$ s. Danach sinkt sie auf 0.2 nF (d) ab. Bei (c) wird C_M auf 0.3 nF konstant gehalten. **C:** R_A beträgt 40 $M\Omega$ und steigt beim Anstechen ($t = 0$ s) auf 110 $M\Omega$ an. Injektionen vor (e) und nach dem Ende (f) des Membran-Pipetten-Kontakts erniedrigen R_A .

lang zu einem Einbrechen von R_A auf bis zu $3\text{ M}\Omega$. Danach steigt R_A wieder auf $30\text{ M}\Omega$.

Messung B2: Der effektive Membranwiderstand R_M^* liegt unmittelbar nach dem Anstechen für 15 s bei durchschnittlich $330\text{ M}\Omega$. Anschließend steigt er innerhalb von 33 s auf $1000\text{ M}\Omega$. Es folgt ein schneller Abfall in 11 s auf $650\text{ M}\Omega$. Das weitere Absinken von R_M^* auf $80\text{ M}\Omega$ dauert dagegen bis $t = 490\text{ s}$. Dabei wird die $500\text{ M}\Omega$ Grenze bei $t = 170\text{ s}$ unterschritten. Die Membrankapazität C_M liegt bis $t = 400\text{ s}$ konstant bei durchschnittlich 0.3 nF . Zwischen $t = 40\text{ s}$ und $t = 55\text{ s}$ musste sie kurzzeitig auf 0.3 nF konstant gehalten werden, da für diesen Zeitraum die Amplitude der Strompulse mit 10 pA zu gering gewählt wurde. Nach $t = 400\text{ s}$ sinkt C_M innerhalb von 50 s langsam auf 0.2 nF ab. Die Größe des Vesikels verändert sich währenddessen kaum. Der Zugangswiderstand R_A liegt vor dem Anstechen bei $40\text{ M}\Omega$. Zwei Testinjektionen senken ihn kurzfristig auf $3\text{ M}\Omega$ ab. Beim Einstechen springt R_A auf $110\text{ M}\Omega$. Während der Phase mit den zu niedrigen Strompulsen von $t = 40\text{ s}$ bis $t = 55\text{ s}$ ist die Bestimmung von R_A sehr ungenau. Bis zum Ende des Kontakts sinkt R_A wieder auf $40\text{ M}\Omega$ ab. Danach führen drei Injektionen noch einmal zu kurzfristigen Absenkungen auf $5\text{ M}\Omega$.

Ergebnis und Diskussion:

- Von insgesamt 45 Versuchen konnte in 60 Prozent aller Fälle ein Membran-Pipetten-Kontakt hergestellt werden. Bei einem der 27 erfolgreichen Experimente konnte als Maximalwert des effektiven Membranwiderstands R_M^* ein Wert von $1550\text{ M}\Omega$ ermittelt werden. Dies ist eine deutliche Steigerung gegenüber den bei Dimethyldichlorsilan-beschichteten Pipetten erreichten $930\text{ M}\Omega$. Auch die durchschnittliche Dauer des Seals wurde auf 237 s erhöht. Die drei längsten messbaren Kontakte besaßen zwar nur Maximalwerte von $110\text{ M}\Omega$, $240\text{ M}\Omega$ und $920\text{ M}\Omega$, kamen aber auf Zeitdauern von 990 s , 940 s und 860 s .
- Es existieren hochohmige Messungen, die keinen schnellen Abfall von R_M^* zu Beginn der Messung besitzen (siehe Messung B1).

2.4.5 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Hauptnachteil der Beschichtung von Pipetten mit Aminosilan ist der lange und aufwendige Prozess. Mit Poly-L-Lysin wurde hier eine praktischere Alternative gefunden, die auf demselben Grundprinzip beruht. In wässriger Umgebung ist Poly-L-Lysin ebenfalls protoniert und trägt dadurch viele positive Ladungen. Abbildung 2.39 zeigt die Anlagerung von Poly-L-Lysin Ketten an Glasoberflächen. Verwendet man auch hier Vesikel mit den Bestandteilen POPC, DOPME und DiI (Molverhältnis $200:2:1$), so trägt die Membranaußenseite wieder negative Ladungen. Es kommt zu einer starken elektrostatischen Anziehung zwischen beschichteter Pipette und Vesikelmembran. Dass mit Poly-L-Lysin sehr enge Kontakte zwischen Vesikelmembranen und oxidierten Siliziumchips hergestellt werden können, zeigten auch schon die Messungen von G. Zeck und V. Kießling [Fro99, Kie99]. Bei flächiger Adhäsion kam es zu Abständen von $d = 1.1\text{ nm}$ und Schichtwiderständen von $r_J = 130\text{ G}\Omega$. Allerdings handelt es sich beim Membran-Pipetten-Kontakt um eine völlig andere Geometrie.

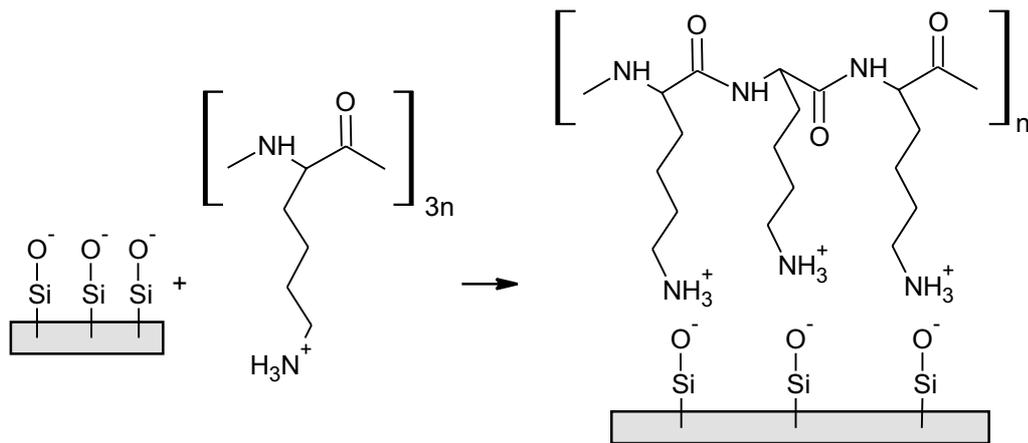


Abbildung 2.39: Anlagerung von Poly-L-Lysin an eine Glasoberfläche in wässriger Lösung. Die negativen Hydroxyl-Gruppen des Glases ziehen die positiv geladene Aminogruppen des Poly-L-Lysins an.

Prozessführung:

Eine Beschichtung der Pipetten mit Poly-L-Lysin ist ohne die Verwendung des Druckhalters nicht möglich. Pipetten ohne erhöhten Innendruck verstopfen schon nach wenigen Minuten in der Beschichtungslösung.

Zu Beginn des Beschichtungsprozesses wurden die Pipetten im Druckhalter auf 34 bar gesetzt. Um sie einerseits zu reinigen und andererseits ihre Durchlässigkeit zu testen, wurden sie für 30 Minuten in 100 ml Reinstwasser getaucht. Danach fand ein rascher Wechsel zur eigentlichen Beschichtungslösung statt. Hierbei handelte es sich um 100 ml einer wässrigen Poly-L-Lysin Lösung (P-6516, $MW = 4000 - 15000$, Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$. Nach 60 bis 90 Minuten wurden die Pipetten aus der Lösung gezogen. Bei der einen Hälfte der Experimente wurde danach eine 1 bis 10 minütige Spülung mit Reinstwasser vorgenommen, bei der anderen Hälfte wurden die Pipetten sofort ungespült an der Luft getrocknet. Nach dem Ablassen des Drucks sollten die Pipetten bis zum Experiment in einer möglichst staubfreien Umgebung aufbewahrt werden, da sie im beschichteten Zustand den Staub stärker anziehen. Teilweise konnte der angelagerte Staub unter dem Mikroskop kurz vor dem Einstechen an den Säulen ohne negative Folgen für den Membran-Pipetten-Kontakt abgestriffen werden.

Detaillierte Beschreibung von Messungen:

Wie bei den anderen beiden Beschichtungsmethoden wurden auch hier zwei Messungen mit anfänglich hohem Membranwiderstand R_M^* und längerer Dauer ausgewählt. In Abbildung 2.40 ist der Fit einer einzelnen Messkurve aus der ersten Messung dargestellt. Abbildung 2.41 und Abbildung 2.42 zeigen den zeitlichen Verlauf der aus den Fits gewonnenen Parameter.

Messung C1: Beim Berühren des Vesikels bildet sich ein cell-attached Zustand mit $1 \text{ G}\Omega$, der aber nur von kurzer Dauer ist, da die Membran rasch durchbrochen wird. Unmittelbar nach dem Einstechen ist auch in dieser Messung aufgrund der kurzen Strompulse für 9s keine genaue Bestimmung des effektiven Membranwiderstands

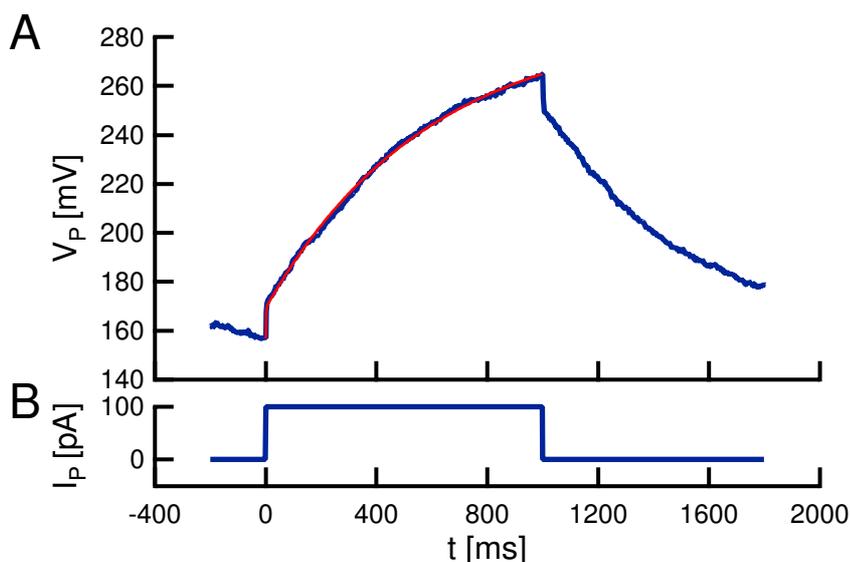


Abbildung 2.40: Spannungsantwort $V_P(t)$ auf einen vorgegebenen Strompuls $I_P(t)$. Zum Anstechen wurde eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Pipette verwendet. Dieser nicht korrigierte Testpuls wurde Messung C1 entnommen. Durch Anfitzen der Aufladung (Messung: blau, Fit: rot) lassen sich die Membran- und Pipettenparameter bestimmen. Bei konstanten $C_S = 10 \text{ pF}$ ergeben sich hier $R_M^* = 1170 \text{ M}\Omega$, $C_M = 0.49 \text{ nF}$ und $R_A = 130 \text{ M}\Omega$

R_M^* möglich. Erst beim Anlegen längerer Pulse wird als maximaler Wert $1220 \text{ M}\Omega$ ermittelt. Danach fällt R_M^* langsam bis $t = 1285 \text{ s}$ auf $70 \text{ M}\Omega$ ab. Hier endet der Kontakt. Bei diesem langsamen Abfall wird die $500 \text{ M}\Omega$ Marke erst bei $t = 210 \text{ s}$ unterschritten. Die Membrankapazität C_M liegt durchgehend bei durchschnittlich 0.48 nF , bis sie dann bei $t = 1136 \text{ s}$ auf 0.31 nF absinkt. Nach einer Injektion bei $t = 1270 \text{ s}$ stellt sich wieder ein Wert von 0.44 nF ein. Der Zugangswiderstand R_A der Pipette liegt vor dem Anstechen bei $50 \text{ M}\Omega$. Eine Testinjektion lässt ihn kurz auf $14 \text{ M}\Omega$ absinken. Unmittelbar nach dem Anstechen erreicht er $150 \text{ M}\Omega$, um dann langsam auf $100 \text{ M}\Omega$ abzusinken. Gleichzeitig mit dem Kapazitätsabfall bei $t = 1136 \text{ s}$ steigt R_A sprunghaft auf $140 \text{ M}\Omega$. Dieser Anstieg geht langsam bis $190 \text{ M}\Omega$ weiter, wird aber durch die Injektion bei $t = 1270 \text{ s}$ abgebrochen. Diese führt zu einem Abfall auf $20 \text{ M}\Omega$, dem ein Wiederanstieg auf $70 \text{ M}\Omega$ folgt.

Messung C2: Zu Beginn ist die Bestimmung des effektiven Membranwiderstandes R_M^* bis $t = 8 \text{ s}$ sehr ungenau. Durchschnittlich werden hier $1160 \text{ M}\Omega$ erreicht. Nach dem Anlegen längerer Pulse fällt R_M^* bis $t = 78 \text{ s}$ unter $500 \text{ M}\Omega$, steigt nach einem lokalen Minimum von $400 \text{ M}\Omega$ bei $t = 93 \text{ s}$ wieder auf $560 \text{ M}\Omega$ bei $t = 111 \text{ s}$, um bei $t = 150 \text{ s}$ plötzlich auf $320 \text{ M}\Omega$ abzufallen. Der Kontakt endet nach $t = 212 \text{ s}$ mit $220 \text{ M}\Omega$. Die Membrankapazität C_M liegt während der gesamten Messung bei durchschnittlich 0.16 nF . Der Zugangswiderstand R_A liegt vor dem Anstechen bei $56 \text{ M}\Omega$. Während er beim Berühren des Vesikels nur auf $120 \text{ M}\Omega$ ansteigt, erreicht er kurz nach dem Eindringen bis zu $250 \text{ M}\Omega$. Nach einem schnellen Abfall auf $140 \text{ M}\Omega$ innerhalb von 5 s fällt er anschließend bis zum Ende des Experiments langsam auf $80 \text{ M}\Omega$ ab.

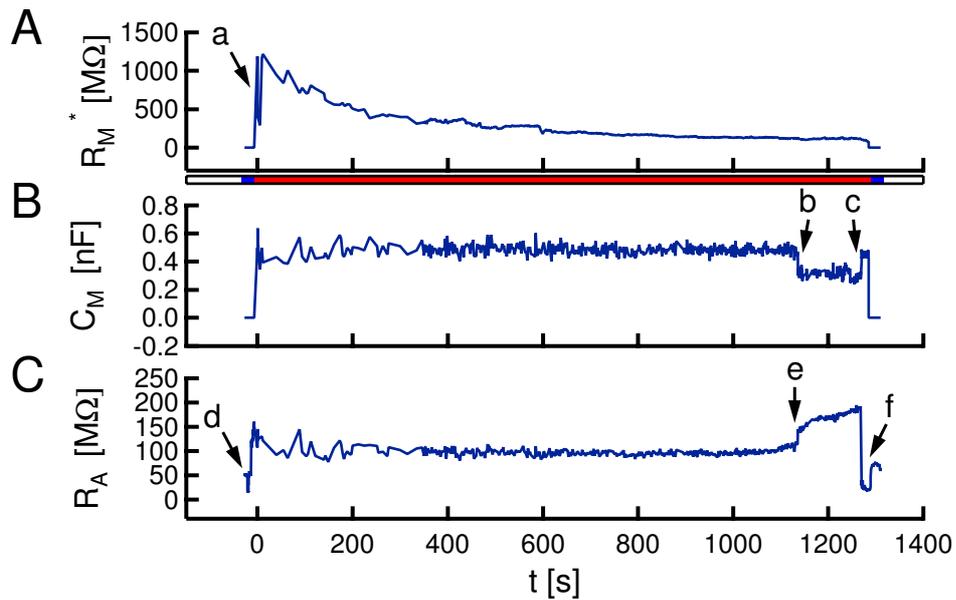


Abbildung 2.41: Verlaufsanalyse von Messung C1 mit Poly-L-Lysin-beschichteter Pipette. **A:** Zu Beginn ist die Bestimmung von R_M^* ungenau (a). Er sinkt in 210 s von 1220 M Ω auf 500 M Ω und bis $t = 1285$ s auf 70 M Ω . **B:** C_M liegt bis auf den Einbruch auf 0.31 nF zwischen (b) und (c) bei 0.48 nF. **C:** R_A steigt beim Anstechen ($t = 0$ s) von 50 M Ω auf 150 M Ω an. Injektionen vor (d) und am Ende (f) des Membran-Pipetten-Kontakts erniedrigen R_A . Bei (e) springt R_A von 100 M Ω auf 140 M Ω .

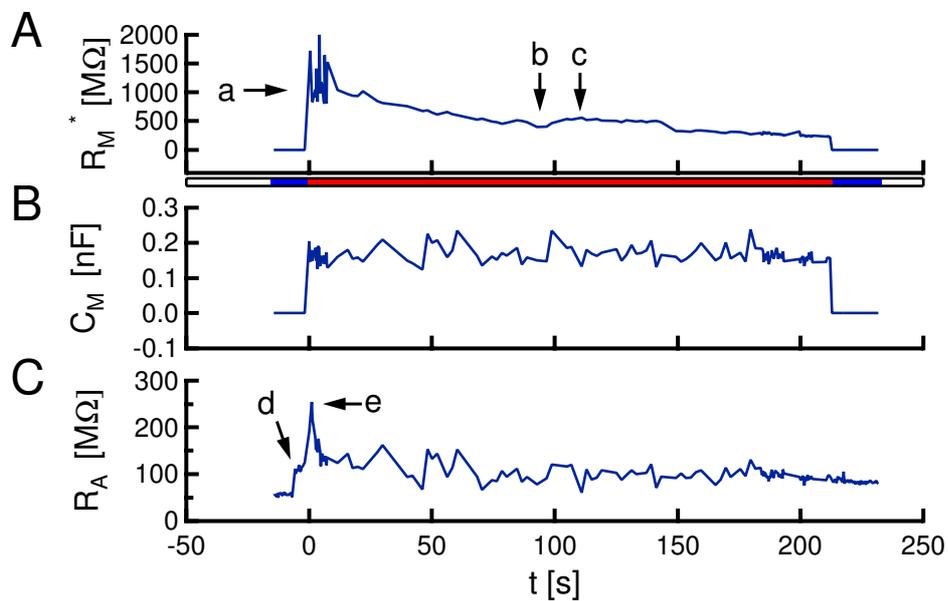


Abbildung 2.42: Verlaufsanalyse von Messung C2 mit Poly-L-Lysin-beschichteter Pipette. **A:** Zu Beginn ist die Bestimmung von R_M^* ungenau (a). Er sinkt in 93 s von 1160 M Ω auf 400 M Ω (b) und erreicht mit 560 M Ω ein zweites Maximum (c). **B:** $C_M \approx 0.16$ nF. **C:** R_A steigt beim Berühren von 56 M Ω auf 120 M Ω an (d). Nach dem Anstechen wächst er bis auf 250 M Ω (e).

Ergebnis und Diskussion:

- Beim Anstechen von Riesenvesikeln mit Poly-L-Lysin beschichteten Pipetten wurden 35 Versuche ohne Spülung und 42 Versuche mit Spülung vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass die Erfolgsquote ohne Spülung mit 66 Prozent gegenüber der mit Spülung mit 60 Prozent leicht erhöht war. Der Unterschied zu den Erfolgsquoten der anderen beiden Beschichtungsmethoden ist gering. Das erfolgreichste Experiment hatte einen maximalen effektiven Membranwiderstand R_M^* von 1220 M Ω und dauerte 1285 s (Messung C1). Allerdings war die durchschnittliche Dauer aller Experimente mit 170 s deutlich kürzer als bei den Versuchen mit Aminosilan-Beschichtung.
- In einer der gezeigten Messungen (C1) sinkt die Membrankapazität zeitweise von 0.5 nF auf 0.3 nF ab. In einer Videoaufnahme, die parallel zur Messung aufgezeichnet wurde, ist die Bildung eines kleinen Vesikels im Inneren zu erkennen. Eventuell dichtet sich dieser zweite Vesikel gegenüber der Pipette ab und die Serienschaltung der beiden Membranen verursacht eine Erniedrigung der gefitteten Kapazität. Die Injektion zerstört den kleinen Vesikel und führt zur ursprünglichen Kapazität.

**2.4.6 Poly-L-Lysin-Beschichtung:
Abwechselnde Puls- und Lock-In-Messungen**

An angestochenen Riesenvesikeln auf Chips wurden intrazelluläre Lock-In-Messungen (LIM) vorgenommen. Als Pipettenbeschichtung wurde dabei immer Poly-L-Lysin verwendet. Diese Wahl wird in Kapitel 2.4.7 genau begründet. In diesem Kapitel wird nun zunächst der zeitliche Verlauf des Membran-Pipetten-Kontakts zwischen den Lock-In-Messungen betrachtet. Dieser konnte genau wie bisher anhand von Strompulsen kontrolliert werden. Sobald sich nach dem Anstechen ein dichter Kontakt einstellte, wurde eine Lock-In-Messung gestartet. Dabei schaltete die Apparatur automatisch von current clamp auf voltage clamp um. Nacheinander wurden an die Pipette Wechselspannungen V_P mit 26 bis 41 verschiedenen Frequenzen angelegt. Die resultierenden Amplituden der Membranspannung V_M lagen dabei bei circa 200 mV. Über einen speziellen Lock-In-Verstärker wurde mit Feld-Effekt-Transistoren gleichzeitig das Spannungssignal im Spalt zwischen Vesikel und Chip gemessen. Einzelheiten über den Messaufbau und die Ergebnisse findet sich in Kapitel 3.5. Nach dem Ende der Lock-In-Messung schaltete die Apparatur wieder auf current clamp um und applizierte weitere Strompulse über die Pipette auf die Vesikelmembran. War der Membran-Pipetten-Kontakt noch intakt, konnten weitere Lock-In-Messungen gestartet werden. Je nach Beschaffenheit des Kontakts konnten sie bis zu 16 Mal wiederholt werden.

Detaillierte Beschreibung von Messungen:

Analog zu den vorhergegangenen Kapiteln sollen hier zwei ausgewählte Messungen mit hohem Membranwiderstand R_M^* gezeigt werden. In Abbildung 2.43 ist der Fit einer einzelnen Messkurve aus der ersten Messung dargestellt. Abbildung 2.44 und Abbildung 2.45 zeigen den zeitlichen Verlauf der aus den Messungen gewonnenen Fit-Parameter. Die Zeitbereiche, in denen aufgrund der Lock-In-Messungen keine Werte bestimmt werden konnten, sind in den Graphen grau schattiert.

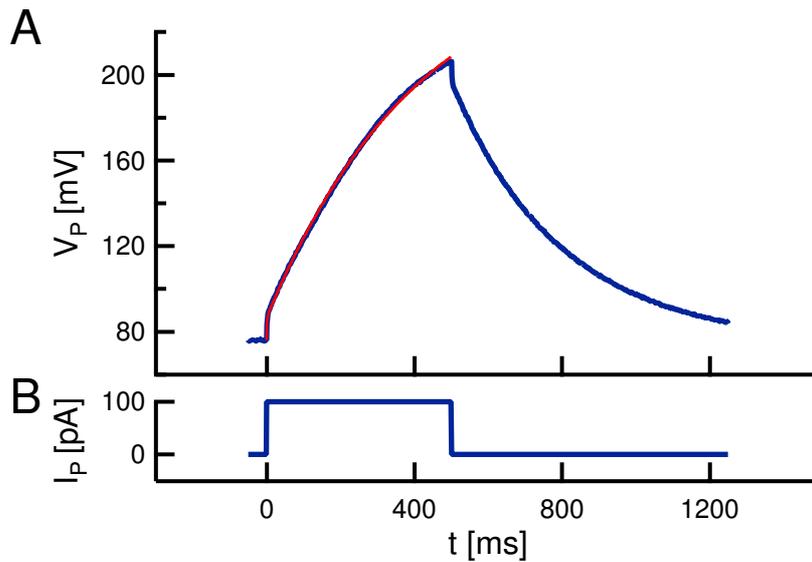


Abbildung 2.43: Spannungsantwort $V_P(t)$ auf einen vorgegebenen Strompuls $I_P(t)$ nach dem zweiten Anstechversuch. Zum Kontaktieren wurde eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Pipette verwendet. Dieser nicht korrigierte Testpuls wurde Messung D2 entnommen. Durch Anfitzen der Aufladung (Messung: blau, Fit: rot) lassen sich die Membran- und Pipettenparameter bestimmen. Bei konstanten $C_S = 10$ pF ergeben sich hier $R_M^* = 1740$ M Ω , $C_M = 0.23$ nF und $R_A = 112$ M Ω .

Messung D1: Beim ersten Anstechversuch verschwindet der nach einem negativen Buzz erzielte effektive Membranwiderstand R_M^* von 1480 M Ω schon nach der ersten Lock-In-Messung. Durch Bewegen der Pipette konnte danach zunächst wieder ein schwacher Kontakt von 170 M Ω hergestellt werden. Als nach 24 s dieser Kontakt abbrach, wurde ein zweiter Versuch unternommen, in den Vesikel einzudringen. Nach einem cell-attached Zustand mit 6 G Ω gelang dies erneut mit einem negativen Buzz. Es konnte ein Wert von bis zu 1320 M Ω zuverlässig ermittelt werden. Im Laufe der folgenden 1847 s sank R_M^* kontinuierlich bis zum Ende der Messung auf 240 M Ω . Währenddessen wurden zehn Lock-In-Messungen vorgenommen. Erstaunlicherweise sank R_M^* nach den einzelnen Lock-In-Messungen um durchschnittlich 150 M Ω , konnte sich aber in 70 Prozent der Fälle wieder um durchschnittlich 60 M Ω erholen. Nach der neunten Lock-In-Messung kam es sogar zu einem kurzzeitigen Verschwinden des Kontakts. Beim Betrachten der Membrankapazität C_M fallen die unterschiedlichen Werte beim ersten und zweiten Versuch auf. Während sich beim ersten Kontakt durchschnittlich 0.33 nF ergaben, veränderte sich der Wert auf 0.87 nF nach dem Bewegen der Pipette und auf 0.65 nF beim zweiten Versuch. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Der Zugangswiderstand R_A stieg beim ersten Versuch von 270 M Ω auf 550 M Ω . Nach dem Buzz lag er im zweiten Versuch bei 230 M Ω . Die Lock-In-Messungen hoben den ansonsten stetig sinkenden R_A an. Der Endwert lag mit 160 M Ω unter dem Anfangswert. Auch hier konnte keine plausible Erklärung gefunden werden.

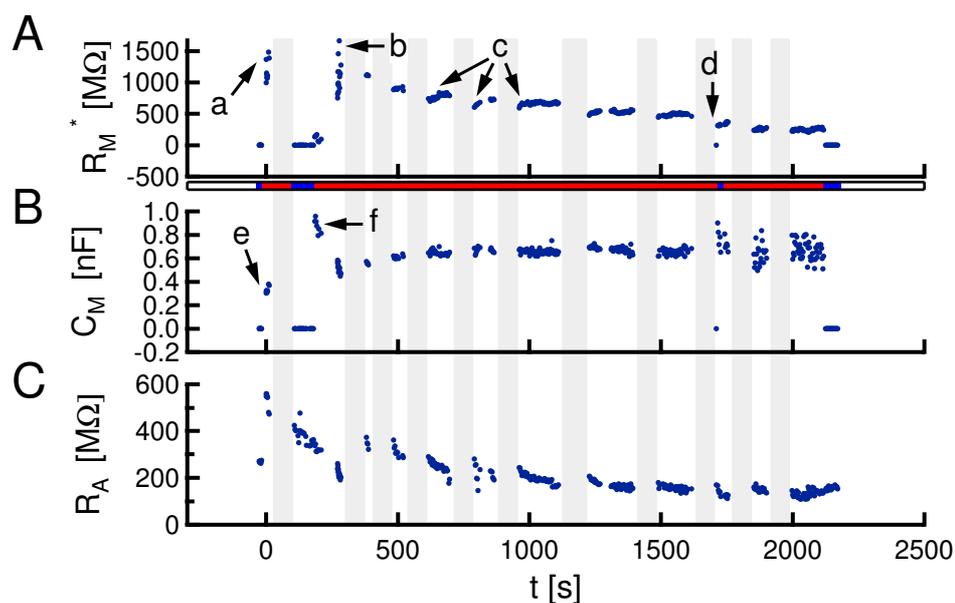


Abbildung 2.44: Verlaufsanalyse von Messung D1 mit Poly-L-Lysin-beschichteter Pipette. Graue Bereiche entsprechen Lock-In-Messungen (LIM). **A:** Der erste Kontakt (**a**) wird durch eine LIM zerstört. Beim Zweiten (**b**) erholt sich R_M^* nach den einzelnen LIM wieder (**c**), sogar nach einem vollständigen Zusammenbruch (**d**). **B:** 1. Versuch: $C_M = 0.33$ nF (**e**) nach dem Bewegen 0.87 nF (**f**), 2. Versuch: $C_M = 0.65$ nF. **C:** Die LIM heben den abfallende R_A an.

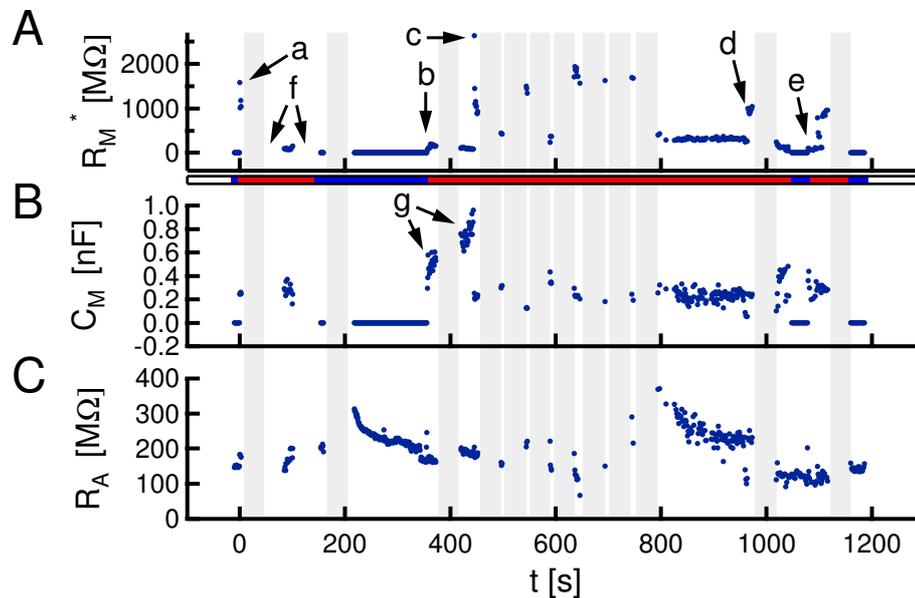


Abbildung 2.45: Verlaufsanalyse von Messung D2 mit Poly-L-Lysin-beschichteter Pipette. Graue Bereiche entsprechen Lock-In-Messungen (LIM). **A:** Der erste Kontakt (**a**) endet mit einer Verstopfung der Pipette (**f**). Der Zweite (**b**) wird zweimal durch Bewegen verbessert (**c**, **d**). Der Dritte (**e**) endet nach einer LIM. **B:** $C_M = 0.25$ nF bis auf den Anstieg von 0.3 nF auf 0.9 nF (**g**). **C:** Einige LIM erhöhen den meist abfallenden R_A .

Messung D2: Diese Messung wurde ausgewählt, da mit einer Pipette derselbe Vesikel drei Mal erfolgreich angestochen wurde. Während des zweiten Versuchs konnte außerdem zweimal eine Verbesserung des Membran-Pipetten-Kontakts durch Bewegung der Pipette erzeugt werden. Der effektive Membranwiderstand R_M^* zeigte beim ersten Anstechversuch einen sprunghaften Anstieg auf durchschnittliche $1200\text{ M}\Omega$. Die nach 2 s ausgelöste erste Lock-In-Messung führte aber zu einer Verstopfung der Pipette, die erst wieder durch einen negativen Buzz beseitigt werden konnte. Beim erneuten Einstechen bei $t = 356\text{ s}$ wurde nach dem Eindringen ein maximaler R_M^* von $190\text{ M}\Omega$ erreicht. Erst das vorsichtige Herausziehen der Pipette führte schließlich zu einem besseren Kontakt von $2600\text{ M}\Omega$, der allerdings innerhalb von 7 s auf $880\text{ M}\Omega$ abfiel. Die folgenden Lock-In-Messungen führten zu großen Schwankungen des effektiven Membranwiderstandes R_M^* . Werte zwischen $230\text{ M}\Omega$ und $1900\text{ M}\Omega$ lassen bei dieser Messung auf eine starke Beeinflussung des Membran-Pipetten-Kontakts durch die Lock-In-Messungen schließen. Sowohl eine Zerstörung als auch eine Heilung schien möglich zu sein. Nach der insgesamt zehnten Lock-In-Messung blieb R_M^* auf einem Plateau von $310\text{ M}\Omega$. Erst ein erneutes Bewegen der Pipette zum Zeitpunkt $t = 964\text{ s}$ führte zu einer erneuten Verbesserung auf $1000\text{ M}\Omega$, die aber durch eine sofort folgende Lock-In-Messung wieder zunichte gemacht wurde. Der zweite Kontakt endete dann auch rasch nach weiteren 23 s . Er dauerte insgesamt 686 s . Auch der dritte Anlauf bei $t = 1079\text{ s}$ brachte einen hohen R_M^* mit sich. Allerdings fand hier anstatt einer sprunghaften Verbesserung wie in den beiden ersten Versuchen eine langsame Heilung statt. Innerhalb von 37 s wuchs R_M^* von $60\text{ M}\Omega$ auf $960\text{ M}\Omega$ an. Die zwölfte und letzte Lock-In-Messung zerstörte auch diesen Kontakt. Für die Membrankapazität C_M ergibt sich als Durchschnittswert 0.25 nF . Nicht beachtet wurde dabei der unerklärliche Anstieg von 0.3 nF auf 0.9 nF im Bereich zwischen $t = 356\text{ s}$ und $t = 443\text{ s}$. Der Zugangswiderstand R_A betrug vor dem Anstechen $150\text{ M}\Omega$. Durch den ersten Anstechversuch stieg er auf $180\text{ M}\Omega$. Bei den beiden späteren Anläufen gab es dagegen im Moment der Kontakte keine Erhöhungen von R_A . Obwohl das übrige Verhalten von R_A auf den ersten Blick chaotisch wirkt, ist tendenziell ein Absinken zu erkennen. Die Lock-In-Messungen schienen dagegen häufig R_A kurzzeitig zu erhöhen. Wie in Messung D1 wurden teilweise Zugangswiderstände unter dem Anfangswert ermittelt.

Ergebnis und Diskussion:

- Die Lock-In-Messungen waren die erste Anwendung der elektrischen Kontaktierung von Riesenvesikeln mit Hilfe von Poly-L-Lysin beschichteten Pipetten. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Erfolgsquote beim Anstechen deutlich höher lag als bei der eigentlichen Entwicklung der Methode (siehe Kapitel 2.4.5). Von den 43 betrachteten Experimenten waren 35 erfolgreich. Damit lag die Wahrscheinlichkeit, einen Membran-Pipetten-Kontakt herzustellen, mit 81 Prozent deutlich über den vorher ermittelten 66 Prozent für ungespülte Poly-L-Lysin Pipetten. Außerdem stieg die durchschnittliche Dauer der Kontakte von 170 s auf 513 s . Der höchste ermittelte Wert für den effektiven Membranwiderstand lag bei $1890\text{ M}\Omega$.
- Bei den Messungen fiel auf, dass der Membran-Pipetten-Kontakt durch die einzelnen Lock-In-Messungen beeinflusst wurde. Sowohl die Zerstörung als auch die Verbesse-

rung von Kontakten kam vor. Verständlich wird dies bei Berücksichtigung der relativ hohen Wechsellspannungsamplituden um die $V_M = 200$ mV. Desweiteren liegen die in den Lock-In-Messungen vorkommenden Frequenzen teilweise in derselben Größenordnung wie die bei der Herstellung der Riesenvesikel verwendeten.

Mögliche Gründe für die verbesserte Erfolgsquote:

1. In den betrachteten Lock-In-Messungen wurde PB-Puffer mit einem spezifischen Widerstand von $\rho = 23$ k Ω cm verwendet. Dadurch sollte der Kontakt zum Chip verbessert werden. Die Messungen in Kapitel 2.4.5 wurden dagegen mit PA-Puffer mit $\rho = 250$ Ω cm durchgeführt. Falls die Leitfähigkeit der Membranlecks durch den äußeren Elektrolyten bestimmt wird, würde dieser Unterschied direkt zu höheren effektiven Membranwiderständen R_M^* führen. Denkbar wäre allerdings auch, dass aufgrund der Oberflächenspannung des Vesikels durch Löcher in der Membran immer die Füllung aus dem Inneren herausströmt. Damit würde der Leckwiderstand von der Leitfähigkeit des Vesikelinneren abhängen.
2. Bei den Lock-In-Messungen wurde systematisch versucht, Vesikel ein zweites oder drittes Mal anzustechen, falls beim ersten Versuch kein ausreichender Membran-Pipetten-Kontakt erreicht werden konnte. Dies funktionierte bei vielen Vesikeln, obwohl die Pipettenspitzen durch den ersten Versuch mit Lipidresten verschmutzt waren. Zurückzuführen ist dies entweder auf die starke Ladung des Poly-L-Lysins, die nicht durch die Reste abschirmbar ist, oder auf ein erneutes Fusionieren des Lipids mit dem Vesikel.
3. Die Vesikel wurden zwischen 2 und 12 Stunden vor den Experimenten in PB-Puffer umgesetzt. Deshalb war der osmotische Ausgleich eventuell weiter fortgeschritten als bei den früheren Experimenten. Dort lagerten sie zuerst in Glucoselösung und wurden erst kurz vor den Experimenten in PA-Puffer umgesetzt.

2.4.7 Fazit

Unmittelbar nach der Erprobung der drei verschiedenen Beschichtungsmethoden musste entschieden werden, welche für die Lock-In-Messungen auf Chips am Besten geeignet ist. Zur Wahl standen die drei oben beschriebenen Reagenzien Dimethyldichlorsilan, Aminosilan und Poly-L-Lysin. Letztendlich wurde, wie schon in Kapitel 2.4.6 genauer beschrieben, Poly-L-Lysin ausgewählt. Einen Überblick über die erzielten Erfolgsquoten, Zeitdauern und maximalen effektiven Membranwiderstände gibt Tabelle 2.4.7.

Interessanterweise wiesen alle drei Beschichtungsmethoden in der Erprobungsphase eine ähnliche Erfolgsquote von circa 60 Prozent auf. Gegenüber einer Quote von 20 Prozent bei unbeschichteten Pipetten war das ein immenser Fortschritt. Sowohl Aminosilan- als auch Poly-L-Lysin-beschichtete Pipetten zeigten im Gegensatz zu Dimethyldichlorsilan-beschichteten Pipetten in einigen Einzelfällen maximale effektive Membranwiderstände R_M^* von über 1 G Ω sowie Gesamtdauern über 900 s. Bei beiden Methoden konnte sich R_M^* in einigen Experimenten über 200 s lang über 500 M Ω halten. Dies sind zwar im Vergleich zu gepatchten Zellen geringe Werte, für die Verwendung in intrazellulären Lock-In-Messungen reichen sie aber dennoch aus. Obwohl die durchschnittliche Dauer bei den Aminosilan-Experimenten 1 min länger war, fiel die Entscheidung dennoch zugunsten

Beschichtung	Anzahl	Erfolgsquote [%]	maximaler R_M^* [M Ω]	durchschnittliche Dauer [s]	maximale Dauer [s]
keine Beschichtung	45	20	430	66	120
Dimethyldichlorsilan	52	58	930	175	730
Aminosilan	45	60	1550	237	990
Poly-L-Lysin	77	62	1220	170	1285
LIM: Poly-L-Lysin	43	81	1890	513	1847

Tabelle 2.2: Alle drei Beschichtungsmethoden sowie die abschließenden Lock-In-Messungen (LIM) im Überblick.

des Poly-L-Lysin aus. Ausschlaggebend war die deutlich einfachere und kürzere Prozessführung. Außerdem weist das in Kapitel 2.5 beschriebene viel stärkere und häufigere Spreading der Lipidmembran auf den Pipetten bei der Poly-L-Lysin Beschichtung auf eine stärkere Anziehung der Membran durch die Pipetten hin. Dass die Entscheidung richtig war, zeigte sich in den Chipmessungen durch eine deutlich gesteigerte Erfolgsquote von 81 Prozent, einen erhöhten maximalen effektiven Membranwiderstand R_M^* und größere Zeitdauern. Wie in Kapitel 2.4.6 genauer beschrieben, können dafür mehrere Gründe verantwortlich sein. Abbildung 2.46 stellt die Häufigkeitsverteilung der maximalen effektiven Membranwiderstände R_M^* sowie der Zeitdauern der Membran-Pipetten-Kontakte für die unterschiedlichen Beschichtungen und die Lock-In-Experimente dar.

Auffallend bei den ersten drei Reihen **A-C** in Abbildung 2.46 ist die massive Häufung von Experimenten mit maximalen effektiven Membranwiderständen R_M^* unter 100 M Ω und Zeitdauern unter 200 s. Für Lock-In-Messungen auf Chips sind kurze Kontakte aber ungeeignet, da ihre Dauer bei einer Minute liegt. Dies relativiert die oben angegebenen Erfolgsquoten für die verschiedenen Methoden erheblich. Zusätzlich soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die dargestellten Widerstände Maximalwerte der Messungen sind. Sie traten meist zu Beginn der Experimente auf und fielen rasch ab. Die erfolgreicher Lock-In-Messungen selber wurden dann auch in den stabileren Bereichen der Kontakte zu späteren Zeitpunkten durchgeführt. Genauere Angaben zu diesem Thema folgen in Kapitel 3.5.

Bestimmung spezifischer Membranparameter:

Mit der an der Apparatur angeschlossenen CCD-Kamera wurde jedes Experiment per Video oder wenigstens als Photo festgehalten. Es war somit möglich, durch Vermessung der Bilder den Radius a_V aller kontaktierter Vesikel zu bestimmen. Daraus wiederum konnte die Oberfläche der Vesikel mit $A_M = 4\pi a_V^2$ ermittelt werden. Unter der Annahme, dass ein angestochener Vesikel kein Leck aufweist, ist $R_M = R_M^*$. Aus dem gemessenen Membranwiderstand R_M und der Membrankapazität C_M kann dann auf die entsprechenden spezifischen Parameter $r_M = R_M A_M$ und $c_M = C_M / A_M$ geschlossen werden. Ausgewertet wurden alle Experimente mit beschichteten Pipetten außer den Lock-In-Experimenten. Letztere wurden meist an Vesikeln unternommen, die größer als ihre Käfige waren und deshalb keine kugelförmige Gestalt mehr besaßen.

Als maximaler Wert ergab sich für den spezifischen Membranwiderstand $r_M = 0.79 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. Das entspricht einer minimalen spezifischen Membranleitfähigkeit von $g_M = 1/r_M = 1.27 \mu\text{S}/\text{cm}^2$. Das Ergebnis liegt nahe dem von V. Kießling ermittelten

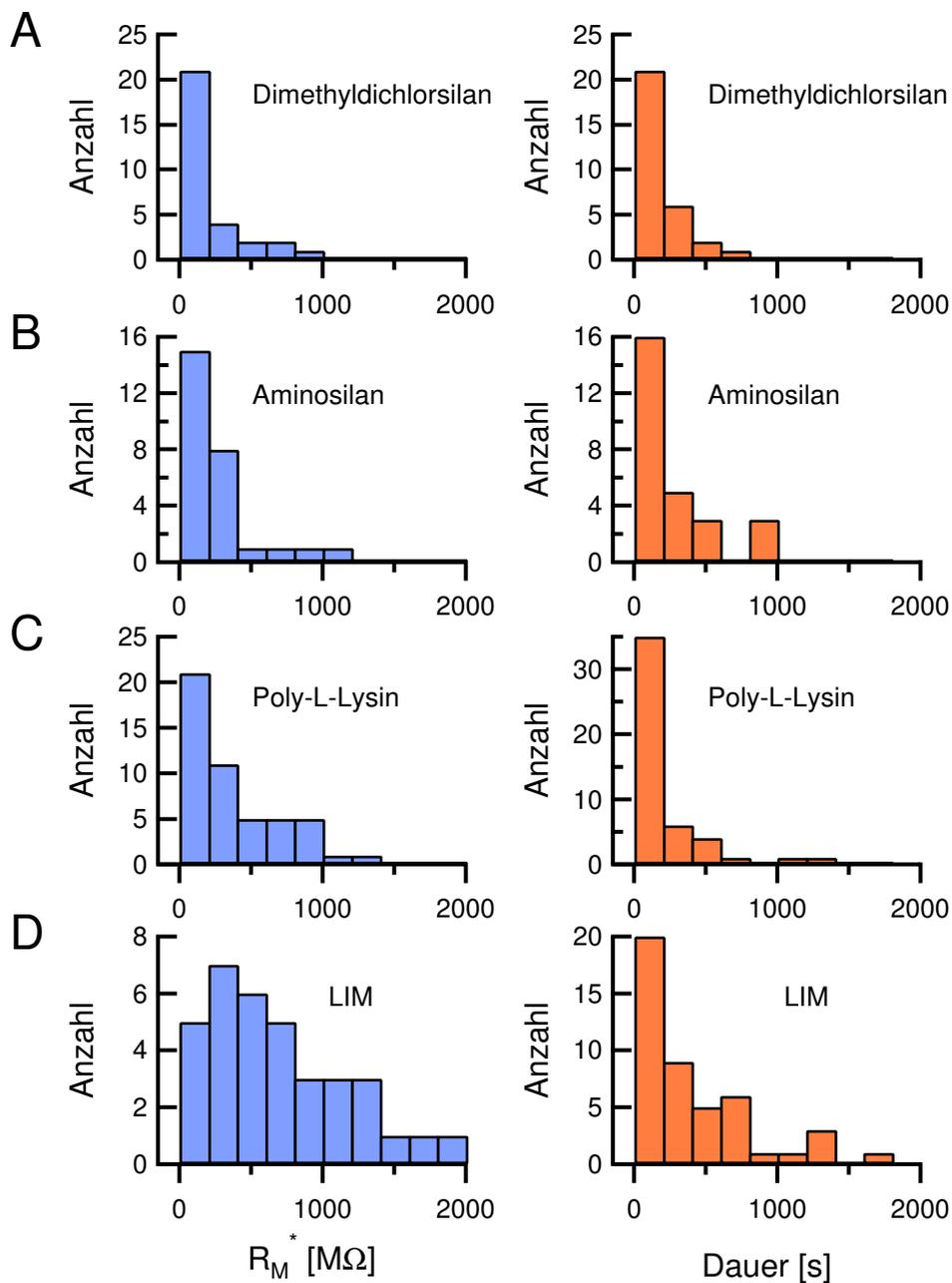


Abbildung 2.46: Verteilung der maximalen effektiven Membranwiderstände R_M^* (links) sowie der Zeitdauern der Membran-Pipetten-Kontakte (rechts) für die unterschiedlichen Beschichtungen (A-C) und die Lock-In-Experimente (D).

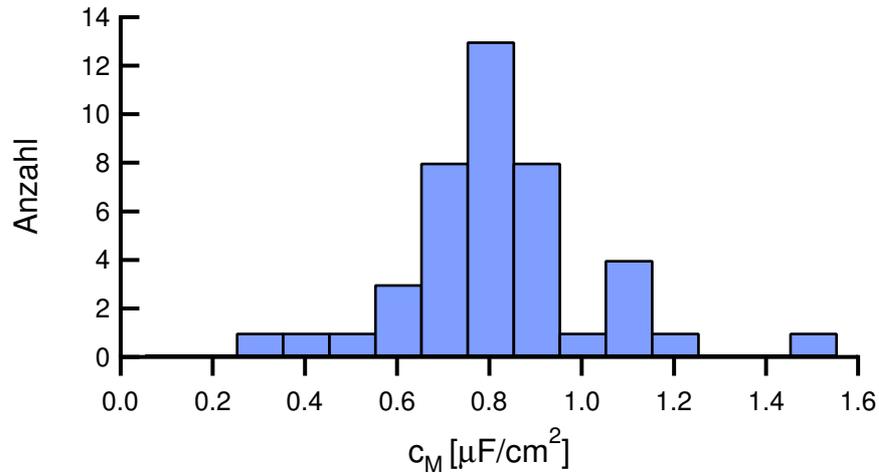


Abbildung 2.47: Verteilung der spezifischen Membrankapazität c_M . Selektiert wurden die Experimente, die einen maximalen effektiven Membranwiderstand von $R_M^* \geq 200 \text{ M}\Omega$ aufwiesen. Außerdem durfte in den Fits die Standardabweichung für R_M^* maximal $10 \text{ M}\Omega$ und die Standardabweichung für C_M maximal 0.002 nF betragen. Als Mittelwert ergab sich $\bar{c}_M = 0.76 \pm 0.21 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Grenzwert von $r_M > 1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ für Vesikelmembranen [Fro99, Kie99].

Zur Bestimmung der spezifischen Membrankapazität c_M wurden aus allen Experimenten mit beschichteten Pipetten diejenigen ausgewählt, die mindestens einen effektiven Membranwiderstand $R_M^* \geq 200 \text{ M}\Omega$ aufwiesen. Außerdem durfte in den Fits die Standardabweichung für R_M^* maximal $10 \text{ M}\Omega$ und die Standardabweichung für C_M maximal 0.002 nF betragen. Hierbei wurde den Fits eine Spannungsungenauigkeit von 0.3 mV zugrunde gelegt. Die 42 selektierten c_M sind in Abbildung 2.47 in einem Histogramm aufgetragen. Als Mittelwert ergibt sich für die spezifische Kapazität einer Vesikelmembran $\bar{c}_M = 0.76 \pm 0.21 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dieser Wert liegt nahe dem für lösungsmittelfreie Lipidmembranen ermittelten Wert von $0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Dam86, Mon72].

2.5 Spreading

Bei der Bildung von Membran-Pipetten-Kontakten ist besonders der Mechanismus der Abdichtung von Interesse. Beim Anstechen von Riesenvesikeln mit beschichteten Pipetten scheint dafür ein bisher unbekanntes Phänomen verantwortlich zu sein.

2.5.1 Ein neuartiger Membran-Pipetten-Kontakt

In vielen Experimenten konnte unmittelbar nach dem Anstechen ein Fließen der Vesikelmembran auf der Außenwand der Pipette beobachtet werden. Dieser erstaunliche Effekt konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmodi des Auflichtmikroskops auf Video aufgenommen werden. Dazu wurde ein Computer mit einer Videoschnitt-Karte (miroVIDEO DC30 plus, Pinnacle Systems, Mountain View, USA) verwendet, die die digitalen Bilddaten mit einem auf MPEG-2 basierenden Verfahren komprimiert.

Das Auftreten dieses Phänomens, auch *Spreading* genannt, ist abhängig von der Art der Beschichtung. Bei der Verwendung von Dimethyldichlorsilan als Beschichtungsreagenz konnte in 15 Prozent aller 52 Experimente diese Bewegung der Membran beobachtet werden. Hierbei zeigten sich allerdings nur geringe Reichweiten von maximal $10\ \mu\text{m}$. Ein wenig weiter flossen die Membranen bei einigen mit Aminosilan beschichteten Pipetten. In 3 von 45 Experimente konnte eine schnellere Ausbreitung mit Entfernungen bis zu $20\ \mu\text{m}$ beobachtet werden. Wahrscheinlich ist hier die anziehende Wirkung der Beschichtung stärker als bei Dimethyldichlorsilan. Die geringe Häufigkeit weist auf die allgemein schlechtere Reproduzierbarkeit von Aminosilanbeschichtungen hin. Am stärksten trat der Effekt bei Poly-L-Lysin beschichteten Pipetten auf. Während der Testphase zeigte er sich in 52 Prozent aller 77 Messungen, bei den späteren Lock-In-Messungen sogar in 77 Prozent von 43 Experimenten. Hier kam es sogar vor, dass die Membran bis zu $300\ \mu\text{m}$ an der Pipette hochgezogen wurde.

Das Hauptproblem bei der Beobachtung des Spreadings liegt in der Verwendung des Fluorescein/DiI Filtersatzes im Mikroskop. Er wurde zum Anstechen ausgewählt, da durch ihn Vesikelmembran und Pipette gleichzeitig zu sehen waren. Pipettenspitze und maximaler Vesikeldurchmesser können damit in dieselbe Fokusebene gebracht werden. Der Nachteil dieses Filtersatzes ist, dass die fließende gelbe Membran sich nur schlecht von der leuchtend grünen Pipette abhebt. Abbildung 2.48 zeigt zwei unterschiedliche Methoden, die fließende Membran deutlich sichtbar zu machen. Bei der ersten Methode werden die einzelnen RGB-Werte eines Videobildes unmittelbar vor dem Anstechen von denen eines danach aufgenommenen Bildes subtrahiert. Nach der Eliminierung des Blauanteiles, einer Absolutwertbildung und starker Kontrastverstärkung zeigte sich eine leuchtend gelbe Membran auf der Pipette. Im Differenzbild ist der Vesikel selber als zweifacher Kreis zu erkennen. Der äußere Kreis entspricht dem Vesikel vor dem Anstechen, der Innere dem Vesikel danach. Dies veranschaulicht die plötzliche Formveränderung durch die wachsende Anspannung der Membran. Bei der zweiten Methode wird nach dem Anstechen auf den DiI-Filtersatz gewechselt. Die Pipette wird damit unsichtbar und nur die Membran ist zu erkennen. Die durch den Filterwechsel verursachte Erschütterung zerstört jedoch meistens den Membran-Pipetten-Kontakt.

Für eine genaue Untersuchung des Spreadings wurden die Videos komplett in Einzelbilder zerlegt. Die analysierten Experimente wiesen Bildwiederholraten von 15 oder 25 Bildern pro Sekunde auf. Durch Berücksichtigung des Interlacings der Kamera ergeben

sich daraus 30 beziehungsweise 50 Bilder pro Sekunde. In jedem Bild wurde die Lipidmembran auf der Pipette mit der oben beschriebenen Subtraktions-Methode sichtbar gemacht. Danach wurde die Distanz s zwischen der kugelförmigen Vesikelmembran und der Grenze zwischen fließender Membran und unbedeckter Pipette per Hand bestimmt. Abbildung 2.49 zeigt den zeitlichen Verlauf der Distanz s für drei verschiedene Experimente. Meist unterteilt sich das Fließen in eine sprunghafte Anfangsphase und eine langsamere Sättigungsphase, wie in den beiden oberen Graphen gezeigt wird. Eine Pore kann dabei zu einer Relaxation des Vesikels und zu einer erneuten Beschleunigung des Fließens führen. Auf Poren wird genauer in Kapitel 2.6.1 eingegangen. Oft kann nur der Beginn des Fließens untersucht werden, da die Membran aus dem Bildausschnitt heraus rutscht. Dies kann im obersten und im untersten Graphen beobachtet werden. Problematisch ist außerdem, dass die Entfernungsbestimmung mit zunehmender Strecke s immer ungenauer wird, da die Membran durch die schräg gestellte Pipette (15°) aus dem Fokus gleitet.

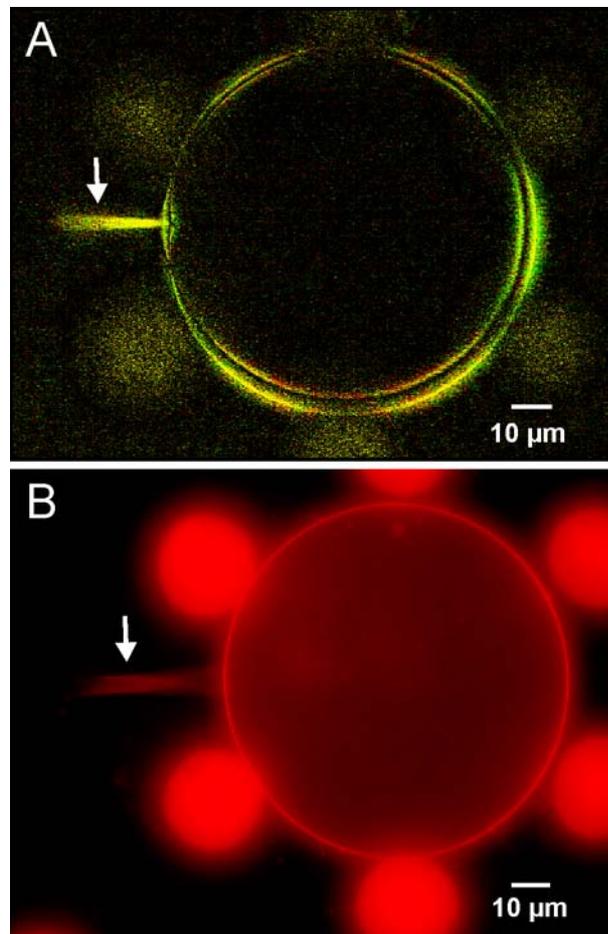


Abbildung 2.48: Zwei Methoden, die fließende Membran auf der Pipette sichtbar zu machen: **A:** Die Subtraktion von Videobildern vor und nach dem Anstechen eliminiert die Pipette. Das Bild ist stark kontrastverstärkt. Die Bildartefakte beruhen auf der MPEG-2 Komprimierung des Videos. **B:** Im DiI Filter ist die Pipette unsichtbar. Nur die mit DiI angefärbte Membran und die Säulen sind zu erkennen. In beiden Bildern wurden die Vesikel mit einer Poly-L-Lysin beschichteten Pipette von links angestochen. Die weißen Pfeile markieren die fließende Membran.

Das Verhalten der Ausbreitung von Lipidmembranen auf beschichteten Glasoberflächen wird in der Literatur beschrieben. J. Rädler et al. platzierten Phospholipidklumpen aus DMPC auf verschiedene Oberflächen [Räd95a]. Nach der Zugabe von Wasser fing das Lipid an, sich auf der Oberfläche auszubreiten. Dieser Effekt wurde *Spreading* oder *Wetting* genannt. Der erste Begriff wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen. Je nach Unterlage konnten zwei Ausbreitungsmechanismen beobachtet werden: Das sogenannte *Sliding* trat bei der Verwendung von Glas, das durch UV-Bestrahlung oder Argon-Sputtern gesäubert wurde, sowie bei Glimmer auf. Die Oberflächen sind so glatt, dass sich ein einschichtiger Bilayer durch Rutschen auf einem 2 nm dicken Wasserfilm ausbreiten kann. Von *Rolling* wird dagegen gesprochen, sobald die Membran an der Oberfläche stärker haftet und sie sich wie ein Teppich auf der Oberfläche ausrollt. Dieser Effekt trat bei Magnesiumfluorid beschichteten Glasoberflächen auf.

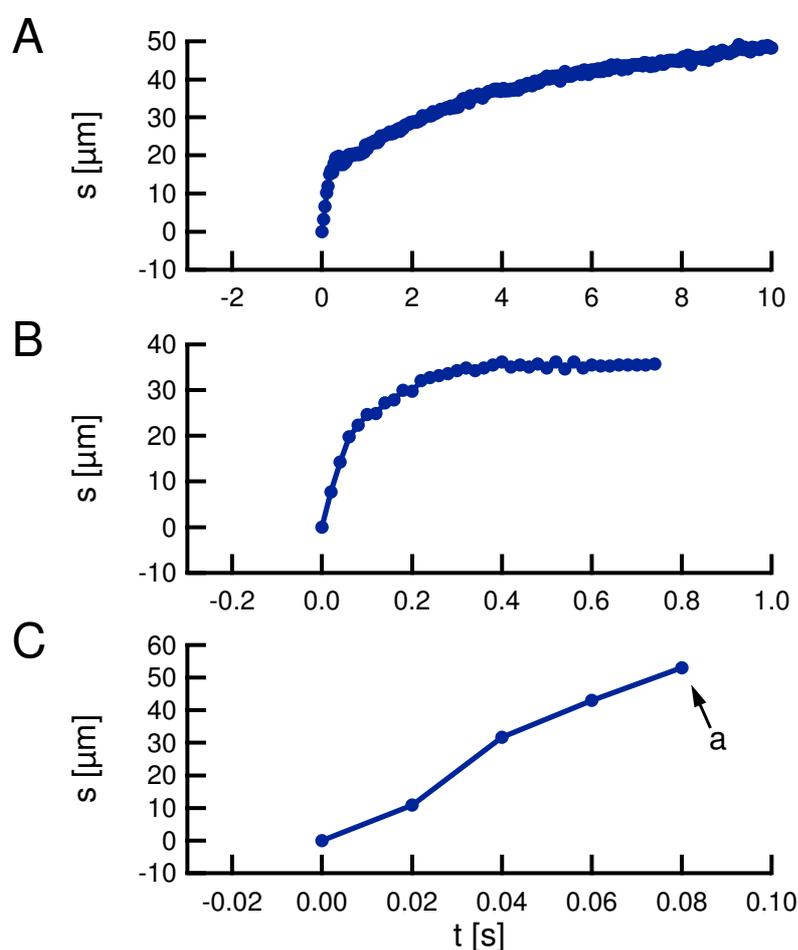


Abbildung 2.49: Entfernungs- und Zeitmessungen der fließenden Membran. Aufgetragen ist jeweils die Distanz s zwischen der kugelförmigen Vesikelmembran und dem Rand der auf der Pipette fließenden Membran gegenüber der Zeit t . Zwischen den Experimenten existieren große Unterschiede in der Fließgeschwindigkeit. **A:** Häufig fließt die Membran anfangs sehr sprunghaft und nähert sich dann langsam einem Maximum an. **B:** Aber auch eine schnellere Sättigung ohne Anfangssprung ist möglich. **C:** In manchen Experimenten fließt die Membran in weniger als 0.1 s aus dem Bildausschnitt heraus (a).

Bei dem hier beobachteten Spreading handelt es sich wahrscheinlich um das von Rädler entdeckte Rolling. Hierbei wird eine an der Pipette haftende innere Membranröhre von einer äußeren vollständig umhüllt. Die Äußere kann dabei auf der Inneren gleiten. Zwischen beiden befindet sich ein Wasserfilm, dessen Volumen aus dem Inneren des Vesikels stammt. Für dieses Modell sprechen folgende Indizien:

1. Vor dem Durchbrechen der Membran wird der Vesikel bis zu $30\ \mu\text{m}$ „eingedellt“. Im Rolling-Modell nähert sich die Membran dabei immer mehr an die Pipette an bis es zum eigentlichen Abrollen der Membran kommt. Beim Zugrundelegen des Sliding-Modells müsste die eingedellte Membranröhre nach außen gestülpt werden, was kaum vorstellbar ist. Möglich wäre das Sliding nur durch ein Aufreißen der Membran $30\ \mu\text{m}$ von der Pipettenspitze entfernt. Dies würde aber zu einer kurzen Undichtigkeit des Vesikels führen. In den elektrischen Messungen ist davon jedoch nichts zu erkennen. In Abbildung 2.50 wird zum einen die Membranverformung an der Pipette während des Anstechens skizziert, zum anderen werden die beiden Modelle Sliding und Rolling gegenüber gestellt.
2. In manchen Videos ist an der vordersten Front der fließenden Membran im Auflicht-Modus des Mikroskops mit kleiner Apertur ein Schatten zu erkennen. Beim Sliding würde aber nur eine $4\ \text{nm}$ dicke Membran an der Pipette hochrutschen. Die dadurch hervorgerufene Änderung der Lichtbrechung der Pipette wäre nicht sichtbar. Im Rolling-Modell jedoch besteht die sich ausbreitende Lipidrolle aus zwei Membranen, die durch einen Wasserfilm getrennt sind. Die Dicke des Wasserfilms ist nicht zu vernachlässigen, da die beiden Membranen das positiv geladene DOPME enthalten und

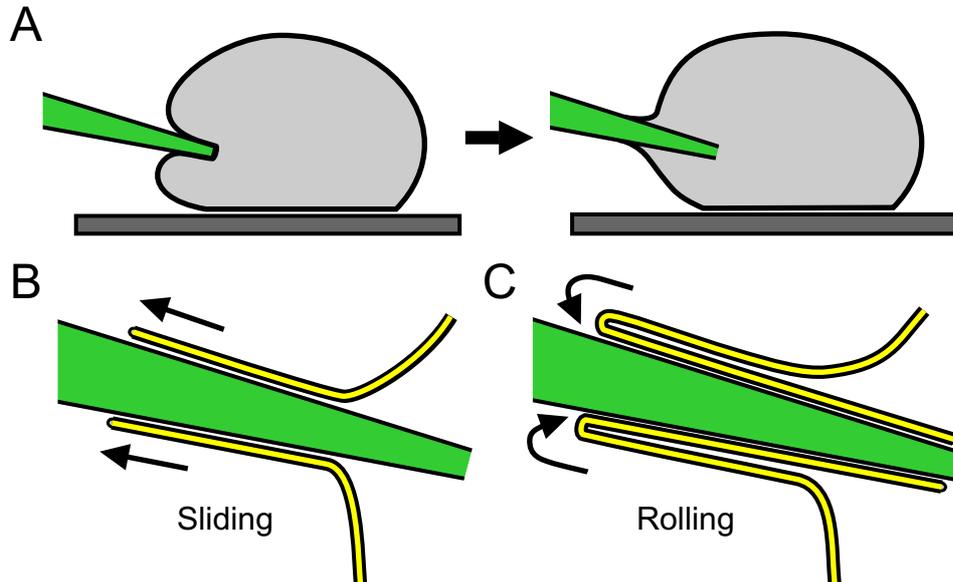


Abbildung 2.50: Spreading-Modelle. **A:** Während des Anstechvorgangs wird die Vesikelmembran durch die Pipette eingedellt. Kurz danach stülpt sich die Membran um und fließt an der Pipette hoch. Diese Membranverformung lässt sich durch zwei Modelle erklären: **B:** Im Sliding-Modell breitet sich die Membran einschichtig aus. Dieses Modell ist eher unwahrscheinlich, da die vorher eingedellte Membran nach Außen umklappen müsste. **C:** Das favorisierte Rolling-Modell beschreibt das Spreading als ein Abrollen der Membran auf der Pipette.

sich deshalb gegenseitig abstoßen. Da der Wasserfilm aus der Saccharoselösung des Vesikelinneren besteht und der Außenraum größtenteils aus Glucoselösung besteht, bewirkt der Wasserfilm eine Änderung der Lichtbrechung.

3. Ein weiteres auftretendes Phänomen, das sogenannte Budding, wird in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Es kann nur mit Hilfe einer zweiten, nicht an der Pipette festklebenden, Membran erklärt werden.

Bei dem hier vorgeschlagenen Modell der rollenden Membran handelt es sich neben die bisher üblichen Methoden wie Patchen und Anstechen um einen bisher unbekanntem Mechanismus der elektrisch dichten Anbindung von Membranen an Glaspipetten.

Das Spreading bewirkt, dass dem restlichen Vesikel Membranfläche entzogen wird und die entsprechende Lipidmenge als Umhüllung fehlt. Aufgrund der Inkompressibilität der Saccharose Lösung im Inneren des Vesikels führt dies zu einer Steigerung der Membranspannung. Allerdings tritt dieser Effekt meist nicht sofort ein, da die Vesikel einen großen Osmolaritätsunterschied zwischen der 300 mOsm Saccharoselösung im Inneren und der 400 mOsm Pufferlösungen im Außenraum aufweisen. Dadurch sind sie eher schlapp und besitzen fast schon eine Halbkugelform. Das Spreading bewirkt deshalb auch zuerst eine Annäherung der Vesikelform an eine Kugel. Diese schnelle Formveränderung ermöglicht das sprunghafte Anfangsverhalten zu Beginn des Membranfließens. Danach steigt die Membranspannung an und es kommt zu einer langsameren Annäherung an ein Gleichgewicht zwischen den Anziehungskräften der Pipette und der Membranspannung. Die bereits beschriebene Abbildung 2.49 zeigt in den beiden oberen Graphen genau dieses Verhalten.

Durch die Anziehungskraft zwischen Membran und Pipette kann es aber auch zu anderen Relaxationserscheinungen kommen:

Poren: Die Membran öffnet sich kurzzeitig und Vesikelinneres strömt kurzzeitig heraus. Ein Teil der Membranspannung wird so abgebaut. Auf dieses Thema wird in Kapitel 2.6.1 näher eingegangen.

Dauerhaftes Loch: Der Vesikel reißt auf und sein gesamter Inhalt fließt heraus. Meist geschieht das in unmittelbarer Nähe der Anstechstelle. Während des Ausflusses verteilt sich die gesamte Membran des Vesikels auf der Pipette.

Annäherung: Besitzt der Vesikel in seinem Käfig etwas Spielraum, so rückt er auf die Pipette soweit wie möglich zu. Normalerweise wird er dann von den Käfigssäulen gestoppt. Hierbei handelt es sich nicht um eine Anziehung des kompletten Vesikels. Seine Membran versucht nur die Ausstülpung der fließenden Membran zu verhindern und die Kugelform beizubehalten.

Sprung: Manchmal kommt es vor, dass der gesamte Vesikel aus seinem Käfig herausspringt und an der Pipette hochgezogen wird.

In Abbildung 2.51 wird ein Experiment gezeigt, in dem fast alle soeben beschriebenen Erscheinungen auftraten. Der angestochene Vesikel bewegte sich zuerst auf die Pipette zu, rutschte halb aus dem Käfig heraus und kollabierte schließlich durch Bildung eines großen Loches.

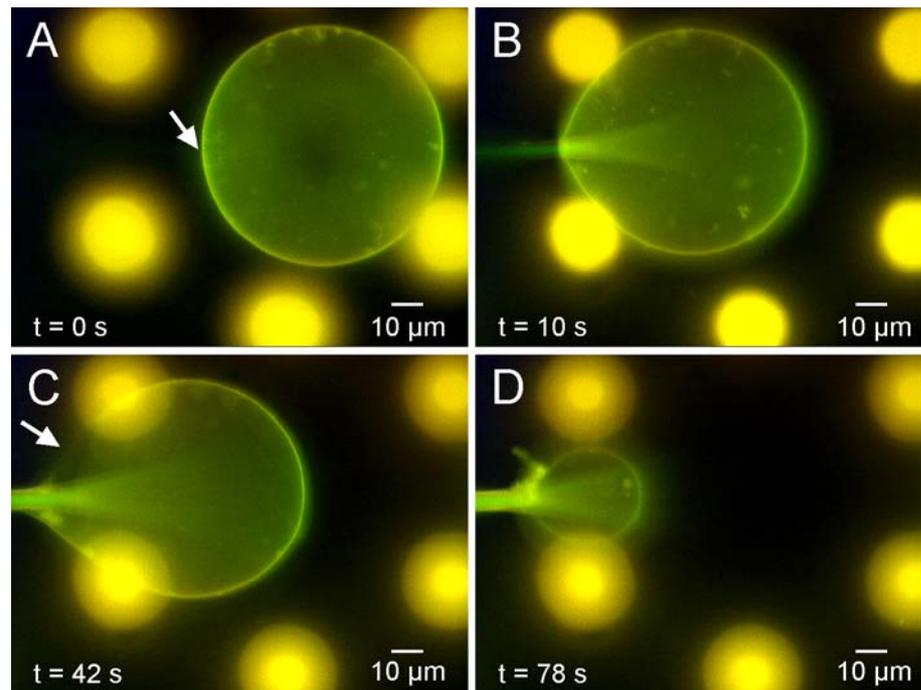


Abbildung 2.51: Vernichtung eines Vesikels durch eine zu starke Anziehung der Pipettenbeschichtung. **A:** Der Vesikel liegt relativ frei in einem größeren Käfig. Die Spitze der fast unsichtbaren Pipette (weißer Pfeil) berührt den Vesikel. **B:** Innerhalb von zwei Sekunden springt der Vesikel auf die Pipette zu. Dann verformt ihn die Anziehungskraft der Pipette (Zeit $t = 10$ s). Es ist jedoch kein Spreading zu erkennen. **C:** Der Vesikel rutscht halb auf die Säulen hoch und reißt plötzlich auf (Zeit $t = 42$ s). Ein $20\mu\text{m}$ breites Loch bildet sich (weißer Pfeil), aus dem sich nach und nach der gesamte Inhalt des Vesikels entleert. Im Moment der Lochbildung beginnt die Membran an der Pipette empfangen zu fließen. Der Vesikel verteilt sich fast komplett auf der Pipette. **D:** Am Ende bleibt nur noch ein kleiner Minivesikel zurück (Zeit $t = 78$ s).

2.5.2 Lipid-Barrieren gegen das Spreading

Beim Vergleichen der durchschnittlichen Kontaktdauern bei Anstechversuchen mit beschichteten Pipetten in Tabelle 2.4.7 fällt auf, dass sie bei Aminosilan-Beschichtungen mit 237 s deutlich länger als bei Poly-L-Lysin mit 175 s sind. Trotzdem weist das stärkere und häufigere Spreading bei Poly-L-Lysin auf eine viel kraftvollere Anziehung der Membran hin. Wie aber kann eine bessere Anziehung einen kürzeren Kontakt zur Folge haben? Eine mögliche Erklärung ist, dass das Spreading direkt verantwortlich für das Zusammenbrechen des Membran-Pipetten-Kontakts ist. Dies lässt sich des öfteren visuell unter dem Mikroskop verfolgen. Deutlich zu sehen ist die Bildung von kurzzeitigen Poren oder auch dauerhaften Löchern. Hierauf wird näher in Kapitel 2.6.1 eingegangen. In diesem und dem nächsten Kapitel werden zwei Ansätze vorgestellt, um das Spreading zu begrenzen und damit die Dauer der Kontakte zu verlängern. Bedauerlicherweise führte keiner von beiden zu einer reproduzierbaren Auswirkung auf die Dauer der Seals. Sie finden trotzdem hier Erwähnung, da sie andere interessante Aspekte aufzeigten.

Der erste Versuch zur Begrenzung des Spreading beruhte auf der Idee, die Ladungen des Poly-L-Lysins gezielt $20\mu\text{m}$ von der Pipettenspitze entfernt zu neutralisieren. Die Hoffnung war, dass die fließende Membran diese „Barriere“ nicht überschreitet. Zuerst

wurde dies mit Lipid versucht. Ein Problem war jedoch die Verwendung der richtigen Menge an Lipid. Gab man zu viel auf die Pipette, so floss es vom Applizierungsort bis zur Spitze und verschmutzte sie. Ein dichter Membran-Pipetten-Kontakt konnte dann nicht mehr gebildet werden.

Die geeignete Menge an Lipid stellt ein Minivesikel dar. Hierbei handelt es sich um $5\ \mu\text{m}$ kleine Vesikel, die bei der Riesenvesikelherstellung abfallen. Im Bad sind immer einige von ihnen auf dem Chip zu finden. Beim seitlichen Berühren werden sie von der Poly-L-Lysin beschichteten Pipette sehr stark angezogen. Zuerst adhäreren sie großflächig, um dann nach kurzer Zeit zu platzen. Ihre Membran verteilt sich komplett als Lipidfleck auf der Pipette und bildet so die gewünschte Barriere. Der Vorgang ist in Abbildung 2.52 zu sehen.



Abbildung 2.52: Herstellung einer Barriere aus Lipid auf einer Pipette, um das Spreading zu begrenzen. Da die Poly-L-Lysin beschichtete Pipette fast unsichtbar ist, wird sie durch eine weiße gestrichelte Linie gekennzeichnet. **A:** Eine Pipette befindet sich unmittelbar neben kleinem Minivesikel. **B:** Minivesikel ist an die Pipette adhärert **C:** Der Vesikel ist geplatzt und hat sich komplett auf der Pipette verteilt.

Das Anstechen von Riesenvesikeln mit Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten, die zusätzlich mit einer Lipidbarriere versehen worden waren, war jedoch nicht erfolgreich. Wie in Abbildung 2.53 dargestellt, wurde das Fließen der Membran bei Erreichen der Lipidmembran zwar extrem verlangsamt, aber nicht vollständig gestoppt. Stattdessen überwand die rollende Membran nach einiger Zeit die Lipidbarriere. Scheinbar reichte eine Lipidmembran nicht aus, um die Ladungen des Poly-L-Lysins vollständig abzuschirmen. Bemerkenswert ist der deutliche Helligkeitsunterschied zwischen der Lipidbarriere und der fließenden Membran. Unklar ist allerdings, ob dies auf den Unterschied in der Anzahl der Lipidbilayer im Lipidfleck und in der rollenden Membran oder auf die stärkere Ausbleichung des Lipidfleck zurückzuführen ist. Bei der Vermessung der Distanz s in Graph C mussten die zugrundeliegenden Videobilder wegen der schwer zu trennenden Fluoreszenz von Lipidbarriere und Vesikelmembran wieder durch die in Kapitel 2.5.1 beschriebene Differenzmethode analysiert werden.

Bei den insgesamt elf Experimenten mit Lipidbarriere bewegte sich entweder der Vesikel (zwei Fälle) ganz bis zur Lipidbarriere oder seine fließende Membran wurde durch die Barriere abgebremst (neun Fälle). Trotz der Verlangsamung des Spreadings zeigten sich aber in vier Fällen Poren und die durchschnittliche Zeitdauer der Membran-Pipetten-Kontakte lag bei den sieben erfolgreichen Anstechversuchen bei nur 34 s. Der Grund für diese Verschlechterung gegenüber Pipetten ohne Lipidbarriere könnte die größere Verweildauer der Pipette in der Badlösung mit eventuell enthaltenen Lipidverschmutzungen sein.

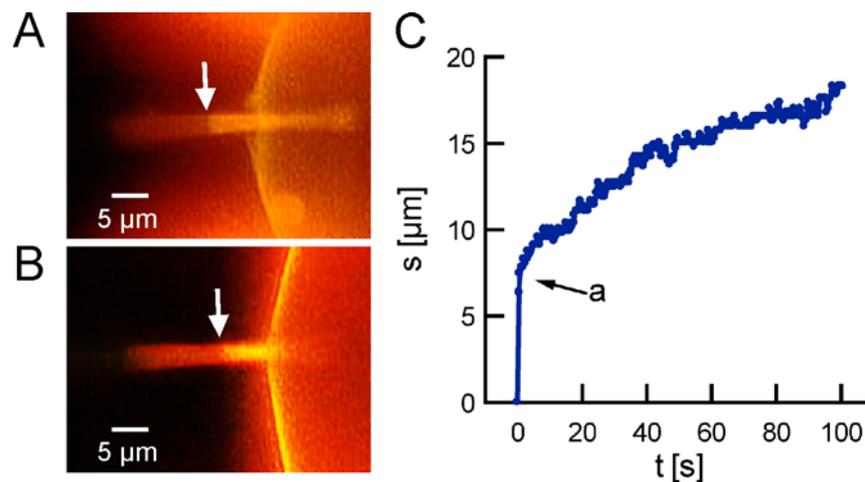


Abbildung 2.53: Spreading über eine Lipidbarriere. **A,B:** Beide Photos zeigen Vesikel, die von links mit einer Poly-L-Lysin beschichteten Pipette angestochen wurden. In beiden Fällen floss die Vesikelmembran sehr schnell bis zu einer aus einem Minivesikel hergestellten Lipidbarriere. Die weißen Pfeile markieren die Grenze zwischen Lipidbarriere (links) und fließender Membran (rechts). Auffallend ist, dass die fließende Membran deutlich heller als die Lipidbarriere ist. **C:** Aufgetragen ist die Distanz s zwischen der kugelförmigen Vesikelmembran und dem Rand der fließenden Membran gegenüber der Zeit t . Ausgewählt wurde hierfür das in **B** dargestellte Experiment. Deutlich zu erkennen ist eine immense Verlangsamung der Fliessgeschwindigkeit beim Erreichen der Lipidbarriere (**a**).

2.5.3 PMMA-Barrieren gegen das Spreading

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung einer Barriere gegen das Spreading ist die Beschichtung mit einem Polymer. Diese Methode stammt ursprünglich aus dem Gebiet der patch clamp Technik. Dort ist es oft notwendig, sehr kleine Ströme zu messen. Dies trifft besonders auf Messungen an einzelnen Ionenkanälen in excised patch Konfigurationen zu. Durch die Reduzierung der Pipettenkapazität mit Hilfe einer Beschichtung kann dabei das Rauschen sowie der Messfehler deutlich gesenkt werden. Üblich ist das Aufbringen einer flüssigen PDMS-Binder/Härter Mischung (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, USA) bis zu einem Abstand von 100 – 200 μm von der Spitze entfernt. Anschließend wird sie in einem heißen Luftstrom getrocknet.

Um das Spreading frühzeitig zu begrenzen, muss die Pipette deutlich näher an der Spitze beschichtet werden. Ein Abstand von 10 – 30 μm ist notwendig, um eine übermäßige Anspannung der Vesikel zu vermeiden. Da die Grenze einer Polymer-Beschichtung so nah an der Spitze nicht mehr im normalem Auflicht erkennbar war, wurde versucht, die flüssige PDMS-Binder/Härter Mischung mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen anzufärben. Diese Versuche waren jedoch bei den verwendeten Farbstoffen DiI und DiD (Molecular Probes, Eugene, USA) selbst bei Lösungsvermittlung durch Ethanol nicht erfolgreich. Erst die Verwendung von in Chlorbenzol gelöstem PMMA (Polymethylmethacrylat, Plexiglas GS, Röhm, Darmstadt) ermöglichte die Herstellung fluoreszierender Pipettenbeschichtungen. Die endgültig verwendete Mischung bestand aus 0.6 ml PMMA in Chlorbenzol (0.4 g/ml) und 0.1 ml DiD in Ethanol (10 mM). Der Farbstoff DiD wurde ausgewählt, da seine im Roten liegende Fluoreszenz durch einen eigenen Filtersatz fast ungestört von der fluo-

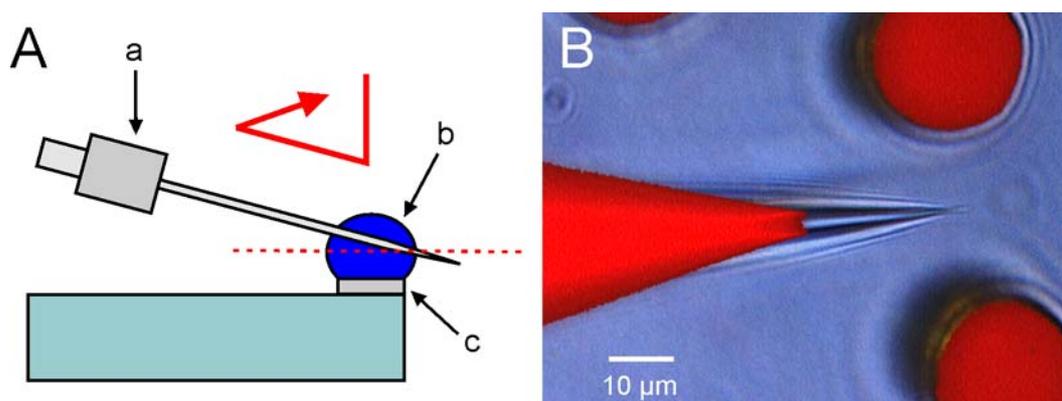


Abbildung 2.54: Herstellung einer Barriere aus PMMA gegen das Spreading auf einer Poly-L-Lysin beschichteten Pipette. **A:** Ein Pipettenhalter mit Pipette (a) wird von oben in einen PMMA-Tropfen (b) eingetaucht. Dieser steht über den Rand eines Teflonplättchens (c) über, so dass sein Rand im Fokus gut zu erkennen ist (Fokusebene = rote gestrichelte Linie). Danach wird die Pipette bis zu einem Abstand von $20\mu\text{m}$ von der Spitze zurückgezogen und nach oben herausgefahren (roter Pfeil = Pipettenbewegung) **B:** Überlagerung vom Auflichtbild einer Pipette und dem Bild der PMMA-Beschichtung im DiD-Filtersatz. Die abgebildete Barriere reicht bis $26\mu\text{m}$ an die Spitze.

reszierenden Vesikelmembran und den Polyimid-Säulen detektiert werden kann. Näheres zu Spektrum und Filtersatz von DiD findet sich in Kapitel 2.2.1. Das Lösungsmittel Chlorbenzol verdunstet relativ langsam (Verdunstungszahl 12,5, Dampfdruck 12 hPa) und ermöglicht so eine längere Verarbeitungszeit als vergleichbare Lösungsmittel wie beispielsweise Chloroform (Verdunstungszahl 2,5, Dampfdruck 211 hPa).

Die Herstellung der Barriere aus PMMA fand in der auch für die Anstechversuche verwendeten Apparatur statt. Der Grund hierfür liegt in den hochqualitativen Objektiven des Mikroskops sowie der Möglichkeit die Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten mit dem Mikromanipulator sehr präzise zu verfahren. Auf ein kleines rundes Plättchen aus Teflon mit 3 mm Durchmesser wurde nach dem Einlegen der Pipette in den Halter ein $20\mu\text{l}$ grosser Tropfen der PMMA-Lösung gegeben. Da der Tropfen größer als das Plättchen ist, steht er seitlich über. Auf seinen Rand kann deshalb im Mikroskop gut fokussiert werden. Bis zum Trocknen der Mischung bleiben nach der Applizierung 1 – 2 Minuten. Zur Beschichtung wird die Pipette von oben in den Tropfen heruntergefahren. Dabei wird darauf geachtet, dass die Spitze außerhalb des Tropfens bleibt. Sobald Tropfenrand und Spitze im selben Fokus liegen, wird die Pipette bis zu einem Abstand des Tropfenrandes von der Spitze von $10 - 30\mu\text{m}$ zurückgezogen. Anschließend bewegt man sie schräg nach oben aus dem Tropfen heraus. Diese in Abbildung 2.54 dargestellte Vorgehensweise kann sehr gut reproduziert werden.

Bei den Anstechexperimenten mit Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten, die zusätzlich mit einer PMMA-Barriere versehen waren, stellte sich heraus, dass es in den meisten Fällen schon vor dem Erreichen der eigentlichen Barriere zu einer Einschränkung des Spreading kam. Verglichen mit den nur mit Poly-L-Lysin beschichteten Pipetten verlangsamte sich das Spreading stark. Eine schnelle Anfangskomponente ist ebenfalls nicht mehr erkennbar. Von insgesamt 23 Experimenten zeigten 12 ein langsames Spreading. Nur ein Mal wurde normales schnelleres Fließen der Membran beobachtet. Diese einzige schnelle Mes-

sung sowie ein weiteres Experiment mit gebremsten Spreading sind in Abbildung 2.55 dargestellt. Die Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit der Lipidmembran weist auf eine nicht sichtbare Verschmutzung der Pipette noch vor der eigentlichen PMMA-Barriere hin. Tatsächlich wurden an den Rändern von Polymer-Schmelzen, die auf glatte Substrate aufgebracht wurden, mikroskopische Vorläufer-Füße entdeckt [Bro84]. Dieser Vorgang der Oberflächenbenetzung wird auch als *Wetting* bezeichnet. Eventuell handelt es sich auch in diesem Fall um solch eine monomolekulare Verunreinigung in der Nähe der Barriere, die das Poly-L-Lysin nur teilweise abschirmt. Für eine Verschmutzung spricht auch die kurze durchschnittliche Dauer des Pipetten-Membran-Kontakts von 243 s. Eine Verbesserung des

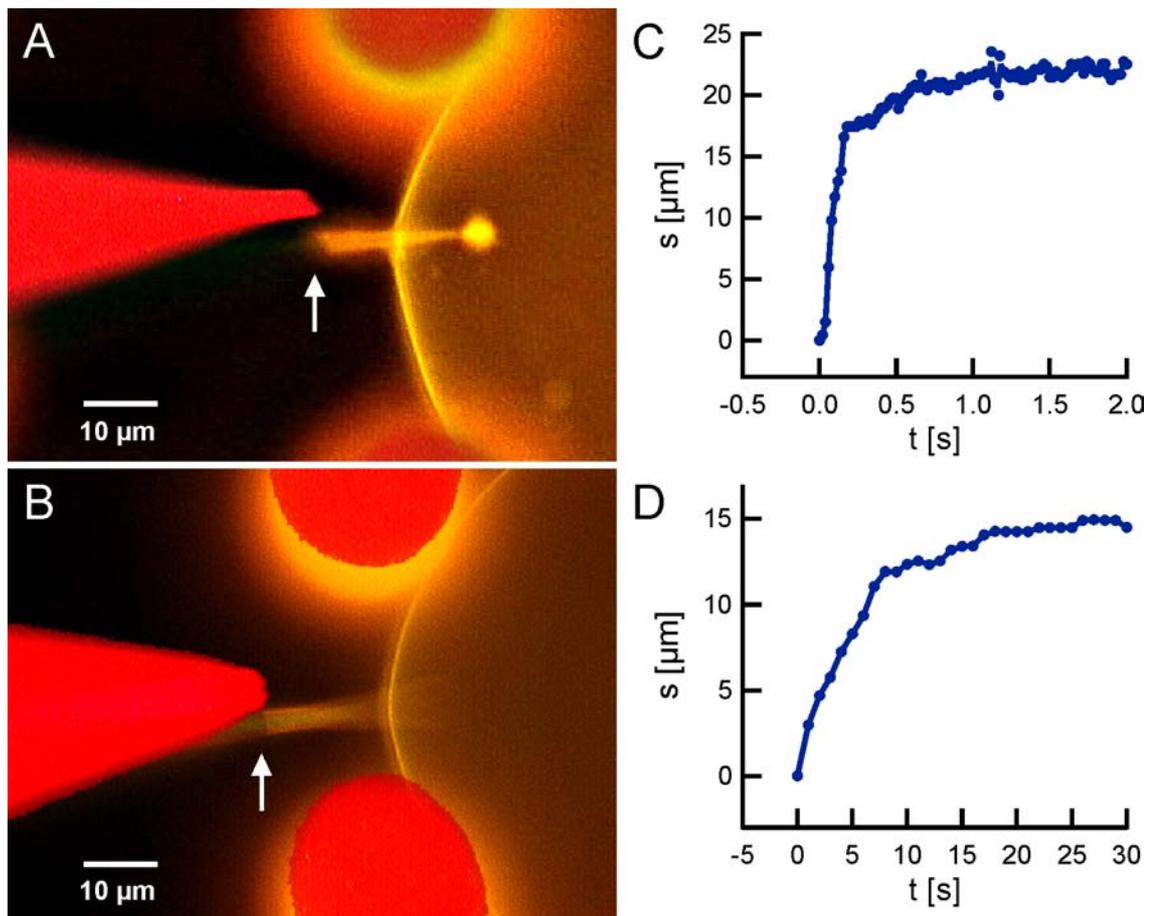


Abbildung 2.55: Zwei Beispiele für das Spreading der Vesikelmembran bis zu einer PMMA-Barriere. **A, B:** Überlagerungen der Bilder von zwei Vesikeln im DiI/Fluorescein-Filtersatz mit den entsprechenden Bildern der PMMA-Beschichtungen im DiD-Filtersatz. Die Bilder sind vertikal versetzt um die ähnliche Form der Grenzen von Barrieren und Membranen besser darzustellen. **C, D:** Aufgetragen ist in beiden Graphen die Distanz s zwischen der kugelförmigen Vesikelmembran und dem Rand der fließenden Membran gegenüber der Zeit t . Dabei entspricht Graph **C** dem in **A** dargestellten Experiment und Graph **D** dem in **B** gezeigten Versuch. In beiden Fällen schreitet das Spreading nur bis zum Erreichen der Barriere fort und stoppt dort. Graph **C** zeigt eines der wenigen Experimente mit sehr schnellem Spreading. In den meisten Fällen jedoch ist das Spreading stark eingeschränkt wie bei dem Beispiel in Graph **D**. Auffallend ist außerdem das Fehlen der schnellen Anfangskomponente, wie sie rein Poly-L-Lysin-beschichtete Pipetten aufweisen.

maximalen effektiven Membranwiderstands R_M^* gegenüber Pipetten ohne Barriere konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Das oben erwähnte einzige Experiment mit schnellem Spreading wies allerdings bei einem maximalen effektiven Membranwiderstand von $R_M^* = 240 \text{ M}\Omega$ eine sehr lange Kontaktdauer von 1300 s auf.

Da an der beschichteten Oberfläche in unserem Fall nichts geändert werden kann, muss die Zusammensetzung des Barrieren-Materials abgewandelt werden. Das Fließverhalten der verwendeten PMMA-Mischung ist wegen der unterschiedlichen Komponenten sehr schwierig zu beschreiben. Theoretisch behandelt wurden bisher nur reine Polymer-Schmelzen [Bro84, dG85]. Bei der hier vorhandenen Mischung müssten außerdem noch weitere Effekte wie Lösungsmittelverdunstung, Oberflächenadsorption einzelner Komponenten sowie der sogenannte Marangoni Effekt beachtet werden.

Bei der Suche nach einem geeigneteren Material als die verwendete PMMA-Lösung muss auf mehrere Punkte geachtet werden: Am wichtigsten ist natürlich, dass es kein Benetzungsverhalten aufweisen darf. Außerdem muss es sich unter dem Mikroskop auch in der Nähe der Spitze optisch gut von der übrigen Glaspipette abheben. Desweiteren muss es von einem viskosen Zustand, in dem es bearbeitbar ist und die Pipette eng umschließen kann, in einen stabileren festen Zustand wechseln können. Letztendlich ist es nötig, dass die Materialbearbeitung bei Temperaturen unter 150°C stattfindet, da ansonsten das auf der Pipette befindliche Poly-L-Lysin zerstört wird.

2.6 Poren und Budding

Zusätzlich zu dem Spreading von Lipidmembranen tauchten während der Anstechexperimente weitere unerwartete Effekte auf. Genauer soll hier auf das Auftauchen von Membranlöchern in der Nähe der Pipette sowie die Bildung von kleinen Vesikeln aus der fließenden Membran auf beschichtete Pipetten, auch *Budding* genannt, eingegangen werden.

2.6.1 Poren

Ein sehr häufig auftretendes Phänomen ist das Entstehen von Löchern in der Vesikelmembran nach dem Anstechen. Diese kurzfristig auftretenden Öffnungen werden auch *Poren* genannt. Es konnten Löcher mit einer Größe von bis zu $25\ \mu\text{m}$ und Öffnungszeiten von mehreren Sekunden beobachtet werden. Auffällig war, dass der Entstehungsort immer um oder direkt neben der Kontaktstelle der Pipette mit der Vesikelmembran lag.

Die Vesikelmembran entwickelt Poren, sobald sie unter zu große Spannung gesetzt wird. Durch den Ausfluss der Lösung aus dem Inneren durch Löcher in der Membran wird diese Anspannung abgebaut. Sandre et al. konnten das Entstehen von Poren in Riesenvesikeln beobachten, die durch Adhäsion auf Poly-L-Lysin-beschichteten Oberflächen oder durch intensive Beleuchtung verursacht wurden [San99, BW00a]. Die Zeit, in der sich die bis zu $10\ \mu\text{m}$ großen Poren schlossen, konnte durch die Verwendung einer Wasser/Glycerol Mischung mit einer erhöhten Viskosität von $\eta_0 = 30\ \text{cP}$ im Inneren der Vesikel auf mehrere Sekunden verlängert werden.

Es gab mehrere Ursachen für das Auftreten von Poren. Allen gemeinsam ist eine Erhöhung der Membranspannung:

Vesikelverformung durch „Eindellen“: Beim Anstechen wird die Vesikelmembran „eingedellt“. Diese Verformung erhöht die Membranspannung. Wenn die Vesikel trotz des osmotischen Druckunterschiedes nicht genügend erschlafft waren oder falls die Pipette sehr tief in die Vesikel eingeführt wurde, reichte dies aus, um Poren zu verursachen.

Anspannung durch Pipettenanziehung Eine weitere Ursache für Poren ist die starke Anziehung beschichteter Pipetten. Insbesondere mit Poly-L-Lysin-beschichtete Pipetten verformen die Vesikel, ziehen sie schnell an oder lösen das Spreading der Membran aus. Alle drei Vorgänge verursachen eine zusätzliche Anspannung der Lipidmembran und führen deswegen oft zu Poren.

Injektion Poren entstehen auch durch stärkere Injektionen. Die Erhöhung der Membranspannung wird hierbei durch die Volumenzunahme der Vesikel verursacht. Beim Auftreten längerer Öffnungszeiten war es sogar möglich, die Poren durch kleine Injektionen über längere Zeiträume am Schließen zu hindern und sie weit offen zu halten.

Abgesehen von der Entstehung von Poren durch Injektion, war das Vorkommen von Poren bei Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten mit 32 Prozent deutlich höher als bei Aminosilan- (6 Prozent) oder Dimethyldichlorsilan-beschichteten (3 Prozent) Pipetten. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die starke Anziehung der Membran durch das Poly-L-Lysin zurückzuführen. Während hier nur 20 Prozent auf reines Eindellen beim Anstechen

zurückzuführen waren, traten 60 Prozent aller Poren bei dieser Beschichtung nach einem Fließen der Membran auf. Die übrigen 20 Prozent wurden durch schnelle Bewegung und Vesikelverformung aufgrund der Pipettenanziehung verursacht.

Durch Vermessung der aus den Videoaufnahmen der Experimente stammenden Einzelbilder ist es möglich, den zeitlichen Verlauf des Porendurchmessers zu studieren. In Abbildung 2.56 sind zwei Aufnahmen von größeren Poren in Vesikeln dargestellt. Während die Pore des linken Vesikels durch zuvor erfolgtes Spreading verursacht wurde, reichte es beim rechten schon aus, ihn mit der Anstechpipette nur leicht einzudellen. Dieser große Vesikel zeigte anschließend eine Folge von 41 Poren, die immer kleiner wurden und für kürzere Zeit offen waren. Am Ende blieb ein dauerhaftes, kaum sichtbares Loch bestehen, aus dem langsam aber kontinuierlich das Vesikelinnere ausfloss. Der unter den Photos befindliche Graph zeigt den zeitlichen Verlauf des Durchmessers von vier ausgewählten Poren. Jede

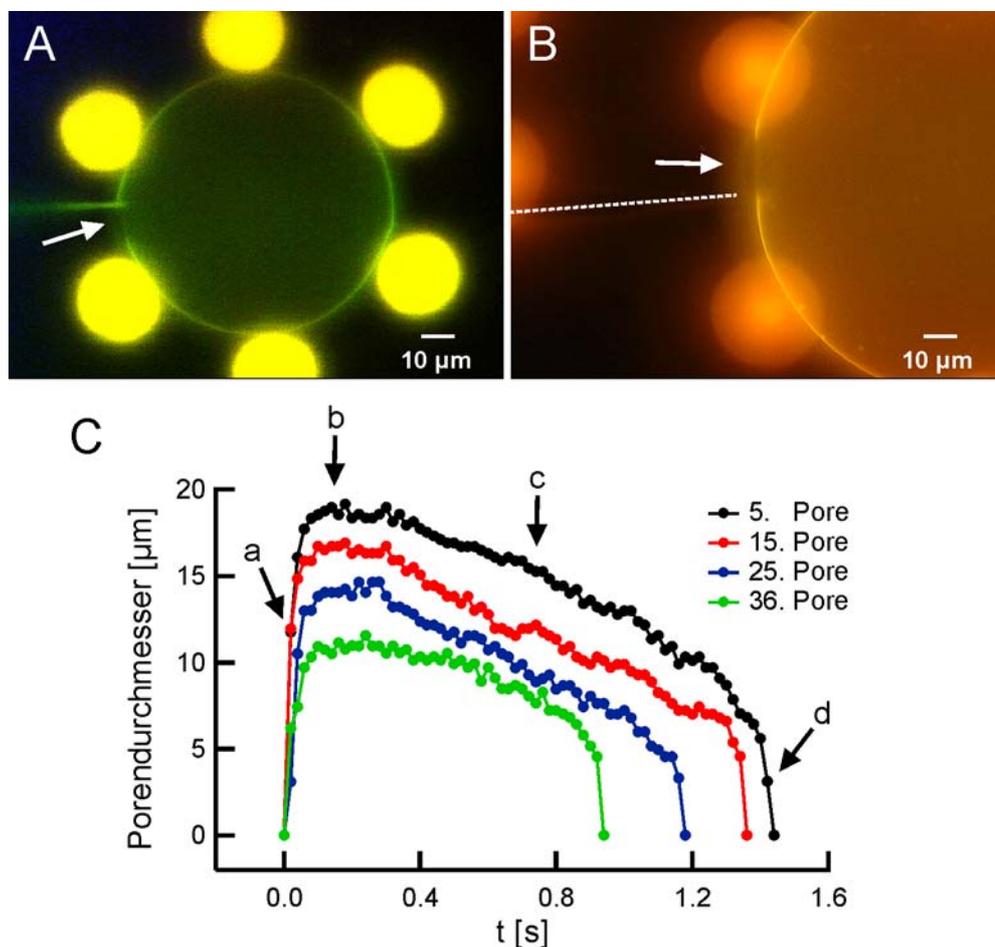


Abbildung 2.56: Vermessung der beim Anstechen entstehenden Poren. **A:** Photo einer durch schnelles Sliding verursachten $10\ \mu\text{m}$ Pore (weißer Pfeil) in einem $80\ \mu\text{m}$ großen Vesikel. **B:** Photo einer durch leichtes Eindellen mit einer nicht sichtbaren Pipette (gestrichelte Linie) verursachten $17\ \mu\text{m}$ Pore. Der $136\ \mu\text{m}$ große Vesikel zeigt eine Folge von 41 Poren in der Nähe der Anstechpipette. **C:** Zeitlicher Verlauf von vier ausgesuchten Poren des in **B** gezeigten Vesikels. Gut zu erkennen ist, dass die Poren mit der Zeit sowohl kleiner werden als auch von kürzerer Dauer sind. Jede Pore weist vier Phasen auf: growth (**a**), bloom (**b**), leak-out (**c**) und ultimate closure (**d**).

dargestellte Pore weist vier Phasen auf [BW00b]. Nach einer schnellen Öffnung (*growth*) folgt zuerst eine stabile Plateauphase (*bloom*), dann eine langsame Schließphase mit starkem Ausfluss (*leak-out*) und am Ende ein schnelles Schließen (*ultimate closure*).

Die größte in allen Experimenten beobachtete Pore hatte einen Durchmesser von $40\ \mu\text{m}$. Der angestochene Vesikel hatte dabei einen Radius von $80\ \mu\text{m}$.

Bei der Applizierung von kontinuierlichen Strompulsen während der oben beschriebenen Anstechversuche fiel in den meisten Fällen auf, dass nach dem Auftreten einer Pore die Bestimmung eines effektiven Membranwiderstandes R_M^* nicht mehr möglich war. Der Membran-Pipetten-Kontakt blieb undicht. Nur in wenigen Fällen schlossen sich die Poren so gut, dass im Spannungssignal $V_P(t)$ wieder eine Membranaufladung durch die Strompulse sichtbar war. Abbildung 2.57 zeigt eine dieser Messungen. Nur in fünf weiteren Anstechexperimenten wurden ähnlich gut messbare wiederkehrende Seals beobachtet.

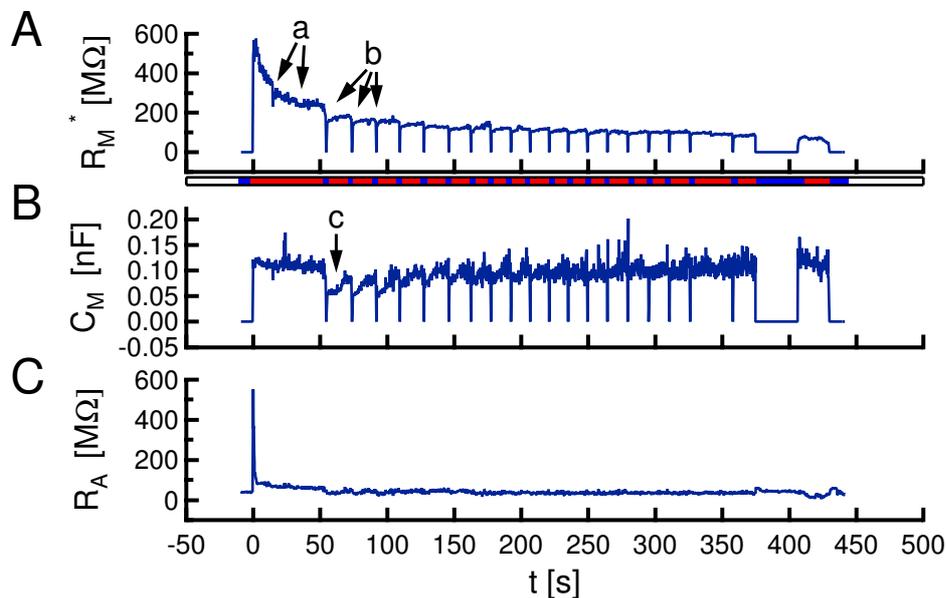


Abbildung 2.57: Verlaufsanalyse von Messung P1 mit Dimethyldichlorsilan-beschichteter Pipette. Der Membran-Pipetten-Kontakt verschwindet 22 mal aufgrund einer Pore. **A:** Nach einem Maximum von $570\ \text{M}\Omega$ beginnt sofort ein rascher Abfall des R_M^* . Diesem folgen zwei kurzzeitige Schwächungen des Widerstandes (**a**). Ab $t = 55\ \text{s}$ folgen äquidistante Einbrüche (**b**). Hier können weder R_M^* noch C_M bestimmt werden. **B:** C_M liegt bei durchschnittlich $0,11\ \text{nF}$. Unmittelbar nach den Poren ist sie merkwürdigerweise erniedrigt (**c**). **C:** R_A steigt sprunghaft beim Anstechen ($t = 0\ \text{s}$) an, sinkt aber schnell wieder ab.

Detaillierte Beschreibung von Messung P1: Als Beschichtung wurde in diesem Fall Dimethyldichlorsilan verwendet. Während des Auftretens einer Pore konnten die Signale für kurze Zeit nicht mehr mit Formel 2.5 (S. 14, rot im Fitbalken) gefittet werden. Stattdessen musste Formel 2.12 (S. 41, blau) verwendet werden. In dieser Zeit konnte weder R_M^* noch C_M bestimmt werden. In den entsprechenden Graphen fallen die Kurven deswegen kurzzeitig auf Null ab. Nach der 22. Pore schließlich brach der ohnehin nicht besonders dichte Kontakt mit Werten zwischen $100 - 150\ \text{M}\Omega$ zusammen. Auffallend ist die zeitliche Äquidistanz der auftretenden Poren. Beim genauen

Betrachten des Verlaufgraphen für R_M^* fallen außerdem zwei kurzfristige Schwächungen vor dem Auftreten der eigentlichen Poren auf. Ihre zeitlichen Abstände zu den Poren sind ähnlich wie die der Poren selber. Im Verlauf der Membrankapazität C_M ist zu erkennen, dass diese nach den Poren meist erniedrigt ist. Der Zugangswiderstand R_A beträgt vor dem Anstechen $40 \text{ M}\Omega$. Nach dem Anstechen scheint die Pipette für kurze Zeit verstopft zu sein und ein Peak von $550 \text{ M}\Omega$ ist zu erkennen. Danach ist der Widerstand leicht erhöht und fällt nach der ersten Pore wieder auf seinen ursprünglichen Wert ab.

Besser zu verfolgen ist das Auftauchen von Poren allerdings, wenn anstatt von Strompulsen ein konstanter Strom von $I_0 = 1 \text{ nA}$ angelegt wird. Bei unverändertem effektiven Membranwiderstand R_M^* wird dann eine Spannung von $V_P = I_0(R_A + R_M^*)$ gemessen. Sobald eine Pore auftritt, wird R_M^* durch den Porenwiderstand $R_P = R_L$ dominiert und das Spannungssignal fällt kurzzeitig auf $V_P = I_0(R_A + R_P)$ ab.

Bei Anwendung der Kirchhoffschen Knotenregeln auf das Schaltbild in Abbildung 2.5 (S. 14) ergeben sich folgende Gleichungen:

$$\begin{aligned} I_0 - C_S \frac{dV_P(t)}{dt} - \frac{1}{R_A} V_P(t) + \frac{1}{R_A} V_M(t) &= 0 \\ \frac{1}{R_A} V_P(t) - \left(\frac{1}{R_A} + \frac{1}{R_M^*(t)} \right) V_M(t) - C_M \frac{dV_M(t)}{dt} &= 0 \end{aligned} \quad (2.16)$$

Durch Eliminieren von $V_M(t)$ lassen sich die beiden Gleichungen auf eine Gleichung reduzieren. Aufgelöst nach $R_M^*(t)$ ergibt sich:

$$R_M^*(t) = \frac{V_P(t) - I_0 R_A + C_S R_A \frac{dV_P(t)}{dt}}{I_0 + C_S \frac{dV_P(t)}{dt} - C_M \frac{dV_P(t)}{dt} - C_S C_M R_A \frac{d^2 V_P(t)}{dt^2}} \quad (2.17)$$

Nach Filterung der Spannungsmessung $V_P(t)$ an Poren durch einen digitalen Butterworth Tiefpass 2. Ordnung mit einer Grenzfrequenz von $f_G = 50 \text{ Hz}$ ergeben sich als Maximalwerte für $dV_P(t)/dt \approx 0.4 \text{ V/s}$ und für $d^2 V_P(t)/dt^2 \approx 100 \text{ V/s}^2$. Damit sind die Terme in Gleichung 2.17, die entweder $dV_P(t)/dt$ oder $d^2 V_P(t)/dt^2$ enthalten, vernachlässigbar. Als gute Näherung ergibt sich für R_M^* :

$$R_M^*(t) = \frac{V_P(t)}{I_0} - R_A \quad (2.18)$$

Da für den Porenwiderstand $R_P(t) \approx R_M^*(t)$ gilt, folgt für den Porenradius:

$$r_P(t) = \sqrt{\frac{\rho d_{mem}}{R_M^*(t) \pi}} \quad (2.19)$$

Hierbei ist $\rho = 260 \text{ k}\Omega\text{cm}$ der spezifische Widerstand der Lösung im Inneren des Vesikels und $d_{mem} = 4 \text{ nm}$ die Dicke einer POPC-Membran. Ein Wert für R_A ergibt sich aus dem Minimum $V_{P,min}$ der gemessenen Spannung $V_P(t)$ und dem aus den Videos ermittelten maximalen Porenradius $r_{P,max}$:

$$R_A = \frac{V_{P,min}}{I_0} - R_{P,min} \quad \text{wobei:} \quad R_{P,min} = \frac{\rho d_{mem}}{r_{P,max}^2 \pi} \quad (2.20)$$

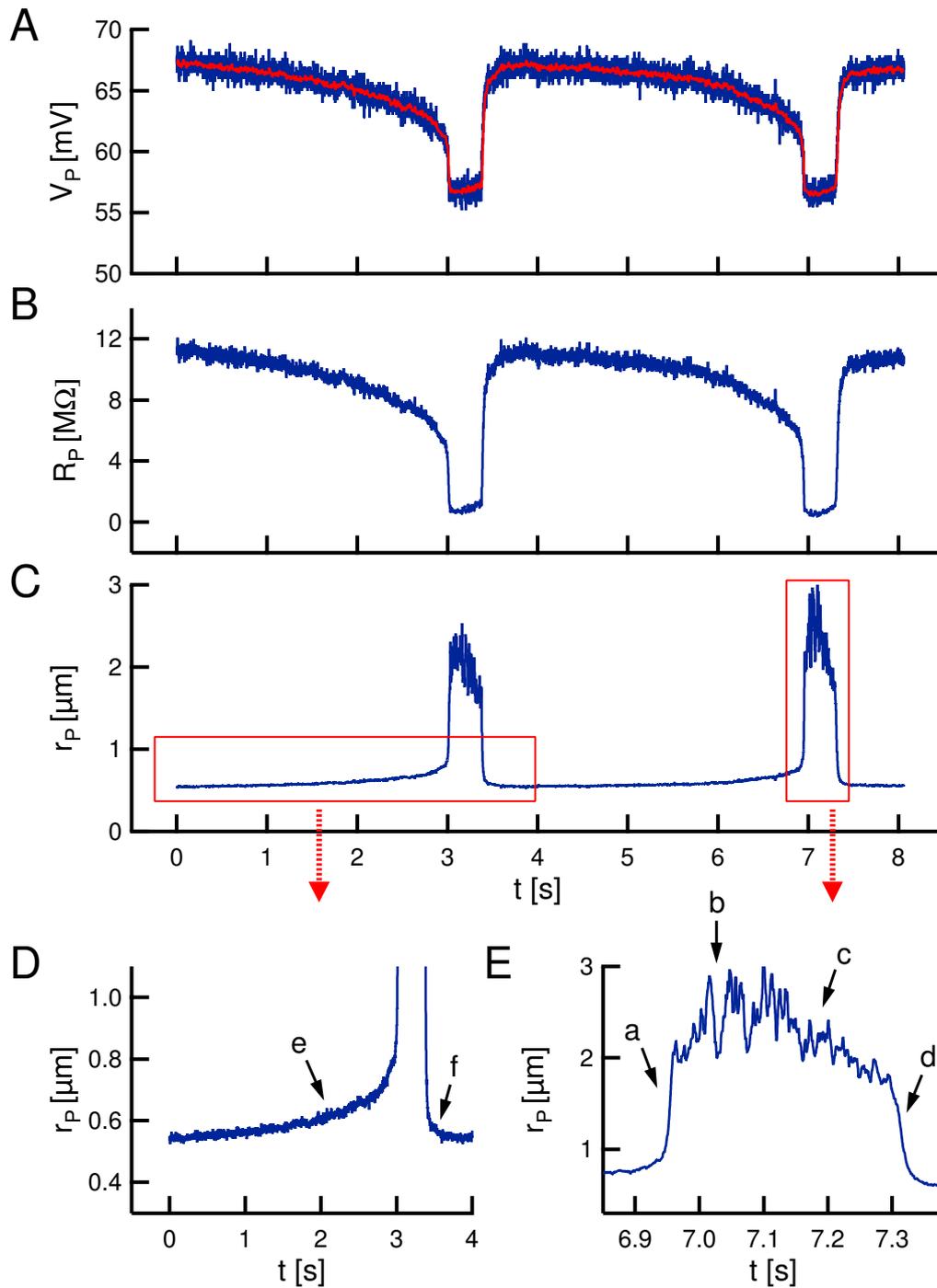


Abbildung 2.58: Ermittlung des Porenradius $r_P(t)$ aus dem gemessenen Spannungssignal $V_P(t)$ bei konstantem Injektionsstrom $I_P(t) = I_0$. **A:** Im Spannungssignal $V_P(t)$ sind zwei Poren als Absenkungen zu erkennen (blau). Durch einen 50 Hz Tiefpass lässt sich das Rauschen reduzieren (rot). **B:** Aus $V_P(t)$ lässt sich $R_P(t)$ berechnen. **C:** Aus $R_P(t)$ lässt sich wiederum $r_P(t)$ berechnen. **D:** Zoom auf die langsame Annäherungs- und Schließphase der ersten Pore (e, f). **E:** Zoom auf die vier optisch sichtbaren Phasen der zweiten Pore (a-d, vergleiche Abbildung 2.56).

Die Werte für die Membrankapazität C_M und die Streukapazität C_S müssen getrennt durch Anfitzen von Spannungsantworten auf Strompulse bestimmt werden.

Abbildung 2.58 zeigt das gemessene Spannungssignal von zwei aufeinander folgenden Poren. Abgebildet sind ebenfalls das gefilterte Signal, der Verlauf von $R_M^*(t) = R_P(t)$ und der daraus ermittelte Porenradius $r_P(t)$. Für die Ermittlung von R_M^* wurde Gleichung 2.17 verwendet. Problematisch war das Fehlen eines zeitlich mit den Spannungsmessungen abgestimmten Videos. Hier wurde deshalb anhand von zeitlich nicht einzuordnenden Porenvideos desselben Vesikels ein maximaler Porenradius von $r_p = 3 \mu\text{m}$ geschätzt. Deswegen und aufgrund des Rauschens wird die Bestimmung von $r_P(t)$ aus $V_P(t)$ mit steigendem $r_P(t)$ ungenauer. Die bisher unbekanntenen Bereiche mit kleinem $r_P(t)$, die vor und nach den vier optisch sichtbaren Phasen liegen, können genauer bestimmt werden. Der schnellen Wachstumsphase (*growth*) geht eine sehr langsame Annäherung (*slow destruction*) an einen kritischen Radius $r_i \approx 1.5 \mu\text{m}$ voraus. Beim Überschreiten dieser Grenze öffnet sich die Pore schlagartig. Außerdem existiert eine langsame Schließphase (*slow resealing*) nach der bisher letzten bekannten Phase des schnellen Schließens (*ultimate closure*).

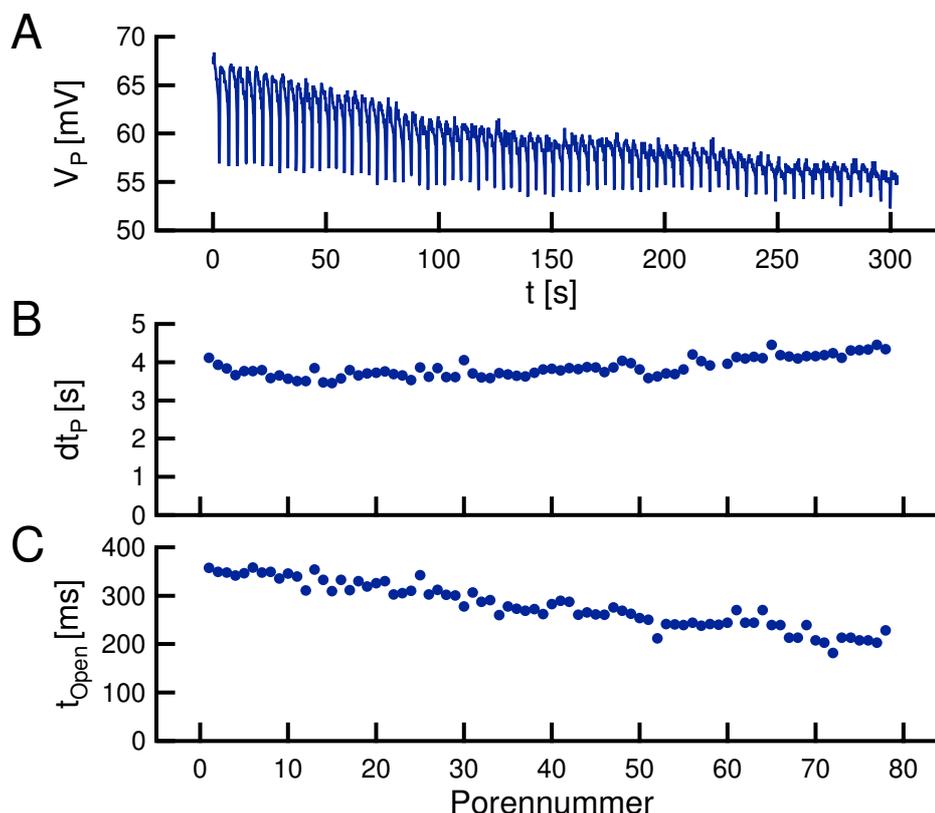


Abbildung 2.59: Ermittlung der zeitlichen Abstände der Poren dt_P sowie ihrer Öffnungszeiten t_{Open} aus dem gemessenen Spannungssignal $V_P(t)$ bei konstantem Injektionsstrom $I_P(t) = 1 \text{ nA}$. **A:** Im Spannungssignal $V_P(t)$ sind 78 Poren als Absenkungen zu erkennen. Die Amplitude sinkt mit der Zeit t ab. **B:** Die Zeitdifferenz dt_P zwischen den schnellen Wachstumsphasen (*growth*) der aufeinander folgenden Poren bleibt nahezu konstant bei durchschnittlich $\overline{dt_P} = 3.86 \pm 0.25 \text{ s}$. **C:** Die Öffnungszeiten der Poren t_{Open} nehmen linear von 360 ms auf 200 ms ab.

In den Experimenten fiel auf, dass, wenn eine Pore beobachtet wurde, oft eine ganze Reihe weiterer Poren folgte. Ein Beispiel hierfür ist auch die Messung in Abbildung 2.57. Bei gleichbleibendem Seal wird meist eine zeitliche Äquidistanz der Poren beobachtet. Durch die Injektion eines konstanten Stromes $I_P(t) = I_0$ lässt sich diese deutlich genauer als durch Videoaufnahmen vermessen. Bestimmt werden kann sowohl die Öffnungszeiten der Poren t_{Open} als auch die zeitlichen Abstände dt_P der Poren zueinander. Die Öffnungszeit einer Pore t_{Open} wird hier als zeitlicher Abstand vom Ende der schnellen Wachstumsphase (*growth*, a) bis zum Anfang des schnellen Schließens (*ultimate closure*, d) definiert. Der zeitliche Abstand zweier Poren dt_P bezieht sich ebenfalls auf die jeweiligen Enden der schnellen Wachstumsphasen.

In Abbildung 2.59 ist die Spannungskurve $V_P(t)$ einer Folge von 78 Poren dargestellt. Hier wurde ein Injektionsstrom von $I_0 = 1$ nA angelegt. Auffallend ist das langsame Absinken der Amplitude mit der Zeit t . Dies ist auf den immer schlechter werdenden Membran-Pipetten-Kontakt zurückzuführen. Der zeitliche Abstand der Poren dt_P zueinander ist erstaunlich konstant. Er liegt bei durchschnittlich $\bar{dt}_P = 3.86 \pm 0.25$ s. Die Öffnungszeit der Poren t_{Open} dagegen nimmt linear von 360 ms auf 200 ms ab.

2.6.2 Budding

Ein weiterer häufig auftretender Effekt ist das sogenannte *Budding*. Ursprünglich wurde hiermit die Bildung eines kleinen Tochter- oder Bud-Vesikels aus einem großen Muttervesikel heraus bezeichnet. Ursache für diese Transformation kann eine Änderung der Temperatur, der Osmolarität oder der Lipidzusammensetzung sein [Käs91, Ber90]. Bemerkenswert dabei ist, dass die Vesikel nach der Abschnürung miteinander verbunden bleiben.

In dieser Arbeit wurde die Bildung eines kleinen Tochtervesikels aus der Membran, die bei Poly-L-Lysin beschichteten Pipetten an der Pipette empor floss, beobachtet. Der entstandene kleine Vesikel umgab die Pipette. In den meisten Experimenten zeigte sich ein immer langsamer werdendes Wachsen des Tochtervesikels, das schließlich zum Stillstand kommt. In einigen Fällen kam es jedoch zu einem zyklischen Verhalten. Der entstandene kleinere Vesikel fusionierte mit dem angestochenen Muttervesikel und bildete sich anschließend wieder von neuem. Je größer der Bud-Vesikel war, desto langsamer ging dieser Prozess vonstatten. Bei kleinen Bud-Vesikeln konnte der Vorgang bis zu 37 mal beobachtet werden.

Das Budding trat bei Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten in 21 Prozent aller 77 Experimente auf. Entscheidend war dabei, ob die Pipetten nach der Poly-L-Lysin-Beschichtung noch einmal mit Reinstwasser gespült worden waren oder nicht. Die ungespülten Pipetten zeigten zu 31 Prozent Budding, während die gespülten hingegen nur auf 10 Prozent kamen.

Zwei Budding-Experimente sind in Abbildung 2.60 dargestellt. Während die mit dem Fluorescein/DiI-Filtersatz gemachte Aufnahme A einen angestochenen Vesikel mit einem $15 \mu\text{m}$ großen Tochtervesikel zeigt, ist in Aufnahme B ein Auflichtphoto eines Vesikels mit einem $28 \mu\text{m}$ großen Tochtervesikel zu sehen. Aus diesem zweiten Experiment stammt außerdem die Bildfolge aus neun Stadien des Buddings (C). Die Photos zeigen nur den Ausschnitt um die Pipette. Insgesamt bildeten sich hier dreimal hintereinander Tochtervesikel aus, die immer wieder schlagartig mit dem Muttervesikel fusionierten.

Auch die von den Budding-Experimenten angefertigten Videos lassen sich in Einzelbilder zerlegen. Dadurch kann der Durchmesser der Tochtervesikel d_B vermessen werden. In Abbildung 2.61 ist der zeitliche Verlauf von d_B dargestellt. Da das Budding meistens lang-

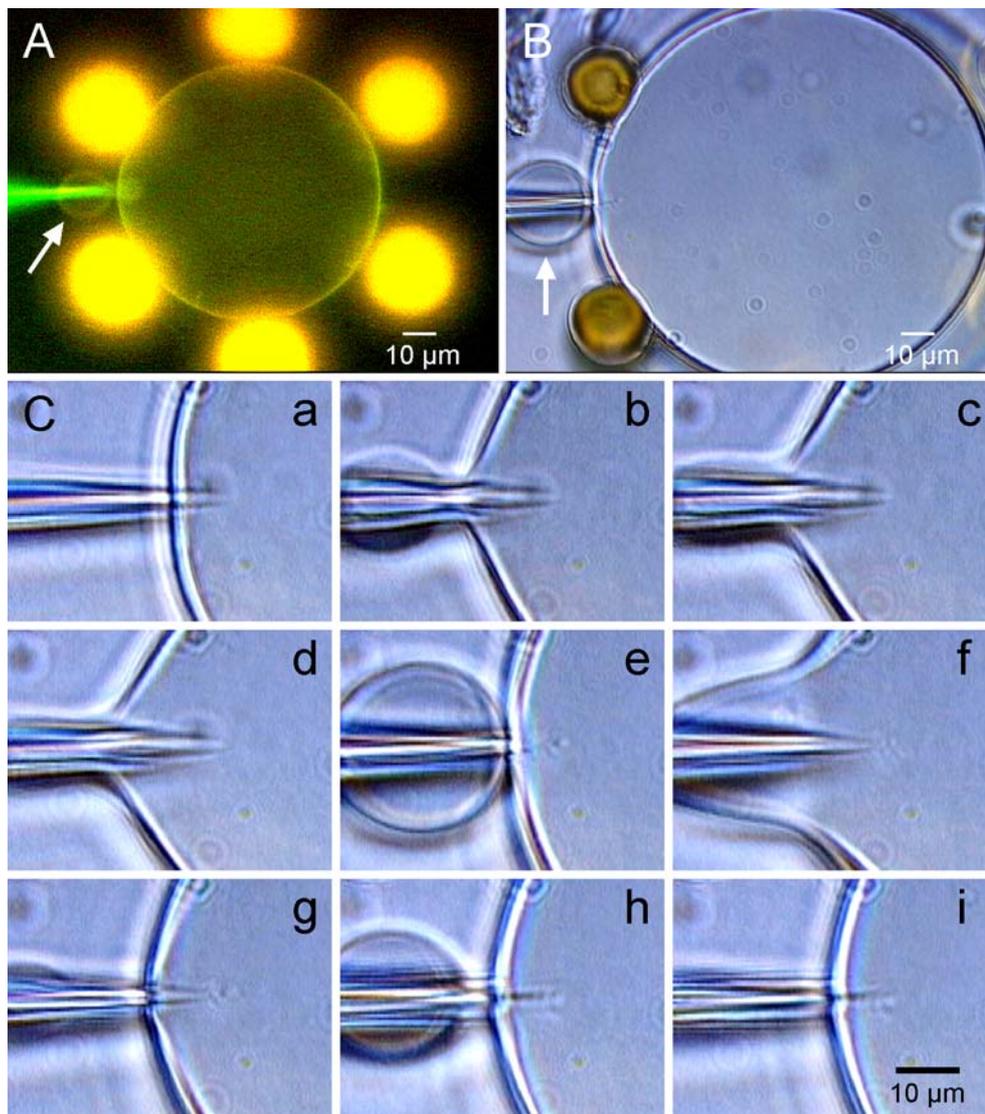


Abbildung 2.60: Budding: Bildung eines Tochtervesikels aus der fließenden Membran auf einer Poly-L-Lysin beschichteten Pipette. **A:** Fluoreszenzaufnahme eines angestochenen Vesikels mit einem $15\mu\text{m}$ großen Tochtervesikel (weißer Pfeil). In diesem Experiment wurde insgesamt acht Mal Budding beobachtet (siehe Abbildung 2.61, B). **B:** Auflichtaufnahme eines angestochenen Vesikels mit einem $28\mu\text{m}$ großen Tochtervesikel (weißer Pfeil). **C:** Die verschiedenen Stadien des in Photo B gezeigten Experiments: Nach dem Anstechen des Muttervesikels von links (**a**, $t = 0\text{ s}$) bildete sich langsam der erste Tochtervesikel um die Pipette (**b**, $t = 5.5\text{ s}$). Nachdem dieser mit dem Muttervesikel fusioniert war (**c**, $t = 6\text{ s}$), behielt die äußere Membran etwas Abstand zur Pipette bei, schnürte sich aber bald wieder ein (**d**, $t = 11.5\text{ s}$). Anschließend bildete sich wieder langsam ein zweiter Tochtervesikel (**e**, $t = 47.5\text{ s}$), der ebenfalls mit dem Muttervesikel fusionierte (**f**, $t = 47.57\text{ s}$). Der letzte Tochtervesikel entstand schon als Abschnürung (**g**, $t = 48\text{ s}$), wuchs zu seiner maximalen Größe an (**h**, $t = 62\text{ s}$) und fusionierte letztendlich ebenfalls. Danach bildete sich kein weiterer Tochtervesikel (**i**, $t = 63.5\text{ s}$). Der genaue zeitliche Verlauf dieses Experiments ist in Abbildung 2.61C dargestellt.

sam ablief, reichte eine Bildwiederholrate von zwei Bildern pro Sekunde. Nur in Graph B wurde anfangs mit 15 Bildern pro Sekunde gearbeitet. Während in Graph A der häufigste Fall des einfachen in Sättigung laufenden Buddings gezeigt ist, ist in Graph B und C mehrfaches Budding zu erkennen. Die Graphen B und C entsprechen den in Abbildung 2.60 gezeigten Photos A und B. In Graph B fällt auf, dass sich das dargestellte achtfache Budding verlangsamt und schließlich wie in Graph A in Sättigung läuft. In Graph C ist dreifaches Budding zu sehen. Neben der enormen Größe des Tochtervesikels von $28 \mu\text{m}$ ist

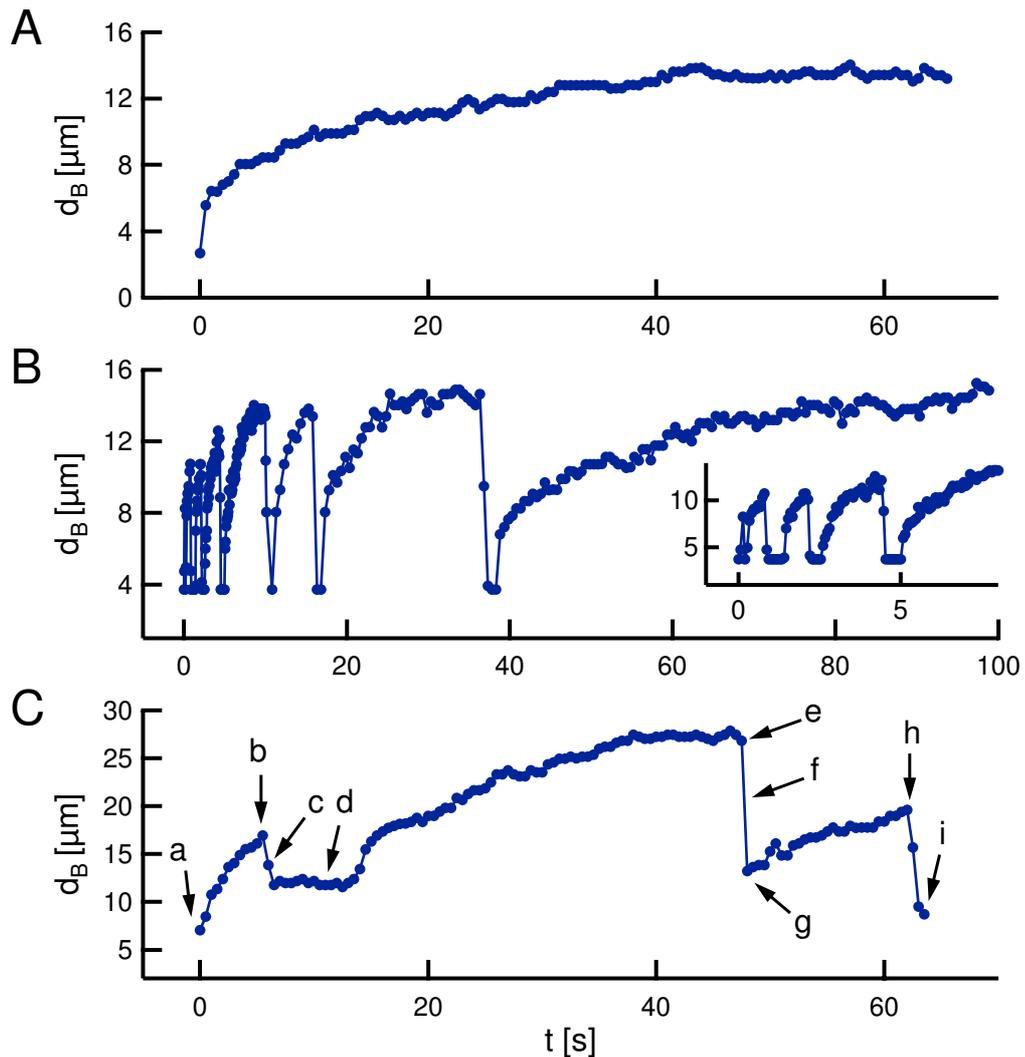


Abbildung 2.61: Drei Beispiele für den zeitlichen Verlauf des Durchmessers d_B eines Tochtervesikels beim Budding auf einer Pipette. **A:** Langsame Bildung eines Bud-Vesikels, der nicht mehr verschwindet. **B:** Der Graph zeigt die achtfache Bildung eines Tochtervesikels. Der Prozess verlangsamt sich dabei immer mehr. Im Graphen enthalten ist eine zweite vergrößerte Darstellung des schnellen Buddings zu Beginn der Messung. **C:** Messung mit dem größten Tochtervesikel. Bei dem dreifachen Budding (**b**, **e**, **h**) verschwinden die Bud-Vesikel nicht vollständig (**d**, **g**). Stattdessen schnüren sich sofort wieder kleine Vesikel ab. Am Ende verschwinden sie vollständig (**i**). Die Photos zu den jeweiligen Stadien (**a-i**) sind in Abbildung 2.60C gezeigt.

außerdem die Tatsache interessant, dass sich die Membran zwischen den einzelnen Buddingzyklen nicht mehr eng an die Pipette anschmiegt. Nach dem ersten Zyklus hält die Membran ein wenig Abstand zur Pipette, während sich nach dem zweiten Mal sofort ein neuer kleiner Tochtervesikel abschnürt. Die Zeitpunkte der in Abbildung 2.60 gezeigten Stadien des Buddings sind gekennzeichnet (a-i).

Wie kommt es nun aber zum Effekt des Buddings auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Anstechpipetten? Einen Anhaltspunkt dazu liefert der von Bar-Ziv et al. entdeckte Effekt des *Pearling* [BZ94]. Sie untersuchten den Einfluss einer optischen Pinzette (*optical tweezers*) auf Lipid tubuli mit Radien von $0.3 - 5 \mu\text{m}$. Die aus DGDG oder DMPC bestehenden Membranröhren waren an ihren Enden verankert. Durch eine kurzzeitige Applikation des Tweezers ($0.2 - 2 \text{ s}$) initiierten sie eine sinusförmige Instabilität in den Tubuli, die sich in beide Richtungen mit konstanter Geschwindigkeit fortpflanzte. Bei längerer und stärkerer Einwirkung des optical tweezers verstärkte sich die Instabilität bis zu einer Abschnürung von kleinen Vesikeln, die durch dünne Röhren (*tubes*) verbunden blieben. Das Auftreten der periodischen Instabilität konnte als Wettstreit zwischen Oberflächenspannung (*surface tension*) und Krümmungsenergie (*curvature*) der Membran erklärt werden.

In einem kleinen Nebenexperiment, das genauer in Anhang A.3 beschrieben wird, konnte der Effekt des Pearlings nachgestellt werden. Mit Hilfe einer einfachen Anstechpipette konnte durch Ziehen an einseitig verankerten Lipid tubuli die reversible Abschnürung kleiner Minivesikel beobachtet werden.

Hier ist jedoch das System ein wenig komplizierter. Trotzdem soll ein Erklärungsansatz vorgestellt werden:

- Der Effekt setzt eine auf der Pipette gleitende Membran voraus. Da sich die Membran beim Budding von der Pipette löst, kann sie vorher nicht stark an diese gebunden sein. In Zusammenhang mit den starken elektrostatischen Bindungskraften von Poly-L-Lysin an eine DOPME enthaltende Lipidmembran lässt das als Interpretationsmöglichkeit nur die schon in Kapitel 2.5 vorgeschlagene rollende Membranröhre zu. In Abbildung 2.62 wird dieses Modell vorgestellt.
- Das System bleibt während des Buddings in den meisten Fällen elektrisch dicht. Beim Auftreten von Poren verschwindet das Budding in der Regel. Deswegen sind der Tochtervesikel, die rollende Membran und der Muttervesikel als zusammenhängendes System anzusehen. Mutter- und Tochtervesikel bleiben über eine die Pipette

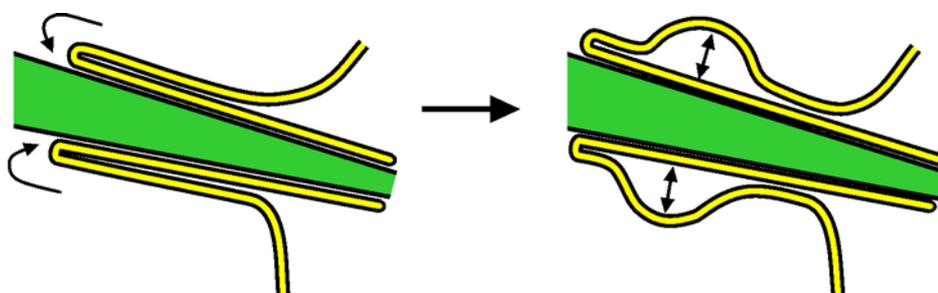


Abbildung 2.62: Modell für das Budding: die fließende Membran besteht aus zwei Membranschichten: Die Innere klebt an der Pipette, die Äußere gleitet auf der Inneren (links). Der Tochtervesikel entsteht als Ausstülpung der äußeren Membranröhre (rechts).

umhüllende Membranröhre trotz der Abschnürung miteinander verbunden. Diese Annahme wird auch durch die Fusionsaufnahmen unterstützt (siehe Abbildung 2.60, Graph C, Photo f).

- Als Ursache des Buddings gilt, ähnlich wie beim Pearling, wahrscheinlich die Minimierung der Gesamtenergie, bestehend aus Oberflächenspannung und Krümmungsenergie. Ein großer Unterschied ist allerdings, dass der minimale Abschnürungsdurchmesser durch die Pipette vorgegeben ist. Interessant ist auch, dass in den Experimenten nie ein zweites Tochtervesikel oberhalb des ersten beobachtet wurde.
- Die Dynamik des Systems kann mit dem durch das fortschreitende Rolling verursachte Ansteigen der Oberflächenspannung der Membran erklärt werden. Möglicherweise werden bei unterschiedlichen Oberflächenspannungen unterschiedliche Buddingzustände begünstigt. Das Budding verlangsamt sich dann wegen des langsamer werdenden Rollings ebenfalls bis zum Stillstand. Der Zusammenhang konnte bisher jedoch noch nicht experimentell verifiziert werden.
- Das Budding wird wahrscheinlich durch die Viskosität der Saccharoselösung im Inneren des Vesikels gebremst. In dem dichten System kann das Volumen des Tochtervesikels nur aus dem Muttervesikel stammen. Da die sich abrollende Membran aber eng anliegt, muss die Lösung durch die Abschnürung hindurch gesaugt werden. Dies behindert das Fortschreiten des Budding.
- Da die Form der Pipette als Kegel angesehen werden kann, wäre es denkbar, dass die Abschnürung oberhalb des Tochtervesikels diesen in Richtung kleinerer Pipetendurchmessern schiebt. Der kleine Vesikel würde also in Richtung Muttervesikel gedrückt. Eventuell erklärt dies auch das wiederholte Fusionieren.
- Das Volumen des Systems kann während des Buddings trotz des leichten Unterdrucks in der Pipette aufgrund des geringen Öffnungsdurchmessers der Spitzen von 360 nm als konstant angesehen werden.

Abschließend soll hier noch erwähnt werden, dass nicht nur symmetrisch um die Pipette entstehende Tochtervesikel, sondern auch halbkugelförmige Vesikel an der Pipette beobachtet wurden. Manchmal tauchen diese sogar gleichzeitig an zwei unterschiedlichen Stellen der Pipette auf.

Kapitel 3

Riesenvesikel auf Chips

Nachdem die in Kapitel 2 beschriebene, neuartige Kontaktierungsmethode für Riesenvesikel entwickelt worden war, wurde sie direkt auf die Kopplung von Vesikeln an Siliziumchips angewendet. Zu näherer Charakterisierung dieses hybriden Systems wurde das Spannungsprofil im Spalt zwischen Vesikeln und Chips vermessen. Der entscheidende Fortschritt gegenüber den bisherigen Messungen [Fro99] lag in der, bei Riesenvesikeln bisher noch nicht angewandten, intrazellulären Anregung. Das Spannungsprofil im Spalt wurde dabei mit Hilfe eines Linienarrays aus Feldeffekttransistoren bestimmt. Durch die Verwendung des Lock-In-Verfahrens konnte auf das frequenz- und ortsabhängige Verhältnis zwischen den Spannungen im Spalt und der Spannung an der Pipette geschlossen werden. Aus den Messungen ließen sich Rückschlüsse über die Membran- und die Spaltleitfähigkeit ziehen. Die zusätzlich durchgeführten extrazellulären Messungen dienten der Verifizierung der Ergebnisse.

3.1 Theorie des Vesikel-Chip-Kontakts

Um die Experimente an Riesenvesikeln korrekt interpretieren zu können, ist es notwendig, ein detailliertes Wissen über die Zell-Chip-Kopplung im Allgemeinen zu besitzen. Dazu gehört die genaue Funktionsweise der verwendeten Feld-Effekt-Transistoren, die Kenntnis der verschiedenen Spalt-Modelle sowie die Herleitung der unterschiedlichen Übertragungsfunktionen. Die Funktionen zum Anfitzen der später vorgestellten Messungen berücksichtigen zum ersten Mal sowohl den Widerstand des Badelektrolyten als auch eine ortsabhängige Spaltbreite. Sie werden in den Kapiteln 3.1.5 (S. 121) und 3.1.6 (S. 130) erklärt. Zum detaillierten Verständnis dieser komplexen Modelle wird das Übertragungsverhalten ausgehend von den einfachsten Theorien in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 schrittweise erklärt. Alle Modelle sind bis auf die idealen intrazellulären Modelle [Wei94] allgemeiner und teilweise korrekter berechnet worden als in vorhergehenden Arbeiten [Kie99, Bra00].

3.1.1 Metallfreie Feldeffekttransistoren

Die Grundidee der Zell-Silizium-Kopplung ist die Messung des Potentials im Elektrolyten unmittelbar an der Oberfläche der Siliziumchips. Hierzu wurden metallfreie Feld-Effekt-Transistoren (FET) entwickelt.

Auf der Suche nach einem geeigneten Halbleiter fiel die Wahl auf Silizium. Dies geschah aus folgenden Gründen [Fro02]:

- Die Silizium-Prozesstechnologie ist eine etablierte Methode, um mikroskopische integrierte Schaltkreise herzustellen.
- Die Oberfläche von Silizium lässt sich durch thermische Verfahren leicht oxidieren. An einer solchermaßen passivierten Grenzfläche zwischen Bad und Chip finden beim Anlegen von Spannungen keine elektrochemischen Prozesse statt. Diese könnten ansonsten zur Korrosion der Chips oder zur Beschädigung der Zellen führen.
- Oxidierte Siliziumchips sind absolut inert und somit optimal für die Zellkultur geeignet.

Die metallfreien Feld-Effekt-Transistoren, die auch *EOSFETs* (*electrolyte-oxide-semiconductors*) genannt werden, ähneln in ihrem Aufbau den gewöhnlichen MOSFETs (*metal-oxide-semiconductors*). Diese bestehen aus zwei in Silizium dotierten Zuleitungen, die *Source* und *Drain* genannt werden. Über dem Bereich zwischen den Zuleitungen befindet sich isoliert durch ein dünnes Oxid ein Metall. Beim EOSFET wird dieses Metall, das auch als *Gate* bezeichnet wird, durch einen Elektrolyten (Bad) ersetzt. Abbildung 3.1 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Transistoren sowie die in dieser Arbeit verwendete Beschaltung.

Das Funktionsprinzip des EOSFETs ist dasselbe wie bei einem gewöhnlichen MOSFET und kann in fast jedem Halbleiterbuch gefunden werden [Sze81]. Deswegen wird hier auf eine ausführliche Herleitung verzichtet und nur das Ergebnis skizziert. Das Grundprinzip

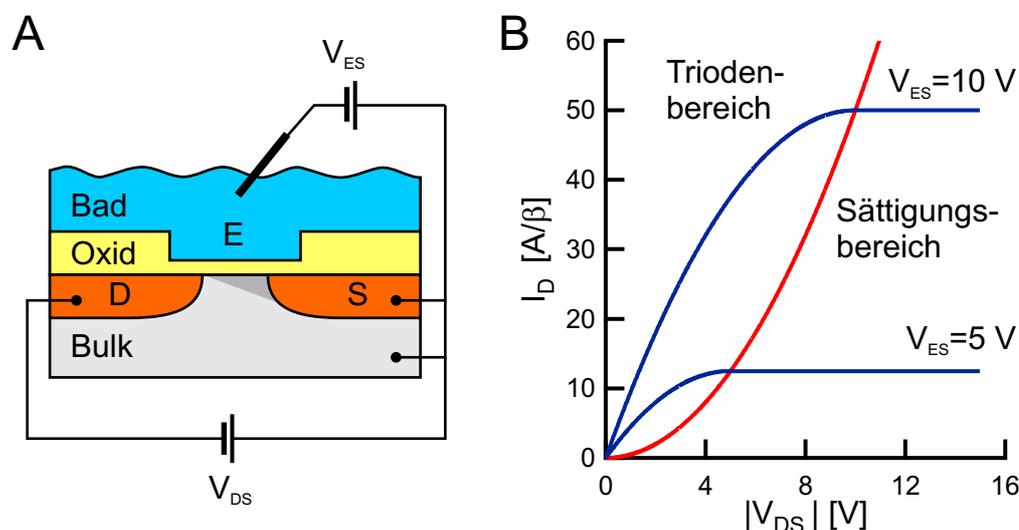


Abbildung 3.1: Grundprinzip des EOSFETs. **A:** Aufbau und Funktion: Das Bad fungiert als das Gate (G) des FETs. Seine Spannung moduliert den Strom zwischen den beiden p-dotierten Zuleitungen (Source=S, Drain=D). Der n-dotierte Silizium-Chip (Bulk) ist vom Bad durch eine dünne Oxidschicht getrennt. Zusätzlich ist die in dieser Arbeit verwendete Beschaltung der Transistoren skizziert. Der Chip liegt dabei gegenüber dem Bad auf einem positiveren Potential. **B:** I_D - V_{DS} -Kennlinie: Aufgetragen ist der Drainstrom I_D gegen die Drain-Source-Spannung V_{DS} für zwei verschiedene Gatespannungen (blau). Die Grenze zwischen Trioden- und Sättigungsbereich wird durch die Kurve $V_{DS} = V_{ES} - V_T$ vorgegeben (rot) (hier $V_T = 0$ V).

eines FETs beruht auf einer Bandverbiegung im Silizium an der Grenzfläche zum Oxid. Sie wird durch die Spannung zwischen Silizium und Gate erzeugt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Chips sind Source und Drain p-dotiert. Der restliche Chip (Bulk) ist n-dotiert. Ohne das Anlegen einer Spannung zwischen Gate und Source ($V_{ES} = 0$) fließt kein Strom zwischen den beiden Zuleitungen, da zwei pn-Dioden gegeneinander geschaltet sind. Der Transistor wird deswegen als *selbstsperrend (normally-off)* bezeichnet. Das Anlegen einer negativen Spannung zwischen Gate und Source ($V_{ES} = \phi_E - \phi_S < 0$ V) führt zu einer positiven Bandverbiegung. Ab einer bestimmten negativen *Schwellspannung* V_T ragt das Valenzband über das Fermi-niveau. Die dabei entstehende leitfähige Schicht aus beweglichen Löchern (p) wird als *Inversionsschicht* oder *p-Kanal* bezeichnet. Beim Anlegen einer ebenfalls negativen Spannung zwischen Drain und Source ($V_{DS} = \phi_D - \phi_S < 0$ V) fließt im p-Kanal der sogenannte *Drainstrom* I_D .

Die Kennlinien der Transistoren $I_D(V_{DS}, V_{ES})$ lassen sich in zwei Bereiche einteilen: den *Trioden-* und den *Sättigungsbereich*. Unterschieden werden die Bereiche je nach Drain-Source-Spannung V_{DS} :

Triodenbereich: $|V_{DS}| < |V_{ES} - V_T|$

$$I_D = k \left((V_{ES} - V_T) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right) \quad (3.1)$$

Sättigungsbereich: $|V_{DS}| \geq |V_{ES} - V_T|$

$$I_D = \frac{1}{2} k (V_{ES} - V_T)^2 \quad (3.2)$$

wobei:

$$k = \mu_p \cdot \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{ox}} \cdot \frac{b}{l} \quad (3.3)$$

mit der Löcherbeweglichkeit μ_p , der relativen Dielektrizitätskonstanten ε_r , der absoluten Dielektrizitätskonstanten des Vakuums ε_0 , der Oxiddicke d_{ox} sowie der Breite b und der Länge l des Gates. Das Verhalten eines FETs ist also durch Angabe der Schwellspannung V_T und der Konstanten k vollständig beschrieben. Während k aus einfachen, bekannten Parametern besteht, setzt sich V_T aus mehreren technologieabhängigen Größen zusammen. Da diese für unsere Transistoren nicht genau bekannt sind, kann V_T nur empirisch bestimmt werden. Letztendlich passt das obige Modell besonders gut auf FETs mit großen Gatebereichen. Dazu zählen auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transistoren: Sie weisen eine Kanallänge von $2 \mu\text{m}$ auf.

Für die Anwendung interessant sind auch die partiellen Ableitungen des Drainstromes I_D . Sie tragen deswegen eigene Namen. Mit *Steilheit (transconductance)* bezeichnet man die Ableitung nach V_{ES} :

$$g_m \equiv \frac{\partial I_D}{\partial V_{ES}} \quad (3.4)$$

während die Ableitung nach V_{DS} *Drainleitwert (channel conductance)* genannt wird:

$$g_D \equiv \frac{\partial I_D}{\partial V_{DS}} \quad (3.5)$$

Daraus folgt für die obigen Bereiche:

Triodenbereich: $|V_{DS}| < |V_{ES} - V_T|$

$$g_m = kV_{DS} \quad , \quad g_D = k(V_{ES} - V_T - V_{DS}) \quad (3.6)$$

Sättigungsbereich: $|V_{DS}| \geq |V_{ES} - V_T|$

$$g_m = k(V_{ES} - V_T) \quad , \quad g_D = 0 \quad (3.7)$$

Für die Messungen in dieser Arbeit ist besonders die Steilheit g_m der Transistoren wichtig. Sie ist im Triodenbereich unabhängig von der Gatespannung V_{ES} . Der Drainstrom I_D ist damit proportional zu V_{ES} . Bei bekannter Steilheit kann deshalb vom Drainstrom I_D auf die gemessene Spannung im Elektrolyten (Gate) zurückgerechnet werden. Der Sättigungsbereich sollte dagegen vermieden werden, da hier die Steilheit g_m von V_{ES} abhängt.

3.1.2 Grundlagen und Nomenklatur des Vesikel-Chip-Kontakts

Schon bei den ersten Versuchen, Zellen auf oxidierten Siliziumchips aufzubringen, stellte sich heraus, dass die beiden Kompartimente keine elektrisch dichte ohmsche Verbindung eingehen [Fro91]. Zwischen Zelle und Chip existiert vielmehr ein mit einem Elektrolyt gefüllter Spalt. Die Breite d_J dieses Spalts, der auch *Junction* genannt wird, hängt sowohl von der Zellsorte als auch von der Beschichtung der Chips ab. Sie kann mit der schon in Kapitel 2.2.5 vorgestellten FLIC-Methode vermessen werden. Für die in dieser Arbeit verwendete BSA-Beschichtung ergab sich für Riesenvesikel ein Abstand von $d_J = 93 \pm 14$ nm. Dieser Abstand kann bei der Verwendung von Poly-L-Lysin als Beschichtung deutlich auf $d_J = 1.1 \pm 0.2$ nm verringert werden [Fro99]. Derartig stark adhärierte Vesikel sind aber für Anstechexperimente zu stark gespannt (siehe Kapitel 2.2.4).

Für die theoretische Beschreibung des Messsystems wird die Vesikelmembran in zwei Teilmembranen unterteilt. Die am Chip anliegende Membran wird als *Junctionmembran* bezeichnet. Der übrige Bereich, der mit dem Elektrolyt des Bades in Kontakt ist, stellt die *freie Membran* dar. Im Folgenden wird immer von einem kugelförmigen Vesikel mit Radius a_V und einer kreisförmigen Junctionmembran mit Radius a_J ausgegangen. Für die Flächen der freien Membran A_{FM} und der Junctionmembran A_{JM} sowie das Flächenverhältnis β ergibt sich deshalb:

$$A_{JM} = \pi a_J^2 \quad , \quad A_{FM} \approx 4\pi a_V^2 - A_{JM} \quad , \quad \beta = \frac{A_{JM}}{A_{FM}} \quad (3.8)$$

Um im Spalt ein mit FETs messbares Spannungsprofil zu erzeugen, gibt es zwei Methoden: die extrazelluläre und die intrazelluläre Anregung. Für die intrazelluläre Methode ist es notwendig, den Innenraum der Zellen elektrisch zu kontaktieren und die Membranspannung direkt zu kontrollieren. Sie wurde erstmals von R. Weis et al. [Wei96] verwendet. Er vermaß mit acht Transistoren das Spannungsprofil unter gepatchten Blutegelneuronen. Später gelang es S. Vassanelli et al. unter angestochenen Froscheiern (Oozyten) die Spannung mit 32 Transistoren zu detektieren [Vas02]. Die extrazelluläre Methode wurde bisher hauptsächlich für Zellen verwendet, deren Inneres nicht verlässlich zu kontaktieren war. Das anregende Signal wird in diesen Fällen direkt an das die Zellen umgebende Bad angelegt. V. Kießling vermochte als erster auf diese Weise Spannungsprofile unter fusionierten Riesenerthrozyten sowie unter Schneckenneuronen zu vermessen. Er wendete die Methode ebenfalls auf Riesenvesikel an, die auf Poly-L-Lysin adhäriert waren [Fro99].

Um beide Methoden konsistent mit einer Nomenklatur beschreiben zu können, müssen zuerst die verwendeten Spannungen als Potentialdifferenzen definiert werden. Dies ist wichtig, da signifikante Unterschiede zu vorhergehenden Promotionsarbeiten und Publikationen bestehen können. Der Grund dafür liegt in der erweiterten Komplexität der hier verwendeten Modelle.

Potentiale:

ϕ_M	Potential im Vesikelinneren, wobei angenommen wird, dass der Innenraum äquipotential ist.
ϕ_S	Potential des Chips (Bulk). Dabei werden die Transistorstrukturen vernachlässigt.
ϕ_E	Potential, auf dem das Bad unmittelbar an der Badelektrode liegt.
ϕ_{EC}	Potential, auf dem das Bad unmittelbar am Vesikel liegt. Diese Definition ist für hochohmige Elektrolytlösungen wichtig.
$\phi_J(x, y)$	ortsabhängiges Potential im Spalt, dessen Ausdehnung senkrecht zur Chipoberfläche vernachlässigt wird.

Potentialdifferenzen, die gegenüber dem Potential des Bades ϕ_{EC} unmittelbar am Vesikel definiert sind, besitzen als Index nur einen Buchstaben. Sie sind wichtig für den Vergleich mit anderen Arbeiten.

Standard-Spannungen:

$V_M = \phi_M - \phi_{EC}$	die Membranspannung, auch Membranpotential genannt, fällt über der freien Membran ab.
$V_J(x, y) = \phi_J(x, y) - \phi_{EC}$	die Junctionspannung fällt über dem 2D-Widerstand des Spalts ab.
$V_P = \phi_P - \phi_{EC}$	die Anregungsspannung der Pipette bei intrazellulärer Anregung, gültig nur bei Vernachlässigung des Bades.
$V_E = \phi_{EC} - \phi_S$	die Badspannung am Vesikel, bei Vernachlässigung des Bades: Anregungsspannung der extrazellulären Anregung.

Bei den späteren Modellen werden außerdem folgende Spannungen verwendet:

zusätzliche Spannungen:

$V_{JM}(x, y) = \phi_M - \phi_J(x, y)$	Junctionmembranspannung (JM=Junctionmembran)
$V_{JS}(x, y) = \phi_J(x, y) - \phi_S$	Gatespannung der FETs
$V_{ES} = \phi_E - \phi_S$	Anregungsspannung bei extrazellulärer Anregung
$V_{PE} = \phi_P - \phi_E$	Anregungsspannung bei intrazellulärer Anregung
$V_{ME} = \phi_M - \phi_E$	Membranspannung

An dieser Stelle soll bereits darauf hingewiesen werden, dass in allen später untersuchten Modellen die gesuchte Spannung die Gatespannung V_{JS} ist. Diese kann je nach Modell identisch mit der Junctionspannung V_J sein. Um einer Verwechslung der Spannungen zuvorzukommen, wird dieser Sachverhalt in jedem Modell als erstes geklärt.

Es existieren zwei Grundmodelle mit deren Hilfe der Spalt elektrisch beschrieben werden kann. Beim sogenannten *Flächenkontaktmodell* wird der Spalt als zweidimensionaler

Kern-Mantel-Leiter betrachtet. Sein Elektrolyt-Kern wird dabei durch den Schichtwiderstand r_J repräsentiert. Der Mantel wird auf der einen Seite durch die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} und auf der anderen Seite durch die spezifische Membrankapazität c_{JM} und die spezifische Membranleitfähigkeit g_{JM} gebildet. Im *Punktkontaktmodell* dagegen wird der Spalt durch globale Bauteile beschrieben. Die Leitfähigkeit $G_J = 1/R_J$, auch *Junctionleitfähigkeit* genannt, repräsentiert den Elektrolyten im Spalt. Die Junctionmembran wird durch die Leitfähigkeit $G_{JM} = 1/R_{JM}$ und die Kapazität C_{JM} beschrieben, das Oxid

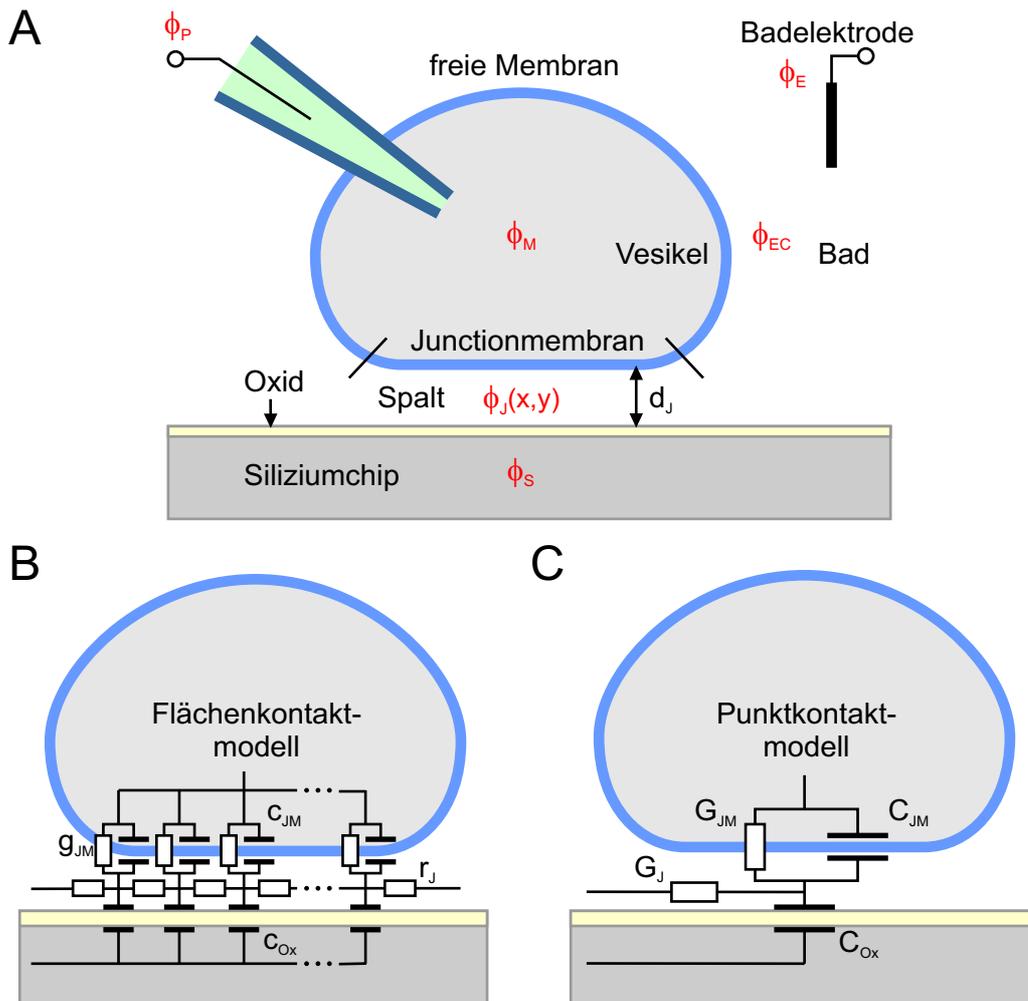


Abbildung 3.2: Der Vesikel-Chip-Kontakt. **A:** Kopplung eines Riesenvesikels an einen oxidierten Silizium-Chip. Beide Teile des hybriden Systems sind durch den Spalt (Junction) getrennt. Die Vesikelmembran wird in freie Membran und Junctionmembran unterteilt. Eingezeichnete Potentialdefinitionen: Vesikellinneres ϕ_M , Chip ϕ_S , Badelektrode ϕ_E , Badpotential unmittelbar am Vesikel ϕ_{EC} , ortsabhängiges Potential im Spalt $\phi_J(x,y)$. **B:** Im Flächenkontaktmodell wird der Spalt durch die 2D-Kabeltheorie beschrieben. Dabei repräsentieren g_{JM} und c_{JM} die spezifische Leitfähigkeit und Kapazität der Junctionmembran, c_{Ox} die spezifische Kapazität des Oxides und r_J den Schichtwiderstand des Spalts. **C:** Im Punktkontaktmodell gibt es nur globale Bauteile. Dabei handelt es sich um die Gesamtleitfähigkeit der Junctionmembran G_{JM} , die entsprechende Kapazität C_{JM} , die Gesamtkapazität des Oxides C_{Ox} und die Ersatzleitfähigkeit der Junction G_J .

unter dem Vesikel durch die Kapazität C_{Ox} . In Abbildung 3.2 werden obige Potentialdefinitionen sowie das Flächenkontaktmodell und das Punktkontaktmodell veranschaulicht.

Analog den Definitionen für die Junction werden zusätzlich noch Parameter für die freie Membran benötigt. Auch sie kann durch eine Leitfähigkeit $G_{FM} = 1/R_{FM}$ und eine Kapazität C_{FM} beschrieben werden. Die entsprechenden spezifischen Größen sind g_{FM} und c_{FM} .

Wichtig für die intrazellulären Modelle sind außerdem der Zugangswiderstand R_A und die Streukapazität C_S der Pipette sowie der Leckwiderstand R_L des Membran-Pipetten-Kontakts.

Der Zusammenhang zwischen den spezifischen Größen und den globalen Parametern ist über die Flächen von freier Membran und Junctionmembran gegeben:

$$\begin{aligned} C_{FM} &= c_{FM}A_{FM} & G_{FM} &= g_{FM}A_{FM} \\ C_{JM} &= c_{JM}A_{JM} & G_{JM} &= g_{JM}A_{JM} \\ C_{Ox} &= c_{Ox}A_{JM} & G_J &= g_JA_{JM} \end{aligned} \quad (3.9)$$

Die hier neu definierte spezifische Junctionleitfähigkeit g_J hängt unmittelbar von dem Flächen- oder Schichtwiderstand r_J des Spalts ab [Wei97]:

$$\frac{1}{G_J} = \frac{r_J}{5\pi} \quad , \quad G_J = g_JA_{JM} \quad \Rightarrow \quad g_J = \frac{5\pi}{r_JA_{JM}} \quad (3.10)$$

Der Flächenwiderstand r_J wiederum setzt sich aus der Leitfähigkeit des Elektrolyten im Spalt ρ_J und dem Adhäsionsabstand des Vesikels d_J zusammen:

$$r_J = \frac{\rho_J}{d_J} \quad (3.11)$$

In einigen Modellen wird zusätzlich zu den bisher genannten Parametern noch die Leitfähigkeit des Badelektrolyten $G_{Bad} = 1/R_{Bad}$ verwendet. Zusätzlich wird die spezifische Leitfähigkeit des Bades $g_{Bad} = G_{Bad}/A_{JM}$ eingeführt. Dieser rein virtuelle Parameter dient der Vereinfachung einiger Formeln. Bei einem höheren Badwiderstand spielt zusätzlich noch die Kapazität des, nicht vom Vesikel bedeckten, Oxides C_{Ox2} eine Rolle. Der entsprechende virtuelle Parameter ist die spezifische Kapazität $c_{Ox2} = C_{Ox2}/A_{JM}$.

3.1.3 Intrazelluläres Punktkontaktmodell

Das Punktkontaktmodell beschreibt den Spalt durch einzelne globale Bauelemente. Es dient zum prinzipiellen Verständnis der Vorgänge in der Junction, liefert aber naturgemäß keine Beschreibung des örtlichen Spannungsprofils im Spalt. Im intrazellulären Punktkontaktmodell wird die Anregungsspannung $V_{PE} = \phi_P - \phi_E$ zwischen Pipette und Badelektrode angelegt und die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$ zwischen Junction und Chip detektiert. Alle folgenden Modellen werden für den Fall einer sinusförmigen Stimulation mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$ gelöst. Es gilt also:

$$\begin{aligned} V_{PE}(t) &= \bar{V}_{PE}(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \\ V_{JS}(t) &= \bar{V}_{JS}(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \end{aligned} \quad (3.12)$$

Ideales intrazelluläres Punktkontaktmodell

In diesem Modell wird der Einfluss der Pipette und des Bades komplett vernachlässigt. Die Potenziale in der Pipette ϕ_P und im Vesikel ϕ_M sind identisch. Chip und Bad liegen ebenfalls auf demselben Potenzial.

Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_1^I(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\left. \begin{array}{l} \phi_M = \phi_P \\ \phi_S = \phi_E = \phi_{EC} \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_{JS} = V_J \\ V_{PE} = V_P = V_M \end{array} \right\} \Rightarrow h_1^I(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_M(\omega)} \quad (3.13)$$

Aus den Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregeln ergibt sich [Wei97]:

$$h_1^I(\omega) = \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_M(\omega)} = \frac{G_{JM} + i\omega C_{JM}}{G_{JM} + G_J + i\omega(C_{JM} + C_J)} = \frac{1 + i\omega\tau_{JM}}{1 + i\omega\tau_J} h_{1,0}^I \quad (3.14)$$

mit den Zeitkonstanten:

$$\begin{aligned} \tau_{JM} &= \frac{C_{JM}}{G_{JM}} = \frac{c_{JM}}{g_{JM}} \\ \tau_J &= \frac{C_{JM} + C_{Ox}}{G_{JM} + G_J} = \frac{c_{JM} + c_{Ox}}{g_{JM} + g_J} \end{aligned} \quad (3.15)$$

und den Limes:

$$\begin{aligned} h_{1,0}^I &= \lim_{\omega \rightarrow 0} h_1^I(\omega) = \frac{G_{JM}}{G_J + G_{JM}} = \frac{g_{JM}}{g_J + g_{JM}} \\ h_{1,\infty}^I &= \lim_{\omega \rightarrow \infty} h_1^I(\omega) = \frac{\tau_{JM}}{\tau_J} h_{1,0}^I = \frac{C_{JM}}{C_{JM} + C_{Ox}} = \frac{c_{JM}}{c_{JM} + c_{Ox}} \end{aligned} \quad (3.16)$$

Sowohl für hohe als auch für niedrige Frequenzen wird die Übertragungsfunktion rein reell. Die Phase geht in beiden Fällen gegen null. Für hohe Frequenzen wird das Verhalten durch einen kapazitiven Spannungsteiler aus C_{JM} und C_{Ox} beschrieben, für niedrige Frequenzen dagegen durch einen ohmschen Spannungsteiler aus G_{JM} und G_J .

Für Betrag $|h_1^I(\omega)|$ und Phase φ_1^I der Übertragungsfunktion $h_1^I(\omega)$ ergeben sich:

$$\begin{aligned} |h_1^I(\omega)|^2 &= \frac{1}{1 + (\omega\tau_J)^2} h_{1,0}^I{}^2 + \frac{(\omega\tau_J)^2}{1 + (\omega\tau_J)^2} h_{1,\infty}^I{}^2 = \frac{1 + (\omega\tau_{JM})^2}{1 + (\omega\tau_J)^2} h_{1,0}^I{}^2 \\ \tan \varphi_1^I &= \frac{1}{(\omega\tau_{JM})^{-1} + \omega\tau_J} \left(1 - \frac{\tau_J}{\tau_{JM}} \right) = \frac{\omega(\tau_{JM} - \tau_J)}{1 + \omega^2\tau_{JM}\tau_J} \end{aligned} \quad (3.17)$$

Beim Betrachten der Übertragungsfunktion fällt auf, dass sie sich als Produkt zweier Komponenten darstellen lässt, die jeweils nur eine der beiden Zeitkonstanten enthalten:

$$h_1^I(\omega) = h_{JM}(\omega)h_J(\omega) \quad (3.18)$$

mit:

$$h_{JM}(\omega) = 1 + i\omega\tau_{JM} \quad , \quad h_J(\omega) = \frac{h_{1,0}^I}{1 + i\omega\tau_J} \quad (3.19)$$

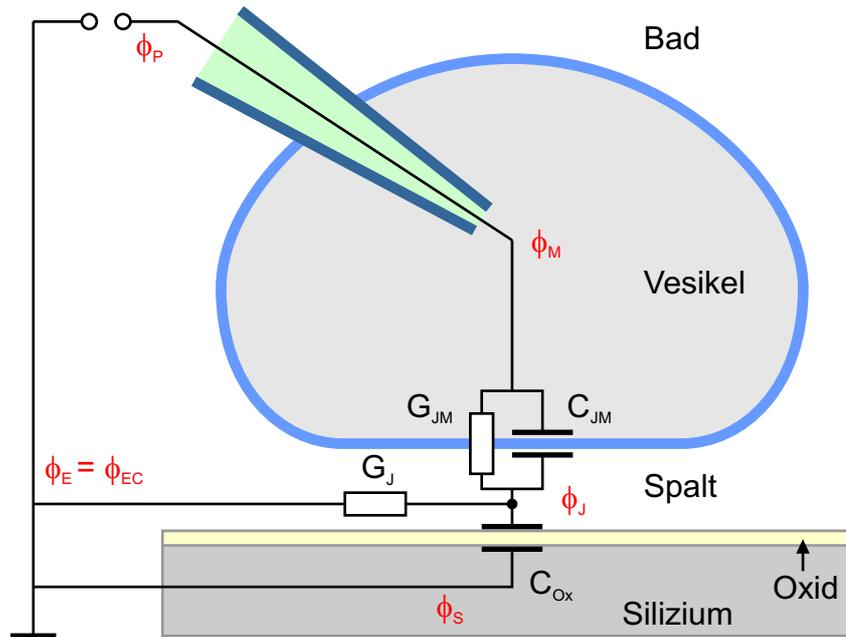


Abbildung 3.3: Vereinfachter Schaltplan für intrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell. Die Pipette und das Bad werden vernachlässigt, so dass die anregende Spannung V_{PE} direkt über der Vesikelmembran abfällt $V_M = V_{PE}$. Die FETs messen die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$. Bauteilnomenklatur entsprechend Kapitel 3.1.2.

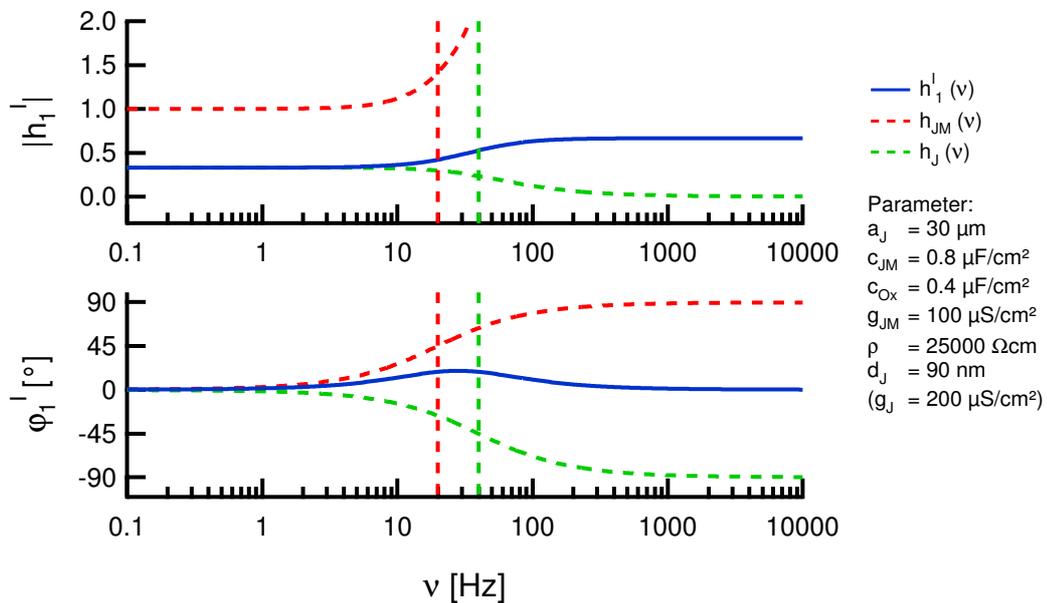


Abbildung 3.4: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_1^I(v)$ bei intrazellulärer Anregung ohne Berücksichtigung von Bad und Pipette (blau). Zusätzlich dargestellt sind die Teilfunktionen h_{JM} (rot) und h_J (grün) sowie Markierungen bei zwei den Zeitkonstanten entsprechenden Frequenzen $\nu_{JM} = 1/(2\pi\tau_{JM})$ (rot) und $\nu_J = 1/(2\pi\tau_J)$ (grün).

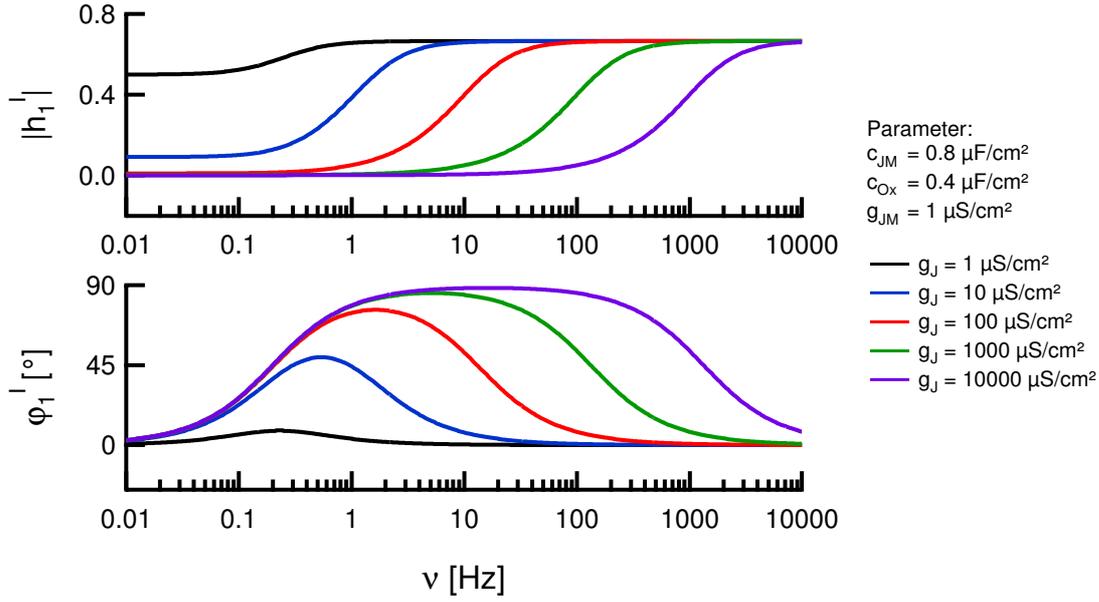


Abbildung 3.5: Mehrere Simulationen von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_1^I(\nu)$ bei intrazellulärer Anregung ohne Berücksichtigung von Bad und Pipette (blau). Variiert wird dabei der Parameter g_J und somit τ_J .

Abbildung 3.4 zeigt ein Beispiel für Betrag und Phase einer Übertragungsfunktion $h_1^I(\omega)$. Ebenfalls eingezeichnet sind die Einzelkomponenten h_{JM} und h_J sowie ihre Grenzfrequenzen $\nu_{JM} = 1/(2\pi\tau_{JM})$ und $\nu_J = 1/(2\pi\tau_J)$. Deutlich erkennbar geht der Betrag bei ν_J vom niederfrequenten in das hochfrequente Plateau über. Die Phase dagegen beginnt bei ν_J anzusteigen und fängt bei ν_{JM} an abzufallen. Das Verhalten ist um so stärker ausgeprägt, je weiter die beiden Grenzfrequenzen auseinander liegen. Dies ist in Abbildung 3.5 besonders gut zu sehen. Hier sind mehrere Übertragungsfunktionen für unterschiedliche Spaltleitfähigkeiten g_J dargestellt. Je größer g_J ist, desto größer ist ν_J , während ν_{JM} hingegen konstant bleibt.

Intrazelluläres Punktkontaktmodell mit Pipette und ohne Bad

In diesem Modell wird der Einfluss der Pipette berücksichtigt, der des Bades jedoch vernachlässigt. Die Potenziale in der Pipette ϕ_P und im Vesikel ϕ_M sind deshalb verschieden. Chip und Bad liegen hingegen auf demselben Potenzial.

Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.6 zu sehen. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_2^I(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\phi_S = \phi_E = \phi_{EC} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_{JS} = V_J \\ V_{PE} = V_P \end{array} \right\} \Rightarrow h_2^I(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} \quad (3.20)$$

Die Übertragungsfunktion setzt sich aus zwei Komponenten zusammen:

$$h_2^I(\omega) = \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_M(\omega)} \frac{\bar{V}_M(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = h_1^I(\omega) h_{Pip}(\omega) \quad (3.21)$$

wobei:

$$\begin{aligned} h_1^I(\omega) &= \frac{\bar{V}_J(\omega)}{\bar{V}_M(\omega)} \\ h_{Pip}(\omega) &= \frac{\bar{V}_M(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = \frac{R_{FM}^*}{R_{FM}^* + R_A + i\omega C_{FM} R_A R_{FM}^*} = \frac{1}{1 + i\omega \tau_{Pip}} h_{Pip,0} \end{aligned} \quad (3.22)$$

mit

$$R_{FM}^* = G_{FM}^*{}^{-1} = (G_{FM} + R_L^{-1})^{-1} \quad (3.23)$$

sowie der Zeitkonstanten:

$$\tau_{Pip} = C_{FM} \frac{R_{FM}^* R_A}{R_{FM}^* + R_A} \quad (3.24)$$

und den Limes:

$$\begin{aligned} h_{Pip,0} &= \lim_{\omega \rightarrow 0} h_{Pip}(\omega) = \frac{R_{FM}^*}{R_{FM}^* + R_A} \\ h_{Pip,\infty} &= \lim_{\omega \rightarrow \infty} h_{Pip}(\omega) = 0 \end{aligned} \quad (3.25)$$

Dabei ist zu beachten, dass $h_1^I(\omega)$ die Übertragungsfunktion aus Formel 3.14 ist. Sie berücksichtigt die Pipette nicht. Ebenso berücksichtigt $h_{Pip}(\omega)$ weder die Junctionmembran noch das Oxid oder die Junction selbst. Pipette und Junction werden also als entkoppelte Vierpole betrachtet, deren Gesamtübertragungsfunktion $h_2^I(\omega)$ als Multiplikation der Einzelübertragungsfunktionen dargestellt werden darf. Dies ist nur für den Fall erlaubt, dass der Pipettenvierpol nicht durch den Junctionvierpol belastet wird. Das entspricht der Forderung:

$$|X_{FM}| \ll |X_{JM} + X_{J,Ox}| \quad (3.26)$$

wobei:

$$X_{FM} = \frac{1}{G_{FM}^* + i\omega C_{FM}}, \quad X_{JM} = \frac{1}{G_{JM} + i\omega C_{JM}}, \quad X_{J,Ox} = \frac{1}{G_J + i\omega C_{Ox}} \quad (3.27)$$

Diese Bedingung reduziert sich bei Vernachlässigung des Leckwiderstandes R_L und unter der Berücksichtigung von $c_M = c_{FM} = c_{JM}$, $g_M = g_{FM} = g_{JM}$ sowie der Gleichungen 3.9 auf:

$$(g_J + g_M)^2 + (c_{Ox} + c_M)^2 \omega^2 \gg \beta^2 (g_J^2 + c_{Ox}^2 \omega^2) \quad (3.28)$$

Da $A_{JM} \ll A_{FM}$ für Riesenvesikel und damit $\beta^2 \ll 1$ ist, wurde diese Bedingung in der vorliegenden Arbeit hinreichend erfüllt. Hinzu kommt, dass die Forderung für einen dichten Membran-Pipetten-Kontakt berechnet wurde. Existiert ein zusätzliches Leck an der Pipette, wie schon oben in Kapitel 2 beschrieben, so sinkt die Ausgangsimpedanz des Pipettenvierpols X_{FM} weiter ab. Die Entkopplungsbedingung ist dann noch besser erfüllt.

Die Tatsache, dass bei der Bestimmung intrazellulärer Übertragungsfunktionen die Spannung über die Pipette angelegt wird, erweist sich als extrem nachteilig. Die Pipette bildet zusammen mit der freien Membran einen Tiefpass, der die Übertragungsfunktion $h_{Pip}(\omega)$ aus Gleichung 3.22 besitzt. Dies führte schon in den Arbeiten von

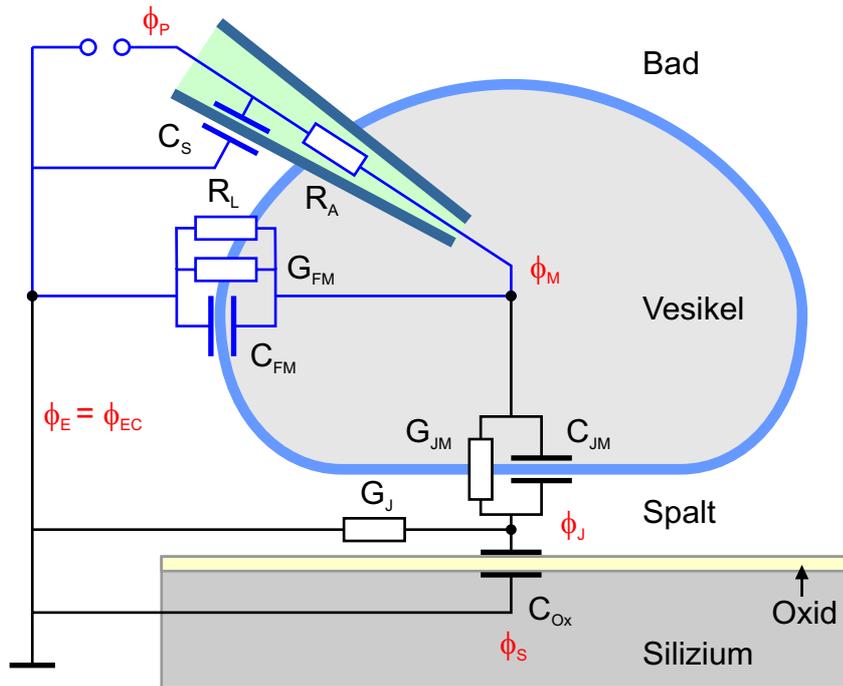


Abbildung 3.6: Schaltplan für intrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell mit Berücksichtigung der Pipette. Die Schaltung lässt sich in den Pipettenvierpol (blau) und den Junctionvierpol (schwarz) unterteilen. Die Bauteilnomenklatur entspricht Kapitel 3.1.2.

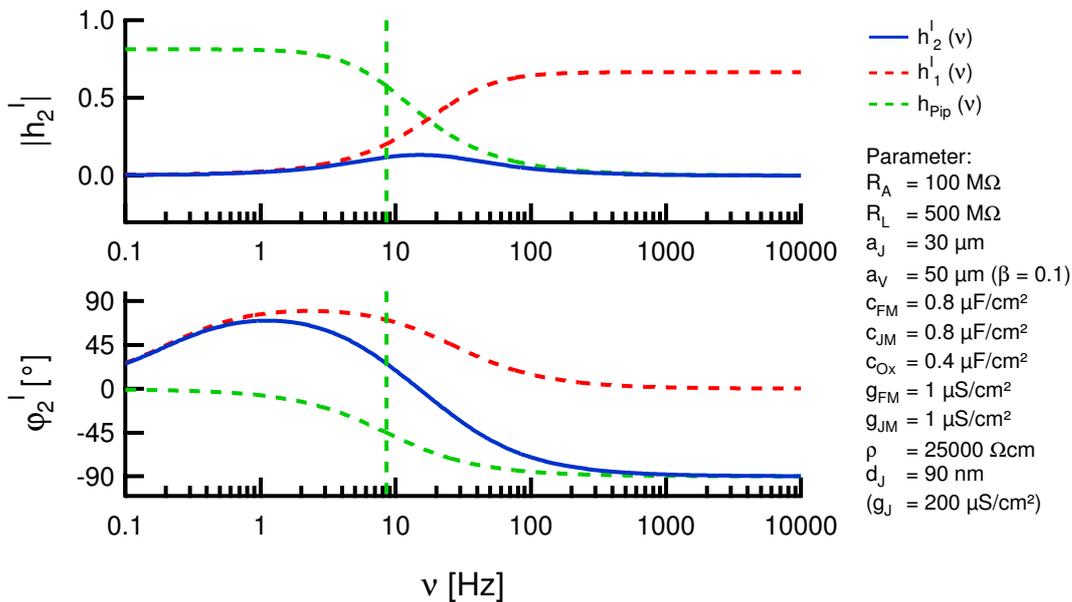


Abbildung 3.7: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_2^I(\nu)$ bei intrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung der Pipette. Das Bad wird vernachlässigt. Zusätzlich dargestellt sind die Teilfunktionen $h_{Pip}(\nu)$ (grün) und $h_1^I(\nu)$ (rot) sowie eine Markierung bei der Grenzfrequenz $\nu_{Pip} = 1/(2\pi\tau_{Pip})$ (grün).

R. Weis et al. [Wei96, Wei97] dazu, dass Messungen bei Grenzfrequenzen des Tiefpasses von $\nu_{Pip} = 1/(2\pi\tau_{Pip}) = 60 - 340$ Hz nur bis $\nu = 5000$ Hz möglich waren. In der vorliegenden Arbeit lagen die Grenzfrequenzen aufgrund der hohen Zugangswiderstände R_A der Anstechpipetten sogar bei nur $8 - 40$ Hz. Abbildung 3.7 zeigt die Übertragungsfunktion $h_2^I(\nu)$ des Gesamtsystems sowie die beiden Einzelübertragungsfunktionen $h_{Pip}(\nu)$ und $h_1^I(\nu)$. Aufgrund der Filterwirkung der Pipette ist in der Junction nur ein kleiner „Buckel“ im Bereich von $1 - 100$ Hz messbar.

Vom physikalischen Standpunkt aus betrachtet, ist es natürlich wünschenswert, die reine Übertragungsfunktion $h_1^I(\omega)$ zu erhalten. Hierzu wurden in den Arbeiten von R. Weis et al. [Wei96, Wei97] gleichzeitig zu den eigentlichen Transistormessungen Zellimpedanzmessungen durchgeführt. Dabei werden sowohl Pipettenstrom I_P als auch Pipettenspannung V_P mit zwei zusätzlichen Lock-In-Verstärkern gemessen. Durch Anfiten der frequenzabhängigen Impedanz $Z(\omega) = V_P(\omega)/I_P(\omega)$ kann auf die effektiven Membranparameter R_M^* und C_M sowie die Pipettenparameter R_A und C_S geschlossen werden. Dabei repräsentieren R_M^* und C_M sowohl die freie Membran als auch die Junction. Die daraus gebildete Übertragungsfunktion der Pipette $h_{Pip,M}(\omega)$ entspricht deshalb auch nicht nur dem Pipettenvierpol, sondern dem Gesamtsystem. Durch Division lässt sich auf die reine Übertragungsfunktion $h_{1,Meas}^I(\omega)$ schließen:

$$h_{1,Meas}^I(\omega) = \frac{h_{2,Meas}^I(\omega)}{h_{Pip,M}(\omega)} \quad \text{mit:} \quad h_{Pip,M}(\omega) = \frac{R_M^*}{R_M^* + R_A + i\omega C_M R_A R_M^*} \quad (3.29)$$

Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls angewendet. Allerdings wurden die Zell- und Pipettenparameter teilweise durch Anfiten von Spannungsantworten auf rechteckige Strompulse bestimmt. Näheres hierzu in Kapitel 3.5.2.

Intrazelluläres Punktkontaktmodell mit Pipette und mit Bad

Bei einer niedrigen Leitfähigkeit des Elektrolyts muss zusätzlich zur Pipette der Badwiderstand berücksichtigt werden. Im Gegensatz zum später folgenden extrazellulären Modell kann die Kapazität des unbedeckten Chipoxides vernachlässigt werden. Bei Messungen bis maximal 10 kHz spielt sie noch keine Rolle. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Definiert werden zwei verschiedene Badpotenziale. Während ϕ_E das Potenzial direkt an der Badelektrode ist, handelt es sich bei ϕ_{EC} um das Badpotenzial unmittelbar am Vesikel. Ermittelt werden soll auch hier wieder die komplexe Übertragungsfunktion $h_3^I(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\left. \begin{array}{l} \phi_S = \phi_E \neq \phi_{EC} \\ \phi_P \neq \phi_M \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_{JS} \neq V_J \\ V_{PE} \neq V_P \end{array} \right\} \Rightarrow h_3^I(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} \quad (3.30)$$

Für die Übertragungsfunktion gilt:

$$h_3^I(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{-a i \omega^3 - b \omega^2 + c i \omega + d}{-e i \omega^3 - f \omega^2 + g i \omega + h} \quad (3.31)$$

wobei die Konstanten a-h positive reelle Konstanten sind, die in Anhang C.1 angegeben sind. Die Struktur der Formel weist auf die Existenz von sechs Zeitkonstanten hin, die allerdings zu umfangreich sind, um hier angegeben werden zu können.

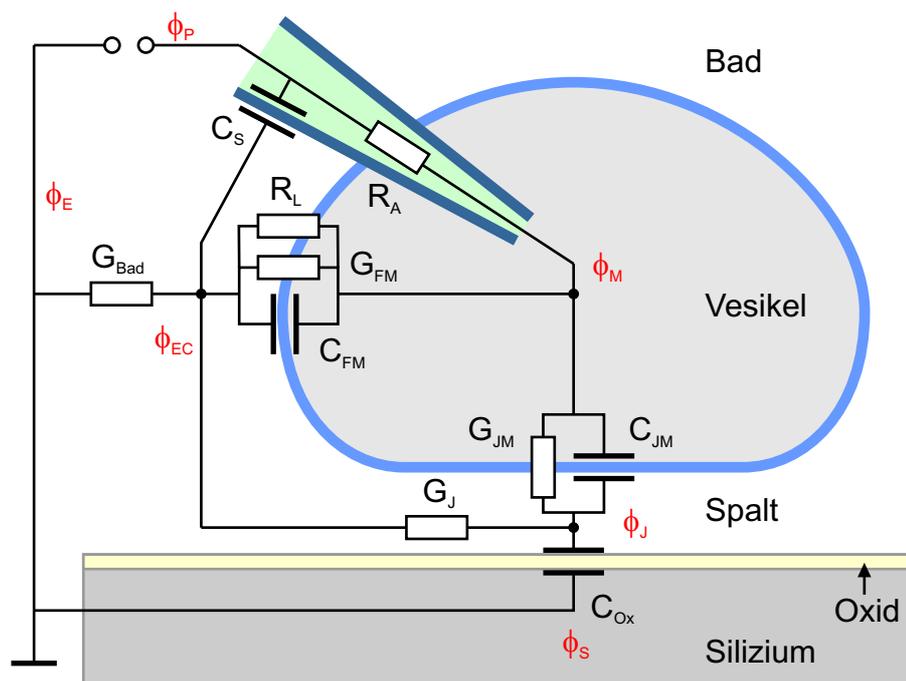


Abbildung 3.8: Schaltplan für intrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell mit Berücksichtigung der Pipette und des Badwiderstandes $R_{Bad} = 1/G_{Bad}$. Im Bad wird unterschieden zwischen dem Potenzial ϕ_E direkt an der Badelektrode und dem Potenzial ϕ_{EC} unmittelbar am Vesikel. Die Bauteilnomenklatur entspricht Kapitel 3.1.2.

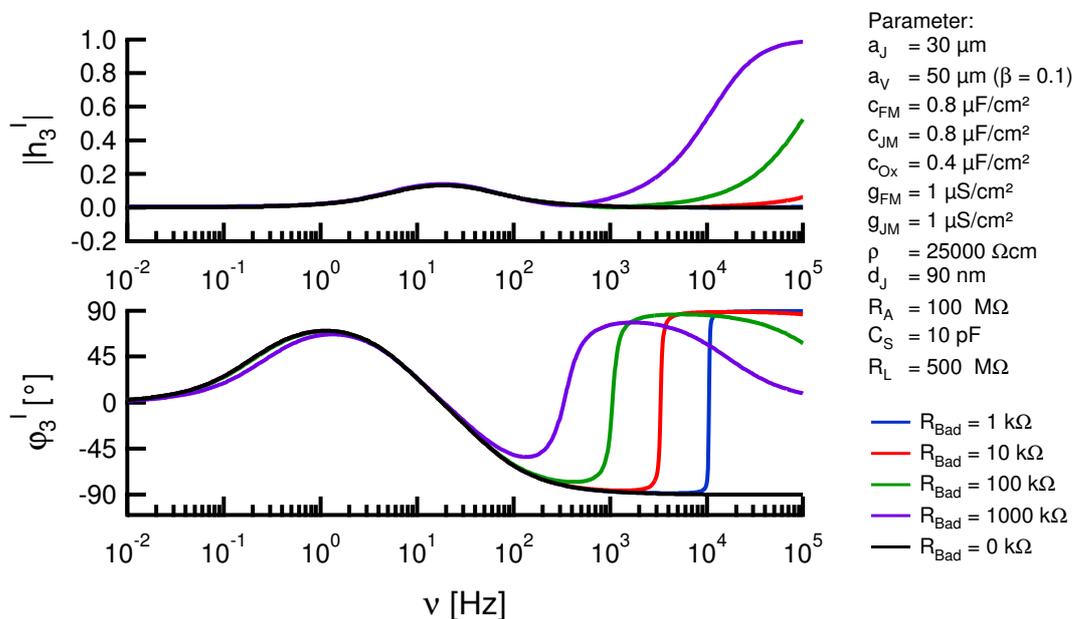


Abbildung 3.9: Mehrere Simulationen von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_3^I(\nu)$ bei intrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung von Bad und Pipette. Variiert wird dabei der Badwiderstand R_{Bad} .

Abbildung 3.9 zeigt die Simulation von Betrag und Phase der komplexen Übertragungsfunktion $h_3^I(\nu)$ unter Berücksichtigung des Badwiderstandes $R_{Bad} = 1/G_{Bad}$. Dieser wurde zwischen 0 und 1000 k Ω variiert. Deutlich zu erkennen ist ein Ansteigen von Betrag und Phase bei höheren Frequenzen. Die Grenze des Anstiegs verschiebt sich mit steigendem Badwiderstand zu niedrigeren Frequenzen. Auffallend ist sowohl in Betrag als auch in Phase die Übereinstimmung der Kurven mit der Übertragungsfunktion ohne Badwiderstand ($R_{bad} = 0$ k Ω , schwarz) bis zum Erreichen des jeweiligen Tales vor dem Anstieg. Dies lässt umgekehrt den Schluss zu, dass sich Messungen bis zu den Tälern ohne Berücksichtigung des Badwiderstandes mit Formel 3.29 interpretieren lassen.

3.1.4 Extrazelluläres Punktkontaktmodell

Bei der extrazellulären Anregung wird keine Pipette verwendet, um das Innere der Vesikel zu kontaktieren. Stattdessen wird das Bad mit der Anregungsspannung $V_{ES} = \phi_E - \phi_S$ gegenüber dem Chip moduliert. Detektiert wird auch hier die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$ zwischen Junction und Chip. Es gilt daher:

$$\begin{aligned} V_{ES}(t) &= \bar{V}_{ES}(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \\ V_{JS}(t) &= \bar{V}_{JS}(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \end{aligned} \quad (3.32)$$

Ideales extrazelluläres Punktkontaktmodell

In diesem Modell wird der Einfluss des Bades vernachlässigt. Chip und Bad befinden sich auf demselben Potenzial. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_1^E(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{ES}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\phi_E = \phi_{EC} \Rightarrow \begin{cases} V_{JS} = V_J + V_{ES} \neq V_J \\ V_{ES} = V_E \end{cases} \Rightarrow h_1^E(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_E(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega) + \bar{V}_E(\omega)}{\bar{V}_E(\omega)} \quad (3.33)$$

Aus den Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregeln erhält man die allgemeine Übertragungsfunktion:

$$h_1^E(\omega) = \frac{-a\omega^2 + bi\omega + c}{-d\omega^2 + ei\omega + c} = \frac{(1 + i\omega\tau_A)(1 + i\omega\tau_B)}{(1 + i\omega\tau_C)(1 + i\omega\tau_D)} \quad (3.34)$$

mit den Zeitkonstanten:

$$\tau_{A/B} = \frac{b \mp \sqrt{b^2 - 4ac}}{2c} \quad \tau_{C/D} = \frac{e \mp \sqrt{e^2 - 4dc}}{2c} \quad (3.35)$$

wobei die Variablen a bis e reelle positive Konstanten sind:

$$\begin{aligned} a &= C_{FM}C_{JM} \\ b &= C_{JM}(G_{FM} + G_J) + C_{FM}(G_J + G_{JM}) \\ c &= G_{FM}G_J + G_{FM}G_{JM} + G_JG_{JM} \\ d &= C_{JM}C_{Ox} + C_{FM}C_{JM} + C_{FM}C_{Ox} \\ e &= C_{JM}(G_{FM} + G_J) + C_{FM}(G_J + G_{JM}) + C_{Ox}(G_{FM} + G_{JM}) \end{aligned} \quad (3.36)$$

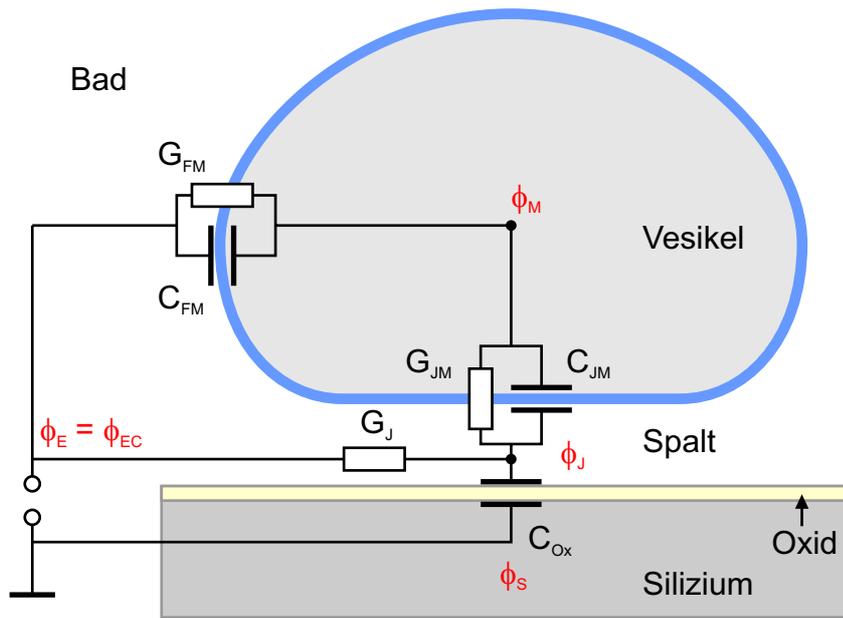


Abbildung 3.10: Schaltplan für extrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell ohne Berücksichtigung eines Badwiderstandes. Die Anregungsspannung V_{ES} wird zwischen Bad und Chip angelegt. Die FETs messen die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$. Bauteilnomenklatur entsprechend Kapitel 3.1.2.

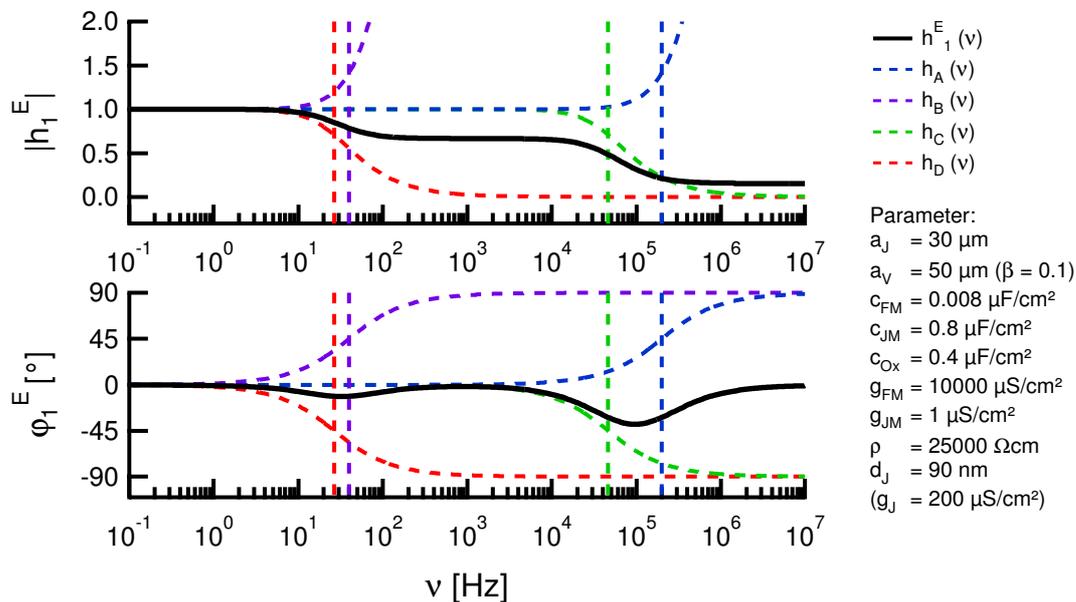


Abbildung 3.11: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_1^E(v)$ bei extrazellulärer Anregung ohne Berücksichtigung des Badwiderstandes (schwarz). Zusätzlich dargestellt sind die Teilfunktionen h_X sowie Markierungen bei den Frequenzen $\nu_X = 1/(2\pi\tau_X)$, die den jeweiligen Zeitkonstanten τ_X entsprechen. Die Parameter sind so gewählt, dass die Zeitkonstanten sich stark unterscheiden, haben aber keine physikalische Relevanz.

Für die Limes ergibt sich:

$$\begin{aligned} h_{1,0}^E &= \lim_{\omega \rightarrow 0} h_1^E(\omega) = 1 \\ h_{1,\infty}^E &= \lim_{\omega \rightarrow \infty} h_1^E(\omega) = \frac{\tau_A \tau_B}{\tau_C \tau_D} = \frac{a}{d} = \frac{C_{FM} C_{JM}}{C_{JM} C_{Ox} + C_{FM} C_{JM} + C_{FM} C_{Ox}} \end{aligned} \quad (3.37)$$

Gleichung 3.34 lässt sie sich als Produkt mehrerer Komponenten darstellen, die jeweils nur eine Zeitkonstante enthalten:

$$h_1^E(\omega) = h_A(\omega) h_B(\omega) h_C(\omega) h_D(\omega) \quad (3.38)$$

mit:

$$\begin{aligned} h_A(\omega) &= 1 + i\omega\tau_A & h_B(\omega) &= 1 + i\omega\tau_B \\ h_C(\omega) &= \frac{1}{1 + i\omega\tau_C} & h_D(\omega) &= \frac{1}{1 + i\omega\tau_D} \end{aligned} \quad (3.39)$$

Wie sich die allgemeine extrazelluläre Übertragungsfunktion $h_1^I(\omega)$ aus diesen vier einzelnen Teilfunktionen zusammensetzt, zeigt Abbildung 3.11. Die für die dargestellte Simulation ausgewählten Parameter der freien Membran sind so gewählt, dass die Grundstruktur der Übertragungsfunktion gut zu erkennen ist. Sie besitzen deswegen keine physikalische Relevanz. Jeder Zeitkonstanten τ_X wird eine Grenzfrequenz $\nu_X = 1/(2\pi\tau_X)$ zugeordnet ($X = A, B, C, D$). Von tiefen Frequenzen kommend bestimmen ν_C und ν_D das Absinken von sowohl Betrag als auch Phase der Übertragungsfunktion. Bei ν_A und ν_B dagegen beginnen die anschließenden Betrags-Plateaus, die mit einer Steigerung der Phase einhergehen.

In Abbildung 3.12 wird der Einfluss der Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} bei realistischen Parametern demonstriert. Ab $g_{JM} = 100 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ treten zwei Stufen auf, von denen die erste kaum zu erkennen ist (Markierung a). Die Hauptstufe des Betrags inklusive des entsprechenden Phasentales verschiebt sich mit steigendem g_{JM} hin zu höheren Frequenzen.

Bei identischen Eigenschaften von Junctionmembran und freier Membran ($c_M = c_{FM} = c_{JM}$, $g_M = g_{FM} = g_{JM}$) sowie unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.9 vereinfachen sich die Zeitkonstanten deutlich:

$$\begin{aligned} \tau_A &= \frac{c_M}{g_M + g_J(1 + \beta)} & \tau_B &= \frac{c_M}{g_M} \\ \tau_C &= \frac{c_M + c_{Ox}(1 + \beta)}{g_M + g_J(1 + \beta)} & \tau_D &= \frac{c_M}{g_M} \end{aligned} \quad (3.40)$$

Da τ_B und τ_D identisch sind, erhält man für die Übertragungsfunktion:

$$h_2^E(\omega) = \frac{1 + i\omega\tau_A}{1 + i\omega\tau_C} = \frac{g_M + g_J(1 + \beta) + i\omega c_M}{g_M + g_J(1 + \beta) + i\omega[c_M + c_{Ox}(1 + \beta)]} \quad (3.41)$$

und für die Limes:

$$\begin{aligned} h_{2,0}^E &= \lim_{\omega \rightarrow 0} h_2^E(\omega) = 1 \\ h_{2,\infty}^E &= \lim_{\omega \rightarrow \infty} h_2^E(\omega) = \frac{c_M}{c_M + c_{Ox}(1 + \beta)} \end{aligned} \quad (3.42)$$

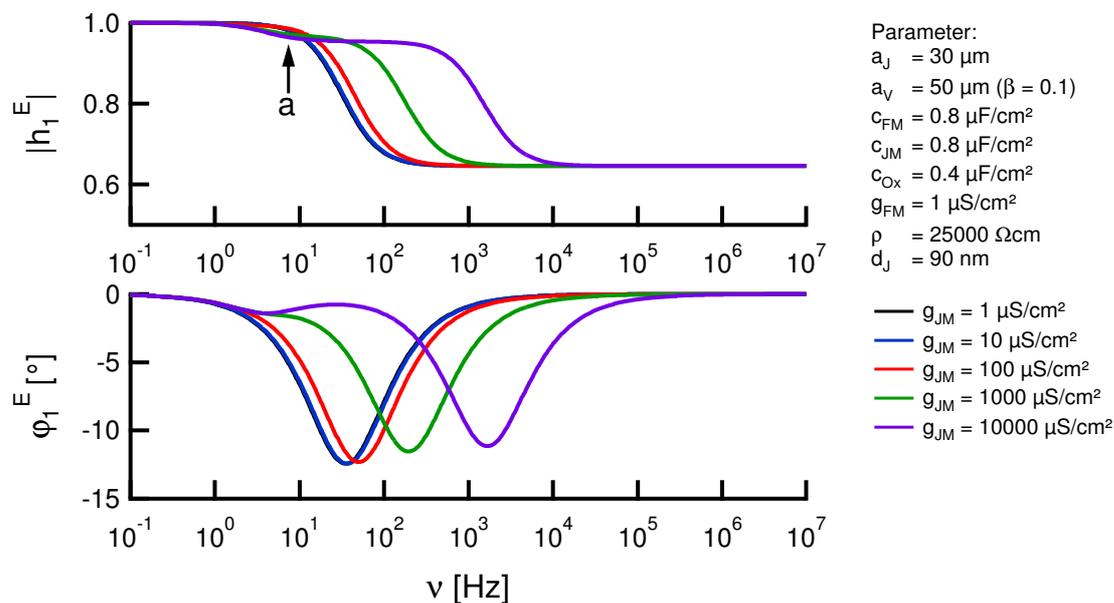


Abbildung 3.12: Mehrere Simulationen von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_1^E(\nu)$ bei extrazellulärer Anregung. Variiert wird dabei die Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} . Die erste Stufe (a), die ab $g_{JM} > 100 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ auftritt, ist sehr schwach ausgeprägt.

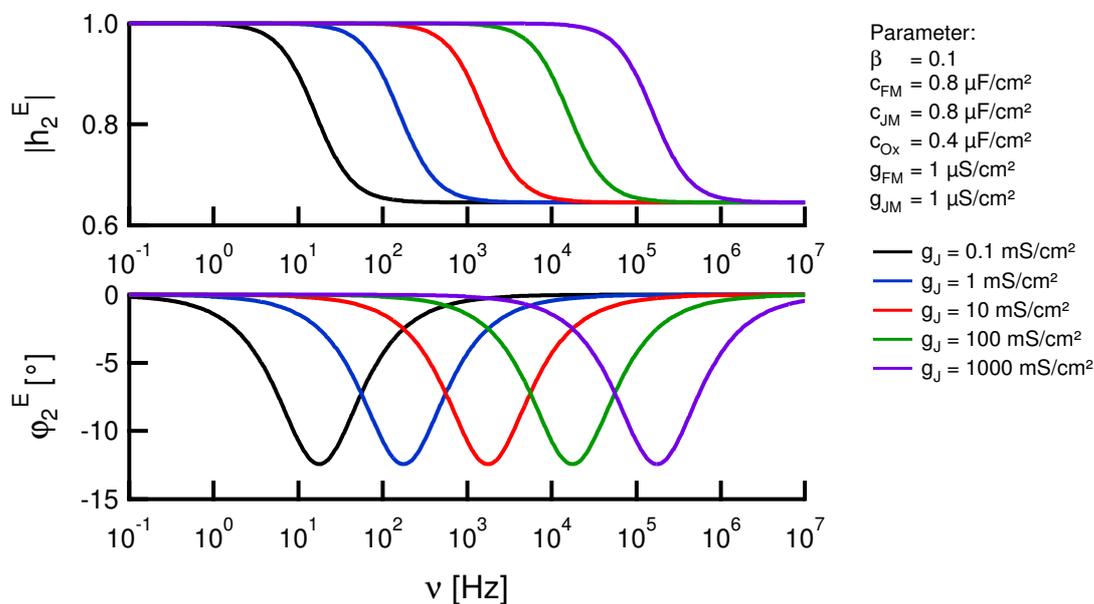


Abbildung 3.13: Mehrere Simulationen von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_2^E(\nu)$ bei extrazellulärer Anregung. Variiert wird dabei die spezifische Leitfähigkeit der Junction g_J .

Bemerkenswert an diesem Spezialfall ist die Eliminierung der Flächen aus den Gleichungen. Alle auftauchenden Größen sind spezifisch. In Abbildung 3.13 sind verschiedene Simulationen für diesen Fall dargestellt. Variiert wird der spezifische Junctionwiderstand g_J . Entsprechend dem Vorhandensein von nur noch zwei Zeitkonstanten enthalten die Betragsfunktionen nur noch eine Stufe. Diese wird ebenso wie das Tal in der Phase mit steigendem g_J zu höheren Frequenzen verschoben.

Wie in den Abbildungen 3.12 und 3.13 zu sehen ist, haben die Erhöhungen der Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} und der Junction g_J einen ähnlichen Effekt. In beiden Fällen findet eine Verschiebung der Übertragungsfunktion zu höheren Frequenzen statt. Die im ersten Fall entstehende kleinere zweite Stufe ist schwach ausgeprägt und in realen Messungen wahrscheinlich nicht zu erkennen. In Kapitel 3.4.2 werden Messungen gezeigt, deren Frequenzgang sowohl mit einem erhöhten g_J als auch mit einer erhöhten g_{JM} interpretiert werden kann. Eine Entscheidung kann dort nur aufgrund des Ortsprofils getroffen werden.

Extrazelluläres Punktkontaktmodell mit Bad

Analog zur intrazellulären Anregung muss auch bei der extrazellulären Anregung der Einfluss der Leitfähigkeit des Elektrolyts untersucht werden. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.14 zu sehen. Auch hier wird mit zwei verschiedenen Badpotenzialen ϕ_E und ϕ_{EC} gearbeitet. Ermittelt werden soll wieder die komplexe Übertragungsfunktion $h_3^E(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{ES}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\phi_E \neq \phi_{EC} \Rightarrow V_{JS} \neq V_J \Rightarrow h_3^E(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{ES}(\omega)} \quad (3.43)$$

Für die Übertragungsfunktion folgt aus den Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregeln:

$$h_3^E(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{ES}(\omega)} = \frac{-a\omega^2 + bi\omega + c}{-di\omega^3 - e\omega^2 + fi\omega + g} \quad (3.44)$$

wobei die Konstanten a-g positive reelle Konstanten sind, die in Anhang C.2 aufgelistet werden. Die Struktur der Formel weist auf die Existenz von fünf Zeitkonstanten hin, die aber teilweise zu umfangreich sind, um hier angegeben werden zu können.

Für die Limes ergibt sich:

$$h_{3,0}^E = \lim_{\omega \rightarrow 0} h_3^E(\omega) = 1 \quad , \quad h_{3,\infty}^E = \lim_{\omega \rightarrow \infty} h_3^E(\omega) = 0 \quad (3.45)$$

Bei identischen Eigenschaften von Junctionmembran und freier Membran ($c_M = c_{FM} = c_{JM}$, $g_M = g_{FM} = g_{JM}$) sowie unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.9 vereinfacht sich die Übertragungsfunktion zu:

$$h_4^E(\omega) = \frac{a_2 i\omega + b_2}{-c_2 \omega^2 + d_2 i\omega + b_2} = \frac{(1 + i\omega\tau_1)}{(1 + i\omega\tau_2)(1 + i\omega\tau_3)} \quad (3.46)$$

mit den Zeitkonstanten:

$$\tau_1 = \frac{a_2}{b_2} \quad , \quad \tau_{2/3} = \frac{d_2 \mp \sqrt{d_2^2 - 4c_2 b_2}}{2b_2} \quad (3.47)$$

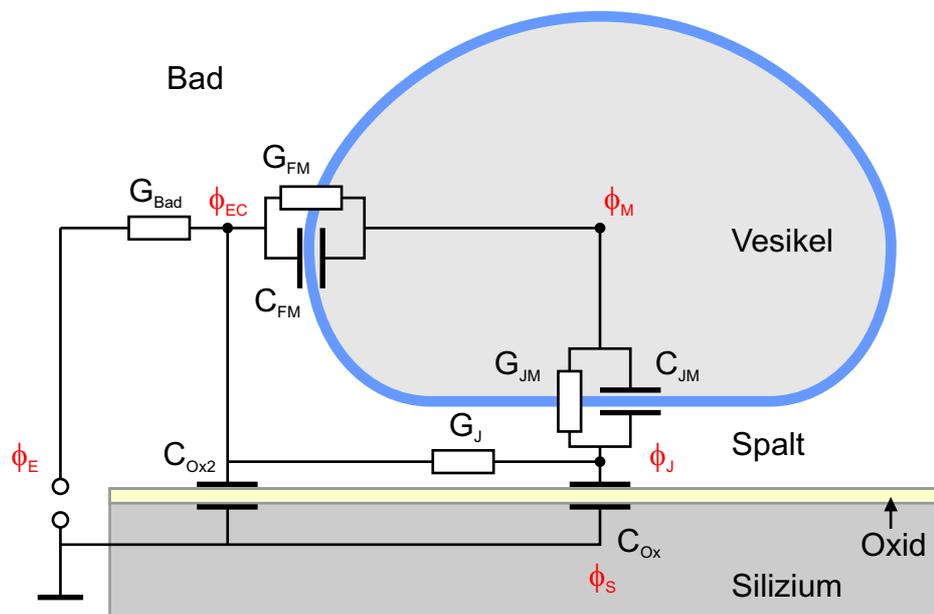


Abbildung 3.14: Schaltplan für extrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell unter Berücksichtigung des Badwiderstandes $R_{Bad} = 1/G_{Bad}$ und der unbedeckten Chipkapazität C_{Ox2} . Im Bad wird unterschieden zwischen dem Potenzial ϕ_E direkt an der Badelektrode und dem Potenzial ϕ_{EC} unmittelbar am Vesikel. Bauteilnomenklatur entsprechend Kapitel 3.1.2.

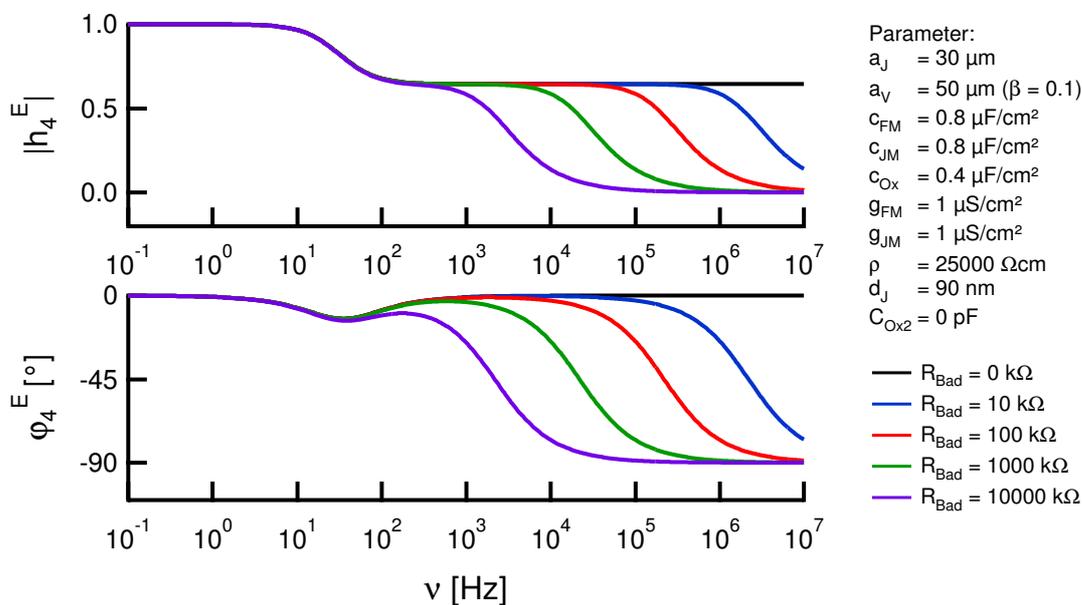


Abbildung 3.15: Mehrere Simulationen von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_4^E(\omega)$ bei extrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung und Variation des Badwiderstandes R_{Bad} .

wobei:

$$\begin{aligned}
 a_2 &= c_M g_{Bad} \\
 b_2 &= g_{Bad} [g_J (1 + \beta) + g_M] \\
 c_2 &= c_M c_{Ox} + c_{Ox2} [c_M + c_{Ox} (1 + \beta)] \\
 d_2 &= c_M g_{Bad} + c_{Ox} [(g_{Bad} + g_J) (1 + \beta) + g_M] + c_{Ox2} [g_J (1 + \beta) + g_M] \quad (3.48)
 \end{aligned}$$

Dabei wurde $g_{Bad} = G_{Bad}/A_{JM}$ und $c_{Ox2} = C_{Ox2}/A_{JM}$ neu definiert, um die Gleichungen zu vereinfachen. Unter der Annahme $g_{Bad} \gg g_T = g_M + g_J (1 + \beta)$ folgt für die Zeitkonstanten:

$$\begin{aligned}
 \tau_1 &= \frac{c_M}{g_M + g_J (1 + \beta)} & \tau_2 &= \frac{c_{Ox2}}{g_{Bad}} + \frac{c_M c_{Ox}}{g_{Bad} [c_M + c_{Ox} (1 + \beta)]} \\
 \tau_3 &= \frac{c_M + c_{Ox} (1 + \beta)}{g_M + g_J (1 + \beta)} \quad (3.49)
 \end{aligned}$$

Bei τ_1 und τ_3 handelt es sich um dieselben Zeitkonstanten wie im extrazellulären Fall ohne Badwiderstand (siehe Gleichung 3.40). Abbildung 3.15 demonstriert den Einfluss des Badwiderstandes auf die extrazelluläre Übertragungsfunktion $h_4^E(\omega)$. Bei der Grenzfrequenz $\nu_2 = 1/(2\pi\tau_2)$ fallen sowohl Betrag als auch Phase auf null ab. Die gesamte zwischen Bad und Chip angelegte Spannung V_{ES} fällt dann am Badwiderstand R_{Bad} ab.

Einfluss der Messmethode auf das extrazelluläre Modell mit Bad

In den extrazellulären Experimenten wird die Übertragungsfunktion durch zwei kurz aufeinanderfolgende Messungen bestimmt. Die erste Messung wird an einem Riesenvesikel vorgenommen. Bei der Zweiten handelt es sich um eine Referenzmessung, die nach dem Entfernen des Vesikels stattfindet. Um die gewünschte Übertragungsfunktion $h^E(\omega)$ zu erhalten, werden die gemessenen Drainströme $I_{D,exp}(\omega)$ und $I_{D,ref}(\omega)$ dividiert. Sinn dieser Vorgehensweise ist die Eliminierung der Einflüsse von Apparatur und Chip. Eine genauere Erklärung hierzu ist in Kapitel 3.4.1 zu finden. Das Verfahren basiert ursprünglich auf der Annahme, dass die Übertragungsfunktion des Bades ohne Vesikel immer $h_{Bad}(\omega) = 1$ sei. Bei den in dieser Arbeit verwendeten hochohmigen Elektrolyten ist dies aber nicht mehr der Fall. In der Referenzmessung bilden der Badwiderstand R_{Bad} und die Chipkapazität C_{Chip} einen Tiefpass mit der Zeitkonstanten $\tau_{Bad} = R_{Bad}C_{Chip}$. Es wird angenommen, dass für die Chipkapazität $C_{Chip} = C_{Ox} + C_{Ox2}$ gilt. Die Übertragungsfunktion des Bades lautet damit:

$$h_{Bad}(\omega) = \frac{1}{1 + i\omega\tau_{Bad}} \quad (3.50)$$

Die experimentell bestimmte Übertragungsfunktion ist für hochohmige Elektrolyten also nicht identisch mit der reinen Übertragungsfunktion des Vesikels:

$$h_{Mess}^E(\omega) = \frac{I_D^{exp}(\omega)}{I_D^{ref}(\omega)} = \frac{h_3^E(\omega)}{h_{Bad}(\omega)} \quad (3.51)$$

Für große unbedeckte Chipkapazitäten C_{Ox2} kann man den Vierpol, bestehend aus R_{Bad} und C_{Ox2} , als von der Zelle entkoppelt betrachten (siehe Abbildung 3.14). Dann folgt auch

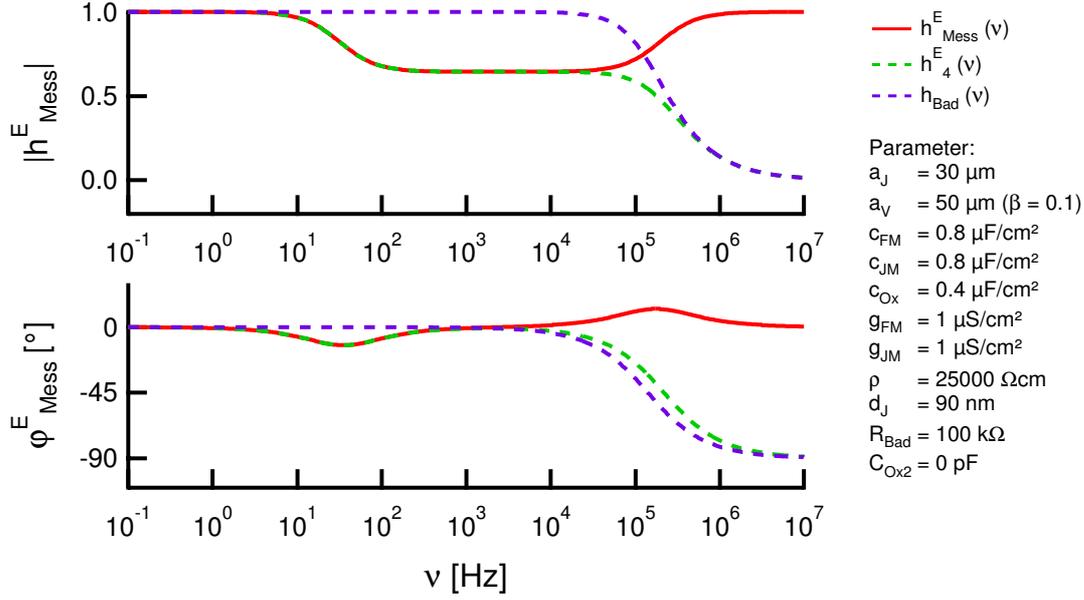


Abbildung 3.16: Simulation von Betrag und Phase der mit den Experimenten vergleichbaren Übertragungsfunktion $h_{Mess}^E(\nu) = h_4^E(\nu)/h_{Bad}(\nu)$ bei extrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung des Badwiderstandes. Zusätzlich dargestellt sind die theoretische Übertragungsfunktion $h_4^E(\nu)$ und die Übertragungsfunktion des Bades $h_{Bad}(\nu)$.

$C_{Chip} \approx C_{Ox2}$ sowie $h_3^E(\omega) = h_1^E(\omega)h_{Bad}(\omega)$ und die Division in Gleichung 3.51 eliminiert den Badtiefpass, so dass $h_{Mess}^E(\omega) \approx h_1^E(\omega)$.

Für kleine unbedeckte Chipkapazitäten C_{Ox2} sind die Vierpole nicht entkoppelt. Dies ist in der vorliegenden Arbeit der Fall. Abbildung 3.16 demonstriert das Zustandekommen der Messfunktion $h_{Mess}^E(\nu)$ für den Extremfall, dass $C_{Ox2} = 0$ pF. Die simulierte Funktion $h_{Mess}^E(\nu)$ ist unterhalb der Grenzfrequenz des Tiefpasses nahezu identisch mit der Übertragungsfunktion des Vesikels $h_4^E(\nu)$. Bei hohen Frequenzen macht sich der Einfluss des Bades bemerkbar und der Betrag geht gegen eins. Die Phase zeigt gleichzeitig einen Überschwinger und fällt anschließend auf null ab. Grund dafür ist die Annäherung von $h_4^E(\nu)$ an $h_{Bad}(\nu)$ bei hohen Frequenzen.

Die Tatsache, dass bei einem hochohmigen Bad mit geringer unbedeckter Chipkapazität nicht die reine extrazelluläre Übertragungsfunktion ermittelt werden kann, mag auf den ersten Blick irritierend wirken. Die Bestimmung der Fitparameter wie zum Beispiel der Spaltabstand d_J ist aber dennoch gut möglich, da der Einfluss des Bades erst bei hohen Frequenzen die Funktion verfälscht. Der Einfachheit halber wird die gemessene Funktion deshalb auch weiterhin als *extrazelluläre Übertragungsfunktion* bezeichnet.

3.1.5 Intrazelluläres Flächenkontaktmodell

Das Flächenkontaktmodell betrachtet im Gegensatz zum Punktkontaktmodell die Junction als orts aufgelöst. Vesikel und Chip sind über einen flächigen Kontakt gekoppelt. Hierbei wird in dieser Arbeit wie im bereits erklärten Punktkontaktmodell die Junctionmembran als passive Membran beschrieben. Ihre spezifische Leitfähigkeit g_{JM} und Kapazität c_{JM} ist außerdem ortsunabhängig ($g_{JM}(x, y) = g_{JM}$, $c_{JM}(x, y) = c_{JM}$). Grundlage der folgenden Modelle ist die Beschreibung der Junction als Kern-Mantel-Leiter, wobei der Elektrolyt im Spalt den Kern und das Siliziumoxid sowie die Junctionmembran den Mantel darstellen. Basierend auf der Kabeltheorie lässt sich für die Spannung zwischen Junction und Chip V_{JS} und die Spannung zwischen Vesikelinnerem und Junction V_{JM} folgende Gleichung formulieren [Wei97]:

$$\begin{aligned} \nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) V_{JS}(t, x, y) - c_{Ox} \frac{\partial}{\partial t} V_{JS}(t, x, y) + \\ + \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) V_{JM}(t, x, y) = 0 \end{aligned} \quad (3.52)$$

Wie im Punktkontaktmodell wird bei intrazellulärer Anregung eine Anregungsspannung $V_{PE} = \phi_P - \phi_E$ zwischen Pipette und Badelektrode angelegt und die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$ zwischen Junction und Chip detektiert. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_F^I(\omega, x, y) = \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) / \bar{V}_{PE}(\omega)$.

Ideales intrazelluläres Flächenkontaktmodell

In diesem als erstes betrachteten Modell wird der Einfluss der Pipette und des Bades vernachlässigt. Die Potenziale in der Pipette ϕ_P und im Vesikel ϕ_M sind identisch. Chip und Bad liegen auf demselben Potenzial.

Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.17 zu sehen. Mit Hilfe dieser Potenzialdefinitionen ergibt sich für die Spannungen:

$$\left. \begin{array}{l} \phi_M = \phi_P \\ \phi_S = \phi_E = \phi_{EC} \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_{JS}(t, x, y) = V_J(t, x, y) \\ V_{PE}(t) = V_P(t) = V_M(t) \\ V_{JM}(t, x, y) = V_M(t) - V_J(t, x, y) \end{array} \right. \quad (3.53)$$

und aus Gleichung 3.52 folgt:

$$\begin{aligned} \nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) V_J(t, x, y) - c_{Ox} \frac{\partial}{\partial t} V_J(t, x, y) + \\ + \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) (V_M(t) - V_J(t, x, y)) = 0 \end{aligned} \quad (3.54)$$

Unter der Voraussetzung, dass mit Wechselspannung angeregt wird:

$$\begin{aligned} V_{PE}(t) &= V_M(t) = \bar{V}_M(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \\ V_{JS}(t, x, y) &= V_J(t, x, y) = \bar{V}_J(\omega, x, y) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \end{aligned} \quad (3.55)$$

und unter der Annahme einer kreisförmigen zylindersymmetrischen Junction:

$$\bar{V}_J(\omega, x, y) = \bar{V}_J(\omega, \varphi, a) = \bar{V}_J(\omega, a) \quad (3.56)$$

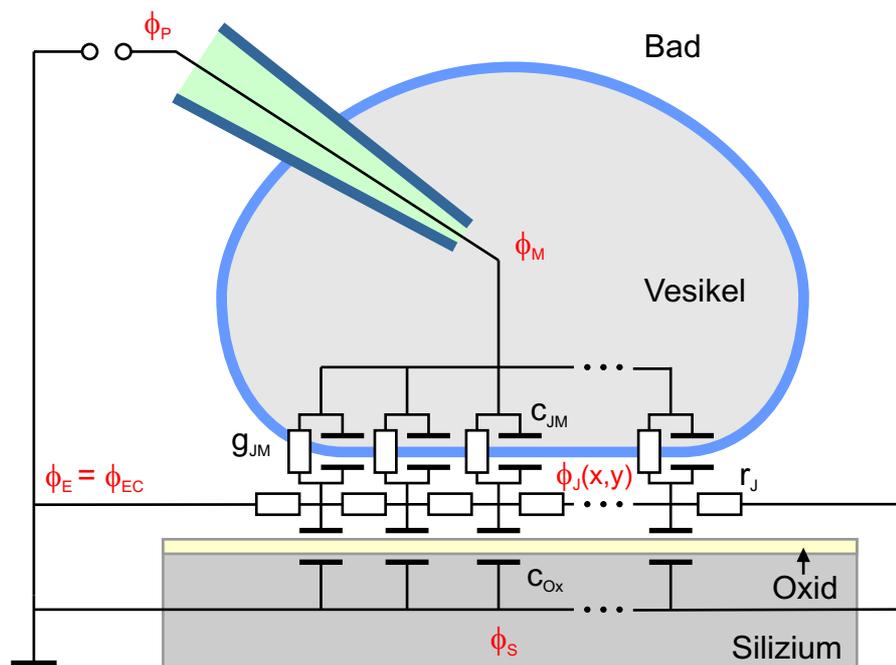


Abbildung 3.17: Vereinfachter Schaltplan für den Fall der intrazellulären Anregung im Flächenkontaktmodell. Die Pipette und das Bad werden vernachlässigt, so dass die anregende Spannung V_{PE} direkt über der Vesikelmembran abfällt ($V_M = V_{PE}$). Die FETs messen die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$. Bauteilnomenklatur nach Kapitel 3.1.2.

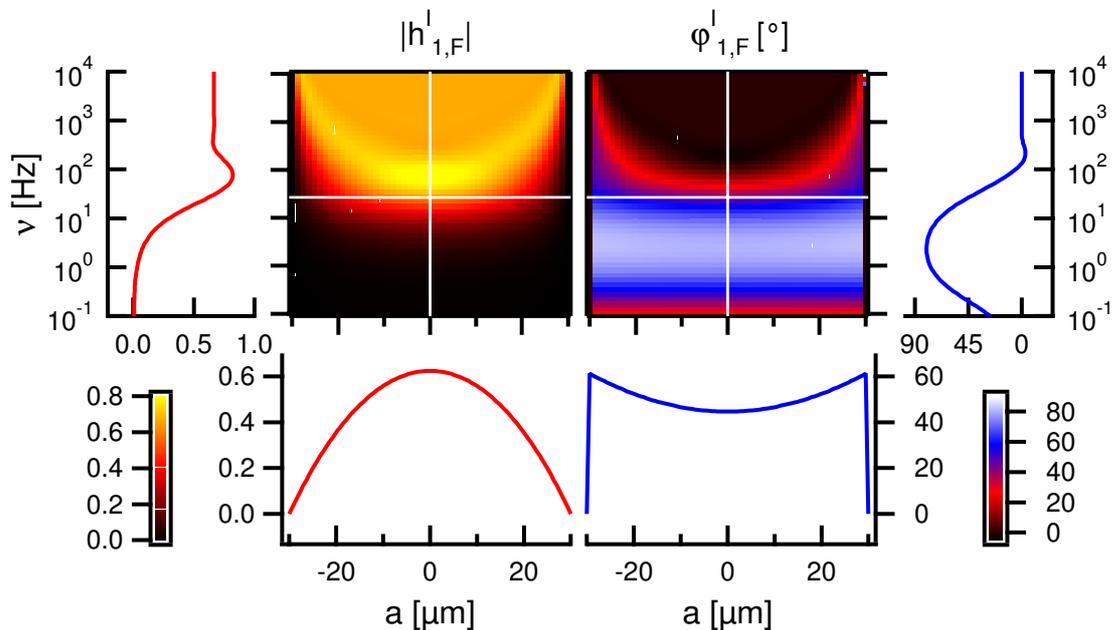


Abbildung 3.18: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{1,F}^I(\nu, a)$ bei intrazellulärer Anregung ohne Beachtung von Bad und Pipette. Der verwendete Schichtwiderstand liegt bei $r_J = 2.8 \text{ G}\Omega$. (weitere Parameter: $c_{JM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_J = 30 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{ k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{ nm}$)

folgt:

$$\left[\lambda^2 \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \lambda^2 \left(\frac{1}{a} + \kappa \right) \frac{\partial}{\partial a} - (1 + i\omega\tau_C) \right] \bar{V}_J(\omega, a) = -(1 + i\omega\tau_{JM}) \bar{V}_M(\omega) \quad (3.57)$$

mit der Längskonstante λ , den Zeitkonstanten τ_C und τ_{JM} sowie dem Junctionparameter κ :

$$\begin{aligned} \tau_{JM} &= \frac{c_{JM}}{g_{JM}} & \lambda^2 &= \frac{1}{r_J(a) g_{JM}} \\ \tau_C &= \frac{c_{JM} + c_{Ox}}{g_{JM}} & \kappa &= -\frac{1}{r_J(a)} \frac{\partial r_J(a)}{\partial a} \end{aligned} \quad (3.58)$$

Homogenes intrazelluläres Flächenkontaktmodell

Im einfachsten Modell wird davon ausgegangen, dass der Schichtwiderstand des Spalts ortsunabhängig ist ($r_J(a) = r_J = const$). Damit verschwindet der Junctionparameter κ aus Gleichung 3.57 und man erhält:

$$\left[\lambda^2 \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{\lambda^2}{a} \frac{\partial}{\partial a} - (1 + i\omega\tau_C) \right] \bar{V}_J(\omega, a) = -(1 + i\omega\tau_{JM}) \bar{V}_M(\omega) \quad (3.59)$$

Diese inhomogene Differentialgleichung lässt sich mit der Randbedingung $V_J(\omega, a_J) = 0$ analytisch lösen. Aus dem Ergebnis ergibt sich die gesuchte Übertragungsfunktion [Wei97, Wei94]:

$$h_{1,F}^I(\omega, a) = \frac{\bar{V}_J(\omega, a)}{\bar{V}_M(\omega)} = \frac{1 + i\omega\tau_{JM}}{1 + i\omega\tau_C} \left[1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right] \quad (3.60)$$

wobei die komplexe Dämpfungskonstante γ eingeführt wurde:

$$\gamma^2 = \frac{1 + i\omega\tau_C}{\lambda^2} = r_J [g_{JM} + i\omega (c_{JM} + c_{Ox})] \quad (3.61)$$

Bei $I_0(x)$ handelt es sich um die modifizierte Besselsche Funktion erster Gattung 0. Ordnung. Abbildung 3.18 zeigt eine Simulation der intrazellulären Übertragungsfunktion $h_{1,F}^I(\omega, a)$. Zusätzlich zur zentralen farbkodierten Darstellung von Betrag und Phase sind jeweils zwei Schnitte in Richtung der Orts- sowie der Frequenzachse gezeigt, um einen besseren quantitativen Eindruck zu vermitteln. Die Schnittlinien sind in den Farbgraphen als weiße Linien eingezeichnet. Diese Art der Darstellung wird in allen folgenden Simulationen verwendet.

Homogenes intrazelluläres Flächenkontaktmodell mit Pipette

Bei Berücksichtigung der Pipette sind die Potenziale in der Pipette ϕ_P und im Vesikel ϕ_M unterschiedlich. Chip und Bad liegen aber auf demselben Potenzial.

Das entsprechende Wechsellspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.19 zu sehen. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_{2,F}^I(\omega) = \bar{V}_{JS}(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$. Es ergibt sich aus den Potenzialdefinitionen:

$$\phi_S = \phi_E = \phi_{EC} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_{JS} = V_J \\ V_{PE} = V_P \end{array} \right\} \Rightarrow h_{2,F}^I(\omega, a) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega, a)}{\bar{V}_P(\omega)} \quad (3.62)$$

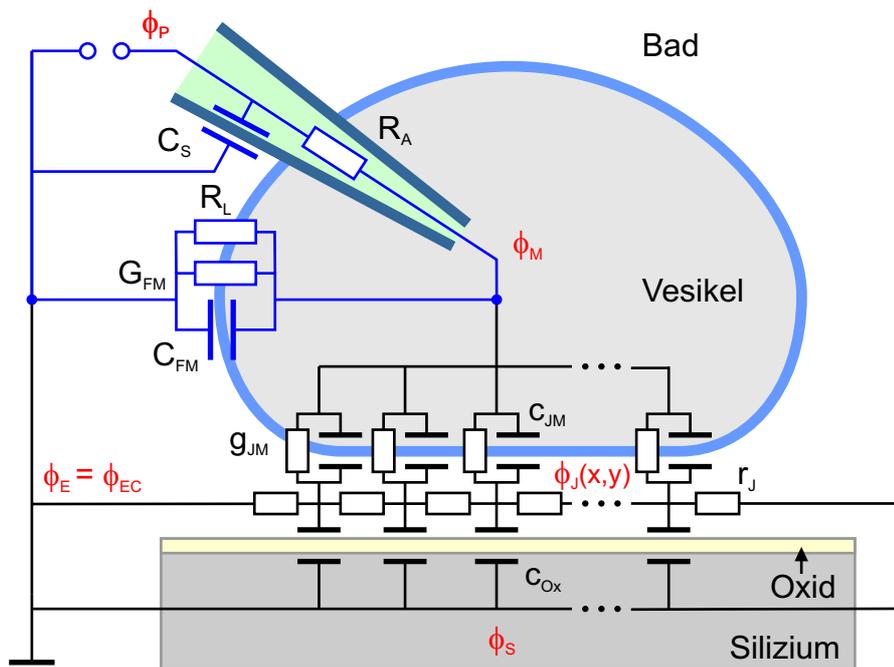


Abbildung 3.19: Schaltplan für den Fall der intrazellulären Anregung im Flächenkontaktmodell mit Berücksichtigung der Pipette. Chip und Bad liegen auf demselben Potential. Die Schaltung lässt sich in den Pipettenvierpol (blau) und den Junctionvierpol (schwarz) unterteilen. Die Bauteilnomenklatur entspricht Kapitel 3.1.2.

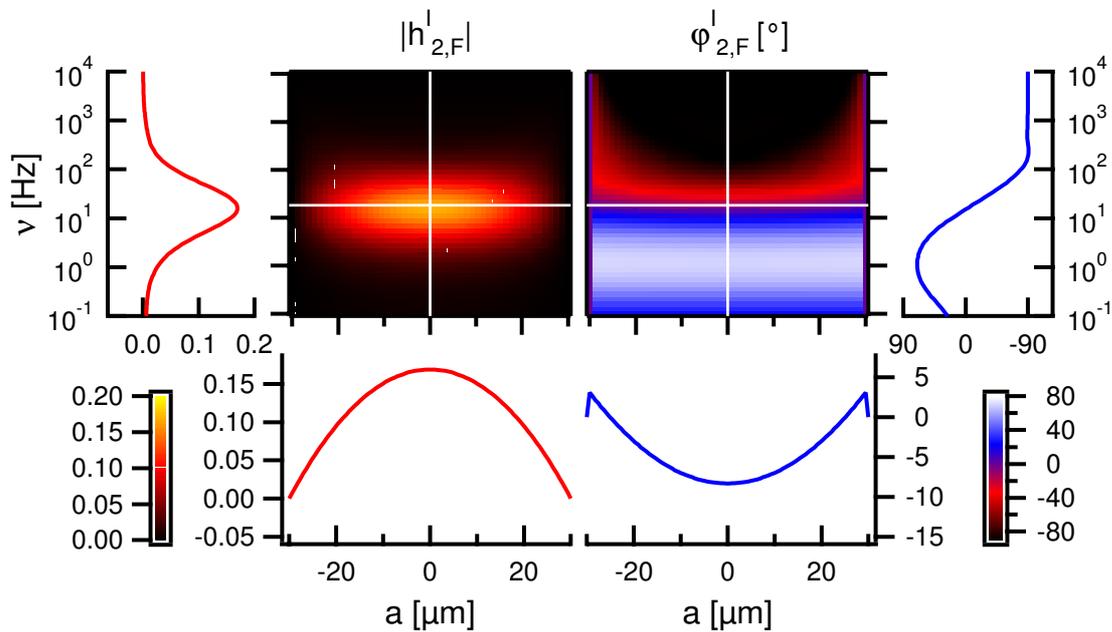


Abbildung 3.20: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{2,F}^I(\omega, a)$ bei intrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung einer Pipette. Der Zugangswiderstand beträgt $R_A = 100 \text{ M}\Omega$, der Leckwiderstand $R_L = 0.5 \text{ G}\Omega$. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_J = 30 \mu\text{m}$, $a_V = 50 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{ k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{ nm}$)

Analog zur Berechnung im Punktkontaktmodell in Kapitel 3.1.3 lässt sich die Schaltung in zwei entkoppelte Vierpole zerlegen. Für die Übertragungsfunktion gilt somit:

$$h_{2,F}^I(\omega, a) = \frac{\bar{V}_J(\omega, a)}{\bar{V}_P(\omega)} = \frac{\bar{V}_J(\omega, a)}{\bar{V}_M(\omega)} \frac{\bar{V}_M(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = h_{1,F}^I(\omega, a) h_{Pip}(\omega) \quad (3.63)$$

wobei für die Übertragungsfunktion des Pipetten-Tiefpasses gilt:

$$h_{Pip}(\omega) = \frac{\bar{V}_M(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = \frac{1}{1 + i\omega\tau_{Pip}} h_{Pip,0} \quad (3.64)$$

mit der Zeitkonstanten τ_{Pip} , dem Limes $h_{Pip,0}$ und dem effektiven Membranwiderstand der freien Membran R_{FM}^* :

$$\begin{aligned} \tau_{Pip} &= C_{FM} \frac{R_{FM}^* R_A}{R_{FM}^* + R_A}, \quad h_{Pip,0} = \lim_{\omega \rightarrow 0} h_{Pip}(\omega) = \frac{R_{FM}^*}{R_{FM}^* + R_A} \\ R_{FM}^* &= (G_{FM} + R_L^{-1})^{-1} \end{aligned} \quad (3.65)$$

Eine Simulation von Betrag und Phase der resultierenden Übertragungsfunktion ist in Abbildung 3.20 zu sehen. Deutlich erkennbar ist die Abschwächung des Signals durch den Pipetten-Tiefpass ab der Grenzfrequenz $\nu_{Pip} = 1/(2\pi\tau_{Pip}) = 9.2$ Hz. In der Junction kommt nur noch ein kleiner Buckel im Bereich von 1 – 100 Hz an. Im Gegensatz zum einfachen homogenen intrazellulären Modell fällt die Phase bei hohen Frequenzen nicht mehr auf 0° ab, sondern auf -90° .

Homogenes intrazelluläres Flächenkontaktmodell mit Pipette und Badwiderstand

Das Bad wird auch im intrazellulären Flächenkontaktmodell durch einen einzelnen Widerstand simuliert. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.21 zu sehen. Es werden zwei verschiedene Badpotenziale ϕ_E und ϕ_{EC} definiert. Daraus folgt:

$$\left. \begin{aligned} \phi_S &= \phi_E \neq \phi_{EC} \\ \phi_M &\neq \phi_P \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{cases} V_{JS}(\omega, a) \neq V_J(\omega, a) \\ V_{JM}(\omega, a) = V_{ME}(\omega) - V_{JS}(\omega, a) \end{cases} \quad (3.66)$$

Das Einsetzen dieser Spannungsdefinitionen in Gleichung 3.52 sowie die Berücksichtigung der Wechselspannungsanregung und der Annahme einer zylindersymmetrischen Junction analog den Gleichungen 3.55 und 3.56 führt zu folgender inhomogener Differentialgleichung:

$$\left[\lambda^2 \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{\lambda^2}{a} \frac{\partial}{\partial a} - (1 + i\omega\tau_C) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, a) = -(1 + i\omega\tau_{JM}) \bar{V}_{ME}(\omega) \quad (3.67)$$

wobei die in Formel 3.58 definierten Variablen Anwendung finden. Die Struktur dieser Gleichung ist dieselbe wie in Gleichung 3.59. Analog der Herleitung in [Wei94] ergibt sich mit der modifizierten Randbedingung $\bar{V}_{JS}(\omega, a_J) = \bar{V}_E(\omega)$ für die gesuchte Übertragungsfunktion $h_{3,F}^I(\omega, a) = \bar{V}_{JS}(\omega, a)/\bar{V}_{PE}(\omega)$:

$$h_{3,F}^I(\omega, a) = \frac{(1 + i\omega\tau_{JM})}{(1 + i\omega\tau_C)} \left(1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right) h_{ME}(\omega) + \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} h_{EE}(\omega) \quad (3.68)$$

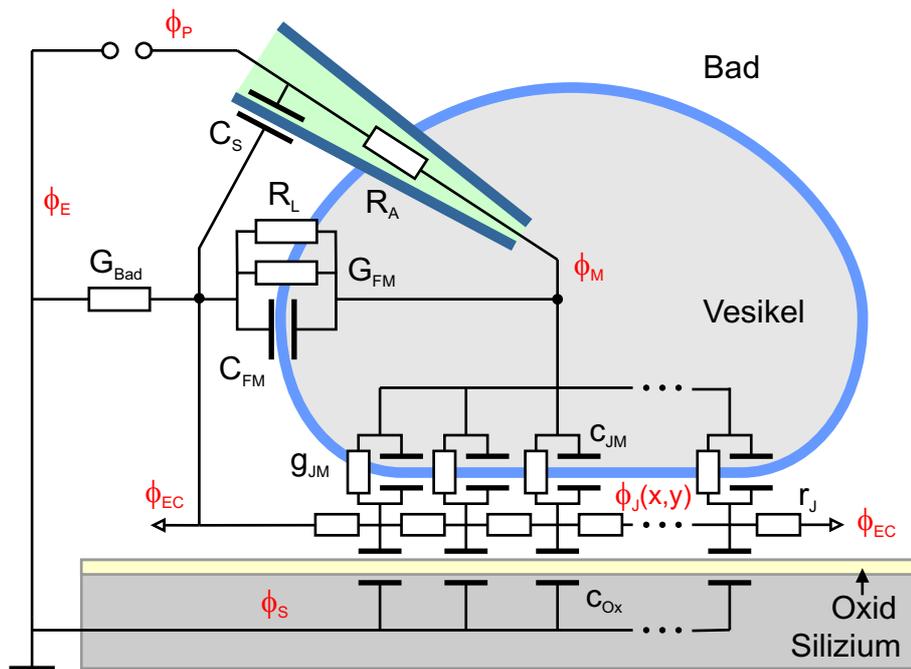


Abbildung 3.21: Schaltplan für intrazelluläre Anregung im Punktkontaktmodell mit Berücksichtigung der Pipette und des Badwiderstandes $R_{Bad} = 1/G_{Bad}$. Im Bad wird unterschieden zwischen dem Potenzial ϕ_E direkt an der Badelektrode und dem Potenzial ϕ_{EC} unmittelbar am Vesikel. Die übrige Bauteilnomenklatur entspricht Kapitel 3.1.2.

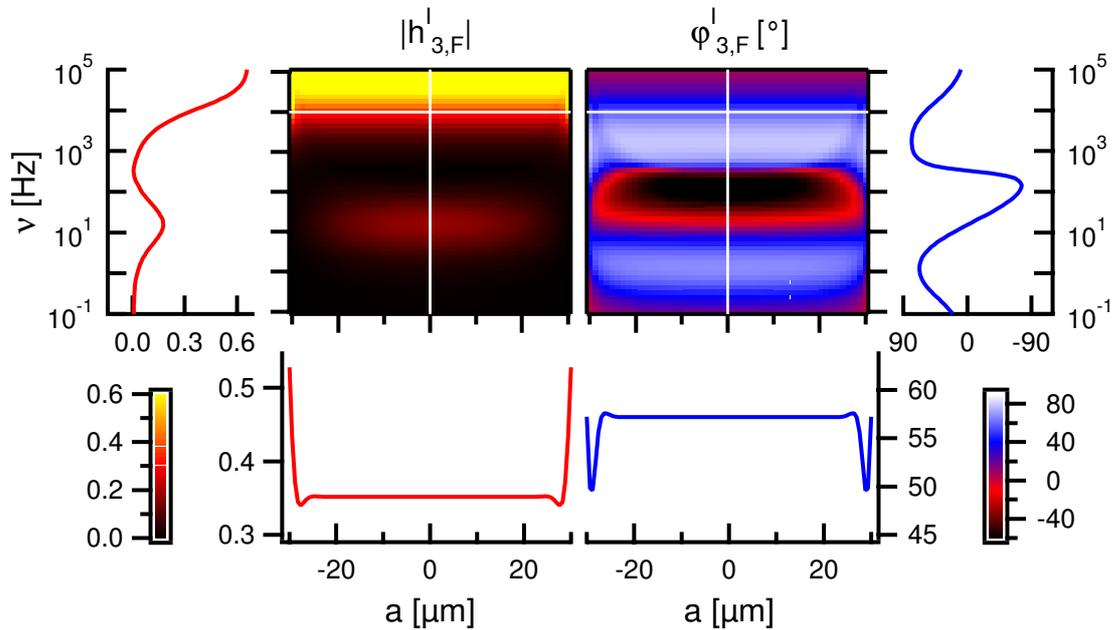


Abbildung 3.22: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{3,F}^I(\omega, a)$ bei intrazellulärer Anregung mit Berücksichtigung einer Pipette mit $R_A = 100 \text{ M}\Omega$ und eines Badwiderstandes von $R_{Bad} = 1 \text{ M}\Omega$. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_J = 30 \mu\text{m}$, $a_V = 50 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{ k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{ nm}$, $R_L = 0.5 \text{ G}\Omega$)

wobei $h_{ME}(\omega) = \bar{V}_{ME}(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$ und $h_{EE}(\omega) = \bar{V}_E(\omega)/\bar{V}_{PE}(\omega)$. Beim Betrachten des Schaltplans in Abbildung 3.21 ist zu erkennen, dass die Spannungen $V_{ME}(\omega)$ und $V_E(\omega)$ allein durch die Pipette, die freie Membran und den Badwiderstand bestimmt werden (blau), da $|X_{FM}| \ll |X_{JM} + R_J|$ und $|G_{Bad}^{-1}| \ll |X_{Cox} + R_J|$ gilt. Bei Vernachlässigung der Junction ergeben sich die fehlenden Spannungsverhältnisse aus den Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregeln:

$$\begin{aligned} h_{ME}(\omega) &= \frac{\bar{V}_{ME}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{-a\omega^2 + bi\omega + c}{-d\omega^2 + ei\omega + f} \\ h_{EE}(\omega) &= \frac{\bar{V}_E(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{-a\omega^2 + bi\omega + g}{-d\omega^2 + ei\omega + f} = \frac{g(1 + i\omega\tau_1)(1 + i\omega\tau_2)}{f(1 + i\omega\tau_3)(1 + i\omega\tau_4)} \end{aligned} \quad (3.69)$$

wobei sich nur für $h_{EE}(\omega)$ reelle Zeitkonstanten errechnen lassen:

$$\begin{aligned} \tau_{1/2} &= \frac{b \mp \sqrt{b^2 - 4ag}}{2g} \\ \tau_{3/4} &= \frac{e \mp \sqrt{e^2 - 4df}}{2f} \end{aligned} \quad (3.70)$$

mit den Konstanten:

$$\begin{aligned} a &= C_{FM}C_S R_A R_{Bad} R_{FM} \\ b &= R_{Bad} (C_S R_A + C_{FM} R_{FM} + C_S R_{FM}) \\ c &= R_{Bad} + R_{FM} \\ d &= C_{FM}C_S R_A R_{Bad} R_{FM} \\ e &= C_S R_A R_{Bad} + C_{FM} R_A R_{FM} + C_{FM} R_{Bad} R_{FM} + C_S R_{Bad} R_{FM} \\ f &= R_A + R_{Bad} + R_{FM} \\ g &= R_{Bad} \end{aligned} \quad (3.71)$$

Eine Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{3,F}^I(\omega, a)$ ist in Abbildung 3.22 zu sehen. Deutlich erkennbar ist der Einfluss des Bades bei hohen Frequenzen. In diesem Bereich sinkt die Impedanz der Streukapazität der Pipette ab und die anliegende Spannung V_{PE} fällt zunehmend am Badwiderstand $R_{Bad} = G_{Bad}^{-1}$ ab. Die steigende Badspannung $V_E(\omega)$ koppelt in die Junction und führt zu einem raschen Anstieg der Oxidspannung $V_{JS}(\omega, a)$. Die Phase nähert sich nicht wie in der Simulation ohne Bad an -90° an, sondern steigt wieder auf $+90^\circ$. Anschließend läuft sie gegen 0° . Bis auf den Randbereich ist die Simulation bei hohen Frequenzen ortsunabhängig.

Intrazelluläres Flächenkontaktmodell mit radiusabhängigem Abstand

Dieses Modell wurde letztendlich zum Anfitzen der Messungen in Kapitel 3.5.2 verwendet. Seine Entwicklung war notwendig, da der Betrag der intrazellulären Messungen am Rande der Junction nicht den durch die bisherigen intrazellulären Modelle vorhergesagten Abfall auf null aufwies. Dies kann auf einen flachen linearen Anstieg der Membran mit dem Winkel θ am Rand der Adhäsionsfläche sowie auf die Isolierung der Junction durch die Säulen der Käfige zurückgeführt werden. Beide Effekte lassen sich durch Kombination des Schaltplanes in Abbildung 3.21 mit einem radiusabhängigen Abstand der Junctionmembran von der Chipoberfläche simulieren. Für den Abstand gilt somit $d_J(x, y) = d_J(a)$. Desweiteren

wird die Leitfähigkeit ρ_J des Elektrolyten im Spalt als konstant angenommen. Aus dem allgemeinen Flächenkontaktmodell in Gleichung 3.52 ergibt sich mit den Potentialdefinitionen in Formel 3.66 unter Berücksichtigung der Wechsellspannungsanregung und der Annahme einer zylindersymmetrischen Junction analog den Gleichungen 3.55 und 3.56 folgende inhomogene Differentialgleichung:

$$\left[\lambda^2 \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \lambda^2 \left(\frac{1}{a} + \kappa \right) \frac{\partial}{\partial a} - (1 + i\omega\tau_C) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, a) = - (1 + i\omega\tau_{JM}) \bar{V}_{ME}(\omega) \quad (3.72)$$

wobei die in Gleichung 3.58 definierten Konstanten verwendet wurden. Dabei ergibt sich für die Längskonstante λ und den Junctionparameter κ :

$$\left. \begin{array}{l} d_J(x, y) = d_J(a) \\ \rho_J(x, y) = \rho_J \end{array} \right\} \Rightarrow r_J(a) = \frac{\rho_J}{d_J(a)} \Rightarrow \begin{cases} \lambda = \sqrt{\frac{d_J(a)}{\rho_J g_{JM}}} \\ \kappa = \frac{1}{d_J(a)} \frac{\partial d_J(a)}{\partial a} \end{cases} \quad (3.73)$$

Die Differentialgleichung 3.72 lässt sich nur noch numerisch lösen. Hierzu wurde die sogenannte Relaxationsmethode verwendet [Pre92]. Diese Methode wurde für komplexe Zahlen modifiziert und in den Programmiersprachen Visual C++ (Microsoft) und LabVIEW programmiert. Dabei werden der Numerik die Spannung $V_{ME}(\omega)$ und die Randbedingungen $V_{JS}(\omega, a_J) = V_E(\omega)$ und $\frac{\partial V_{JS}}{\partial a}(\omega, 0) = 0$ V vorgegeben. $V_{ME}(\omega)$ und $V_E(\omega)$ lassen sich dabei vorher unter der Vernachlässigung der Junction mit Formel 3.69 aus $V_{PE}(\omega)$ analytisch berechnen.

In Kapitel 3.5.2 werden die effektiven Membranparameter R_M^* und C_M sowie die Pipettenparameter R_A und C_S über Impedanz- und Pulsmessungen bestimmt. R_M^* und C_M repräsentieren dabei sowohl die freie Membran als auch die Junction (siehe Abbildung 3.23). Beim Anfitzen der Messungen werden bei der Berechnung von $V_{ME}(\omega)$ und $V_E(\omega)$ durch Formel 3.69 $R_{FM} = R_M^*$ und $C_{FM} = C_M$ gesetzt. Die Junction wird damit nicht mehr vernachlässigt, sondern mit einbezogen. Zum Anfitzen wird die Übertragungsfunktion $h_{Fit}^I(\omega, a) = V_{JS}(\omega, a)/V_{PE}(\omega)$ verwendet.

Um den Einfluss der Säulen auf das Signal der Transistoren unter dem Vesikel sowie unter den Säulen selbst simulieren zu können, muss ein kleiner Trick angewendet werden.

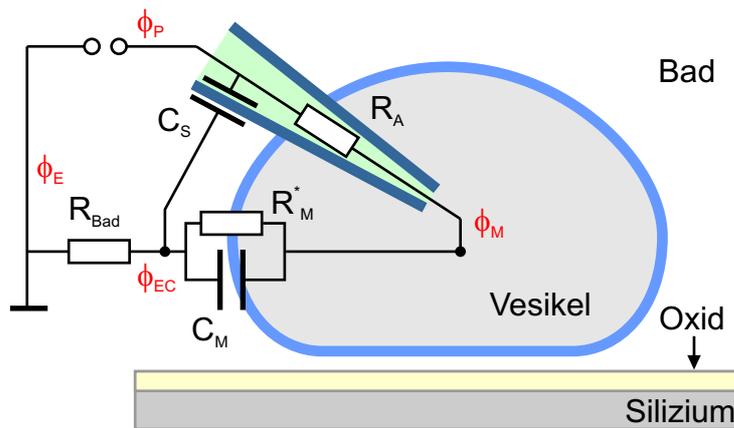


Abbildung 3.23: Ersatzschaltplan für intrazelluläre Impedanzmessungen unter Berücksichtigung des Badwiderstandes. Die effektiven Membranparameter R_M^* und C_M repräsentieren dabei sowohl die freie Membran als auch die Junction.

Die Säulen werden als Teil der Junction simuliert und können so in die Numerik eingebunden werden. Dafür ist es allerdings notwendig, die Parameter der Junction im Bereich der Säulen anzupassen. Um das Modell möglichst einfach zu halten, werden die spezifischen Leitfähigkeiten und Kapazitäten der Junctionmembran sowie des Oxides in den Säulen auf null gesetzt. Der Säule wird ein ortsunabhängiger virtueller Abstand d_S zugeordnet, der sich aus dem gewünschten Ersatz-Schichtwiderstand r_S über $d_S = \rho_J/r_S$ berechnet.

Für die vollständige Beschreibung des Modells werden folgende Radien benötigt:

a_V	Radius des Vesikels
a_J	Radius der adhären Membran
a_{Si}	Innenradius des Käfigs
a_{Sa}	virtueller Außenradius des Käfigs

Betont werden soll dabei, dass der Außenradius des Käfigs a_{Sa} ebenfalls ein virtueller Parameter ist, da er beim Anfitzen der Messung größer gewählt werden muss, als es den realen Säulen entsprechen würde. Das liegt daran, dass selbst außerhalb der Säulen noch ein Spannungsabfall im Elektrolyten vorhanden ist. Dies zeigten Messungen in freien Nachbarkäfigen. Außerdem muss immer bedacht werden, dass die zweidimensional verteilten Säulen durch ein eindimensionales Modell simuliert werden.

Die Junction wird durch drei Bereiche beschrieben. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Parameter in den unterschiedlichen Zonen. Die Formel für den Abstand $d(a)$ im Bereich der ansteigenden Membran geht von dem einfachsten Modell eines linearen Anstiegs aus.

Radius	spez. Oxidkapazität	spez. Membrankapazität	spez. Membranleitfähigkeit	Adhäsionsabstand $d(a)$
$a \leq a_J$	c_{Ox}	c_{JM}	g_{JM}	d_J
$a_J < a \leq a_{Si}$	c_{Ox}	c_{JM}	g_{JM}	$d_J + (a - a_J) \tan(\theta)$
$a_{Si} < a \leq a_{Sa}$	0	0	0	$d_S = \rho_J/r_S$

Tabelle 3.1: Parameter der verschiedenen Radius-Zonen

Der Einfluss der beiden unterschiedlichen Methoden, den Rand der adhären Junctionmembran zu begrenzen, soll nun unabhängig voneinander demonstriert werden. Begonnen wird mit der Simulation von Betrag und Phase der intrazellulären Übertragungsfunktion $h_{4,F}^I(\omega, a)$ für den Fall einer am Rand der Adhäsionsfläche ansteigenden Membran. Abbildung 3.24 zeigt den Fall eines Vesikels, der eine Adhäsionsfläche mit einem Radius von $a_J = 20 \mu\text{m}$ besitzt. Außerhalb der Adhäsionsfläche steigt die Membran unter einem Winkel von $\theta = 5^\circ$ bis zu einem Radius von $a_{Si} = 40 \mu\text{m}$ an. In der Simulation wurden weder Säulen noch ein Badwiderstand berücksichtigt. Zusätzlich wurden in den Schnittgraphen die Grenzfälle $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$ eingezeichnet. Deutlich zu erkennen ist eine Anhebung der Betragsfunktion insbesondere am Rande der Adhäsionsmembran durch die ansteigende Membran gegenüber dem Normalfall ($\theta = 90^\circ$). Aufgrund der besseren Abdichtung des Spalts wird die gesamte Übertragungsfunktion zu niedrigeren Frequenzen verschoben.

In einer zweiten Simulation wird der Rand der adhären Membran, die einen Radius von $a_J = 20 \mu\text{m}$ besitzt, durch eine Säule begrenzt. Zu größeren Radien hin befindet sich von $a_{Si} = 20 \mu\text{m}$ bis $a_{Sa} = 40 \mu\text{m}$ eine Säule mit einem Ersatz-Schichtwiderstand von

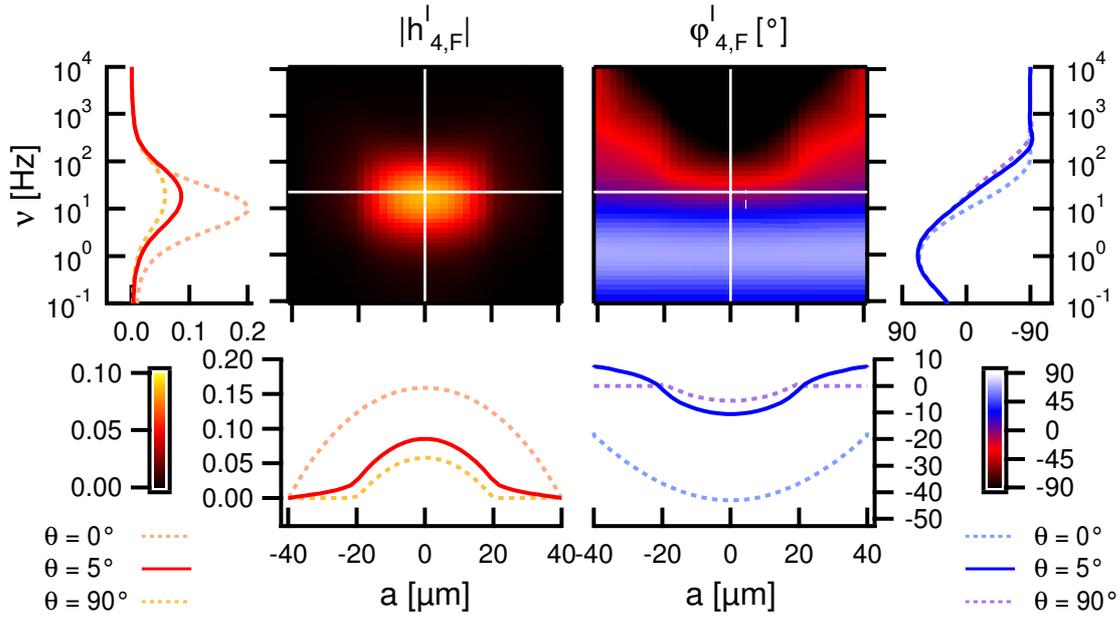


Abbildung 3.24: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{4,F}^I(\omega, a)$ bei intrazellulärer Anregung mit unter $\theta = 5^\circ$ ansteigender Membran am Rande der Junction ($a_J = 20 \mu\text{m}$). In den Schnittgraphen sind zusätzlich die Grenzfälle $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$ eingezeichnet. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_V = 60 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{nm}$, $R_{Bad} = 0 \Omega$, $a_{Si} = a_{Sa} = 40 \mu\text{m}$, $r_S = 0 \Omega$)

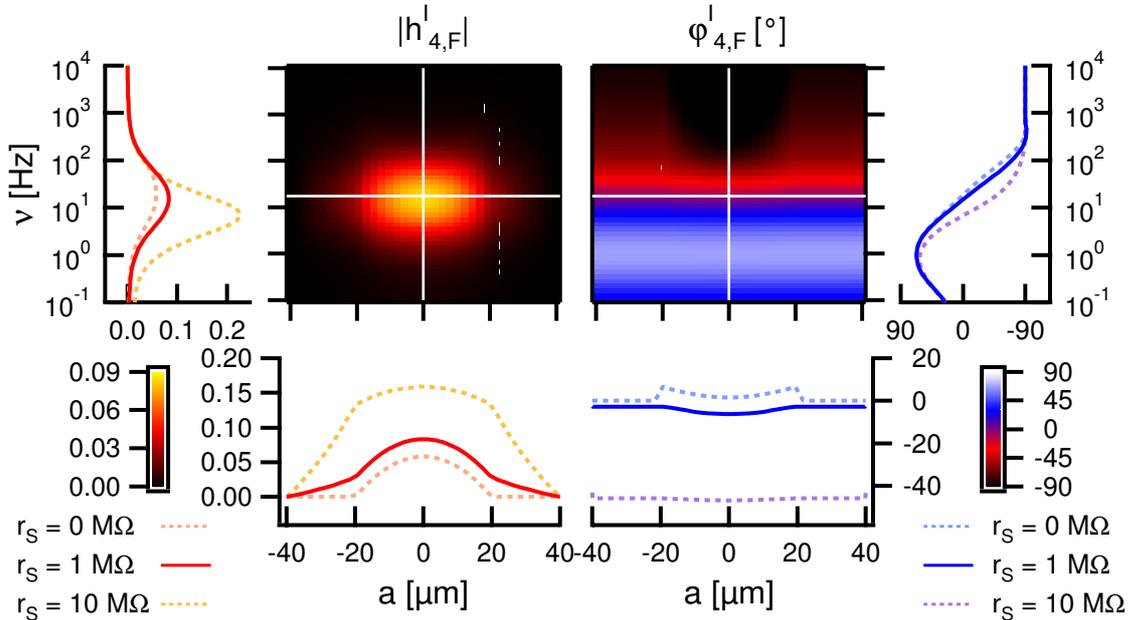


Abbildung 3.25: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{4,F}^I(\omega, a)$ bei intrazellulärer Anregung mit einer Säule $r_S = 1 \text{M}\Omega$ am Rande der Junction ($a_J = a_{Si} = 20 \mu\text{m}$). In den Schnittgraphen sind zusätzlich die Grenzfälle $r_S = 0 \Omega$ und $r_S = 10 \text{M}\Omega$ eingezeichnet. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_V = 60 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{nm}$, $R_{Bad} = 0 \Omega$, $a_{Sa} = 40 \mu\text{m}$)

$r_S = 1 \text{ M}\Omega$. Weder ein Bereich mit ansteigender Membran noch ein Badwiderstand wurden berücksichtigt. Betrag und Phase des Ergebnisses sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Zum Vergleich wurden in den Schnittgraphen Simulationen mit $r_S = 0 \Omega$ und $r_S = 10 \text{ M}\Omega$ eingezeichnet. In den Graphen ist zu erkennen, dass die Säulen ebenfalls eine Anhebung der Betragsfunktion insbesondere am Rande der Adhäsionsmembran bewirken. Außerdem findet eine Verschiebung der gesamten Funktion zu niedrigeren Frequenzen statt.

3.1.6 Extrazelluläres Flächenkontaktmodell

Bei der extrazellulären Anregung wird das Bad gegenüber dem Chip moduliert. Die Anregungsspannung ist somit $V_{ES} = \phi_E - \phi_S$. Die FETs detektieren die über dem Oxid anliegende Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$. Ermittelt werden soll die komplexe Übertragungsfunktion $h_{FE}^E(\omega, x, y) = \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) / \bar{V}_{ES}(\omega)$.

Im Gegensatz zur intrazellulären Anregung kommt hier zu dem Flächenkontaktmodell in Gleichung 3.52 noch eine zweite Gleichung hinzu. Sie ergibt sich aus der Kirchhoffschen Knotenregel im Zellinneren [Bra00]:

$$A_{FM} \left(g_{FM} + c_{FM} \frac{\partial}{\partial t} \right) V_M(t, x, y) + \int_{A_{JM}} \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) V_{JM}(t, x, y) dA = 0 \quad (3.74)$$

Ideales extrazelluläres Flächenkontaktmodell

Zuerst wird der Fall mit vernachlässigbarem Badwiderstand betrachtet. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.26 zu sehen. Aus den Potenzialdefinitionen erhält man:

$$\phi_E = \phi_{EC} \Rightarrow \begin{cases} V_{JS} = V_J + V_{ES} \neq V_J & , & V_{ES} = V_E \\ V_{JM} = V_{ES} + V_M - V_{JS} \end{cases} \quad (3.75)$$

Einsetzen von V_{JM} in die Gleichungen 3.52 und 3.74 führt zu folgendem Gleichungspaar:

$$\begin{aligned} \nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) V_{JS}(t, x, y) - \left(g_{JM} + (c_{JM} + c_{ox}) \frac{\partial}{\partial t} \right) V_{JS}(t, x, y) + \\ + \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) [V_E(t) + V_M(t)] = 0 \end{aligned} \quad (3.76)$$

$$\begin{aligned} \left(g_{FM} + \beta g_{JM} + (c_{FM} + \beta c_{JM}) \frac{\partial}{\partial t} \right) V_M(t, x, y) + \\ + \beta \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) V_E(t) - \beta \left(g_{JM} + c_{JM} \frac{\partial}{\partial t} \right) \langle V_{JS}(t) \rangle = 0 \end{aligned} \quad (3.77)$$

wobei die durchschnittliche Oxidspannung eingeführt wird:

$$\langle V_{JS}(t, x, y) \rangle = \frac{1}{A_{JM}} \int_{A_{JM}} V_{JS}(t, x, y) dA \quad (3.78)$$

Hieraus ergeben sich unter Berücksichtigung der Wechselspannungsanregung:

$$\begin{aligned} V_E(t) = \bar{V}_E(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \quad , \quad V_M(t) = \bar{V}_M(\omega) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \\ V_{JS}(t, x, y) = \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) \cdot e^{i\omega t} + c.c. \end{aligned} \quad (3.79)$$

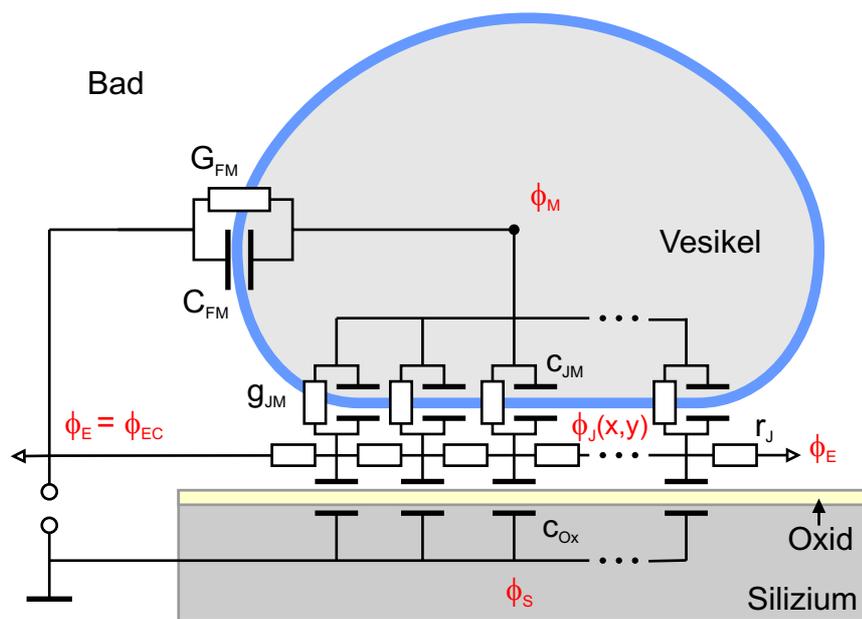


Abbildung 3.26: Vereinfachter Schaltplan für den Fall der extrazellulären Anregung im Flächenkontaktmodell ohne Berücksichtigung des Badwiderstandes. Die Anregungsspannung $V_{ES} = V_E$ wird zwischen Bad und Chip angelegt. Die FETs messen die Spannung $V_{JS} = \phi_J - \phi_S$. Bauteilnomenklatur entsprechend Kapitel 3.1.2.

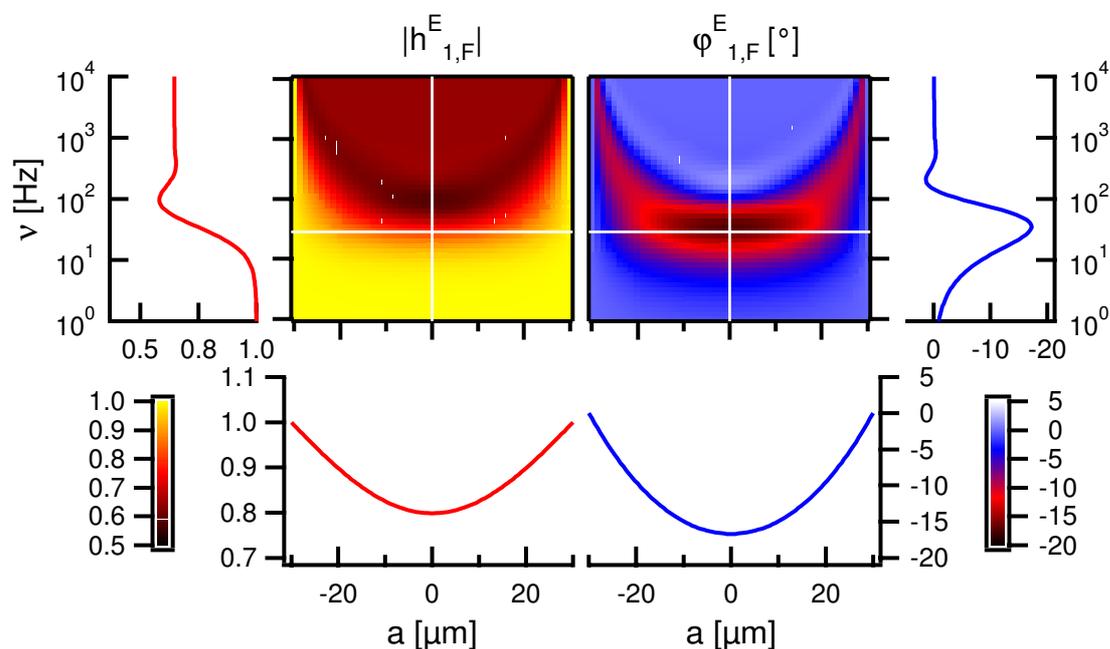


Abbildung 3.27: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion bei extrazellulärer Anregung $h_{1,F}^E(\omega, a)$ ohne Berücksichtigung des Bades. Verwendet wurde ein Schichtwiderstand von $r_J = 2.8 \text{ G}\Omega$. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_J = 30 \mu\text{m}$, $a_V = 50 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{ k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{ nm}$)

folgende Gleichungen:

$$\left[\nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) - (l_J + l_O) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) + l_J \bar{V}_E(\omega) + l_J \bar{V}_M(\omega) = 0 \quad (3.80)$$

$$(l_F + \beta l_J) \bar{V}_M(\omega) + \beta l_J \bar{V}_E(\omega) - \beta l_J \langle \bar{V}_{JS}(\omega) \rangle = 0 \quad (3.81)$$

wobei komplexe Leitfähigkeiten definiert wurden:

$$l_J = g_{JM} + i\omega c_{JM} \quad l_F = g_{FM} + i\omega c_{FM} \quad l_O = i\omega c_{Ox} \quad (3.82)$$

Löst man Gleichung 3.81 nach $\bar{V}_M(\omega)$ auf, setzt das Ergebnis in Gleichung 3.80 ein und führt eine zylindersymmetrische Junction analog Formel 3.56 ein, so erhält man:

$$\begin{aligned} \left[\frac{1}{r_J(a)} \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{1}{r_J(a)} \left(\frac{1}{a} + \kappa \right) \frac{\partial}{\partial a} - (l_J + l_O) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, a) \\ + \frac{l_J l_F}{l_F + \beta l_J} \bar{V}_E(\omega) + \frac{\beta l_J^2}{l_F + \beta l_J} \langle \bar{V}_{JS}(\omega, a) \rangle = 0 \end{aligned} \quad (3.83)$$

wobei wieder der Junctionparameter κ aus Gleichung 3.58 angewendet wird.

Homogenes extrazelluläres Flächenkontaktmodell ohne Bad

Für den einfachen Fall, dass der Schichtwiderstand des Spalts ortsunabhängig ist ($r_J(a) = r_J = \text{const}$), wird der Junctionparameter κ in Gleichung 3.83 gleich null gesetzt und man erhält:

$$\begin{aligned} \left[\frac{1}{r_J} \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{1}{r_J a} \frac{\partial}{\partial a} - (l_J + l_O) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, a) \\ + \frac{l_J l_F}{l_F + \beta l_J} \bar{V}_E(\omega) + \frac{\beta l_J^2}{l_F + \beta l_J} \langle \bar{V}_{JS}(\omega, a) \rangle = 0 \end{aligned} \quad (3.84)$$

Unter der Randbedingung $\bar{V}_{JS}(\omega, a_J) = \bar{V}_E(\omega)$ erhält man folgende, als Übertragungsfunktion dargestellte Lösung:

$$h_{1,F}^E(\omega, a) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a)}{\bar{V}_E(\omega)} = 1 - \frac{l_O (l_F + \beta l_J) [I_0(\gamma a_J) + I_0(\gamma a)]}{(l_J + l_O) (l_F + \beta l_J) I_0(\gamma a_J) - \beta l_J^2 I_2(\gamma a_J)} \quad (3.85)$$

mit der komplexen Dämpfungskonstanten:

$$\gamma^2 = \gamma(\omega)^2 = r_J (l_J + l_O) = r_J (g_{JM} + i\omega (c_{JM} + c_{Ox})) \quad (3.86)$$

Dabei handelt es sich bei $I_0(x)$ und $I_2(x)$ um die modifizierten Besselschen Funktionen erster Gattung 0. und 2. Ordnung. Zur Herleitung dieses Ergebnisses ist eine Substitution notwendig, die auf R. Gleixner zurückgeht und in Anhang D.1 skizziert ist. Abbildung 3.27 zeigt eine Simulation der extrazellulären Übertragungsfunktion $h_{F,1}^E(\omega, a)$.

Unter der Annahme einer homogenen Vesikelmembran mit $c_M = c_{FM} = c_{JM}$ und $g_M = g_{FM} = g_{JM}$ vereinfacht sich die Übertragungsfunktion zu:

$$h_{2,F}^E(\omega, a) = 1 - \frac{i\omega\tau_1 [I_0(\gamma a_J) - I_0(\gamma a)]}{(1 + i\omega\tau_2) I_0(\gamma a_J) - \frac{\beta}{(1+\beta)} (1 + i\omega\tau_3) I_2(\gamma a_J)} \quad (3.87)$$

mit den Zeitkonstanten τ_1, τ_2, τ_3 sowie der Längskonstanten λ_E

$$\tau_1 = \frac{c_{Ox}}{g_M} \quad \tau_2 = \frac{c_{Ox} + c_M}{g_M} \quad \tau_3 = \frac{c_M}{g_M} \quad (3.88)$$

$$\gamma^2 = \frac{1 + i\omega\tau_2}{\lambda_E^2} \quad \lambda_E^2 = \frac{1}{r_J g_M} \quad (3.89)$$

Homogenes extrazelluläres Flächenkontaktmodell mit Bad

Das Bad wird im extrazellulären Flächenkontaktmodell wieder durch einen einzelnen Widerstand simuliert. Das entsprechende Wechselspannungs-Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.28 zu sehen. Es wird wiederum mit zwei verschiedenen Badpotenzialen ϕ_E und ϕ_{EC} gearbeitet. Aus den Potenzialdefinitionen ergibt sich:

$$\phi_E \neq \phi_{EC} \Rightarrow V_{JS} \neq V_J \Rightarrow h_3^E(\omega, a) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a)}{\bar{V}_{ES}(\omega, a)} \quad (3.90)$$

Die dem Schaltplan entsprechende Übertragungsfunktion $h_{3,F}^E(\omega, a)$ lässt sich aus der bereits bekannten extrazellulären Übertragungsfunktion ohne Bad $h_{1,F}^E(\omega, a)$ ableiten. Die Herleitung wird in Anhang D.2 kurz beschrieben. Es ergibt sich:

$$h_{3,F}^E(\omega, a) = \frac{aI_0(\gamma a_J) - bI_2(\gamma a_J) + cI_0(\gamma a)}{dI_0(\gamma a_J) - eI_2(\gamma a_J)} \quad (3.91)$$

wobei:

$$\begin{aligned} a &= g_{Bad} l_J (l_F + \beta l_J) \\ b &= \beta g_{Bad} l_J^2 \\ c &= g_{Bad} l_O (l_F + \beta l_J) \\ d &= (g_{Bad} + l_O + i\omega c_{Ox2}) (l_J + l_O) (l_F + \beta l_J) \\ e &= l_F l_O^2 + \beta l_J [g_{Bad} l_J + l_O (l_J + l_O) + l_J i\omega c_{Ox2}] \end{aligned} \quad (3.92)$$

Zur Vereinfachung der Gleichungen wurden $g_{Bad} = G_{Bad}/A_{JM}$ und $c_{Ox2} = C_{Ox2}/A_{JM}$ verwendet. Abbildung 3.29 zeigt eine Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion. Deutlich zu erkennen ist, wie bei hohen Frequenzen die gesamte Anregungsspannung am Badwiderstand abfällt und der Betrag der Spannung im Spalt gegen null geht. Dieser Effekt ist bis auf einen sehr schmalen Bereich am Rande der Junction ortsunabhängig.

Einfluss der Messmethode auf das extrazelluläre Modell mit Bad

Wie schon in Kapitel 3.1.4 beschrieben, besteht ein reales extrazelluläres Experiment aus zwei Messungen: einer Messung mit Vesikel und einer Referenzmessung ohne Vesikel. Um die Systemeigenschaften zu eliminieren, werden die beiden gemessenen Drainströme dividiert. Ohne Badwiderstand erhält man so die reine Übertragungsfunktion des Vesikels. Wird aber ein hochohmiger Elektrolyt verwendet, besitzt das Bad ohne Vesikel die Übertragungsfunktion $h_{Bad}(\omega) = 1/(1 + i\omega\tau_{Bad})$ mit $\tau_{Bad} = R_{Bad}C_{Chip}$ und die Division ergibt:

$$h_{Mess,F}^E(\omega, a) = \frac{I_D^{\text{exp}}(\omega, a)}{I_D^{\text{ref}}(\omega, a)} = \frac{h_{3,F}^E(\omega, a)}{h_{Bad}(\omega)} \quad (3.93)$$

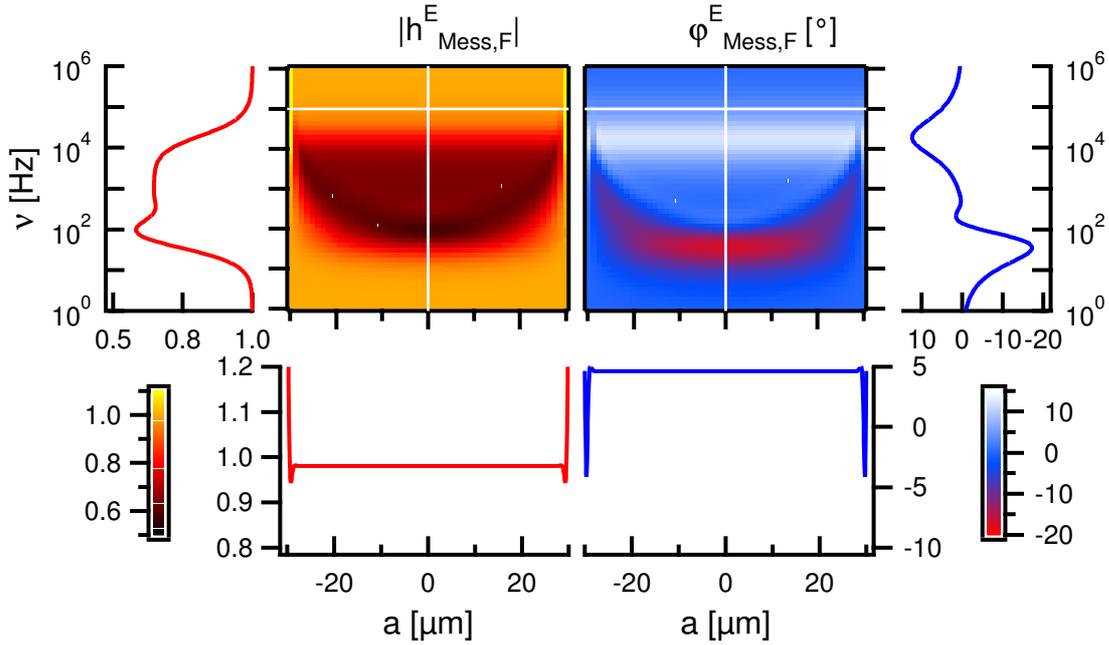


Abbildung 3.30: Simulation von Betrag und Phase der realen Experimenten vergleichbaren Übertragungsfunktion $h_{Mess,F}^E(\omega, a)$ bei extrazellulärer Anregung unter Berücksichtigung eines Badwiderstandes von $R_{Bad} = 1 \text{ M}\Omega$ und einer unbedeckten Chipkapazität von $C_{Ox2} = 0 \text{ pF}$. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_J = 30 \mu\text{m}$, $a_V = 50 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{ k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{ nm}$)

wobei $C_{Chip} = C_{Ox} + C_{Ox2}$. Abbildung 3.30 zeigt eine Simulation von Betrag und Phase der mit realen Experimenten vergleichbaren Übertragungsfunktion $h_{Mess,F}^E(\omega, a)$. Ähnlich wie im Punktkontaktmodell ist diese Funktion unterhalb der Grenzfrequenz des Tiefpasses nahezu identisch mit der Übertragungsfunktion des Vesikels $h_{3,F}^E(\omega, a)$. Bei hohen Frequenzen macht sich der Einfluss des Bades bemerkbar und der Betrag geht gegen eins. Die Phase zeigt gleichzeitig einen Überschwinger und nähert sich dann null an. Bis auf einen sehr schmalen Bereich am Rande der Junction ist die Funktion oberhalb der Grenzfrequenz des Tiefpasses ortsunabhängig.

Extrazelluläres Flächenkontaktmodell mit radiusabhängigem Abstand

Das Ortsprofil des Betrags weist in allen bisher erklärten extrazellulären Modellen am Rand der Junction einen signifikanten steilen Anstieg auf. Die Messungen in Kapitel 3.4 besitzen diesen jedoch nicht. Er kann auf einen flachen Anstieg der Membran mit dem Winkel θ am Rand der Adhäsionsfläche sowie auf die Isolierung der Junction durch die Säulen der Käfige zurückgeführt werden. Beide Effekte lassen sich analog Kapitel 3.1.5 durch Kombination des Schaltplanes in Abbildung 3.28 mit einem radiusabhängigen Abstand $d_J(a)$ der Junctionmembran von der Chipoberfläche simulieren. Die Leitfähigkeit in der Junction ρ_J wird als konstant angenommen. Damit folgt für die Längskonstante λ

und den Junctionparameter κ :

$$\left. \begin{array}{l} d_J(x, y) = d_J(a) \\ \rho_J(x, y) = \rho_J \end{array} \right\} \Rightarrow r_J(a) = \frac{\rho_J}{d_J(a)} \Rightarrow \begin{cases} \lambda = \sqrt{\frac{d_J(a)}{\rho_J g_{JM}}} \\ \kappa = \frac{1}{d_J(a)} \frac{\partial d_J(a)}{\partial a} \end{cases} \quad (3.94)$$

Analog der Herleitung des extrazellulären Modells mit Bad im Anhang D.2 wird zuerst die Übertragungsfunktion für den Fall ohne Bad $h_{4,F}^E(\omega, a)$ berechnet. Sie lässt sich numerisch aus Gleichung 3.83 ermitteln. Dies geschieht wieder mit Hilfe der Relaxationsmethode [Pre92]. Als Randbedingungen werden $V_{JS}(\omega, a_J) = V_{ES}(\omega)$ und $\frac{\partial V_{JS}}{\partial a}(\omega, 0) = 0$ V verwendet. Aus $h_{4,F}^E(\omega, a)$ berechnet sich dann die Übertragungsfunktion für den Fall mit Bad über:

$$h_{5,F}^E(\omega, a) = \frac{h_{4,F}^E(\omega, a)}{1 + i\omega \left(\frac{c_{Ox2}}{g_{Bad}} + \frac{c_{Ox}}{g_{Bad}} \langle h_{4,F}^E(\omega, a) \rangle \right)} \quad (3.95)$$

Die endgültige Fitfunktion bezieht schließlich wie schon im vorigen Abschnitt erklärt den Einfluss der Division durch die Referenzmessung mit ein.

$$h_{Fit}^E(\omega, a) = \frac{h_{5,F}^E(\omega, a)}{h_{Bad}(\omega)} \quad , \quad h_{Bad}(\omega) = 1/(1 + i\omega\tau_{Bad}) \quad (3.96)$$

wobei $\tau_{Bad} = R_{Bad}C_{Chip}$ und $C_{Chip} = C_{Ox} + C_{Ox2}$.

In den beiden folgenden Beispielen soll nur der Einfluss des radiusabhängigen Abstandes demonstriert werden. Deswegen wird hier der Widerstand des Bades R_{Bad} auf null gesetzt. Damit wird $h_{Fit}^E(\omega, a) = h_{4,F}^E(\omega, a)$. In den Fits in Kapitel 3.4 werden dagegen alle diskutierten Effekte berücksichtigt.

Zuerst sollen hier Betrag und Phase der extrazellulären Übertragungsfunktion $h_{4,F}^E(\nu, a)$ für den Fall einer am Rand der Adhäsionsfläche ansteigenden Membran betrachtet werden. Abbildung 3.31 zeigt den Fall eines Vesikels, der eine Adhäsionsfläche mit einem Radius von $a_J = 20 \mu\text{m}$ besitzt. Außerhalb der Adhäsionsfläche steigt die Membran unter einem Winkel von $\theta = 5^\circ$ bis zu einem Radius von $a_{Si} = 40 \mu\text{m}$ an. In die Simulation wurden weder die begrenzenden Säulen noch ein Badwiderstand mit einbezogen. Zusätzlich enthalten die Schnittgraphen die Grenzfälle $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$. Am Rande der Adhäsionsmembran ist deutlich eine Absenkung des Betrags durch die ansteigende Membran zu erkennen. Außerdem wird die komplette Funktion zu niedrigeren Frequenzen verschoben.

Ein ähnliches Ergebnis weist eine zweite Simulation auf. Hier wurde der Rand der adhären Membran durch eine Säule begrenzt. Abbildung 3.32 zeigt den Fall eines Vesikels, der eine Adhäsionsfläche mit einem Radius von $a_J = 20 \mu\text{m}$ besitzt. Zu größeren Radien hin befindet sich von $a_{Si} = 20 \mu\text{m}$ bis $a_{Sa} = 40 \mu\text{m}$ eine Säule mit einem Ersatz-Schichtwiderstand von $r_S = 1 \text{M}\Omega$. Weder ein Bereich mit ansteigender Membran noch ein Badwiderstand wurden berücksichtigt. Zum Vergleich wurden zusätzlich in den Schnittgraphen Simulationen mit $r_S = 0 \Omega$ und $r_S = 10 \text{M}\Omega$ eingezeichnet. Wie die Simulation zeigt, bewirken die Säulen ebenfalls am Rande der Adhäsionsmembran eine Absenkung des Betrags. Desweiteren ist eine Verschiebung der gesamten Funktion hin zu niedrigeren Frequenzen zu erkennen.

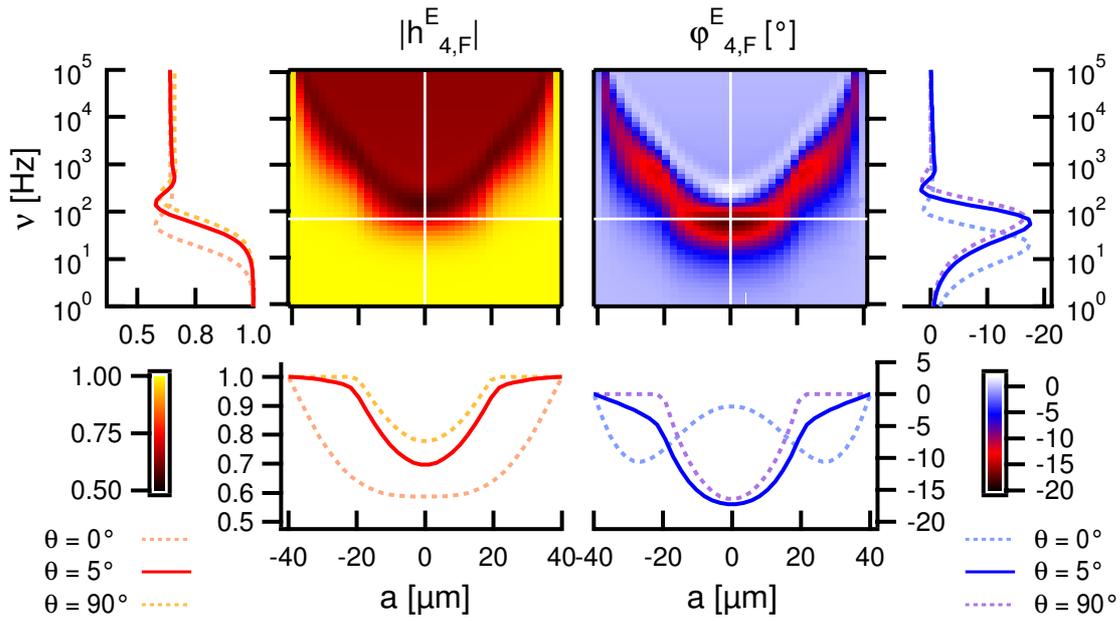


Abbildung 3.31: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{4,F}^E(\omega, a)$ bei extrazellulärer Anregung mit unter $\theta = 5^\circ$ ansteigender Membran am Rande der Junction ($a_J = 20 \mu\text{m}$). In den Schnittgraphen sind zusätzlich die Grenzfälle $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$ eingezeichnet. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_V = 60 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{nm}$, $R_{Bad} = 0\Omega$, $a_{Si} = 40 \mu\text{m}$, $r_S = 0\Omega$)

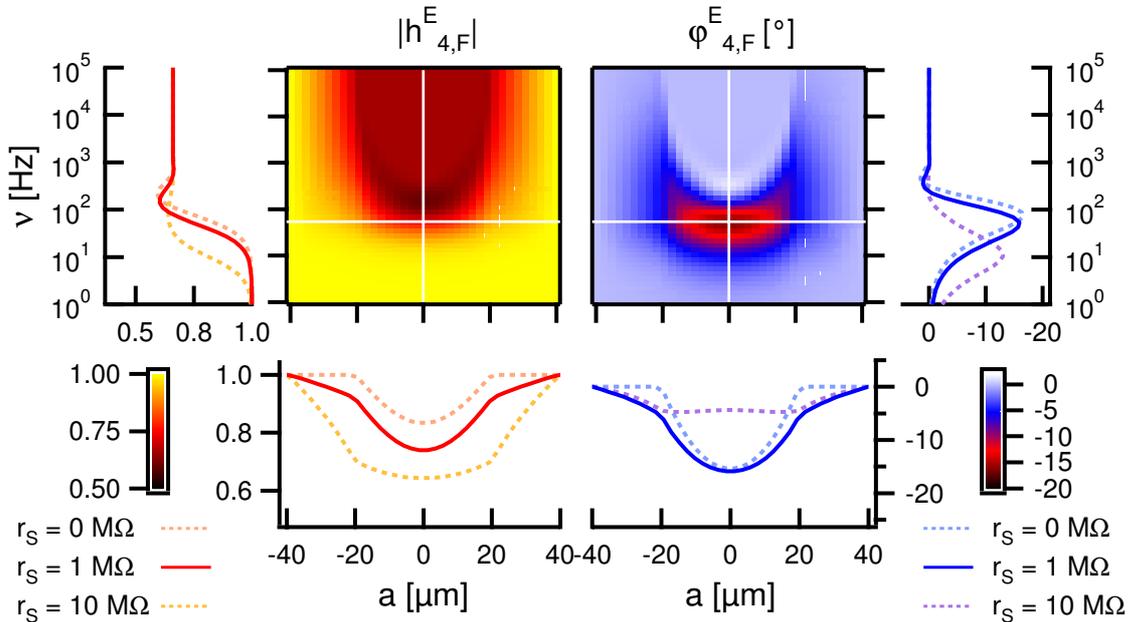


Abbildung 3.32: Simulation von Betrag und Phase der Übertragungsfunktion $h_{4,F}^E(\omega, a)$ bei extrazellulärer Anregung mit einer Säule $r_S = 1 \text{M}\Omega$ am Rande der Junction ($a_J = a_{Si} = 20 \mu\text{m}$). In die Schnittgraphen sind zusätzlich die Grenzfälle $r_S = 0\Omega$ und $r_S = 10 \text{M}\Omega$ eingezeichnet. (weitere Parameter: $c_{JM} = c_{FM} = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_{Ox} = 0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $g_{JM} = g_{FM} = 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, $a_V = 60 \mu\text{m}$, $\rho_J = 25 \text{k}\Omega\text{cm}$, $d_J = 90 \text{nm}$, $R_{Bad} = 0\Omega$, $a_{Sa} = 40 \mu\text{m}$)

3.2 Messapparatur

3.2.1 Messaufbau

Zweck des zweiten Aufbaus dieser Arbeit war es, Experimente zu ermöglichen, bei denen der örtliche Potentialverlauf im Kontaktpalt zwischen einem angestochenen Riesenvesikel und einem Siliziumchip bestimmt werden konnte. Dazu war es notwendig, den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen ersten Aufbau dieser Arbeit mit dem Messaufbau von V. Kießling zu kombinieren [Kie99]. Übernommen wurde die gesamte Elektronik, die für Lock-In-Messungen an Transistoren und Pipettenverstärkern entwickelt worden war. Zusätzlich wurde die Apparatur um einen zweiten Mikromanipulator erweitert. Da die alte Software für die geplanten intrazellulären Messungen zu langsam war, wurde die gesamte Apparaturansteuerung neu konzipiert und in LabVIEW 5.1 realisiert.

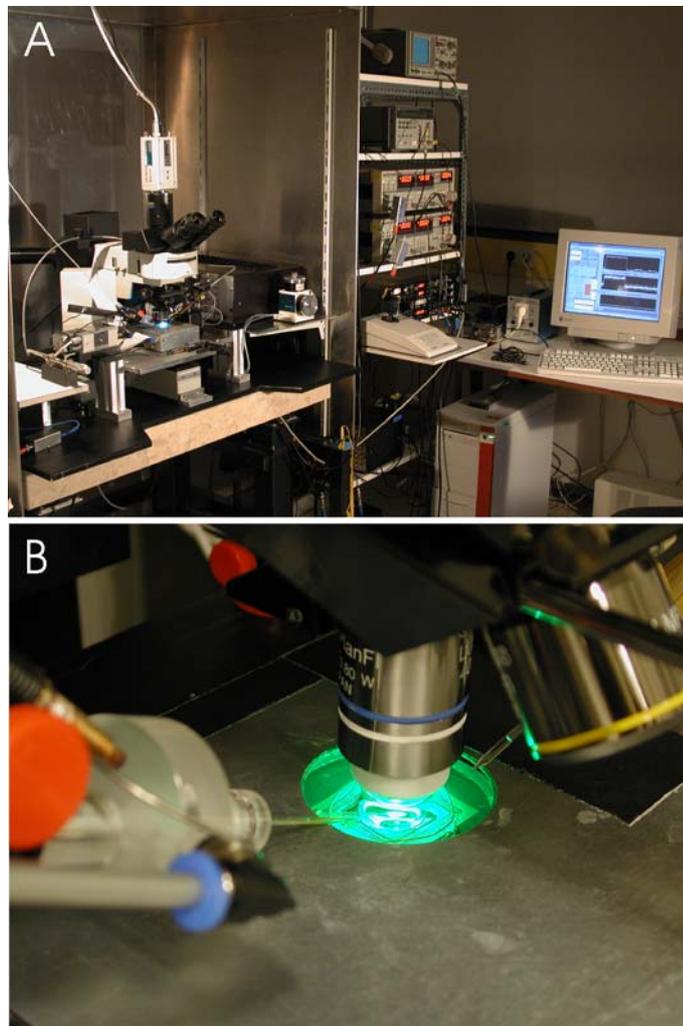


Abbildung 3.33: Photo der zweiten Apparatur. **A:** Überblick über den Messplatz. **B:** Der Chip befindet sich unter dem eingetauchten 40x-Objektiv in einem abschirmenden Metallgehäuse. Zwei Pipetten werden in das Bad eingetaucht.

Aus dem ersten Aufbau wurde die Grundkombination aus Mikroskop (BX-50-WI) mit Aufricht-Fluoreszenz-Einrichtung, Grundplatte und Mikromanipulator (Injectman) übernommen. Ebenfalls weiter verwendet wurde der für die Videoaufnahmen benötigte Computer mit zugehöriger CCD-Kamera. Der Pipettenverstärker (SEC-10L) wurde in die existierende Messelektronik von V. Kießling eingebaut. Abbildung 3.33 zeigt den neuen Aufbau im Überblick sowie eine Nahaufnahme der Messsituation.

Mittelpunkt der gesamten Apparatur ist der Adhesios 1.1-Chip, der über einen Keramiksockel kontaktiert wird. Von den insgesamt 96 Feldeffekttransistoren auf dem Chip können in einer Messung je 32 verwendet werden. Das lineare Sensorarray wird durch eine spezielle SU-8 Struktur, die zusätzlich auf die Chips prozessiert wurde, in drei unterschiedlich große Käfige unterteilt. Auf Chip und Sockel ist eine Messkammer zur Aufnahme des Badelektrolyten aufgeklebt. Die für eine Messung in die Kammer gegebenen Riesenvesikel können mit Hilfe einer größeren Pipette, die mit einem zusätzlich angebrachten größeren Mikromanipulator (WR-88, Narishige, Tokyo, Japan) verfahren wird, in einen der drei Käfige positioniert werden. Näheres zur Positionierung der Riesenvesikel befindet sich in Kapitel 3.3.2. Angestochen wurden sie mit Hilfe des feineren Mikromanipulators (InjectMan, Eppendorf, Hamburg).

Der Keramiksockel mit dem Chip befindet sich in einem Steckplatz, dessen Kontakte in einem abgeschirmten Metallgehäuse mit drei verschiedenen D-Sub-Buchsen verbunden sind. Je nach ausgesuchter Käfigstruktur auf dem Chip wird eine der Buchsen mit dem FET-Lock-In-Verstärker verbunden. Für Source und Bulk führt je ein abgeschirmtes Kabel zum Verstärker. Zur Positionierung des Chips unter den Mikroskopobjektiven kann das gesamte Gehäuse durch einen x-y-Tisch verfahren werden.

Sowohl Wechselspannungs- als auch Gleichspannungsmessungen können an der Apparatur vorgenommen werden. Ein genaues elektronisches Schema des Messaufbaus ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Wichtigster Bestandteil ist der FET-Lock-In-Verstärker mit 36 Kanälen. Außer der Bereitstellung der Versorgungsspannungen für die Transistoren ist seine Hauptaufgabe die rauscharme Strom-Spannungswandlung und Verstärkung der Drainströme I_D von 36 parallel betriebenen Feld-Effekt-Transistoren. Von den Signalen der einzelnen Kanäle werden anschließend die Offsets des Arbeitspunktes der Transistoren abgezogen und das Ergebnis 40-fach verstärkt. Die Offsetkorrektur geschieht über programmierbare DACs (*digital analog converter*), die für jeden FET vorhanden sind. Die Einstellung der DACs wird durch den Computer vorgenommen (DAC Control). Danach werden die Signale durch zwei Lock-In-Verstärkerschaltungen pro Kanal in Real- und Imaginärteil zerlegt. Für jeden FET stehen damit vier Messsignale zur Verfügung: ein 1:1 gewandeltes Spannungssignal, ein 1:40 verstärktes Signal sowie Real- und Imaginärteil der 1:40 Spannung. Die Details der Schaltung sind in der Arbeit von V. Kießling [Kie99] erklärt.

Das Einlesen der analogen FET-Verstärker-Signale in den Computer geschieht über eine AD-Wandler Karte mit 64 Kanälen (64xIn; AT-MIO-64E-2, National Instruments, Austin, USA). Sie ist über einen 64x4 Multiplexer mit dem FET-Lock-In-Verstärker verbunden. Über eine dreiadrige digitale Leitung (M-Control) kann selektiert werden, ob an den Eingängen der Karte die 1:1 Spannungen von Kanal 0-35, die 1:40 Spannungen von Kanal 0-35, Real- und Imaginärteil von Kanal 0-32 oder Real- und Imaginärteil von Kanal 33-36 anliegen. Theoretisch könnte der Multiplexer 256 Kanäle von 64 FETs durchschalten. In den Messungen dieser Arbeit wurden aber nie mehr als 32 FETs verwendet. Ebenso viele benötigt man für die größte Käfigstruktur.

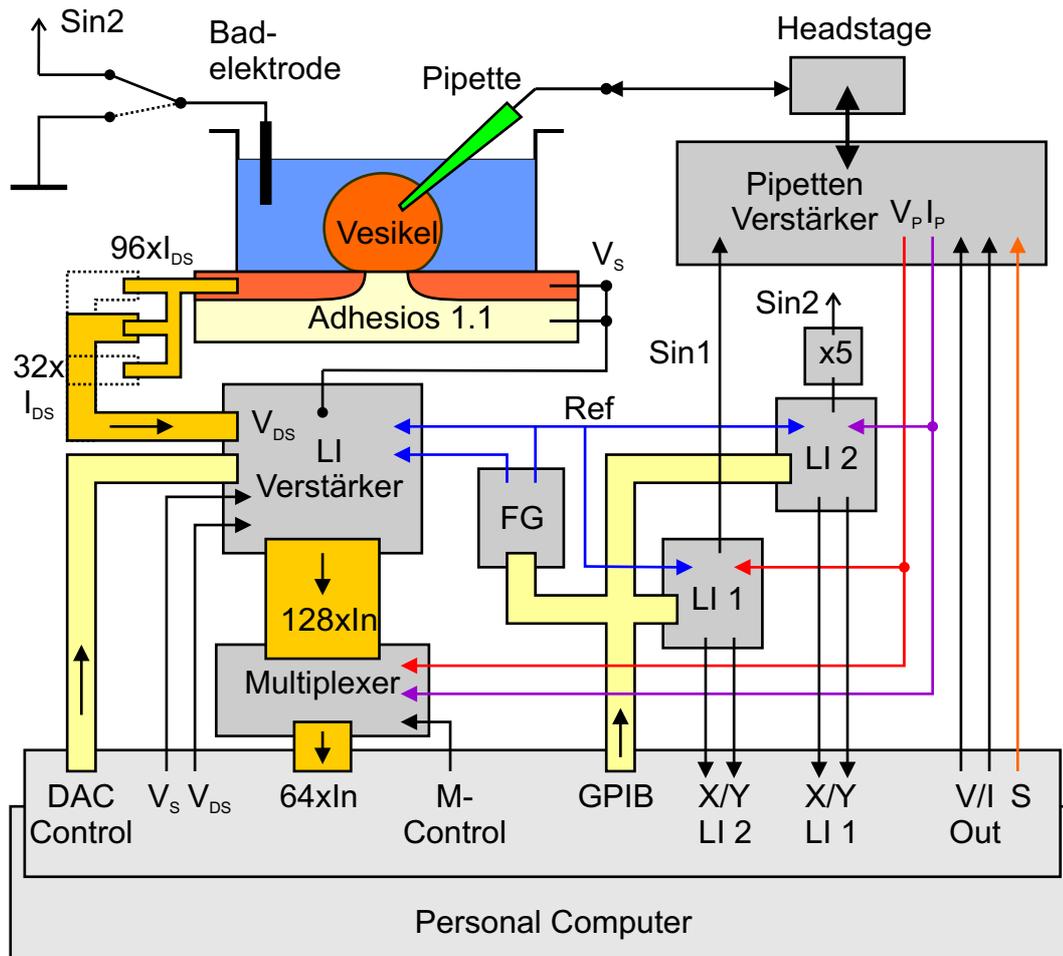


Abbildung 3.34: Schema der Messelektronik.

Der an die Anstechpipette angeschlossene Pipetten-Verstärker (SEC-10L) ermöglicht es wie im ersten Aufbau, entweder Strom oder Spannung zu klemmen. Die entsprechenden Modi können über eine Kontrollleitung (S) durch den Computer umgeschaltet werden, was die Geschwindigkeit der Messungen beschleunigt. Während Spannungs- und Stromkontrollleitung (V/I Out) über die erste Messkarte mit dem Computer verbunden sind, werden die Strom- und Spannungsausgänge (I_P , V_P) des SEC-10L über den Multiplexer im 1:40 Modus über höhere ungenutzte Kanäle ausgelesen.

Bei Wechselstrommessungen ist es außerdem möglich, das Strom- und Spannungssignal des Pipetten-Verstärkers mit zwei zusätzlichen Lock-In-Verstärkern (LI 1, LI 2; SR830 DSP, Stanford, Sunnyvale, USA) in Real- und Imaginärteil zu zerlegen und die Messsignale (X/Y LI 1, X/Y LI 2) über eine zweite Messkarte (AT-MIO-16DE-10, National Instruments) einzulesen. Je nach Art der Messung wird dabei das Anregungssignal vom ersten oder zweiten Lock-In-Verstärker produziert. Bei intrazellulären Messungen speist LI 1 sein Sinussignal (Sin 1) in einen ungefilterten Spannungs-Kontroll-Eingang des SEC-10L, während bei extrazellulären Messungen LI 2 die Spannung der Badelektrode moduliert (Sin 2). Diese kann zwischen Masse und Sinussignal umgeschaltet werden. Für Messungen mit niedrigen Leitfähigkeiten des Badelektrolyten ist es notwendig, einen zusätzlichen

Fünffach-Verstärker zwischen LI 2 und Badelektrode zu schalten. Somit kann das Bad mit bis zu 25 V moduliert werden.

Während der Lock-In-Messungen fungiert ein Frequenzgenerator (FG; 8904A, Hewlett-Packard, Loveland, USA) mit zwei eigenständigen Kanälen als gemeinsamer Taktgeber für die übrigen Geräte. Er erzeugt zwei um 90° gegeneinander verschobene Sinus-Signale (Ref). Diese steuern einerseits die Anregungssignale der beiden einzelnen Lock-In-Verstärker (LI 1, LI 2), dienen andererseits aber auch als Referenz für die Real- und Imagärteile des FET-Lock-In-Verstärkers.

Die Ansteuerung der beiden Lock-In-Verstärker sowie des Frequenzgenerators geschieht mit dem Computer über eine GPIB-Karte (National Instruments).

3.2.2 Der Adhesios 1.1 Chip

Die Adhesios 1.1. Chips wurden von der Abteilung Mikromechanik der TU Berlin hergestellt. Ein Exemplar ist in Abbildung 3.35 zu sehen. Die Fertigung aus n-dotierten Silizium-Wafern erfolgte mittels eines Silizium-Planar-Prozesses. Da die gesamte Prozessführung schon detailliert von V. Kießling beschrieben wurde [Kie99], werden hier Chipaufbau und Herstellung nur grob skizziert.

Beim Adhesios 1.1. handelt es sich um einen 12 mm x 12 mm großen Chip, der in seinem Zentrum 96 EOSFETs besitzt. Diese sind in einer Linie angeordnet. Ihre Sensorflächen (Gates) besitzen eine Länge von $2.4 \mu\text{m}$ und eine Breite von $2.0 \mu\text{m}$. Der Abstand zwischen den einzelnen Transistoren beträgt $1.6 \mu\text{m}$. Somit ergibt sich eine Distanz von $3.6 \mu\text{m}$ zwischen den Messpunkten. An beiden Ränder des FET-Arrays befindet sich je eine Reizfläche. Diese sollten es ermöglichen, den Chip auch für die Stimulationsexperimente an Neuronen einzusetzen. Sie fanden aber in dieser Arbeit keine Verwendung. In Abbildung 3.36 sind Details des Chip-Designs abgebildet.

Ebenfalls historisch bedingt ist die Zuführung der mit Bor p-dotierten Zuleitungen, welche die Source- und Drain-Bereiche der Transistoren mit den Kontaktierungen am Rande des Chips verbinden. Alle Kontakte liegen in einer Hälfte des Chips, um eventuelle Messungen mit aufgezogenen Lipidmembranen zu ermöglichen. Von den insgesamt 100 Zuleitungen führen 96 zu den Drain-Bereichen, zwei zum Source-Bereich und zwei zu den Reizflächen. Die Verwendung einer gemeinsamen Source, die sich erst unmittelbar in der

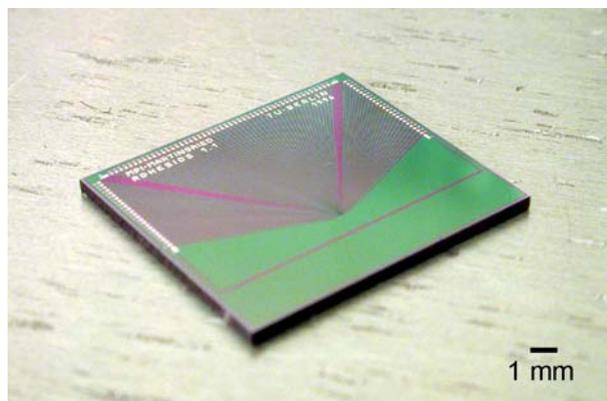


Abbildung 3.35: Photo eines Adhesios 1.1 Siliziumchips mit einer Kantenlänge von 12 mm.

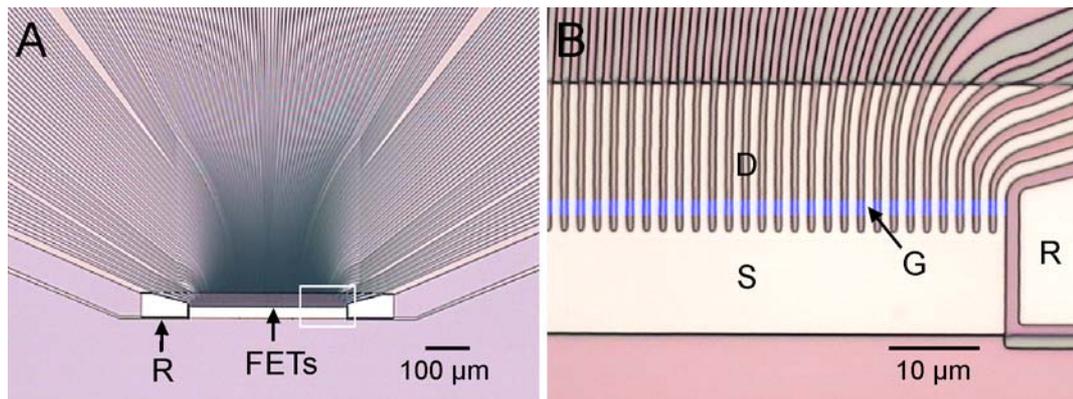


Abbildung 3.36: Details des Adhesios 1.1 Siliziumchips. **A:** Im Zentrum des Chips befindet sich ein FET-Array mit 96 Transistoren. Es wird an beiden Enden durch Reizspots (R) abgeschlossen. Die Zuleitungen führen von den Transistoren nach oben weg. **B:** Im Zoom sind deutlich die Oxidbahnen zwischen den Drainzuleitungen (D) zu erkennen. Ebenfalls sichtbar ist der gemeinsame Sourcebereich (S) und der Rand eines Reizspots (R). Die nicht erkennbaren Gate-Regionen (G) sind blau eingefärbt.

Nähe des Sensorfeldes auf die einzelnen Transistoren aufteilt, wird mit *common source* bezeichnet. Die Zuleitungen sind voneinander durch ein lokal gewachsenes Oxid (LOCOS) isoliert. So wird verhindert, dass zwischen den Transistoren parasitäre Transistorenkanäle entstehen. Um die isolierenden Eigenschaften des LOCOS zu verstärken, wurde das Silizium unter dem LOCOS mit Phosphor n-dotiert. Dies wird auch *channel stop* genannt. Teilweise wurden Chips mit lokalem Oxid hergestellt, das durch vorheriges Wegätzen von Silizium abgesenkt war (recessed LOCOS). Die in dieser Arbeit verwendeten Chips wiesen diese Eigenschaft jedoch nicht auf und besaßen damit größere Höhenunterschiede an der Chipoberfläche.

Der gesamte Chip ist vom Bad durch ein circa 400 nm dickes Passivierungsoxid isoliert. Nur in der Gateregion wurde ein $50\ \mu\text{m} \times 550\ \mu\text{m}$ Fenster freigeätzt. An dieser sensitiven Stelle sind Chip und Bad nur durch das 8 nm dicke Gateoxid getrennt. Dieses besitzt eine spezifische Kapazität von $c_{Ox} = \epsilon_0 \epsilon_r / d_{Ox} = 0.4\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Die Zuleitungen können am Rande des Chips über circa $70\ \mu\text{m}$ große mit Aluminium bedampfte Flächen kontaktiert werden. Zwischen den Kontaktflächen wurde durchschnittlich $100\ \mu\text{m}$ Abstand gelassen. Zu den 100 Zuleitungskontakten kommen noch zwei weitere Bulk-Kontakte hinzu, die über phosphordotiertes Silizium mit dem Substrat des Chips verbunden sind.

3.2.3 SU-8 Strukturen

Damit auf Adhesios 1.1-Chips Riesenvesikel angestochen werden konnten, mussten sie mit einer zusätzlichen Käfigstruktur versehen werden. Anstatt des in Kapitel 2.2.4 verwendeten Polyimids wurde dieses Mal SU-8-10 (MicroChem, Newton, Massachusetts, USA) benützt. Der Hauptgrund für diesen Wechsel war die nun angestrebte Strukturhöhe von $110\ \mu\text{m}$, die mit Polyimid nur schwer zu erreichen ist. Außerdem ist die Lichtempfindlichkeit des Polyimids sehr hinderlich bei der Positionierung der Masken auf den Chip. Beim SU-8 handelt es sich um einen Epoxid-basierten Negativ-Photolack, der speziell für die

Erstellung hoher Strukturen mit aspect ratios (Höhe:Breite) von bis zu 20:1 entwickelt wurde. Im Folgenden wird die Prozessierung der neuartigen Käfigstruktur schrittweise erläutert. Abbildung 3.37 zeigt die endgültige Struktur.

Maskendesign: Aus den Erfahrungen mit den Polyimidstrukturen war bekannt, dass Säulen mit $25\ \mu\text{m}$ Durchmesser zwar einerseits optimal geeignet sind, um Riesenvesikel zu fixieren, andererseits aber relativ instabil sind. Deswegen musste beim Design der neuen Struktur auf eine größere Kontaktfläche zum Chip geachtet werden. Limitierend war dabei die Tatsache, dass das Material durch den Prozess unter Spannung gerät. Bei einigen Teststrukturen führte dies zum Ablösen von größeren zusammenhängenden Strukturen. Ausgangspunkt bei der Designfindung waren drei über dem linearen FET-Array angeordnete hexagonale Käfige bestehend aus Säulen mit $25\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Die Innenradien der Käfige betragen $40\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $60\ \mu\text{m}$. Die Säulen wurden dreiecksförmig nach außen um circa $100\ \mu\text{m}$ in die Länge gezogen. Auf diese Weise konnten die Strukturen vergrößert werden, ohne den Zugang zu den Riesenvesikeln zu erschweren. Prozess-Schwächen wie Quervernetzung zwischen eng zusammenliegenden Strukturen und Abrundung von spitzen Ecken wurde durch Brücken zwischen benachbarten Säulen und abgerundete Strukturen vorgebeugt.

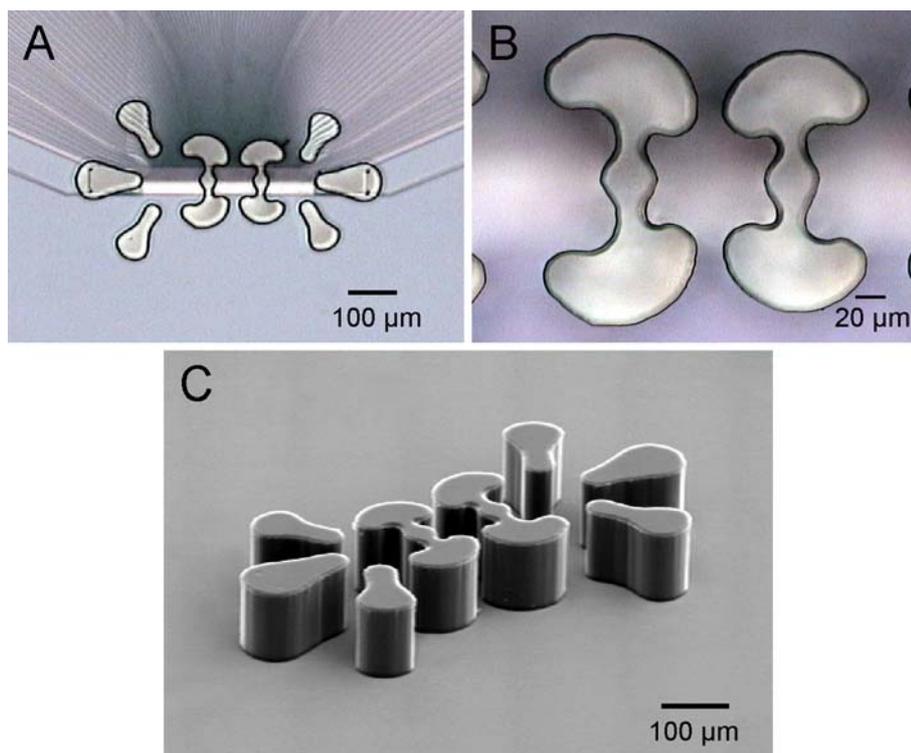


Abbildung 3.37: Käfigstruktur aus SU-8 zur Fixierung von Riesenvesikeln auf dem Adhesios 1.1. Chip. **A:** Überblick über die Gesamtstruktur. Sie bietet drei unterschiedlich großen Vesikeln Platz. (Innenradien von links nach rechts: $60\ \mu\text{m}$, $40\ \mu\text{m}$ und $50\ \mu\text{m}$) **B:** Zoom auf den Käfig in der Mitte der Struktur. **C:** REM-Aufnahme der $600\ \mu\text{m}$ langen und circa $110\ \mu\text{m}$ hohen Gesamtstruktur auf einem blanken Siliziumchip (Aufnahme von D. Müller).

Maskenherstellung: Auch in diesem Prozess werden die schon in Kapitel 2.2.4 näher erläuterten Diamasken verwendet.

Reinigung: Die optimale Reinigungsprozedur für Siliziumchips wäre eigentlich ein Bad in CARO-scher Säure. Da diese stark oxidierende Lösung aber die Aluminiumkontakte angreift, muss die Säuberung der Adhesios 1.1-Chips stattdessen durch eine Folge fünfminütiger Ultraschall-Bäder in Aceton, Isopropanol und Reinstwasser vorgenommen werden.

Dehydratisierung: Um die Adhäsion des SU-8 auf Siliziumchips zu verbessern, werden diese normalerweise vor dem Aufschleudern durch ein Sauerstoffplasma dehydratisiert. Dieses zerstört jedoch EOSFETs. Stattdessen werden die Chips deshalb für eine Stunde bei 200 °C in einem Umluftofen (LUT 6050 LAF, Heraeus, Hanau) platziert. Anschließend müssen sie zehn Minuten lang bei 100 °C in einem zweiten Trockenofen (Heraeus) abkühlen.

Aufschleudern: Nach zweiminütigem Abkühlen außerhalb des Ofens werden 0.5 ml Lack für 2-10 Minuten auf die einzelnen Chips gegeben. Anschließend erfolgt ein zweistufiger Schleuderprozess mit 500 rpm (1500 rpm/s) und 930 rpm (200 rpm/s) für jeweils 20 s. Der erste Schritt dient dabei dem Verteilen des SU-8, der zweite dem Einstellen der Schichtdicke. Letzterer wurde zusätzlich so eingestellt, dass die Lackschicht in der Mitte der Chips ein Maximum aufweist. Eine gleichmäßige Verteilung ist bei kleinen Chips unmöglich.

Prebaking: Bevor der Lack belichtet werden kann, muss erst ein Großteil des Lösungsmittels ausgetrieben werden. Dieser Schritt, auch Pre- oder Softbaking genannt, erfolgt bei dicken Schichten möglichst langsam und schonend, um mechanische Spannungen im Material gering zu halten. Der Chip wird unmittelbar nach dem Aufschleudern für zehn Minuten auf eine 50 °C warme Hotplate (Thermoplate S, Desaga, Wiesloch) platziert. Dann folgen zehn Minuten bei einer Temperatur von 75 °C. Nach abschließenden fünf Minuten bei 95 °C muss die Hotplate langsam auf 65 °C abkühlen, bevor die Chips entfernt werden dürfen.

Belichten - Exposure: Jeder Chip wird einzeln durch die Diamaske 85 s belichtet. Verwendet wird dazu ein Maskaligner (MA 4 BSA, Karl Suss, Garching) mit einer UV-Linie bei 436 nm und einer Strahlungsleistung von 24 mW/cm². Dabei wurde auf das gut sichtbare 50 µm x 550 µm große Fenster im Passivierungsoxid des Adhesios 1.1. aligned.

Post-Exposure Bake: Um die durch das Belichten initiierte Quervernetzung zu verbessern, werden die Chips danach erneut für fünf Minuten auf die 50 °C warme Hotplate gelegt. Nach einem 30 minütigen und 75 °C heißen Plateau muss die Hotplate wieder langsam auf 65 °C abkühlen, bevor die Chips entfernt werden können.

Entwicklung: Zur Entfernung der unbelichteten Bereiche des SU-8 werden die Chips für sieben Minuten in 100 ml des Entwicklers XP-SU-8 (MicroChem, Newton, Massachusetts, USA) getaucht. Das abschließende Spülen (*Rinsing*) erfolgt durch ein einminütiges Bad in frischem Entwickler und Abspritzen mit Ethanol.

Flood-Belichtung: Um die Quervernetzung der fertigen Strukturen zu optimieren, werden die Chips noch einmal 500 s lang ohne Maske im Maskaligner bei einer Strahlungsleistung von 21 mW/cm^2 belichtet.

Hardbaking: Damit alle Lösungsmittel verdampfen und die Strukturen vollständig polymerisieren, werden die Chips zum Abschluss des Prozesses erneut auf die 50°C warme Hotplate gegeben. Nach zwei Stunden bei 200°C und anschließendem langsamen Abkühlen sind die $100 - 120 \mu\text{m}$ hohen SU-8 Strukturen fertig.

SU-8 lässt sich bei Fehlprozessierungen durch mehrere längere CARO-Bäder sowie Ultraschall entfernen. Laugen gegenüber ist das Material relativ resistent.

Kontaktierung des Adhesios 1.1

Nach der erfolgreichen Prozessierung der neuartigen Käfigstrukturen auf dem zentralen FET-Array des Adhesios 1.1 wurden diese mit einem medizinischen Silikonkleber (MK3, Osypka, Rheinfelden-Herten) auf einen Keramiksockel (CPGA208L, Spektrum, San Jose, USA) geklebt. Von den insgesamt 208 Goldkontakten des Sockels wurden 102 durch Aluminiumdrähte mit dem Chip verbunden. Hierzu wurde ein Ultraschallbonder (4523A, Kulicke & Soffa, Radfeld, Österreich) verwendet. Auf Chip und Sockel wurde mit dem Silikonkleber eine hohle Wanne für den Elektrolyten befestigt. Abschließend wurde diese Struktur zur Stabilisierung mit flüssigem Epon (Serva, Heidelberg) gefüllt und drei Stunden bei 90°C ausgehärtet. Abbildung 3.38 zeigt das Ergebnis.

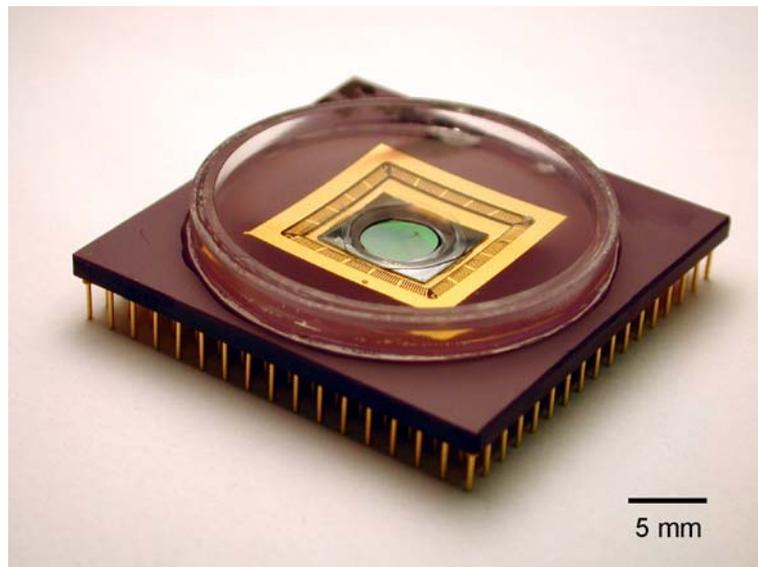


Abbildung 3.38: Keramiksockel mit einer Kantenlänge von 4.2 cm. Auf den Sockel aufgeklebt ist eine Wanne aus PMMA, in deren Mitte ein Adhesios 1.1. Chip mit Säulenstruktur zu sehen ist.

Kennlinien des Adhesios 1.1

Um die Funktionsfähigkeit der gebondeten und verklebten Chips zu testen und um den optimalen Arbeitspunkt zu bestimmen, wurden von den insgesamt fünf verwendeten Chips Kennlinien aufgenommen. Abbildung 3.39 zeigt exemplarisch die Kennlinien eines EOS-FETs auf einem Adhesios 1.1-Chip. Um die für die Bestimmung des Arbeitspunktes wichtige Steigung $g_m = \partial I_D / \partial V_{ES}$ besser zu erkennen, wurde im Gegensatz zu den Kennlinien in Abbildung 3.1 der Drainstrom I_D gegenüber der Elektrolyt-Source-Spannung V_{ES} aufgetragen.

Bei den verwendeten EOSFETs ist es nicht wie bei normalen Feldeffekttransistoren möglich, beliebige Source- und Drainspannungen anzulegen. Da das Gate bei den EOS-FETs ein Elektrolyt ist, muss darauf geachtet werden, dass keine positiven Metallionen, wie zum Beispiel Natrium, in das Gateoxid eingebaut werden. Deswegen hält man den Chip immer auf einem positiven Potential gegenüber dem Bad, was gleichbedeutend mit $|V_{ES}| \geq |V_{DS}|$ ist.

Da die Kennlinien aller verwendeten Chips ähnlich waren, wurde immer derselbe Arbeitspunkt verwendet. Ausgewählt wurde eine Elektrolyt-Source-Spannung von $V_{ES} = -1.8 \text{ V}$ und eine Drain-Source-Spannung von $V_{DS} = -1.5 \text{ V}$. Bei diesen Spannungen fließt ein Offset-Strom von $I_D \approx 100 \mu\text{A}$. Wie es für p-Kanal Transistoren üblich ist, wurde das Substrat der Chips (Bulk) auf Sourcepotential V_S gehalten. Dasselbe gilt für die ungenutzten Reizspots.

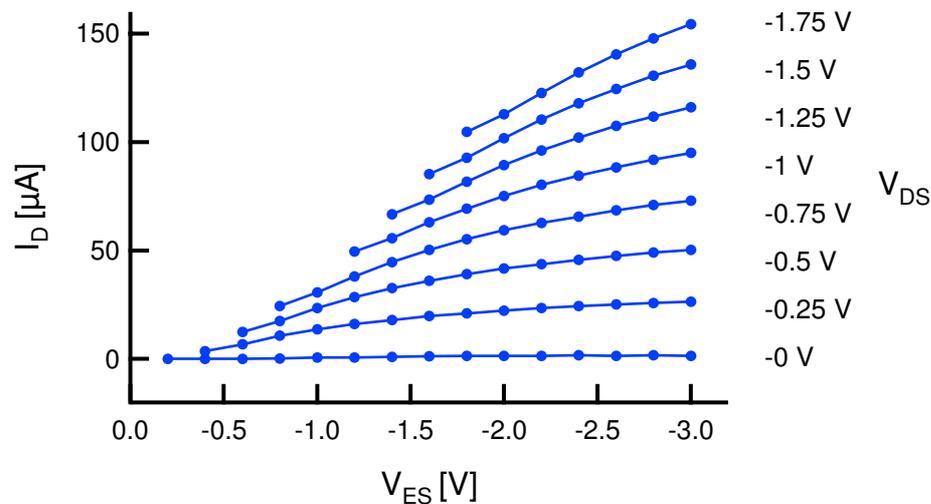


Abbildung 3.39: Kennlinien eines p-Kanal EOSFETs auf einem Adhesios 1.1 Chip. Aufgetragen ist der Drainstrom I_D gegenüber der Elektrolyt-Source-Spannung V_{ES} . Hierbei wurde außerdem die Drain-Source-Spannung V_{DS} in 0.25 V Schritten variiert.

3.3 Versuchsvorbereitungen

Alle Lock-In-Messungen wurden an nur fünf verschiedenen Chips vorgenommen. Die Chipoberflächen wurde weder durch die Riesenvesikel noch durch die abwechselnden BSA-Beschichtungen und Reinigungsprozeduren angegriffen. Lediglich das Ablösen von Säulenstrukturen durch unbeabsichtigtes Anstoßen mit der Saugpipette beim Positionieren der Vesikel machte die Chips unbrauchbar. Reinigung, Beschichtung und Positionierung werden im Folgenden genauer beschrieben.

3.3.1 Reinigung und Beschichtung der Chips

Reinigung und Beschichtung der Chips sind ein miteinander verknüpfter, nicht trivialer Vorgang. Die bisher übliche Methode zum vollständigen Entfernen von Zellresten ist, die Oberfläche unter Wasser mechanisch mit einem weichen Wattestäbchen abzureiben. Bei den mit Säulen bestückten Adhesios-Chips ist dies jedoch nicht mehr möglich. Auch das im ersten Teil der Arbeit verwendete Reinigen mit Ultraschall kann nicht benutzt werden, da es sowohl die Bonddrähte als auch die SU-8 Strukturen ablöst. Stattdessen werden die Chips, deren Wanne auch zwischen den Experimenten mit Reinstwasser gefüllt ist, als erstes zweimal für 30 Sekunden CARO-scher Säure ausgesetzt. Um ihre Aktivität abzuschwächen, wird diese schon zehn Minuten vorher angesetzt. Dabei wird die Säure senkrecht von oben mit einer auf 1 cm Öffnungsdurchmesser abgeschliffenen Pasteurpipette so appliziert, dass nur der Chip benetzt wird. Auf diese Weise vermeidet man eine Beschädigung der PMMA-Wannen durch die Säure. Während der Applikation muss das Volumen der Pasteurpipette mit dem benetzenden Tropfen in Kontakt bleiben, um einen Flüssigkeitsaustausch zu gewährleisten. Danach folgen ein Bad in Reinstwasser, zwei Bäder mit 20 °C warmer, zwei-prozentiger Tickopur-Lösung (RP 100, Badelin, Berlin) und ein abschließendes Bad in Reinstwasser. Diese vier zehnminütigen Bäder dienen der vollständigen Neutralisation und Entfernung von Säureresten. Nach beiden Säureapplikationen sowie den beiden Tickopurbädern werden die Chips zusätzlich mit einem kräftigen Wasserstrahl aus einer PET-Flasche abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Der Wasserstrahl dient außerdem der Entfernung kleinster, in den Strukturen verbleibender Luftblasen vor der Beschichtung. Zur eigentlichen Beschichtung wird über Nacht eine 2 mg/ml BSA-Lösung in PBS (PBS Dulbecco's, GIBCO, Paisley, Schottland) auf den noch benetzten Chip gegeben. Einige Stunden vor den eigentlichen Experimenten wird der Chip gründlich gespült und die Wanne mit Pufferlösung gefüllt. Diese aufwendige Reinigungs- und Beschichtungsprozedur wird durch die hohen SU-8 Strukturen bedingt, welche den Austausch der verschiedenen Lösungen behindern.

3.3.2 Positionierung der Vesikel

Ein allgemeines Problem der Chipmessungen ist die Positionierung der Zellen beziehungsweise der Riesenvesikel über den FETs. Bei Rattenneuronen und HEK-Zellen wird gänzlich darauf verzichtet. Bei genügend dichter Kultivierung ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle an der richtigen Stelle sitzt, hoch genug, um reproduzierbar Messungen vorzunehmen. Bei Neuronen, die einzeln aus den Ganglien von Schnecken präpariert werden müssen, ist die Anzahl dagegen nicht mehr hoch genug. Hier etablierte es sich als Standardmethode, die Nervenzellen in selbstgezogene Glaspipetten einzusaugen, weit über den FETs auszu-

stoßen und durch geschicktes Blasen die Zelle während des Herabfallens zu positionieren. Dabei wird der Pipettendruck über einen Silikonschlauch mit dem Mund reguliert und die Pipette mit der Hand koordiniert. Diese Methode war jedoch für Riesenvesikel nicht geeignet. Durch die zu ungenaue Steuerung des Drucks wurden die Riesenvesikel beim Einsaugen zerstört. Desweiteren passten die Vesikel mit Durchmessern über $100\ \mu\text{m}$ nicht mehr durch die maximal erreichbare Pipettenöffnung. Gelöst wurden die Probleme durch die Verwendung einer Mikrometerspritze (Aglä, Burroughs Wellcome, Großbritannien) zur Regulierung des Drucks sowie eines weiteren Mikromanipulators (WR-88, Narishige, Tokyo, Japan) zur genaueren Steuerung der Pipette. Nun war es möglich, Riesenvesikel entweder durch leichtes Ansaugen zu fixieren oder sie so vorsichtig einzusaugen, dass sie nicht zerstört wurden. Anschließend wurde die Pipette bis auf circa $100\ \mu\text{m}$ an den gewünschten Käfig angenähert und der Vesikel vorsichtig hineingeblasen. Abbildung 3.40 zeigt einen Vesikel, der im mittleren der drei Käfige gefangen ist. Im Folgenden wird die Position eines Vesikels in der Käfigstruktur mit **Käfig A-C** bezeichnet. Die Zuordnung ist in der Abbildung genau festgelegt. Dabei handelt es sich bei Käfig A um den untersten mit $60\ \mu\text{m}$, bei Käfig B um den mittleren mit $40\ \mu\text{m}$ und bei Käfig C um den obersten mit $50\ \mu\text{m}$ Radius.

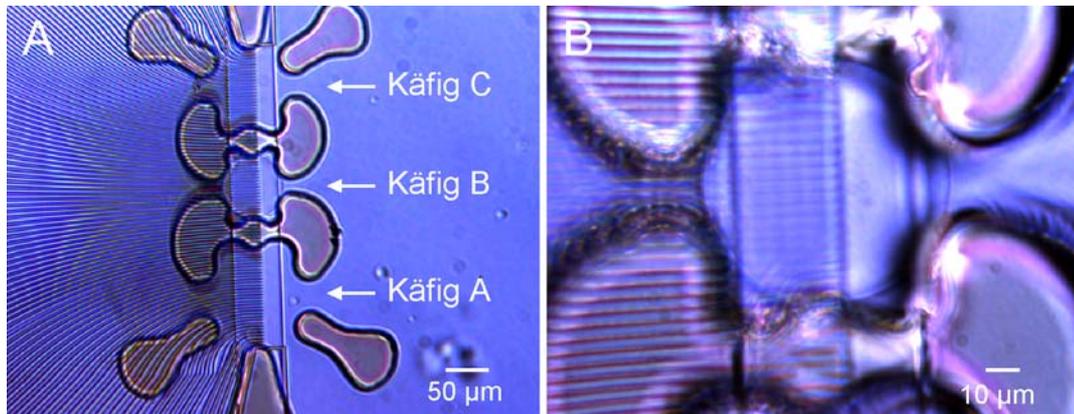


Abbildung 3.40: Riesenvesikel in SU-8-Struktur auf einem Adhesios 1.1.-Chip. **A:** Überblick über die Gesamtstruktur, die aus den drei Käfigen A-C besteht. (Radien: Käfig A: $60\ \mu\text{m}$, Käfig B: $40\ \mu\text{m}$ und Käfig C: $50\ \mu\text{m}$). Ein Vesikel befindet sich im mittleren Käfig (B). **B:** Zoom auf den Vesikel im mittleren Käfig (B).

3.4 Messung extrazellulärer Übertragungsfunktionen

3.4.1 Durchführung

Für einwandfreie elektrische Messungen mit Riesenvesikeln auf Chips ist es notwendig, die Vesikel nach der Herstellung direkt in ein Falcon-Schälchen mit 2 ml Puffer umzusetzen. Von dort werden nach mindestens einer Stunde 0.2 ml direkt auf den Chip zu weiteren 2 ml Puffer hinzugegeben. Nach der Selektion und Positionierung des gewünschten Vesikels muss mindestens eine weitere Stunde gewartet werden, bevor sich die Lösungen gleichmäßig vermischt haben und die Vesikel optimal adhärirt sind. Erst dann kann mit den Messungen begonnen werden.

Unmittelbar vor dem Beginn der Messungen werden die Arbeitsspannungen der 32 ausgewählten Transistoren eingestellt und die resultierenden Drainströme durch Addition von Offsetströmen auf null geregelt. Die computergesteuerte Apparatur bewerkstelligt diesen Vorgang selbständig in circa einer Minute.

In den Messungen der extrazellulären Übertragungsfunktionen wird die Spannung des Bades mit einem Sinussignal ($\sin 2$) moduliert und das resultierende Spannungsprofil im Spalt zwischen Vesikel und Chip detektiert. Die in Spannungen gewandelten Drainströme I_D der 32 einzelnen Transistoren werden durch den FET-Lock-In-Verstärker in Real- und Imaginärteil zerlegt und mit dem Computer über mehrere Perioden gemittelt. Die Messung wird mit bis zu 42 verschiedenen Frequenzen wiederholt, wobei die Reihenfolge von hohen zu niedrigen Frequenzen geht. Je niedriger die verwendete Frequenz ist, desto länger muss zwischen Einstellen des Signals und Beginn der Messung gewartet werden. Außerdem haben kleine Frequenzen längere Mittelungs- und damit Messzeiten der Lock-In-Verstärker zur Folge.

Als Badlösung wurde in allen vorgestellten Messungen eine Tris/HCl Pufferlösung mit einem pH von 7.4 (PB-Lösung) verwendet. Da der Adhäsionsabstand von Riesenvesikeln auf BSA-beschichteten Chips mit 93 nm sehr groß ist, wurde der spezifische Widerstand der Lösung auf 23 k Ω cm erhöht, um eine gute elektrische Kopplung zu erreichen. Dazu musste die Tris-Konzentration der Lösung auf 0.5 mM gesenkt werden. Zur Kontaktierung des Elektrolytbades wurde dabei eine Silber/Silberchloridelektrode verwendet, die über einen Handschalter und einen fünffach Verstärker mit dem Sine-Out Ausgang des zweiten Lock-In-Verstärker (LI 2) verbunden ist. Sie umschloss das FET-Array in der Form eines Rings mit 2 cm Durchmesser.

Der hohe Widerstand des Elektrolytbades hat wichtige Folgen für den Ablauf und die Auswertung der Experimente. Es stellte sich heraus, dass der erhöhte Badwiderstand mit der Oxidkapazität des Chips einen Tiefpass bildet. Dieser besitzt eine Grenzfrequenz von $\nu_E = 2400$ Hz und bewirkt bei höheren Frequenzen ein Verschwinden des zu detektierenden Transistorsignals im Rauschen. Dieses Problem konnte durch eine Anpassung der Spannungsamplitude der Badelektrode an die Amplitude des Transistorsignals gelöst werden. In der Praxis wurde dazu bei konstanter Amplitude von 50 – 100 mV ein Probedurchlauf gemacht. Anschließend wurde für jede einzelne Frequenz die detektierte Spannungsamplitude aller 32 Transistoren gemittelt und die Elektrodenspannung in der endgültigen Messung verhältnismäßig angepasst. So konnte im Durchschnitt bei jeder Frequenz dieselbe Amplitude detektiert werden. Durch dieses Verfahren war es möglich, extrazelluläre Übertragungsfunktionen bis 100 kHz aufzunehmen. Abbildung 3.41 zeigt ein Beispiel für die Anpassung der Anregungsamplituden anhand des Signals eines einzelnen Transistors.

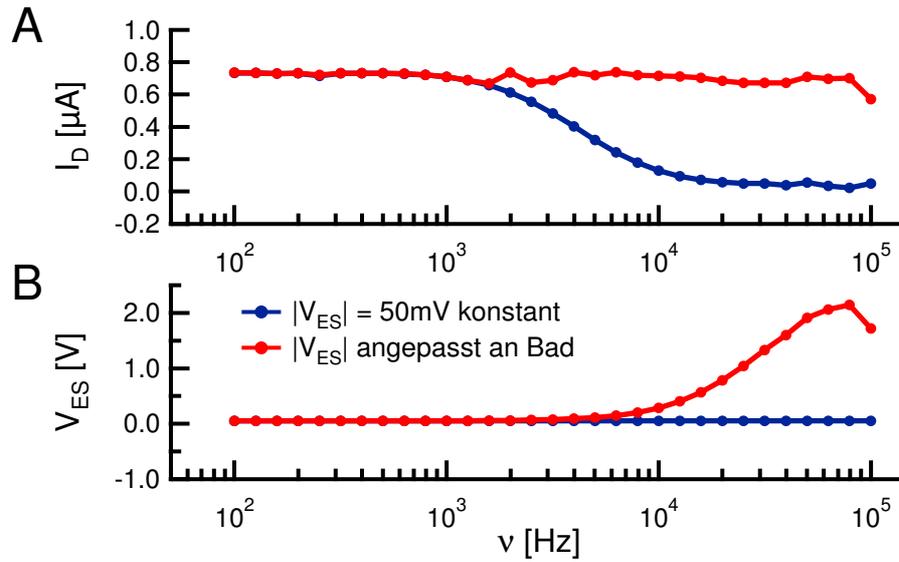


Abbildung 3.41: Demonstration der Anpassung der Badelektrodenspannung an den durch das Bad erzeugten Tiefpass. Bei gleichbleibender Anregungsspannung V_{ES} nimmt der Drainstrom I_D ab einer Grenzfrequenz von $\nu_E = 2400$ Hz rapide ab (blau). Durch Anpassung von V_{ES} an diese gemessene I_D Kurve lässt sich I_D fast konstant halten (rot).

Die extrazelluläre Übertragungsfunktion $h^E(\omega, a_i) = V_{JC}/V_{ES}$ lässt sich mit den EOS-FETs nicht direkt messen. Hierzu ist außer der Messung mit aufgesetzten Vesikeln immer eine zweite Referenzmessung ohne Vesikel nötig. Für den vom Transistor i am Ort a_i sowie der Frequenz ω abhängigen gemessenen Drainstrom $I_D^{exp}(\omega, a_i)$ gilt:

$$I_D^{exp}(\omega, a_i) = h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) h^E(\omega, a_i) V_{ES} \quad (3.97)$$

Hierbei handelt es sich bei $h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES})$ um die Geräteübertragungsfunktion, die sich aus der Steilheit des Transistors $g_m(a_i, V_{SD}, V_{ES})$ und einer Übertragungsfunktion der Messelektronik $h_{elektronik}(\omega)$ zusammensetzt.

$$h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) = g_m(a_i, V_{SD}, V_{ES}) h_{elektronik}(\omega) \quad (3.98)$$

Für die gemessenen Drainströme $I_D^{ref}(\omega, a_i)$ der Referenzmessung gilt:

$$I_D^{ref}(\omega, a_i) = h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) h_{Bad}(\omega, a_i) V_{ES} \quad (3.99)$$

Dabei handelt es sich bei $h_{Bad}(\omega, a_i)$ um die Übertragungsfunktion des Bades. Um die Geräteübertragungsfunktion $h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES})$ zu eliminieren, dividiert man die beiden gemessenen Drainströme:

$$h_{Mess}^E = \frac{I_D^{exp}(\omega, a_i)}{I_D^{ref}(\omega, a_i)} = \frac{h^E(\omega, a_i)}{h_{Bad}(\omega, a_i)} \quad (3.100)$$

Dabei gilt bis zur Grenzfrequenz der Übertragungsfunktion des Bades:

$$h_{Bad}(\omega, a_i) \approx 1 \Rightarrow h_{Mess}^E = h^E(\omega, a_i) \quad (3.101)$$

Bis knapp unter die Grenzfrequenz kann also die Übertragungsfunktion des Vesikels ermittelt werden. Bei höheren Frequenzen dagegen wird sie verfälscht. Eine genauere Demonstration des Effekts findet sich in Kapitel 3.1.4 (S. 113). Für die Bestimmung von Fitparametern aus den folgenden Messungen war er jedoch nicht hinderlich. Aus dem hochfrequenten Bereich konnte sogar auf den Badwiderstand und die Chipkapazität geschlossen werden.

Die Eliminierung der Geräteübertragungsfunktion $h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES})$ in Gleichung 3.100 ist nur möglich, falls diese konstant bleibt. Dies kann aber nur gewährleistet werden, wenn der zeitliche Abstand zwischen den Messungen klein ist. Über größere Zeiträume als circa 10 Minuten verändert sich der Badwiderstand. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die Verdunstung des Elektrolyten sowie die langsame Vermischung der Vesikellösung mit der Badlösung. Da die Adhäsion von Riesenvesikeln auf BSA bis zu einer Stunde dauern kann, ist von einer Referenzaufnahme schon vor dem eigentlichen Experiment abzuraten. Stattdessen wurde der Vesikel nach der Messung vorsichtig mit der Positionierungspipette weggesaugt und anschließend die Referenzmessung vorgenommen.

3.4.2 Vesikel mit salzhaltiger Saccharoselösung

Die wesentlichen FET-Messungen dieser Arbeit wurden mit Vesikeln unternommen, die in SB-Lösung hergestellt wurden. Diese enthält 300 mM Saccharose und 0.5 mM Natriumchlorid. Damit besitzt sie einen spezifischen Widerstand von 20 k Ω cm. Als Elektrolyt wurde PB-Lösung mit einem spezifischen Widerstand von 23 k Ω cm verwendet.

Kurz vor der Messung wurden der Vesikel und seine adhärierte Junctionmembran durch den DiI-Filter fotografiert, so dass der Vesikelradius a_V und der Radius der Junctionmembran a_J später vermessen werden konnten.

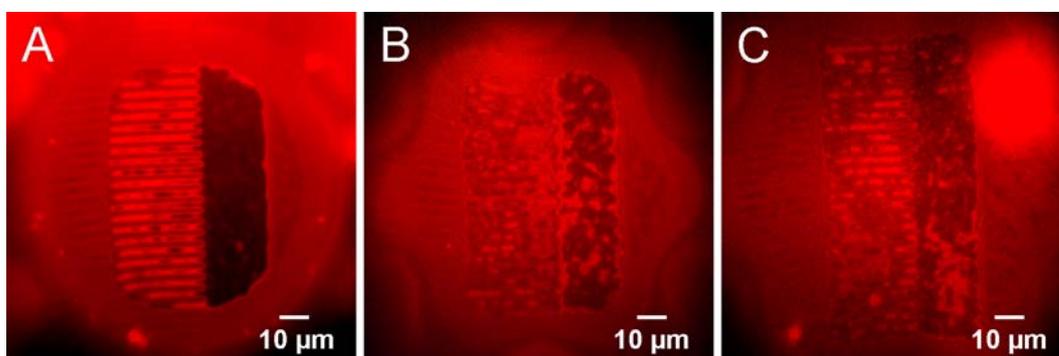


Abbildung 3.42: Anhand von kontrastverstärkten Fluoreszenzaufnahmen mittels DiI-Filtersatz können die Adhäsionsmembranen vermessen werden. Der ermittelte Radius beträgt sowohl bei Messung E1 als auch bei Messung E2 $a_J = 40 \mu\text{m}$ (A, B). Für Messung E3 ergibt sich $a_J = 50 \mu\text{m}$ (C). Die Membranen von Messung E2 und E3 fluktuieren stark.

Von den 36 vorgenommenen Messungen wurden drei Messungen ausgewählt. Dabei wurde auf eine möglichst große und gleichmäßige Adhäsionsfläche Wert gelegt. Abbildung 3.42 zeigt Photos der adhärierten Junctionmembranen der Messungen. Sie wurden unmittelbar vor den Messungen aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass die Qualität der Messungen eher von der Größe der Adhäsionsfläche abhing als vom Grad der Membranfluktuationen. Aus diesem Grund wurden die Messungen E2 und E3 gegenüber anderen

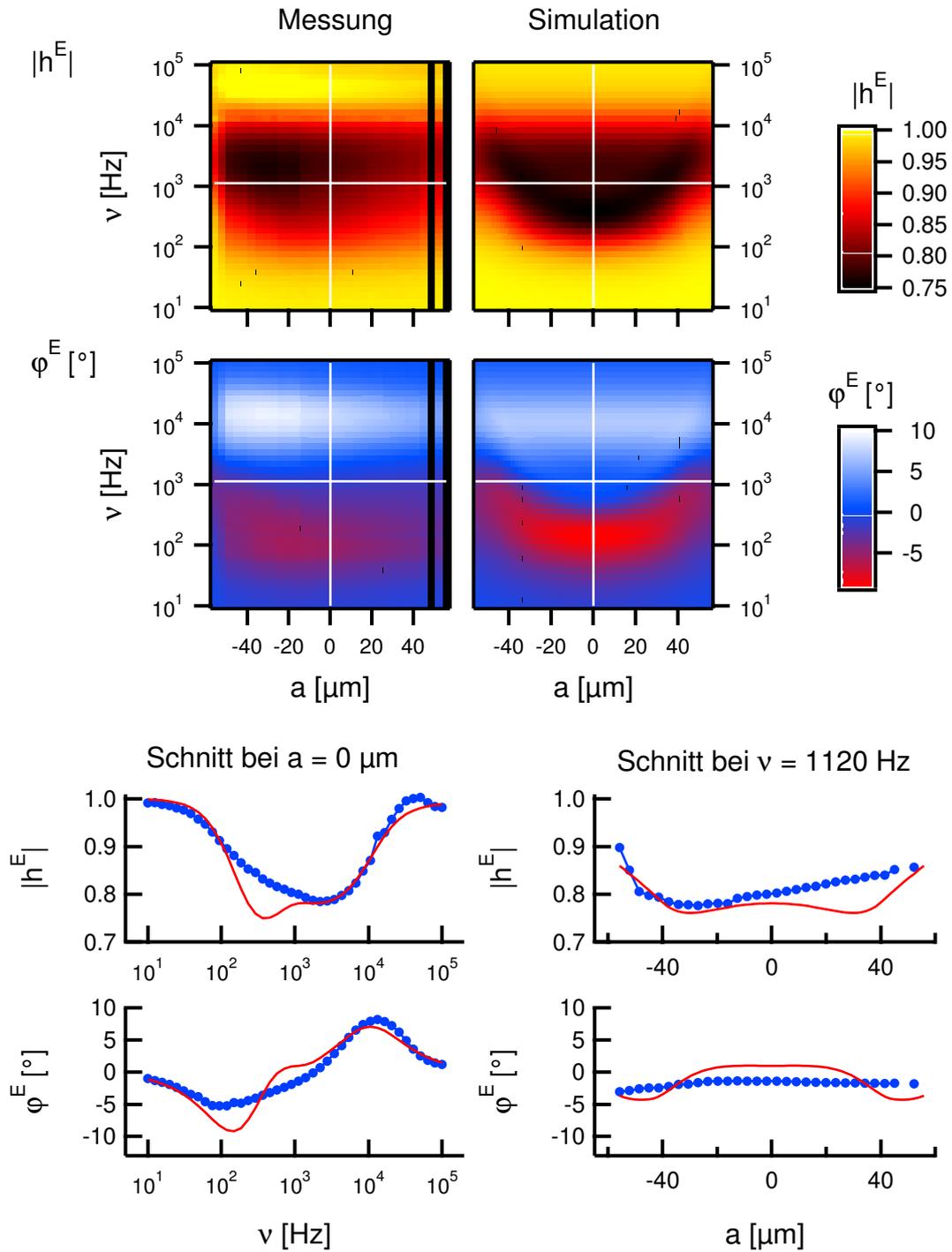


Abbildung 3.43: Messung E1: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Die in Käfig A vorgenommene Messung weist auf der rechten Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der linken Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen.

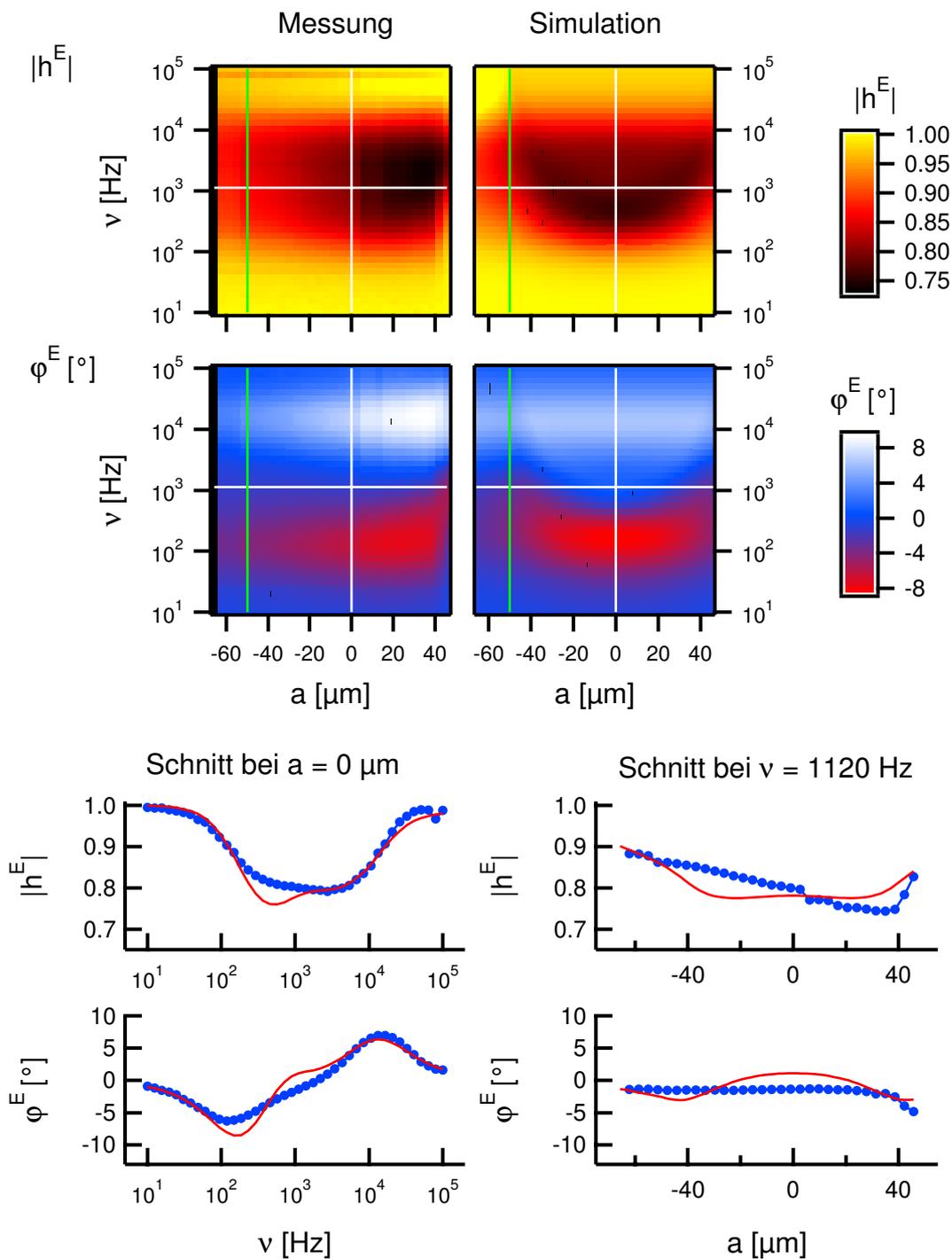


Abbildung 3.44: Messung E2: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Die in Käfig C vorgenommene Messung weist auf der linken Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der rechten Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen (grüne Linie = Grenze).

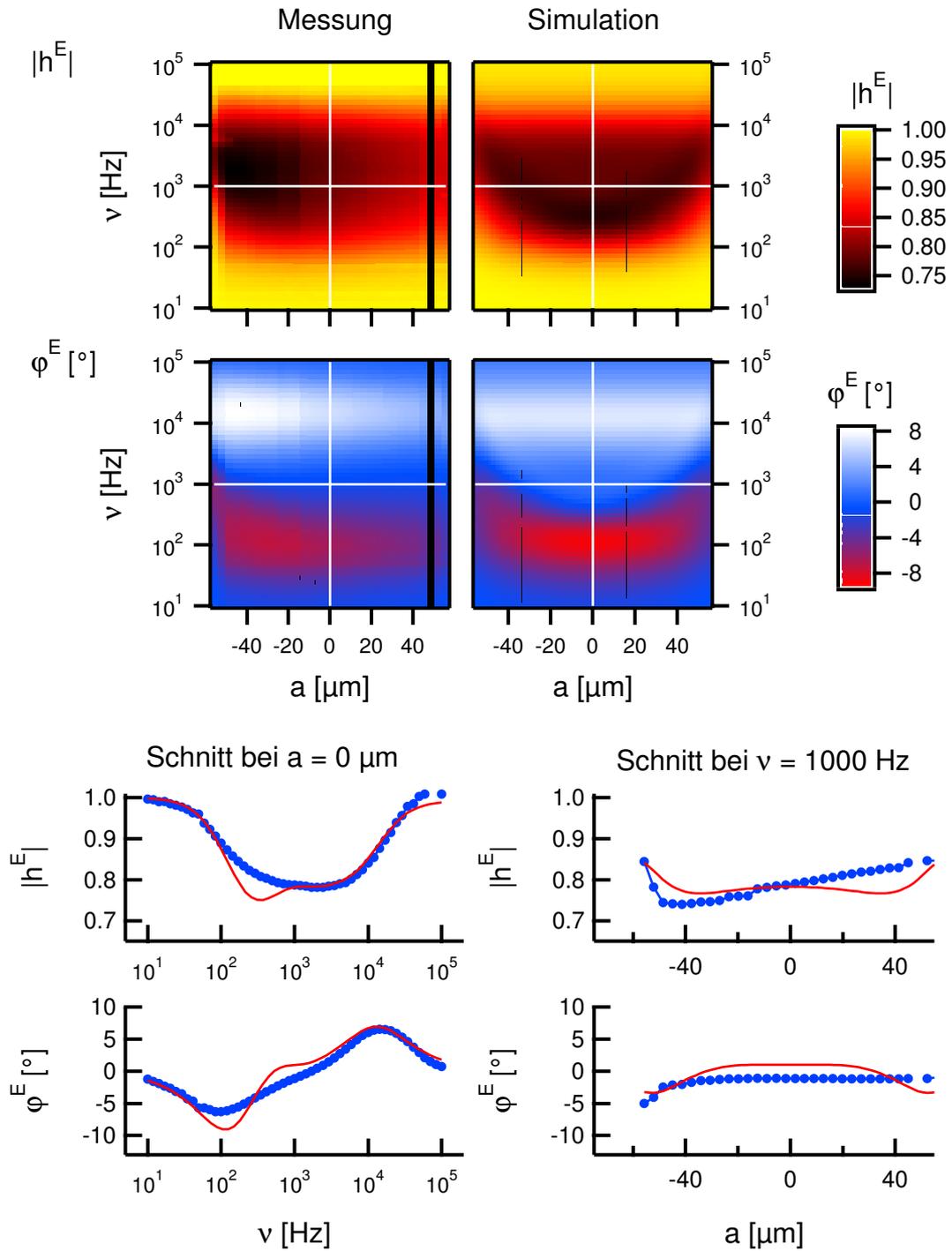


Abbildung 3.45: Messung E3: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Die in Käfig A vorgenommene Messung weist auf der rechten Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der linken Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen.

Experimenten mit glatterer, aber kleinerer Adhäsionsfläche vorgezogen. Der aufgenommene Frequenzbereich liegt dabei zwischen 10 Hz und 100 kHz. Die drei Messungen E1, E2 und E3 sind in Abbildung 3.43, 3.44 und 3.45 dargestellt. Während in den Messungen E1 und E3 ein Vesikel in Käfig A untersucht wurde, galt Messung E2 einem Vesikel in Käfig C. Die Darstellungen der Experimente sind alle gleich aufgebaut. Gegenübergestellt sind immer Messung und Simulation. In der oberen Hälfte der Abbildungen sind Betrag und Phase von h_{Mess}^E farbkodiert gegen den Ort a und die Frequenz ν aufgetragen. Defekte FETs sind schwarz hinterlegt. Bei Messungen in Käfig A bedeckt der Vesikel alle 32 Transistoren. Bei Messungen in den Käfigen B und C sitzen Transistoren teilweise unter einer SU-8 Struktur. Die Grenzen zwischen Vesikel und Säulen werden in den Graphen durch grüne Linien gekennzeichnet. Im unteren Teil der Darstellung sind jeweils Betrag und Phase zweier Schnitte durch die oberen zweidimensionalen Graphen gezeigt. Beim linken Schnitt handelt es sich um einen Frequenzgraphen in der Mitte des Vesikels ($a = 0 \mu\text{m}$), beim rechten um eine Ortskurve zu Beginn der Talsohle des Betrags.

Das Anpassen der Fitparameter an die Messungen wurde von Hand vorgenommen. Als Fitmodell wurde das numerisch berechnete extrazelluläre Modell mit Berücksichtigung der Säulen, des Badwiderstandes und des radiusabhängigen Abstandes verwendet ($h_{5,F}^E(\nu, a)$, siehe Kapitel 3.1.6, Seite 130). Variiert wurden nur der Adhäsionsabstand d_J , die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} , der Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S , der virtuelle Außenradius des Käfigs a_{Sa} , der Elektrolytwiderstand R_{Bad} und die Chipkapazität C_{Chip} . Angefittet wurden sowohl Betrag als auch Phase. Hierbei wurden d_J an den Abfall der Messung von 10 – 1000 Hz angepasst, r_S und a_{Sa} an die Absenkung der flacheren Seite des Betragsprofils bei 1 kHz (Messung E1, E3: $a = +56 \mu\text{m}$, Messung E2: $a = -56 \mu\text{m}$), c_{Ox} an das Betragsplateau zwischen 1 – 10 kHz, R_{Bad} und C_{Chip} an den Betragsanstieg und den Phasenüberschwinger zwischen 10 – 100 kHz. Da die Simulationen zylindersymmetrisch sind, konnten sie nicht an die Asymmetrie der Messungen angepasst werden. Tabelle 3.2 zeigt das Ergebnis der Fits.

Messung, Käfig	d_J [nm]	c_{Ox} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	r_S [M Ω]	a_{Sa} [μm]	R_{Bad} [k Ω]	C_{Bad} [pF]
E1, A	900	0.17	30	130	900	19
E2, C	1300	0.17	60	120	950	14
E3, A	1100	0.175	50	130	700	20

Tabelle 3.2: Gefittete Parameter aus den extrazellulären Messungen E1-E3.

Die übrigen Parameter des Modells wurden konstant gehalten. Dabei handelt es sich um die spezifischen Membrankapazitäten der freien Membran c_{FM} und der Junctionmembran c_{JM} , die entsprechenden spezifischen Leitfähigkeiten g_{FM} und g_{JM} , den Radius des Vesikels a_V , den Radius der Junctionmembran a_J , den Innenradius des Käfigs a_{Si} , den Randwinkel θ und die Leitfähigkeit des Elektrolyten in der Junction ρ_J . Die verwendeten konstanten Parameter sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Messung, Käfig	a_V [μm]	a_J [μm]	a_{Si} [μm]	C_{FM} [$\frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$]	C_{JM} [$\frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$]	g_{FM} [$\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$]	g_{JM} [$\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$]	θ [$^\circ$]	ρ_J [$k\Omega\text{cm}$]
E1, A	58	40	60	0.8	0.8	1	1	10	23
E2, C	55	40	50	0.8	0.8	1	1	10	23
E3, A	63	50	60	0.8	0.8	1	1	10	23

Tabelle 3.3: Konstant gehaltene Parameter in den Fits der extrazellulären Messungen E1-E3.

Diskussion der Fitergebnisse:

- Auffälligstes Ergebnis der Fits ist der große Adhäsionsabstand von $d_J = 900 - 1300$ nm, der sich um einen Faktor 10-14 von denen in Kapitel 2.2.5 mit FLIC ermittelten $d_{J,FLIC} = 93 \pm 14$ nm unterscheidet. Da bei einem so großen Abstand die Junctionmembran im Mikroskop nicht mehr erkennbar wäre, ist die Differenz der beiden Messungen wohl auf eine leitfähige Schicht zurückzuführen. Eventuell bildet sie sich aufgrund der Entstehung einer diffusen Doppelschicht an der Oberfläche des Siliziumoxids. Hierauf wird in Kapitel 3.6 noch näher eingegangen.
- Beim Betrachten der Messungen fällt desweiteren ins Auge, dass die Ortskurven des Betrags am Rand der Adhäsionsfläche flach auslaufen und nicht gegen eins gehen. Dieser Effekt wird durch das verwendete extrazelluläre Modell mit linear ansteigender Junctionmembran am Rande der Adhäsionsfläche $a > a_J$ gut wiedergegeben. Der von G. Zeck vermessene Randwinkel von 10° bei Riesenvesikeln auf BSA [Zec00] passt ebenfalls.
- Erstaunlich an den Messungen ist außerdem das Ausbleiben des steilen Anstiegs der Ortskurven des Betrags am Rand der Käfige (Messung E1, E3: $a = \pm 56 \mu\text{m}$, Messung E2: $a = \pm 50 \mu\text{m}$). Wie in Messung E2 zu sehen ist, reicht der flache Verlauf sogar bis in die Säulen hinein ($a < -50 \mu\text{m}$). Kontrollmessungen zeigten zudem eine Beeinflussung des Potentialverlaufes im leeren Nachbarkäfig. Hauptursache dafür ist der hochohmige Elektrolyt. Zusammen mit den extrem hohen Säulenstrukturen führt dieser zu einer Isolierung der Junction. Besonders stark wirken sich scheinbar die SU-8 Strukturen in der Mitte der FET-Reihe aus. Da sie im Gegensatz zu den Strukturen am Rand der Reihe fusioniert sind, scheinen sie stärker zu isolieren und damit zu einem flacheren Verlauf der Übertragungsfunktion zu führen (Messung E1, E3: $a > 60 \mu\text{m}$, Messung E2: $a < -50 \mu\text{m}$). Dies ist wahrscheinlich auch der Grund für die Asymmetrie der Messungen. Unklar bleibt allerdings, warum das Minimum des Betrags auf der Seite der eigentlich weniger isolierenden Struktur liegt. Die Absenkung des Potentials am Rande der Messungen E1 und E3 sowie der Potentialverlauf in der Säule in Messung E2 konnte in allen drei Fits durch eine $70 \mu\text{m}$ breite virtuelle Säule wiedergegeben werden ($a_{Sa} = a_{Si} + 70 \mu\text{m}$). Der Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S ist mit $30 - 60 \text{ M}\Omega$ durchschnittlich fünf mal kleiner als der Schichtwiderstand der Junction.
- Der Anstieg des Betrags sowie der Überschwinger der Phase oberhalb von $\nu = 10$ kHz lässt sich gut als Division der simulierten Übertragungsfunktion mit der Übertragungsfunktion eines Tiefpasses bestehend aus Elektrolytwiderstand R_{Bad} und einer Chipkapazität C_{Chip} erklären. Die ermittelte C_{Chip} entspricht sehr genau der

jeweiligen Oxidkapazität innerhalb der verschiedenen Käfige $C_{Ox} = a_{Si}^2 \pi c_{Ox}$ (E1, E3: 19 pF, E2: 13 pF). Es scheint so, als würde durch die isolierenden Säulenstrukturen die übrige Chipkapazität für den Badtiefpass nicht mehr ins Gewicht fallen ($C_{Ox2} = C_{Chip} - C_{Ox} \approx 0$ pF). Errechnet man aus den gefitteten Parametern die Grenzfrequenz $\nu_E = (2\pi R_{Bad} C_{Chip})^{-1}$ des Tiefpasses, so ergeben sich 9–12 kHz. Sie liegt also um einen Faktor 4–5 höher als die durch Anfitzen des Drainstromes bei gleichbleibender Anregungsamplitude der Badspannung gewonnene Grenzfrequenz des Bades von $\nu_E = 2.4$ kHz in Kapitel 3.4.1. Der Grund hierfür ist unbekannt.

- Um die Höhe des Betragsplateaus im Bereich 1–10 kHz anzugleichen, muss der Wert für die spezifische Kapazität des Gateoxides von dem theoretischen Wert von $0.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für ein 8 nm dickes Gateoxid auf $0.15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ reduziert werden. Der Argumentation von V. Kießling [Kie99] für Messungen an Erythrozyten folgend, ist der Grund hierfür die Tatsache, dass sich unter dem Vesikel zwischen den $1.6 \mu\text{m}$ breiten Gates $2 \mu\text{m}$ breite Bereiche mit lokalem Oxid (LOCOS) befinden. Dieses ist mit $d_{Ox} \approx 400$ nm deutlich dicker als das Gateoxid und besitzt damit eine spezifische Kapazität von $c_{Locos} = 8$ nF/cm². Gemittelt ergibt sich hier eine spezifische Kapazität von $0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Sie kommt dem gefitteten Wert deutlich näher.

Alternative Fitparameterwahl

Beim Vergleichen von Messung E1 und der zugehörigen Simulation in Abbildung 3.43 fällt die fehlende Übereinstimmung des qualitativen Verhaltens von Betrag und Phase im Frequenzbereich von 100–1000 Hz ins Auge. Durch die Wahl eines konstanten Abstands $d_J = 93$ nm und einer stark erhöhten Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} lässt sich der Frequenzgang jedoch exzellent wiedergeben. Abbildung 3.46 zeigt den alternativen Fit. In Tabelle 3.4 sind die Fitergebnisse zu sehen. Konstant gehalten wurden ansonsten dieselben Parameter wie in Tabelle 3.3.

Messung, Käfig	g_{JM} [$\frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$]	c_{Ox} [$\frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$]	r_S [$M\Omega$]	a_{Sa} [μm]	R_{Bad} [$k\Omega$]	C_{Bad} [pF]
E1, A	1000	0.165	55	130	900	19
E2, C	1000	0.17	90	120	950	14
E3, A	800	0.175	70	130	700	20

Tabelle 3.4: Alternative Fit-Parameter aus den extrazellulären Messungen E1-E3.

Diskussion der alternativen Fitergebnisse:

- Eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} auf 800–1000 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ gegenüber der von V. Kießling bestimmten Grenze von $g_{JM} < 1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ [Fro99] würde auf eine extreme Beschädigung durch die Berührung mit dem BSA-beschichteten Chip hinweisen. Allerdings ist dieses Fitergebnis trotz der sehr guten Übereinstimmung der Frequenzprofile aus zwei Gründen unwahrscheinlich: Erstens weist das Ortsprofil der Simulation im Bereich der Adhäsionsmembran $a < a_J$ keine Ortsabhängigkeit mehr auf. Zurückzuführen ist dies auf die Dominanz des Membranstromes über den Spaltstrom. Im Experiment dagegen ist eine Ortsabhängigkeit zu beob-

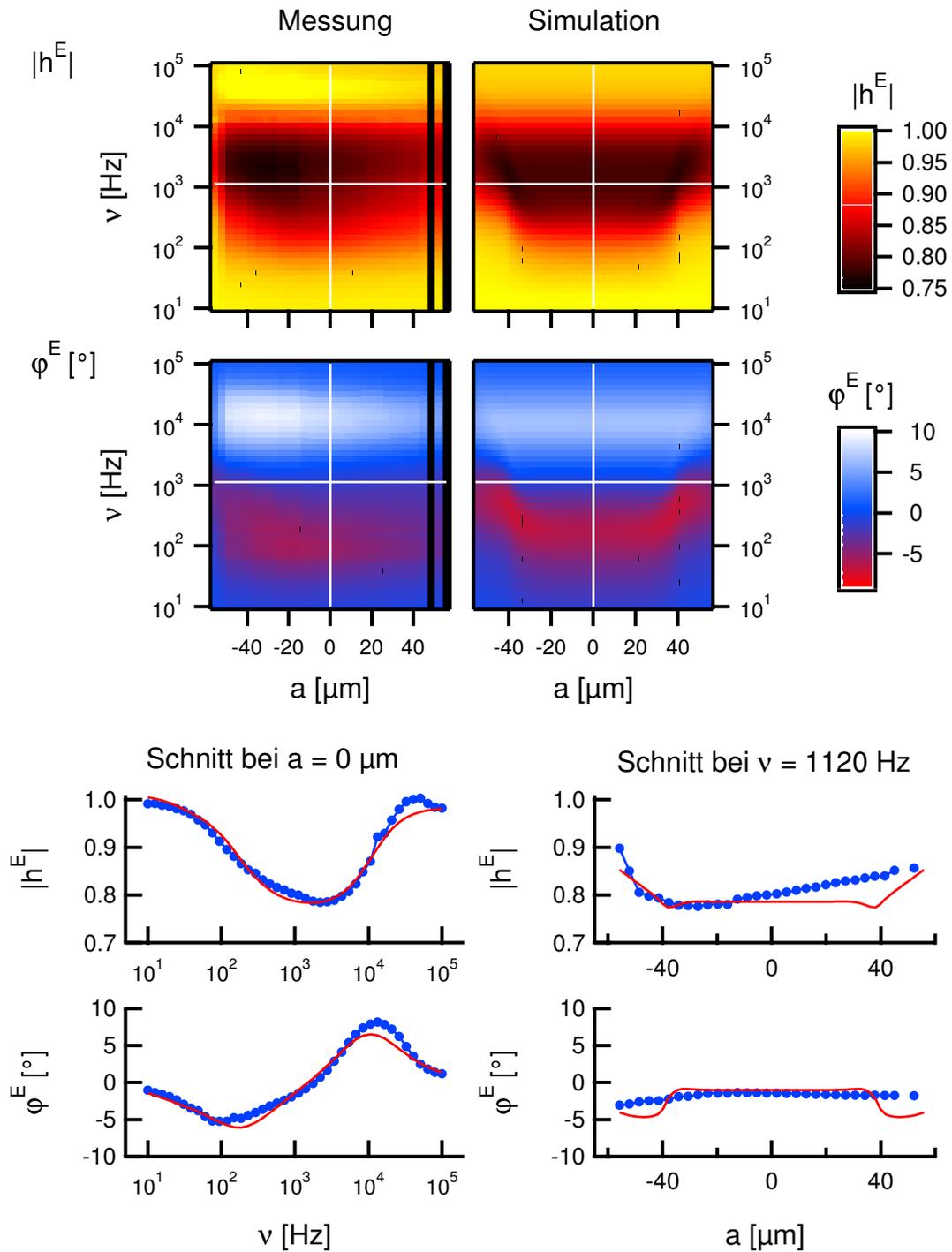


Abbildung 3.46: Alternative Interpretation von Messung E1: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Hier wurde an Stelle des Abstandes d_J die Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} angepasst.

achten. Aufgrund der Asymmetrie des Ortsprofils lässt sich das aber nicht mit letzter Sicherheit behaupten. Zweitens können die später gezeigten intrazellulären Experimente nicht mit einer Leitfähigkeit der Junctionmembran von $g_{JM} > 30 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ in Einklang gebracht werden.

- Die übrigen Fitparameter sind ähnlich den Werten aus Tabelle 3.2 und können auch auf die gleiche Art und Weise interpretiert werden.

3.4.3 Vesikel mit reiner Saccharoselösung

Zusätzlich zu den Messungen an Vesikeln mit salzhaltiger Saccharoselösung wurden Experimente mit Vesikeln unternommen, die nur eine Lösung mit 300 mM reiner Saccharose enthielten (SA-Lösung). Die Leitfähigkeit dieser Lösung beruht nur noch auf Verunreinigungen des Reinstwassers und liegt bei $260 \text{ k}\Omega\text{cm}$. Als Elektrolyt wurde wie in den vorherigen Messungen PB-Lösung mit einem spezifischen Widerstand von $23 \text{ k}\Omega\text{cm}$ verwendet.

Die Experimente wurden analog zu den Messungen in Kapitel 3.4.2 durchgeführt. Junctionradius a_J und Vesikelradius a_V wurden wieder anhand von Fluoreszenzaufnahmen bestimmt.

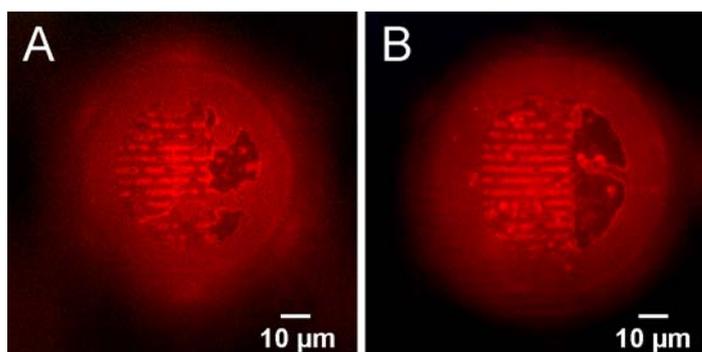


Abbildung 3.47: Junctionmembran aus den Messungen E4 und E5. Die stark kontrastverstärkten Fluoreszenzaufnahmen sind mit DiI-Filtersatz aufgenommen worden. Die Adhäsionsradien betragen für Messung E4 $a_J = 24 \mu\text{m}$ (A) und für Messung E5 $a_J = 25 \mu\text{m}$ (B). Beide Membranen fluktuieren stark.

Von den insgesamt 61 Messungen wurden drei mit einer möglichst großen Adhäsionsfläche ausgewählt. Abbildung 3.47 zeigt Photos der adhärrierten Junctionmembran der Messungen. Der aufgenommene Frequenzbereich lag dabei zwischen $0.1 - 100 \text{ kHz}$. Die beiden Messungen E4 und E5 sind in Abbildung 3.48 und 3.49 dargestellt. Während Messung E4 einen Vesikel in Käfig B zeigt, wurde Messung E5 in Käfig C vorgenommen. Die Darstellungen der Experimente sind wie in Kapitel 3.4.2 aufgebaut.

Das Anpassen der Fitparameter an die Messungen wurde von Hand vorgenommen. Als Fitmodell wurde diesmal das numerisch berechnete extrazelluläre Modell mit Berücksichtigung der Säulen und des radiusabhängigen Abstandes verwendet ($h_{4,F}^E(\omega, a)$, siehe Kapitel 3.1.6, S. 130). Das entsprechende Modell mit Badwiderstand wurde nicht verwendet, da es nicht an die Daten angepasst werden konnte. Hauptgrund dafür ist das Fehlen eines positiven Phasenüberschwingers in den Messungen, der durch die Theorie vorhergesagt wird. Da der hochfrequente Teil somit nicht mehr beschreibbar war, wurde das Modell nur an den

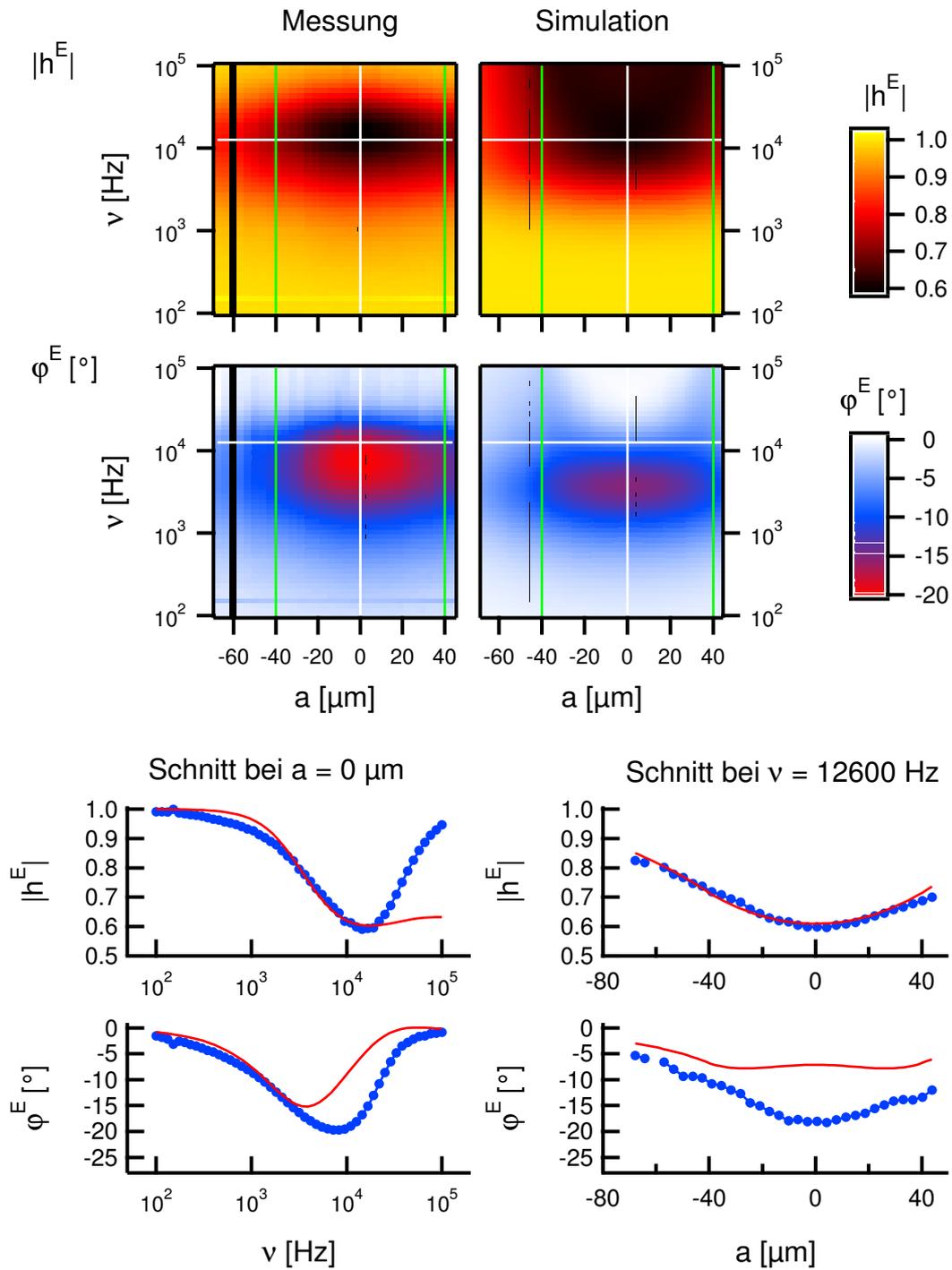


Abbildung 3.48: Messung E4: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Die in Käfig B vorgenommene Messung weist auf beiden Seiten eine starke Isolierung durch die fusionierten Säulenstrukturen (grüne Linien = Grenzen) gegenüber dem Bad auf.

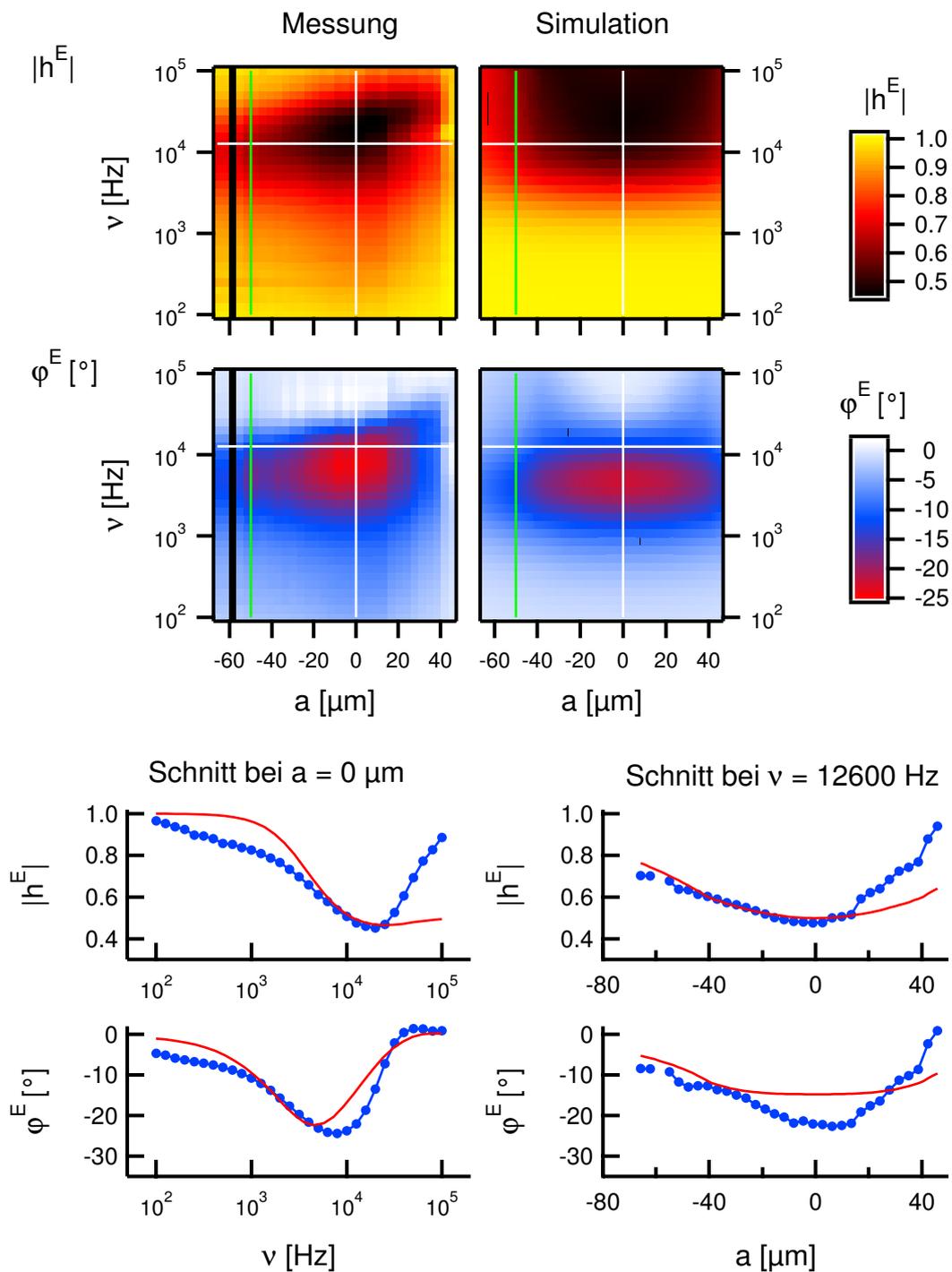


Abbildung 3.49: Messung E5: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter extrazellulärer Übertragungsfunktion $h^E(\nu, a)$. Die in Käfig C vorgenommene Messung weist auf der linken Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der rechten Seite, was auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur (grüne Linie = Grenze) zurückzuführen ist.

Frequenzbereich von 100 – 12000 Hz angeglichen. Variiert wurden dabei der Adhäsionsabstand d_J , die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} , der Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S und der virtuelle Außenradius des Käfigs a_{Sa} . Der zuletzt genannte Parameter wurde in Messung E5 an die flachere Seite der Ortskurven ($a < 0 \mu m$) angepasst. Tabelle 3.5 zeigt das Ergebnis der Fits.

Messung, Käfig	d_J [μm]	c_{Ox} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	r_S [$M\Omega$]	a_{Sa} [μm]
E4, A	50	0.33	6	120
E5, C	100	0.59	4	130

Tabelle 3.5: Gefittete Parameter aus den extrazellulären Messungen E4 und E5.

Die übrigen Parameter des Modells wurden wieder konstant gehalten. Dabei handelt es sich um die spezifische Membrankapazität der freien Membran c_{FM} und die der Junctionmembran c_{JM} , die entsprechenden spezifischen Leitfähigkeiten g_{FM} und g_{JM} , den Radius des Vesikels a_V , den Radius der Junctionmembran a_J , den Innenradius des Käfigs a_{Si} , den Randwinkel θ und die Leitfähigkeit des Elektrolyten in der Junction ρ_J . Die verwendeten konstanten Parameter sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Messung, Käfig	a_V [μm]	a_J [μm]	a_{Si} [μm]	c_{FM} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	c_{JM} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	g_{FM} [$\frac{\mu S}{cm^2}$]	g_{JM} [$\frac{\mu S}{cm^2}$]	θ [$^\circ$]	ρ_J [$k\Omega cm$]
E4, B	38	24	40	0.8	0.8	1	1	10	23
E5, C	41	25	50	0.8	0.8	1	1	10	23

Tabelle 3.6: Konstant gehaltene Parameter in den Fits der extrazellulären Messungen E4 und E5.

Diskussion der Fitergebnisse:

- Das erstaunlichste Ergebnis dieser Experimente ist die große Verschiebung der Messkurven zu höheren Frequenzen. Der nur ungenau zu bestimmende Adhäsionsabstand liegt bei $d_J = 50 - 100 \mu m$, was einem Schichtwiderstand von $r_J = 2.3 - 4.6 M\Omega$ entspricht. Dieser Abstand unterscheidet sich um einen Faktor 500-1000 von denen mit FLIC in Kapitel 2.2.5 ermittelten $d_{J,FLIC} = 93 \pm 14 nm$. Selbst im Vergleich mit den in Kapitel 3.4.2 bestimmten theoretischen Adhäsionsabständen von $d_J = 900 - 1300 nm$ ist noch ein Faktor 11-23 hinzugekommen. Da die Photos der Junctionmembran von Vesikeln mit und ohne Natriumchlorid aber nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 3.42 und Abbildung 3.47), sollten die echten Abstände aber nicht mehr als 50 nm voneinander abweichen. Da eine Beeinflussung der diffusen Doppelschichten durch den Vesikelinhalt schwer vorstellbar ist, fehlt für die Interpretation dieses Messergebnisses bisher jegliche Grundlage.
- Während sich die Ortsprofile von Messung E4 unter 10 kHz gut durch die Theorie beschreiben lassen, ist dies in Messung E5 aufgrund der unterschiedlichen Isolierung der Säulenstrukturen an den Rändern der Transistorreihe nur für negative a möglich. Außerdem ist der Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S mit 4 – 6 $M\Omega$ um einen

Faktor zehn kleiner als bei salzhaltigen Vesikeln. Allerdings wurde auch der virtuelle Außenradius der Säulenstruktur in beiden Messungen auf $a_{Sa} = a_{Si} + 80 \mu\text{m}$ vergrößert. Trotzdem sollte die Verringerung von r_S kleiner ausfallen.

- Die ermittelte spezifische Oxidkapazität von $c_{Ox} = 0.3 - 0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ kommt gut an den theoretischen Wert von $0.42 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für ein 8 nm dickes Gateoxid heran. Das Ergebnis wäre aber inkonsistent mit den $0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für alternierende Gateoxid- und LOCOS-Bereiche aus Kapitel 3.4.2. Eine Alternative zur Variation der Oxidkapazität ist die Wahl einer anderen spezifischen Membrankapazität $c_M = c_{JM} = c_{FM}$. Bei konstanten $c_{Ox} = 0.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ergibt sich durch einen alternativen Fit von Messung E4 $c_M = 0.45 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Diese Verkleinerung lässt sich gut durch die Reihenschaltung der Kapazitäten der Membran und einer breiten diffusiven Doppelschicht im Inneren des Vesikels erklären. Unter der Annahme, dass die durch Verunreinigungen verursachte Leitfähigkeit im Inneren der Vesikel nur auf Natriumchlorid beruht, schließt man man aus den Leitfähigkeiten der SA- und der SB-Lösung auf eine Konzentration von 0.04 mM Natriumchlorid in der SA-Lösung. Hieraus ergibt sich mit der Gouy-Chapman Theorie [Hie97] für die diffuse Doppelschicht eine Dicke von $d_{DD} = 49 \text{ nm}$ und eine spezifische Kapazität von $c_{DD} = 1.46 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Mit einer in Serie geschalteten Membrankapazität von $c_M = 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erhält man eine Gesamtkapazität von $c_{M,ges} = 0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

3.5 Messung intrazellulärer Übertragungsfunktionen

3.5.1 Durchführung

Die intrazellulären Messungen dieser Arbeit wurden im Wechsel mit den extrazellulären vorgenommen. Meist wurden sogar an einem Vesikel beide Messungen durchgeführt. Aus diesem Grund ist nahezu die gesamte Versuchsdurchführung bis auf das eigentliche Experiment identisch.

Nach der Positionierung des selektierten Vesikels musste ebenfalls mindestens eine Stunde gewartet werden, bevor sich der Elektrolyt gleichverteilt hatte und der Vesikel genügend adhäriert war. Nach dem automatischen Einstellen der Drain-Offsets wurde zuerst eine extrazelluläre Messung zum Test des Systems aufgenommen. Verließ alles zufriedenstellend, konnte das Bad mittels des Handschalters auf Masse gelegt und mit den intrazellulären Messungen begonnen werden.

Der den intrazellulären FET-Messungen vorhergehende Anstechvorgang wurde, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, vorgenommen. In allen Experimenten wurden Poly-L-Lysin-beschichtete Pipetten verwendet. Zur Kontrolle des Membran-Pipetten-Kontakts wurden im current clamp Modus Strompulse verwendet. Konnte ein dichter Kontakt festgestellt werden, so wurde die vollautomatische Lock-In-Messung gestartet. Hierbei fand als erstes ein Umschalten des Pipettenverstärkers auf voltage clamp statt. Dann wurden nacheinander Sinussignale (Sin 1) mit 26 bis 41 unterschiedlichen Frequenzen über die Pipette an den Vesikel angelegt. Gleichzeitig detektierte der FET-Lock-In-Verstärker die Drainströme I_D der einzelnen Transistoren unter dem Vesikel. Strom $I_P(\omega)$ und Spannung $V_P(\omega)$ der Pipette wurden zusätzlich über zwei eigene Lock-In-Verstärker (LI 1 und LI 2) aufgenommen. Von allen Signalen wurde Real- und Imaginärteil bestimmt. Nach der Messung schaltete der Pipettenverstärker wieder zurück auf current clamp. Anhand der weiter kontinuierlich applizierten Strompulse konnte bestimmt werden, ob der Membran-Pipetten-Kontakt die Messung überdauert hatte. Näheres zum Gesamtverlauf der Experimente ist in Kapitel 2.4.6 zu finden. Je nach Stabilität des Kontakts konnten bis zu 16 intrazelluläre Lock-In-Messungen gemacht werden.

Im Gegensatz zu den extrazellulären Messungen müssen hier sehr kleine FET-Signale aufgenommen werden. Deshalb besteht ein intrazelluläres Experiment nicht mehr nur aus zwei, sondern aus drei einzelnen Lock-In-Messungen. Zusätzlich zu der eigentlichen Messung $I_D^{exp}(\omega, a_i)$ und der schon bekannten Referenzmessung $I_D^{ref}(\omega, a_i)$ muss noch eine weitere Messung $I_D^{off}(\omega, a_i)$ aufgenommen werden, bei der sich die modulierte Pipette außerhalb des Vesikels befindet. Sie ist notwendig, da das Messsignal mit einer durch den Verstärkerabgleich bedingten Signalverschiebung $I_D^{setup}(\omega, a_i)$ behaftet ist. Diese macht sich bei kleinen Signalen bemerkbar. Bei großen Signalen kann sie dagegen vernachlässigt werden. Die Offsetaufnahme sowie die Referenzmessung wurden erst gemacht, nachdem der angestochene Vesikel mit einer Saugpipette weggesaugt worden war. Die Anstechpipette wurde dabei nicht bewegt. Die drei aufgenommenen Messungen von Transistor i am Ort a_i sind:

$$\begin{aligned}
 I_D^{exp}(\omega, a_i) &= h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) h^I(\omega, a_i) V_{PE}(\omega) + I_D^{setup}(\omega, a_i) \\
 I_D^{ref}(\omega, a_i) &= h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) h_{Bad}(\omega, a_i) V_{ES}^{ref}(\omega) \\
 I_D^{off}(\omega, a_i) &= I_D^{setup}(\omega, a_i)
 \end{aligned} \tag{3.102}$$

Die Geräteübertragungsfunktion $h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES})$ ist unterhalb der maximalen verwendeten Frequenz von 10 kHz frequenzunabhängig:

$$h_{setup}(\omega, a_i, V_{SD}, V_{ES}) \approx h_{setup}(a_i, V_{SD}, V_{ES}) \quad (3.103)$$

Von der Referenzmessung wird deswegen nur die Aufnahme bei einer Frequenz ω_0 benötigt. Dafür wird die niedrigste verwendete Frequenz ausgewählt, da hier die Übertragungsfunktion des Bades h_{Bad} gegen eins geht. Um aus den drei Messungen die gesuchte Übertragungsfunktion $h^I(\omega, a_i)$ zu erhalten, wird zuerst die Offsetmessung $I_D^{off}(\omega, a_i)$ von der eigentlichen Messung $I_D^{exp}(\omega, a_i)$ abgezogen. Anschließend wird das Ergebnis durch die Referenzmessung $I_D^{ref}(\omega, a_i)$ dividiert, um die Geräteübertragungsfunktion des Setups zu eliminieren. Dabei müssen die Signale zusätzlich mit den Anregungsspannungen gewichtet werden:

$$h^I(\omega, a_i) = \frac{V_{ES}^{ref}(\omega_0) \left(I_D^{exp}(\omega, a_i) - I_D^{off}(\omega, a_i) \right)}{V_{PE}(\omega) I_D^{ref}(\omega_0, a_i)} \quad (3.104)$$

Bei höheren Frequenzen wird die an der Pipette anliegende Spannung $V_{PE}(\omega)$ durch den schon in Kapitel 3.1.3 erwähnten Pipettenvierpol gefiltert. Somit sinkt die über der Membran anliegende Spannung V_M rapide ab. Deswegen wurde analog der extrazellulären Messung versucht, diesem Tiefpass entgegenzuwirken. Dazu wurde die Spannung an den Pipettenvierpol $V_{PE}(\omega)$ so angepasst, dass die Membranspannung $V_{ME}(\omega)$ ausreichend hoch war. Für den Vierpol wurden aus Geschwindigkeitsgründen Standardparameter verwendet ($R_A = 50 \text{ M}\Omega$, $C_M = 0.045 \text{ nF}$, $R_M^* = 100 \text{ M}\Omega$). Diese wurden so gewählt, dass das

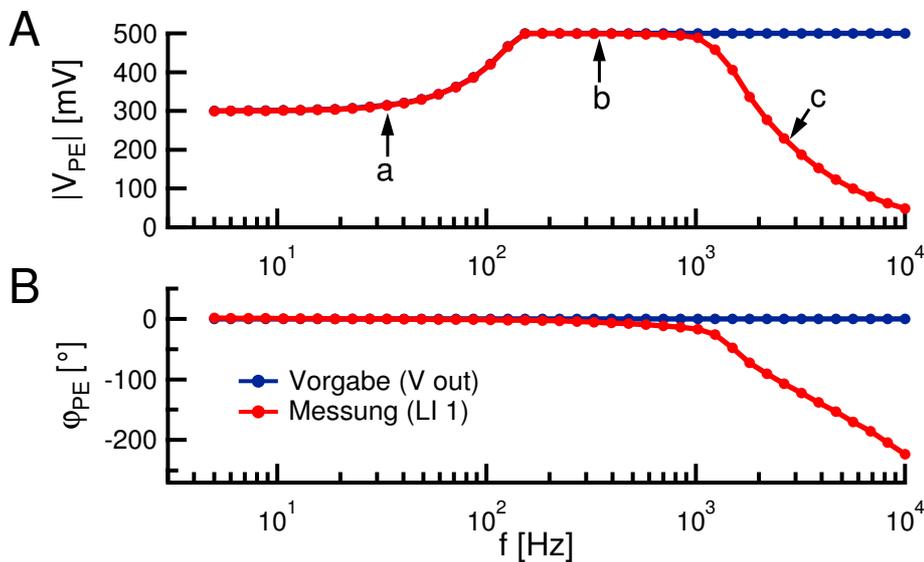


Abbildung 3.50: Vergleich von Betrag (A) und Phase (B) der an der Pipette gemessenen Pipettenspannung $V_{PE}(\omega)$ (rot) und der vom Computer vorgegebenen theoretischen Spannung (blau). Zu erkennen sind drei Bereiche: Amplitudenanpassung an Standardparameter mit dem Ziel: $|V_{ME}(\omega)| = 200 \text{ mV}$ (a), Erreichen der Maximalspannung des Pinnenverstärkers (b) und Abfallen der Spannung, da der Verstärker den Strom nicht mehr liefern kann. (c).

errechnete Signal für alle anvisierten Vesikel ($a_V > 20 \mu\text{m}$) die als Maximalspannung vorgegebenen $V_{ME,max} = 200 \text{ mV}$ nicht überschreitet. Aus der Vierpolschaltung ergibt sich:

$$|V_{PE}(\omega)| = \frac{|V_{ME,max}|}{R_M^*} \sqrt{(R_M^* + R_A)^2 + (\omega R_A C_M)^2} \quad (3.105)$$

Im Experiment konnten allerdings maximal $|V_{PE}| = 500 \text{ mV}$ verwendet werden, da der Pipettenverstärker SEC 10L nicht mehr erlaubte. Abbildung 3.50 zeigt den in allen Experimenten ähnlichen Verlauf von Betrag und Phase der Pipettenspannung $V_P(\omega)$, wie er vom ersten Lock-In-Verstärker (LI 1) aufgezeichnet wurde. Zum Vergleich wurde der Betrag und die Phase der Spannungsvorgabe (V Out) des Computers mit eingezeichnet. Auffallend ist die extreme Abweichung der Pipettenspannung bei Frequenzen über 1000 Hz. Hier schaffte es der Verstärker nicht mehr, den notwendigen Strom zum Halten der Spannung zu injizieren.

3.5.2 Experimente

Bei den intrazellulären Messungen wurden in SB-Lösung hergestellte Riesenvesikel verwendet. Die Lösung besitzt einen spezifischen Widerstand von $20 \text{ k}\Omega\text{cm}$. Alle vorgestellten Messungen wurden wie die vorherigen Experimente in PB-Lösung mit einem pH von 7.4 und einem spezifischen Widerstand von $23 \text{ k}\Omega\text{cm}$ durchgeführt.

Insgesamt konnten mit 25 salzhaltigen Vesikeln erfolgreiche intrazelluläre FET-Lock-In-Messungen unternommen werden. Davon wurden drei Messungen aufgrund ihrer hohen Amplitude der FET-Signale im Bereich zwischen 10 – 1000 Hz ausgewählt.

Die Vesikel lösen sich beim Anstechen größtenteils von der Chipoberfläche. Erst nach einigen Minuten kam es wieder zu einer großflächigeren Adhäsion. Deshalb wurden die ausgewählten intrazellulären Lock-In-Messungen zu einem späteren Zeitpunkt gemacht, obwohl dann des öfteren kein guter Membran-Pipetten-Kontakt mehr vorhanden war. Beim Betrachten der in Abbildung 3.51 gezeigten Aufnahmen der Junctionmembran der drei ausgewählten Experimente fällt auf, dass die Membran nur im ersten Fall (A) fluktuiert, wie das bei den extrazellulären Experimenten der Fall war. Im Normalfall trat

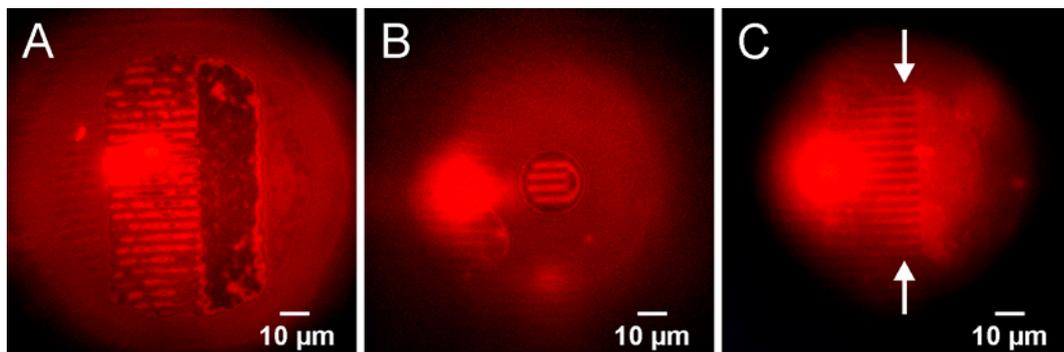


Abbildung 3.51: Anhand von kontrastverstärkten Fluoreszenzaufnahmen mittels DiI-Filtersatz können die Adhäsionsmembranen vermessen werden. Die ermittelten Radien a_j betragen für die Messung I1, I2 und I3: $43 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ und $28 \mu\text{m}$ (A, B, C). Während die Membran in Messung I1 fluktuiert, ist sie in Messung I2 und I3 angespannt.

dagegen eine glatte Adhäsionsfläche wie im zweiten Fall (B) auf. Dies ist auf die angespanntere Membran der angestochenen Vesikel zurückzuführen. Sie ist auch der Grund dafür, dass die nach dem Anstechen erreichten Adhäsionsflächen deutlich kleiner waren als davor. Die Undeutlichkeit des dritten Photos (C) ist auf eine große Anzahl fluoreszierender Einschlüsse im Vesikel zurückzuführen.

Um intrazelluläre Messungen interpretieren zu können, müssen der Pipettenwiderstand R_A , die Vesikelkapazität C_M und der effektive Membranwiderstand R_M^* während der Lock-In-Messung bekannt sein. Bei Riesenvesikeln stellt dies oft ein großes Problem dar, da sich die Werte laufend ändern können. Es existieren zwei Verfahren, die Parameter zu bestimmen. Einerseits können sie vor und nach den Lock-In-Messungen durch Anfitten der Spannungsantworten auf die applizierten Strompulse erhalten werden. Andererseits ergeben sie sich durch Anpassen der Theoriekurven an Betrag und Phase der Impedanz $Z(\omega)$. Diese lässt sich durch Division der Pipettenspannung $V_P(\omega)$ und des Pipettenstromes $I_P(\omega)$ kalkulieren, die parallel zu den FET-Messungen von den Lock-In-Verstärkern (LI 1, LI 2) aufgenommen wurden. Für die Impedanz ergibt sich anhand von Abbildung 3.23 (S. 122):

$$Z(\omega) = \frac{V_P(\omega)}{I_P(\omega)} = R_{Bad} + \left[\frac{1}{R_A + 1/(R_M^{*-1} + i\omega C_M)} + i\omega C_S \right]^{-1} \quad (3.106)$$

wobei freie Membran und Junction durch den effektiven Membranwiderstand R_M^* und die Membrankapazität C_M beschrieben werden. Abbildung 3.52 zeigt für jede der ausgewählten Messungen den Verlauf von Betrag und Phase der Impedanz in Abhängigkeit von der Frequenz. Diese Darstellungsart wird auch als Bode-Plot bezeichnet. Zusätzlich sind in den Betragsgraphen kleine Nyquist-Plots eingefügt. Dabei handelt es sich um die Auftragung vom Imaginär- gegenüber dem Realteil der Impedanz $Z(\omega)$. Jeder Graph enthält die entsprechenden Fits, deren Ergebnisse in Tabelle 3.7 festgehalten sind. Wie sich herausstellte, war der Frequenzbereich der Messungen nicht ausreichend, um eine Aussage über den Badwiderstand machen zu können. Sein Einfluss war vernachlässigbar.

Beim Betrachten der Fitergebnisse fällt der große Ausreißer des effektiven Membranwiderstandes R_M^* im letzten Fit der zweiten Messung (I2: Puls, nachher) besonders ins Auge. Wie der Nyquist-Plot zeigt, veränderte sich bei der vorletzten Messfrequenz (rechts) der Membran-Pipetten-Kontakt sprunghaft.

Die Genauigkeit der ermittelten Parameter ist in den Bode-Plots und in den Pulsmessungen unterschiedlich hoch. Deshalb werden die Ergebnisse beider Methoden bei der Interpretation der folgenden FET-Messungen miteinander vermischt. Zur Bestimmung von R_M^* und C_M wurde der Durchschnitt der Pulsmessungen vor und nach der FET-Messung gebildet. Bei Messung I2 wurde für R_M^* nur der Wert vor der FET-Messung verwendet. Die Werte für R_A und C_S wurden wegen der Gleichzeitigkeit mit den FET-Messungen aus den Bode-Plots ermittelt. Hinzu kommt, dass die Parameter R_A und C_S sowohl in den Bode-Plots als auch in den FET-Messungen die Impedanz beziehungsweise die Pipettenübertragungsfunktion dominieren. Alle verwendeten Werte sind in Tabelle 3.7 grau hinterlegt.

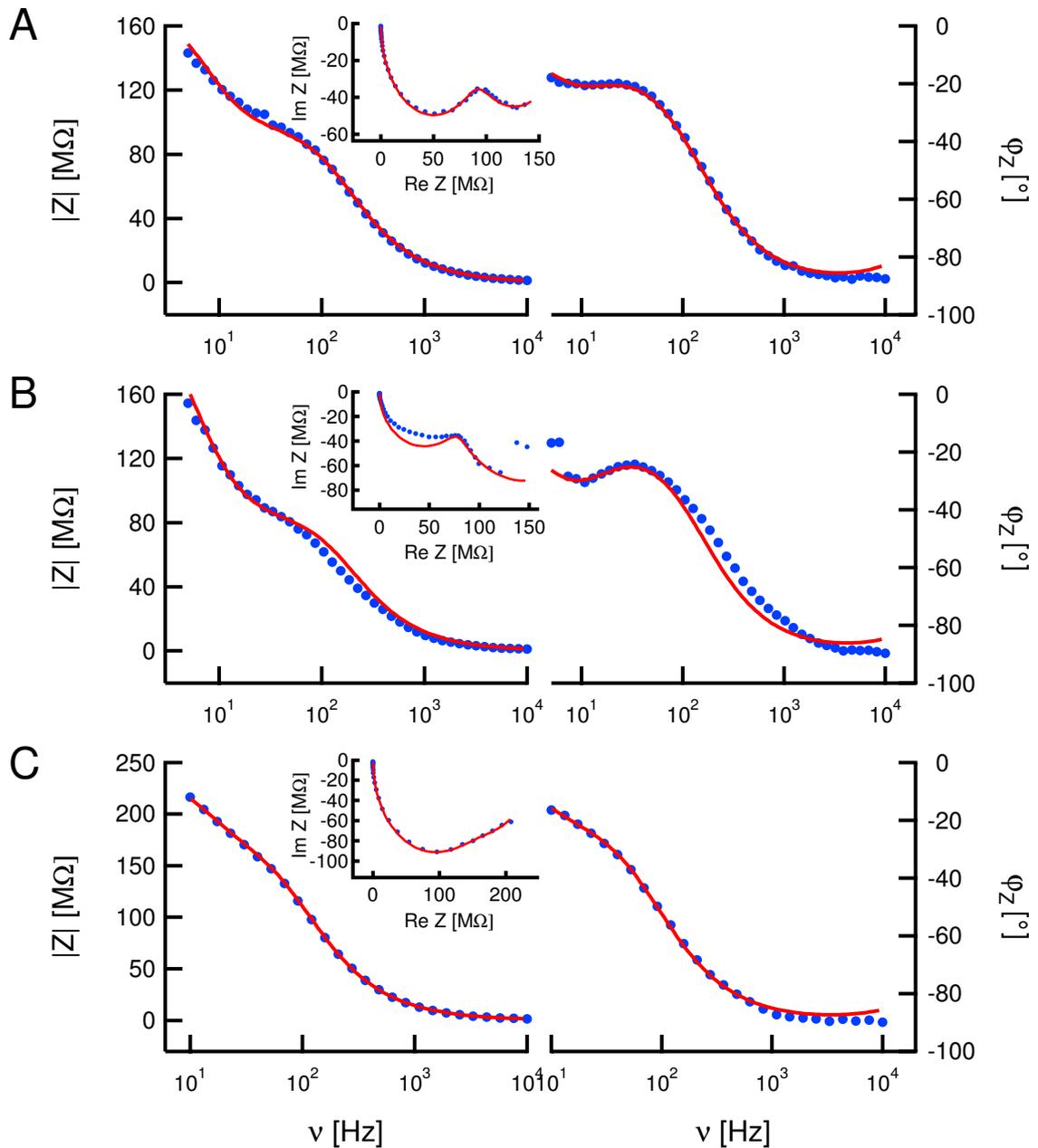


Abbildung 3.52: Bode-Plots der drei intrazellulären Messungen I1, I2 und I3 (A-C) mit salzhaltiger Saccharose Füllung (blau). Zusätzlich enthalten sind kleine Nyquist-Plots. Alle Graphen enthalten die zugehörigen Fits (rot).

Messung	Fit	R_M^* [$M\Omega$]	C_M [nF]	R_A [$M\Omega$]	C_S [pF]
I1	Puls, vorher	123	0.41	154	10
	Bode	73	0.32	99	12
	Puls, nachher	76	0.41	119	10
I2	Puls, vorher	194	0.40	137	10
	Bode	130	0.24	88	13
	Puls, nachher	325	0.37	122	10
I3	Puls, vorher	52	0.21	170	10
	Bode	60	0.19	180	11
	Puls, nachher	70	0.20	199	10

Tabelle 3.7: Fit-Parameter aus den Bode-Plots sowie den Spannungsantworten auf Strompulse der intrazellulären Messungen I1, I2 und I3. Die grau hinterlegten Werte wurden später beim Anfitzen der intrazellulären Übertragungsfunktion verwendet.

Die Abbildungen 3.53, 3.54 und 3.55 zeigen die Transistor-Messungen der ausgewählten Experimente. Der aufgenommene Frequenzbereich liegt bei Messung I1 und I2 zwischen 5 und 10000 Hz, in Messung I3 zwischen 10 und 10000 Hz. Während in Experiment I1 ein Vesikel in Käfig A angestochen wurde, zeigen die Experimente I2 und I3 Messungen an Vesikeln in Käfig C. Die Darstellungen der Übertragungsfunktionen h_{Mess}^I der Experimente sind ähnlich aufgebaut wie die der extrazellulären Messungen in Kapitel 3.4.2.

Die Fitparameter wurden auch hier wieder von Hand an die Messungen angepasst. Als Fitmodell diente das numerisch berechnete intrazelluläre Modell mit Berücksichtigung der Säulen, des Badwiderstandes und des radiusabhängigen Abstandes ($h_{Fit}^I(\omega, a)$, siehe Kapitel 3.1.5, S. 121). Variiert wurden der Adhäsionsabstand d_J , die spezifische Leitfähigkeit der Junctionmembran g_{JM} , der Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S , der Außenradius des Käfigs a_{Sa} sowie der Elektrolytwiderstand R_{Bad} . Dabei wurde d_J an den Anstieg des Betrags bis 100 Hz angepasst, g_{JM} an den Phasenabfall bis 100 Hz, r_S und a_{Sa} an die flachere Seite des „Betrags-Buckels“ bei 40 – 60 Hz (Messung I1: $a = +56 \mu m$, Messung I2, I3: $a = -50 \mu m$) und R_{Bad} an den Betragsanstieg ab 1 kHz. Da die Simulationen zylindersymmetrisch sind, konnten sie nicht an die Asymmetrie der Messungen angepasst werden. Tabelle 3.8 zeigt das Ergebnis der Fits.

Messung, Käfig	d_J [nm]	g_{JM} [$\frac{\mu S}{cm^2}$]	r_S [$M\Omega$]	a_{Sa} [μm]	R_{Bad} [$k\Omega$]
I1, A	3000	10	70	130	160
I2, C	3500	8	50	120	260
I3, C	3500	20	65	120	170

Tabelle 3.8: Gefittete Parameter aus den intrazellulären Messungen I1-I3.

Die übrigen Parameter des Modells wurden konstant gehalten. Dabei handelte es sich um die spezifische Membrankapazität der Junctionmembran c_{JM} , die entsprechende spezifische Leitfähigkeit der freien Membran g_{FM} , die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} , den Radius der Junctionmembran a_J , den Innenradius des Käfigs a_{Si} , den Randwinkel θ und die Leitfähigkeit des Elektrolyten in der Junction ρ_J . Die konstant gehaltenen Parameter sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Verwendet wurden außerdem noch die aus Tabelle 3.7 er-

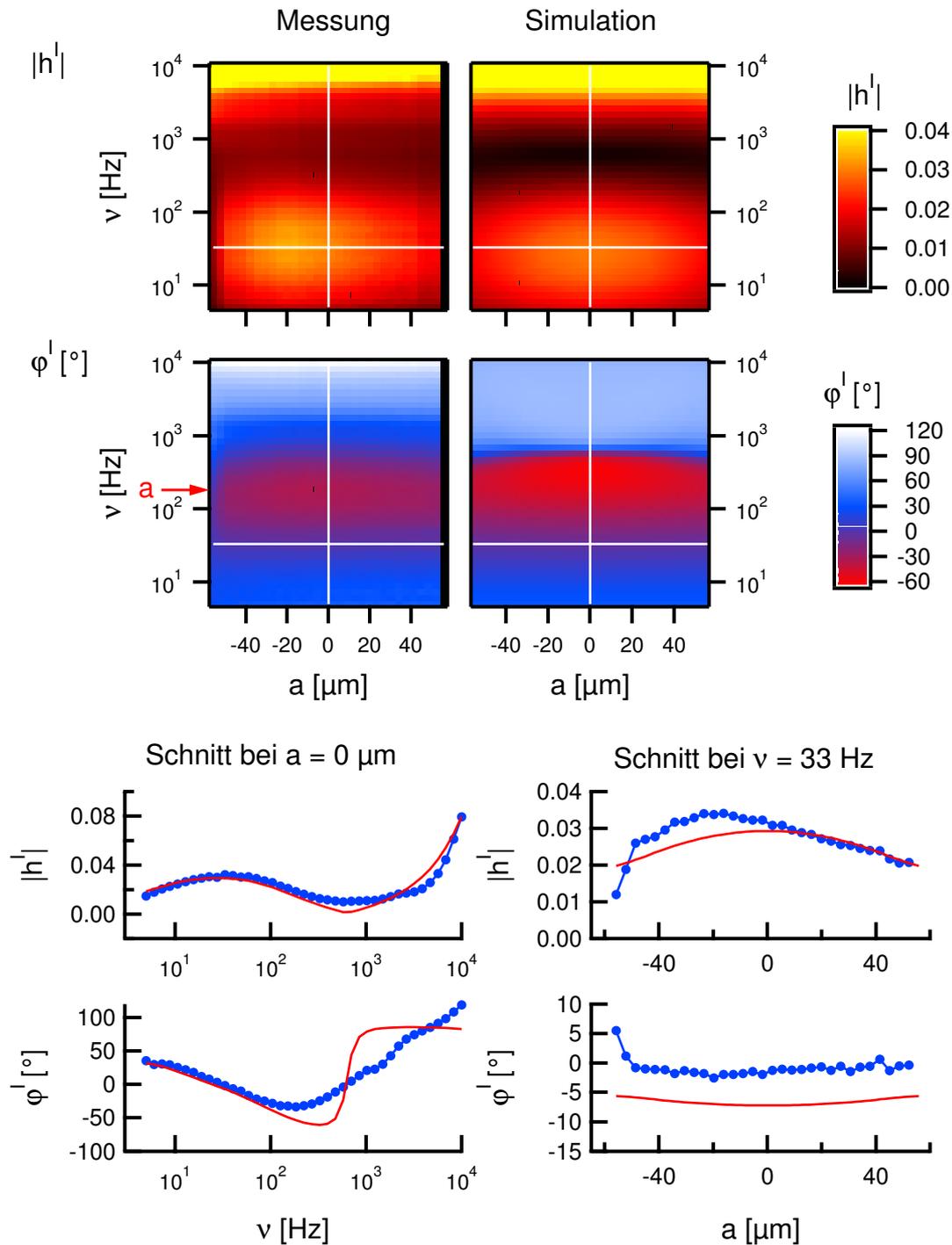


Abbildung 3.53: Messung II: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter intrazellulärer Übertragungsfunktion $h^I(\nu, a)$. Die in Käfig A vorgenommene Messung weist auf der rechten Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der linken Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen. Der Einfluss des Badwiderstandes ist zuerst in der Phase zu erkennen (**a**).

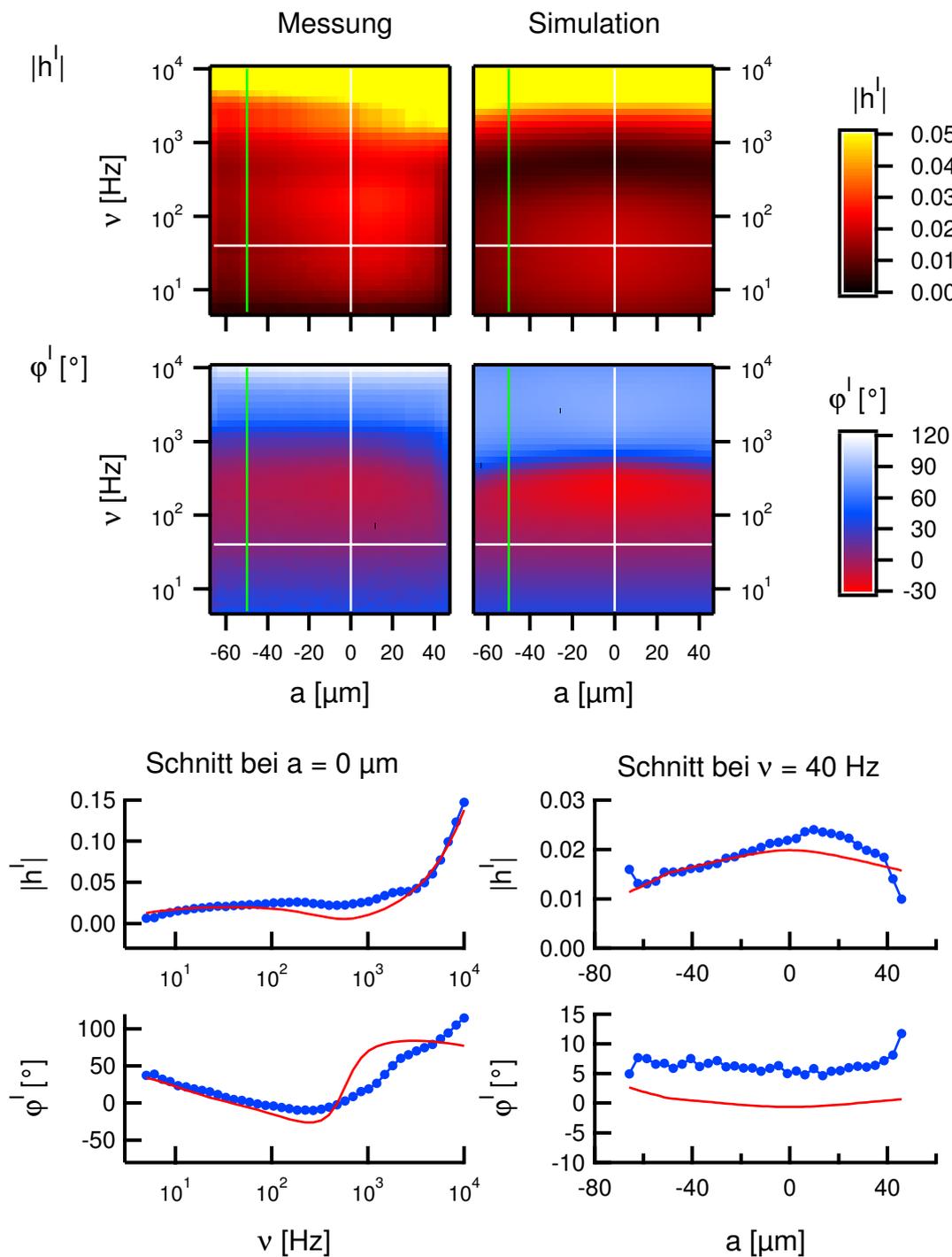


Abbildung 3.54: Messung II: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter intrazellulärer Übertragungsfunktion $h^I(\nu, a)$. Die in Käfig C vorgenommene Messung weist auf der linken Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der rechten Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen (grüne Linie = Grenze).

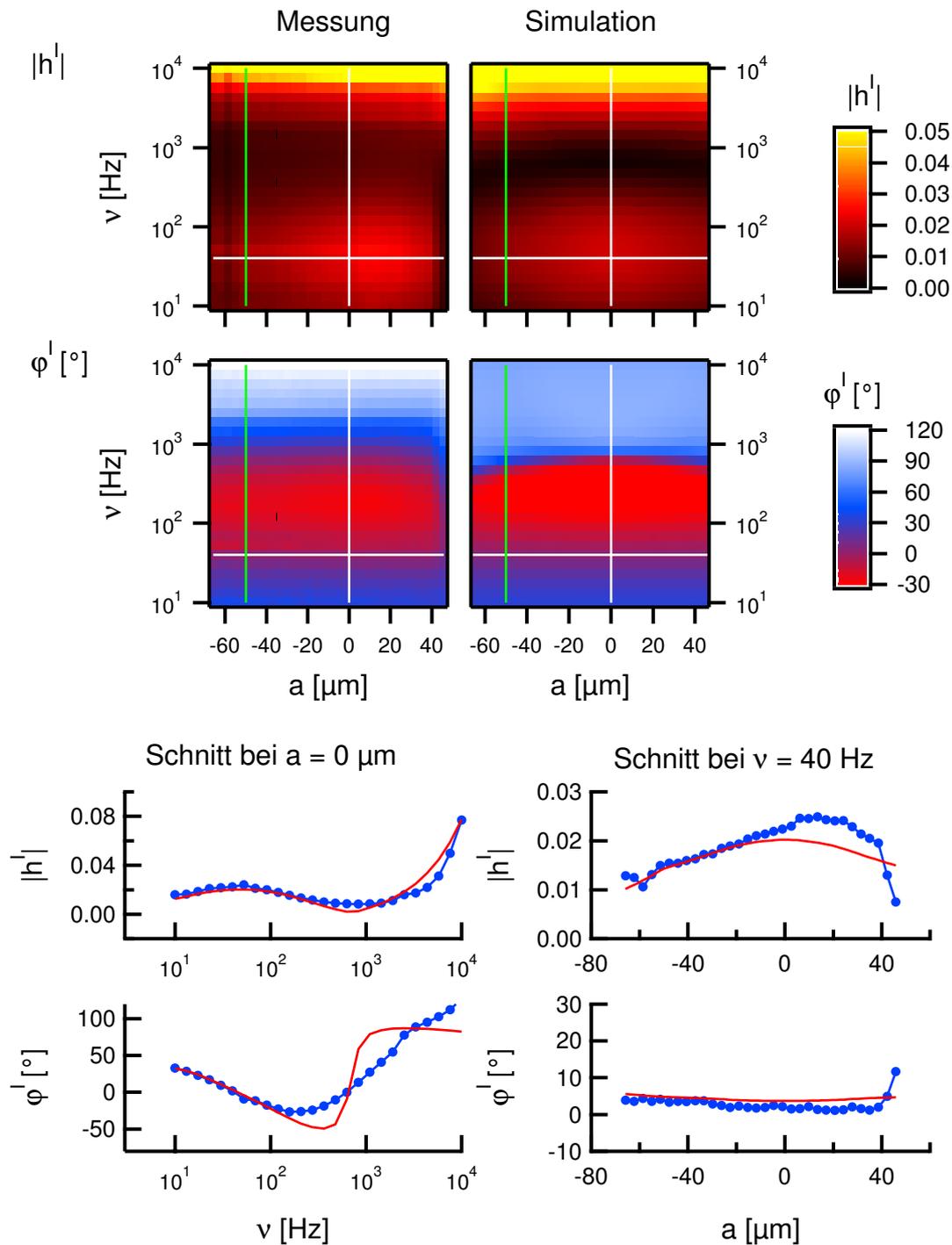


Abbildung 3.55: Messung II: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter intrazellulärer Übertragungsfunktion $h^I(\nu, a)$. Die in Käfig C vorgenommene Messung weist auf der linken Seite eine stärkere Isolierung gegenüber dem Bad auf als auf der rechten Seite. Dies ist auf die dort befindliche fusionierte Säulenstruktur zurückzuführen (grüne Linie = Grenze).

mittelten Werte für den effektiven Membranwiderstand R_M^* , die Membrankapazität C_M , den Pipettenwiderstand R_A und die Streukapazität C_S .

Messung, Käfig	a_J [μm]	a_{Si} [μm]	c_{JM} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	c_{Ox} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	θ [$^\circ$]
I1, A	43	60	0.8	0.4	10
I2, C	10	50	0.8	0.4	10
I3, C	28	50	0.8	0.4	10
Messung	R_M^* [$M\Omega$]	C_M [nF]	R_A [$M\Omega$]	C_S [pF]	ρ_J [$k\Omega cm$]
I1	100	0.41	99	12	23
I2	194	0.39	88	13	23
I3	61	0.21	180	11	23

Tabelle 3.9: Konstant gehaltene Parameter in den Fits der intrazellulären Messungen I1-I3.

Pipettenkorrektur

Eine andere Möglichkeit die Messungen zu analysieren ist, von der gemessenen Übertragungsfunktion $h_{Mess}^I(\omega, a_i) = \bar{V}_{JS}(\omega, a_i)/\bar{V}_P(\omega)$ auf die Übertragungsfunktion $h_{VM}^I(\omega, a_i) = \bar{V}_{JS}(\omega, a_i)/\bar{V}_M(\omega)$ zu schließen und diese dann zu interpretieren. Diese Methode wurde zuerst von R. Weis angewendet [Wei97]. Sie setzt die getrennte Ermittlung der effektiven Membranparameter R_M^* und C_M sowie der Pipettenparameter R_A und C_S voraus. Näheres hierzu findet sich in Kapitel 3.1.3. Es gilt:

$$h_{VM}^I(\omega, a_i) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a_i)}{\bar{V}_M(\omega)} = \frac{h_{Mess}^I(\omega, a_i)}{h_{Pip,M}(\omega)} \quad (3.107)$$

wobei:

$$h_{Pip,M}(\omega) = \frac{\bar{V}_M(\omega)}{\bar{V}_P(\omega)} = \frac{R_M^*}{R_M^* + R_A + i\omega C_M R_A R_M^*} \quad (3.108)$$

Auf die hier vorgestellten Messungen lässt sich dieses Verfahren nur im unteren Frequenzbereich anwenden, da dort der Einfluss des Bades vernachlässigbar ist. Wie schon in der Theorie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.5 gezeigt, macht sich der Badwiderstand zuerst durch einen Wiederanstieg in der Phase bemerkbar. Dieser Effekt ist beispielsweise deutlich ab 250 Hz in Messung I1 in Abbildung 3.53 zu beobachten. Deshalb wird diese Frequenz bei der Berechnung von $h_{VM}^I(\omega, a_i)$ als obere Grenze gewählt. Abbildung 3.56 zeigt die ermittelte Übertragungsfunktion sowie den dazugehörigen Fit. Zur Umrechnung wurden die aus Tabelle 3.7 ermittelten Parameter verwendet. Als Fitmodell diente das schon vorhandene numerisch berechnete intrazelluläre Modell mit Berücksichtigung der Säulen, des Badwiderstandes und des radiusabhängigen Abstandes ($h_{Fit}^I(\omega, a)$, siehe Kapitel 3.1.5, S. 121). Der Einfluss der Pipette und des Bades wurden durch die Wahl $R_A = 0\Omega$ und $R_{Bad} = 0\Omega$ eliminiert ($V_{ME} = V_{PE}$). Ansonsten wurden beim Anfitzen der Graphen wieder alle Parameter aus Tabelle 3.9 bis auf die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} konstant gehalten. Die ermittelten Fitparameter sind in Tabelle 3.10 zu finden.

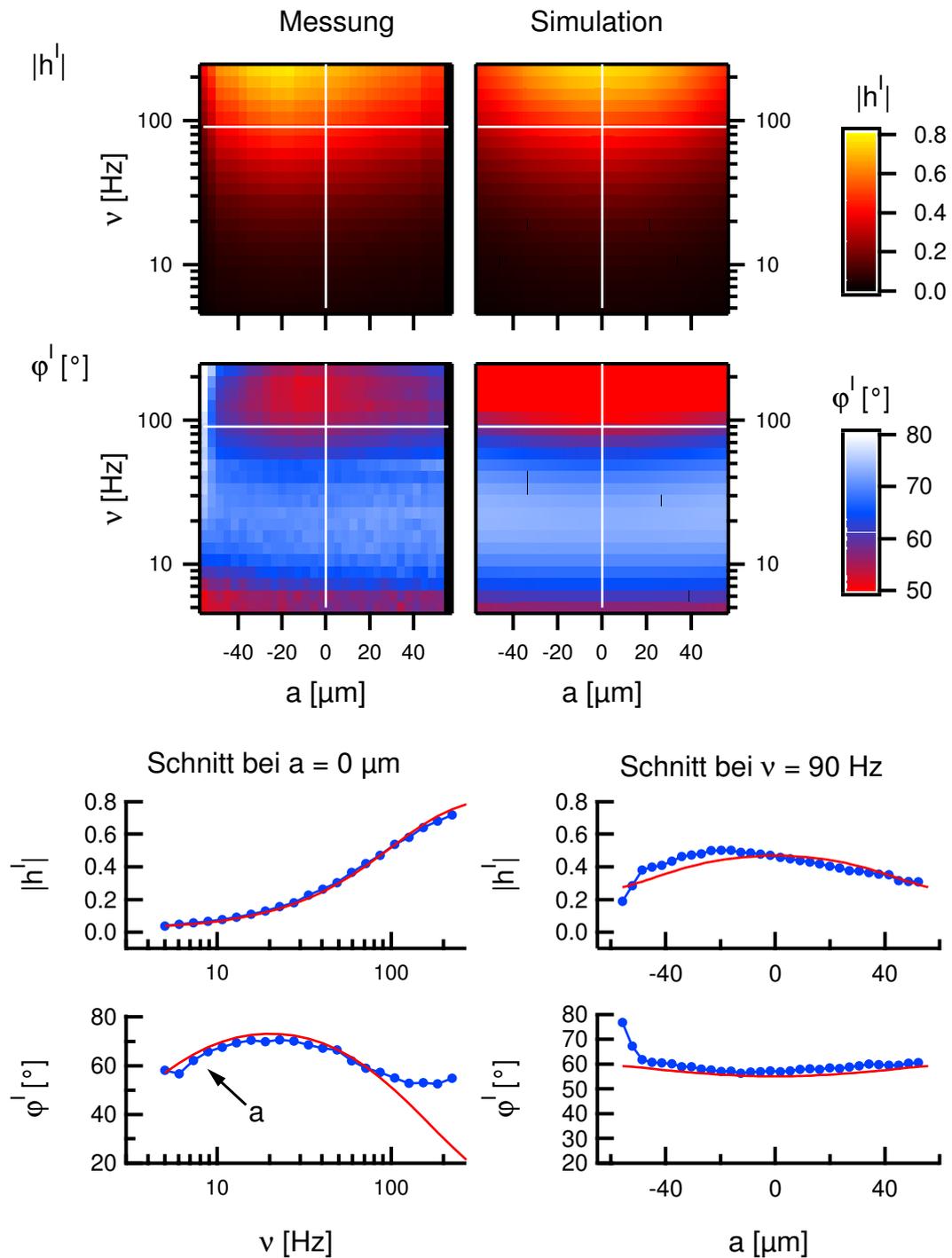


Abbildung 3.56: Messung II nach der Pipettenkorrektur: Gegenüberstellung von gemessener und gefitteter intrazellulärer Übertragungsfunktion $h_{VM}^l = V_{JS}/V_M$. Die zu niedrigen Frequenzen abfallende Phase (a) weist auf eine erhöhte Leitfähigkeit der Junctionmembran hin.

Messung, Käfig	d_J [nm]	g_{JM} [$\frac{\mu S}{cm^2}$]	c_{Ox} [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	r_S [M Ω]	a_{Sa} [μm]
I1, A	2400	8	0.15	70	130
I2, C	2000	8	0.15	60	120
I3, C	3500	20	0.4	70	120

Tabelle 3.10: Gefittete Parameter aus den intrazellulären Messungen I1-I3 nach Pipettenkorrektur.

Diskussion der Fitergebnisse:

- Aus den Messungen folgt erneut ein sehr großer Adhäsionsabstand. Die ermittelten $d_J = 2400 - 3500$ nm entsprechen einem Schichtwiderstand von $r_J = 66 - 96$ M Ω . Dieser Abstand unterscheidet sich um einen Faktor 25-37 von den mit FLIC gemessenen $d_{J,FLIC} = 93 \pm 14$ nm. Sie liegen in derselben Größenordnung wie die in den extrazellulären Messungen bestimmten Abstände. Grund für dieses Ergebnis ist abermals kein realer größerer Abstand d_J , sondern eine leitfähige diffuse Doppelschicht in der Junction. Darauf wird in Kapitel 3.6 näher eingegangen.
- Zusätzlich ergibt sich aus den Messungen eine spezifische Leitfähigkeit der Junctionmembran von $g_{JM} = 8 - 20$ $\mu S/cm^2$. Auf sie kann besonders gut aus dem niederfrequenten Phasenanstieg der Messungen nach der Pipettenkorrektur gefolgert werden. Dies bedeutet einen Anstieg um einen Faktor 8 bis 20 gegenüber den erwarteten 1 $\mu S/cm^2$. Eine Interpretation findet sich ebenfalls in Kapitel 3.6.
- Der flache Potentialanstieg am Rande der Junction ließ sich durch den Randwinkel von $\theta = 10^\circ$ annähern. Die Anhebung an den Säulen ($a = a_{S_i}$) sowie der Verlauf in den Säulen in Messung I2 und I3 wird durch die Isolierung der Junction aufgrund der Säulen wiedergegeben. Der ermittelte Ersatz-Schichtwiderstand der Säulen r_S liegt mit $50 - 70$ M Ω im selben Bereich wie bei den extrazellulären Messungen. Die virtuelle Breite der Säulen von $a_{S_a} - a_{S_i} = 70$ μm passte in allen drei Messungen gut.
- Der ermittelte Badwiderstand R_{Bad} von $160 - 260$ M Ω ist um einen Faktor 4 niedriger als in den extrazellulären Messungen. Eventuell ist das darauf zurückzuführen, dass Theorie und Messung oberhalb von 250 Hz nicht besonders gut übereinstimmen. Vor allem die Phase zeigt ein gänzlich unterschiedliches Verhalten. Deswegen konnte kein der Pipettenkorrektur ähnliches Verfahren zur Eliminierung des Badwiderstandes und der Pipette aus den Messungen angewendet werden.
- Die aus den pipettenkorrigierten Messungen erhaltenen Werte von $0.15 - 0.4$ $\mu F/cm^2$ für die spezifische Oxidkapazität c_{Ox} liegen im Bereich der durchschnittlichen Oxidkapazität von Gateoxid und lokalem Oxid von 0.19 $\mu F/cm^2$.
- Auffallend sind die niedrigen effektiven Membranwiderstände R_M^* der gezeigten Experimente. Der Grund hierfür ist der späte Zeitpunkt, zu dem die Messungen nach dem Anstechen gemacht wurden. Die erst dann erreichte große Adhäsionsfläche ist für das Entstehen eines großen Transistorsignales wichtiger als ein hoher Leckwiderstand.

- Es existieren auch Messungen mit Vesikeln, die reine Saccharose Lösung (SA-Lösung) enthalten. Sie unterscheiden sich in ihrem Ergebnis aber nicht von den hier gezeigten Experimenten. Grund hierfür ist wahrscheinlich das Einströmen von Ionen aus der Pipette oder durch das Leck in den Vesikel. Die Leitfähigkeit im Vesikelinneren ist damit unabhängig von der ursprünglichen Füllung.

3.6 Fazit

Im Folgenden werden die zwei wichtigsten Ergebnisse der intra- und extrazellulären Chipmessungen an Riesenvesikeln auf BSA-beschichteten Siliziumchips interpretiert.

Abstand zwischen Junctionmembran und Chip

Das Anfitten der Messkurven liefert bei Vesikeln, die salzhaltige Saccharoselösung (SB-Lösung) enthalten, einen viel zu großen Abstand d_J zwischen Junctionmembran und oxidierte Siliziumoberfläche. Während die intrazellulären Messungen Abstände von $d_J = 2400 - 3500$ nm ergeben, erhält man in den extrazellulären Abstände von $d_J = 900 - 1300$ nm. Diese Ergebnisse unterscheiden sich um den Faktor 25-37 beziehungsweise 10-14 von dem durch FLIC-Messungen bestimmten Wert von $d_{J,FLIC} = 93 \pm 14$ nm. Sie entsprechen bei einem angenommenen spezifischen Elektrolytwiderstand im Spalt von $\rho_J = \rho_{Bad} = 23$ k Ω cm Schichtwiderständen von $r_J = 66 - 96$ M Ω beziehungsweise $r_J = 180 - 260$ M Ω .

Zur Interpretation der großen Differenz zwischen FLIC-Messung und intrazellulärer Messung gibt es zwei Ansätze:

- Eine Ursache könnte das Fluktuieren der Junctionmembran sein. Der Widerstand der Junction wird durch die maximale Auslenkung der adhären Membran bestimmt. Dies wird beim Betrachten zweier benachbarter kleiner Bereiche mit gleichem radialen Abstand vom Mittelpunkt der Junction klar. Unter der Annahme, dass das elektrische Feld in der Junction radial ist, sind die beiden Bereiche parallel geschaltet, und derjenige mit dem geringeren Widerstand und dem größeren Abstand dominiert. Beim Beobachten der Fluktuationen in den Messvideos fällt allerdings auf, dass sie nur zwischen einem Maximum und einem Minimum der FLIC-Theorie-Kurve schwanken. Ihre maximale Auslenkung liegt deshalb bei nur 100 nm. Das reicht nicht aus für eine Erklärung der niedrigen Schichtwiderstände.
- Wahrscheinlicher ist die Existenz einer oder mehrerer Schichten mit erhöhter Leitfähigkeit in der Junction. Eine Zunahme der Gesamtleitfähigkeit in der Junction würde sich dagegen an den Rändern der Adhäsionsfläche viel stärker bemerkbar machen als dies in den Messungen zu sehen ist. Eine mögliche Erklärung sind leitfähige diffuse Doppelschichten. Dies sind Raumladungszonen, die sich an den negativ geladenen Oberflächen des Siliziumoxids und des Vesikels bilden. Die Dichte der Silanolgruppen an einer Siliziumoxidoberfläche beträgt $N_{Sil} = 5.0 \cdot 10^{18} \frac{1}{\text{m}^2}$ [Rai98]. In einer POPC-Membran liegt die Lipiddichte bei $N_{POPC} = 1.4 \cdot 10^{18} \frac{1}{\text{m}^2}$ [Alt84]. Allerdings trägt in den verwendeten Vesikeln nur jedes hundertste Molekül eine Ladung (Molverhältnis POPC:DOPME=100:1). Berücksichtigt man die pKs-Werte $pK_{Sil} = 5.7$ [Ber88] und $pK_{DOPME} = 1 - 2$ sowie die Konzentrationen der dissoziierten Ionen

$c_{Cl} = c_{Tris} = 0.45 \text{ mM}$ des verwendeten Elektrolyten (0.54 mM Tris/HCl Puffer, pH 7.4), folgen aus der Gouy-Chapman Theorie [Hie97] die Oberflächenladungen $\sigma_{Sil} = -0.04 \text{ C/m}^2$ und $\sigma_{Mem} = -0.002 \text{ C/m}^2$. Da die diffusen Doppelschichten in dem verwendeten Elektrolyten eine Dicke von $d_{DD} = 1/\kappa = 15 \text{ nm}$ haben, kann davon ausgegangen werden, dass die Tris-Ionen, welche die Gegenladung zu den dominierenden Oberflächenladungen des Siliziumoxids bilden, sich fast komplett im Spalt befinden. Die Oberflächenladung entspricht einer durchschnittlichen Konzentration von $c_{Tris,J} = 4.4 \text{ mM}$ und damit einem erniedrigten spezifischen Widerstand von $\rho_J = -d_J/(u_{Tris}\sigma_{Sil}) = 7.5 \text{ k}\Omega\text{cm}$ in der Junction. Dabei wurde für die Tris-Ionen eine Beweglichkeit von $u_{Tris} = 3.0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{Vs})$ angenommen [Ng95]. Unter Verwendung von $d_J = 93 \text{ nm}$ folgt damit ein Schichtwiderstand von $r_J = \rho_J/d_J = 810 \text{ M}\Omega$. Dieses Ergebnis weist in die richtige Richtung, entspricht aber noch nicht ganz den aus den obigen Abständen ermittelten Werten.

Bei allen Überlegungen dürfen die extrazellulären Messungen an Riesenvesikeln mit reiner Saccharose nicht vernachlässigt werden. Der ermittelte Adhäsionsabstand von $d_J = 50 - 100 \mu\text{m}$ liegt noch einmal um einen Faktor 11-23 höher als bei den Vesikeln mit salzhaltiger Füllung. Tatsache ist, dass die sich auf der Innenseite befindlichen Membranladungen durch die 49 nm breite diffuse Doppelschicht im Inneren nicht genügend abgeschirmt werden und so auf die Junction wirken. Dieser Effekt sollte jedoch die Oberflächenladung der Membran maximal verdoppeln. Das reicht bei weitem nicht aus, um die Messungen zu erklären.

Leitfähigkeit der Junctionmembran

Das zweite wichtige Ergebnis der intrazellulären Messungen ist die hohe spezifische Leitfähigkeit der Junctionmembran. Der gemessene Wert von $g_{JM} = 8 - 20 \mu\text{S/cm}^2$ liegt weit über der in [Fro99] abgeschätzten Grenze von $g_{JM} < 1 \mu\text{S/cm}^2$. Bedauerlicherweise konnte das Ergebnis in den extrazellulären Messungen der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden, da die Ortsprofile asymmetrisch sind und zudem am Rande flach auslaufen.

Als Begründung für die hohen Leitfähigkeiten gibt es mehrere Ansätze:

- Eine Möglichkeit ist, dass Vesikelmembranen generell undichter sind als bisher angenommen. Dies würde aber den hohen Abdichtwiderständen zu Beginn der Anstechexperimente widersprechen.
- Wahrscheinlicher ist hingegen, dass Vesikelmembranen unter Anspannung mit der Zeit Mikroporen entwickeln und deswegen undicht werden. Unter der Annahme, dass die gesamte Vesikelmembran die gemessene Leitfähigkeit $g_M = g_{JM}$ besitzt, erhält man für die Experimente I1, I2 und I3 Gesamtmembranwiderstände R_M von 180 M Ω , 270 M Ω und 150 M Ω . Diese Ergebnisse liegen in derselben Größenordnung wie die Werte für R_M^* aus Tabelle 3.7.
- Eine andere Möglichkeit wäre, dass nur die Junctionmembran diese hohe Leitfähigkeit aufweist. Das würde für eine Beschädigung der Membran durch den Kontakt mit dem BSA oder der Siliziumoxidoberfläche sprechen. Außerdem ist bekannt, dass BSA in Lösung Membranen schädigt [Dim97]. Diese Theorie wäre durch Experimente auf anderen Beschichtungen zu überprüfen.

Kapitel 4

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für den Einsatz von Riesenvesikeln auf dem Gebiet der Elektrophysiologie geschaffen. Außerdem gelang es, den Kontakt zu Siliziumchips mittels Feld-Effekt-Transistor-Arrays zu untersuchen. Anhand von Messungen der Signalübertragung vom Inneren des Vesikels in den Chip konnten die Leitfähigkeiten der Membran und der Elektrolytschicht im Kontaktbereich bestimmt werden.

Zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet könnten sich mit der Weiterentwicklung der Methode befassen. Sie sollten in erster Linie geringere Spaltbreiten und höhere Leckwiderstände zum Ziel haben:

- Die wichtigste zu klärende Frage ist, ob Vesikelmembranen prinzipiell nicht dichter als die für die Junctionmembran gemessenen $8 - 25 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ sind. Es ist vorstellbar, dass die verwendete Albumin-Beschichtung oder die Membrananspannung Mikroporen verursachen. Vergleichende intrazelluläre Chip-Messungen auf alternativen Beschichtungen wie Laminin oder Fibronectin würden sich zur Beantwortung dieser Frage gut eignen.
- Außerdem wäre es von Vorteil, die Adhäsion der Junctionmembran zu verbessern. Dazu könnten Vesikel auf kleine Poly-L-Lysin-Kreise aufgebracht werden, die sich in einem ansonsten homogenen Albumin-Teppich befinden. Bei richtiger Wahl der Fleckengröße und eventueller Stabilisierung durch Säulen könnte eine Membrananspannung vermieden werden, die intrazelluläre Experimente verhindert.
- Um die Stabilität des Membran-Pipetten-Kontakts zu verbessern, muss das Spreading der Membran auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Pipetten eingeschränkt werden. Ideal geeignet wäre der Bau einer Barriere auf der Pipette, wie es ansatzweise in Kapitel 2.5.3 versucht wurde. Ein erster Schritt in diese Richtung wäre die Entwicklung eines gelartigen aushärtenden Materials. Es sollte an Glasoberflächen haften und dabei keinen dünnen „Fuß“ ausbilden, der die Pipettenspitzen verschmutzt.

Andere Projekte könnten direkt auf dem etablierten Modellsystem aufbauen:

- Eine denkbare Anwendung wäre der Einsatz eines Riesenvesikels als Biosensor. Über rekonstituierte Ionenkanäle in der Membran ist es möglich, mit biochemischen Reagenzien das Potenzial im Inneren des Vesikels zu beeinflussen. Die daraus resultierende Änderung des Potenzials im Spalt könnte wiederum über den Chip detektiert werden.

- Ebenfalls interessant ist das bisher nur in der Theorie vorhergesagte Phänomen des Selffocusings von Ionenkanälen [Fro95a]. Hierbei werden geladene Ionenkanäle in der Mitte einer auf einem Substrat adhärenen Vesikelmembran angereichert. Dieser Effekt ist selbstverstärkend, da die Ionenkanäle einerseits im elektrischen Feld der Junction driften, andererseits ihre Neupositionierung das Feld verstärkt. Eine genaue Erläuterung dieses eventuell für Synapsen wichtigen Vorgangs ist in Anhang B nachzulesen.

Anhang A

Zusatzexperimente

A.1 Vesikelentstehung an Polyimidstrukturen

Nach der Applikation einer Lipidmischung aus POPC, DOPME und DiI (Molverhältnis 200:2:1) auf einen Säulenchip verdunstet das Lösungsmittel (Diethylether:Methanol= 9:1 (v/v)) innerhalb von Sekunden. Nach Zugabe der Pufferlösung (PA-Lösung) bilden sich schon nach fünf Minuten an allen Polyimidstrukturen Riesenvesikel aus. Auf Siliziumoxidoberflächen entstehen stattdessen nur Lipid tubuli und multilamellare Gebilde. Abbildung A.1 zeigt die Vesikelbildung an Säulen sowie über homogenen Polyimidflächen. Eventuell

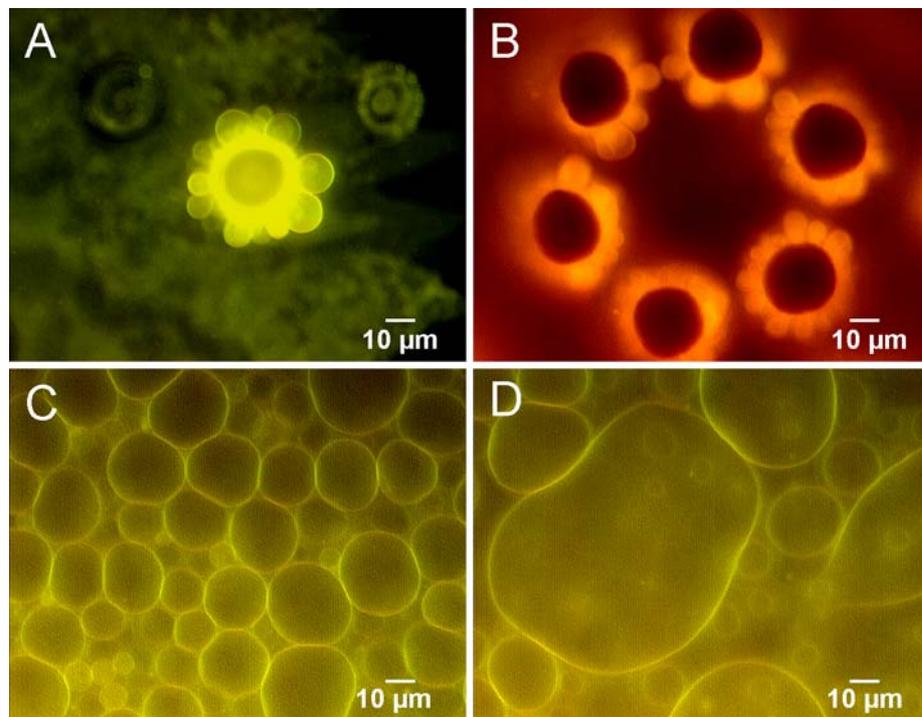


Abbildung A.1: Riesenvesikelbildung an Polyimidstrukturen. **A:** Einzelsäule mit Vesikelkranz (Fluorescein-Filtersatz). **B:** Käfig mit sechs Säulen, die alle kleine Vesikel tragen (DiI-Filtersatz). **C, D:** Polyimidflächen bedeckt mit Vesikeln (Fluorescein-Filtersatz).

ist dies ein Ansatz zur schnelleren Herstellung von Riesenvesikeln. Das Ablösen der Vesikel könnte analog dem Elektroswelling mit Wechselspannung geschehen.

A.2 Patchversuche an Riesenvesikeln

Aufgrund des hohen Zugangswiderstandes von 20–200 M Ω bei Anstechpipetten wäre es ein großer Fortschritt, wenn Riesenvesikel stattdessen mit Patchpipetten kontaktiert werden könnten. Diese besitzen einen viel geringeren Widerstand von 1 – 10 M Ω . Erste Versuche wurden bereits von Keller et al. unternommen [Kel88]. Sie berichteten von einem Zusammenbrechen des Membranwiderstands nach dem Durchbruch der Vesikelmembran. Parallel zu den Anstechexperimenten wurden auch in dieser Arbeit Versuche mit Patchpipetten, die in unserer Abteilung erfolgreich bei Nervenzellen angewendet werden (GB150-T10, science products, Hofheim), unternommen. Dabei stellte sich heraus:

- Ein Gigaseal im cell-attached Zustand konnte erreicht werden. Allerdings war es nicht möglich, die Membran zu durchbrechen. Stattdessen platzten die Vesikel, wurden komplett in die Patchpipette eingesaugt oder innerhalb der Pipette wurden kleine Vesikel abgeschnürt. Abbildung A.2 zeigt verschiedene Fehlversuche.

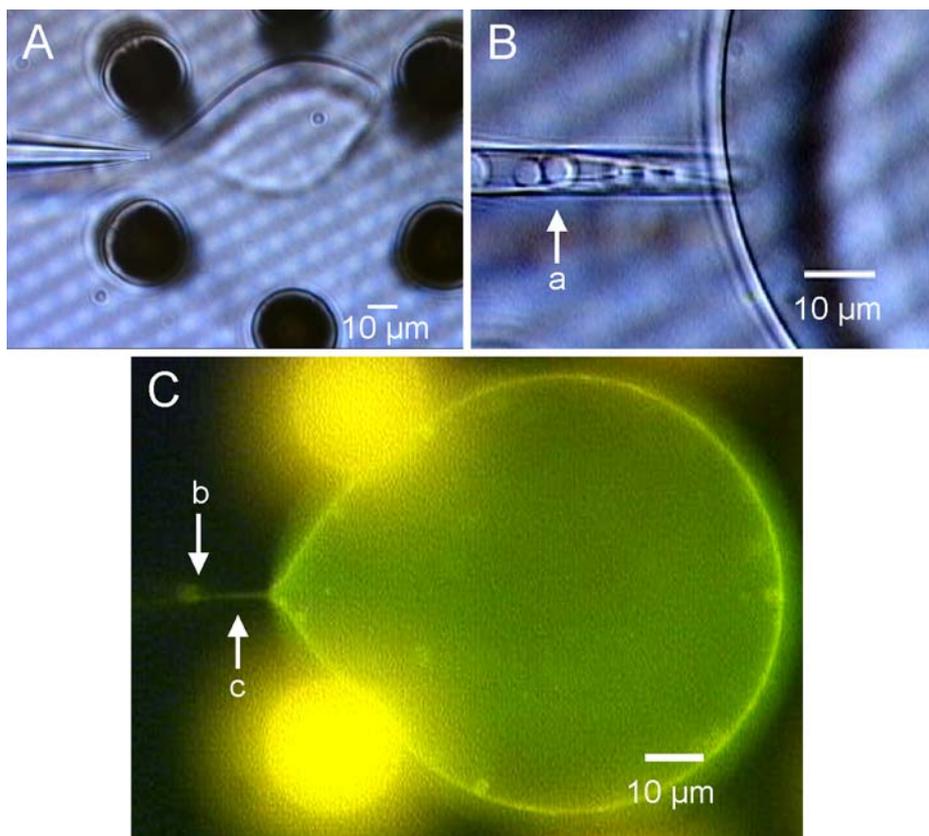


Abbildung A.2: Fehlversuche beim Patchen. **A:** Vesikel wird von der Patchpipette eingesaugt **B:** Kleine Vesikel (a) schnüren sich beim Saugen in der Patchpipette ab. **C:** Ein Lipidfaden (c) wird schon vor dem Berühren des Vesikels eingesaugt. Die von links herangeführte Spitze der unsichtbaren Patchpipette (b) wird dabei verschmutzt.

- Analog Kapitel 2.4.1 wurde ein Druckhalter für Patchpipetten gebaut. Die Beschichtung von Patchpipetten mit Poly-L-Lysin war damit innerhalb von zwei Stunden problemlos möglich. In allen Patchversuchen mit diesen Pipetten zeigte sich allerdings kein einziger Gigaseal. In einem von 18 Versuchen wurde der Spreading-Effekt beobachtet.
- Häufig veranlasste der Unterdruck der Patchpipette schon vor dem eigentlichen Berühren den Riesenvesikel dazu, einen Lipidfaden auszustülpen. Dieser wurde in die Pipette eingesaugt und verschmutzte sie dabei.
- Bei Patchversuchen mit Anstechpipetten verstopften aufgrund der kleineren Öffnung beim Saugen eher die Pipetten, als dass ein Durchbruch erzielt wurde.

A.3 Pearling

In einem Zusatzexperiment wurde versucht, den von Bar-Ziv et al. [BZ94] entdeckten Effekt des *Pearlings* nachzustellen. Wie schon in Kapitel 2.6.2 beschrieben, handelt es sich hierbei um das Abschnüren von kleinen Vesikeln (Perlen) aus einem Membrantubulus, der mit einer *optischen Pinzette* (*optical tweezers*) berührt wird.

In unserem kurzen Versuch wurde anstelle der optischen Pinzette eine Anstechpipette verwendet. Zur Herstellung der Membranröhren wurde eine in Methanol und Diethylether gelöste Mischung aus POPC, DOPME und DiI (siehe Kapitel 2.2.2) direkt auf einen oxidierten Siliziumchip appliziert. Nach dem Verdunsten der Lösungsmittel führte die Zugabe

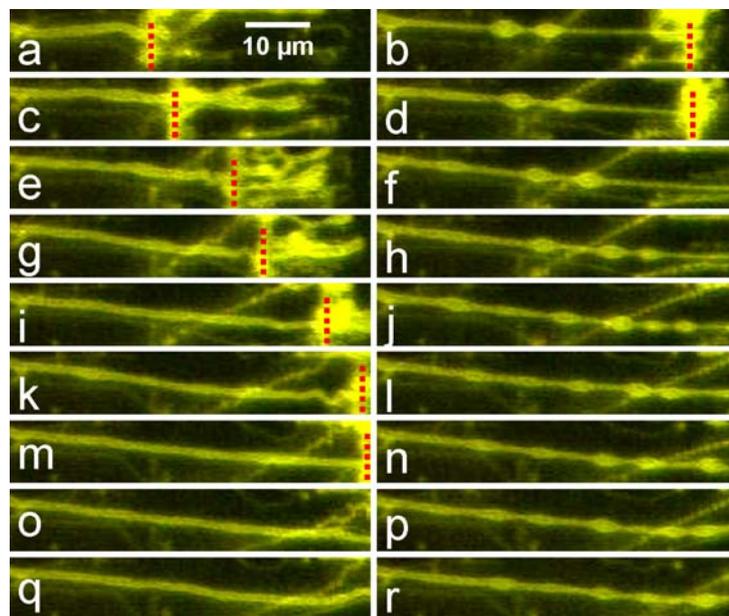


Abbildung A.3: Pearling einer aus POPC, DOPME und DiI bestehenden Membranröhre. Dieser Tubulus ist zwischen einem Lipidklumpen (links außerhalb der Bilder) und einer Pipette (rot gepunktete Linie) befestigt. Die Pipette wird abwechselnd nach rechts (**b, d, f, h, j, l, n, p, r**) und wieder nach links (**a, c, e, g, i, k, m, o, q**) bewegt. Bei der Bewegung nach rechts beginnen sich jeweils kleine Perlen abzuschneiden, die bei den darauffolgenden Bewegungen nach links wieder verschwinden.

von Pufferlösung (PA-Lösung) zum Quellen des Lipids. Unter anderem bildeten sich dabei Membranröhren aus, die aus gequollenen Lipidklumpen herauswuchsen. Bei Quetschung des freien Endes dieser Tubuli mit einer Pipette auf das Oxidsubstrat blieben die Tubuli an der Pipette haften. Ein Ziehen an den Enden der Membranröhren führte zu einem Abschnüren mehrerer kleiner Lipidvesikel mit einem Durchmesser von $2 - 3 \mu\text{m}$. Diese Bildung von sogenannten Perlen, auch *Pearling* genannt, war reversibel. Bei jeder Entspannung der Perlenschnur bildete sich wieder der ursprüngliche einfache Tubulus aus. In Abbildung A.3 ist eines dieser Experimente dargestellt. Der Übergang vom Tubulus zur Perlenschnur konnte acht Mal hintereinander ausgelöst werden. Da die linke Seite des Tubulus an einem Lipidklumpen befestigt war, konnte von dort aus Material nachfließen. Dies führte dazu, dass der Tubulus bei jedem Ziehen länger wurde und die Pipette meist außerhalb des Bildes ist.

Anhang B

Selffocusing

Der Effekt des Selffocusing wurde 1981 von P. Fromherz vorgeschlagen [Fro95a]. Es handelt sich hierbei um ein sich selbst verstärkendes Ansammeln von Ionenkanälen in der Mitte der Junctionmembran. Als Grundvoraussetzung muss der Abstand d_J zwischen Zelle und Substrat sehr klein sein. Die Junctionmembran enthält Ionenkanäle der Dichte n und der Leitfähigkeit Λ , die eine positive Ladung ze_0 tragen. Wird das Innere der Zelle mit einer Glaspipette elektrisch kontaktiert, so kann man über die Zellmembran eine konstante Spannung V_M anlegen. Dies führt zu einem Stromfluss vom Bad in die Zelle. Ein Teil des Stromes fließt dabei über den Spalt der Junction in die Zelle. Der spezifische Widerstand des Spalts ρ_J führt zu einem Spannungsabfall V_J und damit zu einem radialen nach innen gerichteten elektrischen Feld in der Junction. Dadurch angetrieben driften die geladenen Ionenkanäle zum Zentrum der Junctionmembran. Diese Umordnung der Kanäle verändert wiederum den Stromfluss im Spalt und damit das Spannungsprofil. Der Prozess ist damit selbstverstärkend. Dem Drift überlagert ist die Diffusion der Kanäle mit dem Diffusionskoeffizienten D . Sie führt dazu, dass nach einer Weile eine Sättigung des Verhaltens eintritt.

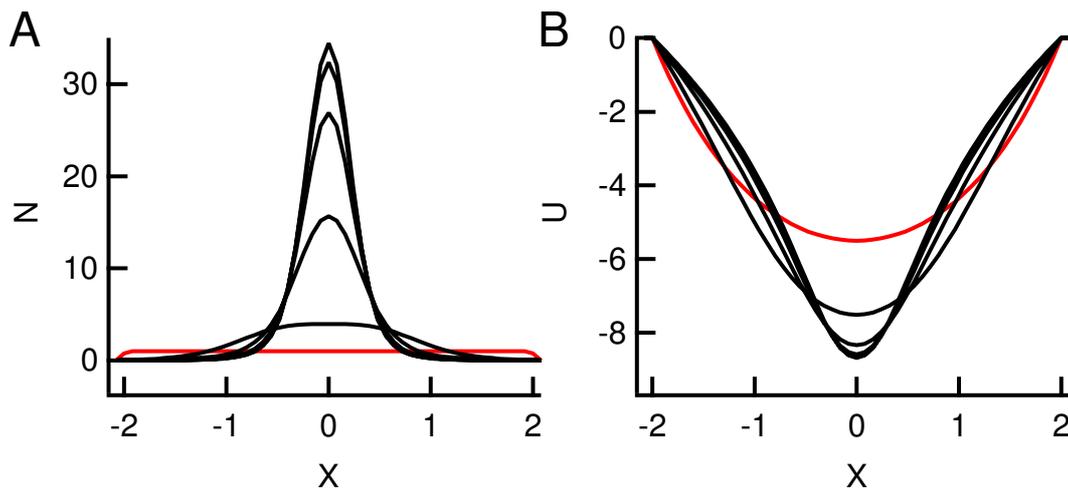


Abbildung B.1: Schnitte durch das Zentrum einer kreisförmigen Fläche: U und N werden in Abhängigkeit vom Ort X zu verschiedenen Zeiten T dargestellt: 0 (rot), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0

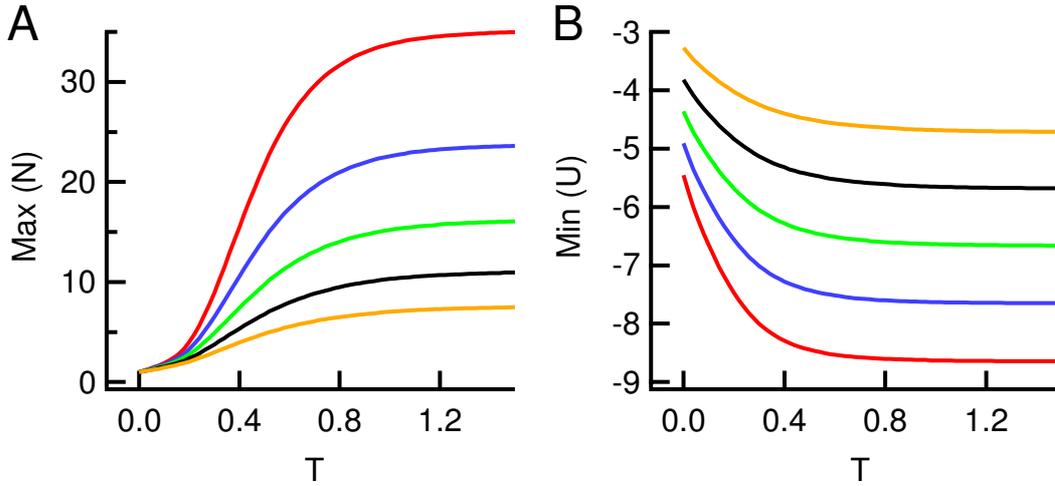


Abbildung B.2: Maxima von U und N in Abhängigkeit von der Zeit T für verschiedene Driveparameter \hat{U} : -10, -9, -8, -7, -6 (rot-gelb)

Das System kann durch ein nichtlineares gekoppeltes Differentialgleichungssystem beschrieben werden. Für die normierte Kanaldichte $N = \frac{n}{n_0}$ und die normierte Junctionspannung $U = \frac{V_J z e_0}{k_B T}$ gelten die Smoluchowski-Gleichung:

$$\partial_T N = \nabla (\nabla N + N \nabla U) \quad (\text{B.1})$$

und eine Gleichung, die eine zweidimensionale quasistationäre Form von Kelvins Kabelgleichung darstellt:

$$\Delta U = N (U - \hat{U}) \quad (\text{B.2})$$

Diese Gleichung ist stationär, da die Spannungsrelaxation um Größenordnungen schneller abläuft als die Neuordnung der Kanäle [Fro88]. Für den Driveparameter \hat{U} gilt:

$$\hat{U} = \frac{(V_M - V_0) \cdot z e_0}{k_B T} \quad (\text{B.3})$$

In den Gleichungen sind Ort (X, Y) und Zeit T normiert:

$$X = \frac{x}{\lambda}, Y = \frac{y}{\lambda}, T = \frac{t}{\tau} \quad (\text{B.4})$$

wobei für die Längskonstante λ und die Zeitkonstante τ gelten:

$$\lambda = \sqrt{\frac{d_J}{\rho \Lambda \bar{n}}} \quad , \quad \tau = \frac{\lambda^2}{D} = \frac{d_J}{\rho_J \Lambda \bar{n} D} \quad (\text{B.5})$$

Das Differentialgleichungssystem lässt sich nur numerisch lösen. Hierzu wird N aus einer Euler-Vorwärts-Integration der Smoluchowski-Gleichung bestimmt. Nach jedem Eulerschritt wird die Kelvin-Gleichung durch *successive over relaxation* gelöst und somit U bestimmt [Pre92]. Auf einem Kreis mit dem normiertem Radius $R_0 = \frac{r_0}{\lambda}$ gelten für U und N die Randbedingungen $U(R_0) = 0$ (Dirichlet) und $\vec{R} \cdot \nabla_{2D} N = 0$ (Neumann).

Anhang C

Lösung des Punktkontaktmodells

C.1 Intrazelluläres Punktkontaktmodell mit Bad und Pipette

Für das Schaltbild in Abbildung 3.8 ergibt sich folgende Übertragungsfunktion:

$$h_3^I(\omega) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega)}{\bar{V}_{PE}(\omega)} = \frac{-ai\omega^3 - b\omega^2 + ci\omega + d}{-ei\omega^3 - f\omega^2 + gi\omega + h} \quad (\text{C.1})$$

mit den Konstanten:

$$\begin{aligned} a &= C_{FM}C_{JM}C_S \\ b &= C_{Bad}C_{JM}G_A + C_{JM}C_S(G_A + G_{FM}^* + G_J) + C_{FM}[C_{JM}G_A \\ &\quad + C_S(G_J + G_{JM})] \\ c &= C_S(G_A + G_{FM}^*)G_J + C_{JM}G_A(G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J) \\ &\quad + [C_{Bad}G_A + C_S(G_A + G_{FM}^* + G_J)]G_{JM} + C_{FM}G_A(G_J + G_{JM}) \\ d &= G_A G_{FM}^* G_J + G_A(G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J)G_{JM} \\ e &= C_{Bad}C_{FM}C_{JM} + C_{FM}C_{JM}C_{Ox} + C_{Bad}(C_{FM} + C_{JM})C_{Ox} \\ &\quad + C_{JM}C_{Ox}C_S + C_{FM}(C_{JM} + C_{Ox})C_S \\ f &= C_{JM}C_S G_A + C_{Ox}C_S G_A + C_{JM}C_{Ox}G_{Bad} + C_{JM}C_{Ox}G_{FM}^* \\ &\quad + C_{JM}C_S G_{FM}^* + C_{Ox}C_S G_{FM}^* + C_{JM}C_{Ox}G_J + C_{JM}C_S G_J \\ &\quad + C_{Ox}C_S G_{JM} + C_{Bad}[C_{JM}(G_A + G_{FM}^* + G_J) \\ &\quad + C_{Ox}(G_A + G_{FM}^* + G_{JM}) + C_{FM}(G_J + G_{JM})] \\ &\quad + C_{FM}[C_{JM}(G_A + G_{Bad}) + C_S(G_J + G_{JM}) \\ &\quad + C_{Ox}(G_A + G_{Bad} + G_J + G_{JM})] \\ g &= [C_{FM}(G_A + G_{Bad}) + C_{Bad}(G_A + G_{FM}^*) + C_S(G_A + G_{FM}^*)]G_J \\ &\quad + C_{JM}[G_{Bad}(G_{FM}^* + G_J) + G_A(G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J)] \\ &\quad + [C_{FM}(G_A + G_{Bad}) + C_{Bad}(G_A + G_{FM}^* + G_J) \\ &\quad + C_S(G_A + G_{FM}^* + G_J)]G_{JM} + C_{Ox}[G_{FM}^*(G_{Bad} + G_J) \\ &\quad + G_A(G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J) + (G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J)G_{JM}] \\ h &= G_{Bad}G_{FM}^*G_J + G_A(G_{Bad} + G_{FM}^*)G_J + G_{Bad}(G_{FM}^* + G_J)G_{JM} \end{aligned}$$

$$+ G_A (G_{Bad} + G_{FM}^* + G_J) G_{JM} \quad (C.2)$$

wobei:

$$R_{FM}^* = G_{FM}^*{}^{-1} = (G_{FM} + R_L^{-1})^{-1} \quad (C.3)$$

Für Betrag und Phase folgt:

$$\begin{aligned} |h_3^I(\omega)|^2 &= \frac{(d - b\omega^2)^2 + (c\omega - a\omega^3)^2}{(h - f\omega^2)^2 + (g\omega - e\omega^3)^2} \\ \tan \varphi_3^I &= \frac{(ch - dg)\omega + (de - cf + bg - ah)\omega^3 + (af - be)\omega^5}{dh + (cg - df - bh)\omega^2 + (bf - ce - ag)\omega^4 + ae\omega^6} \end{aligned} \quad (C.4)$$

C.2 Extrazelluläres Punktkontaktmodell mit Bad

Für das Schaltbild in Abbildung 3.14 ergibt sich folgende Übertragungsfunktion:

$$h_4^E(\omega) = \frac{-a\omega^2 + bi\omega + c}{-di\omega^3 - e\omega^2 + fi\omega + g} \quad (C.5)$$

mit den Konstanten:

$$\begin{aligned} a &= C_{FM} C_{JM} G_{Bad} \\ b &= G_{Bad} [C_{JM} (G_{FM} + G_J) + C_{FM} (G_J + G_{JM})] \\ c &= G_{Bad} (G_{FM} G_J + G_{FM} G_{JM} + G_J G_{JM}) \\ d &= C_{FM} C_{JM} C_{Ox} \\ e &= C_{JM} C_{Ox} (G_{Bad} + G_{FM} + G_J) + C_{FM} [C_{JM} G_{Bad} \\ &\quad + C_{Ox} (G_{Bad} + G_J + G_{JM})] + C_{Ox2} [C_{JM} (G_{FM} + G_J) \\ &\quad + C_{Ox} (G_{FM} + G_{JM}) + C_{FM} (G_J + G_{JM})] \\ f &= C_{Ox} G_{FM} (G_{Bad} + G_J) + C_{JM} G_{Bad} (G_{FM} + G_J) \\ &\quad + C_{Ox} (G_{Bad} + G_{FM} + G_J) G_{JM} + C_{FM} G_{Bad} (G_J + G_{JM}) \\ &\quad + C_{Ox2} [G_J G_{JM} + G_{FM} (G_J + G_{JM})] \\ g &= G_{Bad} G_{FM} G_J + G_{Bad} (G_{FM} + G_J) G_{JM} \end{aligned} \quad (C.6)$$

wobei $G_{Bad} = 1/R_{Bad}$ verwendet wurde. Für Betrag und Phase folgt:

$$\begin{aligned} |h_3^I(\omega)|^2 &= \frac{b^2\omega^2 + (c - a\omega^2)^2}{(g - e\omega^2)^2 + (f\omega - d\omega^3)^2} \\ \tan \varphi_3^I &= \frac{(bg - cf)\omega + (cd - be + af)\omega^3 + (-ad)\omega^5}{cg + (bf - ce - ag)\omega^2 + (ae - bd)\omega^4} \end{aligned} \quad (C.7)$$

Anhang D

Lösung des Flächenkontaktmodells

D.1 Extrazelluläres Flächenkontaktmodell ohne Bad

Allgemein ergeben sich aus den Kirchhoffschen Knotenregeln in der Junction und im Zellinneren die schon in Kapitel 3.1.6 hergeleiteten Gleichungen 3.80 und 3.81. Löst man Zweitere nach V_{JM} auf und setzt das Ergebnis in Erstere ein, so ergibt sich:

$$\left[\nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) - (l_J + l_O) \right] \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) + \frac{l_J l_F}{l_F + \beta l_J} \bar{V}_{ES}(\omega) + \frac{\beta l_J^2}{l_F + \beta l_J} \langle \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) \rangle = 0 \quad (\text{D.1})$$

mit den komplexen Leitfähigkeiten:

$$l_J = g_{JM} + i\omega c_{JM} \quad l_F = g_{FM} + i\omega c_{FM} \quad l_O = i\omega c_{ox} \quad (\text{D.2})$$

Die Lösung der Differentialgleichung (DGL) nach V_{JS} wird dabei einerseits durch den integralen Anteil $\langle \bar{V}_{JS}(\omega, x, y) \rangle$ als auch durch die Randbedingung $\bar{V}_{JS}(\omega, x(k), y(k)) = \bar{V}_{ES}(\omega)$ mit der Randbegrenzung $(x(k), y(k))$ erschwert. Sie wird erst durch eine geschickte Substitution möglich, die leicht modifiziert von R. Gleixner [Gle03] übernommen wurde:

$$\bar{V}_{JS}(\omega, x, y) = \bar{V}_{ES}(\omega) + \alpha U(\omega, x, y) \quad (\text{D.3})$$

Einsetzen in Gleichung D.1 ergibt:

$$\left[\nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) - \underbrace{(l_J + l_O)}_{T_1} \right] U(\omega, x, y) - \underbrace{\frac{1}{\alpha} l_O \bar{V}_{ES}(\omega) + \frac{\beta l_J^2 \langle U(\omega, x, y) \rangle}{l_F + \beta l_J}}_{T_2} = 0 \quad (\text{D.4})$$

Nun wird α so gewählt, dass die markierten Terme T_1 und T_2 identisch werden. Man erhält:

$$\alpha = \frac{l_O (l_F + \beta l_J)}{-(l_J + l_O) (l_F + \beta l_J) + \beta l_J^2 \langle U(\omega, x, y) \rangle} \bar{V}_{ES}(\omega) \quad (\text{D.5})$$

Für die DGL folgt:

$$\left[\nabla \left(\frac{1}{r_J(x, y)} \nabla \right) - (l_J + l_O) \right] U(\omega, x, y) + (l_J + l_O) = 0 \quad (\text{D.6})$$

mit der veränderten Randbedingung $U(\omega, x(k), y(k)) = 0$. Diese analytisch nicht lösba-re DGL vereinfacht sich unter der Annahme einer zylindersymmetrischen Junction mit $U(\omega, x, y) = U(\omega, \varphi, a) = U(\omega, a)$ zu:

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial a^2} + \left(\frac{1}{a} - \frac{1}{r_J(a)} \frac{\partial r_J(a)}{\partial a} \right) \frac{\partial}{\partial a} - \gamma^2 \right] U(\omega, a) + \gamma^2 = 0 \quad (\text{D.7})$$

mit der komplexen Dämpfungskonstante $\gamma^2 = r_J(a) (g_{JM} + i\omega (c_{JM} + c_{ox}))$. Auch diese DGL ist analytisch nicht lösbar. Dies wird erst bei Annahme eines homogenen Schichtwi-derstandes $r_J(a) = r_J$ möglich. Aus Gleichung D.7 wird:

$$\left[\frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial a} - \gamma^2 \right] U(\omega, a) + \gamma^2 = 0 \quad (\text{D.8})$$

Mit der Randbedingung $U(\omega, a_J) = 0$ ergibt sich als Lösung:

$$U(\omega, a) = 1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \quad (\text{D.9})$$

Dabei handelt es hier und im Folgenden bei den Funktionen $I_n(x)$ um die modifizier-ten Besselschen Funktionen erster Gattung n-ter Ordnung. Durch obige Annahme einer zylindersymmetrischen Junction vereinfacht sich ebenfalls die Berechnung des benötigten Mittelwertes:

$$\begin{aligned} \langle U(\omega, a) \rangle &= \frac{1}{A_{JM}} \int_{A_{JM}} \left(1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right) dA = \frac{2\pi}{a_J^2 \pi} \int_0^{a_J} \left(1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right) a da \\ &= \frac{2}{a_J^2} \left(\frac{a_J^2}{2} - \frac{1}{I_0(\gamma a_J)} \int_0^{a_J} I_0(\gamma a) a da \right) \end{aligned} \quad (\text{D.10})$$

Mit Hilfe der Substitution $b = \gamma a$ und $\int_0^z b^\nu I_{\nu-1}(b) db = z^\nu I_\nu(z)$ [Abr74] kann das Integral berechnet werden:

$$\langle U(\omega, a) \rangle = 1 - \frac{2}{\gamma a_J} \frac{I_1(\gamma a_J)}{I_0(\gamma a_J)} \quad (\text{D.11})$$

Mit dem Satz $\frac{2n}{x} I_n(x) = I_{n-1}(x) - I_{n+1}(x)$ [Bro91] reduziert sich die Formel zu:

$$\langle U(\omega, a) \rangle = \frac{I_2(\gamma a_J)}{I_0(\gamma a_J)} \quad (\text{D.12})$$

Die Resubstitution von Gleichung D.9 unter der Verwendung von D.5 und D.12 führt zur gewünschten analytischen Lösung des extrazellulären Flächenkontaktmodells mit zylindersymmetrischer homogener Junction:

$$\begin{aligned} \frac{V_{JS}(\omega, a)}{V_{ES}(\omega)} &= 1 + \frac{l_O}{-(l_J + l_O) + \frac{\beta l_J^2}{(l_F + \beta l_J)} \frac{I_2(\gamma a_J)}{I_0(\gamma a_J)}} \left(1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right) \\ &= 1 - \frac{l_O (l_F + \beta l_J) [I_0(\gamma a_J) + I_0(\gamma a)]}{(l_J + l_O) (l_F + \beta l_J) I_0(\gamma a_J) - \beta l_J^2 I_2(\gamma a_J)} \end{aligned} \quad (D.13)$$

D.2 Extrazelluläres Flächenkontaktmodell mit Bad

Berechnet werden soll die Übertragungsfunktion der Schaltung in Abbildung 3.28. Für die gesuchte Übertragungsfunktion gilt:

$$h_{3,F}^E(\omega, a) = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a)}{\bar{V}_{ES}(\omega)} = \frac{\bar{V}_{JS}(\omega, a)}{\bar{V}_E(\omega)} \frac{\bar{V}_E(\omega)}{\bar{V}_{ES}(\omega)} = h_{1,F}^E(\omega, a) h_{EE}(\omega) \quad (D.14)$$

wobei $h_{1,F}^E(\omega, a)$ die Übertragungsfunktion bei extrazellulärer Anregung ohne Bad ist, die aus Gleichung 3.85 in Kapitel 3.1.6 bekannt ist. Das Spannungsverhältnis h_{EE} ergibt sich beim Betrachten der Schaltung als Spannungsteiler zwischen Badwiderstand, unbedeckter Chipkapazität und Zellimpedanz:

$$h_{EE}(\omega) = \frac{\bar{V}_E(\omega)}{\bar{V}_{ES}(\omega)} = \frac{1}{1 + G_{Bad}^{-1} (i\omega C_{Ox2} + Z_{cell}(\omega))^{-1}} \quad (D.15)$$

wobei sich der komplexe Widerstand der Zelle mit dem Ohmschen Gesetz über den Gesamtstrom \bar{I}_{Ox} durch das Oxid berechnen lässt. Dieser wiederum lässt sich einfach aus der schon bekannten Übertragungsfunktion $h_{1,F}^E(\omega, a)$ berechnen.

$$Z_{cell}(\omega) = \frac{\bar{V}_E(\omega)}{\bar{I}_{Ox}(\omega, a)} = \frac{\bar{V}_E(\omega)}{i\omega c_{Ox} \int_{A_{JM}} \bar{V}_{JS}(\omega, a) dA} = \frac{1}{i\omega c_{Ox} A_{JM} \langle h_{1,F}^E(\omega, a) \rangle} \quad (D.16)$$

Einsetzen von Gleichung D.15 und Gleichung D.16 in Gleichung D.14 ergibt:

$$h_{3,F}^E(\omega, a) = \frac{h_{1,F}^E(\omega, a)}{1 + i\omega \left(\frac{c_{Ox2}}{g_{Bad}} + \frac{c_{Ox}}{g_{Bad}} \langle h_{1,F}^E(\omega, a) \rangle \right)} \quad (D.17)$$

wobei $g_{Bad} = 1/(R_{Bad} A_{JM}) = G_{Bad}/A_{JM}$ und $c_{Ox2} = C_{Ox2}/A_{JM}$ ist. Nach Berechnung des Mittelwertes $\langle h_{1,F}^E(\omega, a) \rangle$ analog der Herleitung von $\langle U(\omega, a) \rangle$ in Kapitel D.1 und einsetzen in Formel D.17 folgt:

$$h_{3,F}^E(\omega, a) = \frac{aI_0(\gamma a_J) - bI_2(\gamma a_J) + cI_0(\gamma a)}{dI_0(\gamma a_J) - eI_2(\gamma a_J)} \quad (D.18)$$

mit:

$$\begin{aligned}
 a &= g_{Bad} l_J (l_F + \beta l_J) \\
 b &= \beta g_{Bad} l_J^2 \\
 c &= g_{Bad} l_O (l_F + \beta l_J) \\
 d &= (g_{Bad} + l_O + i\omega c_{Ox2}) (l_J + l_O) (l_F + \beta l_J) \\
 e &= l_F l_O^2 + \beta l_J [g_{Bad} l_J + l_O (l_J + l_O) + l_J i\omega c_{Ox2}]
 \end{aligned} \tag{D.19}$$

Anhang E

Materialien

Geräte:

Gerätename	Typ	Hersteller
DMZ-Universal Puller	0704051069108	Zeitz Instruments, Augsburg
Flüssigkeitslichtleiter	LLG 5 VIS	Linos Photonics, Göttingen
Frame-Grabber-Karte	PC Eye 2	ELTEC Electronic, Mainz
Funktionsgenerator 1	33120A	Hewlett-Packard, Loveland, USA
Funktionsgenerator 2	8904A	Hewlett-Packard, Loveland, USA
GPIB-Karte	PCI-GPIB	National Instruments, Austin, USA
Heizlüfter	Hotwind S, 9C1	Leister, Kägiswil, Schweiz
Lichtquelle	LQX 1800	Linos Photonics, Göttingen
Lock-In-Verstärker	SR830 DSP	Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA
Messkarte 1	AT-MIO-16E-2	National Instruments, Austin, USA
Messkarte 2	AT-MIO-64E-2	National Instruments, Austin, USA
Messkarte 3	AT-MIO-16DE-10	National Instruments, Austin, USA
Mikroinjektor	Transjector 5246	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Mikromanipulator fein	InjectMan	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Mikromanipulator grob	WR-88	Narishige, Tokyo, Japan
Mikrometer-Spritze	Agla	Burroughs Wellcome & Co, GB
Mikroskop	BX50WI	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop Auflicht-Fluoreszenz-Einrichtung	BX-FLA	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop Objektive	LMPlanFL 10x LUMPlanFL 40x W	Olympus, Tokyo, Japan
Pipetten-Verstärker	SEC-10L	npi electronic, Tamm
Spektrofluorometer	SLM 8100	SLM-Aminco, Rochester, NY, USA
Spektrophotometer	cary 3E	Varian, Palo Alto, USA
Videoschnitt-Karte	miroVIDEO DC30 plus	Pinnacle Systems, Mountain View, USA
Videokamera	HV-C20E/K-S4	Hitachi Denshi, Tokyo, Japan

Chemikalien:

Chemikalie	Produktnr.	Firma
2-(Aminoethyl)-3-amino-propylmethyldimethoxysilan	06667	Fluka, Buchs, Schweiz
Albumin	A-4503	Sigma-Aldrich, Steinheim
Argon	GA 260	Linde Gas, Höllriegelskreuth
BSA, Fraction V	A-4503	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chlorbenzol	814506	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Cholesterol	700000	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dimethyl-dichlorsilan	803452	Merck Eurolab, Darmstadt
DiD	D-307	Molecular Probes, Eugene, USA
DiI	D-282	Molecular Probes, Eugene, USA
DOPC	42492	Fluka, Buchs, Schweiz
DOPME	P-0791	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose (D+)	8337.1000	Merck Eurolab, Darmstadt
KCl	4935	Merck Eurolab, Darmstadt
Methanol p. A.	1.06009.1000	Merck Eurolab, Darmstadt
MK3 (Kleber)	53300	Dr. Osypka, Rheinfelden-Herten,
NaCl	1.06406	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumfluorescein	103992	Merck Eurolab, Darmstadt
PBS Dulbecco's	14040-091	GIBCO, Paisley, Schottland
PMMA	Plexiglas GS	Röhm, Darmstadt
Poly-L-Lysin	P-6516	Sigma-Aldrich, Steinheim
POPC	850457	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Saccharose	1.07653	Merck Eurolab, Darmstadt
Stickstoff 5.0	GA 221	Linde Gas, Höllriegelskreuth
Sylgard	184	Dow Corning, Midland, USA
Tickopur	RP 100	Bandelin Elektronik, Berlin
Toluol	32249	Riedel-de Haen, Seelze
Tris (Trizma Base)	T-8404	Sigma-Aldrich, Steinheim

Reinraumgeräte:

Gerätename	Typ	Firma
Aufdampfanlage	Univex 450	Leybold, Hanau
Bonder	4523A Digital	Kulicke & Sofa, Radfeld, Österreich
Elektronenmikroskop	SM-300	Topcon, Tokyo, Japan
Ellipsometer	SD 2000	Plasmos, München
Hotplate	Thermoplate S	Desaga, Wiesloch
Mask-Aligner	MA4 BSA	Karl Suss, Garching
Nass-Chemie-Bank		Arias, Schwerte
Plasma-Ätzanlage	Plasmalab	Oxford Instruments, Oxon, GB
Profilometer	Dektak 3	Veeco Instruments, Woodbury, USA
Trockenofen	T 6030P	Heraeus Instruments, Hanau
Umluftofen	LUT 6050 LAF	Heraeus Instruments, Hanau

Reinraumchemikalien:

Chemikalie	Produktnr.	Firma
Dia-Entwickler	G282c	AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien
Dia-Fixierer	G333c	AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien
Dias	30PL2x2x.060in.	AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien
Diethylether p.A.	1.00921.1000	Merck Eurolab, Darmstadt
Entwickler	HTR-D2	Arch Chemicals, Zwijndrecht, Belgien
Ethanol p.A.	32205	Riedel-de Haen, Seelze
Polyimid	Probimid 7020	Arch Chemicals, Zwijndrecht, Belgien
Polymer	SU-8-10	MicroChem, Newton, USA
Polymer-Entwickler	XP-SU8	MicroChem, Newton, USA
Rinser	RER 600	Arch Chemicals, Zwijndrecht, Belgien
Schwefelsäure 96%	1.00709.1000	Merck Eurolab, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 31%	1.08552.2500	Merck Eurolab, Darmstadt

Lösungen:

Name	Zusammensetzung
SA-Lösung	300 mM Saccharose
SB-Lösung	300 mM Saccharose, 0.5 mM NaCl
G-Lösung	300 mM Glucose
PA-Lösung	300 mM Glucose, 40 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl, pH 7.4
PB-Lösung	399 mM Glucose, 0.5 mM Tris/HCl, pH 7.4

Literaturverzeichnis

- [Abr74] M. Abramowitz, I. A. Stegun. *Handbook of Mathematical Functions*. Dover Publications, New York, 1974.
- [Alb02] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 4. Ausgabe, 2002.
- [Alt84] C. Altenbach, J. Seelig. Ca^{2+} Binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic-resonance – evidence for the formation of a Ca^{2+} complex with 2 phospholipidmolecules. *Biochemistry*, 23:3913–3920, 1984.
- [Ang86] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discuss.*, 81:303–311, 1986.
- [Ang92] M. I. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon, P. Bothorel. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 89:127–131, 1992.
- [Bai88] J. Bailey, D. Gingell. Contacts of chick fibroblasts on glass: Results and limitations of quantitative interferometry. *J. Cell Sci.*, 90:215–224, 1988.
- [Ban64] A. D. Bangham, R. W. Horne. Negative staining of phospholipids + their structural modification by surface active agents as observed in electron microscope. *J. Mol. Biol.*, 8:660, 1964.
- [Ban95] A. D. Bangham. Surrogate cells or trojan horses – the discovery of liposomes. *Bioessays*, 17:1081–1088, 1995.
- [Ber88] P. Bergveld, A. Sibbald. *Analytical and Biomedical Applications of Ion-Selective Field-Effect Transistors*, Band 23 in *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [Ber90] K. Berndl, J. Kas, R. Lipowsky, E. Sackmann, U. Seifert. Shape transformations of giant vesicles – extreme sensitivity to bilayer asymmetry. *Europhys. Lett.*, 13:659–664, 1990.
- [Bra97] D. Braun, P. Fromherz. Fluorescence Interference-Contrast Microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Appl. Phys. A - Mater. Sci. Process.*, 65:341–348, 1997.
- [Bra00] D. Braun. *Capacitive stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.

- [Bro84] F. Brochard, P.G. de Gennes. Spreading laws for liquid polymer droplets – interpretation of the foot. *J. Phys. Lett. Paris*, 45:L597–L602, 1984.
- [Bro91] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew. *Taschenbuch der Mathematik*. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, 25. Ausgabe, 1991.
- [Buc98] P. Bucher, A. Fischer, P. L. Luisi, T. Oberholzer, P. Walde. Giant vesicles as biochemical compartments: The use of microinjection techniques. *Langmuir*, 14:2712–2721, 1998.
- [Bur94] J.S. Burmeister, G.A. Truskey, W.M. Reichert. Quantitative analysis of Variable-Angle Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts. *J. Microsc.*, 173:39–51, 1994.
- [BW00a] F. Brochard-Wyart, A. Buguin, P. Martin, A. Martin, O. Sandre. Adhesion of soft objects on wet substrates. *J. Phys. - Condes. Matter*, 12:A239–A244, 2000.
- [BW00b] F. Brochard-Wyart, P.G. de Gennes, O. Sandre. Transient pores in stretched vesicles: Role of leak-out. *Physica A*, 278:32–51, 2000.
- [BZ94] R. Bar-Ziv, E. Moses. Instability and pearling states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Phys. Rev. Lett.*, 73:1392–1395, 1994.
- [Cur64] A. S. G. Curtis. Mechanism of adhesion of cells to glass – study by Interference Reflection Microscopy. *J. Cell Biol.*, 20:199–215, 1964.
- [Dam86] K. H. Dambacher, P. Fromherz. Reversible bilayer junction of lipid monolayers – free mono-bi-monolayer contact. *Biochim. Biophys. Acta*, 861:331–336, 1986.
- [Döb97] H. G. Döbereiner, E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, M. Wortis. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 55:4458–4474, 1997.
- [Döb98] H. G. Döbereiner, A. Lehmann, W. Goedel, O. Selchow, R. Lipowsky. Materials science of the cell. In B. Mulder, V. Vogle, C. Schmidt, Editoren, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, Band 489, Seite 101, 1998.
- [Döb00] H. G. Döbereiner. Properties of giant vesicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 5:256–263, 2000.
- [Deu76] H. J. Deuling, W. Helfrich. Curvature elasticity of fluid membranes – catalog of vesicle shapes. *J. Phys. Paris*, 37:1335–1345, 1976.
- [dG85] P. G. de Gennes. Wetting: Statistics and dynamics. *Rev. Mod. Phys.*, 57:827–63, 1985.
- [Dim88] D. S. Dimitrov, M. I. Angelova. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 19:323–336, 1988.
- [Dim97] M. N. Dimitrova, H. Matsumura. Protein-induced leakage and membrane destabilization of phosphatidylcholine and phosphatidylserine liposomes. *Colloid Surf. B - Biointerfaces*, 8:287–294, 1997.

- [Eva84a] E. Evans, M. Metcalfe. Free-energy potential for aggregation of giant, neutral lipid bilayer vesicles by van der Waals attraction. *Biophys. J.*, 46:423–426, 1984.
- [Eva84b] E. Evans, M. Metcalfe. Free-energy potential for aggregation of mixed phosphatidylcholine phosphatidylserine lipid vesicles in glucose polymer (dextran) solutions. *Biophys. J.*, 45:715–720, 1984.
- [Fro88] P. Fromherz. Self-organization of the fluid mosaic of charged channel proteins in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:6353–6357, 1988.
- [Fro91] P. Fromherz, A. Offenhausser, T. Vetter, J. Weis. A neuron-silicon junction – a *Retzius* cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252:1290–1293, 1991.
- [Fro95a] P. Fromherz. Selffocusing of ion channels in cell-adhesion. *Phys. Rev. E*, 52:R1303–R1305, 1995.
- [Fro95b] P. Fromherz, A. Stett. Silicon-neuron junction – capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Phys. Rev. Lett.*, 75:1670–1673, 1995.
- [Fro99] P. Fromherz, V. Kießling, K. Kottig, G. Zeck. Membrane transistor with giant lipid vesicle touching a silicon chip. *Appl. Phys. A - Mater. Sci. Process.*, 69:571–576, 1999.
- [Fro02] P. Fromherz. Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chem. Phys. Chem.*, 3:276–284, 2002.
- [Gle03] R. Gleixner. *Fluoreszenzspektroskopische Sonden im Zell-Silizium-Kontakt*. Doktorarbeit in Vorbereitung, Technische Universität München, geplant für 2003.
- [Ham81] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391:85–100, 1981.
- [Hie97] P. C. Hiemenz, Rajagopalan R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, New York, 3. Ausgabe, 1997.
- [Hig87] K. Higashi, S. Suzuki, H. Fujii, Y. Kirino. Preparation and some properties of giant liposomes and proteoliposomes. *J. Biochem. (Tokyo)*, 101:433–440, 1987.
- [Hil02] H. Hillebrandt, M. Tanaka, E. Sackmann. A novel membrane charge sensor: Sensitive detection of surface charge at polymer/lipid composite films on indium tin oxide electrodes. *J. Phys. Chem. B*, 106:477–486, 2002.
- [Hot84] H. Hotani. Transformation pathways of liposomes. *J. Mol. Biol.*, 178:113–120, 1984.
- [Hot99] H. Hotani, F. Nomura, Y. Suzuki. Giant liposomes: From membrane dynamics to cell morphogenesis. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 4:358–368, 1999.

- [Izz76] C. S. Izzard, L. R. Lochner. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: An interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.*, 21:129–59, 1976.
- [Jen01] M. Jenkner, B. Müller, P. Fromherz. Interfacing a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapses. *Biol. Cybern.*, 84:239–249, 2001.
- [Kar00] M. Karlsson, K. Nolkrantz, M. J. Davidson, A. Stromberg, F. Ryttsen, B. Akerman, O. Orwar. Electroinjection of colloid particles and biopolymers into single unilamellar liposomes and cells for bioanalytical applications. *Anal. Chem.*, 72:5857–5862, 2000.
- [Kel88] B. U. Keller, R. Hedrich, W. L. C. Vaz, M. Criado. Single channel recordings of reconstituted ion channel proteins: An improved technique. *Pflugers Arch.*, 411(1):94–100, 1988.
- [Kie99] V. Kießling. *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazellulär angelegten Wechselspannungen*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 1999.
- [Kie00] V. Kießling, B. Müller, P. Fromherz. Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe. *Langmuir*, 16:3517–3521, 2000.
- [Kot00] K. Kottig. *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Lipidvesikeln auf oxidiertem Silizium*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [Käs91] J. Käs, E. Sackmann. Shape transitions and shape stability of giant phospholipid-vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys. J.*, 60:825–844, 1991.
- [Lam96] A. Lambacher, P. Fromherz. Fluorescence Interference-Contrast Microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Appl. Phys. A - Mater. Sci. Process.*, 63:207–216, 1996.
- [Lam02] A. Lambacher, P. Fromherz. Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and Fluorescence Interference-Contrast Microscopy of biomembranes. *J. Opt. Soc. Am. B - Opt. Phys.*, 19:1435–1453, 2002.
- [Lan85] F. Lanni, A. S. Waggoner, D. L. Taylor. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *J. Cell Biol.*, 100:1091–1102, 1985.
- [Las93] D. D. Lasic. *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [Leh11] O. Lehmann. *Die neue Welt der flüssigen Kristalle*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1911.
- [Lip95] R. Lipowsky, E. Sackmann. *Structure and Dynamics of Membranes*. Elsevier, Amsterdam, 1995.

- [Lui00] P. L. Luisi, P. Walde. *Giant Vesicles*. Perspectives in Supramolecular Chemistry. v. 6. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 2000.
- [Mah99] M. P. Maher, J. Pine, J. Wright, Y. C. Tai. The neurochip: A new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *J. Neurosci. Methods*, 87:45–56, 1999.
- [Mat96] L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys. J.*, 70:1112–1121, 1996.
- [Men95a] F. M. Menger, K. D. Gabrielson. Cytomimetic organic chemistry – early developments. *Angew. Chem. Int. Edit*, 34:2091–2106, 1995.
- [Men95b] F. M. Menger, S. J. Lee. Induced morphological changes in synthetic giant vesicles: Growth, fusion, undulation, excretion, wounding, and healing. *Langmuir*, 11:3685–3689, 1995.
- [Men98] F. M. Menger, J. S. Keiper. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:726–732, 1998.
- [Mon72] M. Montal, P. Mueller. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 69:3561–3566, 1972.
- [Mue62] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194:979–, 1962.
- [Nee90] D. Needham, R. S. Nunn. Elastic-deformation and failure of lipid bilayer-membranes containing cholesterol. *Biophys. J.*, 58:997–1009, 1990.
- [Ng95] B. Ng, P. H. Barry. The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *J. Neurosci. Methods*, 56(1):37–41, 1995.
- [Nic95] J. G. Nicholls. *Vom Neuron zum Gehirn*. G. Fischer, Stuttgart, 1995.
- [NS96] D. A. Noppl-Simson, D. Needham. Avidin-biotin interactions at vesicle surfaces: Adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions. *Biophys. J.*, 70:1391–1401, 1996.
- [Ost98] G. Ostertag. *Stark-Spektroskopie von Hemicyaninfarbstoffen in viskoser polarer Matrix*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 1998.
- [Pre92] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2. Ausgabe, 1992.
- [Pri00] A. A. Prinz, P. Fromherz. Electrical synapses by guided growth of cultured neurons from the snail *Lymnaea stagnalis*. *Biol. Cybern.*, 82:L1–L5, 2000.

- [Rai98] R. Raiteri, B. Margesin, M. Grattarola. An atomic force microscope estimation of the point of zero charge of silicon insulators. *Sens. Actuator B - Chem.*, 46:126–132, 1998.
- [Räd92] J. O. Rädler, E. Sackmann. Vesicle-substrate interaction studied by Reflection Interference Contrast Microscopy. In R. Lipowsky, D. Richter, K. Kremer, Editoren, *The structure and conformation of amphiphilic membranes: Proceedings of the international workshop on amphiphilic membranes*, Seiten 158–161. Springer, 1992.
- [Räd95a] J. Rädler, H. Strey, E. Sackmann. Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir*, 11:4539–4548, 1995.
- [Räd95b] J. O. Rädler, T. J. Feder, H. H. Strey, E. Sackmann. Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Phys. Rev. E*, 51:4526–4536, 1995.
- [Sac96] E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science*, 271:43–48, 1996.
- [San99] O. Sandre, L. Moreaux, F. Brochard-Wyart. Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96:10591–10596, 1999.
- [Sei97] U. Seifert. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv. Phys.*, 46:13–137, 1997.
- [Sin72] S. J. Singer, G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731, 1972.
- [Str01] B. Straub, E. Meyer, P. Fromherz. Recombinant Maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing. *Nat. Biotechnol.*, 19:121–124, 2001.
- [Sve89] S. Svetina, B. Zeks. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur. Biophys. J.*, 17:101–111, 1989.
- [Sze81] S. M. Sze. *Physics of Semiconductor Devices*. John Wiley and Sons, New York, 2. Ausgabe, 1981.
- [Tan82] D. W. Tank, C. Miller, W. W. Webb. Isolated patch recording from liposomes containing functionally reconstituted chloride channels from *Torpedo-Californica Electropax*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79:7749–7753, 1982.
- [Tru92] G. A. Truskey, J. S. Burmeister, E. Grapa, W. M. Reichert. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM). II. Topographical mapping of relative cell/substratum separation distances. *J. Cell Sci.*, 103:491–9, 1992.
- [Vas99] S. Vassanelli, P. Fromherz. Transistor probes local potassium conductances in the adhesion region of cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 19:6767–6773, 1999.
- [Vas02] S. Vassanelli, V. Kießling. Extracellular voltage modulates ionic channels along a *Xenopus* oocyte-silicon cleft. *Biophys. J.*, 82:626a, 2002.

- [Wei94] R. Weis. *Neuron-Transistor-Kopplung: Bestimmung der elektrischen Übertragungseigenschaften*. Doktorarbeit, Universität Ulm, 1994.
- [Wei96] R. Weis, B. Müller, P. Fromherz. Neuron adhesion on a silicon chip probed by an array of field-effect transistors. *Phys. Rev. Lett.*, 76:327–330, 1996.
- [Wei97] R. Weis, P. Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Phys. Rev. E*, 55:877–889, 1997.
- [Wei99] M. G. Weller, A. J. Schuetz, M. Winklmeier, R. Niessner. Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal. Chim. Acta*, 393:29–41, 1999.
- [Wic96] R. Wick, M. I. Angelova, P. Walde, P. L. Luisi. Microinjection into giant vesicles and light microscopy investigation of enzyme-mediated vesicle transformations. *Chem. Biol.*, 3:105–111, 1996.
- [Win96] W. Wintz, H. G. Döbereiner, U. Seifert. Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, 33:403–408, 1996.
- [Zec00] G. Zeck. *Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [Zec01] G. Zeck, P. Fromherz. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98:10457–10462, 2001.
- [Zec03] G. Zeck, P. Fromherz. Repulsion and attraction by extracellular matrix protein in cell adhesion studied with nerve cells and lipid vesicles on silicon chips. *Langmuir*, 19:1580–1585, 2003.
- [Zil87] A. Zilker, H. Engelhardt, E. Sackmann. Dynamic Reflection Interference Contrast (RIC-) Microscopy – a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic-moduli. *J. Phys. Paris*, 48:2139–2151, 1987.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. P. Fromherz für die Möglichkeit, dieses interessante und herausfordernde Thema zu bearbeiten, seine Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit,

Herrn Dr. G. Hübner für die Unterstützung bei chemischen Problemstellungen,

Herrn Dr. V. Kießling für die rasche Hilfe bei Problemen und Fragen zu seiner Apparatur,

Herrn M. Merz, Herrn M. Ulbrich, Herrn R. Gleixner und *Herrn M. Hinner* für viele hilfreiche Diskussionen,

Herrn H. Vogl für die Rettung aus allen Notlagen im Reinraum,

Herrn W. Emmert, Herrn R. Pabst und *Herrn W. Wagner* für die schnelle Verwirklichung etlicher Spezialanfertigungen

und allen Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut für Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mir durch ihre vielseitige Unterstützung meine Ausbildung und die Promotion ermöglicht haben sowie Annette für ihre liebevolle Begleitung dieser Arbeit.