

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Neuro- und Membranphysik

**Zell-Silizium-Synapse:
Beobachtung der Ausschüttung einzelner Vesikel
chromaffiner Zellen mit Feldeffekttransistoren**

Janosch Peer Lichtenberger

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. Roland Netz
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Andreas Bausch

Diese Dissertation wurde am 03.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 15.11.2005 angenommen.

Zusammenfassung

Die Aktivität neuronaler Netze kann durch Feldeffekttransistoren mit hoher Auflösung nicht invasiv verfolgt werden. Bis jetzt war die Messung mit Feldeffekttransistoren auf elektrische Signale der Zellen beschränkt. Ein weiterer wichtiger Bereich der neuronalen Informationsverarbeitung, der chemisch an speziellen Stellen, den Synapsen, durch das Ausschütten von Vesikeln stattfindet, wurde mit Feldeffekttransistoren bislang nicht untersucht. Diese Arbeit zeigt, daß es möglich ist, die Ausschüttung von Vesikeln einer Zelle mit dem Feldeffekttransistor zu messen.

Neuroendocrine Zellen aus der Rindernebenniere, die ein etabliertes Modellsystem für die synaptische Übertragung sind, werden auf der Oberfläche eines linearen Arrays von Feldeffekttransistoren kultiviert.

Unter Stimulation der Zellen mißt der Transistor Signale, welche mit der Referenzmethode zum Detektieren der Vesikel, der Amperometrie, verglichen werden. Dieser Vergleich zeigt, daß der Transistor die Exozytose einzelner Vesikel mißt und daß fast alle ausgeschütteten Vesikel vom Transistor detektiert werden.

Im Gegensatz zu den Signalen der Amperometrie besitzen die Signale der Transistoren eine starke Abhängigkeit von der extrazellulären Pufferkonzentration; ein Indiz, daß die Transistor-signale auf der Ausschüttung von Protonen durch die Vesikel beruhen. Dieses wird durch das Zerstören der granularen pH-Gradienten mit der Pore Nigericin sowie den Carrier Valinomycin bestätigt. Während die amperometrischen Messungen von diesen Substanzen unbeeinflusst bleiben, erlöschen die Signale im Transistor nach ihrem Wirken fast gänzlich.

Mittels Transistoren der Gategröße von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ und eines Abstandes von $4.6 \mu\text{m}$ in einer linearen Anordnung ist es möglich, mit mehreren Transistoren die Exozytose unterhalb einer Zelle zu messen. So kann eine räumliche Karte der Ausschüttung, die physiologisch an bestimmte Stellen in der Zelle gekoppelt ist, erstellt werden.

Ein Modell der Transistorsignale berücksichtigt die Freisetzung von Protonen in den engen Spalt zwischen Zelle und Transistoroberfläche, ihre Diffusion entlang des Spaltes und ihre Reaktion mit den durch den Transistor bereitgestellten dissoziierten Oberflächengruppen. Ein Vergleich des Modells mit dem Experiment zeigt, daß die Transistorsignale nur in dem Kontext der Komplexität der Vesikelfusion und des Zerfalls der granularen Matrix erklärt werden können.

Da eine Vielzahl an Vesikeln eine erhöhte Protonenkonzentration besitzt, ist in dieser Arbeit nicht nur eine neue fundamentale Kopplung einer Zelle an einen Feldeffekttransistor und damit ein neuartiges hybrides System experimentell und theoretisch erstellt, sondern es wird auch eine neue Methode zum Detektieren der Vesikelausschüttung begründet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Das System	5
2.1	Grundlagen der Exozytose	5
2.2	Die chromaffine Zelle als synaptisches Modellsystem	7
2.3	Stimulation der Zellen	8
2.4	Struktur und Inhalt chromaffiner Granulen	8
2.5	Der Elektrolyt-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor	9
2.6	Oxide in wäßrigen Lösungen	12
2.7	Protonendiffusion in gepufferten Systemen	15
2.8	Gleichungssystem zur Modellierung des Zelle-Transistor-Kontakts	18
3	Zell-Silizium-Synapse	21
3.1	Amperometrie	21
3.2	Messung von Exozytose mit Transistoren	23
3.3	Zonen der Exozytose: Transistormessung mit einem Raster von $4.6 \mu\text{m}$	26
4	Die Protonen als Träger der Exozytose-Silizium-Kopplung	31
4.1	Dynamik der Exozytose: Amperometrie	31
4.2	Der Einfluß der extrazellulären Pufferkonzentration auf das Transistorsignal	33
4.3	Vergleich der charakteristischen Signalparameter	36
4.4	Das Auflösungsvermögen der Transistoren	38
4.5	Equilibrieren des ΔpH der Vesikel durch Poren	39
4.6	Wirkung von Ammoniumchlorid	44
5	Modellierung der Transistorsignale	49
5.1	Systemparameter	49
5.2	Grundlegende Modelle	52
5.3	Die Fusionsdynamik: auf der Suche nach dem Quellterm	58
6	Zusätzliche Experimente	65
6.1	Ligandengesteuerte Exozytose	65
6.2	Messungen auf einem 128×128 Transistorarray	66
6.3	Elektrische Kopplung chromaffiner Zellen an einen Transistor	68

A	Anhang	71
A.1	Potentialabfälle an einer Elektrolyt-Oxid-Silizium-Struktur	71
A.2	Präparation chromaffiner Zellen	73
A.3	Zellkultur	74
A.4	Medien	74
A.5	Meßstand	75
A.6	Meßkammer	76
A.7	Amperometrie	77
A.8	Herstellung und Justage der θ -Tubes	77
A.9	Simulation	77

Kapitel 1

Einleitung

In allen höheren Lebewesen findet die Informationsverarbeitung innerhalb des Nervensystems und seines komplexen Netzwerkes aus einzelnen Neuronen statt. Dabei laufen die Informationen in Form von elektrischen Impulsen, den Aktionspotentialen, über die Zellen und werden an den Schaltzentralen zwischen den Zellen, den Synapsen, verarbeitet und an andere Zellen weitergeleitet.

In der modernen Gesellschaft läuft die Informationsverarbeitung größtenteils über siliziumbasierte Computer. Da diese mit dem Feldeffekttransistor als Grundbaustein ebenfalls elektrisch arbeiten und die Größenordnung der Feldeffekttransistoren gleich der einer Nervenzelle ist, liegt es nahe, ein hybrides System aus diesen Bausteinen, Transistor und Nervenzelle, zu gestalten. Einerseits eröffnen sich eine Vielzahl von interessanten Fragestellungen über den Informationsaustausch zwischen den Systemen und über das System als Ganzes. Andererseits wird für ein tieferes Verständnis des Nervensystems eine schnelle und skalierbare Methodik benötigt, die seiner Komplexität und seinem immensen Informationsfluß Sorge trägt. Mit der ausgereiften Siliziumtechnologie steht uns eine solche zur Verfügung.

Während die Aktionspotentiale hauptsächlich der Weiterleitung der Information dienen, findet ihre eigentliche Verarbeitung und Bewertung an den Synapsen statt. Beides geschieht über die Ausschüttung von Neurotransmittern. Das einlaufende Aktionspotential löst das Verschmelzen von Vesikeln mit der Zellmembran aus, wodurch Neurotransmitter aus den Vesikeln freigesetzt werden. Diese Neurotransmitter diffundieren über den engen Spalt von der presynaptischen Zelle zu speziellen Rezeptoren in der gegenüberliegenden Membran der postsynaptischen Zelle und können damit eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen auslösen. Dabei wird die benötigte hochgradige Regulierung durch den Einsatz verschiedener Neurotransmitter und Rezeptoren sowie durch deren unterschiedliche Wirkung auf die Zelle erreicht.

Bis jetzt haben sich die Untersuchungen auf den elektrischen Signaltransfer sowie auf die elektrischen Eigenschaften der Schnittstelle zwischen Zellen und Feldeffekttransistoren beschränkt und die Möglichkeit des Austausches chemischer, synaptischer Signale blieb unbeachtet. Diese Lücke wird in dieser Arbeit geschlossen. Die Abbildung 1.1 zeigt ein Schema des betrachteten Systems.

Es werden Zellen auf der Oberfläche eines Elektrolyt-Oxid-Silizium Feldeffekttransistors kultiviert. Diese Zellen enthalten Vesikel, welche unter geeigneter Stimulation mit der Zellmembran verschmelzen und ihren Inhalt freisetzen. Zwischen der Zelle und der isolierenden Oxidoberfläche des Transistors befindet sich ein Spalt, der mit Extrazellulärlösung gefüllt ist. Wird der Vesikelinhalt in den Spalt zwischen der Zellmembran und dem Transistor ausgeschüttet, diffundieren die Inhaltsstoffe entlang des Spaltes zwischen Siliziumdioxid der Oberfläche und schließlich in das die Zelle umgebende Bad.

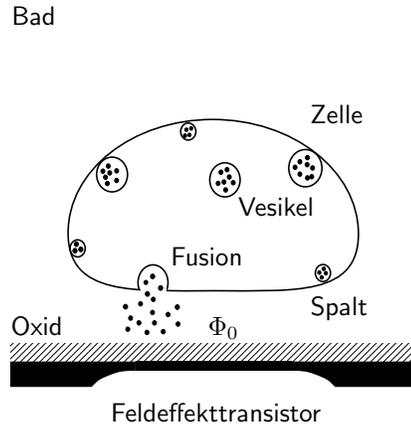


Abbildung 1.1: Das Zell-Chip-System. Zellen, die Vesikel ausschütten können, werden auf Elektrolyt-Oxid-Feldeffekttransistorstrukturen kultiviert. Unter Stimulation fusionieren Vesikel der Zelle mit der Zellmembran; der Vesikelinhalt wird ausgeschüttet. Findet die Ausschüttung in den kleinen Spalt zwischen Siliziumdioxid und der Zellmembran statt, diffundieren die freigesetzten Stoffe entlang des Spaltes zwischen Zelle und Gateoxid und können durch Bindung oder durch Abschirmung das Oberflächenpotential ϕ_0 und damit die Meßgröße eines Feldeffekttransistors verändern. Die kultivierten Zellen besitzen einen Durchmesser von ca. $15 \mu\text{m}$, der Spalt ist ungefähr 50 nm eng.

Die Oberfläche der Transistoren, sei es wie in dieser Arbeit Siliziumdioxid, oder auch eines der vielen anderen in der Halbleitertechnik benutzten Isolationsoxide, bildet in physiologischen Extrazellulärlösung Gruppen, die als ein potentieller Elektrolyt dissoziieren. Für Siliziumdioxid sind dies Silanolgruppen, welche hauptsächlich mit den Protonen der Lösung reagieren. Damit ist der Dissoziationsgrad der Oberfläche und ihre Oberflächenladung von der Protonenkonzentration, bzw. dem pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig.

Findet die Exozytose, d.h. die Vesikelfusion, auf dem Gate, dem sensitiven Bereich eines Transistors statt, so binden die zusammen mit den Neurotransmittern freigesetzten Protonen des Vesikels an die dissoziierten Oberflächengruppen. Damit wird die Oberflächenladung und mit ihr das Oberflächenpotential variiert und als Signal von dem Feldeffekttransistor detektiert.

Experimentell wird das Signal auf die hohe Konzentration an Protonen innerhalb der Vesikel zurückgeführt, wodurch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf den benutzten Zelltyp beschränkt bleiben. In der Natur ist es weit verbreitet, daß Vesikel über einen Protonengradienten mit Inhaltsstoffen über ihre Membran beladen werden [Glo00]. Also eignet sich die Methode zum Messen der Exozytose für eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen.

Wegen der weit fortgeschrittenen Siliziumtechnologie lassen sich die Transistoren auf sehr kleinem Raum herstellen und es ist möglich, die Vesikelausschüttung unter einer Zelle durch mehrere Transistoren räumlich aufzulösen (Abb. 1.2).

Als Methode zum Messen von Exozytose ist es relevant, inwiefern die gemessenen Transistor-signale mit den Messungen anderer etablierten Methoden zur Detektion von Exozytose übereinstimmen und was sie unterscheidet. Transistoren besitzen eine hohe zeitliche Auflösung, können durch ihre Bauart bedingt auch eine sehr hohe räumliche Auflösung erreichen, sind relativ einfach in der Anwendung und nichtinvasiv. Hierdurch hebt sich das Messen der Vesikelausschüttung mit einem Feldeffekttransistor von den etablierten Methoden ab. Von der Amperometrie, bei der die vom Vesikel freigesetzten Stoffe an einer Kohlefaser oder an Goldelektroden elektrisch umgesetzt werden, die dadurch auf oxidierbare bzw. reduzierbare Stoffe beschränkt ist, von der Patch-

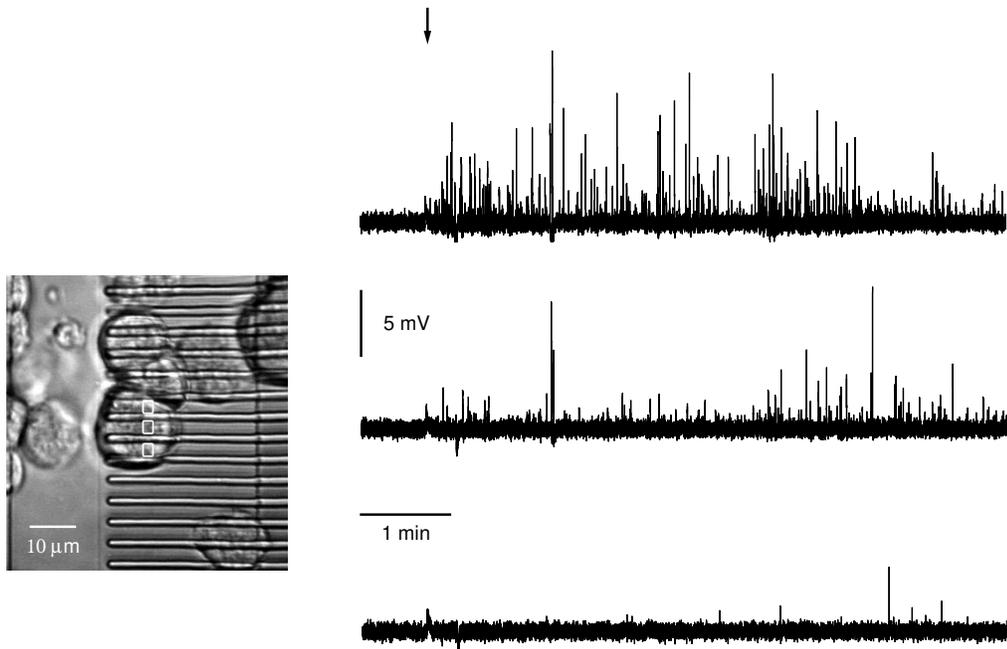


Abbildung 1.2: Ortsaufgelöste Messung der Vesikelausschüttung an einer Zelle mit Feldeffekttransistoren. Zum markierten Zeitpunkt (↓) wurde anhaltende Vesikelausschüttung eingeleitet, die Signale der weiß gerahmten Transistoren sind rechts dargestellt.

Clamp-Technik, die invasiv ist und beim Messen von Exozytose keine sehr hohe Zeitauflösung hat, sowie den optischen Methoden, die eine sehr hohe räumliche, aber nur eine mäßige zeitliche Auflösung besitzen.

Der Feldeffekttransistor ist zur Messung der Vesikelausschüttung schon jetzt eine Alternative zu den etablierten Methoden.

In dieser Arbeit ist zudem eine weitere fundamentale Schnittstelle zwischen einem biologischen System und einem Computerchip verwirklicht. Diese hybride Struktur aus einer Zelle und einem Feldeffekttransistor verhält sich wie eine biologische Synapse. Die presynaptische, auf dem Feldeffekttransistor kultivierte Zelle schüttet unter Stimulation Vesikel aus, die bei der Exozytose freigesetzten Protonen stellen den Transmitter dar und der Transistor übernimmt die Rolle der postsynaptischen Zelle; es ist eine Zell-Silizium-Synapse.

Kapitel 2

Das System

Zunächst soll eine kurze Einführung in die Biologie des Vesikelausstoßes und dessen Kreislaufes gegeben werden. Die chromaffine Zelle, die eine zentrale Rolle in dieser Arbeit einnimmt, wird vorgestellt. Dann betrachten wir einen Feldeffekttransistor, die Oxidoberfläche eines Transistors in wäßriger Lösung, ihre Oberflächenladung und ihr Oberflächenpotential als wichtige Meßgröße. Schließlich behandeln wir die Diffusion innerhalb des Spaltes und weil das Signal im Transistor auf die Protonen des Vesikels zurückgeführt wird, gilt eine besondere Aufmerksamkeit der Protonendiffusion unter dem Einfluß von Puffern.

2.1 Grundlagen der Exozytose

Informationsverarbeitung innerhalb des neuronalen Systems findet hauptsächlich mittels chemischer Botenstoffe, der Neurotransmitter, an speziellen sehr komplex regulierten Stellen, den Synapsen, statt. Die Neurotransmitter sind in synaptischen Vesikeln im presynaptischen Terminal an speziellen Orten gespeichert und werden ausgeschüttet, wenn eine elektrische Erregung des presynaptischen Terminals durch ein Aktionspotential die Membranfusion des synaptischen Vesikels mit der Plasmamembran auslöst. Die freigesetzten Neurotransmitter stimulieren daraufhin Rezeptoren in den postsynaptischen Zellen. Damit ist die Information von der pre- zu der postsynaptischen Zelle übertragen worden. Eine Schlüsselrolle in der Freisetzung der Neurotransmitter spielt die Exozytose, das Verschmelzen der Membran des synaptischen Vesikels mit der presynaptischen Plasmamembran. Dieser Prozeß ist stark calciumabhängig und findet statt, wenn Calcium durch die bei der Erregung geöffneten Calciumkanäle in die Zelle hineinströmt. Nachdem die Exozytose stattgefunden hat, werden Vesikel via Endozytose, die Inkorporierung von Membran, wieder dem Kreislauf zugeführt, welcher sich damit schließt.

2.1.1 Der synaptische Vesikelkreislauf

Ausgangspunkt des synaptischen Vesikelkreislaufs ist die Aufnahme von Neurotransmittern in die Vesikel. Dieser Prozeß findet durch spezielle Transporterproteine statt. Wichtig hierbei ist die membranständige Protonenpumpe, die für einen niedrigeren pH-Wert, das bedeutet eine erhöhte Protonenkonzentration innerhalb des Vesikels, und ein damit verbundenes elektrochemisches Potential über die Vesikelmembran sorgt. Während die Pumpe direkt Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht, liefert dieser elektrochemische Gradient die Energie für die Aufnahme der Neurotransmitter. Diese Aufnahme von Neurotransmittern über einen Protonengradienten ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, da als Resultat hiervon die Vesikel sehr vieler unterschiedli-

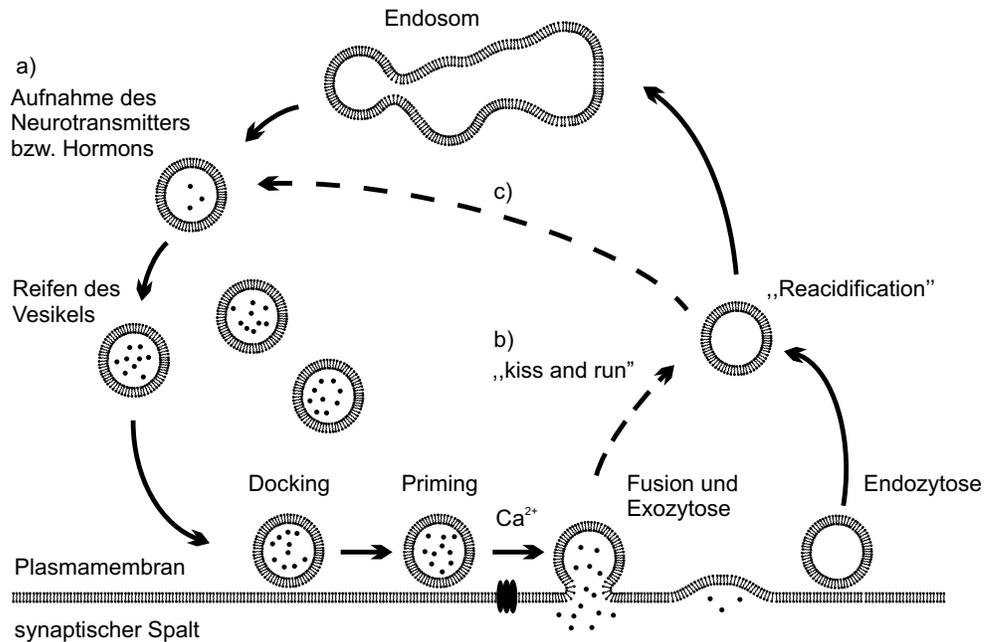


Abbildung 2.1: Der synaptische Vesikelkreislauf: a) Neurotransmitter werden über spezielle Proteine in ein Vesikel aufgenommen. Die Vesikel wandern zu einer aktiven Zone der presynaptischen Membran und lagern sich an diese an. In einer weiteren Reaktion, Priming, binden die Vesikel an die Membran fest und werden so für die Exozytose vorbereitet. Während einer Membrandepolarisation strömt Calcium durch spannungsabhängige Kanäle in die Zelle ein und löst das Verschmelzen der Vesikel- mit der Plasmamembran aus: der Neurotransmitter wird freigesetzt. b) Manchmal verschmelzen die Membranen nicht vollständig und es bildet sich vorübergehend eine Pore, durch die der Inhalt freigesetzt wird; ein Mechanismus, der als „kiss and run“ bezeichnet wird. Ansonsten wird die Membran bei der Endozytose inkorporiert und die membranständigen Protonenpumpen bauen wieder ein elektrochemisches Potential für Protonen auf, welches zur erneuten Aufnahme der Neurotransmitter dient. Entweder fusionieren die Vesikel mit einem Endosom und sie werden dort mit neuen Proteinen aufgefüllt und von alten Proteinen befreit oder sie nehmen direkt frische Neurotransmitter auf (c) (modifiziert, nach [Sud04]).

chen Zelltypen einen sauren Inhalt besitzen [Glo00].

Nachdem die Neurotransmitter aufgenommen worden sind, werden sie, wenn nötig, teilweise im sauren Milieu des Vesikels enzymatisch umgesetzt; die Vesikel reifen und werden zu den aktiven Zonen der presynaptischen Plasmamembran, den „release sites“, transportiert. Hier lagern sich die Vesikel an, sie docken fest und werden in einem ATP-abhängigen Schritt für die Exozytose vorbereitet. Schließlich löst durch spannungsabhängige Kanäle einströmendes Calcium die komplette Verschmelzung der Membranen in einer sehr schnellen Reaktion aus.

Nach der Exozytose werden die Vesikel per Endozytose wieder inkorporiert. Die abgeschnürten Vesikel füllen sich entweder sofort mit Neurotransmittern auf, oder sie fusionieren mit einem Endosom und werden dort für einen neuen Kreislauf vorbereitet.

2.2 Die chromaffine Zelle als synaptisches Modellsystem

In dieser Arbeit wird nicht mit Neuronen sondern mit chromaffinen Zellen gearbeitet. Sie werden als primäre Kultur aus dem Mark der Nebennieren von Rindern präpariert (A.2). Ihren Namen verdanken die Zellen Alfred Kohn (1867-1959), der sie 1902 aufgrund einer Reaktion mit Chromsalzen und einer daraus resultierenden Braunfärbung so benannte [Koh02, Sul05].

Diese Zellen werden benutzt, da ihre Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 350 nm um einen Faktor sieben größer sind als die von Neuronen. Weil auch die Amperometrie bei diesen Zellen anwendbar ist, kann die Exozytose dieser Zellen mit allen gängigen Methoden zur Messung der Vesikelausschüttung untersucht werden. Deshalb ist die Exozytose bei diesen Zellen am besten von allen Zelltypen charakterisiert.

Die Zellen haben einen neuronalen Ursprung und sind deshalb mit Nervenzellen eng verwandt. Es zeigte sich, daß die an der Exozytose beteiligten Proteine der Neurone auch in diesen Zellen die Fusion von Vesikeln regulieren und auslösen. Daher sind die chromaffinen Zellen ein etabliertes Modellsystem für die synaptische Übertragung.

Die chromaffinen Zellen sind elektrisch erregbar, zeigen unter Stimulation wie Neurone Aktions-

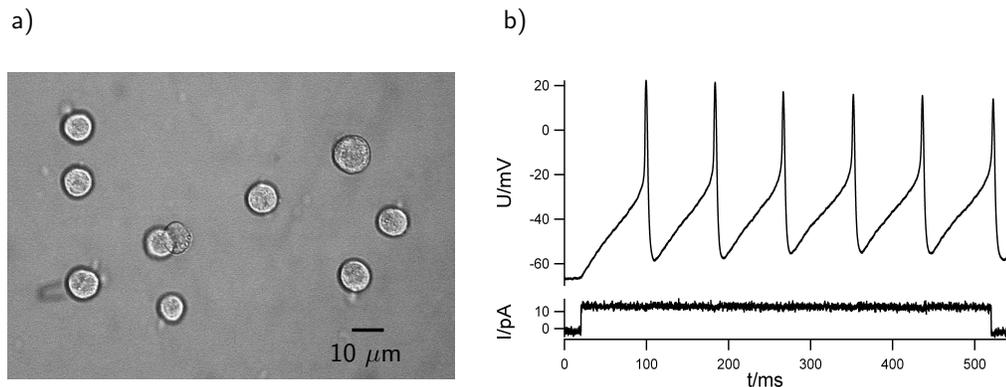


Abbildung 2.2: a) chromaffine Zellen in Kultur. Mit einem Durchmesser von 10 bis $20\ \mu\text{m}$ besitzen sie eine zu Neuronen ähnliche Größe. b) Die Zellen sind elektrisch erregbar: unter Stimulation mit einer Strominjektion (unten) zeigen sie für elektrisch erregbare Zellen typische Aktionspotentiale (oben).

potentiale (Abb. 2.2b), und besitzen Rezeptoren für Neurotransmitter, in diesen Fall Acetylcholin, durch die sie stimuliert werden können. Mit ungefähr 10 bis $20\ \mu\text{m}$ Durchmesser sind sie genauso groß wie Säugetiernervenzellen, besitzen eine sphärische Form, wobei in Kultur ein Teil der Zellen ausdifferenziert und morphologisch eine zu Neuronen ähnliche Gestalt annimmt.

Im Unterschied zu Neuronen werden nicht Neurotransmitter sondern Catecholamine, die Hormone Adrenalin sowie Noradrenalin, ausgeschüttet. Die Hormone wirken nicht synaptisch, sie wirken regulativ über die Blutbahn. Dabei wird Adrenalin vorwiegend von einem Zelltyp, Noradrenalin von einem anderen produziert. Diese beiden Zelltypen stehen im Verhältnis von ungefähr drei zu eins [Aun99, Orn95, Kov00a] und sind morphologisch im Lichtmikroskop nicht zu unterscheiden. Die Zellen enthalten 20.000 bis 30.000 Vesikel und mit ihnen ist etwa ein Drittel und damit ein Großteil des Zellvolumens ausgefüllt, so daß auch dauerhaft stimuliert werden kann, ohne den Pool an Vesikeln völlig zu erschöpfen.

2.3 Stimulation der Zellen

Unter physiologischen Bedingungen ist die Exozytose hochgradig reguliert. Insbesondere bei der Ausschüttung von stark wirkenden Hormonen, wie es in chromaffinen Zellen der Fall ist, ist die Exozytose auf ein niedriges Niveau geregelt. Um eine große Anzahl an Daten zu erhalten wird eine lang anhaltende und starke Stimulation der Zellen benötigt.

Exozytose findet statt, sobald Calcium intrazellulär an bestimmte Proteine bindet. Eine langzeitige Stimulation erfordert deshalb eine dauerhaft erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration. Dieses wird durch eine Inaktivierung der Calciumkanäle und eine hohe zytosolische Pufferkapazität für Calcium verhindert. Für andauernde Stimulation müssen die Calciumkanäle umgangen werden: bei der Dialyse durch ein direktes Austauschen des Zytosols gegen eine calciumhaltige Lösung mit einer Patchpipette; beim Permeabilisieren durch das Einfügen von Calciumporen in die Zellmembran.

Eine weitere und hier benutzte Möglichkeit besteht in der Verwendung von Bariumchlorid. Ein kurzes Applizieren einer mit Bariumchlorid versetzten Extrazellulärlösung ist ausreichend, um anhaltende Vesikelausschüttung auszulösen. Barium blockiert Kaliumkanäle, welche das Ruhepotential einer Zelle bestimmen, und depolarisiert so die Zelle. Daraufhin öffnen sich unter anderem spannungsabhängige Calciumkanäle, durch welche das Barium in die Zelle gelangt und dort wie Calcium agiert, aber weniger als das gepuffert wird. Auch bindet Barium nicht an die Calciumpumpe, sodaß es, einmal in die Zelle hineingelangt, hier wesentlich länger als Calcium wirkt [Von93, Sch94].

2.4 Struktur und Inhalt chromaffiner Granulen

Die Zusammensetzung chromaffiner Granulen ist gut erforscht [Win80]. Ihr Inhalt besteht zum größten Teil aus den Catecholaminen Adrenalin sowie Noradrenalin, deren Konzentration innerhalb des Vesikels ungefähr 550 mM beträgt [Kui89, Tra98]. Desweiteren befinden sich Adenosintriphosphat zu ca. 120 mM, 20-30 mM Calcium, 5 mM Magnesium sowie 20 mM Ascorbat und 20 mM Kalium im Vesikel [Orn88, Joh76, Hai89]. Zudem gesellt sich noch eine Vielzahl von Proteinen und ihren Zwischenprodukten, die wichtigsten unter ihnen sind das Chromogranin A und die Dopamin- β -Hydroxylase in ihrer membrangebundenen und löslichen Form. Der Vesikelinhalt ist mit einem pH-Wert von 5.5 sauer [Joh76, Pot02]. Einige der Inhaltsstoffe haben die Möglichkeit, als Puffer für Protonen zu dienen, welches durch die Dissoziationskonstante, bzw. durch deren negativen Logarithmus zu Basis zehn als pK-Wert beschrieben wird. So hat der Hauptbestandteil Adrenalin eine pK-Wert bei 8.6, ATP besitzt drei pK-Werte, sie sind bei 1.6, 4.0 und bei 6.5 und auch die Proteine können mit einigen Aminosäuren Protonen puffern. Wenn der Inhalt einer Granule durch Exozytose freigesetzt wird, so ändert sich der pH-Wert von 5.5 auf 7.2 und es wird eine Vielzahl von Protonen frei.

Um die gesamte Anzahl an freigesetzten Protonen zu erhalten, wird das Volumen der Granulen benötigt und wir müssen das Volumen eines Vesikels kennen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an chromaffinen Zellschnitten zeigen eine gaußförmige Verteilung der Vesikelradien [Cou68, Wig91]. In neueren Studien werden viele verschiedene Vesikel klassifiziert [Kov00a, Pla97, Kov01], mindestens sieben Klassen sind bekannt. Daher rührt auch die Konfusion über die exakte Radiusverteilung der Vesikel. Oftmals wird der Radius adrenalinhaltiger Zellen größer als der von noradrenalinhaltiger Zellen angegeben [Cou68, Orn95], neue Studien zeigen aber die umgekehrten Verhältnisse [Kov00a, Gla98]. Ein Mittelwert des Radius adrenalinhaltiger Zellen ist 156 nm mit einer Standardabweichung σ von 42 nm [Wig91]. Aus der Gaußverteilung für die Radien ergibt sich eine leicht gestauchte Dichte für die Volumina.

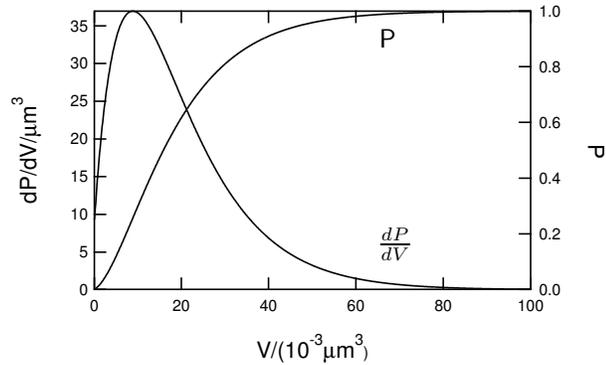


Abbildung 2.3: Die Wahrscheinlichkeitsdichte des Volumens chromaffiner Granulen und deren Verteilung bei einem gaußförmig verteilten Radius. Der mittlere Radius ist hier 156 nm, die Standardabweichung 42 nm.

Die Dichte ist zusammen mit ihrer Verteilungsfunktion in Abbildung 2.3 dargestellt. Simultane Messungen der Zellkapazität und der Ausschüttung von Catecholaminen zeigen für Catecholamine eine vom Vesikelvolumen unabhängige konstante Konzentration innerhalb des Vesikels [Alb97], obwohl dieses für größere Vesikelvolumina nicht ganz zutrifft [Gla98]. Bei konstanter Konzentration der Catecholamine kann aus deren Messung direkt auf die Volumenverteilung, bzw. Radiusverteilung der Vesikel geschlossen werden.

Wichtig ist auch, daß es sich bei dem Vesikelinhalt um ein komplexes Assoziat handelt und die Inhaltsstoffe starken Wechselwirkungen unterliegen. Obwohl die totale Konzentration der Inhaltsstoffe über 750 mM ist, ist das Granulinnere isoosmotisch zu einer 300 mOsm Lösung. Kernspinresonanzmessungen zeigen, daß beinahe die gesamten Catecholamine und das gesamte ATP gelöst sind [Hol86]. Messungen des osmotischen Drucks von Lösungen aus diesen beiden Hauptbestandteilen der Granule decken ihre starke Wechselwirkung auf [Kop82]. Auch Lösungen von ATP allein zeigen starkes nichtideales Verhalten, wobei sowohl Calcium als auch der pH-Wert eine Rolle zu spielen scheinen [Cor90]. Das Chromogranin A, ein großes saures Protein, kann ebenfalls mit ATP und den Catecholaminen interagieren, wie auch die Dopamin- β -Hydroxylase. Viele Bestandteile des Vesikels assoziieren, um mit der Zellflüssigkeit isoosmotisch zu sein, ohne jedoch eine feste Struktur zu bilden. Damit ist die biologische, presynaptische Seite des Systems aus Zelle und Chip beschrieben und wir wenden uns nun der postsynaptischen Seite, dem Transistor, zu.

2.5 Der Elektrolyt-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor

In dieser Arbeit wird mit einem Elektrolyt-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor gearbeitet. Es werden zwei verschiedene Transistorarrays benutzt. Beide bestehen aus 96 linear angeordneten Transistoren, unterscheiden sich aber in den Gategrößen und deren Abständen. Die eine Art hat eine Gatebreite von $20 \mu\text{m}$ und -länge von $2 \mu\text{m}$ bei einem Abstand von $20 \mu\text{m}$, die andere besitzt die Maße von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ bei einem Abstand von $4.6 \mu\text{m}$. Dabei handelt es sich um p-Kanaltransistoren mit einem Gateoxid von 10 nm. Die restliche Oberfläche ist mit einem 400 nm dicken Oxid bedeckt und so gegen den Elektrolyten isoliert. Diese Transistoren wurden an der Technischen Universität Berlin gefertigt [Ren98, Kie00, Wei97]. In Abbildung 2.4 ist der Source-Drain-Strom I_{SD} in Abhängigkeit der Elektrolyt-Sourcespannung V_{AgS} bei verschiedenen

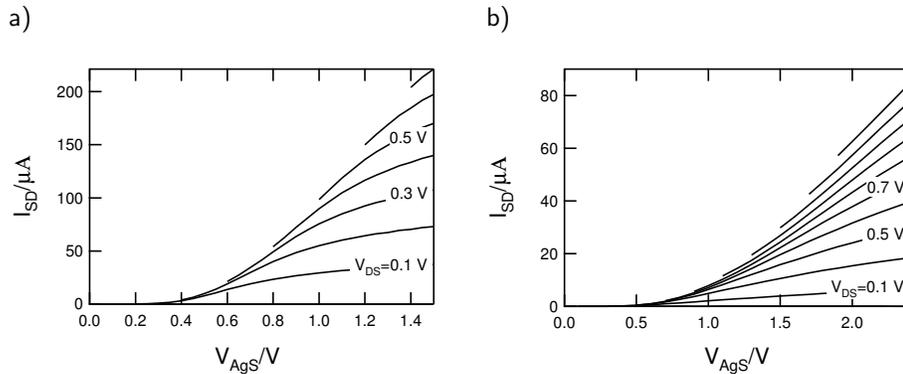


Abbildung 2.4: Exemplarischer Strom-Spannungsverlauf der in dieser Arbeit benutzten Transistorarrays. Aufgetragen ist der Source-Drain-Strom in Abhängigkeit der Elektrolyt-Source-Spannung mit der Drain-Source-Spannung als Parameter. a) Kennlinie des Transistors mit einem $2 \times 20 \mu m$ großen Gatebereich. b) Kennlinien des $2 \times 2 \mu m$ großen Transistors. Die Schwellspannung liegt für beide Transistoren bei ca. 0.3 V.

Drain-Source Spannungen für die in dieser Arbeit benutzten Transistoren aufgetragen. Sie zeigen ein für Feldeffekttransistoren typisches Aussehen.

Über die Funktionsweise von Feldeffekttransistoren gibt es eine Vielzahl an Literatur [Sze85, Pie96], deshalb wird nur auf den für diese Arbeit relevanten Aspekt der Schwellwertverschiebung eingegangen. Es ist ausreichend, wenn wir das der Arbeit zugrunde liegende Meßprinzip vom experimentellen Standpunkt aus an einem Diagramm des inneren Potentials diskutieren und so ein gesamtes, ausuferndes Banddiagramm des Elektrolyt-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor umschiffen.

Zunächst wird davon ausgegangen, daß der Transistor durch geeignet angelegte Spannungen zwischen der Silber/Silberchloridelektrode des Bades und der Sourceleitung V_{AgS} sowie zwischen Source- und Drainleitungen V_{SD} auf einen Arbeitspunkt eingestellt ist und ein Source-Drain-Strom fließt. Auch ist wie normalerweise üblich die Bulkspannung gleich der Sourcespannung. Weiterhin lassen wir die Kontaktierungen des Siliziums mit den Aluminium-, bzw. Kupferkabeln und die Silber/Silberchloridelektrode außer Betracht. An beiden Kontakten ändert sich das innere Potential nur um einen konstanten Betrag. Für die Kontaktierung des Siliziums ist dieses klar, an diesem Kontakt wird während der Messung nichts geändert. Für die Silber/Silberelektrode gilt dieses nur, wenn ihr Redoxsystem während der Messung unverändert bleibt. Dafür muß entweder die Chloridionenkonzentration des Elektrolyten während der Messung konstant gehalten werden, oder es muß mit einer Salzbrücke gearbeitet werden.

Um einen p-Kanal Transistor in starke Inversion zu bringen, müssen die Löcher als Minoritätsträger durch ein negatives Potential an die Oberfläche des Siliziums gebracht werden, deshalb ist das innere Potential, bzw. $-e_0 \phi_{Silizium}$ im Diagramm, nach oben gebogen.

Unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingung für die dielektrische Verschiebung und ohne das Vorhandensein von Dipolen und Flächenladungen an der Grenze Silizium-Siliziumoxid sinkt das innere Potential innerhalb des Oxides. Falls keine Raumladungen im Oxid vorliegen, ist der Abfall linear.

An der Oberfläche des Oxides zum Elektrolyt befinden sich die dissoziierten Silanolgruppen und die dielektrische Verschiebung macht hier einen Sprung um den Betrag der mit ihnen verbundenen Flächenladungsdichte σ_{Oxid} . Innerhalb des Elektrolyten steigt das Potential über die diffuse

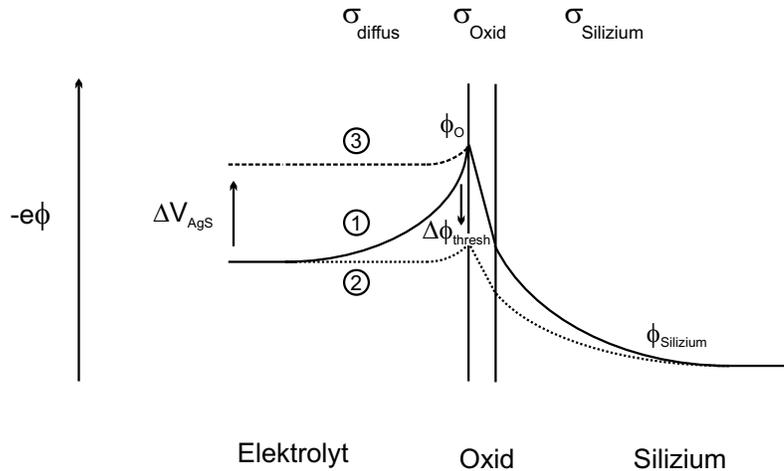


Abbildung 2.5: Diagramm der inneren Potentiale eines Elektrolyt-Oxid-Feldeffekttransistors zur Veranschaulichung des Meßprinzips. Aufgetragen ist das innere Potential, bzw. $-e\phi$ über die Strukturtiefe. Ausgangspunkt ist der Potentialverlauf des Transistors in starker Inversion (1). Bei einem Wechsel auf einen Elektrolyten mit einem niedrigeren pH-Wert steigt wegen der geringeren Dissoziation der Silanolgruppen das Oberflächenpotential ϕ_O um $\Delta\phi_{thresh}$ (2). Um dieses auszugleichen und wieder auf denselben Potentialverlauf im Silizium und damit denselben Source-Drain-Strom zu gelangen, müßte das Potential zwischen der Silber/Silberchloridelektrode und dem Silizium um ΔV_{AgS} gesenkt werden (3). Eine Änderung des Elektrolyten hat also eine Änderung der Schwellspannung zur Folge.

Schicht und wir erhalten das Diagramm des inneren Potentials von Abbildung 2.5 1.

Wechseln wir nun den Elektrolyten gegen einen mit einem niedrigeren pH-Wert bei sonst gleicher Transistorbeschaltung, so wird aufgrund des niedrigeren Dissoziationsgrads der Oxidoberfläche das Oberflächenpotential ϕ_O steigen. Damit sinkt die Meßgröße des Source-Drain-Stroms (Abb. 2.5 2).

Um einen gleich großen Source-Drain-Strom wie unter dem ersten Elektrolyten zu erhalten, würde man die Spannung zwischen der Silber/Silberchloridelektrode und dem Silizium um ein ΔV_{AgS} absenken müssen (3). Da die von außen angelegten Spannungen gewechselt werden würden, um den Source-Drain-Strom konstant zu halten, ändert sich die Schwellspannung des Transistors durch den Wechsel des pH-Wertes der Lösung.

Eine Änderung des pH-Wertes des Elektrolyten hat eine Verschiebung der Schwellspannung eines Transistors zur Folge und wird als solche gemessen.

Das Oberflächenpotential des Oxides an der Elektrolytgrenzfläche setzt sich aus dem an die Silber/Silberchloridelektrode angelegten Spannung und einem Anteil, der durch die Dissoziation der Silanolgruppen entsteht, zusammen. Da das sich durch die Silber/Silberchloridelektrode einstellende innere Potential des Elektrolyten nicht im Elektrolyten abfällt (siehe Anhang A.1), können die beiden Anteile zu einem Oberflächenpotential addiert werden. Damit läßt sich auch alternativ sagen, daß der betriebsbereite Transistor Änderungen des Oberflächenpotentials $\Delta\phi_O$ mißt.

Es gilt

$$d\phi_O = dV_{AgS} + d\phi_{thresh}.$$

Als direkte Konsequenz können durch den Elektrolyten bedingte Änderungen des Oberflächenpotentials durch eine Änderung der Spannung an der Silberelektrode geeicht werden. Damit gilt für den Source-Drain-Strom bei kleinen Signalen um einen Arbeitspunkt des Transistors

$$dI_{DS} = \frac{\partial I_{DS}}{\partial V_{AgS}} d(V_{AgS} + \phi_{thresh}). \quad (2.1)$$

Mit der Ableitung des Transistorstroms bezüglich der Spannung zwischen der Silberchloridelektrode und Source des Transistors kann aus einer Stromänderung auf die Änderung des Oberflächenpotentials geschlossen werden.

2.6 Oxide in wäßrigen Lösungen

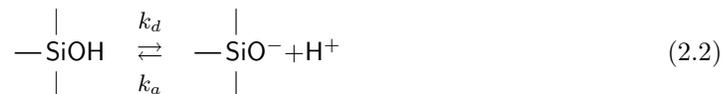
Um die elektrischen Strukturen des Feldeffekttransistors von dem Elektrolyten des Bades zu isolieren, ist auf seiner Oberfläche ein Oxid aufgebracht. Dieses Oxid ist für den ionensensitiven Effekt eines Feldeffekttransistors verantwortlich, auf dem die Messungen dieser Arbeit beruhen [Ber70].

In wäßriger Lösung bilden sich auf vielen Halbleiteroxidflächen Hydroxygruppen, welche teilweise dissoziieren und so Oberflächenladungen tragen. Die Ionen des Elektrolyten werden von diesen Ladungen angezogen, bzw. abgestoßen, es bildete sich eine diffuse Ladungsschicht aus. Die Oberflächenladungen bilden zusammen mit der diffusen Ladungsschicht des Elektrolyten eine elektrische Doppelschicht. Mittels einer Gouy-Chapman-Stern-Theorie werden die Oberflächenladungsdichte sowie das Oberflächenpotential miteinander in Relation gesetzt [Pay55, Ste24, Ver00]. Im folgenden soll mittels einer solchen Theorie eine Beziehung zwischen der Dissoziation der Hydroxygruppen und dem Oberflächenpotential der Oxidfläche als Meßgröße eines Feldeffekttransistors hergestellt werden.

Bei der Dissoziation der Hydroxygruppen handelt es sich um eine chemische Reaktion. Im allgemeinen werden chemische Reaktionen mittels Ratenkonstanten beschrieben; dynamisch mit den Ratenkonstanten für die Dissoziation und Assoziation k_d sowie k_a ; im Gleichgewicht mit der Gleichgewichtskonstante $K = k_d/k_a$.

Wir beschränken uns hier auf die Behandlung der Reaktion zwischen den dissoziierten Silanolgruppen und Protonen als führenden Beitrag zur Änderung des Oberflächenpotentials [Fun86, Bou83] und behandeln die chemische Reaktion an der Siliziumdioxidoberfläche als Reaktion mit nur einer Gleichgewichtskonstante. Dieses bedeutet eine Einschränkung der Protonenkonzentration auf einen Bereich um die Gleichgewichtskonstante K , welches für den physiologisch wichtigen Bereich zwischen einem pH-Wert von 5.5 bis 7.5 gültig ist.

An der Oberfläche findet die Reaktion



statt. Aufgrund des Potentials der Oberfläche ϕ_0 weichen die Konzentrationen geladener Teilchen an der Oberfläche von ihren Konzentrationen innerhalb der Lösung ab. Nimmt man eine Boltzmannverteilung der Teilchen an, so stehen die Bulkkonzentrationen c mit den Oberflächenkonzentrationen c_O über

$$c_O = c e^{-e_0 \phi_0 / (k_B T)}$$

in Beziehung. Dabei ist e_0 die Elementarladung, k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur.

Im folgenden betrachten wir die beteiligten chemischen Reaktionen als schnell, wir befinden uns immer im Gleichgewicht und die Reaktion 2.2 verknüpft die Protonenkonzentration mit dem Potential der Oberfläche, ihrem Dissoziationsgrad $\alpha_O = SiO/N$ und der Gleichgewichtskonstante K der Oberflächenreaktion. Dabei ist N die gesamte Anzahl an Silanolgruppen pro Fläche. Damit folgt

$$\frac{\alpha_O H}{1 - \alpha} = K e^{-Z}, \quad Z = -\frac{e_0 \phi_O}{k_B T}. \quad (2.3)$$

Das Oberflächenpotential wird in Einheiten von $-k_B T/e$ gemessen.

Für die Oberflächenladungsdichte σ_O gilt laut der Gouy-Chapman-Theorie einer elektrischen Doppelschicht

$$\sigma_O = -N e_0 \alpha_O = -\sqrt{8 \epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sqrt{c} \sinh\left(\frac{Z}{2}\right). \quad (2.4)$$

Die gesamte Ionenkonzentration an positiv geladenen Ionen bei einem 1:1 Elektrolyten ist c , ϵ_0 ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und ϵ_r die für Wasser. Hierbei beschränken wir uns auf Lösungen ausschließlich einwertiger Ionen, eine Erweiterung auf höhere Valenzen bereitet aber keine Schwierigkeiten [Gra47, Bri05].

Wir eliminieren aus (2.3) und (2.4) den Dissoziationsgrad α und erhalten

$$\sqrt{c_{ge}} \left(1 + \frac{H}{K} e^Z\right) \sinh\left(\frac{Z}{2}\right) - \frac{N}{\zeta} = 0 \quad (2.5)$$

mit

$$\zeta = \sqrt{8 \epsilon_0 \epsilon_r k_B T} / e_0.$$

Aus Gleichung 2.5 ist ersichtlich, daß das Oberflächenpotential des Oxides als implizite Funktion der Protonenkonzentration sowie der Quadratwurzel der Ionenkonzentration der Lösung gegeben ist, die Anzahl an Oberflächengruppen N sowie die Gleichgewichtskonstante K sind im allgemeinen oxidspezifische Größen. Sind sie gegeben, so ist das Oberflächenpotential durch den pH-Wert der Lösung und ihrer Ionenkonzentration eindeutig bestimmt.

Abbildung 2.6a zeigt das Oberflächenpotential in Abhängigkeit des pH-Wertes für typische Parameter einer physiologischen Lösung bei verschiedenen Dissoziationskonstanten der Oberflächengruppen. Die Dissoziationskonstante legt die Lage der Kurve Oberflächenpotential versus pH fest und verschiebt diese längs der pH-Achse. Daneben ist der Dissoziationsgrad der Silanolgruppen im Vergleich zum Dissoziationsgrad eines Puffers ohne Oberflächenpotential für einen pK-Wert von 5.7 abgebildet (Abb. 2.6b). Die Pufferkurve der geladenen Oberfläche ist gegenüber dem ungeladenen Puffer abgeflacht und zu höheren pH-Werten verschoben.

Fassen wir das Oberflächenpotential Z als Funktion der Oberflächengruppendichte N bei konstantem pH-Wert auf, so sehen wir, daß das Oberflächenpotential Z durch $2 \ln(2N / (\zeta \sqrt{c_{ge}}))$ beschränkt ist. Für kleine Oberflächenpotentiale gilt $0 < Z < 2N / (\zeta \sqrt{c_{ge}})$. Damit steigt das Oberflächenpotential zunächst linear, dann logarithmisch zur Oberflächengruppendichte an.

Da experimentell nur Potentialänderungen gemessen werden, bestimmen wir $\partial Z / \partial pH$ bzw. mit pc analog zum pH-Wert als dem negativen Logarithmus der Ionenkonzentration c $\partial Z / \partial pc$.

Wieder unterscheiden wir zwischen Oberflächenpotentialen $Z \ll 1$ und $Z > 1$ und damit

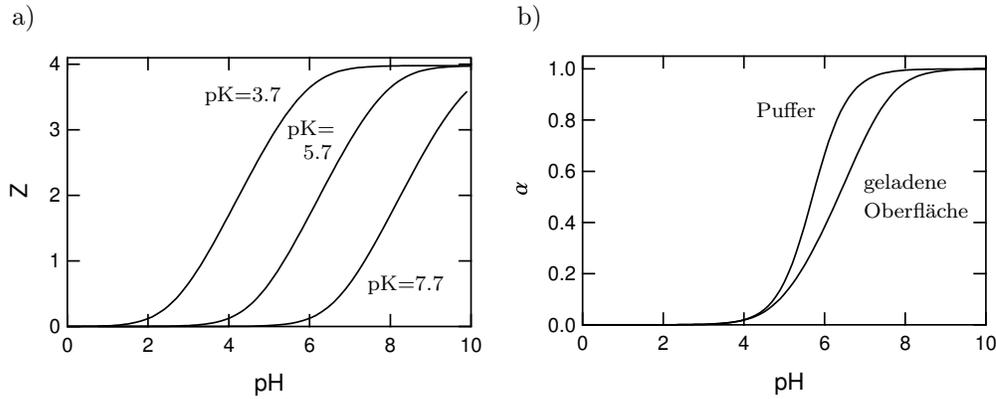


Abbildung 2.6: Das Oberflächenpotential sowie der Dissoziationsgrad einer Siliziumdioxidoberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes. a) Das Oberflächenpotential für verschiedene pK-Werte der Protonenbindung bei sonst gleichen Parametern. Der pK-Wert verschiebt die Kurven des Oberflächenpotentials längs der pH-Achse, innerhalb eines Bereiches von zwei pH-Einheiten ist es relativ linear zum pH-Wert. b) Der Dissoziationsgrad α der Siliziumdioxidoberfläche und eines ungeladenen Puffers gleichen pK-Wertes. Die Pufferkurve der geladenen Oberfläche ist abgeflacht und erscheint zu höheren pH-Werten verschoben.

zwischen kleinen und großen Dichten der Oberflächengruppen. Für $Z \ll 1$ gilt

$$\frac{\partial Z}{\partial pH} = \frac{2 N \ln 10}{\zeta \sqrt{c_{ge}} (1 + \frac{10^{-pH}}{K})^2} \frac{10^{-pH}}{K}, \quad (2.6)$$

$$\frac{\partial Z}{\partial pc} = \frac{N \ln 10}{\zeta (1 + \frac{10^{-pH}}{K})} 10^{\frac{pc}{2}} \quad (2.7)$$

bei $Z \gg 1$

$$\frac{\partial Z}{\partial pH} = \frac{2}{3} \ln 10, \quad (2.8)$$

$$\frac{\partial Z}{\partial pc} = \frac{1}{3} \ln 10. \quad (2.9)$$

Für $H < K$ durchläuft $\partial Z / \partial pc$ dabei ein Maximum, welches durch $\ln 10$ beschränkt ist. An Gleichung 2.8 mag verblüffen, daß wir nicht in das Nernstsche Limit von $\partial Z / \partial pH = \ln 10$ hineinlaufen. Es wurde zur Herleitung angenommen, daß die Ionenkonzentration c viel größer als die Protonenkonzentration H ist. Gilt dieses nicht und ist $c = H$ folgt dieses aber direkt aus (2.5).

Die beiden stoffspezifischen Parameter K sowie N stellen das Verhalten einer Oxidoberfläche in wäßriger Lösung ein.

Die Dissoziationskonstante K legt die Lage der Pufferkurve der Oberfläche fest und wir fordern hier eine fast lineare Abhängigkeit des Oberflächenpotentials vom pH-Wert in dem relevanten Bereich.

Die Ableitungen des Oberflächenpotentials bezüglich der Ionenstärke und des pH-Wertes werden beide durch die Oberflächengruppendichte N bestimmt.

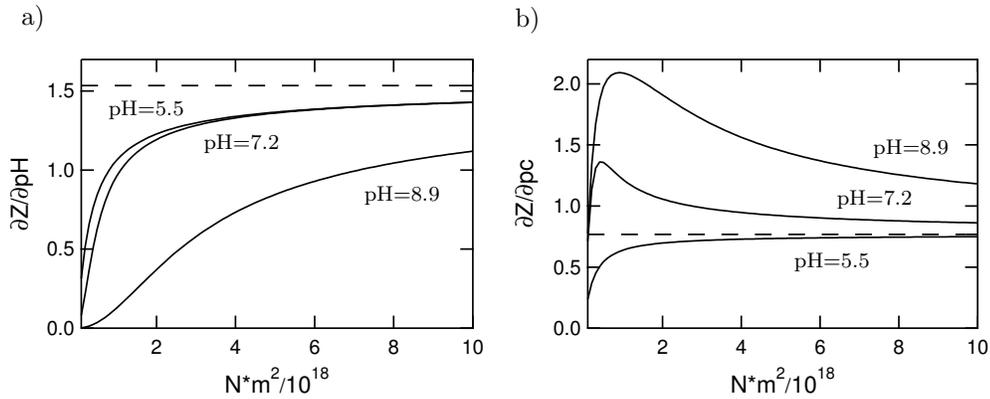


Abbildung 2.7: Die Ableitungen des Oberflächenpotentials nach dem pH-Wert sowie dem negativen Logarithmus der Ionenkonzentration der Lösung pc in Abhängigkeit der Oberflächengruppeneichte N . a) Die Ableitung des Oberflächenpotentials bezüglich des pH-Werts steigt erst linear zu N an, bevor sie in die Grenze von $2/3 \ln 10$ hineinläuft. b) Bezüglich der Ionenkonzentration durchläuft die Ableitung von Z bei $H < K$ ein Maximum. Der pK-Wert der Oberfläche ist hier 5.7.

Wir werden diese Parameter benutzen, um die Theorie an die experimentellen Messungen anzugleichen.

Es ist bekannt, daß eine Gouy-Chapman-Theorie der reinen diffusen Doppelschicht das Oberflächenpotential nicht ganz korrekt wiedergibt. Um diese Schwäche zu überwinden werden unter plausiblen Annahmen weitere Schichten in das Modell eingebaut und damit wird eine größere Anzahl freier Parameter geschaffen [Yat74, Fun86]. Dieses ist aber nur bei einem Meßbereich über einige Dekaden in den Konzentrationen nötig und das hier skizzierte Modell ist in dem engen physiologischen Meßbereich ausreichend.

Die Gouy-Chapman-Stern-Theorie verknüpft das Oberflächenpotential eines Oxides mit den für eine Lösung wichtigen Größen des pH-Wertes sowie ihrer Ionenkonzentration.

Neben den beiden Bestandteilen des Systems, den Zellen und den Transistoren, ist die Schnittstelle dieser Bausteine, in diesem Fall der kleine Spalt zwischen Zelle und Chip, für das Verständnis von entscheidender Bedeutung. Insbesondere auf die Dynamik der Protonen und damit auf die Ursache des Transistorsignals hat der Spalt einen Einfluß.

2.7 Protonendiffusion in gepufferten Systemen

Nicht nur innerhalb der Vesikel sind Protonen gepuffert, auch in der Extrazellulärlösung wird der pH-Wert durch einen Puffer stabilisiert. Zudem werden neben dem Puffer der Lösung die Silanolgruppen des Siliziumdioxids als Protonenpuffer fungieren. Diese verschiedenen Puffer werden die Diffusion der Protonen und damit die Dynamik des Systems beeinflussen.

Es müssen zwei Arten von Puffern unterschieden werden. Zum einen Puffer, die selbst diffundieren können, die mobil sind, dazu gehört der Puffer in der Extrazellulärlösung. Zum anderen Puffer, die nur Bindungsstellen für Protonen bereitstellen und selbst nicht diffundieren, dazu gehören die Silanolgruppen. Diese Bindungsstellen bilden einen fixierten Puffer.

Es sind $[M]$ sowie $[MH]$ die Konzentrationen des mobilen Puffers sowie seiner protonierten Form, $[F]$ und $[FH]$ die entsprechenden Konzentrationen des fixierten Puffers, für den der Diffusionskoeffizient gleich null ist. Die Diffusionskoeffizienten sollen für die protonierte und deprotonierte

Form der Puffer gleich sein. Die Diffusionsgleichungen mit den Reaktionen der beteiligten Substanzen, ihren Assoziationsratenkonstanten k_a sowie den Dissoziationsratenkonstanten k_d lauten in einer Dimension

$$\partial_t[H] = (D_H + D_{OH})\partial_x^2[H] - k_{aF}[F][H] - k_{aM}[M][H] + k_{dF}[FH] + k_{dM}[MH] \quad (2.10)$$

$$\partial_t[MH] = D_M\partial_x^2[MH] + k_{aM}[M][H] - k_{dM}[MH] \quad (2.11)$$

$$\partial_t[M] = D_M\partial_x^2[M] - k_{aM}[M][H] + k_{dM}[MH] \quad (2.12)$$

$$\partial_t[FH] = k_{aF}[F][H] - k_{dF}[FH] \quad (2.13)$$

$$\partial_t[F] = -k_{aF}[F][H] + k_{dF}[FH] \quad (2.14)$$

und das Hinzufügen des Diffusionskoeffizienten D_{OH} in Gleichung 2.10 berücksichtigt die Diffusion der Hydroxyionen¹. Addiert man (2.11) mit (2.12) sowie (2.13) mit (2.14), so findet sich

$$\begin{aligned} \partial_t([M] + [MH]) &= D_M\partial_x^2([M] + [MH]) \\ \partial_t([F] + [FH]) &= 0. \end{aligned}$$

Falls der mobile Puffer am Anfang gleich verteilt ist, d.h. gilt $[M] + [MH] = const = [N_M] \forall x$, sieht man hieraus, daß er auch gleich verteilt bleiben wird und daß sich die Gesamtkonzentration des fixierten Puffers nicht ändert.

2.7.1 Die „rapid buffer approximation“

Das Lösen des Gleichungssystems 2.10 bis 2.14 ist recht aufwendig, falls aber die Puffer auf der Zeitskala der Diffusion sehr schnell in das Gleichgewicht streben, kann mit der „rapid buffer approximation“ gearbeitet werden [Zad94, Jun87, Nar97]. Diese erlaubt unter der Annahme, daß die beteiligten Reaktionen sehr viel schneller als die Diffusion sind, eine Lösung des Systems. Für Protonenpuffer liegt die Zeitkonstante in dem Bereich von einigen Mikrosekunden und selbst für die relativ schnelle Diffusion von Protonen ist die Annahme meist erfüllt. Zuerst wird die Gleichung 2.13 im Gleichgewicht gelöst. Mit der Kettenregel für

$$\partial_t[FH] = \partial_{[H]}[FH]\partial_t[H] = \frac{K_F[N_F]}{(K_F + [H])^2}\partial_t[H]$$

wird dieser Ausdruck in (2.10) substituiert.

Für den mobilen Puffer der Gleichung 2.11 ergibt sich den obigen Ausführungen folgend mit $[N_M] = [M] + [MH]$ als Gesamtkonzentration des mobilen Puffers ein ähnlicher Term und damit für die Protonendiffusion

$$\begin{aligned} \left(1 + \frac{K_M[N_M]}{(K_M + [H])^2} + \frac{K_F[N_F]}{(K_F + [H])^2}\right)\partial_t[H] &= \\ &= \partial_x \left(\left(D_H + D_{OH} + D_M \frac{K_M[N_M]}{(K_M + [H])^2} \right) \partial_x[H] \right). \quad (2.15) \end{aligned}$$

In gepufferten Systemen ist die Diffusion von Protonen abhängig von den Gleichgewichtskonstanten der Puffer K_F und K_M sowie deren Gesamtkonzentration N_F und N_M .

¹Das gilt in dieser Form nur im neutralen Bereich um pH=7.

Für hohe Protonenkonzentrationen reduziert sich die Gleichung 2.15 auf die normale Diffusionsgleichung

$$\partial_t[H] = D_H \partial_x^2[H],$$

wobei die Diffusion der Hydroxyionen zu vernachlässigen ist. Die Puffer haben keinen Einfluß auf die Dynamik, weil sie alle abgesättigt sind.

Ist die Protonenkonzentration sehr viel kleiner als die Pufferdissoziationskonstanten, so treffen wir wiederum auf die Diffusionsgleichung, allerdings mit einem modifizierten Diffusionskoeffizienten

$$\partial_t[H] = \frac{\left(D_M + (D_H + D_{OH}) \frac{K_M}{[N_M]} \right)}{\left(1 + \frac{K_M}{[N_M]} + \frac{[N_F]}{[N_M]} \frac{1}{\beta} \right)} \partial_x^2[H]. \quad (2.16)$$

Dabei wurde das Verhältnis der Pufferkonstanten $\beta = K_F/K_M$ eingeführt.

In diesem basischen Grenzfall reduziert sich der Diffusionskoeffizient je nach dem Verhältnis der Konzentrationen des mobilen und fixierten Pufferkonzentration sowie dem ihrer Gleichgewichtskonstanten ganz erheblich, da die fixierten Puffergruppen die Diffusion stark verlangsamen.

Wird nicht in der basischen Näherung gearbeitet, d.h. im Falle kleiner Protonenkonzentrationen, gestaltet sich die Lösung der Gleichung (2.15) als schwierig, im allgemeinen kann sie nur numerisch gelöst werden.

Um dennoch eine Aussage über das Verhalten der Protonendiffusion treffen zu können, ist es günstiger, nicht die Pufferkonzentrationen $[MH]$ und $[FH]$ als eine Funktionen der Wasserstoffionen $[H]$, sondern $[FH]$ und $[H]$ als Funktionen der protonierten Pufferkonzentration $[MH]$, bzw. des Assoziationsgrads des Puffers $\alpha = [MH]/[N_M]$ aufzufassen.

Damit wird aus dem Gleichungssystem (2.10-2.14)

$$\begin{aligned} \left(1 + \frac{K_M}{[N_M](1-\alpha)^2} + \gamma \frac{\beta}{(\beta + (1-\beta)\alpha)^2} \right) \partial_t \alpha = \\ = D_M \partial_x \left(\left(1 + \frac{K_M}{[N_M]} \frac{D_H + D_{OH}}{D_M} \frac{1}{(1-\alpha)^2} \right) \partial_x \alpha \right), \end{aligned} \quad (2.17)$$

hierbei wurde das Konzentrationsverhältnis $\gamma = [N_F]/[N_M]$ eingeführt.

Diese Gleichung entspricht der Gleichung (2.15).

Im basischen Grenzfall reduziert sich Gleichung (2.17) auf eine zur Gleichung (2.16) äquivalente Form. Es spielt also in der „rapid puffer approximation“ keine Rolle, ob die Protonendiffusion oder die Diffusion des protonierten Puffers betrachtet wird, welches auch unmittelbar einleuchtet.

Im Falle der Silanolgruppen und des benutzten Extrazellulärpuffers liegen die Gleichgewichtskonstanten wahrscheinlich dicht beisammen. Bei gleichen Pufferkonstanten des mobilen und des fixierten Puffers ist $\beta = 1$ und der Term

$$\gamma \frac{\beta}{(\beta + (1-\beta)\alpha)^2}$$

in (2.17) wird konstant und das unabhängig von dem Assoziationsgrad α . Gilt zudem noch

$$\frac{K_M}{[N_M]} \frac{D_H + D_{OH}}{D_M} \frac{1}{(1-\alpha)^2} \ll 1, \quad (2.18)$$

eine Bedingung, die meist erfüllt ist, da oft $K_M \ll [N_M]$, so erhalten wir

$$\partial_t \alpha = D_M \frac{1}{1+\gamma} \partial_x^2 \alpha. \quad (2.19)$$

Dieses ist insofern bemerkenswert, da es der einfachen Diffusionsgleichung mit einem modifizierten Diffusionskoeffizienten

$$\tilde{D} = D_M \frac{1}{1 + \gamma} \quad (2.20)$$

entspricht. Das Ergebnis verallgemeinert die Gleichung (2.16) für Fälle, in denen die Puffer gleiche Pufferkonstanten haben.

In Anbetracht der hohen Pufferkapazität von Proteinen und der großen Oberflächendichte der Silanolgruppen kann sich der Diffusionskoeffizient für Protonen leicht nochmals um einen Faktor 10-100 reduzieren.

Damit zeigt diese Gleichung erstens,

daß langsame Diffusion auch für Protonen mit ihrem eigentlich sehr hohen Diffusionskoeffizienten möglich ist,

und zweitens,

daß bei einer langsamen Diffusion die Dynamik stark von der Konzentration des mobilen Puffers abhängt.

Die einfache Reduzierung des Diffusionskoeffizienten der Protonen gilt streng nur für gleiche Pufferkonstanten. Davon kann im allgemeinen nicht ausgegangen werden.

Sind diese nicht nahezu gleich, bewegt sich der Assoziationsgrad aber in einem engen Bereich, so können die Gleichungen linearisiert werden. Auch dann ergibt sich eine Reduzierung der Koeffizienten.

Im Prinzip könnten mit den Gleichungen 2.4 sowie 2.17 das sich mit der Diffusion von Protonen einstellende Oberflächenpotential berechnet und die Transistorsignale modelliert werden. Durch die Enge des Spaltes zwischen Zelle und Chip kann man die diffuse Schicht mit ihren gebundenen Ionen nicht vernachlässigen. Um für diesen Fall ein klares und verständliches Modell zu entwickeln, verlassen wir die „rapid buffer approximation“ und lösen die Diffusion unter der Annahme schneller chemischer Reaktionen auf einem Gitter.

2.8 Gleichungssystem zur Modellierung des Zelle-Transistor-Kontakts

Die Änderung des Source-Drain-Stroms ist nach Gleichung 2.1 abhängig von einer Änderung des Potentials im Badelektrolyt ΔV_{AgS} sowie einer Änderung der Schwellspannung $\Delta \phi_{thresh}$. Im folgenden werden wir uns auf die Änderung der Schwellspannung durch eine Reaktion der Protonen mit der Siliziumdioxidoberfläche beschränken; es wird bei konstantem Badpotential das Oberflächenpotential variiert ².

Als Grundstock soll die Gouy-Chapman-Stern-Theorie aus Abschnitt 2.6 dienen.

Mit der Benutzung dieser Theorie kann das offensichtlich dreidimensionale Problem der Diffusion

²Prinzipiell könnte sich im Spalt zwischen Zelle und Transistor bei der Ausschüttung eines Vesikels ein Potential aufbauen, wenn die ausgeschüttete Matrix in ein Donnan-Gleichgewicht strebt. Ein solches Potential würde dann wie ein ΔV_{AgS} wirken. Das Donnan-Gleichgewicht würde sich zwischen der relativ festen Matrix und den ausdiffundierenden Stoffen aufbauen. Es wird jedoch vernachlässigt, weil die Diffusion des ausgeschütteten Vesikelinhalts in einem starken ionischen Hintergrund stattfindet. Zudem ist die Matrix der negativ geladene Part und die entstehenden Potentiale sollten eher negative Transistorsignale auslösen, welche aber nicht beobachtet werden.

im Spalt auf zwei reduziert werden, da die Konzentrationen über den Spalt nicht mehr frei sind, sondern via

$$c(z) = c e^{-\frac{e\phi(z)}{k_B T}} \quad (2.21)$$

miteinander verknüpft werden. Die Gouy-Chapman-Theorie ist eine statische Theorie des Gleichgewichts. Gehen wir von einer Spalthöhe von 50 nm aus, so relaxieren die Konzentrationen über den Spalt innerhalb weniger Mikrosekunden, so schnell, daß wir das System über die Spalthöhe als im Gleichgewicht betrachten können. In diesem Modell muß wegen der Reduktion auf zwei Dimensionen die Reaktion der Protonen mit den Silanolgruppen der Dichte N von der Oberfläche in den Spalt abgewälzt werden. Hierfür wird eine effektive Konzentration der Silanolgruppen über die Spalthöhe d

$$N_{eff} = N/d \quad (2.22)$$

gebildet. Damit können wir mit den Silanolgruppen rechnen, als würden sie einen fixierten Puffer der Konzentration N_{eff} bilden.

Desweiteren müssen wir die Pufferreaktion mit den Protonen untersuchen.

Zuerst stellen wir vorweg, daß die Reaktion der Protonen mit dem extrazellulären Puffer der Lösung und die mit der Oberfläche sehr schnell verlaufen soll.

Für den gelösten Puffer gilt dieses sicherlich [?], für die Oberflächenreaktion ist dieses nicht zweifelsfrei gezeigt. Es gibt Hinweise, daß die Kinetik innerhalb weniger Millisekunden liegt [Mit92, Woi95]. Diese sind jedoch so schwach und die Zeiten von wenigen Millisekunden sind bei Signaldauern von einigen zehn Millisekunden so klein, daß wir von einer sehr schnellen Reaktion ausgehen.

Wir benutzen aber nicht die „rapid buffer“-Näherung mit ihren Konsequenzen aus Abschnitt 2.7, sondern setzen die Reaktion als schnell voraus und berechnen die freie Diffusion aller Stoffe. Dadurch hält man sich offen, mit verschiedenen Gleichgewichtskonstanten für die Oberflächenreaktion sowie mit verschiedenen Oberflächengruppendichten zu rechnen. Diese haben über das Oberflächenpotential einen Einfluß auf die scheinbare Gleichgewichtskonstante $K * exp(-Z)$, ein Faktor von $\beta \approx 1$ ist nicht immer gewährleistet.

In die Reaktion zwischen den Protonen und den Silanolgruppen geht die Oberflächenkonzentration der Protonen ein, welche aus (2.21) folgt. Für den Puffer der Extrazellulärlösung gilt in der Bulklösung

$$K = \frac{[H^+][M^-]}{[HM]}.$$

Versieht man die Konzentration nach (2.21) mit den entsprechenden Boltzmann-Faktoren, um das Potential im Spalt zu berücksichtigen, so fallen sie heraus. Ist also das Puffergleichgewicht in der Bulklösung gegeben, so sind die Puffer über den gesamten Spalt eingestellt, auch an der Oberfläche. Aufgrund der relativ kleinen Spalthöhe müssen die in der diffusen Doppelschicht gebundenen Ionen berücksichtigt werden. Zum einen wird die Doppelschicht als Ionentauscher arbeiten, zum anderen können wir lokal von relativ großen Änderungen im Oberflächenpotential ausgehen. Bei einer Änderung des Oberflächenpotentials werden Ionen in ihr verstärkt gebunden oder freigesetzt, sodaß sich die Bulkkonzentrationen merklich ändern können.

Schließlich muß die Diffusionsgleichung auf zwei Dimensionen reduziert werden, und da die diffuse Schicht bei physiologischen Salzkonzentrationen nur ungefähr 1 nm dick ist, wird die Diffusion innerhalb des Bulks berechnet.

Unter der Annahme schneller Reaktionen besteht das System aus einer freien Diffusion aller mobilen Stoffe i

$$\frac{\partial}{\partial t} c_i = D_i \Delta c_i + Q_i(x, t), \quad (2.23)$$

wobei $Q_i(x, t)$ ein Quellterm für die vom Vesikel freigesetzten Stoffe sein soll³, bei der simultan die Puffergleichgewichte

$$K_M = \frac{[H^+][M^-]}{[MH]} \quad \forall M, \quad (2.24)$$

$$K_F = \frac{[H^+][F^-]}{[FH]} e^Z \quad (2.25)$$

erfüllt sind. Für diese Gleichgewichtsreaktion gilt lokal die Teilchenzahlerhaltung

$$N_H = \Xi_+ [H^+] + \sum_M [MH] + [FH], \quad (2.26)$$

$$N_M = \Xi_- [M^-] + [MH] \quad \forall M, \quad (2.27)$$

$$N_{eff} = [F^-] + [FH], \quad (2.28)$$

$$N_I = \Xi_{\pm} [I^{\pm}] \quad \forall I. \quad (2.29)$$

In (2.26) wird über alle mobilen Puffer summiert und I läuft über die von den Puffern verschiedenen Ionen der Lösung. Der Faktor Ξ_{\pm} berücksichtigt die durch die diffuse Schicht gebundenen und verdrängten Ionen und folgt aus der Gouy-Chapman-Theorie. Er ist

$$\Xi_{\pm} = \frac{1}{d} \int_0^d e^{\mp \frac{e\phi(z)}{k_B T}} dz.$$

Dabei gilt das der Valenz des Ions entsprechende Vorzeichen. Würde das Oberflächenpotential Z auf Null gesetzt, so wäre darauf die Ionenkonzentration im Spalt je nach der Valenz des Ions $\Xi_{\pm} * c_i$. Der Debye-Hückel-Parameter κ bildet die charakteristische Abschirmlänge innerhalb eines Elektrolyten. In

$$\kappa = \sqrt{\frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sum_i c_i}$$

wird über alle Ionen der Lösung summiert, wobei positive und negative Valenzen zu berücksichtigen sind. Für $d\kappa \gg 1$ sowie für $Z = 0$ gehen die Parameter Ξ_+ und Ξ_- gegen eins, die diffuse Schicht beinhaltet relativ zum Spalt wenig Ionen, bei $d\kappa \approx 1$ muß man auch die Ionen der diffusen Schicht berücksichtigen, die bei einer Änderung des Potentials Z freigesetzt werden. Für $d\kappa < 1$ kann nicht mehr von einer Bulkonzentration gesprochen werden, da die diffuse Schicht die Ausmaße des Spaltes hat und die Randbedingungen bei $z = d$ für das System relevant werden.

Dem fixierten Puffer fehlt dieser Faktor und da er nicht mobil ist, ist seine Konzentration unabhängig vom Oberflächenpotential. Das Oberflächenpotential in Abhängigkeit der Protonenkonzentration und der Ionenkonzentrationen liefert

$$\sqrt{c} \left(1 + \frac{H}{K_F} e^Z \right) \sinh \left(\frac{Z}{2} \right) - \frac{N}{\zeta} = 0. \quad (2.30)$$

Dieses System von Gleichungen wird später zum Modellieren der Transistorsignale gelöst und auf einem Gitter berechnet. Hiermit sind die theoretischen Grundlagen des Systems beschrieben und es wird sich dem experimentellen Teil der Arbeit zugewandt.

³Wir werden hier alle Strömungen aufgrund des ausgeschütteten Flüssigkeitsvolumens vernachlässigen.

Kapitel 3

Zell-Silizium-Synapse

Innerhalb des experimentellen Teils der Arbeit wird vorweg die Amperometrie als Referenzmethode für das Detektieren von Exozytose bei chromaffinen Zellen vorgestellt, darauf wird die Messung mittels eines Feldeffekttransistors behandelt und mit der Amperometrie verglichen. Dieser Vergleich zeigt, daß der Transistor einzelne Vesikelausschüttungen mißt. Eine lineare Anordnung von Transistoren mit einem Abstand von $4.6 \mu\text{m}$ erlauben eine ortsauflösende Messung der Exozytose an einer Zelle.

3.1 Amperometrie

Als etablierte Methode zur Analyse der Exozytose wird die Amperometrie herangezogen. Electrochemisch aktive Substanzen werden hierbei an der Oberfläche einer Elektrode oxidiert oder reduziert. Im Falle der chromaffinen Zellen sind es die Hormone Adrenalin und Noradrenalin, die umgesetzt werden können. Ab einer Spannung von ca. 460 mV werden die Hormone unter Abgabe von zwei Elektronen zu Chinonen oxidiert (Abb. 3.1) [Pih94, Cio94]. Als Elektrode dient eine

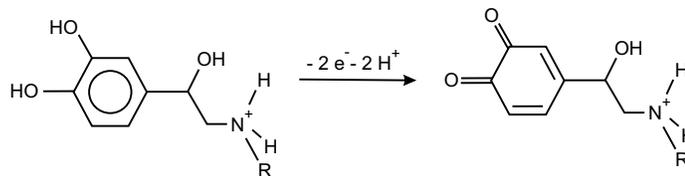


Abbildung 3.1: Reaktion der Catecholamine bei der Amperometrie. Ab ca. 460 mV Elektrodenpotential werden die Catecholamine unter Abgabe von zwei Elektronen zu Chinonen oxidiert.

durch Lack isolierte Kohlefaser mit $5 \mu\text{m}$ Durchmesser, deren Spitze durch einen Schnitt freigelegt ist. Diese wird durch einen geeigneten Verstärker (siehe A.7) auf einer konstanten Spannung von 800 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Badelektrode gehalten. Findet Exozytose statt, werden die Catecholamine ausgeschüttet, sie diffundieren zur Elektrodenoberfläche der Kohlefaser und werden dort oxidiert. Die Reaktion selbst läuft sehr schnell ab [Pih94] und deshalb ist der Elektrodenstrom, die Meßgröße der Amperometrie, proportional zum Fluß Ψ der Catecholamine an

der Elektrodenoberfläche

$$I = -2 e_0 \int_A \Psi dA.$$

Mißt man mit einer gegen die Zellmembran gepreßten Elektrode, so wird die Diffusion der Catecholamine vom Vesikel zur Elektrode sehr schnell vonstatten gehen und es wird direkt der Fluß der Catecholamine aus dem Vesikel gemessen.

Abbildung 3.2 zeigt eine typische Messung. In Abb. 3.2a sehen wir eine chromaffine Zelle mit

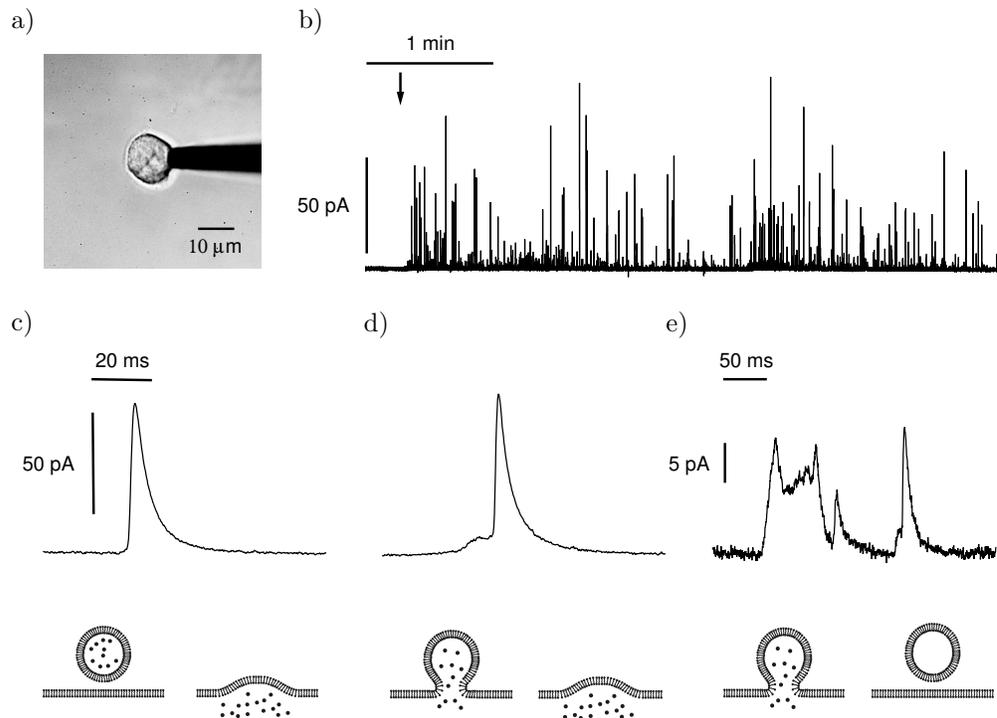


Abbildung 3.2: Die Amperometrie als Referenzmethode zum Detektieren der Exozytose. a) Für die Amperometrie wird eine durch Lack isolierte Kohlefaser mit freigelegter Spitze gegen die Membran einer chromaffinen Zelle gedrückt. b) Nach der Zugabe von Bariumchlorid (\downarrow) findet Exozytose statt, deutlich sichtbar sind die auftretenden Signale im Strom der Kohlefaser. c) Die häufigste Signalform der Amperometrie ist gekennzeichnet durch einen schnellen Anstieg mit einem etwas langsameren Abfall. d) Viele Signale beginnen mit einem Fuß: durch eine Fusionspore, die für einige Millisekunden stabil ist, tritt Vesikelinhalt aus bevor das Vesikel vollständig mit der Plasmamembran verschmilzt. e) Wenn die Fusionspore nicht expandiert sondern wieder kollabiert, spricht man von einem „kiss and run“ Ereignis. Das Vesikel bleibt hierbei intakt und der Inhalt wird nur durch die Pore freigesetzt.

einer leicht gegen die Membran gepreßten Kohlefaser, in Abb. 3.2b den dazugehörigen Elektrodenstrom. Nach der Zugabe von Bariumchlorid setzt anhaltend Exozytose ein, gut sichtbar anhand der vielen auftretenden Peaks. Die Ausschüttung erstreckt sich über einige Minuten, bis schließlich die Messung abgebrochen wird. In Abb. 3.2c bis e sind einige amperometrische Signale in höherer zeitlicher Auflösung dargestellt. Die meisten Signale besitzen eine schnelle Phase des

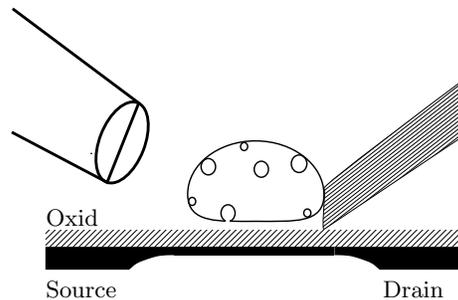


Abbildung 3.3: Aufbau des Experiments. Eine Zelle liegt auf dem Gatebereich eines Transistors. Die auf der Oberfläche liegende Kohlefaser (rechts) ist leicht gegen sie gedrückt und ermöglicht ein zur Transistormessung simultanes Messen amperometrischer Ströme. Durch das Θ -Tube (links) können der Zelle verschiedene Lösungen appliziert werden.

Anstiegs, der ein langsamerer Abfall folgt (3.2c). Hierbei fusioniert das Vesikel vollständig und schnell mit der Plasmamembran (3.2c unten). In der Amperometrie zeigen viele Signale einen Fuß, wie es in Abb. 3.2d zu sehen ist. Dieser Fuß ist mit einer Fusionspore bei dem Verschmelzen der Vesikelmembran mit der Plasmamembran assoziiert. Die Pore bildet sich und ist über einige Millisekunden bis einige 10 Millisekunden stabil, durch sie tritt Vesikelinhalt aus, bevor sie dann expandiert und das Vesikel vollständig fusioniert. Diesen Fuß tragen ungefähr 20%-50% der amperometrischen Signale, vergleichbar mit den berichteten 20-70% [Cho92, Zho96, Ama05, Sch96]. Relativ selten ist der Fall, daß sich die ausgebildete Pore wieder schließt, ohne daß die Membranen vollständig verschmelzen. Nach dem Ausbilden der Pore schnürt sich das Vesikel wieder ab. Dieses transiente Ausbilden einer Pore, auch als „kiss and run“ bezeichnet, ist häufig mit einem wiederholten Sich-Öffnen-und-Schließen der Pore verbunden, welches sich als kurze Spitzen in dem amperometrischen Signal niederschlägt (Abb. 3.2e).

3.2 Messung von Exozytose mit Transistoren

Es werden chromaffine Zellen auf linearen Transistorarrays kultiviert. Nach einigen Stunden adhären die Zellen und wachsen auf der mit Kollagen beschichteten Oberfläche der Feldeffekttransistorstruktur fest. Vor der Messung wird das Kulturmedium gegen physiologische Extrazellulärlösung gewechselt. Während der Messung können unterschiedliche Lösungen mittels eines Θ -Tubes appliziert werden (siehe A.8). Hierbei werden verschiedene Lösungen durch die durch ein Septum getrennten Hälften einer gezogenen Glaskapillare von 180 μm Durchmesser gepumpt, die mittels eines Piezoaktuator über der Zelle bewegt werden kann. Die Glaskapillare wird so justiert, daß beim Anlegen einer Spannung an den Piezokristall die Zelle ungefähr mittig unter den Hälften und deren Flüssigkeitsströmungen zu liegen kommt. Durch das ständige Pumpen der Lösungen ist damit ein rascher Wechsel der Flüssigkeiten über der Zelle beim Verfahren der Glaskapillaren gewährleistet. Einer Hälfte des Θ -Tubes ist ein Revolver vorgeschaltet, mit dem eine aus fünf Lösungen zum Applizieren ausgewählt werden kann. Das die Zelle umgebene Bad wird kontinuierlich mit frischer physiologischer Lösung gespült, um eine Kontamination des

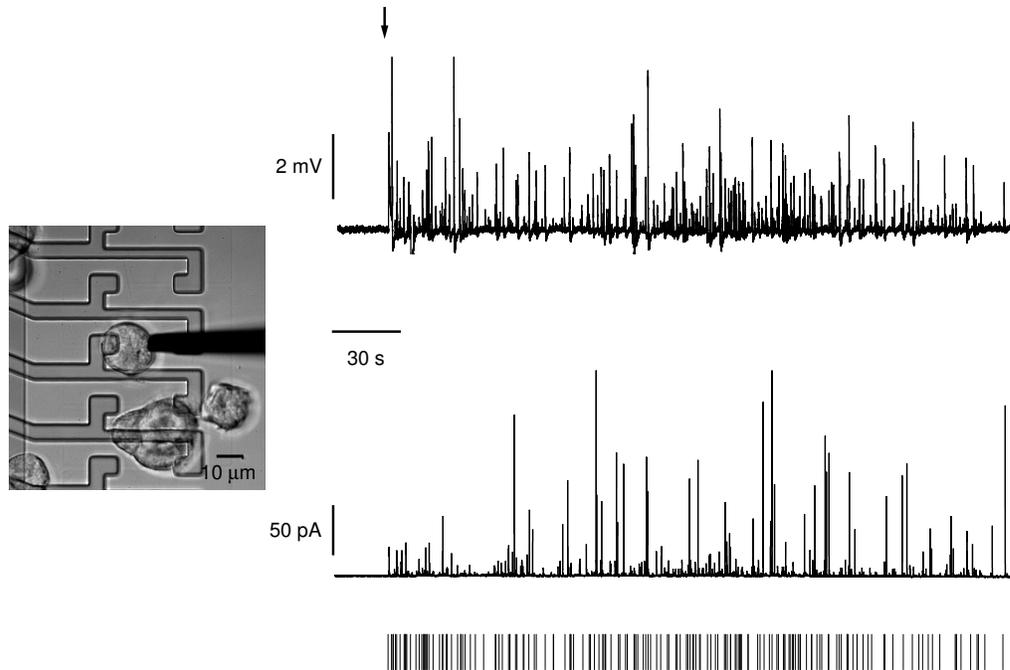


Abbildung 3.4: Reales Szenario einer Messung (links). Die Zelle liegt fast mittig auf dem $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ großem Gate und deckt dieses halb ab. Gut zu erkennen ist die Kohlefaser mit einem Durchmesser von ca. $5 \mu\text{m}$. Das Θ -Tube wird relativ weit von der Zelle plaziert und ist deshalb nicht zu sehen. Simultanes Messen der Exozytose von einem Transistor (oben rechts) und als amperometrischen Oxidationsstrom (Mitte rechts). Nach dem Stimulieren der Zelle mit Bariumchlorid (\downarrow) erscheinen sowohl im Transistor als auch im amperometrischen Strom zeitlich stochastische Signale unterschiedlicher Amplitude. Markiert (unten) sind zu dem Transistorsignal simultane Ströme der Elektrode.

Bades mit applizierten Barium zu vermeiden. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 3.3 gezeigt.

Für eine amperometrische Referenzmessung wird die Kohlefaser auf der Transistoroberfläche seitlich gegen eine passend auf einem Gate liegende Zelle gefahren. In dieser Anordnung können Vesikel, die in den Spalt zwischen Zellmembran und Transistoroberfläche ausgeschüttet werden, amperometrisch detektiert werden, wenn die Catecholamine längs des Spaltes zur Elektrode diffundieren.

Die Abbildung 3.4 links stellt die reale Situation einer Messung dar. Eine chromaffine Zelle mit einem Durchmesser von ungefähr $15 \mu\text{m}$ liegt auf dem $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ großem Gate eines Transistors, seitlich ist als schwarzer Schatten deutlich die leicht gegen die Zellmembran gedrückte Kohlefaser zu erkennen. Das Θ -Tube zum Applizieren der Bariumlösung ist aufgrund seiner Größe weit vor der Zelle und nicht innerhalb des Bildausschnittes zu sehen.

Abbildung 3.4 zeigt das Transistorsignal (oben rechts) sowie den Strom der Kohlefaser (Mitte rechts) dieser Zelle bei einer Stimulation mit Barium für 10 s. Nach der Stimulation zeigen sowohl der Transistor als auch der Elektrodenstrom deutlich sichtbare Signale. Diese treten erst

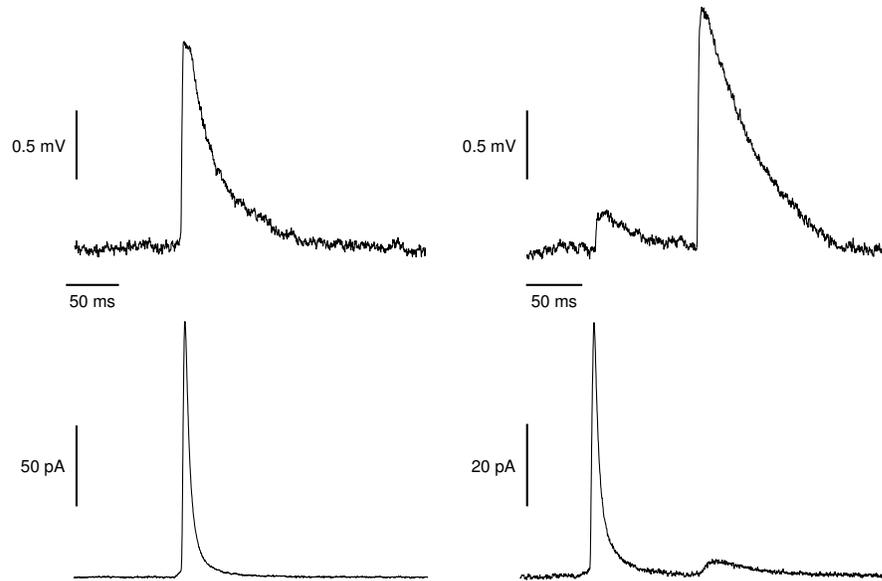


Abbildung 3.5: Vergleich simultan aufgenommener Transistor- und Kohlefaser-Signale. Das Transistor-Signal (oben) ist gegenüber dem amperometrischen Signal (unten) nur minimal zeitlich versetzt. Die Amplituden der Signale korrelieren aufgrund der unterschiedlichen Ausschüttungsorte der Vesikel nicht. Auffallend ist das unterschiedliche zeitliche Verhalten beim Abfallen des Signals.

nach dem Stimulus mit Barium auf und sind zeitlich stochastisch verteilt. Während dieser Messung wurden insgesamt 314 Signale im Transistor und 339 Signale im Strom der Kohlefaser detektiert. Von diesen waren 139 Ereignisse simultan, d.h. sie besaßen einen zeitlichen Versatz von wenigen Millisekunden, in der Amperometrie und in dem Transistor zu sehen. Diese simultan aufgenommenen Signale können wegen des so kurzen zeitlichen Versatzes dem gleichen Fusionsereignis zugeordnet werden und sind in Abb. 3.4 unten als Strich markiert. Die größten amperometrischen Signale haben kein Pendant im Transistor, wie zu erwarten, wenn es sich dabei um direkt unter der Kohlefaser freigesetzte Vesikel handelt. Zudem ist bei allen simultanen Ereignissen das Transistorsignal gleichzeitig zu oder leicht vor dem Strom der Kohlefaser. Da die Catecholamine der in den Spalt ausgeschütteten und vom Transistor detektierten Vesikel erst längs des Spaltes diffundieren müssen, um elektrochemisch an der Faser umgesetzt werden zu können, folgt solch ein zeitlicher Versatz in den Signalen aus der Meßanordnung. Beispiele dieser simultanen Ereignisse in höherer Zeitauflösung zeigt Abbildung 3.5. Das Transistorsignal (oben) ähnelt mit einem schnellen Anstieg und einem exponentiellen Abfall dem bekannten Verlauf der amperometrischen Ströme. Ein Vergleich mit den simultan aufgenommenen Strömen (unten) zeigt, daß das Transistorsignal hier eine langsamere Dynamik im Abfall hat. Die Amplituden der Signale korrelieren nicht. Weil die Vesikel an unterschiedlichen Orten über die gesamte Membran der Zelle ausgeschüttet werden, ist dieses auch nicht zu erwarten.

Da die amperometrischen Signale der Ausschüttung einzelner Vesikel zugeordnet werden können [Sch92], zeigt dieses Experiment, daß auch der Transistor die Exozytose einzelner Vesikel auflöst.

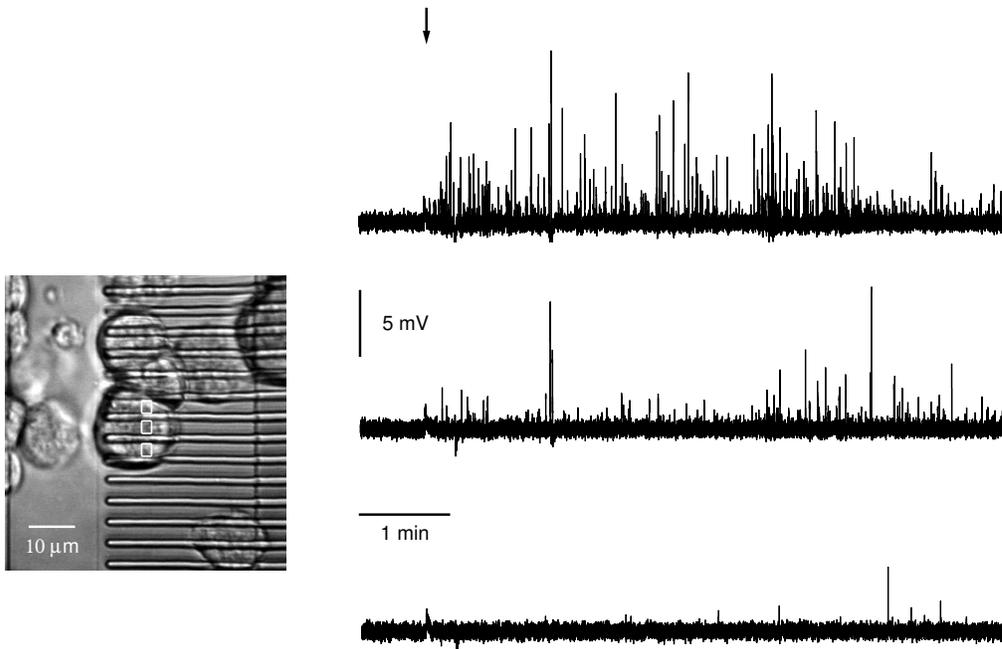


Abbildung 3.6: Ortsaufgelöste Messung der Vesikelausschüttung an einer Zelle. Die Messungen finden auf einem Chip mit $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ großen Gates in linearer Anordnung und einem Abstand von $4.6 \mu\text{m}$ statt. Weiß gerahmt sind die aktiven Gates unter der Zelle. Unter Stimulation (↓) zeigen die verschiedenen Transistoren unterschiedliche Aktivitäten und Signale zu verschiedenen Zeiten.

Aufgrund des höheren dynamischen Bereichs und des schnelleren Abfalls der amperometrischen Signale gegenüber den Transistorsignalen läßt sich schließen, daß die Amperometrie und der Transistor verschiedene Größen messen. Eine Messung mit kleineren Gateflächen im nächsten Abschnitt gibt Auskunft darüber, wie lokalisiert die Signale auf dem Transistor sind.

3.3 Zonen der Exozytose: Transistormessung mit einem Raster von $4.6 \mu\text{m}$

Das zuvor beschriebene Experiment wird auf einem Chip mit linear angeordneten Transistoren der Gatemalaße von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ und einem Abstand von $4.6 \mu\text{m}$ wiederholt. Die Zelle auf dem Chip ist in Abb. 3.6 links gezeigt, wobei die Gates der aktiven Transistoren weiß gerahmt sind. Zwischen den Gates befindet sich zur besseren Isolation der Drainleitungen „local oxide“, welches als kammartige Struktur zu erkennen ist. Die Messung wurde ohne amperometrische Referenzmessung gemacht.

Nach der Stimulation zeigen die verschiedenen Transistoren unter der Zelle unterschiedliche Signale zu unterschiedlichen Zeiten. In der oberen Spur sind sowohl die Signalamplituden als auch die Frequenz am höchsten, während in der unteren Spur nur noch sporadisch einzelne Signale mit geringer Amplitude auftreten, obwohl das dazugehörige Gate noch vollständig von der Zelle bedeckt ist. In Abbildung 3.7 sind einige Peaks aus dieser Messung als Beispiel zeitlich höher auf-

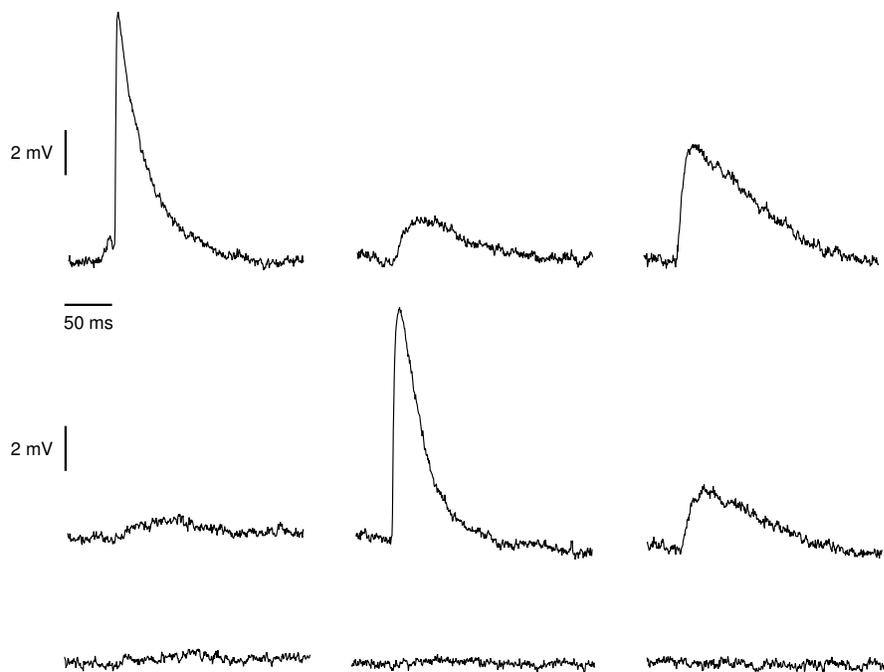


Abbildung 3.7: Signale benachbarter Transistoren. Die meisten Signale bleiben unter einem Transistor lokalisiert (links), nur die größten (Mitte) werden manchmal auch in mehreren detektiert. In benachbarten Transistoren simultan aufgezeichnete Ereignisse sind selten und besitzen meist einen langsameren Anstieg und eine mittlere Amplitude. Es zeigt sich, daß die Signale unter der Zelle sehr lokalisiert sind. Das Signal links besitzt einen aus der Amperometrie bekannten Fuß.

gelöst. Die meisten Signale besitzen einen schnellen Anstieg und werden nur von einem Transistor detektiert (links), nur die größten können selten auch im benachbarten aufgenommen werden (Mitte). Signale, die in benachbarten Transistoren registriert werden, haben meistens einen langsameren Anstieg und eine kleinere Amplitude (rechts). Im oberen Transistor in Abb.3.6 wurden insgesamt 184 getrennt liegende Peaks aufgenommen, 37 von diesen waren auch im daneben liegenden Transistor zu sehen. Gut sichtbar trägt das Signal links einen aus der Amperometrie bekannten Fuß.

Ein weiteres Beispiel für eine orts aufgelöste Messung von Exozytose an einer frei liegenden Zelle sehen wir in Abb.3.8. Die Kohlefaser ist deutlich zu erkennen (links), es befinden sich vier Transistoren unter der Zelle. Alle vier zeigen wie die Amperometrie nach der Stimulation Signale. Während die Transistoren der beiden mittleren Gates kaum simultan Ereignisse messen, können zu diesen Transistoren mit der Kohlefaser jeweils solche detektiert werden, obwohl sie einen viel größeren Abstand besitzt.

Die Messungen mit den kleinen Transistoren zeigen, daß die auftretenden Signale räumlich sehr lokalisiert sind.

Selbst die größten fallen fast vollständig innerhalb von $4.6 \mu\text{m}$ ab. Signale, die in benachbarten

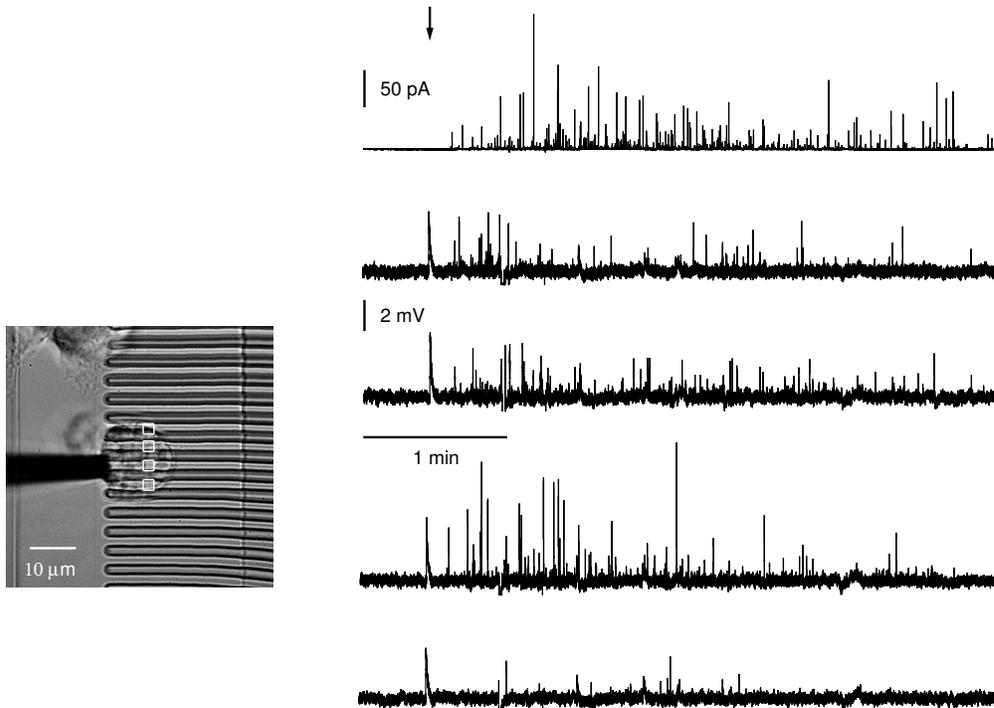


Abbildung 3.8: Ortsaufgelöste Exozytosemessung mit vier Transistoren und Amperometrie. Nach der Stimulation (↓) werden sowohl amperometrisch (oben) als auch in den vier unter der Zelle liegenden Transistoren Vesikel detektiert. Interessanterweise zeigt auch das kaum abgedeckte Gate des obersten Transistors deutliche Signale.

Transistoren registriert werden, können aufgrund ihres langsameren Anstiegs und der kleineren Amplitude Vesikel zugeordnet werden, die zwischen den Transistoren innerhalb des isolierenden „local oxide“ ausgeschüttet worden sind. Weil die Signale örtlich so eingeschränkt sind, ist es möglich, an einer Zelle ortsaufgelöst zu messen. Die unterschiedlichen Aktivitäten der Transistoren sind in der Physiologie der Zelle begründet.

Aus amperometrischen Messungen an einer Zelle mit mehreren kleinen Kohlefasern ist bekannt, daß die Exozytose nicht homogen über die Zelle stattfindet, sondern an bestimmte Stellen der Zellmembran, den „release sites“, gekoppelt ist. Somit gibt es Orte, an denen die Vesikel freigesetzt werden und andere, an denen dieses nicht geschieht [Sch94]. Aus diesen Messungen folgt, daß „release sites“ einen Abstand von ein bis zwei Mikrometern haben können. Diese Beobachtung wird durch Dopamin- β -Hydroxylase-Antikörperfärbung bestätigt. Die Dopamin- β -Hydroxylase ist ein membrangebundenes Protein, welches nur innerhalb der chromaffinen Granulen vorkommt. Wird an der Zelle nach der Stimulation eine Antikörperfärbung durchgeführt, so zeigen sich auf der Zellmembran nur bestimmte Bereiche eingefärbt [Tro02, Sch94]; ein Zeichen dafür, daß nur dort Vesikelmembran in die Plasmamembran eingefügt worden ist. Die räumliche Auflösung ist sehr hoch und es zeigen sich auch hier Bereiche von einigen Quadratmikrometern, welche frei von Vesikelausschüttung sind. Damit kann es durchaus vorkommen, daß keine Fusionsstelle über einem Gate des Transistors liegt und auch keine Signale gemessen werden.

Im Schnitt läßt sich aus den Bildern eine „release site“ pro Quadratmikrometer bestimmen. Es ist also wahrscheinlich, daß sich mehrere verschiedene „release sites“ über einem Gate befinden.

Diese Experimente zeigen, daß es möglich ist, mit dem Transistor einzelne Vesikel zu detektieren und orts aufgelöst die Vesikelausschüttung zu messen.

Hierbei ist die Ausbeute an erfolgreichen Messungen relativ hoch. Unter guten Zellkulturbedingungen und Beschichtungen liefern fast alle adhärenierten Zellen Transistorsignale, wobei wie in der Amperometrie große Unterschiede in den einzelnen Zellaktivitäten gesehen werden. Hier sei auf die Messung mit einem Array von 128×128 Transistoren in Kapitel 6.2 verwiesen, auch hier koppeln sehr viele Zellen.

Damit stellt sich unweigerlich die Frage nach dem zugrunde liegenden Meßprinzip und was dieses von den etablierten unterscheidet.

Kapitel 4

Die Protonen als Träger der Exozytose-Silizium-Kopplung

In diesem Kapitel wird die Kopplung zwischen den Vesikeln und dem Feldeffekttransistor eingehender untersucht und auf die hohe Konzentration der Protonen innerhalb der Vesikel zurückgeführt. Dafür werden zwei verschiedene Wege besprochen. Zum einen ist die Diffusion der Protonen innerhalb des Zell-Chip-Spaltens von der Konzentration des Protonenpuffers abhängig, und wir erwarten einen Einfluß der Pufferkonzentration auf das Transistorsignal. Zum anderen kann die Protonenkonzentration innerhalb der Vesikel durch Membranporen verändert werden. Auch hier muß sich das Transistorsignal der ausgeschütteten Vesikel ändern, wenn die Protonen die Ursache der Kopplung bilden.

4.1 Dynamik der Exozytose: Amperometrie

Um die Dynamik der Exozytose zu bestimmen und zu überprüfen, ob diese selbst nicht von der Konzentration des extrazellulären Puffers abhängt, wird die Exozytose amperometrisch untersucht. In direktem Kontakt der Kohlefaser zur Membran liefert die Amperometrie Auskunft über das zeitliche Verhalten der Vesikelausschüttung. Der Vesikelinhalt ist ein sehr komplexes saures Assoziat und es wurde gezeigt, daß sowohl der pH-Wert der Extrazellulärlösung sowie die Konzentration an monovalenten und divalenten Ionen die Dynamik der Exozytose verändern [Jan93, Jan94, Bor97, Hol86, Pol84].

Hier wird durch eine Variation der extrazellulären Pufferkonzentration überprüft, ob die Exozytose selbst von der extrazellulären pH-Pufferkonzentration unbeeinflusst ist.

Um die Dynamik der Exozytose zu quantifizieren, wurden die Amplituden, die Anstiegszeit von 10% bis 90 % der Amplitude sowie die 90%-10% Abfallszeit durch einfach exponentielle Funktionen gefittet und zudem das Integral über den Strom als Maß für die insgesamt ausgeschütteten Catecholamine berechnet. Bei Signalen mit Fuß wurde die 50%-90% Anstiegszeit gefittet, der Fuß wurde bei dem Integral über dem Strom berücksichtigt. Es wurde für drei unterschiedliche Konzentration von 5 mM, 10 mM und von 20 mM des Extrazellulärpuffers HEPES gemessen. Für 5 mM HEPES wurden an 5 Zellen 354 Peaks, bei 10 mM HEPES an 5 Zellen 457 Peaks und bei 20 mM HEPES an 7 Zellen 593 Peaks ausgewertet.

In Abb. 4.1 sind die kumulierten Verteilungen der Fitparameter bei den verschiedenen Pufferkonzentrationen gezeigt. Es zeigt sich kein signifikantes Verhalten in den Verteilungen, obwohl

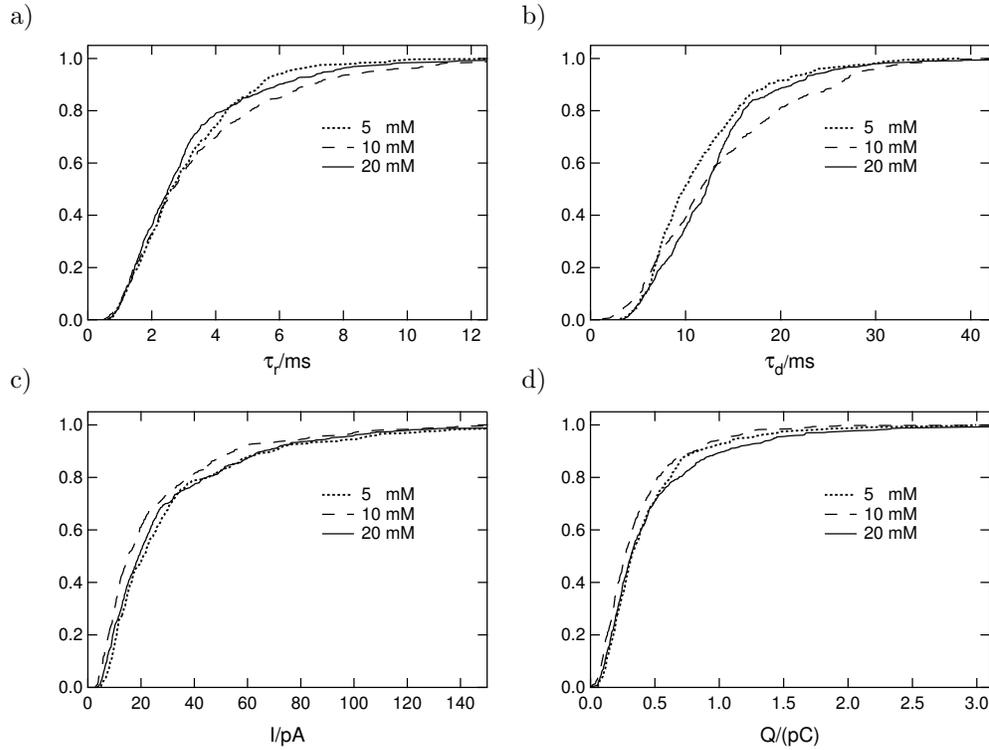


Abbildung 4.1: Kumulierte Häufigkeitsverteilung der charakteristischen amperometrischen Größen bei verschiedenen extrazellulären Pufferkonzentrationen. a) Die Anstiegszeiten τ_r , haben für verschiedene Puffer sehr ähnliche Verteilungen und auch die Medianwerte unterscheiden sich kaum. b) Die Verteilungen der Zerfallszeiten τ_d . Die Mediane variieren leicht zwischen den verschiedenen Pufferkonzentrationen, ausgeprägte Tendenzen gibt es aber nicht. Dies sind auch nicht in der Amplitude in c und in der gesamten Ladung, Abb. d, zu finden. Die extrazelluläre Pufferkonzentration hat keinen Einfluß auf das amperometrische Signal.

die Mediane in den Amplituden leicht variieren. Für 5 mM HEPES ergibt sich ein Wert von 20.9 pA, für 10 mM einer bei 15.2 pA und für 20 mM HEPES ein Wert von 19.0 pA. Der Median der Anstiegszeit ist 2.6 ms, 2.7 ms, 2.5 ms für 5, 10, 20 mM HEPES; die Abfallszeiten liegen bei 9.9, 11.6 und 12.2 ms.

Auch die Mediane des integrierten Stroms zeigen mit 0.32 pA, 0.27 pA und 0.31 pA für die entsprechenden HEPES-Konzentrationen keine spezifischen Tendenzen. Während die gemessenen Mediane der Anstiegs- und die Abfallszeiten gut mit der Literatur übereinstimmen [Xu99, Gra00, Wal96a], sind die Amplituden sowie die Ladung eher klein.

In der Literatur wird meist der Mittelwert angegeben, für die Ladung reichen diese von 0.5-1.3 pC, im Vergleich zu den hier ermittelten Mittelwerten von 0.4-0.5 pC [Wig91, Fin96, Jan93, Jan94, Zho96, Wal96b, Wal96a].

Diese Diskrepanz wird zum einen an den benutzten Kohlefasern liegen, die Kohlefasern wurden weder aktiviert [Cah95] noch poliert, zum anderen an der Platzierung der Faser. Da mit einem aufrechten Mikroskop gearbeitet wurde, wurden die Fasern wegen der besseren Sichtbarkeit seitlich an die Zelle gefahren. Zwar wurde versucht, die Faser nicht direkt auf die Oberfläche der Kulturschale aufzusetzen, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der in den

Spalt zwischen Zelle und Kulturschale ausgeschütteten Vesikel ebenfalls gemessen wurde. Für den Fit wurde keine höhere Mindestamplitude der Signale als das dreifache Peak-Peak-Rauschen des Verstärkers bestimmt. Auch wurde nacheinander an jeweils willkürlichen Zellen gemessen und die Daten wurden nicht nach Zellen mit hohen Stromamplituden gepulst. Die Diskrepanzen in den gemessenen Ladungen sind aber bekannt und werden meist auf obige Punkte zurückgeführt [Hal98].

Wir kommen zu dem Ergebnis, daß die amperometrischen Signale und damit die Ausschüttung der Catecholamine unabhängig von der Konzentration des extrazellulären pH-Puffers sind.

Damit können Auswirkungen des extrazellulären pH-Puffers auf das Transistorsignal auf einen Einfluß des Puffers auf die Kopplung zwischen Zelle und Transistor zurückgeführt werden. Obwohl die Zusammensetzung der Extrazellulärlösung, wie in anderen Studien gezeigt, einen Einfluß auf die Dynamik der Exozytose hat, ist diese von der Pufferkonzentration unabhängig. Gezeigt ist dieses durch die Amperometrie nur für die Freisetzung der Catecholamine. Geht man von einer starken Assoziation des Vesikelkomplexes aus, so ist dieses auch für die Ausschüttung der anderen Inhaltsstoffe des Vesikels plausibel, wenn auch nicht zwingend. Die Ursache für diesen unerwartet langsamen Zerfall der Matrix ist teilweise in der langsamen Dissoziation des Komplexes zu suchen. Nun kann der Einfluß der Pufferkonzentration auf das Transistorsignal untersucht werden.

4.2 Der Einfluß der extrazellulären Pufferkonzentration auf das Transistorsignal

Wenn das durch Exozytose hervorgerufene Transistorsignal hauptsächlich auf die Protonen des Vesikels zurückzuführen ist, erwartet man eine Abhängigkeit des Signals von dem pH-Puffer der Extrazellulärlösung. Nach Gleichung 2.19 wird sich die Dynamik des Transistorsignals ändern, der effektive Diffusionskoeffizient der Protonen nimmt mit zunehmender Konzentration des mobilen Puffers zu und die Zeitkonstante der Signale sollte damit abnehmen. Da sich mit zunehmender Konzentration des Extrazellulärpuffers das Puffergleichgewicht zwischen mobilen und fixierten Puffer verschiebt, sollten auch die Amplituden der Signale mit steigenden Konzentrationen kleiner werden.

Der Protonenpuffer HEPES bindet kaum andere Stoffe als Protonen, die weiteren Inhaltsstoffe des Vesikels bleiben damit unverändert [Goo66], wodurch eine Signaländerung allein auf das Puffern von Protonen zurückgeführt werden kann. Insbesondere Calcium kommt noch in relativ hohen Konzentrationen in den Vesikeln vor und könnte als Ursache für die Signale in Frage kommen. Die Bindungskonstante von Calcium und HEPES ist aber mit einem pK-Wert von 0.82 sehr klein [Chr03], Calcium bleibt praktisch ungepuffert.

In Abb. 4.2 ist ein Experiment gezeigt, bei dem nach der Stimulation die extrazelluläre HEPES-Konzentration im Verlauf der Messung geändert wurde. Da sowohl die Frequenz als auch die Amplituden der Signale in der Amperometrie und auf dem Transistor im allgemeinen mit zunehmender Meßdauer abfallen, wird die Pufferkonzentration von 20 mM im späteren Verlauf der Messung auf 5 mM HEPES gewechselt; ein Anstieg in den Amplituden wird damit signifikanter. Nach der Stimulation mißt der Transistor starke Exozytose, die Kohlefaser liefert Signale mit kleinerer Frequenz. Über den markierten Bereich (—) wird die Pufferkonzentration auf 5 mM gesenkt, während dieser Zeit ist ein deutlicher Anstieg in den Amplituden zu sehen. Gleichzeitig bleiben die Signale der Kohlefaser unverändert, die Frequenz nimmt eher ab. Obwohl es sich um breite Verteilungen in den Amplituden handelt, läßt sich ein visueller Eindruck erhalten.

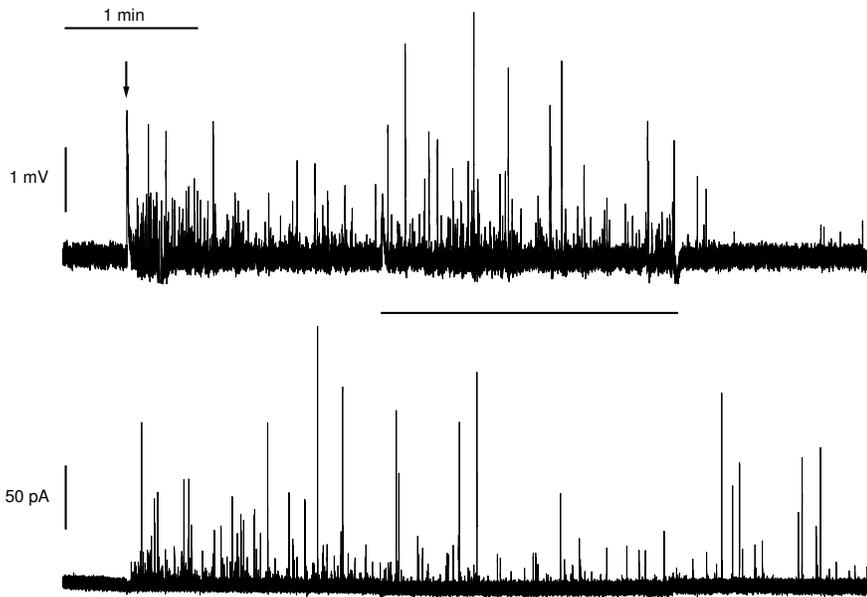


Abbildung 4.2: Die Auswirkung der extrazellulären Pufferkonzentration auf das Transistorsignal. Nach der Stimulation mit Barium (\downarrow) zeigen sowohl der Transistor (oben) als auch die Amperometrie (unten) massive Vesikelausschüttung an. Über den markierten Bereich (—) wird die Konzentration des Extrazellulärpuffers von 20 mM auf 5 mM gesenkt. Während die Kohlefaser hier gleichbleibende oder leicht rückgängige Vesikelausschüttung mißt, ist im Transistorsignal deutlich ein Anstieg der Amplituden sowie der Aktivität zu sehen.

Beim erneuten Wechsel des Puffers auf die höhere Konzentration am Ende der Messung erlöschen die Signale im Transistor fast gänzlich. Die jeweils fünf größten Transistorsignale der beiden Pufferkonzentrationen sind in Abb. 4.3 gemittelt dargestellt. Es zeigt sich, daß sich nicht nur die Amplitude der Signale ändert sondern auch die Zeitkonstante ihres Abfalls.

Für eine detailliertere Untersuchung der Abhängigkeit der Transistorsignale von der extrazellulären Pufferkonzentration wurden die gleichen Parameter wie bei der Amperometrie bestimmt. Die Amplitude, das zeitliche Integral über das Signal sowie die Anstiegszeit und die Abfallszeit wurden ermittelt. Die Messungen wurden auf Transistoren mit der Gategröße von $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ ausgeführt. Die Diagramme sind in Abb. 4.4 gezeigt. Während in den Anstiegszeiten τ_r , Abb. 4.4a, kaum eine Auswirkung der extrazellulären Pufferkonzentration festzustellen ist, die Mediane lie-

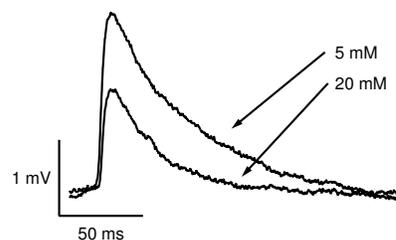


Abbildung 4.3: Für die verschiedenen Pufferkonzentrationen aus Abb. 4.2 sind die jeweils fünf größten Transistorsignale gemittelt dargestellt. Die Amplitude und die Zeitkonstante des Abfalls sinken mit zunehmender Pufferkonzentration.

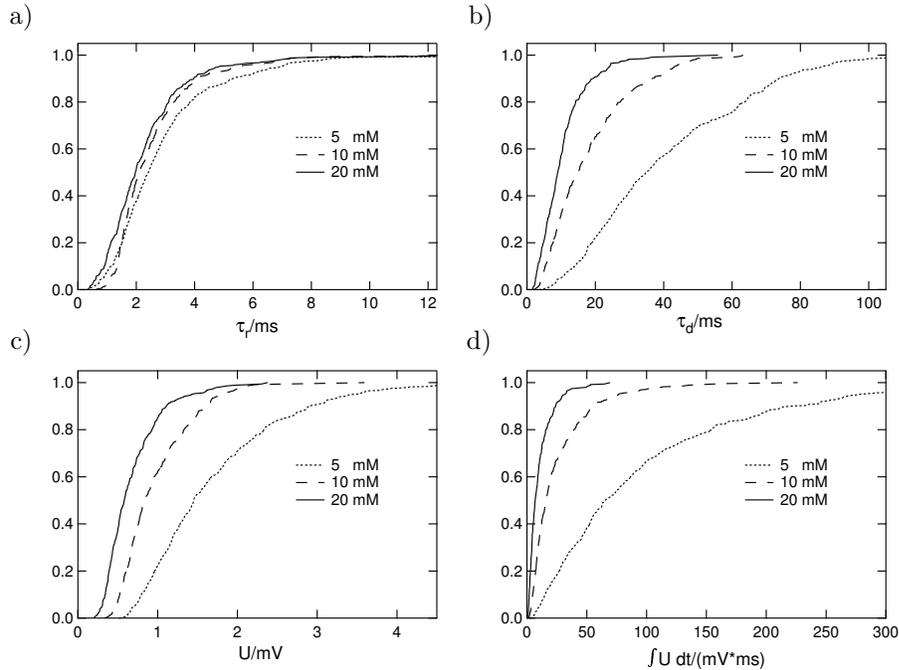


Abbildung 4.4: Kumulierte Häufigkeitsverteilung der charakteristischen Größen der Signale auf einem $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ großen Transistor unter verschiedenen Pufferkonzentrationen. a) Die Anstiegszeiten der Signale τ_r bleiben von der extrazellulären Pufferkonzentration weitestgehend unbeeinflusst, während sowohl die Abfallszeit τ_d (b) als auch die Amplitude U unter erhöhter Pufferkonzentration merklich abnehmen. Als Konsequenz fällt auch das zeitliche Integral über das Signal ab (d). Die Transistorsignale zeigen eine starke Abhängigkeit von der extrazellulären Pufferkonzentration.

gen bei 2.4 ms, 2.1 ms sowie 2.0 ms für 5, 10 und 20 mM HEPES, sind sowohl die Abfallszeit τ_d als auch die Amplitude U , Abb. 4.4b und c, stark von der Pufferkonzentration abhängig. Der Medianwert der Abfallszeit fällt von 35.0 ms auf 14.9 ms und schließlich auf 9.0 ms ab. Auch in den Amplituden sieht man diese Tendenz: Die Mediane der Signalamplituden sinken von 1.45 mV auf 0.83 mV und schließlich auf 0.58 mV bei den Pufferkonzentrationen von 5, 10 und 20 mM. Das zeitliche Integral über die Transistorsignale wird bei fallender Amplitude und sinkender Zeitkonstante des Abfalls kleiner, Abb. 4.4d. Kann in der Amperometrie dem Integral als Ladung die gesamte Menge an ausgeschütteten Catecholaminen zugeordnet werden, so hat dieser Wert für die Transistorsignale keine so große Bedeutung, da er nicht die Anzahl der insgesamt freigesetzten Protonen beinhaltet.

Die Transistorsignale zeigen also im Gegensatz zu den amperometrischen eine starke Abhängigkeit von der extrazellulären Pufferkonzentration.

Das ist ein schweres Indiz, daß die Protonen des Vesikels die Ursache für das Transistorsignal sind.

4.3 Vergleich der charakteristischen Signalparameter

Es werden die amperometrischen Daten mit denen der großen Transistoren und danach die Transistordaten der großen mit denen der kleinen Gateflächen verglichen. Ein Modell der Transistorsignale wird sich daran messen müssen, wie gut es die verschiedenen Daten erklärt.

4.3.1 Vergleich der Amperometrie- mit den Transistorsignalen

Übereinstimmungen und Differenzen sollen aufdecken, inwiefern die Daten der Amperometrie als Parameter eines Quellterms bei einem Modell der Transistordaten benutzt werden können.

Die Anstiegszeiten der Amperometriedaten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Transistordaten. Obwohl die beiden Meßmethoden auf verschiedenen Grundlagen basieren und mit verschiedenen Randbedingungen behaftet sind, liegen die Anstiegszeiten bei der Amperometrie mit 2.6 ms gegenüber den 2.2 ms der Transistorsignale dicht beisammen; diese scheinen etwas schneller anzusteigen.

Ein anderes Bild ergibt sich bei den Abfallszeiten. Hier ist die Amperometrie mit 11.2 ms nur mit den Daten der Transistoren bei hohen Pufferkonzentrationen von 20 mM HEPES mit 9 ms vergleichbar, die Werte für niedrigere Pufferkonzentrationen liegen mit 15 und 35 Millisekunden deutlich höher. Ob die Zeitkonstante der Amperometrie eine untere Schranke für die der Transistormessungen darstellt, kann hier nicht geklärt werden, doch scheint der Einfluß des Puffers bei zunehmender Konzentration abzunehmen. Eine Übereinstimmung der unteren Grenze wäre insofern wichtig, als daß sie es erlauben würde, die amperometrischen Parameter als Quellterm für die Freisetzung der Stoffe aus dem Vesikel im allgemeinen, also auch für das Transistorsignal zu benutzen.

Den Integralwerten kommt bei den beiden Methoden unterschiedliche Bedeutung zu. In der Amperometrie spiegelt dieser Wert die gesamte Anzahl an ausgeschütteten Catecholaminen wider und unter der Annahme konstanter intragranularer Catecholaminkonzentration damit auch direkt das Vesikelvolumen. Dieses gilt für die Protonen bei den Transistormessungen nicht, da das Integral ebenfalls stark durch die Dynamik der Vesikelfusion beeinflußt wird.

Da sowohl die Anstiegszeiten als auch die Abfallszeiten der Transistor- und der Amperometriesignale bei hohen Konzentrationen des Puffers dicht beisammen liegen, wird die Dynamik der Amperometrie für die Freisetzung des Vesikelinhalts für eine Modellvesikelfusion benutzt.

4.3.2 Vergleich zwischen Transistorsignalen verschiedener Gategrößen

Um zu bestimmen, inwiefern die dynamischen Parameter des Transistorsignals von der Gategröße und damit von einer räumlichen Mittelung abhängen, wurden die Messungen auch auf den Transistoren der Größe $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ gemacht. Aus Mangel an funktionstüchtigen Chips ist die Datenlage allerdings nicht so gut, dennoch sollen die Verteilungen zumindest als Anhaltspunkt in Abb. 4.5 gezeigt werden (sechs Zellen, 942 Peaks bei 5 mM HEPES, zwei Zellen, 142 Peaks bei 10 mM, eine Zelle, 124 Peaks bei 20 mM).

Die Medianwerte für die Anstiegszeit sind 4.3, 3.2 und 3.3 ms, d.h. sie scheinen für höhere Pufferkonzentrationen eher zu sinken. Bei den Anstiegszeiten zeigt sich, daß sie auf den kleinen Gates größer sind, insbesondere für die signifikanten Daten bei 5 mM existiert ein deutlicher Unterschied der Mediane von 4.3 zu 2.4 ms.

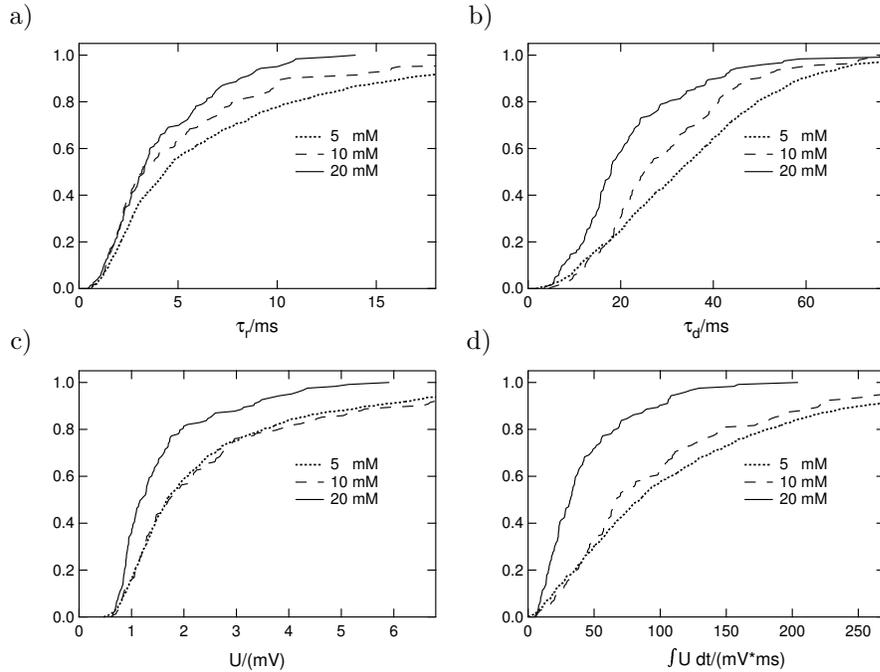


Abbildung 4.5: Kumulierte Häufigkeitsverteilung für die Transistorgröße von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. Während die Anstiegszeiten τ_r (a) und die Abfallszeiten τ_d (b) den Verlauf der Messungen auf den großen Gates und ihre Medianwerte widerspiegeln, sind die Amplituden nicht so stark von der Pufferkonzentration abhängig und unerwartet klein (c). Es muß angemerkt werden, daß die Datenlage bei den höheren Pufferkonzentrationen nicht sehr gut ist.

Die Abfallszeiten sind 33.5, 25.1 und 18 ms für die verschiedenen Pufferkonzentrationen. Dabei stimmen die Mediane der Abfallszeiten für die geringe Pufferkonzentration mit 33.5 ms zu 35.0 ms relativ gut überein, die höheren Konzentrationen passen nicht so gut, allerdings ist die Datenlage auch dünn in diesem Bereich.

Die Integralwerte spiegeln das Verhalten der Amplituden und Abfallszeiten wider. Für die niedrige Pufferkonzentration sind die der großen und kleinen Gates fast gleich, die höheren Konzentrationen zeigen starke Unterschiede.

Mit den Medianwerten von 1.7, 1.7 und 1.2 mV bei 5, 10 und 20 mM HEPES hat die Amplitude zumindest für die hohe Pufferkonzentration die Tendenz abzunehmen. Bei den Amplituden ist auffällig, daß die kleineren Transistoren kaum höhere Signale messen als die großen.

Da die Amplituden durch eine Spannungsvariation des Bades über die gesamte Gatefläche erreicht werden, erwartet man bei einem Flächenverhältnis der Gates von zehn zu eins bei lokalen Signalen auch ein solches Amplitudenverhältnis. Dieses wird nicht beobachtet. Für ein Modell ist die Frage, wie lokal die Signale auf dem Transistor sind, bedeutend und diese muß geklärt werden. Bei den beiden gezeigten Beispielen von Messungen mit kleinen Gates in Abb. 3.6 und Abb. 3.8 ist deutlich zu sehen, daß jeweils ein Transistor wie erwartet erhöhte Signale mißt, während die anderen, obwohl ebenfalls komplett durch die Zelle bedeckt, dieses nicht tun.

Es ist nicht bekannt, daß Vesikel unterschiedlicher Größe an verschiedene Ausschüttungsorte verteilt werden und amperometrische Messungen mit kleinen Platinelektroden an einzelnen Zellen sprechen gegen eine solche Annahme [Haf05]. Man muß hier von einem Kopplungsproblem zwischen der Zelle und dem Chip ausgehen. Ein Punkt für die kleinen Amplituden mag in der anderen Oberflächenstruktur der kleineren Transistorarrays liegen. Die Zelle liegt zwischen den Gates auf den um einige hundert nm erhöhten „local oxid“ auf. Der Abstand zwischen Zelle und Gate ist aber von entscheidender Bedeutung für die Signalhöhe. Der langsame Anstieg der Signale auf den kleinen Gates unterstützt diese Annahme.

Wenn es ein Problem bei der Kopplung auf den kleinen Transistoren gibt, darf dann der Schluß, daß die Signale lokalisiert sind, überhaupt aus diesen Messungen gezogen werden?

Informativer ist als ein Blick auf die Amplituden ist einer auf die Zeitkonstanten der Signale auf den verschiedenen Gategrößen. Wären die Signale nicht lokalisiert, so würde man einen langsameren Anstieg und Abfall auf den großen Gates als auf den kleinen erwarten. Eine schlechte Kopplung auf den kleinen Gates wird diesen Effekt noch vergrößern. Das ist nicht so.

Weiterhin ist die Lokalität auch dadurch gestützt, daß die Parameter der Peaks weitestgehend unabhängig von der Lage der Zelle zur Gatefläche sind. Hier soll insbesondere auf die Abbildung 4.6 verwiesen werden, eine Vesikelfusion, die mit Sicherheit an der Kante der Zelle stattgefunden hat und dennoch ein durchschnittliches Zeitverhalten besitzt.

4.4 Das Auflösungsvermögen der Transistoren

Ein Vergleich der Amplituden läßt die Frage aufkommen, wieviele Vesikel der Transistor auflöst und welcher Teil der Volumenverteilung aus Abbildung 2.3 von ihm detektiert wird. Das Auflösungsvermögen ist von zentraler Bedeutung für die Transistormessung als Methode zur Messung von Exozytose.

Der dynamische Bereich der Amperometrie von einem Picoampere bis zu mehreren hundert ist wesentlich höher als der der Transistorsignale von 0.1 mV bis ca. 5 mV, welches nahe legt, daß der Transistor kleine Vesikel nicht detektiert.

Als ein Indiz für das Auflösungsvermögen wird zuerst das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Transistors betrachtet.

Der Medianwert von 1,4 mV der Transistorsignale ist bei 5 mM HEPES mehr als einen Faktor zehn über dem Rauschlevel der Transistoren. Nimmt man an, daß das Signal in erster Linie proportional zum Vesikelvolumen ist und legt die Volumenverteilung aus Abbildung 2.3 zugrunde, dann kommt man zu dem Schluß, daß nicht viele Vesikel undetektiert bleiben.

Ein schlagfertiges Argument ist aber, daß der Transistor Fusionsporen detektiert. Die Abbildung 4.6 zeigt ein Amperometriesignal mit dem dazugehörigen Transistorsignal. Da das Amperometriesignal relativ groß ist und es keinen zeitlichen Versatz dieses Signals zum Transistorsignal durch Diffusion gibt, hat die Fusion in direkter Umgebung der Kohlefaser stattgefunden. Deshalb gibt die Amplitude des Kohlefaserstroms verglichen mit dem Transistorsignal direkt das Auflösungsvermögen des Transistor wieder.

In dieser Messung löst der Transistor eine Fusionspore mit einer amperometrischen Amplitude von nur 7 pA auf. Der zeitliche Versatz ist ungefähr 10 ms, d.h. es sind insgesamt 0.07 pC an Ladung geflossen. Die Häufigkeitsverteilung der amperometrischen Amplituden in Abb. 4.1 zeigt, daß wir damit schon weit am Anfang der Verteilung sind. Obwohl dieses Vesikel sicherlich nicht optimal auf den Transistor ausgeschüttet wurde und die langsame Ausschüttung der Substanzen bei einer Pore dem Transistorsignal auch abträglich ist, ist die Auflösung des Transistors bei dieser Messung erstaunlich hoch.

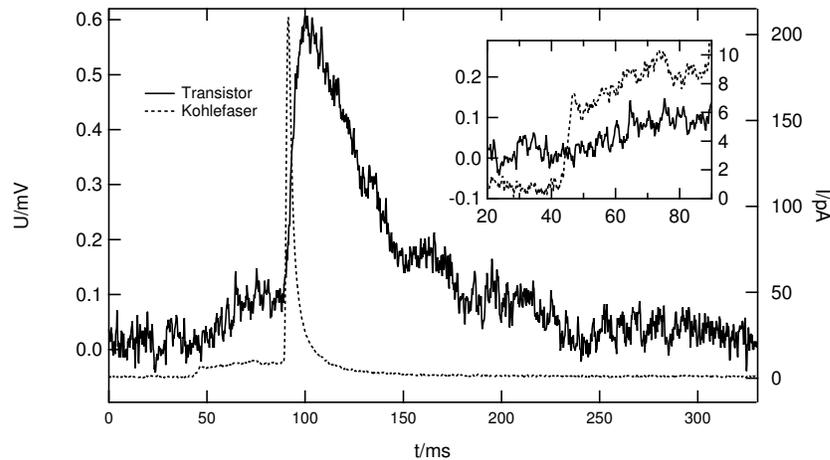


Abbildung 4.6: Ein direkter Vergleich des Kohlefaserstroms mit dem dazugehörigen Transistorsignal zeigt dessen Auflösungsvermögen. Aufgrund der Größe und Dynamik des amperometrischen Signals kann von einer Ausschüttung des Vesikels in unmittelbarer Umgebung der Kohlefaser ausgegangen werden. Zu Beginn der Fusion löst der Transistor einen Fluß durch eine Fusionspore auf, der einem Strom von 7 pA entspricht (Inset). Die Auflösung des Transistors ist in diesem Fall sehr hoch.

Es ergibt sich, daß der Transistor fast alle ausgeschütteten Vesikel mißt.

Dieses ist natürlich sehr erfreulich und wichtig für die Methode. Als Anhaltspunkt könnte auch ein Vergleich der Häufigkeit der gemessenen Signale bezogen auf die Meßfläche dienen. Für beide Methoden ist es allerdings äußerst schwierig, die wirklich effektive Meßfläche zu bestimmen. Selbst für amperometrische Messungen mit direktem Kontakt der Faser zur Zellmembran werden Vesikel gemessen, die nicht unmittelbar unter ihr stattgefunden haben [Hal98]. In der gewählten Anordnung der Kohlefaser ist das Problem noch viel größer. Beim Transistor ist die Lage ähnlich. Es ist nicht bekannt, innerhalb welcher Fläche Vesikel registriert werden. Nicht nur das Bestimmen der effektiven Flächen stellt ein Problem dar, auch die Zellen gelten als polarisiert, d.h. die „release sites“ sind nicht homogen verteilt, sondern bevorzugt zur adhärennten Membran gerichtet [Cl99]. Insgesamt wäre das Ergebnis eines solchen Vergleiches zu wackelig und wird nicht gemacht.

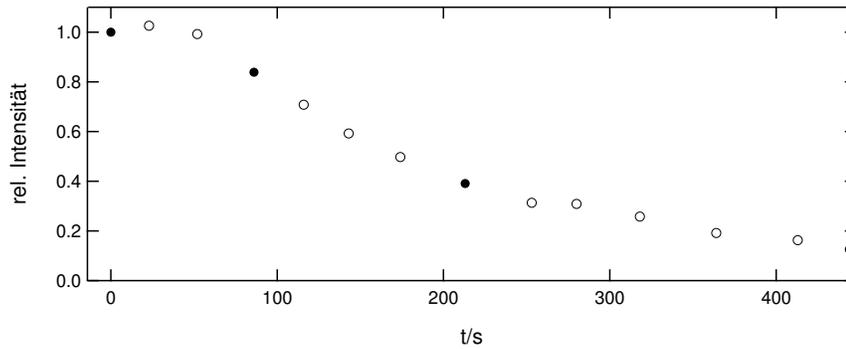
4.5 Equilibrieren des ΔpH der Vesikel durch Poren

Mit der Abhängigkeit des Transistorsignals von der Pufferkonzentration der Extrazellulärlösung gibt es einen ersten Hinweis, daß das Transistorsignal durch die vom Vesikel ausgeschütteten Protonen entsteht.

Falls es möglich wäre, die Protonenkonzentration innerhalb der Vesikel zu verändern, die restlichen Bestandteile aber unverändert zu lassen, so böte dieses eine direkte Bestätigung dafür, daß hauptsächlich die Protonen zum Transistorsignal beitragen. Dieses soll nun experimentell überprüft werden.

Eine Möglichkeit, den niedrigen pH-Wert der Granulen zu zerstören, gibt die Pore Nigericin in Verbindung mit dem Carrier Valinomycin. Die beiden Substanzen sind lipidlöslich und bauen sich

a)



b)

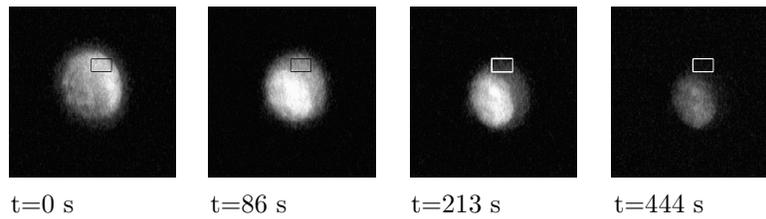


Abbildung 4.7: Fluoreszenzintensität einer mit Acridin Orange gefärbten Zelle. a) Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenz nach Zugabe der Pore Nigericin und des Carriers Valinomycin zu $t = 0$. Die Fluoreszenz nimmt nach der Zugabe merklich ab, ein Zeichen für das Equilibrieren des pH-Wertes der Granulen. b) Aufnahmen zu den markierten Zeiten (●). Da Acridin Orange an die DNA bindet, ist der Zellkern stark angefärbt und muß außerhalb des zur Intensitätsbestimmung ausgewählten Gebiet (gerahmt) liegen.

bei Zugabe in die zellularen Membranen ein. Nigericin hat eine hohe Permeabilität für Protonen und Kalium und gilt als Protonen-Kalium-Austauscher. Da chromaffine Granulen mit 20 mM schon eine relative hohe intragranulare Kaliumkonzentration besitzen, ist durch das Applizieren der Pore Nigericin allein kein vollständiges Equilibrieren der Protonenkonzentration gewährleistet. Es besteht die Gefahr, daß sich über die Membran durch die Pore ein elektrochemisches Potential für Protonen aufbaut, welches deren Ausfluß stoppt. Deshalb wird zusätzlich der Carrier Valinomycin benutzt. Dieser Carrier besitzt eine hohe Permeabilität für Kaliumionen. Da sowohl die Protonenkonzentration als auch die Kaliumkonzentration bei normalen physiologischen Lösungen intragranular erhöht sind und sich deshalb für beide Ionen ein Potential aufbauen kann, wird die extrazelluläre Kaliumkonzentration durch Austausch gegen Natrium auf 80 mM und damit über die Kaliumkonzentration der Vesikel erhöht. So können effektiv Protonen des Vesikels gegen Kaliumionen der Lösung getauscht und der pH-Wert der Granulen auf das extrazelluläre Niveau angehoben werden [Bla01, Wu01, Spi02, Joh76, Pol79]

Die Wirkung der Substanzen wird mit dem Farbstoff Acridin Orange veranschaulicht. Acridin Orange ist ein Farbstoff, der mit einem pK-Wert von ca. 10.5 bei einem pH-Wert von 7.2 hauptsächlich protoniert ist, die unprotonierte Form ist membrangängig. Für diese stellt sich ein Gleichgewicht über die Membran ein, die Konzentration der protonierten Form steigt beim Färben mit $5 \mu\text{M}$ innerhalb des Vesikels auf $250 \mu\text{M}$. Bei solch hohen Konzentrationen aggregiert der Farbstoff, wodurch seine Fluoreszenz im Roten zunimmt [Zan52, Zoc99, Cle98, Tab92, Pal91]. In Abbildung 4.7a sehen wir die Fluoreszenz einer mit Acridin Orange angefärbten Zelle im Roten.

Da Acridin Orange an die DNA des Zellkerns bindet, fluoresziert dieser relativ intensiv und darf nicht innerhalb des ausgewerteten Gebiets liegen 4.7b. Nach der Zugabe von $3\ \mu\text{M}$ Nigericin und $5\ \mu\text{M}$ Valinomycin unter einer auf $80\ \text{mM}$ erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration zu der Zeit $t = 0$ nimmt die Intensität mit einer Zeitkonstante von ungefähr $250\ \text{s}$ ab.

Die Fluoreszenzmessung mit Acridin Orange bestätigt die Wirkung der Substanzen und das Zerstören des vesikulären pH-Gradienten.

Zum Equilibrieren des pH-Wertes muß eine Lösung mit erhöhter Kaliumkonzentration benutzt werden. Es gibt Hinweise darauf, daß Kalium an die Oberfläche des Feldeffekttransistors bindet [Bri05, Bou83] und es muß daher geprüft werden, ob der Einsatz einer hohen Kaliumkonzentration an sich nicht schon die Messung signifikant ändert.

Abbildung 4.8 zeigt die Abhängigkeit des Oberflächenpotentials vom pH-Wert bei einer hohen Kaliumkonzentration. Die Abhängigkeit ändert sich im Vergleich zu einer normalen physiologischen Lösung (siehe Abb. 5.2) kaum. Der Offset beim Wechsel zur Lösung mit hoher K-Konzentration betrug ungefähr $20\ \text{mV}$; der Arbeitspunkt des Transistors muß deshalb nicht gewechselt werden.

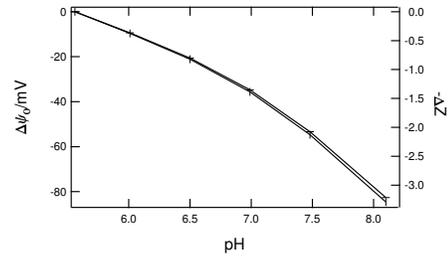


Abbildung 4.8: Die Änderung des Oberflächenpotentials in Abhängigkeit des pH-Werts bei einer hohen Kaliumkonzentration von $80\ \text{mM}$. Das Verhalten entspricht dem in der normalen physiologischen Lösung aus Abb. 5.2.

Die erhöhte Kaliumkonzentration der Extrazellulärlösung beeinflusst die Sensitivität des Transistors bezüglich Protonen nicht.

In Abbildung 4.9 sehen wir die Wirkung der Poren unter der erhöhten Kaliumkonzentration. Zum markierten Zeitpunkt werden die Poren sowie Barium zum Stimulieren der Zelle appliziert. Es setzt sofort Exozytose ein, welche jedoch im Transistor innerhalb von ca. $20\ \text{s}$ erlischt, während die Amperometrie weiterhin Catecholaminausschüttung mißt.

Ein weiteres Experiment zeigt Abb. 4.10. Sowohl im Transistor (Abb. 4.10a oben) als auch im Kohlefaserstrom (4.10a unten) gibt es nach einem kurzen Burst zu Beginn der Applikation einen Einbruch in der Exozytose. Im Unterschied zu dem vorhergegangenen Experiment setzen die Signale simultan wieder ein, im Transistor aber mit einer deutlich reduzierten Amplitude. In Abbildung 4.10b sieht man die Signale zu den markierten Zeitpunkten (*) in zeitlich höherer Auflösung. Nach dem Abfall des Stimulationsartefakts zeigt der Transistor unmittelbar nach der Stimulation Signale mit $2\ \text{mV}$ Amplitude (oben links), welche in der Kohlefaser Ströme von $1\text{-}2\ \text{pA}$ hervorrufen (unten links). Zu dem späteren Zeitpunkt tragen die Amperometrieströme gleiche Amplituden, während die Transistoren nur noch minimale Signale von ca. $0,2\ \text{mV}$ detektieren.

Das nach einem kurzen Burst vorübergehende Aussetzen der Exozytose wurde häufig beobachtet. Aus dem nicht völligen Versiegen der Transistorsignale kann man folgern, daß die Kopplung zum Transistor noch vorhanden ist, die Zelle ist über die gesamte Messung adhärent ¹.

¹Insgesamt wurden sechs Experimente mit Nigericin und Valinomycin erzielt, bei denen zu Beginn gute Kopplung sowohl an den Transistor als auch an die Kohlefaser bestand. Ein weiteres Experiment zeigte zwar sehr gute Kopplung an beide Methoden, wurde aber durch die Poren nicht darin beeinflusst. Der einzige Unterschied war die sehr große Exozytoseaktivität. Unter einer wirklich hohen Aktivität stellt sich aber die Frage, inwiefern die Poren im Spalt wirken können.

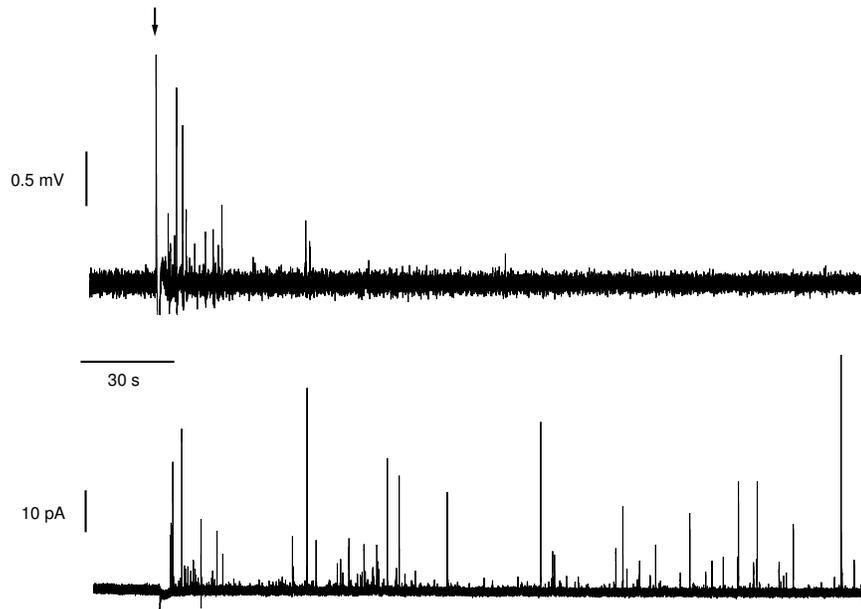


Abbildung 4.9: Applikation der Poren Valinomycin und Nigericin. Transistor- (oben) und Amperometriesignale (unten) im Vergleich. Nach der Zugabe von Barium, Nigericin und Valinomycin (\downarrow) bricht das Transistorsignal innerhalb von 20 s vollständig ein, während die Amperometrie fortlaufend Exozytose detektiert.

Wir kommen zu dem Schluß, daß die Signale im Transistor auf die hohe Protonenkonzentration innerhalb der Vesikel zurückgeführt werden können.

Auffallend ist die unterschiedliche Dynamik der Wirkung der Poren in der Fluoreszenz und dem Transistor. Die Fluoreszenz ändert sich auf einer Zeitskala von Minuten, das Transistorsignal innerhalb von Sekunden.

Das langsame Verhalten im Entfärben wurde an Zellen bei der Zugabe von Ammoniumchlorid (nächster Abschnitt) beobachtet [Kui89]. Bei Untersuchungen an aufgereinigten synaptischen Granulen zeigt sich indes ebenfalls ein Fluoreszenzänderung innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe der Poren [Bar88, Tab92]. Es muß deshalb angenommen werden, daß die langsame Dynamik in der Fluoreszenz mit dem Zellkompartiment zusammenhängt, auch kann eine gewisse Interaktion zwischen dem Farbstoff und den Vesikelinhalt nicht ausgeschlossen werden [Sal80, Mic04].

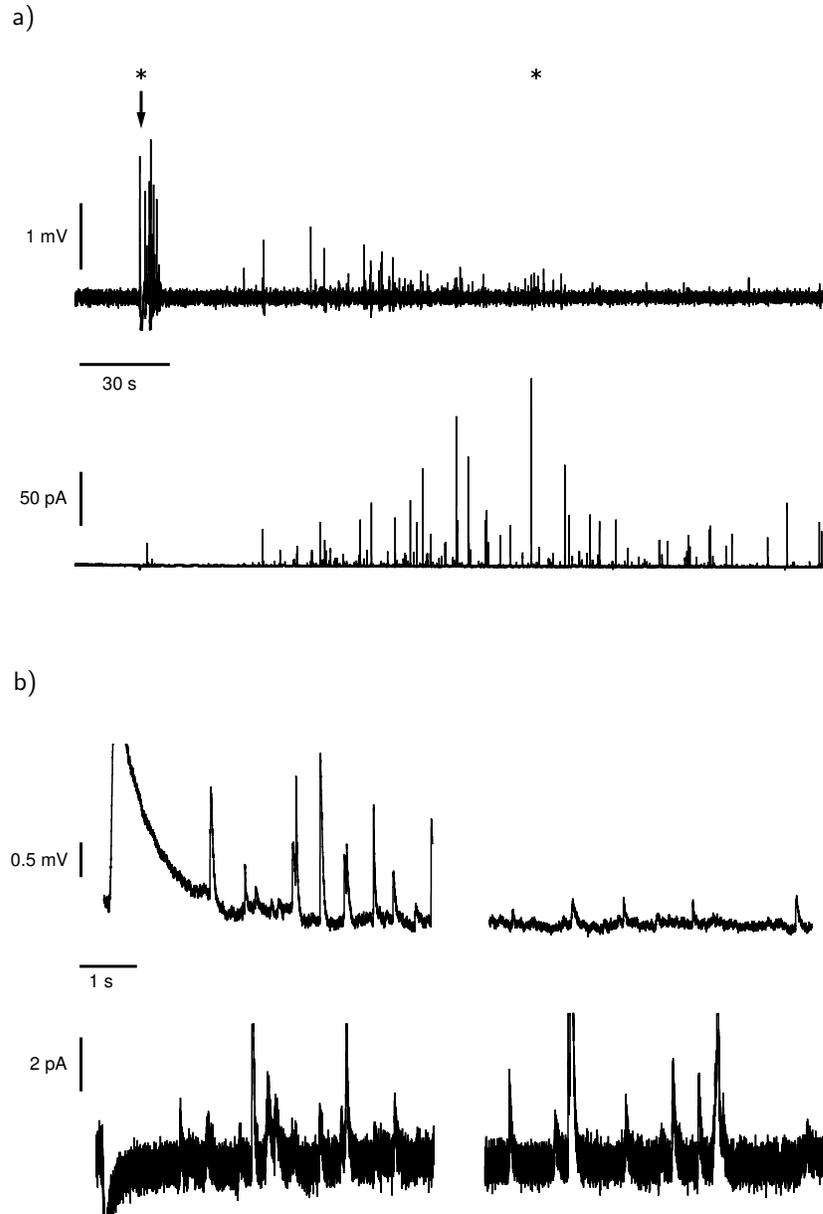


Abbildung 4.10: a) Transistor- und Amperometriesignale eines weiteren Experiments. Nach der Zugabe von Barium, Nigericin und Valinomycin (\downarrow) ist deutlich ein Burst im Transistorsignal (oben) zu sehen, danach scheint die Exozytose für einige Sekunden aufzuhören, auch die amperometrischen Ströme (unten) verschwinden. Nachdem die Exozytose wieder einsetzt, sind die Signale im Transistor drastisch reduziert und verschwinden schließlich gänzlich, während die Kohlefaser die Ausschüttung von Catecholaminen mißt. b) Die Signale in höherer Auflösung zu den markierten Zeiten (*). Trotz gleicher Ströme an der Kohlefaser (unten) haben simultane Ereignisse im Transistor (oben) zu dem späteren Zeitpunkt eine wesentlich kleinere Amplitude.

4.6 Wirkung von Ammoniumchlorid

Vor den Experimenten mit der Pore Nigericin und dem Carrier Valinomycin wurde versucht, mittels Ammoniumchlorid zu dem gleichen Ergebnis zu gelangen. Ammoniumchlorid ist ebenfalls eine häufig benutzte Substanz zum Ändern des intragranularen pH-Wertes. Mit einem pK-Wert von 9.25 ist Ammoniumchlorid schwach basisch, es liegt bei einem pH-Wert von 7.2 hauptsächlich in der protonierten Form als Ammoniumion NH_4^+ vor, nur ein kleiner Teil ist Ammoniak NH_3 . Diese ungeladene Form ist membrangängig, d.h. sie diffundiert durch Membranen, während das Ammoniumion aufgrund seiner Ladung die Lipidmembranen der Vesikel nicht durchqueren kann (Abb. 4.11). Ammoniumchlorid ist vielseitig benutzt worden, um den pH-Wert von Vesikeln zu erhöhen. Die Anwendung von Ammoniumchlorid ist einfacher als die der vorherigen Substanzen, es wird in einer Konzentration von 10 mM der extrazellulären Lösungen beigelegt. Das Problem ist seine in der Literatur kontrovers diskutierte Wirkung.

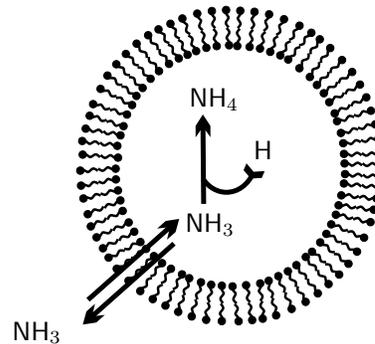


Abbildung 4.11: Wirkung von NH_4Cl . Das ungeladene NH_3 ist membrangängig und equilibriert über die Vesikelmembran. Intragranular wird es aufgrund des niedrigeren pH-Wertes vermehrt protoniert, wodurch dort der pH-Wert steigt.

Zum einen herrscht Unklarheit darüber, inwieweit der pH-Wert der Granulen wirklich angehoben wird. Es wird von einem leichten Anheben [Bla01, Wut94, Hol83] bis zum völligen Equilibrieren des pH-Wertes [Pol79, San00, Wil00, Tar03, Mie98, Wil00] gesprochen. Nimmt man an, daß die Membran für NH_3 ideal durchlässig, für NH_4^+ absolut undurchlässig ist, so wird NH_3 in das Vesikel diffundieren und dort protoniert, solange bis die intragranulare Konzentration an NH_3 gleich der äußeren ist. Damit ergibt sich, daß der pH-Wert des Vesikels bei Zugabe von 10 mM NH_4Cl zur Extrazellulärlösung von 5.5 auf ca. 6.5 steigt, dabei ist die Konzentration von NH_4^+ im Vesikel ca. 50 mM.

Unter dieser Annahme ist ein völliges Equilibrieren des granularen pH-Wertes unmöglich und ein weiteres Ansteigen geschieht nur dann, wenn die Vesikelmembranen für Ammoniumionen etwas durchlässig sind oder wenn es einen aktiven Transport für Ammonium aus dem Vesikel gibt.

Auch ist unklar, wie sich Ammoniumchlorid auf die Exozytose an sich auswirkt. Während in [Hol83] von normaler Ausschüttung unter Ammoniumchlorid berichtet wird, zeigen neuere Studien einen Rückgang der Exozytose während der Anwendung von NH_4Cl um 50-60% [Orn95, Kui89]. Dabei soll die Wirkung schnell ($< 20\text{s}$) und reversibel sein [Kui89].

Daß Ammoniumchlorid den pH-Wert der Granulen beeinflusst, zeigt wieder eine Fluoreszenzmessung mit Acridin Orange. In Abb. 4.12 ist die Fluoreszenzintensität im Roten einer angefärbten chromaffinen Zelle bei Zugabe von 10 mM NH_4Cl gezeigt. Nach der Zugabe sinkt die Intensität, ein Zeichen dafür, daß der pH-Wert innerhalb der Granulen steigt und sich die Aggregate des Acridin Orange auflösen. Inwiefern der pH-Wert steigt, ob auf einen Wert von 6.5 oder ins Gleichgewicht mit der Extrazellulärlösung auf 7.2, läßt sich anhand der Fluoreszenz nicht bestimm-

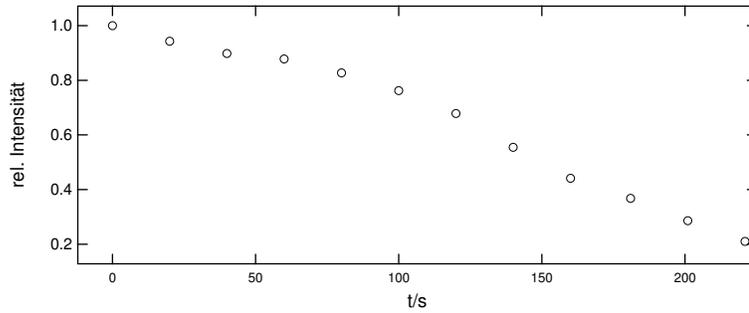


Abbildung 4.12: Fluoreszenzänderung einer Acridin Orange gefärbten Zelle nach Zugabe von NH_4Cl bei $t = 0$. Nach der Zugabe von NH_4Cl sinkt die Fluoreszenz im Roten merklich ab, ein Zeichen dafür, daß der pH-Wert der Vesikel ansteigt.

men. Die Konzentration von Acridin Orange sinkt bei einem Anstieg des pH-Wertes innerhalb des Vesikels auf 6.5 bereits so tief, daß sich ein Großteil der Aggregate auflöst [Zan52] und keine Fluoreszenz im Roten mehr zu erwarten ist.

Für einen Anstieg auf einen pH-Wert von 7.2 müssen Protonen aktiv aus dem Vesikel über die Membran transportiert werden. Von dem Ammoniumion ist bekannt, daß es an Natrium-Kalium-Austauscher bindet [Cou96], welcher sich auch in der Membran der chromaffinen Vesikel befindet. Damit wäre zumindest ein Weg dahin offen.

Ein Vergleich mit dem zeitlichen Verlauf der Intensität beim Anwenden der Poren Nigericin und Valinomycin zeigt, daß Ammoniumchlorid im Fluoreszenznachweis etwas schneller wirkt. Aus diesem Grund und weil kein extrazelluläres Kalium hinzugefügt werden muß, wurde dieses Experiment auch zuerst durchgeführt.

In Abb. 4.13 ist der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Amperometrie sowie die Transistorsignale gezeigt. Die Meßsituation ist wie in den vorangegangenen Experimenten.

Nach dem Wechsel auf eine 10mM-haltige NH_4Cl Lösung (—) bricht sowohl in der Amperometrie als auch auf dem Transistor das Signal ein. Dieser Einbruch geschieht innerhalb von ca. 30 s und scheint zumindest ein Stück weit reversibel zu sein; zum Ende der Messung in NH_4Cl -freier Lösung setzt wieder Exozytose ein.

Der Einbruch war oftmals so stark, daß die Exozytose gänzlich vererbte und eine Datenerhebung unmöglich wurde. In sechs Experimenten wurden die Amplituden U bzw. I , Anstiegszeiten τ_r und Zerfallszeiten τ_d der Transistor- sowie der Amperometriesignale bestimmt, die Daten wurden nicht gemischt, da die Diversität unter den Zellen zu groß ist. Die Medianwerte der sechs Messungen sind für die Transistordaten in Abb. 4.14a, für die Amperometriedaten in b dargestellt. Gezeigt sind die Mediane in physiologischer Lösung vor \circ , während \bullet und nach \diamond der Zugabe von 10 mM NH_4Cl .

Die Anstiegs- sowie die Abfallszeit der Transistorsignale bleiben von NH_4Cl unbeeinflusst. Die Kinetik der Vesikelfusion ändert sich nicht.

Die Amplituden der Transistoren zeigen eine nicht zu verkennende Tendenz abzunehmen, mehr aber auch nicht.

Da die vorhergehenden Experimente zum Equilibrieren des pH-Wertes erfolgreich waren, ist es also unmöglich, den pH-Wert der Granulen durch Ammoniumchlorid auf das extrazelluläre Niveau anzuheben. Damit ergibt sich der nur geringe Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Amplitude. Der Vesikelinhalt wird durch Einfluß von Ammonium höher gepuffert,

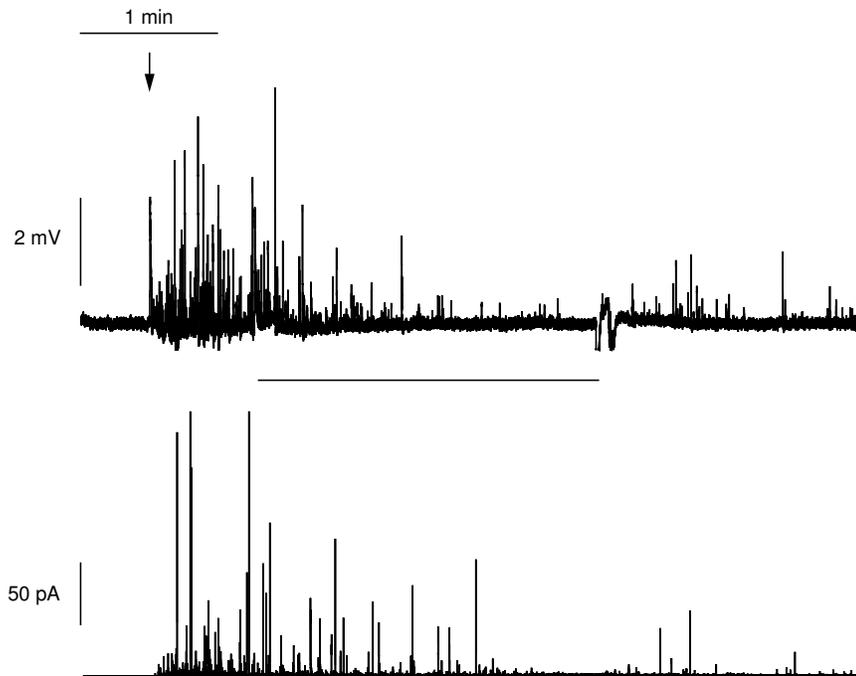


Abbildung 4.13: Exozytose unter Einfluß von Ammoniumchlorid. Nach der Stimulation (↓) zeigt sich in dem Transistor (oben) sowie in der Amperometrie (unten) normale Exozytose, unter 10 mM Ammoniumchlorid (—) bricht diese jedoch für beide innerhalb von ca. 30 s ein. Beim erneuten Wechsel auf die ammoniumchloridfreie Lösung scheint sich die Exozytose zu erholen.

wodurch der pH-Wert leicht steigt. Dieses wird mit dem Farbstoff gezeigt.

Die gesamte Anzahl an den bei einer Vesikelfusion freigesetzten Protonen wird allerdings nicht geändert und so auch nicht die Amplitude des Signals.

Die Daten der Amperometrie 4.14b sind relativ leicht zu interpretieren. Die charakteristischen Eigenschaften der Fusion bleiben unter der Einwirkung von Ammoniumchlorid erhalten.

Mit dem starken Einbruch der Exozytose in beiden Methoden werden die Ergebnisse bestätigt, daß die Häufigkeit der Ausschüttung von Vesikeln von Ammoniumchlorid stark beeinflusst ist und die Exozytose fast gänzlich erlischt.

Daß überhaupt eine Auswirkung von Ammoniumchlorid auf das Transistorsignal gemessen werden kann, mag an leicht löchrigen Vesikelmembranen liegen. Auffällig war, daß der Offset in der Amperometrie unter der NH_4Cl deutlich stieg, er erhöhte sich um ca. 2 pA und viel nach dem Wechsel auf physiologische Lösung wieder langsam ab. Von Aminen ist bekannt, daß sie zelluläre Membranen angreifen [Mun99]. Der erhöhte Offset würde dann auf eine leckige Zellmembran hindeuten durch die zytosolische Catecholamine austreten. Im Zytosol von chromaffinen Zellen befinden sich ca. 700 μM oxidierbare Catecholamine [Mos03], genug, um über einen langen Zeit-

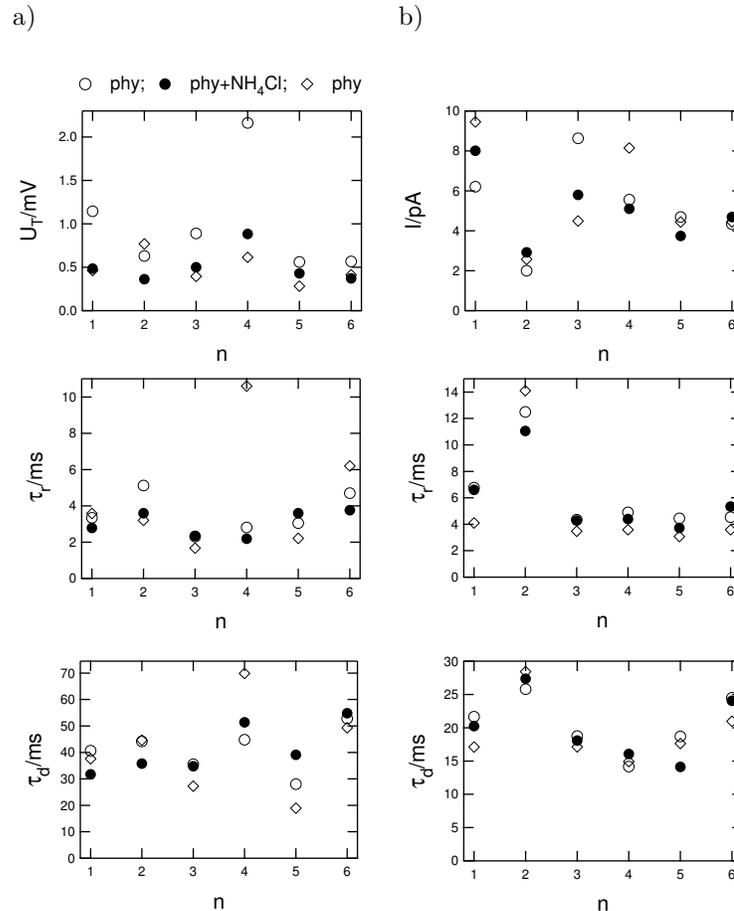


Abbildung 4.14: Medianwerte der Amplituden (oben), Anstiegs- sowie Abfallszeiten (Mitte bzw. unten) der Transistor-(a) sowie der Amperometriedaten (b) von sechs Zellen vor (○), während (●) und nach (◇) der Applikation von 10 mM NH₄Cl. Während die Amperometrie von Ammoniumchlorid unbeeinflusst bleibt, zeigt sich im Transistor ein leichtes Abnehmen der Amplitude.

raum aus der Zelle zu diffundieren. Die löchrige Membran erklärt auch den kleineren Einbruch der Exozytose in [Orn95], wurde hier nicht amperometrisch, sondern die von Zellschichten in das Medium abgesonderten Catecholamine gemessen, welche bei einer porösen Membran erhöht sind ².

Der schnellere Abfall in der Fluoreszenz bei der Anwendung von NH₄Cl gegenüber der bei der von Poren spricht ebenfalls dafür.

²Da der Einbruch zumindest ein Stück weit reversibel ist, kann man davon ausgehen, daß das Barium zu Stimulieren nicht vollständig durch die poröse Membran ausgeschwemmt wird, d.h. die Stimulation geht nicht zurück, weil das Barium fehlt.

Kapitel 5

Modellierung der Transistorsignale

5.1 Systemparameter

Nach dem experimentell nachgewiesen wurde, daß das Transistorsignal auf die hohe Protonenkonzentration innerhalb der Vesikel zurückzuführen ist, wird nun der Zell-Chip-Kontakt charakterisiert. Dazu gehören der Abstand der Zelle zur Chipoberfläche sowie das Verhalten der Transistoren unter verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken der Badlösung. Mit diesen Parametern werden die zu erwartenden Signale im Transistor unter Einbeziehung der in Kapitel 2 gelegten Grundlagen modelliert.

5.1.1 Der Zell-Substrat-Abstand

Ein wichtiger Parameter ist der Abstand von der Zelle zur Chipoberfläche. Dieser Abstand geht in die Konzentration der fixierten Puffergruppen und damit in die Diffusionsgleichung 2.15 ein und hat eine direkte Auswirkung auf das gemessene Transistorsignal. Der Abstand wird mittels der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie ermittelt [Bra97, Lam96]. Hierfür werden die Zellen auf speziellen Siliziumstrukturen gewachsen, welche aus Stufen unterschiedlicher Oxiddicke auf einer glatten Siliziumfläche bestehen und die Zellmembran wird mit einem lipidlöslichen Farbstoff angefärbt. Licht wird an der Siliziumfläche reflektiert und interferiert nahe der Oberfläche mit sich. Anregung und Emission finden in Form von stehenden Wellen statt. Aufgrund der verschiedenen Oxiddicken ändert sich die Intensität des Lichtes, mit der der Farbstoff in der eingefärbten Membran angeregt wird; es entsteht ein charakteristisches Muster. Diese Messungen erlauben einen präzisen Rückschluß auf den Zell-Substrat-Abstand. Für chromaffine Zellen auf mit Kollagen beschichteten Siliziumdioxid ergibt sich ein Abstand von ungefähr 32 nm. Dieser Abstand ist, verglichen mit anderen Zellabständen, relativ klein, es ist von Abständen zwischen 50 und 90 nm berichtet worden [Gle04]. Der kleinere Abstand wird auf die modifizierten Zellkulturbedingungen zurückgeführt.

5.1.2 Charakterisierung der Oxidoberfläche

Die physikalischen Eigenschaften des Oxides und damit des Transistors können innerhalb der vorgestellten Theorie mittels zwei Parameter beschrieben werden.

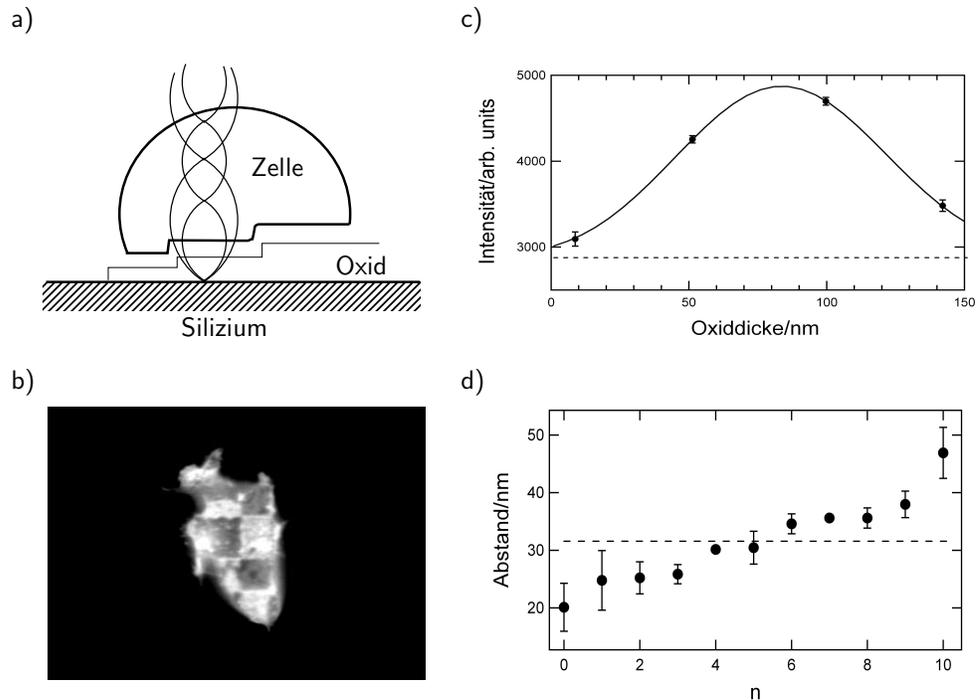


Abbildung 5.1: Abstandsbestimmung der unteren Zellmembran zur Oberfläche des Oxides. a) Prinzip der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie: einfallendes und emittiertes Licht werden an der Siliziumoberfläche reflektiert. Aufgrund der unterschiedlichen Oxiddicken ändern sich die Intensitäten mit denen der Farbstoff in der angefärbten Membran angeregt wird und die mit denen er abstrahlt. b) Eine angefärbte Zelle auf einem Chip mit unterschiedlichen Oxidstufen. Es bilden sich charakteristische Intensitäten in den Quadraten gleicher Oxiddicke aus, die einen Rückschluß auf den Abstand der Membran zur Oberfläche ermöglichen. c) Die gemessenen Intensitäten werden ausgewertet, die Theorie liefert den Abstand als Fitparameter. d) Der mittlere Abstand der unterem Membran verschiedener Zellen zur Oxidoberfläche beträgt 32 nm.

Die Gleichgewichtskonstante K für die Protonenbindung an die Silanolgruppen legt die Lage der Pufferkurve fest, ein kleiner Wert für K entspricht einer zu hohen pH-Werten verschobenen Kurve, ein großer Wert einer zu niedrigen. Wir stellen an diesen Wert die Forderung, daß die Pufferkurve im für uns relevanten Bereich ungefähr linear ist, da ein Transistor ein zum pH-Wert lineares Signal liefert. Aus der Literatur sind eine Vielzahl an Siliziumdioxidoberflächen gemessenen Gleichgewichtskonstanten für Protonen bekannt, sie reichen von $pK=2$ bis $pK=8$ [Hua93], insofern haben wir eine gewisse Freiheit.

Wir benutzen den ebenfalls in der Literatur vertretenen Wert $pK=5.7$ [Sca92].

Der zweite Parameter ist die Oberflächendichte der Silanolgruppen N . Mit diesem Wert wird die Änderung des Oberflächenpotentials bei der Änderung des pH-Wertes sowie der Ionenkonzentration der Lösung eingestellt. Als Höchstwert kann hier der Wert für ein dichtes Gitter für Silanolgruppen mit der Gitterkonstante der Siliziumdioxidoberfläche dienen, der Wert liegt bei $5.4 \cdot 10^{18} m^{-2}$. Die wirkliche effektive Dichte kann aber stark von diesem Wert abweichen, da

die Oberfläche geputzt, beschichtet und schließlich auch mit Zellen versehen wird, Prozesse, bei denen Gruppen bereits abgesättigt werden können. Wir benutzen einen Wert, der die gemessene Änderung des Oberflächenpotentials beim Titrieren der Oberfläche mit Lösungen verschiedener Protonenkonzentrationen wiedergibt.

Um die Steigung zu messen, werden Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes mit konstanter Ionen-

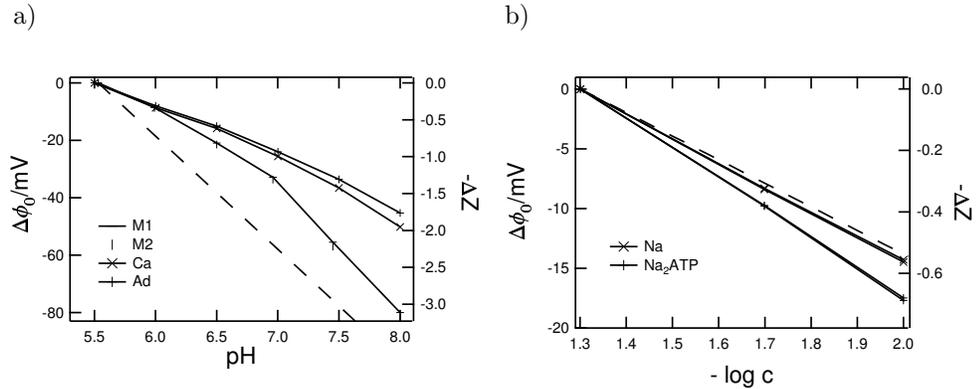


Abbildung 5.2: Die Änderung des Oberflächenpotentials in Abhängigkeit des pH-Wertes sowie der Natriumkonzentration der Lösung. a) Der Verlauf von vier verschiedenen Transistoren ist eingezeichnet. Die Transistoren M1 und M2 (auf einem „burried channel“-Chip) zeigen ein fast ideales Verhalten und kommen nahe an das theoretische Limit von $\partial\psi_0/\partial pH = -39 \text{ mV}$ (---), während die Transistoren, mit denen die meisten Messungen in dieser Arbeit gemacht wurden, Ca ($2 \times 20 \mu\text{m}^2$ Gatefläche) und Ad ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$), mit ca. -20 mV pro pH deutlich unter dieser Grenze bleiben. b) Das Oberflächenpotential in Abhängigkeit der Natriumkonzentration der Lösung. Gezeigt ist die Änderung des Potentials bei den Konzentrationen von 10 mM, 20 mM und 50 mM für Natriumchlorid (\times) sowie für 5 mM, 10 mM und 25 mM Adenosintriphosphatdinatriumsalz Na_2ATP (+). Das theoretische Limit von ca. -20 mV (---) pro Dekade für hohe Werte der Oberflächendichte der Silanolgruppen ist für Na-ATP leicht unterschritten.

nenkonzentration von 140 mM, das entspricht den physiologischen Werten, über den Transistoren ausgetauscht.

Die gemessenen Verläufe sind in Abb. 5.2a zusammen mit der theoretischen Grenze nach Gl. 2.8 gezeigt. Dabei handelt es sich um die Messungen mit vier verschiedenen Transistoren auf drei Chips. Die Transistoren M1 und M2 liegen auf einem „burried channel“-Chip [Voe05]. Sie zeigen ein fast ideales Verhalten mit einer Steigung von ca. 36 mV pro pH. Die in dieser Arbeit hauptsächlich benutzen Transistoren haben mit 20 mV/pH eine deutlich niedrigere Steigung. Zum einen ist der Grund darin zu suchen, daß unterschiedliche Meßaufbauten zum Vermessen benutzt wurden, die sich verschieden resistent gegen eine Drift erwiesen; zum anderen darin, daß die Chips vor der Messung unterschiedlich aufbereitet worden sind. Die Chips M1 und M2 wurden gereinigt und danach für einige Minuten mit 1 M Salzsäure behandelt und sofort vermessen. Die anderen Chips kamen direkt aus einem Zellkulturzyklus. Es zeigt sich auch, daß die Abhängigkeit des Oberflächenpotentials vom pH-Wert kritisch bezüglich der Vorbehandlung des Chips ist; mit den M1 und M2 Transistoren wurden vor der Reinigung und HCl-Behandlung nach einer Nacht unter physiologischer Lösung Steigungen von nur 8 mV pro pH gemessen. Die Ursache hierfür ist unklar, muß aber notgedrungen etwas mit der Absättigung der Oberflächenladungen durch Fremdstoffe zu tun haben.

Nach Abb. 2.7 wählen wir die Dichte der Oberflächenladung zu $1 * 10^{18} \text{ m}^{-2}$ und haben dann eine Änderung des Oberflächenpotentials von ca. -24 mV pro pH . Mit diesem Wert erhalten wir eine Änderung des Oberflächenpotentials bezüglich der Ionenkonzentration von $-30 \text{ mV pro Dekade}$ in der Ionenkonzentration (Abb. 2.7b), welche gut mit den gemessenen -29 mV übereinstimmt.

Weiterhin verhält sich nach Abbildung 5.2 das Natrium-ATP ähnlich wie Natriumchlorid. Das negative Ion ATP hat als ein Hauptbestandteil des Vesikelinhalts kaum einen Einfluß auf das Oberflächenpotential des Transistors.

5.2 Grundlegende Modelle

Nachdem wir die relevanten Systemparameter bestimmt haben, wollen wir nun ein Transistor-signal modellieren. Dazu wird während der Diffusion gemäß (2.23) der Satz von Gleichungen (2.24–2.30) simultan mittels eines Newton-Raphson-Algorithmus auf einem Gitter gelöst.

5.2.1 Instantane Quelle

Da die Fläche und die Dynamik der Ausschüttung relativ unbestimmt sind, wollen wir zunächst die zentrale, instantane Ausschüttung eines Vesikels betrachten. Die Ausschüttung wird auf eine Fläche, die etwas kleiner als ein mittlerer Vesikelquerschnitt ist, beschränkt und der Inhalt des Vesikels auf reine Salzsäure HCl reduziert. Dieses kann als ein Minimalmodell betrachtet werden.

Extrazellulär befindet sich eine physiologische Lösung aus 140 mM Natriumchlorid, deren pH-Wert durch HEPES in verschiedenen Konzentrationen auf $\text{pH } 7.2$ gepuffert ist. Es wird das Gleichungssystem von 2.23 und 2.24–2.30 für $I = H^+, Na^+, Cl^-$ sowie für die Siliziumdioxidoberfläche als fixierten Puffer und HEPES als mobilen gelöst. Durch diese Reduktion können wir sehen, inwiefern sich das System wie das der einfachen Pufferdiffusion aus Abschnitt 2.7 verhält. Die Menge an HCl läßt sich aus der sehr gut bekannten Zusammensetzung der chromaffinen Granulen bestimmen, wenn man alle puffernden Gruppen mit ihren pK -Werten und ihren Konzentrationen kennt und diejenigen Protonen bestimmt, die bei einem Übergang von $\text{pH } 5.5$ nach $\text{pH } 7.2$ frei werden. Insgesamt ergibt sich eine Zahl von $1 * 10^6$ Protonen für ein Vesikel des mittleren Radius von 170 nm . Die Dichte der Silanolgruppen ist $1 * 10^{18} \text{ m}^{-2}$, die Dicke des Spaltes 50 nm ; damit ist die effektive Konzentration der Silanolgruppen im Spalt 33.2 mM . Für eine grobe Abschätzung der erwarteten typischen Zeitkonstanten der Diffusion in einer Scheibe wird

$$\tau = \frac{r_{Gate}^2}{5.78D_M} \left(1 + \frac{N_F}{N_M}\right)$$

benutzt. Diese Gleichung entstammt der Lösung der zweidimensionalen Diffusionsgleichung in Zylinderkoordinaten und gilt nur, wenn die niedrigste Mode die führende im betrachteten Fall ist. Deshalb kann sie nur auf die kleine Gategröße von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ angewandt werden. Die Zeiten liegen bei 2 bis 7 ms, je nach Pufferkonzentration.

Die über die Gategrößen gemittelten Potentiale sind für die verwendeten Transistoren von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ in Abbildung 5.3a sowie für die von $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ in 5.3b für eine instantane Quelle dargestellt

Um einen direkten Vergleich zum Experiment zu haben, ist die Darstellung des Oberflächenpotentials in Millivolt gewählt. Zum Zeitpunkt der Ausschüttung steigt das Oberflächenpotential sprunghaft an und zerfällt danach wieder annähernd exponentiell.

Die Zeitkonstanten für den Zerfall liegen für das Potential bei ca. 3 ms, 2 ms und 1.4 ms für die

Pufferkonzentration von 5, 10 und 20 mM HEPES. Da die Konzentration der freien Protonen zu den frühen Zeiten viel größer als die Pufferkonzentration ist und damit signifikant zur Protonendiffusion beiträgt, kann man nicht davon ausgehen, daß diese Näherung gilt.

Die Reduktion des Vesikelinhalts auf *HCl* birgt zwei Nachteile. Zum einen werden die lokalen

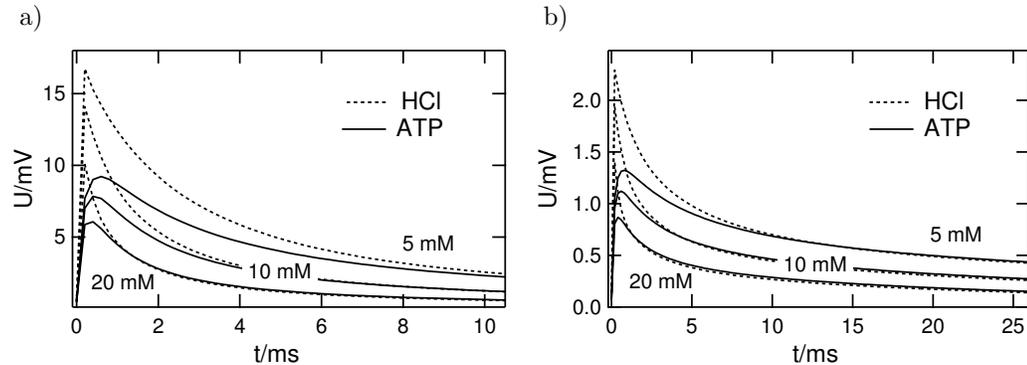


Abbildung 5.3: Simulierte Änderung des Oberflächenpotentials bei einer instantanen Punktquelle für die Gategrößen von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (a) und $20 \times 2 \mu\text{m}^2$ (b). Gezeigt sind die Potentialänderung bei Ausschüttung einer reinen *HCl*-Lösung sowie, etwas physiologischer, einer ATP-gepufferten. Für diese liegen die Amplituden bereits in der richtigen Größenordnung, jedoch sind die Zeitkonstanten für den Abfall viel zu klein.

pH-Werte kurzzeitig so hoch, daß man außerhalb des zum pH-Wert linearen Bereichs für das Oberflächenpotential ist, zum anderen sind diese niedrigen pH-Werte für einen Vesikelinhalt unphysiologisch, der Inhalt ist auf pH 5.5 gepuffert.

Deshalb wird dieses durch das Ausschütten von ATP, dem relevantesten Puffer im Vesikel, berücksichtigt. Dazu wird der Satz von simultan gelösten Gleichungen um das Puffergleichgewicht für ATP erweitert. Die Konzentration von ATP wird so gewählt, das beim Übergang von pH 5.5 nach 7.2 ebensoviel Protonen wie bei der reinen *HCl*-Ausschüttung freigesetzt werden.

Das Potential zum Zeitpunkt der Ausschüttung sinkt wie zu erwarten gegenüber der Ausschüttung von reinem *HCl* merklich (Abb. 5.3), für die Zeitkonstanten ergeben sich die Werte von 3.3, 2.5 und 2.0 ms für die verschiedenen Pufferkonzentrationen. Auch hier ist die „rapid buffer“-Näherung nur bedingt anzuwenden, so stellt ATP selbst einen mobilen Puffer dar und erhöht dadurch seine Konzentration. In der Näherung würde ein Verhältnis der Zeitkonstanten von 1:1.8:2.9 erwartet, es ergibt sich aber 1:1.33:1.62.

Kurz zusammengefaßt ergibt das stark reduzierte Minimalmodell folgendes:

Die Signalamplitude sinkt wie beobachtet mit steigender Pufferkonzentration. Unter der physiologischeren Ausschüttung eines ATP-Puffers sind die Amplituden auch in der richtigen Größenordnung.

Die Anstiegszeit ist schnell.

Ein Einfluß der Pufferkonzentration auf die Abfallszeit ist vorhanden, wenn auch etwas zu klein.

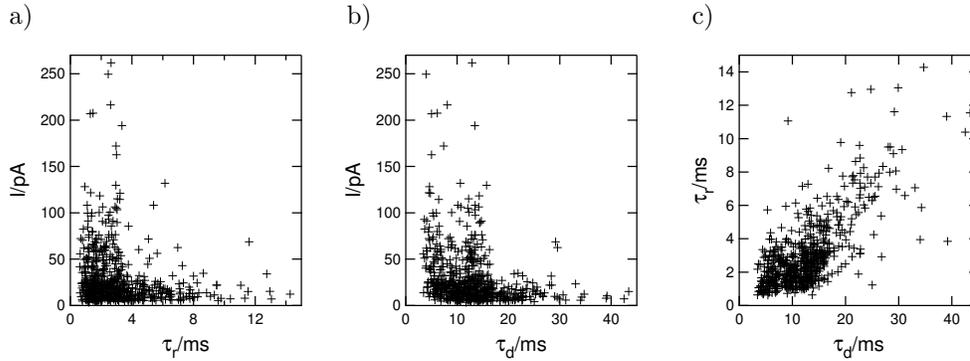


Abbildung 5.4: Streudiagramme amperometrischer Daten, exemplarisch für 20 mM Pufferkonzentration ($n=593$). a) Amplitude I versus Anstiegszeit τ_r . Bei kleinen Anstiegszeiten sind die Amplituden zu diesen unkorreliert, hohe Anstiegszeiten korrelieren mit kleinen Amplituden. b) Amplitude I gegen die Zerfallszeit τ_d . Auch hier sind nur die hohen Zerfallszeiten mit kleinen Amplituden korreliert. c) Die Anstiegszeit und die Abfallszeit sind besonders für hohe Anstiegszeiten korreliert. Durch die Korrelation der hohen Zeitkonstanten untereinander und mit kleinen Amplituden ordnen wir diesen Ereignissen Ausschüttungen zu, die nicht unmittelbar unter der Kohlefaser stattgefunden haben und deshalb diffusionsverbreitert sind. Insgesamt läßt sich dann schließen, daß es nur eine dynamische Klasse von Vesikeln gibt, deren Parameter weit streuen.

Die eigentliche Diskrepanz des Modells besteht in dem viel zu schnellen Abfall der Signale. Sie liegen mit einem Faktor zehn deutlich neben den beobachteten.

Die amperometrischen Daten zeigen, daß eine hier angenommene instantane Ausschüttung zumindest für die Catecholamine nicht richtig ist. Dieses wird jetzt korrigiert.

5.2.2 Dynamische Quelle

Es ist aus den amperometrischen Daten bekannt, daß die Vesikelausschüttung nicht instantan verläuft. Deshalb wird eine Quelle betrachtet, die zeitlich an den Verlauf der amperometrischen Signale angepaßt ist. Dafür muß zunächst geklärt werden, ob es verschiedene dynamische Klassen von Vesikeln gibt, oder ob in der theoretischen Beschreibung des Systems mit einem Modellvesikel mit konstanten Parametern gearbeitet werden darf.

Die Korrelation der Amplitude zu der Anstiegs- sowie der Abfallszeit ist in Abb. 5.4 exemplarisch für die 20mM Pufferkonzentration gegeneinander aufgetragen. Zunächst erscheinen zwei Populationen in den Streudiagrammen der Amplitude gegen die Anstiegs- sowie gegen die Zerfallszeit (Abb. 5.4a und b). Die größeren bestehen jeweils aus einer kleinen Anstiegs- bzw. Zerfallszeit mit einem breitem Spektrum in den Stromamplituden, die kleineren aus kleinen Stromamplituden mit einem breiten Spektrum an größeren Anstiegs- sowie Zerfallszeiten. Wenn wir annehmen, daß die größere Population aus Vesikelausschüttungen direkt unter der Kohlefaser hervorgeht, die kleinere aus welchen, die nicht direkt unter der Elektrode stattfanden, sondern durch Diffusion verbreitert sind, dann muß sich für die langsamen Signale eine Korrelation zwischen der Anstiegs- und der Abfallszeit ergeben. In Abb. 5.4c sind die Zeiten gegeneinander aufgetragen und es liegt wirklich eine Korrelation bei größeren Zeiten vor.

Damit sind die beiden Populationen auf eine zurückgeführt, deren Parameter, die Anstiegszeit, die Abfallszeit sowie die Amplitude weit streuen.

Für eine theoretische Beschreibung kann also mit einem Modellvesikel gerechnet werden, dessen Parameter den Medianwerten der auf die erste Population beschränkten Verteilung entspricht.

Die Exozytose chromaffiner Granulen läuft auf einer Zeitskala von einigen zehn Millisekunden ab. Die Ausschüttung von Catecholaminen steigt im Mittel mit einer Zeitkonstante von 2-3 ms an, bevor sie ihr Maximum erreicht und wieder mit einer Zeitkonstante von 10 ms zerfällt, wobei die Amplitude sowie die beiden Zeitkonstanten voneinander unabhängig sind.

Die instantane Quelle wird deshalb durch eine Quelle, deren zeitlicher Verlauf durch eine exponentiell modifizierte Gaußfunktion gegeben ist, ersetzt [Gru72, Jan94]. Die Funktion beschreibt den Fluß von Catecholaminen aus dem Vesikel und damit den Verlauf amperometrischer Signale relativ gut und ist

$$g(t) = \frac{A}{\tau \sigma \sqrt{2\pi}} \int_0^\infty e^{-\frac{(t-t_p-t')^2}{2\sigma^2}} e^{-\frac{t'}{\tau_d}} dt'.$$

Mit dem Parameter t_p wird sie längs der Zeitachse verschoben, σ gibt die Anstiegszeit und τ_d die Abfallszeit vor. Mit den aus der Amperometrie bekannten Daten wird σ gleich 2.5 ms und τ_d gleich 10 ms gesetzt. Bei diesen relativ langsamen Zeitparameter macht es keinen Unterschied,

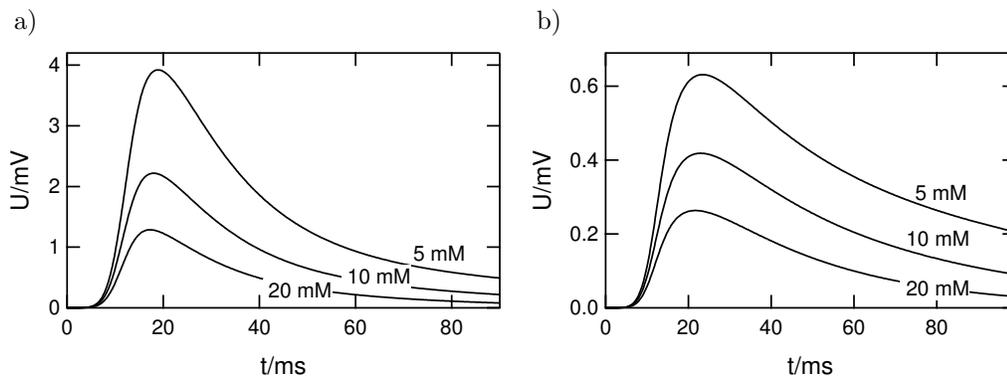


Abbildung 5.5: Modellierte Signale bei einer Punktquelle, die den zeitlichen Verlauf amperometrischer Daten widerspiegelt. Die Zeitkonstanten werden durch die extrazelluläre Pufferkonzentration kaum beeinflusst; auf den kleinen Gategrößen (a) sind die Amplituden im Bereich der beobachteten, die der großen (b) sind eher zu klein.

ob reine Salzsäure oder ATP-Puffer ausgeschüttet wird, deshalb sind nur die Simulationen für HCl in Abb. 5.5 dargestellt.

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild:

Die Amplituden nehmen mit den Werten von ca 4, 2.2 und 1.3 mV für die kleine Gatefläche schon beobachtete Größen an, für die großen sind sie jedoch einen Faktor zwei bis drei zu klein.

Die Zeitkonstanten des Abfalls sind mit 20 bis 40 Millisekunden ebenfalls in der beobachteten Größenordnung, allerdings gibt es im Modell einen Unterschied in den Zeitkonstanten

der verschiedenen Gateflächen von ungefähr einem Faktor zwei. Zudem unterscheiden sich die Zeitkonstanten der Signale für die verschiedenen Pufferkonzentrationen kaum.

Eine große Diskrepanz zeigen die Anstiegszeiten des Modells zum Experiment. Die Signale steigen innerhalb acht bis zehn Millisekunden an, deutlich zu langsam.

Dieses Modell mit einer an die amperometrischen Daten angepaßten zeitlichen Dynamik des Ausflusses an Stoffen trifft grob sowohl die Amplituden der Signale als auch ihren zeitlichen Abfall. Insbesondere zeigt es im Vergleich zum Minimalmodell einen deutlich langsameren und damit viel passenderen Abfall der Signale. Erkauft wird dieses durch Diskrepanzen in der Anstiegszeit und den Amplituden.

In Anbetracht der Komplexität der Vesikelfusion sowie den relativ unbestimmten System aus Zelle, Vesikelfusion, Spalt und Chip liefert es aber eine brauchbare Übereinstimmung. Der zu geringe Einfluß der Pufferkonzentration auf die Zeitkonstante des Abfalls läßt sich auf die Wahl der relativ niedrigen Oberflächendichte der fixierten Gruppen von $1 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$ zurückführen. Prinzipiell kann auch eine fünf- bis sechsfach höhere Dichte angenommen werden. Das der „fixed buffer“-Effekt durchaus einen Einfluß haben kann, zeigt Abb. 5.6. Hier sind die Transistorsignale für ein $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ großes Gate für verschiedene Oberflächengruppendichten abgebildet. Die Zeitkonstanten des Abfalls sind 30 ms, 21 ms, 18 und 15 ms für die Gruppensdichten von 5×10^{18} , 1×10^{18} , 5×10^{17} und $1 \times 10^{17} \text{ m}^{-2}$.

Es ist ein Faktor zwei in den Zeitkonstanten möglich und dies bei gängigen Werten für die Anzahl der Silanolgruppen.

Die Amplitude zeigt für die Dichte von $1 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$ ein Maximum. Unter der Zugabe einer konstanten Anzahl Protonen ist

$$\frac{\partial Z}{\partial N_H} = \frac{\partial Z}{\partial pH} \frac{\partial pH}{\partial N_H}$$

und hängt von der Änderung des Oberflächenpotentials bei sich änderndem pH-Wert (Abb. 2.7a) sowie der Änderung des pH-Wertes bei Protonenzugabe ab. Diese geht mit $1/((N_{eff} + N_B))$. Bei hohen Werten der Oberflächengruppendichte ändert sich die Steigung kaum. Während die Protonen zunehmend gepuffert werden, sinken die Signale. Bei geringen Dichten ist die Steigung sehr klein, auch hier sinken die Signale.

Für lange Zeitkonstanten im Abfall wird also eine hohe Anzahl von Oberflächengruppen benötigt, bei diesen hohen Dichten schwindet der Einfluß des mobilen Puffers auf die Amplitude aber zunehmend. Eine Gruppensdichte von $5 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$ entspricht einer Konzentration von ca. 180 mM Puffer im Spalt und es wird in den Amplituden keinen entscheidenden Unterschied machen, ob mit 185 mM als gesamtem Puffer bei 5mM oder mit 190 mM bei 10 mM extrazellulärer HEPES Konzentration gemessen wird. Experimentell zeigt sich hier jedoch ein signifikanter Unterschied in den Amplituden.

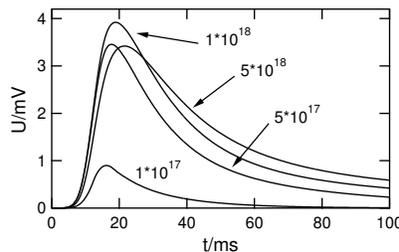


Abbildung 5.6: Der Einfluß des „fixed buffer“-Effekts auf das Signal. Die Kurven zeigen das erwartete Signal auf einem $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ Gate für verschiedene Oberflächengruppendichten des Siliziumdioxids in Gruppen pro Quadratmeter.

Obwohl die relativ unbestimmte Dichte der Oberflächengruppen eine Möglichkeit zum Anpassen der Dynamik des Abfalls liefert, wird diese durch die Abhängigkeit der Signalamplitude von der Pufferkonzentration verbaut.

Die Signale werden von der Kinetik der Quelle und von der Kinetik der Pufferdiffusion im Spalt geprägt.

Um die beiden Einflüsse zu verstehen, lösen wir in Zylinderkoordinaten die Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} c = D \Delta c + Q(x, t)$$

unter der Randbedingung, daß $c(1, t) = 0 \forall t$ mit $x=r/R$, R als Radius des Spaltes. Der Quellterm soll in eine Orts- und eine Zeitfunktion separieren, d.h. $Q(x, t) = p(x) q(t)$. Unter diesen Annahmen ist die Lösung

$$c(x, t) = \sum_n \alpha_n(t) J_0(k_n x)$$

mit

$$\alpha_n(t) = C_n e^{-D k_n^2 t} + e^{-D k_n^2 t} \int_0^t e^{D k_n^2 \zeta} \beta_n(\zeta) d\zeta \quad \text{und}$$

$$\beta_n(t) = \frac{2}{J_1(k_n)^2} \int_0^1 x J_0(k_n x) p(x) q(t) dx.$$

Die Funktionen J_0 und J_1 sind die Besselfunktionen nullter und erster Ordnung, k_n sind die Nullstellen der Besselfunktion nullter Ordnung, C_n zu bestimmende Konstanten und D ist der Diffusionskoeffizient eines Stoffes i geteilt durch das Quadrat des Spaltradius, also $D = D_i/R^2$. Für das Zeitverhalten der Quelle $q(t)$ setzen wir näherungsweise

$$q(t) \propto e^{-\frac{1}{\tau_d} t} (1 - e^{-\frac{1}{\tau_r} t})$$

mit den Zeitkonstanten τ_d für den Abfall und τ_r für den Anstieg.

Damit ist die Kinetik der Diffusion im Diffusionskoeffizienten D beherbergt, die Kinetik der Quelle in den Zeitkonstanten τ_d und τ_r . Es ergibt sich für α

$$\begin{aligned} \alpha_n(t) = & \left(e^{-\frac{1}{\tau_d} t} \left(\frac{1}{D k_n^2 - \frac{1}{\tau_d}} - \frac{1}{D k_n^2 - (\frac{1}{\tau_d} + \frac{1}{\tau_r})} e^{-\frac{1}{\tau_r} t} \right) - \right. \\ & \left. - e^{-D k_n^2 t} \left(\frac{1}{D k_n^2 - \frac{1}{\tau_d}} - \frac{1}{D k_n^2 - (\frac{1}{\tau_d} + \frac{1}{\tau_r})} \right) \right) * \\ & * \frac{2}{J_1(k_n)^2} \int_0^1 x J_0(k_n x) p(x) dx. \end{aligned}$$

Man sieht, daß die Koeffizienten der höheren Moden das Zeitverhalten der Quelle annehmen. Schreibt man alternativ

$$\begin{aligned} \alpha_n(t) = & \left((e^{-\frac{1}{\tau_d} t} - e^{-D k_n^2 t}) \frac{1}{D k_n^2 - \frac{1}{\tau_d}} - \right. \\ & \left. - (e^{-(\frac{1}{\tau_d} + \frac{1}{\tau_r}) t} - e^{-D k_n^2 t}) \frac{1}{D k_n^2 - (\frac{1}{\tau_d} + \frac{1}{\tau_r})} \right) * \\ & * \frac{2}{J_1(k_n)^2} \int_0^1 x J_0(k_n x) p(x) dx, \end{aligned}$$

so zeigt sich, daß die niedrigen Moden mit $1/\tau_d$ steigen. Zudem sind die relevanten Moden der Entwicklung ungefähr gleich besetzt. Um das zeitliche Verhalten der Quelle widerzuspiegeln sind die hohen Moden wichtig. Ist die räumliche Ausdehnung des Quellterms kleiner als ein Integrationsgebiet, so wie hier die Quelle im Vergleich zur Gategröße, so mitteln sich die hohen Moden schnell aus und ein schneller Anstieg im Signal ist nicht möglich. Auch ist der Einfluß der Mittelung auf die Zeitkonstante des Abfalls im Signal groß, dieses wird aber nicht beobachtet. Ein Reduzieren des Diffusionskoeffizienten macht diese Diskrepanzen größer und die Ursache der Fehlvorhersage des Modells ist nicht in einer falschen Parameterwahl zu suchen.

Der schnelle Anstieg der experimentell beobachteten Signale ist über ein Modell einer Quelle mit Diffusion nicht zu erklären. Erst bei Quellen mit den Ausmaßen der Integrationsflächen kann das über die Fläche gemittelte Signal dem Zeitverhalten der Quelle folgen, dieses ist hier aber unvorstellbar.

Die einfachen und damit überschaubaren Modelle beschreiben einige der Charakteristiken der Signale gut, sind der Komplexität des ganzen Systems aber nicht gewachsen.

5.3 Die Fusionsdynamik: auf der Suche nach dem Quellterm

Da eine Quelle mit freier Diffusion das Transistorsignal der Exozytose eines Vesikel nicht erklären kann, braucht man ein besseres Modell und ein *grundlegend anderes Konzept für die Exozytose*. Theoretisch gibt es einige Versuche, die Amperometriedaten zu erklären [Fan04], doch müssen sie sich alle im Fall der chromaffinen Vesikel geschlagen geben, da signifikante Fehlvorhersagen auftreten.

Ursache hierfür ist das komplexe Zusammenspiel verschiedener physikalischer Aspekte auf der gleichen Zeitskala.

Zum einen bildet das Verschmelzen von Lipidmembranen an sich schon einen sehr schwierigen Sachverhalt, zum anderen ist auch die Proteinmatrix innerhalb des Vesikels schwierig zu beschreiben. Die Matrix bildet eine polyelektrolytisches Gel [Nan93, Uvn80a, Uvn80b], welches hauptsächlich aus durch Calcium querverbundenen Proteinen, größtenteils dem Protein Chromogranin A, den Catecholaminen und ATP besteht [App97]. Hierbei bildet das Chromogranin A das anionische Gegenstück zu den protonierten Catecholaminen. Unter Fusion schwillt die Matrix an, Natrium sowie Kalium der Extrazellulärlösungen können die divalenten Querverbindungen ersetzen und gleichzeitig dadurch Elektroneutralität herstellen. Ihr Einwandern, das Austauschen sowie das Ausdiffundieren der Catecholamine und das Schwellen der Matrix sind dabei gekoppelte Prozesse. Schließlich löst sich die Matrix auf und ein Großteil wird ausgeschüttet. Für das Anschwellen der Gele gibt es Modelle [Tan79, Gri90], doch hat sich gezeigt, das die Dynamik der Amperometrie nicht vom Schwellen des Gels und dem Austausch der Catecholamine an der Grenze zwischen geschwellenem-ungeschwellenem Gel erklärt werden kann, da dieses einen polyexponentiellen Abfall des Catecholaminflusses zur Folge haben würde [Sch96]. Die Dynamik ist diffusionskontrolliert. Damit ist gemeint, daß die Diffusion innerhalb der geschwellenen Matrix der Catecholamine wesentlich langsamer von statten geht, als das Schwellen der Matrix. Den Catecholaminen wird innerhalb der Matrix ein Diffusionskoeffizient zugeordnet, der die starke Wechselwirkung mit dieser beinhaltet.

Im folgenden wird ein Zwei-Kompartiment-Modell aufgestellt. Es besteht

- zum einen aus dem Spalt mit der gepufferten Diffusion der Protonen,

- zum anderen aus der ausgeschütteten Vesikelmatrix. In dieser Matrix ist die Diffusion aller Stoffe stark reduziert.

Die Dynamik der Vesikelfusion und damit auch die der Ausschüttung der Matrix in den Spalt wird anhand des einzigen momentan dazu vorhandenen Modells aus einer Arbeit von Amatore et al. gezogen [Ama99].

Diese Arbeit gibt die amperometrischen Daten der Vesikelfusion bei chromaffinen Zellen gut wieder und liefert den zeitlichen Verlauf des freigesetzten Vesikelvolumens. Dieser wird benutzt, um einen Quellterm für die Ausschüttung der Matrix in den Spalt und der Grenze zwischen den beiden Kompartimenten, Matrix und Bad, zu gewinnen.

Die Dynamik der amperometrischen Daten wird auf das Abrollen der Membran vom Vesikel und auf die Diffusion der Catecholamine innerhalb der Granule zurückgeführt.

In Abb. 5.7 ist das zugrunde liegende Modell gezeigt. Eine chromaffine Granule verschmilzt mit der Zellmembran und wird durch den Öffnungswinkel α in zwei unterschiedliche Bereiche zerlegt. Ein Bereich steht im Kontakt mit der Extrazellulärlösung, seine Membran wurde in die Zellmembran inkorporiert ($0 < \theta < \alpha$) und aus diesem Bereich können die Catecholamine herausdiffundieren. Der verbleibende bedeckte Teil ($\alpha < \theta < \pi$) trägt nicht Catecholamin-ausschüttung bei. Die Annahme, daß die Verarmung an Catecholaminen innerhalb der Matrix

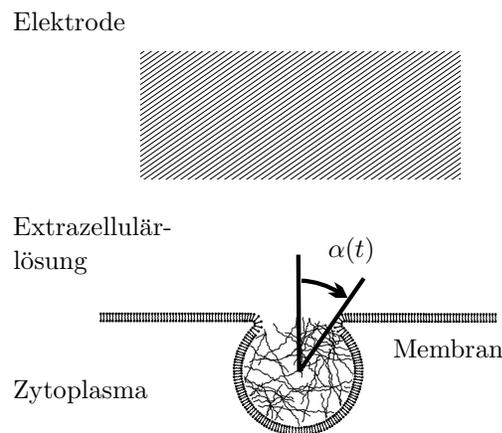


Abbildung 5.7: Das die amperometrischen Signale wiedergebende Modell. Die Dynamik der Exozytose wird von zwei Faktoren bestimmt. Die Wechselwirkung der ausgeschütteten Stoffe mit der Matrix wird durch einen stark reduzierten Diffusionskoeffizienten berücksichtigt, das Abrollen der Vesikelmembran von der Granule mit dem Öffnungswinkel $\alpha(t)$. Die Konvolution aus Diffusion und Membrandynamik bildet die Dynamik der amperometrischen Daten ab (nach [Ama99]).

wesentlich langsamer als die Änderung in der freiliegenden Oberfläche ist, erlaubt es, die Kopplung zwischen Fusion und Diffusion als Konvolution von dem Fluß Ψ aus dem vollständig un-

bedeckten Vesikel mit der Abrollgeschwindigkeit der Membran wiederzugeben ¹. Mittels einer Dekonvolution erhält man aus amperometrischen Daten die Funktion für den Öffnungswinkel $\alpha(t)$ des Vesikels und den intragranularen Diffusionskoeffizienten der Catecholamine. Die erhaltene Funktion und der Diffusionskoeffizient sind von Vesikel zu Vesikel verschieden und werden als Fitparameter betrachtet. Den Catecholaminen wird innerhalb der Matrix ein auf ein Hundertstel

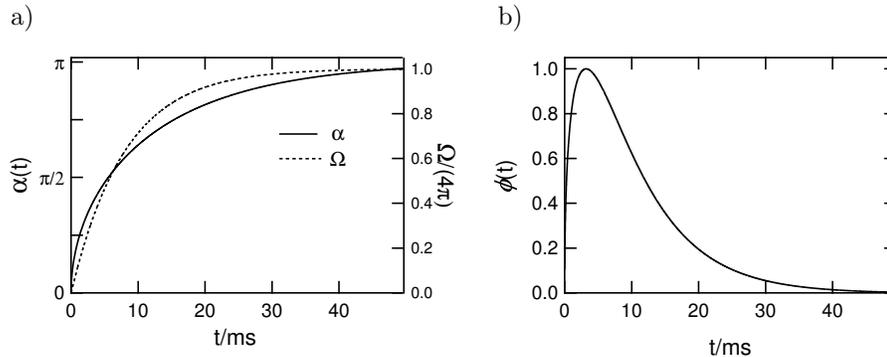


Abbildung 5.8: Abrolldynamik der Membran (aus [Ama99]) und ein damit modelliertes amperometrisches Signal. a) Eine Dekonvolution amperometrischer Daten liefert den zeitliche Verlauf des Abrollens der Membran $\alpha(t)$, bzw. der freiliegenden Oberfläche $\Omega(t)$. Ein mit dieser Funktion und einem reduzierten Diffusionskoeffizienten berechnetes, normiertes Signal (b) stimmt relativ gut mit dem gemessenen Signalen überein.

reduzierter Diffusionskoeffizient zugeschrieben. Die Funktion für den Öffnungswinkel $\alpha(t)$ und die der freigelegten Oberfläche $\Omega(t)$ zeigt Abbildung 5.8a. Ein mit dieser Funktion und einem um einen Faktor hundert reduzierten Diffusionskoeffizienten für die Catecholamine modelliertes Signal ist in Abbildung 5.8 gezeigt. Das modellierte Signal trifft den Verlauf des amperometrischen Stroms relativ gut. Soweit geht die Arbeit nach [Ama99]

Es müssen jetzt einige weitere Annahmen gemacht werden, um mit den Ergebnissen der Arbeit weiterzuarbeiten.

Zuerst mißt der Transistor die Protonenkonzentration, welche hauptsächlich über ATP gepuffert ist und man muß aus der Diffusion der Catecholamine auf einen Diffusionskoeffizienten für diese Bestandteile des Vesikels schließen.

Es werden die Diffusionskonstanten aller anderen Stoffe des Vesikels um den gleichen Faktor reduziert, was rein spekulativ ist, aber über die starke Wechselwirkung der Inhaltsstoffe gerechtfertigt erscheint.

¹Für den Fluß $\phi(t)$ als Meßgröße gilt damit

$$\phi(t) \propto \int_0^t \Psi(t - \zeta) \frac{\theta(\zeta)}{4\pi} d\zeta$$

mit

$$\int_0^t \frac{\theta(\zeta)}{4\pi} d\zeta = 1/2 * (1 - \cos \alpha(t)) = \frac{\Omega(t)}{4\pi},$$

wobei $\Omega(t)$ die gesamte freigelegte Oberfläche zur Zeit t ist.

Zudem wurde bei dem beschriebenen Modell die Kohlefaser außer Acht gelassen; sie war, obwohl in nahem Kontakt zur Zellmembran, im genügend großen Abstand, um das Entfalten des Vesikels nicht zu beeinträchtigen.

Das ist bei einem Abstand der Zellmembran zur Chipoberfläche von nur 50 nm sicherlich nicht der Fall und es stellt sich das Problem, wie man eine Granule von 350 nm Durchmesser und einen 50 nm dicken Spalt zusammenbringt. Es sind verschiedene Szenarien vorstellbar, die von weiteren Eigenschaften des Vesikels abhängen.

Stellen wir uns weiter ein Transistorsignal mit einem schnellen Anstieg vor, der Vesikelinhalt liegt, da der Spalt viel kleiner als ein Vesikel ist, irgendwie auf der Chipoberfläche. Innerhalb der Matrix gilt das Puffergleichgewicht

$$[H] = [K] \frac{[HATP]}{[ATP]}.$$

Unter der Annahme, daß die Diffusionskoeffizienten innerhalb der Granule stark reduziert sind, ist der Fluß der Inhaltsstoffe aus der Matrix proportional zu ihrer intragranularen Konzentration. Da die Protonen hoch gepuffert sind und freie Protonendiffusion vernachlässigbar ist, hat das zur Konsequenz, daß sich der pH-Wert innerhalb der Matrix nicht ändert, auch nicht, wenn $[HATP]$ sowie $[ATP]$ hinausdiffundieren. Es würde also ein Plateau im Signal erwartet, welches nicht beobachtet wird².

Es muß deshalb auch ein Eindiffundieren des extrazellulären Puffers in die Matrix berücksichtigt werden. Sein effektiver Diffusionskoeffizient ist ebenfalls unbekannt, wir reduzieren ihn um den gleichen Faktor wie die Diffusionskoeffizienten der anderen Stoffe.

Als eine Möglichkeit der Ausschüttung eines Vesikels wird betrachtet, daß das durch die Funktion $\Omega(t)$ freigelegte Vesikelvolumen in den Spalt zwischen Zelle und Chip gedrückt wird.

Dabei wird zugrunde gelegt, daß die Matrix nicht fest ist, sondern eine relativ niedrige Viskosität hat. Diese Vorstellung ist nicht nur ein Tribut an ein zweidimensionales Modell, denn die niedrige Viskosität ist keinesfalls rein spekulativ. Wäre sie hoch, so sollte die Form der Granule relativ fest sein, im Spalt würde sie nur als Punktquelle in Erscheinung treten und ein Großteil der Kopplung würde über die Pufferdiffusion im Spalt stattfinden, doch das haben wir bereits ausgeschlossen. Daten zur Viskosität der Matrix chromaffiner Granulen sind nicht bekannt. Kernspinresonanzmessungen zeigen, daß beinahe die gesamten Catecholamine und das gesamte ATP in gelöster Form vorliegen.

Mit dieser Ausschüttung kann weiterhin zweidimensional gearbeitet werden, für alle anderen Möglichkeiten müßte die Höhe der Matrix berücksichtigt werden, womit ein dreidimensionales Modell unausweichlich ist.

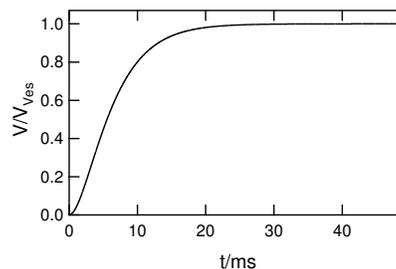


Abbildung 5.9: Das in den Spalt ausgeschüttete Vesikelvolumen in Abhängigkeit von der Zeit.

²In seltenen Fällen zeigen Signale ein solches Plateau oder einen anfänglich sehr langsamen Abfall nach ihrem Maximum.

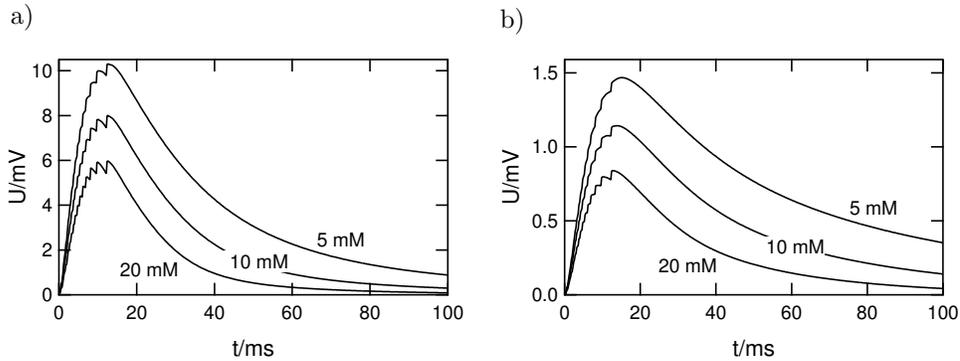


Abbildung 5.10: Signale unter Einbeziehung der Vesikelmatrix und ihrer Ausschüttung. Die Amplituden der kleinen Gategröße sind zwar immer noch deutlich zu hoch, für die großen ergibt sich aber eine gute Übereinstimmung. Auch die Zeitkonstanten kommen in den Bereich der experimentell gefundenen.

Klar zusammengefaßt umfaßt das Modell damit folgende Annahmen:

- die Ausschüttung der Matrix folgt der Volumenfunktion aus dem Modell nach [Ama99],
- die Diffusionskoeffizienten aller Stoffe sind innerhalb der Matrix um einen Faktor hundert reduziert.

Abbildung 5.9 zeigt das ausgeschüttete Vesikelvolumen³. Das ausgeschüttete Volumen steigt relativ langsam an, welches eine direkte Konsequenz der langsamen Abrolldynamik der Vesikelmembran ist.

In Abbildung 5.10a und b sind die simulierten Transistorsignale für die beiden Gategrößen gezeigt. Fassen wir die Ergebnisse des Zwei-Kompartiment-Modells zusammen.

Die Amplituden für die kleinen Gates sind deutlich zu hoch, doch es ist schon bekannt, daß diese Amplituden kein einheitliches Verhalten zeigen. Benachbarte Transistoren liefern um einen Faktor vier verschiedene Mediane, obwohl die Gateflächen komplett bedeckt sind (Abb. 3.6).

Die Amplituden für die größeren Gates von ca. 1.5, 1.1 und 0.8 mV sind relativ nahe an den Medianen 1.45, 0.8 und 0.6 mV bei 5, 10 und 20 mM HEPES. Sie passen zu den experimentellen Daten.

Auch die Zeitkonstanten im Abfall sind nicht mehr so eklatant falsch, sie liegen hier bei 26, 19 und 13 ms für die kleinen und 38, 29 und 22 ms für die großen Gates bei den verschiedenen Pufferkonzentrationen. Der Einfluß der Mittelung über die Gatefläche scheint noch zu hoch zu sein. Insgesamt stimmen die Abfallszeiten der Signale sowie der Einfluß des Puffers auf sie aber relativ gut.

Die Anstiegszeiten spiegeln die Ausschüttung der Matrix wider und sind zu groß.

³Unter diesen Randbedingungen darf die Strömung innerhalb des Spaltes aufgrund des Volumenzustroms nicht vernachlässigt werden. Sie wird in der Simulation berücksichtigt.

Die unter diesen Bedingungen modellierten Transistorsignale zeigen diesen langsamen Anstieg, doch ist er diesmal nur eine Folge der gewählten Randbedingung, also eine Schwäche der Beschränkung auf zwei Dimensionen und der damit verbundenen Ausschüttung der Matrix in den Spalt. Es ist keine physikalische Konsequenz des Systems, wie bei dem einfachen Modell.

Obwohl noch nicht genau mit den experimentellen Daten stimmig, löst das Zwei-Kompartiment-Modell mit der ausgeschütteten Matrix die Unzulänglichkeiten des einfachen Modells. Dabei entspringt dieses nicht nur aus dessen Versagen, sondern es findet auch eine physiologische Berechtigung, die auf der komplizierten Dissoziation der Matrix beruht. Dazu sei auch noch einmal auf die Abbildung 4.6 verwiesen. Diese am Rand der Zelle stattfindende Vesikelfusion besitzt dennoch durchschnittliche Zeitkonstanten.

Es muß also festgestellt werden, daß das dynamische Verhalten der Transistorsignale sowie die Wirkung des Extrazellulärpuffers auf die Signale hauptsächlich unter dem Einfluß der Vesikelmatrix stehen. Der entscheidende Unterschied zu den vorherigen Simulationen ist, daß nicht mehr die Pufferdiffusion im Spalt die Dynamik des Abfalls bestimmt, sondern das Eindiffundieren des Puffers in die Matrix.

Da der Einfluß der Pufferdiffusion im Spalt geringer wird, nähern sich die Zeitkonstanten der großen und kleinen Gateflächen an, so wie es experimentell beobachtet wird. In Anbetracht der komplexen Zusammenhänge bei der Vesikelfusion und innerhalb der Matrix ist es erstaunlich, daß die modellierten Signale so viel Übereinstimmung mit dem Experiment zeigen. Diese werden noch größer, wenn man die Unzulänglichkeit des Modells in der Reduktion auf zwei Dimensionen und bezüglich der Matrixausschüttung bedenkt.

Zum Schluß soll noch kurz auf das Problem des zu langsamen Anstiegs der modellierten Signale eingegangen werden und darauf, ob es aus der eventuell unzulässigen Reduzierung auf zwei Dimensionen entspringt, oder ob das zugrundeliegende Modell des Membranabrollens nicht richtig ist. Um zu überprüfen, ob es experimentelle Hinweise auf die Dynamik des Modells gibt, werden Transistorsignale, die einen Fuß besitzen, genauer untersucht. Bei einem Fuß im Signal ist der physiologische Zustand des Vesikels gut bekannt, es ist eine Pore, durch die Vesikelinhalt ausgeschüttet wird, während das Vesikel noch komplett innerhalb der Zelle ist. Ein Beispiel für ein Signal mit einem Fuß ist in Abb. 5.11 gezeigt. Es kann sowohl mit dem Transistor als auch mit der Kohlefaser beobachtet werden. Da bereits vor dem Expandieren der Pore Kopplung zu dem Transistor besteht, gibt es Hoffnung, über das zeitliche Entwickeln der Signale Rückschlüsse auf die Expansion ziehen zu können. Zu Beginn der Pore-Chip-Kopplung steigt das Signal im Transistor mit einer typischen Zeitkonstante von 8 bis 10 ms an, wobei nur sehr selten ein Plateau wie in den amperometrischen Strömen erreicht wird. Danach ist aber auch im Transistorsignal kein langsames Ansteigen im Übergang zum Peak zu erkennen (Abb. 5.11 Inset), es findet oftmals innerhalb einer Millisekunde statt. Da die Membran dem Modell zufolge aber 4 bis 5 ms braucht (Abb. 5.8), um einen Öffnungswinkel von $\pi/2$ zu erreichen und der Fluß aus dem Vesikel innerhalb dieser Zeit bereits maximal ist, müßte es in einen langsamen Anstieg vor dem eigentlichen Peak resultieren und das auch, wenn nicht zweidimensional gearbeitet wird.

Es gibt keine Hinweise für einen langsamen Anstieg und damit steht das Modell nach [Ama99] im Widerspruch zu der mit dem Transistor gemessenen Fusionsdynamik.

Man muß befürchten, daß auch dieses Modell zur Erklärung der amperometrischen Daten nicht stimmt und sich das Öffnen des Vesikels schnell vollzieht. Ist diesem so, dann spielt ebenfalls die abgerollte Membran des Vesikels eine wichtige Rolle. In ihr sind viele membrangebundene

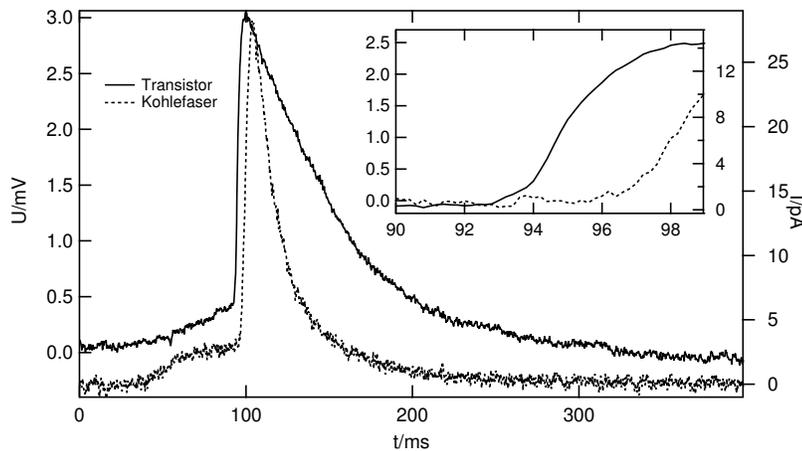


Abbildung 5.11: Ein Transistorsignal mit einem Fuß sowie dem dazugehörigen Amperometriestrom. Der Fuß steigt relativ langsam an. Der Übergang von der Pore-Chip-Kopplung in den Peak vollzieht sich schnell, das Inset zeigt den Ausschnitt in höherer zeitlicher Auflösung. Die Dynamik der Porenexpansion des Modells ist nicht zu erkennen.

Proteine enthalten, die mit dem Vesikelinhalt assoziieren [Col96]. Die Membranfläche eines Vesikels mit dem Radius von 170 nm beträgt immerhin $0.36 \mu\text{m}^2$, das in den Spalt ausgeschüttete Volumen benötigt $0.41 \mu\text{m}^2$ bei einer Spaltdicke von 50 nm. Wie die Situation im Spalt ist, hängt dann entscheidend von der Viskosität der Matrix und der von ihr besetzten Chipoberfläche ab. Nicht zu vernachlässigen sind bei dem Problem die vielen Puffergruppen, die durch die Collagenbeschichtung sowie die Plasmamembran der Zelle bereitgestellt werden.

Dennoch ist der Weg zum Nachvollziehen der Transistorsignale geebnet, denn erst mit dem direkten Kontakt des Vesikelinhalts und der Matrix zu der Chipoberfläche können auch die Messungen mit Ammoniumchlorid erfaßt werden. Zeigt sich die Dynamik hier relativ unbeeinflusst, sinken die Amplituden unter Ammoniumchlorid merklich. Das ist nur bei einem direkten Kontakt zwischen Vesikelinhalt und Chipoberfläche möglich, da die gesamte Menge an Protonen pro Vesikel gleich bleibt und diese auch freigesetzt wird.

Noch mehr als ein Jahrzehnt nach dem Etablieren der Amperometrie als Methode wird über die Interpretation ihrer Daten spekuliert. Dabei ist immer noch strittig, ob diese auf eine reine Reduzierung des Diffusionskoeffizienten im Spalt zwischen Zelle und Elektrode zurückgeführt werden können [Cho92, Haf05], oder ob die Matrix eine entscheidende Rolle in der Dynamik übernimmt [Wig95, Bor00]. Hierfür sprechen auch die Transistordaten. Obwohl es also noch einiger weiterer Klimmzüge bedarf, um das Transistorsignal völlig zu verstehen, macht diese Komplexität die Sache spannender, eröffnet sich damit doch der Zugriff auf schwierig zu bestimmende physiologische Parameter und ein neuer Einblick in den kontrovers diskutierten Bereich der Exozytose [Che01].

Kapitel 6

Zusätzliche Experimente

6.1 Ligandengesteuerte Exozytose

Normalerweise werden chromaffine Zellen durch Nerven mittels des Neurotransmitters Azetylcholin (ACh) stimuliert. Die presynaptische Nervenzelle schüttet ACh aus, welches hierauf an gegenüberliegende Rezeptoren in der chromaffinen Zelle bindet und die Zelle dadurch depolarisiert. Chromaffine Zellen werden schon durch ein bis zwei geöffnete ACh-Kanäle ausreichend

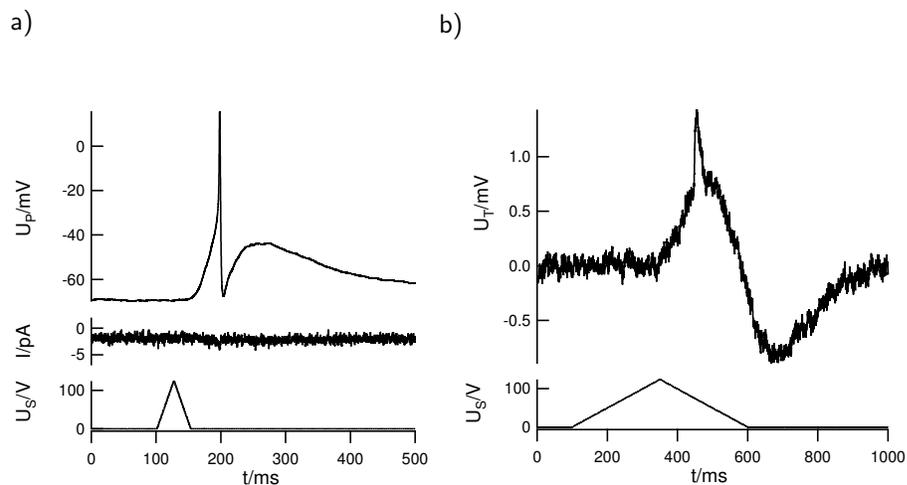


Abbildung 6.1: Ligandengesteuerte Exozytose: a) Current-Clamp einer chromaffinen Zelle unter Applikation von $60 \mu M$ Azetylcholin. Unter dem Stimulus (unten) von ACh werden ligandengesteuerte ACh-Kanäle geöffnet. Der Strom durch die geöffneten ACh-Kanäle (Mitte) ist kaum sichtbar, aber ausreichend, um ein Aktionspotential (oben) auszulösen. b) Die Applikation von ACh (unten) löst die Exozytose eines Vesikels aus. Deutlich ist dessen Signal über dem Artefakt des Lösungswechsels im Transistor zu sehen (oben).

stimuliert, um ein Aktionspotential auszulösen. Dieses Aktionspotential öffnet Calciumkanäle und führt so zur Freisetzung von Vesikeln. In Abb.(6.1a) ist das Auslösen eines Aktionspotentials durch das Applizieren von ACh an einer im Current-Clamp-Modus gepatchten Zelle gezeigt. Weil

die Ströme durch die cholinergen Kanäle relativ zur Zellkapazität groß sind, sind die chromaffinen Zellen sehr sensibel auf ACh; bei höheren Dosen bilden sich keine Aktionspotentiale aus, die Zelle depolarisiert auf ein hohes Zellpotential und repolarisiert sehr langsam. Um ein Überdosieren des Neurotransmitters zu vermeiden, wurde das Θ -Tube so eingestellt, daß der Lösungsstrom oder einer seiner Wirbel die Zelle erst am äußersten Ende des Ausschlags streifte. Der Stimulus U_S in Abb.(6.1a unten), aufgetragen ist die am Piezoelement anliegende Spannung, führt zu einem kaum sichtbaren Strom I_P (6.1a Mitte) durch die ACh-Kanäle und löst ein Aktionspotential aus (6.1a oben). Weil für einen stabilen Patch ein Calciumpuffer innerhalb der Intrazellulärlösung benötigt wird, der die Exozytose verhindert, wurde die ligandengesteuerte Exozytose auf einem Transistor ohne ein Patch-Clamp der Zelle gemessen (6.1b). Die andere Zusammensetzung der Stimulationslösung führt bei einem Auswechseln der Lösungen (6.1b unten) über den Transistor zu einem Artefakt, welches im Zusammenspiel mit dem Hochpaß des Meßverstärkers ein wellenförmiges Signal zur Folge hat (6.1b oben). Deutlich hebt sich davon die Ausschüttung eines Vesikels ab.

6.2 Messungen auf einem 128×128 Transistorarray

Mit dem in Zusammenarbeit mit Infineon entwickelten Array von 128×128 Transistoren steht der Abteilung ein leistungsfähiger Baustein zur Verfügung, der die Vorteile des skalierbaren Siliziumtechnologie bereits verwirklicht [Eve03, Lam04]. Es liegt nahe, die Kopplung der Exozytose auf diesem Array zu untersuchen. Zudem liegt dem Transistorarray eine andere Prozeßführung zugrunde und die Oberfläche besteht bei dem getesteten Chip aus Titandioxid, Faktoren, die die Kopplung und die Signale stark beeinflussen können.

In Abbildung 6.2 ist ein solches Array abgebildet. Die Transistoren haben einen Abstand von $7.8 \mu\text{m}$, einen Gatedurchmesser von ca. $4.5 \mu\text{m}$ und sind als schwarzes Raster zu erkennen. Der gesamte Ausschnitt umfaßt 1 mm. Auf dem Array liegen zufällig verteilt dissoziierte chromaffine Zellen, welche durch Zugabe von Barium stimuliert werden. Aufgrund der Menge an Daten beim Auslesen von 16000 Transistoren wurde die Meßzeit auf zwei Sekunden beschränkt. Die Transistoren, die innerhalb dieser Zeit ein Signal detektierten, sind weiß markiert. In Anbetracht dieser im Vergleich zu der normalen Frequenz der Exozytose kurzen Meßzeit wird mit sehr vielen Transistoren Exozytose registriert. Die Signale der mit einem Pfeil markierten Transistoren sind unten in Abb. 6.2 gezeigt. Die Exozytose einzelner Vesikel ist deutlich sichtbar.

Dieses Experiment dient nur dem „proof of principle“ und es fehlt eine genaue Charakterisierung der Signale und des Chips. Es soll nur angemerkt werden, daß auch auf dem anderen Oberflächensubstrat das schwierig zu erklärende Durchschlagen der Signale ins negative zu beobachten ist.

Mit einem solchen Instrument können völlig neue Fragestellungen bezüglich Exozytose und Morphologie an größeren Strukturen und Schnitten angegangen werden. Nicht zuletzt erlaubt dieses Array wegen der großen Anzahl an simultanen Messungen ein schnelles Erlangen signifikanter Datensätze.

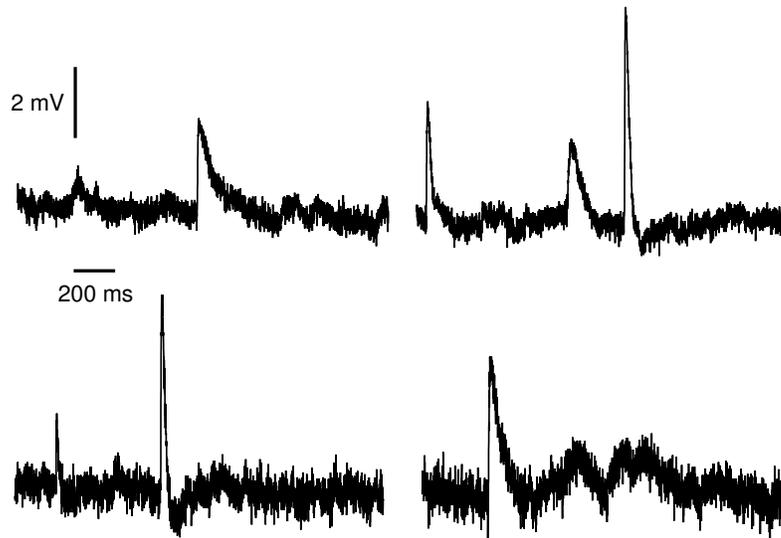
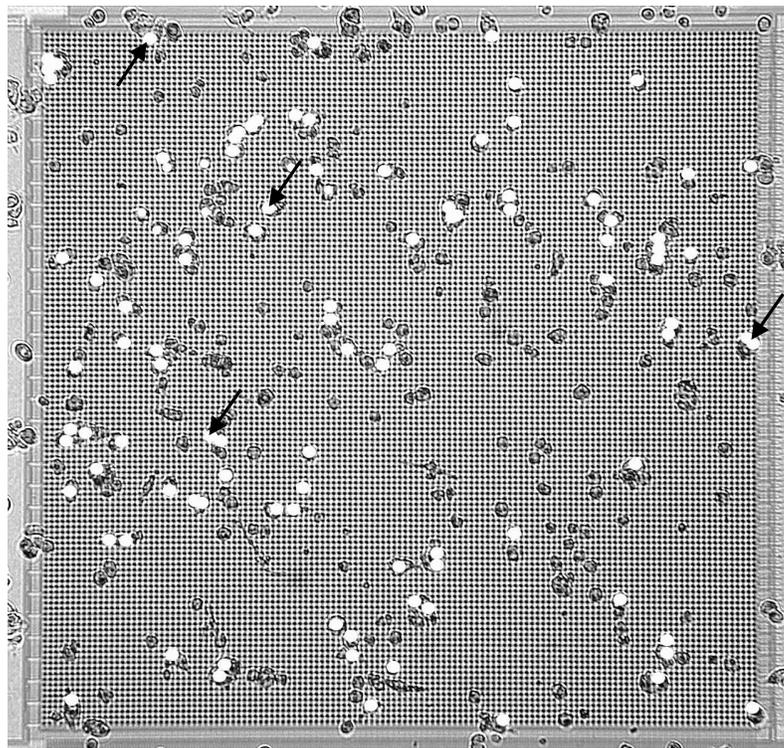


Abbildung 6.2: Auf einem Transistorarray mit 128×128 Transistoren läßt sich die Exozytose vieler Zellen gleichzeitig messen. Der Bildausschnitt hat eine Größe von $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Weiß gepunktet sind die Transistoren, mit welchen innerhalb der zwei Sekunden Meßzeit ein Signal registriert werden konnte. Unten sind die Signale der markierten Transistoren (\downarrow) abgebildet.

6.3 Elektrische Kopplung chromaffiner Zellen an einen Transistor

Die bei einem Aktionspotential entstehenden Ausgleichsströme verursachen innerhalb des Spaltes zwischen Zelle und Chip eine Variation der Elektrolyt-Source-Spannung und können nach Abschnitt 2.5 auch mit einem Transistor gemessen werden. Diese elektrische Kopplung ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Dabei handelt es sich um die intrazelluläre Ableitung der Membranspannung mittels einer Glaskapillare (Patch-Clamp, oben). Es sind zwei Aktionspotentiale gezeigt, welche im Transistor (unten) kurze biphasische Signale auslösen. Im Vergleich zu den durch die Protonen verursachten Signale der Exozytose sind die Signale bei der elektrischen Kopplung sehr klein, das Signal zu Rausch Verhältnis ist bereits limitierend. Insgesamt konnten sechs elektrische Kopplungen chromaffiner Zellen gemessen werden, und dieses ist eher auf eine Hartnäckigkeit des Experimentators zurückzuführen, da die Ausbeute an erfolgreichen Messungen bei ganz wenigen Prozent liegt. Trotz alledem handelt es sich bei diesen Messungen um die ersten ungemittelten Transistorsignale der Aktionspotentiale von Säugetierzellen. Ein weiteres schönes Beispiel eines ganzen Zuges von Aktionspotentialen zeigt Abbildung 6.4. Diesmal ist das Transistorsignal monophasisch und nicht so schnell. Es muß ein chemischer Anteil im Signal vorliegen [Bri05]. Physiologisch sind Aktionspotentiale und Exozytose zumindest an Synapsen gekoppelt und der Feldeffekttransistor ist in der Lage, beide Signaltypen, den elektrischen und den chemischen, zu detektieren. Für einen

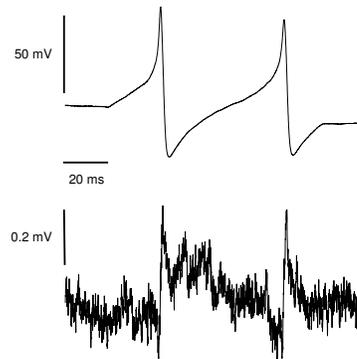


Abbildung 6.3: Elektrische Kopplung von Aktionspotentialen chromaffiner Zellen an einen Transistor. Oben ist die intrazelluläre Ableitung der Membranspannung, unten das Transistorsignal unter der Zelle dargestellt.

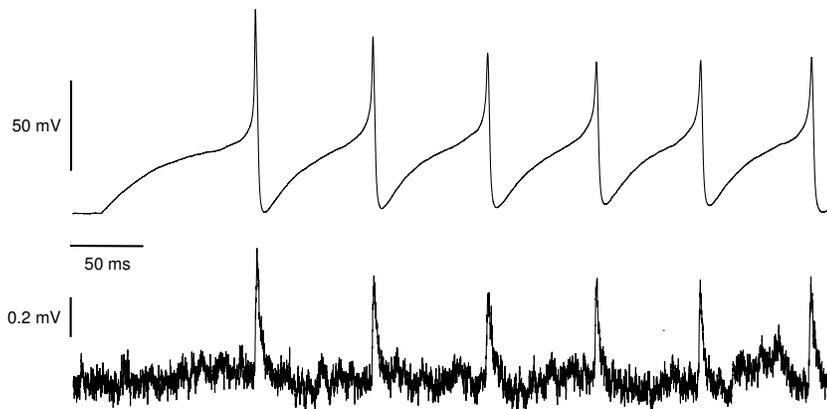


Abbildung 6.4: Ein langer Zug von Aktionspotentialen (oben) löst hier im Transistor (unten) monophasische Signale aus.

stabilen Kontakt zwischen Pipette und Zelle muß bei dem Patch-Clamp mit einem Calciumpuffer gearbeitet werden, welcher die Exozytose weitestgehend blockiert. So wird bei diesen Messungen die Kopplung des Aktionspotentials zur Exozytose unterbrochen. Wird invasionsfrei ohne Patch-Clamp gearbeitet, sollte es möglich sein, beide Signaltypen simultan zu messen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dynamik und Amplitude unterscheiden sie sich gut und die Chancen stehen gut, daß diese Methodik zum Erkenntnisgewinn bei den immer noch vielen Unklarheiten in der Exozytose beitragen wird.

Anhang A

Anhang

A.1 Potentialabfälle an einer Elektrolyt-Oxid-Silizium-Struktur

Nachdem das Diagramm der inneren Potentiale in Abschnitt 2.5 besprochen worden ist, soll noch auf das Ladungsdiagramm einer Elektrolyt-Oxid-Struktur eingegangen werden.

Zum einen wird klar, das die an den Feldeffekttransistor angelegten Spannungen kaum einen Einfluß auf das Oberflächenpotential des Oxides haben.

Zum anderen wird klargestellt, daß es keinen Unterschied für das Transistorsignal macht, ob daß Badpotential mit ΔV_{ES} oder das Oberflächenpotential mit $\Delta \phi_{thresh}$ variiert wird.

Damit ist die Eichung der Amplituden des Transistors, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wird, zulässig. Die Grundlagen eines Feldeffekttransistors in einem Elektrolyten werden der Einfachheit halber an einer Elektrolyt-Oxid-Silizium-Struktur untersucht. Hier wird mit dem Potential zwischen Elektrolyt und Source V_{ES} gearbeitet, etwaige Sprünge durch die Kontaktierungen sollen schon bereinigt sein.

Das Silizium liege auf dem Potential V_{ES} gegenüber der mittels einer geeigneten Elektrode geerdeten Lösung und sei von dieser durch eine ideale Oxidschicht der Dicke d_{Ox} und Dielektrizität ϵ_{Ox} getrennt. Durch die Spannung V_{ES} bildet sich an der Grenzfläche Silizium-Oxid eine Flächenladungsdichte σ_S aus, das Oxid trägt eine Flächenladung durch dissoziierte Silanolgruppen von σ_O und im Elektrolyten baut sich eine diffuse Schicht der Ladungsdichte ρ_d auf. Das Potential der Oxidoberfläche im Elektrolyten sei Φ_O .

Die Flächenladung σ_d der diffusen Doppelschicht entspricht dabei der gesamten Ladung innerhalb einer Einheitsfläche

$$\sigma_d = \int_d^\infty \rho_d dx.$$

Für σ_S und σ_d gilt

$$\sigma_S = C_{Ox}(V_S - \Phi_O) \tag{A.1}$$

$$\sigma_d = -\varsigma \sinh\left(\frac{ze_0\Phi_O}{2k_B T}\right). \tag{A.2}$$

Dabei ist

$$C_{Ox} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{Ox}}{d}$$

die Kapazität einer reinen Siliziumdioxidschicht. Aus der Forderung, daß das elektrische Feld im Unendlichen verschwindet, $\vec{E}_\infty = 0$, folgt

$$0 = \sigma_S + \sigma_{Ox} + \sigma_d. \quad (\text{A.3})$$

Wir erhalten

$$V_{ES} = -\frac{\sigma_{Ox}}{C_{Ox}} + \Phi_0 + \frac{\varsigma}{C_{Ox}} \sinh\left(\frac{ze_0\Phi_0}{2k_B T}\right),$$

welches uns das Oberflächenpotential Φ_0 als Funktion des Potentials V_{ES} und von σ_{Ox} sowie die Ableitung

$$\frac{\partial\Phi_0}{\partial V_{ES}} = \frac{1}{1 + \frac{\varsigma}{C_{Ox}} \frac{ze_0}{2k_B T} \cosh\left(\frac{ze_0\Phi_0}{2k_B T}\right)} \quad (\text{A.4})$$

mit einem Maximum bei $\Phi_0 = 0$ liefert, wobei die Flächenladung des Oxides als unabhängig von dem Oberflächenpotential zu betrachten ist¹.

Der Wert wird um so größer, je kleiner die Oxiddicke d_{Ox} und die Konstante ς , also die Konzentration des Elektrolyten c ist.

Aus

$$V_{ES} = \frac{\sigma_S}{C_{Ox}} + \frac{2k_B T}{ze_0} \operatorname{arcsinh}\left(\frac{\sigma_{Ox} + \sigma_S}{\varsigma}\right) \quad (\text{A.5})$$

folgt die spezifische differentielle Kapazität

$$\tilde{C}_S = \frac{\partial\sigma_S}{\partial V_{ES}} \quad (\text{A.6})$$

dieser Silizium-Oxid-Elektrolyt-Struktur, die von der angelegten Spannung V_{ES} abhängt. Für $\sigma_{Ox} + \sigma_S \geq \pm\varsigma$ erhalten wir aus Gl. A.5 für σ_S

$$\frac{e_0}{4k_B T} \frac{\varsigma}{C_{Ox}} e^{\frac{e_0}{2k_B T}(V_{ES} + \frac{\sigma_{Ox}}{C_{Ox}})} = e^y y \quad ; y = \frac{e_0}{2k_B T C_{Ox}} (\sigma_{Ox} + \sigma_S), \quad (\text{A.7})$$

woraus die spezifische Kapazität folgt.

Ebenfalls von Interesse ist die Änderung der Flächenladungsdichte im Elektrolyten bei der Änderung der des Oxides. Mit Gl. A.1 und Gl. A.3 ist

$$-\frac{2k_B T}{e_0} \operatorname{arcsinh}\left(\frac{\sigma_{Diffus}}{\varsigma}\right) = \frac{\sigma_{Ox} + \sigma_d}{C_{Ox}} + V_{ES}. \quad (\text{A.8})$$

Ist $\sigma_d \gg \varsigma$ substituieren in Gl. A.7 $\sigma_S = -(\sigma_{Ox} + \sigma_d)$ und erhalten daraus

$$\frac{\partial\sigma_d}{\partial\sigma_{Ox}}. \quad (\text{A.9})$$

¹Das Potential fällt über einem wesentlich größeren Bereich als dem einer Bindungslänge ab, daher ist σ_{Ox} unabhängig von Φ_0 .

Die spezifische Kapazität ist je nach den vorliegenden Verhältnissen C_{Ox} , bleibt also unverändert, oder wird durch Gleichung A.6 ersetzt und die Elektrolytspannung fällt über diese Kapazität ab. Ein mit σ_{Ox} verbundenes Oberflächenpotential Φ_O fällt direkt über das Oxid und der damit verbundenen Kapazität C_{Ox} eines Plattenkondensators ab. Wir haben also streng genommen zwei verschiedene Kapazitäten für das Verhalten eines Feldeffekttransistors zu berücksichtigen, je nachdem, ob sich das Oberflächenpotential oder das Elektrolytpotential ändert.

In physiologischen Salzkonzentrationen beträgt die Abweichung \tilde{C}_S von C_{Ox} bei 10 nm Oxid-dicken und bei moderaten Oxid-Elektrolyt-Ladungsdichten von $-0,1 Cm^{-2}$, das entspricht einer Dichte der dissoziierten Gruppen von $6.25 * 10^{17} m^{-2}$, weniger als 2/1000.

Bei denselben Parametern ist nach A.4 $\partial\Phi_0/\partial V_S \leq 0.004$, d.h. das Oberflächenpotential ändert sich kaum, wenn eine Spannung an den Transistor angelegt wird; die Spannung fällt komplett über das Oxid und nicht innerhalb des Elektrolyten ab.

Schließlich ruft nach Gl. A.9 eine Änderung der Oxid-Elektrolyt-Ladungsdichte hauptsächlich eine Änderung der den Ladung hervor, auch hier sind die Abweichungen kleiner 2/1000.

Wir halten damit fest:

- Das Oberflächenpotential der Elektrolyt-Oxid-Grenze bleibt bei einer solchen Struktur von Vorspannungen des Transistors V_{ES} beinahe unbeeinflusst.
- Einer Silizium-Oxid-Elektrolyt-Struktur kann eine Kapazität zugeordnet werden, die bis auf eine unbedeutende Störung der einer normalen Oxidschicht entspricht. Es macht keinen Unterschied, ob das Oberflächenpotential oder das Elektrolytpotential variiert wird, der Transistor antwortet auf beide Änderungen gleich.
- Eine Änderung der Oberflächenladung σ_{Ox} hat fast ausschließlich eine Änderung der den Ladung σ_d zur Folge.

Alle diese Punkte rechtfertigen die Vernachlässigung der Transistorstruktur unterhalb des Oxides, zumal die Ladung der Inversionsschicht wesentlich kleiner als die Ladung auf der Oxid-Elektrolyt-Grenzfläche ist.

Auch ist anzumerken, daß die verbreitete Ansicht einer seriellen Schaltung der Kapazitäten der Silizium-Siliziumoxid-Struktur mit der einer Doppelschicht falsch ist. Die Kapazität ist vielmehr durch die Gleichung A.6 vollständig bestimmt. Andernfalls würden sich auch dramatische Konsequenzen beim Durchqueren des neutralen Punktes der Oberfläche ergeben, hier verschwindet die Kapazität der diffusen Schicht annähernd. Eine Änderung der Ladung an der Halbleiter-Oxidgrenzfläche bewirkt eine Änderung der Ladung in der diffusen Schicht unter Umgehung der der Oxid-Elektrolytoberfläche, eine Änderung der Oxid-Elektrolytladung wirkt ebenfalls nur auf die Schicht im Elektrolyten.

A.2 Präparation chromaffiner Zellen

Die Präparation von chromaffinen Zellen richtet sich nach einer Anleitung, die mir von der Gruppe um Prof. Neher gegeben worden ist.

Zur Gewinnung primärer Kulturen chromaffiner Zellen von Rindern werden am örtlichen Schlachthof die Nebennieren (2-3 Stück) aus den bereits geteilten Tieren mit einem Messer herausgeschnitten. Sofort danach werden die Nebennieren vor Ort grob vom umgebenden Gewebe befreit, mit einer Spritze (20ml) 8°C kaltem Ca-freien Lockes Puffer durch die adrenale Vene gespült und in Puffer auf Eis gelegt.

Im Labor werden die Drüsen unter der Bank mit einer Schere säuberlich vom restlichen äußerlichen Gewebe befreit und erneut durch die Vene mit einer Spritze Lockes Puffer (37°C) perfundiert und bei 37°C 5 min ins Wasserbad gestellt. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt, um die Drüsen vom Blut zu bereinigen und um sie für die folgende Enzymbehandlung richtig zu temperieren.

Hierauf wird in jede Nebenniere ungefähr 5 ml Collagenase-Lösung (1mg/ml) durch die Vene injiziert, welche bei 37°C 15 min lang im Wasserbad wirkt. Dieser Schritt wird ebenfalls wiederholt. Die Drüsen erscheinen jetzt schwammig und aufgedunsen. Unter einer Injektion von Lockes Puffer blähen sich die Drüsen auf und können mit einer Schere vom Eingang der Vene her in zwei Hälften zerlegt werden. Das weiße Gewebe des Kerns, welches die chromaffinen Zellen beinhaltet, wird sichtbar. Säuberlich werden Stücke des Kerns mit der Schere herausgeschnitten, wobei darauf zu achten ist, daß diese sowohl frei von Venen und Adern als auch von dem teilweise fein verwachsenen Mantel sind. Die herausgetrennten Stücke werden in Lockes Puffer in einer Petrischale aufbewahrt. Erscheinen sie noch zu fest, wird etwas Collagenase-Lösung hinzugegeben. Anschließend wird die Collagenase durch Centrifugation bei 180 g für 2 min entfernt, der Bodensatz wird mit dem umgedrehten Ende einer steril geflammten Glaspipette unter tropfenweiser Zugabe von Lockes Puffer durch ein autoklaviertes Nylonnetz (Maschenweite 50µm) in ein Becherglas getrieben; ein Vorgang, der etwa 4 min dauert. Die Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren weiter vereinzelt und durch zwei- bis dreimaliges Zentrifugieren bei 70-100 g aufgereinigt.

A.3 Zellkultur

Unter der Lupe werden die Zellen mittels einer 10µl Pipette langsam so lange auf dem mit Collagen (10µl/cm² aus 1mg/ml Stammlösung) beschichteten und 1 ml Nährmedium gefüllten Chip pipettiert, bis einige Zellen optimal auf den Gates zu liegen kommen. Diese Methode erhöht den Anteil an gut liegenden Zellen gegenüber der reinen Zufallsmethode enorm. Solange die Zellen nicht adhärirt (ca. 20 min) sind, dürfen die Chips nicht bewegt werden. Danach werden sie bei 37°C, 10% CO₂ im Brutschrank gehalten.

Zwei bis drei Stunden nach dem Aussähen wird das Medium gegen eines mit 5% fetalem Kälber Serum gewechselt.

Experimente werden an den folgenden drei Tagen gemacht, wobei mit zunehmendem Alter der Zellkultur die Aussicht auf erfolgreiche Experimente sinkt.

A.4 Medien

A.4.1 Medien für die Präparation

Für die Präparation werden benötigt: Der Puffer wird auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt und

Ca-freier Lockes Puffer 10-fach	c/mM
NaCl	1540,0
KCl	56,0
NaH ₂ PO ₄	8,5
Na ₂ HPO ₄	21,5
D-Glucose	100,0

sterilfiltriert; bei Gebrauch 1:10 verdünnt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Die Collagenaselösung wird aus diesem Puffer und 1mg/ml Collagenase angesetzt. Dulbecos Modified Medium (Linaris, Deutschland, Bestellnummer F2143KG) wird mit Penecillin und Streptomycin versetzt (20 Einheiten/ml bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$).

A.4.2 Meßlösungen

Für die Messungen wurden folgende Extrazellulärlösungen benutzt:

	5mM HEPES	10mM HEPES	20mM HEPES
NaCl	140,0	137,5	132,5
HEPES	5,0	10,0	20,0
Glucose	35,0	30,0	15,0
KCl	2,8	2,8	2,8
MgCl ₂	2,0	2,0	2,0

in mM, pH auf 7,2 mit NaOH und 310 mOsm mit Glucose eingestellt.

Für Messungen mit Ammoniumchlorid wurden der 5mM HEPES-Lösung 10mM NH₄Cl beigegeben.

Stimuliert wurde mit 3mM BaCl₂ in den entsprechenden Extrazellulärlösungen.

Die Poren Valinomycin und Nigericin wurden in Ethanol gelöst.

Die Lösungen bei Patchexperimenten beinhalteten: bei pH 7.2 und 320 mOsm.

	extrazellulär c/mM	intrazellulär c/mM
KCl	2,8	135,0
NaCl	150,0	5,5
Glukose	10,0	-
MgCl ₂	2,0	1,0
HEPES	10,0	10,0
Mg-ATP	-	2,0
CaCl ₂	2,5	1,0
EGTA	-	11

A.4.3 Titrationsmessung

Die Messungen des Oberflächenpotentials in Abhängigkeit von dem pH-Wert unter Na-haltiger Lösung wurden mit einer NaCl-Ag/AgCl Salzbrücke gemacht(3M), ebenso die Messungen unter der Anwesenheit von 10 mM Ammoniumchlorid sowie die Messungen der verschiedenen Konzentrationen von Na-ATP. Die Oberflächenpotential-versus-pH-Messungen unter 80 mM Kalium fanden unter Verwendung einer 3 M KCl-Ag/AgCl Salzbrücke statt.

A.5 Meßstand

Der Meßstand bestand aus einem aufrechten Mikroskop, unter dem der Verstärker für die Transistoren angebracht war. Patchexperimente wurden entweder mit einem NPI discontinuous mode Patchverstärker oder mit einem Axopatch 200b oder einem Axopatch 2a gemacht. Die Lösungen wurden mittels eines Piezoaktuators und eines θ -Tubes appliziert. Um mehrere verschiedene Lösungen applizieren zu können, war die eine Seite des θ -Tubes mit einem Revolver versehen,

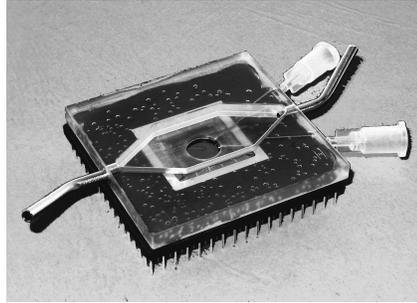


Abbildung A.1: Der Chip mit der aufgeklebten Meßkammer. Gut zu erkennen sind die Kanülen zum Absaugen der applizierten Lösung.

der mittels eines Schrittmotors eine aus sechs Lösungen auf diesen Eingang schalten konnte.

A.6 Meßkammer

Um eine vorzeitige Kontamination der Zellen auf dem Chip durch die applizierten Lösungen zu vermeiden muß die Badlösung schnell und sicher gewechselt werden. Weil Barium bereits in kleinen Konzentrationen nicht reversibel und anhaltend Exozytose auslöst, war dieses besonders wichtig, damit mehrere Messungen verschiedener Zellen auf einem Chip durchgeführt werden konnten. Dazu wurde eine Meßkammer konstruiert, die den Wechsel der Badlösung durch einen laminaren Fluß über den Zellen gewährleistet. Dabei muß sie genügend Platz für das Objektiv, die Patchpipette sowie das θ -Tube für die Applikation der verschiedenen Lösungen bieten. Die Kammer ist aus Plexiglas gefertigt. Einer Seite wird frische Lösung durch ein Metallrohr hinzugegeben, auf der anderen Seite wird abgesaugt. Es handelt sich um einen Diffusor sowie einen Konfusor. Solche Strömungen können berechnet werden, sie sind nur bis zu einer gewissen Strömungsgeschwindigkeit laminar, danach bilden sich gegenläufig Strömungsäste in verschiedener Anzahl, bevor sie turbulent werden [Lan91]. Es zeigt sich, daß die gewählten Maße eine laminare Strömung bis zu einem Volumenstrom von 3.5 ml/min gewährleisten.

Ein Problem bildet die Kontaktierung des Chips mit dem Package durch die Bonddrähte. Da die Bonddrähte eine gewisse Höhe haben und durch die Kammer vor den Lösungen geschützt werden müssen, kann die Kammer nicht eben zur Chipoberfläche gebaut werden; es befindet sich in der Mitte ein Loch, welches den Gatebereich des Chips offenlegt. Die Lösungen werden mit einer relativ hohen Geschwindigkeit über das θ -Tube, bei 2 ml/h pro Seite und 160 μm Durchmesser des θ -Tube sind das ungefähr 50 $\mu\text{m}/\text{ms}$, direkt auf den Chip gegeben und sammeln sich leicht in dieser Aussparung an. Deshalb werden zwei Kanülen (Dentalkanülen, Braun-Melsungen, Deutschland, $\varnothing=0.4$ mm) unterhalb der Kammer direkt auf die Chipoberfläche geklebt, deren Öffnungen an der Kante enden und ein Absaugen der applizierten Lösung erlauben. Einen konstanten Füllstand des Bades garantiert die Benutzung von Push-Pull-Spritzenpumpen sowohl für den Wechsel der Badlösung als auch für das θ -Tube gekoppelt mit den Absaugkanülen. Abbildung A.1 zeigt einen fertigen Chip mit der Meßkammer.

A.7 Amperometrie

Die amperometrischen Messungen wurden mit einem selbst konstruierten Verstärker gemacht. Grundstock dieses Verstärkers bildet ein Strom-Spannungswandler. Der Feedback-Widerstand war $470\text{ M}\Omega$, welcher zusammen mit der Eingangskapazität des Operationsverstärkers und der Kapazität der Elektrode einen linearen Frequenzgang bis 1 kHz zeigt und damit für die Messungen an chromaffinen Zellen ausreichend schnell ist. Die benutzten Kohlefasern besitzen einen Durchmesser von $5\text{ }\mu\text{m}$ (Ala Science). Sie werden vor Nutzung mit einem Skalpell angeschnitten und kurz vor der Messung in Isopropanol für 10 s getaucht. Die Spannung beträgt 800 mV versus Ag/AgCl-Badelektrode.

A.8 Herstellung und Justage der θ -Tubes

θ -Tubes wurden aus Glaskapillaren mit einem Septum von 0.1 mm (Hilgenberg) auf einem Sutter-Puller gezogen und nach Anritzen an einer Diamantscheibe gebrochen. Sie hatten einen Durchmesser von $180\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$. Polyethylenschlauch mit einem Aussendurchmesser von 0.61 (0.28 ID) (Sims Portex, England) wurde aufgeraut und mit Elastosil E43 (Wacker Chemie, Deutschland) eingeklebt.

Zum Justieren des θ -Tubes wurde die Lage des Septums unter dem Mikroskop eingestellt und das Transistorsignal benachbarter Transistoren beim Hin- und Herfahren des Tubes mit Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes oder unterschiedlicher Ionenkonzentration überwacht. Dieses ist die präziseste Methode, um das Tube sauber einzustellen. Aufgrund der schwierigen Strömungsverhältnisse an der Chipoberfläche gestaltet sich das Einstellen als nicht besonders einfach. Das Strömungsprofil innerhalb eines Tubes kann ebenfalls annähernd berechnet werden, wenn man den Querschnitt des Tubes als gleichseitiges Dreieck nähert. Der Strom in die Badlösung bildet einen überfluteten Strahl [Lan91]. Anhand dieser Rechnungen kann man sehen, dass die auf die Zellen ausgeübten Scherkräfte nicht groß sind, da die Badlösung von der applizierten Lösung mitgerissen wird und so das Strömungsprofil glättet.

A.8.1 Fluoreszenz

Gefärbt wurde mit $5\text{ }\mu\text{M}$ Acridin Orange (Sigma Aldrich, Zink Chlorid) in Extrazellulärlösung für 5 min , dann wurde zweimal mit dieser gespült.

Der Filtersatz bestand aus einem Anregungsbandpaß BP480/10, einem Farbteiler FT570 und einem Langpaß LP610. Die Aufnahmen wurden mit einer Nikon D1x gemacht, die Linearität der Kamera wurde mit einem Graufiltersatz geprüft (Schott, Deutschland). Das Ausbleichen des Farbstoffes wurde überprüft und konnte vernachlässigt werden.

A.9 Simulation

Die verwendeten Algorithmen sind aus [Pre93] und modifiziert. Mit den gewählten Gitterparametern wird das Konvergenzkriterium des Algorithmus erfüllt [Ame77]. Die Konzentration an ausgeschütteter Salzsäure als Quellterm ist für dieses Gitter 0.85 M , bei der Simulation mit ATP als Quelle betragen die Konzentrationen für HCl 0.062 , ATP ungefähr 0 und für HATP 0.95 mM . Für ATP wird nur der pK-Wert von 6.5 benutzt, da die anderen Protonierungsgrade kaum einen Beitrag zu den ausgeschütteten Protonen leisten.

Für die Simulation mit der Matrix wurde auf zwei Gittern unterschiedlicher Gitterkonstanten gearbeitet. In der Mitte des großen äußeren Gitters, Gitterparameter und Zeiteinheit wie oben, war ein kleines Gitter 52×52 mit $0.02\text{ }\mu\text{m}$ und 0.00001 als Zeiteinheit. Die Matrix wurde

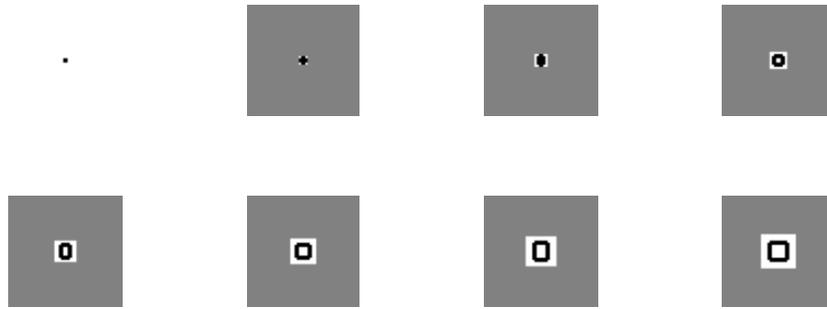


Abbildung A.2: Die Matrix wurde nach diesem Muster (von links oben nach rechts unten) auf das Gitter verteilt. Die schon vorhandene Matrix (weiß) wurde nach außen sortiert, die entstehenden Freiräume durch neue ersetzt. Gezeigt sind die ersten acht Schritte.

nach dem Schema in Abb. A.2 auf das Gitter gelegt, damit war die Matrix immer quadratisch. Dabei wurden die alten, besetzten Gitterpunkte nach außen sortiert, von den Plätzen, die aus der kleinen Matrix heraus fielen, wurden die Substanzen auf das großen Gitter übertragen. Die Diffusionskoeffizienten über die Grenze Matrix-Lösung waren die zwischen der Matrix und der Lösung gemittelt. Die Diffusionskoeffizienten sind für Protonen 9.31, Natrium 1.33, Chlorid 2.03, HEPES 0.79, Adrenalin 0.6, ATP 0.4 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ [Ger82, Kov00b, Hil01].

Literaturverzeichnis

- [Alb97] A. Albillos, G. Dernick, H. Horstmann, W. Almers, G. A. de Toledo, M. Lindau. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650):509–512, 1997.
- [Ama99] C. Amatore, Y. Bouret, L. Midrier. Time-resolved dynamics of the vesicle membrane during individual exocytotic secretion events, as extracted from amperometric monitoring of adrenaline exocytosis from chromaffin cells. *Chemistry-a European Journal*, 5(7):2151–2162, 1999.
- [Ama05] C. Amatore, S. Arbault, I. Bonifas, Y. Bouret, M. Erard, A. G. Ewing, L. A. Sombers. Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis. *Biophysical Journal*, 88(6):4411–4420, 2005.
- [Ame77] W. F. Ames. *Numerical Methods for partial differential equations*. Computer Science and applied mathematics. Academic press, Orlando, Florida, second edition, 1977.
- [App97] D. K. Apps. Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 8(2):121–131, 1997.
- [Aun99] D. Aunis, K. Langley. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiologica Scandinavica*, 167(2):89–97, 1999.
- [Bar88] J. Barasch, M. D. Gershon, E. A. Nunez, H. Tamir, Q. Alawqati. Thyrotropin induces the acidification of the secretory granules of parafollicular cells by increasing the chloride conductance of the granular membrane. *Journal of Cell Biology*, 107(6):2137–2147, 1988.
- [Ber70] P. Bergveld. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, BM17(1):70–71, 1970.
- [Bla01] C. G. Blackmore, A. Varro, R. Dimaline, L. Bishop, D. V. Gallacher, G. J. Dockray. Measurement of secretory vesicle pH reveals intravesicular alkalization by vesicular monoamine transporter type 2 resulting in inhibition of prohormone cleavage. *Journal of Physiology-London*, 531(3):605–617, 2001.
- [Bor97] R. Borges, E. R. Travis, S. E. Hochstetler, R. M. Wightman. Effects of external osmotic pressure on vesicular secretion from bovine adrenal medullary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13):8325–8331, 1997.
- [Bor00] R. Borges, J. D. Machado, C. Alonso, M. A. Briosio, J. F. Gomez. Functional role of chromogranins - the intragranular matrix in the last phase of exocytosis. In *Chromogranins: Functional And Clinical Aspects*, volume 482 of *Advances In Experimental Medicine And Biology*, pages 69–81. 2000.

- [Bou83] L. Bousse, N. F. Derooij, P. Bergveld. The influence of counterion adsorption on the ψ_0 /pH characteristics of insulator surfaces. *Surface Science*, 135(1-3):479–496, 1983.
- [Bra97] D. Braun, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A*, 65(4-5):341–348, 1997.
- [Bri05] M. Brittinger, P. Fromherz. Field-effect transistor with recombinant potassium channels: Fast and slow response by electrical and chemical interactions. *Applied Physics A*, 81(3):439–447, 2005.
- [Cah95] P. S. Cahill, R. M. Wightman. Simultaneous amperometric measurement of ascorbate and catecholamine secretion from individual bovine adrenal- medullary cells. *Analytical Chemistry*, 67(15):2599–2605, 1995.
- [Che01] L. V. Chernomordik, G. B. Melikyan. Membrane fusion and ten reasons not to study it. *Biologicheskie Membrany*, 18(6):477–488, 2001.
- [Cho92] R. H. Chow, L. von Rüden, E. Neher. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 356(6364):60–63, 1992.
- [Chr03] T. Christensen, D. M. Gooden, J. E. Kung, E. J. Toone. Additivity and the physical basis of multivalency effects: A thermodynamic investigation of the calcium EDTA interaction. *Journal of the American Chemical Society*, 125(24):7357–7366, 2003.
- [CI99] I. Cuchillo-Ibanez, P. Michelena, A. Albillos, A. G. Garcia. A preferential pole for exocytosis in cultured chromaffin cells revealed by confocal microscopy. *Febs Letters*, 459(1):22–26, 1999.
- [Cio94] E. L. Ciolkowski, K. M. Maness, P. S. Cahill, R. M. Wightman, D. H. Evans, B. Fosset, C. Amatore. Disproportionation during electrooxidation of catecholamines at carbon-fiber microelectrodes. *Analytical Chemistry*, 66(21):3611–3617, 1994.
- [Cle98] S. Clerc, Y. Barenholz. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Analytical Biochemistry*, 259(1):104–111, 1998.
- [Col96] V. Colomer, G. A. Kicska, M. J. Rindler. Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1):48–55, 1996.
- [Cor90] N. A. Corfu, R. Tribolet, H. Sigel. Comparison of the self-association properties of the 5'-triphosphates of inosine (ITP), guanosine (GTP), and adenosine (ATP) - Further evidence for ionic interactions in the highly stable dimeric $[\text{H}_2(\text{ATP})]_2^{4-}$ stack. *European Journal of Biochemistry*, 191(3):721–735, 1990.
- [Cou68] R. E. Coupland. Determining sizes and distribution of sizes of spherical bodies such as chromaffin granules in tissue sections. *Nature*, 217(5126):384–388, 1968.
- [Cou96] M. Coughnon, P. Bouyer, P. Hulin, T. Anagnostopoulos, G. Planelles. Further investigation of ionic diffusive properties and of NH_4^+ pathways in xenopus laevis oocyte cell membrane. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 431(4):658–667, 1996.

- [Eve03] B. Eversmann, M. Jenkner, F. Hofmann, C. Paulus, R. Brederlow, B. Holzapfl, P. Fromherz, M. Merz, M. Brenner, M. Schreiter, R. Gabl, K. Plehnert, M. Steinhäuser, G. Eckstein, D. Schmitt-Landsiedel, R. Thewes. A 128x128 CMOS biosensor array for extracellular recording of neural activity. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 38(12):2306–2317, 2003.
- [Fan04] T. H. Fan, A. G. Fedorov. Transport model of chemical secretion process for tracking exocytotic event dynamics using electroanalysis. *Analytical Chemistry*, 76(15):4395–4405, 2004.
- [Fin96] J. M. Finnegan, K. Pihel, P. S. Cahill, L. Huang, S. E. Zerby, A. G. Ewing, R. T. Kennedy, R. M. Wightman. Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic β -cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(5):1914–1923, 1996.
- [Fun86] C. D. Fung, P. W. Cheung, W. H. Ko. A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 33(1):8–18, 1986.
- [Ger82] G. Gerhardt, R. N. Adams. Determination of diffusion-coefficients by flow-injection analysis. *Analytical Chemistry*, 54(14):2618–2620, 1982.
- [Gla98] M. I. Glavinovic, M. L. Vitale, J. M. Trifaro. Comparison of vesicular volume and quantal size in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 85(3):957–968, 1998.
- [Gle04] R. Gleixner. *Fluoreszenzspektroskopische Messung des spezifischen Elektrolytwiderstands in der Adhäsionsregion des Neuron-Silizium-Kontakts*. PhD thesis, Technischen Universität München, 2004.
- [Glo00] Michael M. Glombik, Hans-Hermann Gerdes. Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: Secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie*, 82(4):315–326, 2000.
- [Goo66] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5(2):467–477, 1966.
- [Gra47] D. C. Grahame. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Reviews*, 41(3):441–501, 1947.
- [Gra00] M. E. Graham, R. J. Fisher, R. D. Burgoyne. Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: Effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics. *Biochimie*, 82(5):469–479, 2000.
- [Gri90] P. E. Grimshaw, J. H. Nussbaum, A. J. Grodzinsky, M. L. Yarmush. Kinetics of electrically and chemically-induced swelling in polyelectrolyte gels. *Journal of Chemical Physics*, 93(6):4462–4472, 1990.
- [Gru72] E. Grushka. Characterization of exponentially modified gaussian peaks in chromatography. *Analytical Chemistry*, 44(11):1733–&, 1972.
- [Haf05] I. Hafez, K. Kisler, K. Berbian, G. Dernick, V. Valero, M. G. Yong, H. G. Craighead, M. Lindau. Electrochemical imaging of fusion pore openings by electrochemical detector arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39):13879–13884, 2005.

- [Hai89] J. R. Haigh, R. Parris, J. H. Phillips. Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. *Biochemical Journal*, 259(2):485–491, 1989.
- [Hal98] M. Haller, C. Heinemann, R. H. Chow, R. Heidelberger, E. Neher. Comparison of secretory responses as measured by membrane capacitance and by amperometry. *Biophysical Journal*, 74(4):2100–2113, 1998.
- [Hil01] B. Hille. *Ion Channels of excitable Membranes*. Sinaur Associates, Sunderland, third edition, 2001.
- [Hol83] R. W. Holz, R. A. Senter, R. R. Sharp. Evidence that the H⁺ electrochemical gradient across membranes of chromaffin granules is not involved in exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 258(12):7506–7513, 1983.
- [Hol86] R. W. Holz. The role of osmotic forces in exocytosis from adrenal chromaffin cells. *Annual Review of Physiology*, 48:175–189, 1986.
- [Hua93] T. L. Huang, P. Tsai, C. T. Wu, C. S. Lee. Mechanistic studies of electroosmotic control at the capillary solution interface. *Analytical Chemistry*, 65(20):2887–2893, 1993.
- [Jan93] J. A. Jankowski, T. J. Schroeder, E. L. Ciolkowski, R. M. Wightman. Temporal characteristics of quantal secretion of catecholamines from adrenal-medullary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20):14694–14700, 1993.
- [Jan94] J. A. Jankowski, J. M. Finnegan, R. M. Wightman. Extracellular ionic composition alters kinetics of vesicular release of catecholamines and quantal size during exocytosis at adrenal-medullary cells. *Journal of Neurochemistry*, 63(5):1739–1747, 1994.
- [Joh76] R. G. Johnson, A. Scarpa. Internal pH of isolated chromaffin vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7):2189–2191, 1976.
- [Jun87] W. Junge, S. McLaughlin. The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 890(1):1–5, 1987.
- [Kie00] V. Kiessling, B. Muller, P. Fromherz. Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe. *Langmuir*, 16(7):3517–3521, 2000.
- [Koh02] A. Kohn. Das chromaffine Gewebe. *Ergebnisse Anat. Entwicklung*, 12:253–348, 1902.
- [Kop82] W. N. Kopell, E. W. Westhead. Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10):5707–5710, 1982.
- [Kov00a] L. M. Koval, E. N. Yavorskaya, E. A. Lukyanetz. Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures. *Neuroscience*, 96(3):639–649, 2000.
- [Kov00b] O. N. Kovbasnjuk, P. M. Bungay, K. R. Spring. Diffusion of small solutes in the lateral intercellular spaces of MDCK cell epithelium grown on permeable supports. *Journal of Membrane Biology*, 175(1):9–16, 2000.
- [Kov01] L. M. Koval, E. N. Yavorskaya, E. A. Lukyanetz. Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *General and Comparative Endocrinology*, 121(3):261–277, 2001.

- [Kui89] G. A. J. Kuijpers, L. M. Rosario, R. L. Ornberg. Role of intracellular pH in secretion from adrenal-medulla chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(2):698–705, 1989.
- [Lam96] A. Lambacher, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Applied Physics A*, 63(3):207–216, 1996.
- [Lam04] A. Lambacher, M. Jenkner, M. Merz, B. Eversmann, R. A. Kaul, F. Hofmann, R. Thewes, P. Fromherz. Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μm resolution. *Applied Physics A*, 79(7):1607–1611, 2004.
- [Lan91] L. D. Landau, E. M. Lifschitz. *Hydrodynamik*, volume 6 of *Lehrbuch der Theoretischen Physik*. Akademie Verlag, Berlin, 5 edition, 1991.
- [Mic04] D. J. Michael, X. H. Geng, N. X. Cawley, Y. P. Loh, C. J. Rhodes, P. Drain, R. H. Chow. Fluorescent cargo proteins in pancreatic β -cells: Design determines secretion kinetics at exocytosis. *Biophysical Journal*, 87(6):L3–L5, 2004.
- [Mie98] G. Miesenbock, D. A. De Angelis, J. E. Rothman. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689):192–195, 1998.
- [Mit92] M. Mitra, R. Lal. Study of proton binding-sites at the silicon dioxide-electrolyte interface with conductance spectroscopy. *Journal of the Electrochemical Society*, 139(6):1706–1714, 1992.
- [Mos03] E. V. Mosharov, L. W. Gong, B. Khanna, D. Sulzer, M. Lindau. Intracellular patch electrochemistry: Regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, 23(13):5835–5845, 2003.
- [Mun99] M. L. Mundorf, S. E. Hochstetler, R. M. Wightman. Amine weak bases disrupt vesicular storage and promote exocytosis in chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 73(6):2397–2405, 1999.
- [Nan93] C. Nanavati, J. M. Fernandez. The secretory granule matrix - A fast-acting smart polymer. *Science*, 259(5097):963–965, 1993.
- [Nar97] M. Naraghi, E. Neher. Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of Ca^{2+} at the mouth of a calcium channel. *Journal of Neuroscience*, 17(18):6961–6973, 1997.
- [Orn88] R. L. Ornberg, G. A. J. Kuijpers, R. D. Leapman. Electron-probe microanalysis of the subcellular compartments of bovine adrenal chromaffin cells - comparison of chromaffin granules insitu and invitro. *Journal of Biological Chemistry*, 263(3):1488–1493, 1988.
- [Orn95] R. L. Ornberg, S. Furuya, G. Copping, G. A. J. Kuijpers. Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells - Regulation by internal granule pH. *Cell and Tissue Research*, 279(1):85–92, 1995.
- [Pal91] M. G. Palmgren. Acridine-orange as a probe for measuring pH gradients across membranes - Mechanism and limitations. *Analytical Biochemistry*, 192(2):316–321, 1991.
- [Pay55] Th. A. J. Payens. Ionized monolayers. *Philips Res. Rep.*, (10):425–481, 1955.
- [Pie96] R. Pierret. *Semiconductor Device Fundamentals*. Addison Wesley Longman, 1996.

- [Pih94] K. Pihel, T. J. Schroeder, R. M. Wightman. Rapid and selective cyclic voltammetric measurements of epinephrine and norepinephrine as a method to measure secretion from single bovine adrenal-medullary cells. *Analytical Chemistry*, 66(24):4532–4537, 1994.
- [Pla97] H. Plattner, A. R. Artalejo, E. Neher. Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex - Analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *Journal of Cell Biology*, 139(7):1709–1717, 1997.
- [Pol79] H. B. Pollard, H. Shindo, C. E. Creutz, C. J. Pazoles, J. S. Cohen. Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by ^{31}P nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 254(4):1170–1177, 1979.
- [Pol84] H. B. Pollard, C. J. Pazoles, C. E. Creutz, J. H. Scott, O. Zinder, A. Hotchkiss. An osmotic mechanism for exocytosis from dissociated chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 259(2):1114–1121, 1984.
- [Pot02] E. N. Pothos, E. Mosharov, K. P. Liu, W. Setlik, M. Haburcak, G. Baldini, M. D. Gershon, H. Tamir, D. Sulzer. Stimulation-dependent regulation of the pH, volume and quantal size of bovine and rodent secretory vesicles. *Journal of Physiology-London*, 542(2):453–476, 2002.
- [Pre93] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, Cambridge, 2nd edition, 1993.
- [Ren98] M. Rentschler, P. Fromherz. Membrane-transistor cable. *Langmuir*, 14(2):547–551, 1998.
- [Sal80] G. Salama, R. G. Johnson, A. Scarpa. Spectrophotometric measurements of transmembrane potential and pH gradients in chromaffin granules. *Journal of General Physiology*, 75(2):109–140, 1980.
- [San00] S. Sankaranarayanan, T. A. Ryan. Real-time measurements of vesicle-snare recycling in synapses of the central nervous system. *Nature Cell Biology*, 2(4):197–204, 2000.
- [Sca92] P. J. Scales, F. Grieser, T. W. Healy, L. R. White, D. Y. C. Chan. Electrokinetics of the silica solution interface - a flat-plate streaming potential study. *Langmuir*, 8(3):965–974, 1992.
- [Sch92] T. J. Schroeder, J. A. Jankowski, K. T. Kawagoe, R. M. Wightman, C. Lefrou, C. Amatore. Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Analytical Chemistry*, 64(24):3077–3083, 1992.
- [Sch94] T. J. Schroeder, J. A. Jankowski, J. Senyshyn, R. W. Holz, R. M. Wightman. Zones of exocytotic release on bovine adrenal-medullary cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 269(25):17215–17220, 1994.
- [Sch96] T. J. Schroeder, R. Borges, J. M. Finnegan, K. Pihel, C. Amatore, R. M. Wightman. Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophysical Journal*, 70(2):1061–1068, 1996.
- [Spi02] K. W. Spitzer, R. L. Skolnick, B. E. Peercy, J. P. Keener, R. D. Vaughan-Jones. Facilitation of intracellular H^+ ion mobility by CO_2/HCO_3 in rabbit ventricular myocytes is regulated by carbonic anhydrase. *Journal of Physiology-London*, 541(1):159–167, 2002.

- [Ste24] O. Stern. Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht. *Zeitschrift für Elektrochemie*, 30:508–515, 1924.
- [Sud04] T. C. Südhof. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27:509–547, 2004.
- [Sul05] D. Sulzer, M. S. Sonders, N. W. Poulsen, A. Galli. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Progress In Neurobiology*, 75(6):406–433, 2005.
- [Sze85] S. M. Sze. *Semiconductor devices*. John Wiley & Sons, New York, 1985.
- [Tab92] J. S. Tabb, P. E. Kish, R. Vandyke, T. Ueda. Glutamate transport into synaptic vesicles - Roles of membrane-potential, pH gradient, and intravesicular pH. *Journal of Biological Chemistry*, 267(22):15412–15418, 1992.
- [Tan79] T. Tanaka, D. J. Fillmore. Kinetics of swelling of gels. *Journal of Chemical Physics*, 70(3):1214–1218, 1979.
- [Tar03] J. W. Taraska, D. Perrais, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, W. Almers. Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4):2070–2075, 2003.
- [Tra98] E. R. Travis, R. M. Wightman. Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27:77–103, 1998.
- [Tro02] K. P. Troyer, R. M. Wightman. Temporal separation of vesicle release from vesicle fusion during exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32):29101–29107, 2002.
- [Uvn80a] B. Uvnas, C. H. Aborg. Invitro studies on a 2-pool storage of adrenaline and noradrenaline in granule material from bovine adrenal-medulla. *Acta Physiologica Scandinavica*, 109(4):345–354, 1980.
- [Uvn80b] B. Uvnas, C. H. Aborg. Invitro studies on a cation dependent catecholamine release from a 2-compartment storage in bovine adrenal-medullary granules. *Acta Physiologica Scandinavica*, 109(4):355–362, 1980.
- [Ver00] E. J. W. Verwey, J. Th. G. Overbeek. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Dover Publications, 2000.
- [Voe05] M. Voelker, P. Fromherz. Signal transmission from individual mammalian nerve cell to field-effect transistor. *Small*, 1(2):206–210, 2005.
- [Von93] L. von Rüden, A. G. Garcia, M. G. Lopez. The mechanism of Ba²⁺-induced exocytosis from single chromaffin cells. *Febs Letters*, 336(1):48–52, 1993.
- [Wal96a] A. Walker, M. I. Glavinovic, J. M. Trifaro. Temperature dependence of release of vesicular content in bovine chromaffin cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 432(5):885–892, 1996.
- [Wal96b] A. Walker, M. I. Glavinovic, J. M. Trifaro. Time course of release of content of single vesicles in bovine chromaffin cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 431(5):729–735, 1996.
- [Wei97] R. Weis, P. Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E*, 55(1):877–889, 1997.

- [Wig91] R. M. Wightman, J. A. Jankowski, R. T. Kennedy, K. T. Kawagoe, T. J. Schroeder, D. J. Leszczyszyn, J. A. Near, E. J. Diliberto, O. H. Viveros. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23):10754–10758, 1991.
- [Wig95] R. M. Wightman, T. J. Schroeder, J. M. Finnegan, E. L. Ciolkowski, K. Pihel. Time-course of release of catecholamines from individual vesicles during exocytosis at adrenal-medullary cells. *Biophysical Journal*, 68(1):383–390, 1995.
- [Wil00] R. M. Williams, W. W. Webb. Single granule pH cycling in antigen-induced mast cell secretion. *Journal of Cell Science*, 113(21):3839–3850, 2000.
- [Win80] H. Winkler, E. Westhead. The molecular-organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5(11):1803–1823, 1980.
- [Woi95] P. Woias, L. Meixner, D. Amandi, M. Schonberger. Modeling the short-time response of ISFET sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 24(1-3):211–217, 1995.
- [Wu01] M. M. Wu, M. Grabe, S. Adams, R. Y. Tsien, H. P. H. Moore, T. E. Machen. Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35):33027–33035, 2001.
- [Wut94] W. A. Wuttke, T. Munsch, M. S. Berry. Intracellular pH of giant salivary-gland cells of the leech *haementeria-ghiliainii* - Regulation and effects on secretion. *Journal of Experimental Biology*, 189:179–198, 1994.
- [Xu99] J. H. Xu, F. W. Tse. Brefeldin a increases the quantal size and alters the kinetics of catecholamine release from rat adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27):19095–19102, 1999.
- [Yat74] D. E. Yates, S. Levine, T. W. Healy. Site-binding model of electrical double-layer at oxide-water interface. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, 70:1807–1818, 1974.
- [Zad94] A. Zador, C. Koch. Linearized models of calcium dynamics - Formal equivalence to the cable equation. *Journal of Neuroscience*, 14(8):4705–4715, 1994.
- [Zan52] V. Zanker. Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate (reversible Polymerisate) des Acridinorange durch Absorptionsmessungen und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung. *Zeitschrift für Physikalische Chemie-Leipzig*, 199(4):225–258, 1952.
- [Zho96] Z. Zhou, S. Mislser, R. H. Chow. Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophysical Journal*, 70(3):1543–1552, 1996.
- [Zoc99] F. Zoccarato, L. Cavallini, A. Alexandre. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, 72(2):625–633, 1999.