Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Membran- und Neurophysik

Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz

Günther Zeck

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 13.12.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 18.02.2002 angenommen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die nichtinvasive Kopplung von synaptisch verbundenen Neuronen mit einem Halbleiterchip charakterisiert. Dazu wurden Neurone der Schnecke *Lymnaea stagnalis* in Polymerkäfigen auf der Chipoberfläche immobilisiert. Unter Kulturbedingungen vernetzten die Neurone über elektrische Synapsen. Mit einem kapazitiven Stimulator konnte in einer adhärierten Zelle neuronale Aktivität, Aktionspotenziale, ausgelöst werden. Die Aktionspotenziale depolarisierten über die Synapse ein zweites Neuron, dessen Aktivität im darunterliegenden Transistor detektiert wurde. Der vollständige Signalweg vom Halbleiter über ein minimales neuronales Netzwerk zurück zum Halbleiter stellt die Grundlage neuroelektronischer Systeme dar.

Entscheidend für die Qualität der Einzelsignale zwischen Neuron und Chip ist die Beschaffenheit der Adhäsionsregion. Auf Poly-L-Lysin zusammen mit Wachstumsfaktoren kultivierte Schneckenneurone adhärieren im Abstand von 50 nm. Dieser Abstand konnte durch Vergleich zu Adhäsionsexperimenten mit Riesenvesikeln auf die Ausdehnung der Zellglykokalix zurückgeführt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Spalt zwischen Zelle und Halbleiter dieselben elektrischen Eigenschaften wie das Zellmedium hat.

Zur kapazitiven Stimulation von Aktionspotenzialen wurden zwischen Chip und Neuron über ein dünnes Oxid Spannungsstufen angelegt. Spannungstransienten mit Amplituden bis zu 200 mV depolarisierten die Zellmembran, ohne jedoch eine Langzeitschädigung derselben herbeizuführen. Die Eigenschaften der elektrischen Synapse wurden elektrophysiologisch gemessen. Die im Transistor detektierte Signalform konnte auf aktive Ionenkanäle und eine inhomogene Kanalverteilung in der Membran zurückgeführt werden. Die zum Aktionspotenzial verzögerten Signalamplituden von 1 mV weisen auf eine Inhomogenität der Kaliumkanäle in der Adhäsionsmembran im Prozentbereich hin.

Die komplette Signalschleife Silizium-Neuron-Neuron-Silizium wurde in 11 Experimenten gemessen. Wiederholungen einer Signalschleife zeigten unterschiedliche Transistorsignale. Diese konnten auf die Dynamik der Zellaktivität zurückgeführt werden.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Kopplung von neuronalen Netzen und Siliziumchips **1**
1.2 Motivation **2**

2 Siliziumchip und Schneckenneurone **5**

2.1 Siliziumchip **5**
Funktionsweise von Stimulator und Transistor
Chipdesign
Chipprozessierung
Charakterisierung der Chips
2.2 Neurone der Schnecke *Lymnaea stagnalis* **13**

3 Biologische neuronale Netze in Kultur **17**

3.1 Polymerkäfige **17**
3.2 Chipbehandlung für wiederholte Zellkultur **21**
3.3 Zellkultur auf Chips mit Polymerkäfigen **22**

4 Zur Neuron-Silizium-Schnittstelle **25**

4.1 Modell der Neuron-Silizium-Kopplung **25**
Aktionspotenzial eines Neurons von *Lymnaea stagnalis*
Punktkontakt-Modell
4.2 Bestimmung der Spaltleitfähigkeit **30**
4.3 Bestimmung des Adhäsionsabstands **33**
4.4 Charakterisierung der Adhäsionsregion mit Riesenlipidvesikeln **37**
4.5 Zusammenfassung **41**

5 Komponenten der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife **43**

5.1 Messaufbau **43**
5.2 Silizium-Neuron: Kapazitive Stimulation **45**
Zur Theorie der kapazitiven Stimulation
Vorexperimente zur kapazitiven Stimulation
Kapazitive Stimulation auf bidirektionalen Strukturen
5.3 Neuron-Neuron: Elektrische Synapse **55**
5.4 Neuron-Silizium: Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren **59**
Zur Theorie der Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren
Charakterisierung gemessener Signalformen
5.5 Zeitliche Dynamik von Aktionspotenzialen und Transistorsignalen **65**
Aktionspotenzialverbreiterung bei kapazitiver Stimulation
Aktionspotenzialverbreiterung bei Stimulation über die elektrische Synapse
5.6 Zusammenfassung **70**

6 Die Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife **71**

6.1 Beispielmessung zur Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife **71**
6.2 Kontrollexperimente **74**
6.3 Zusammenfassung der Schleifenexperimente **75**

7 Ausblick **79**

8 Anhang **81**

8.1 Chipprozessierung **81**
8.2 Zellkultur: Lösungen und Pipetten **83**
8.3 Vesikelpräparation **84**
8.4 Zellpräparation für Elektronenmikroskopieaufnahmen **84**
8.5 Abkürzungsverzeichnis **85**

Literaturverzeichnis **87**

1 *Einleitung*

1.1 Kopplung von neuronalen Netzen und Siliziumchips

Our understanding of simple circuits in electronics allows us to plan complex circuits which are essential to large computers...It becomes relevant to ask wether the ability of large collections of neurons to perform „computational“ tasks may in part be a spontaneous collective consequence of having a large number of interacting simple neurons [Hopfield 1982].

Die Frage, ob Computerleistungen, „computational tasks“, mit kleinen Netzwerken von Neuronen erzielt werden können, stellt sich auch heute. Von J.Hopfield wurde ein Netzwerk - im Folgenden Hopfieldnetz genannt - bestehend aus theoretischen Modellneuronen vorgeschlagen, welches Gedächtnisleistungen hervorbringen kann [Hopfield 1982]. Die theoretischen Vorhersagen konnten experimentell noch nicht bestätigt werden. Es wurde kein Netzwerk mit lebendigen Neuronen auf zellulärer Ebene beobachtet, um daraus das spontane Auftreten einer Problemlösung abzuleiten. Eine Möglichkeit, wie ein experimentelles Hopfieldnetz realisiert werden könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

Nervenzellen werden auf mikroelektronischem Substrat kultiviert und auf nanoskopischer Skala mit diesem verbunden. Als Substrat können entweder Metallelektroden [Groß 1977, Pine 1980, Novak 1986, Wilson 1994] oder Feldeffekttransistoren [Fromherz 1991] und kapazitive Stimulatoren [Fromherz 1995] auf Siliziumbasis verwendet werden. Eine nichtinvasive Kopplung organischer und anorganischer Materie, wie in den obigen Arbeiten beschrieben, ist für die Langzeitbeobachtung von biologischen Zellverbänden notwendig. Insbesonders könnte die Veränderung synaptischer Verbindungen, ein Hauptkriterium eines Hopfieldnetzes, auf langer Zeitskala verfolgt werden. Im Ansatz mit Transistoren und kapazitiven Siliziumstimulatoren bildet die dünne, isolierende Siliziumoxidschicht eine homogene, zellkulturverträgliche Oberfläche und verhindert elektrochemische Oberflächenreaktionen.

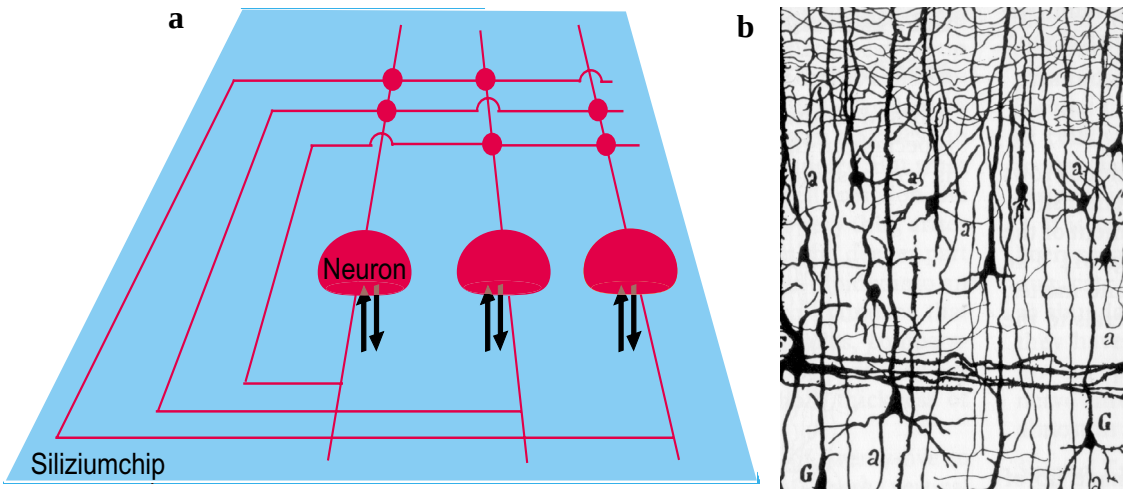


ABBILDUNG 1.1 (a) Schema eines chipüberwachten Hopfieldnetzes. Jedes Neuron (rot) ist synaptisch an bekannten Positionen mit jedem weiteren Neuron verbunden. Die neuronale Aktivität wird vom Siliziumchip ausgelöst und gemessen, durch schwarze Pfeile markiert. In (b) ist zum Vergleich die komplexe neuronale Struktur in einem Hirnschnitt des visuellen Cortex gezeigt. Bildquelle [De Felipe 1988].

In Abb. 1.1a ist das Schema eines biologischen Hopfieldnetzes auf einem mikroelektronischen Halbleitersubstrat, einem Siliziumchip, dargestellt. Folgende Bedingungen für eine assoziative „Gedächtnisleistung“ der Neurone müssen erfüllt sein: Die Neurone müssen untereinander verbunden sein, vom Chip aus stimuliert sowie ihre Aktivität detektiert werden. Weiterhin muß die Position der synaptischen Verbindungen bekannt sein und deren Stärke kontrolliert moduliert werden können. Zum Vergleich ist in Abb. 1.1b ein Schnitt durch die menschliche Sehrinde dargestellt. Die unüberschaubare Komplexität und Unzugänglichkeit neuronaler Verschaltungen *in vivo* motiviert die Reduktion auf ein zweidimensionales Netzwerk *in vitro*. Ob jedoch dieser reduktionistische Ansatz zu etwas Anwendbarem in Neurobiologie oder Informationstechnik führt, stellt eine interessante neurowissenschaftliche Herausforderung dar.

1.2 Motivation

Es wurde gezeigt, dass die Kopplung zwischen einer Retziusnervenzelle des Blutegels *Hirudo medicinalis* und einem Siliziumchip realisiert werden kann [Fromherz 1991, Stett 1997]. In weiteren Arbeiten wurde die Erweiterung auf synaptisch verbundene Zellen vorgenommen [Prinz 2000a, Jenkner 2001]. Dazu wurden Neurone der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis* verwendet, da hier schon kleine neuronale Zellverbände entscheidende physiologische Funktionen haben. Beispielsweise wird der Atemrythmus von nur drei Zellen, einem sogenannten „central pattern generator“, kontrolliert [Syed 1991].

Hauptaufgabe dieser Arbeit ist, die prinzipielle Machbarkeit eines chipüberwachten Hopfieldnetzes zu zeigen. Um die neuronale Aktivität eines Netzwerks zu induzieren und zu detektieren, müssen die Zellen auf mikroelektronischen Stimulatoren und Transistoren adhärieren. In Kultur werden die Zellkörper, die Somata, jedoch von den auswachsenden Fortsätzen, den Neuriten, von ihrer ursprünglichen Position weggezogen. Um dies zu unterbinden, wird die Somataimmobilisierung über Polymerkäfige eingeführt. Die erstmals realisierte Signalschleife vom elektronischen Substrat über zwei synaptisch verbundene Neurone zurück zum Halbleiter stellt die Elementarzelle eines chipüberwachten neuronalen Netzes dar (Abb. 1.2).

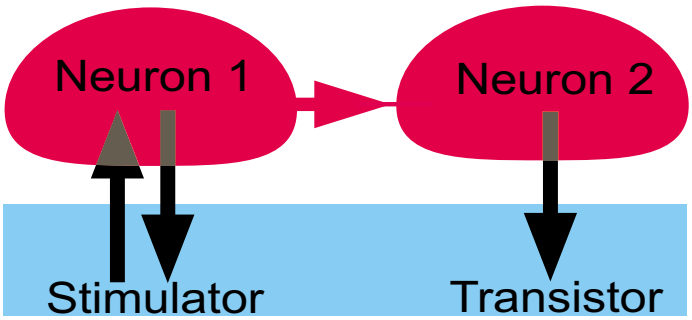


ABBILDUNG 1.2 Elementarzelle eines chipüberwachten Hopfield-Netzwerks, gebildet aus den in Silizium implementierten Stimulatoren und Transistoren sowie zwei synaptisch verbundenen Neuronen.

Ausgangspunkt eines überwachten Hopfieldnetzes sind Siliziumchip und Neuron. Diese werden in Kapitel 2 eingeführt. Die zur Somataimmobilisierung verwendeten Polymerkäfige werden in Kapitel 3 beschrieben.

Das folgende Kapitel 4 beinhaltet die Charakterisierung der Neuron-Silizium Schnittstelle. Da sowohl Neurone als auch Chips elektrisch kommunizieren, kann deren Interfacing durch ein elektrisches Ersatzschaltbild beschrieben werden. Mit Hilfe der neu eingeführten Techniken des Lock-In Imaging spannungssensitiver Fluoreszenz und der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie kann der Nano-Spalt zwischen Zelle und Chip elektrisch und mechanisch charakterisiert werden.

Mit Hilfe der gewonnenen Parameter werden in Kapitel 5 die Einzelelemente der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Schleife charakterisiert: die kapazitive Stimulation neuronaler Aktivität, die Synapse zwischen zwei Neuronen sowie die Detektion von Aktionspotenzialen.

Aus diesen Einzelelementen läßt sich schließlich in Kapitel 6 die vollständige Schleife vom Siliziumchip über Neurone zurück zum Chip verstehen.

2 *Siliziumchip und Schneckenneurone*

In diesem Abschnitt werden die Hauptkomponenten eines chipüberwachten biologischen neuronalen Netzes eingeführt. Zum einen wird die Herstellung und Charakterisierung des Halbleiterchips beschrieben. Danach wird die Präparation von Neuronen von *Lymnaea stagnalis* dargestellt.

2.1 Siliziumchip

2.1.1 Funktionsweise von Stimulator und Transistor

Um die kapazitive Stimulation neuronaler Aktivität und deren Detektion über Feld-Effekt-Transistoren zu beschreiben, wird in Abb. 2.1 ein schematischer Querschnitt durch ein Siliziumchip betrachtet. Es sind zwei bidirektionale Strukturen, jeweils bestehend aus Stimulator und Transistor, dargestellt.

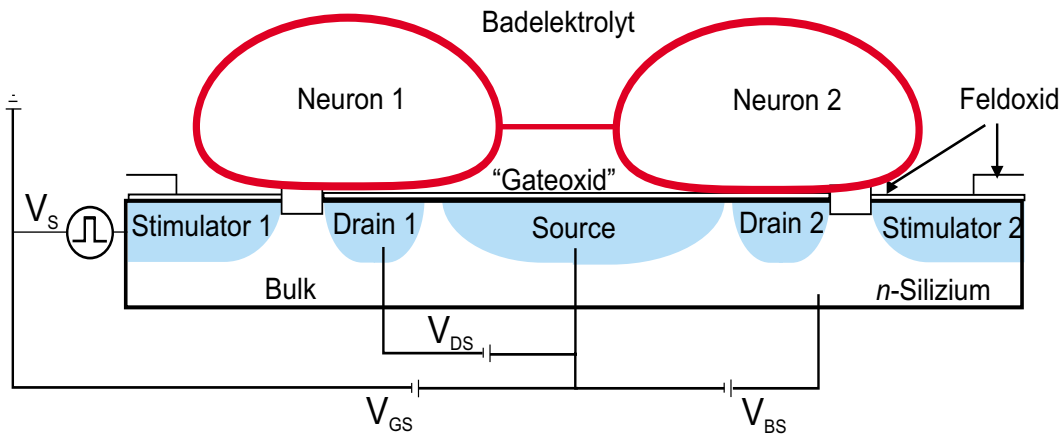


ABBILDUNG 2.1 Aufbau von kapazitivem Stimulator und Transistor in einem Siliziumchip. Für jedes Neuron wird ein Stimulator und ein Feld-Effekt-Transistor eingesetzt, durch Feldoxid getrennt. Der Stimulator besteht aus dotierten Zuleitungen. Der Transistor besteht aus einer Drain-Zuleitung, einer für alle Transistoren gemeinsamen Source-Zuleitung sowie einer nicht-metallisierten Gateregion dazwischen. Der Source-Drain Strom wird über die Source-Drain Spannung V_{DS} sowie die Gate-Source Spannung V_{GS} bestimmt. Um den pn-Übergang zwischen den Zuleitungen und dem Substrat bei angelegter Stimulationsspannung V_S zu sperren, wird das Bulkpotenzial um V_{BS} erhöht. Die Skizze ist nicht maßstabsgetreu.

Zur Stimulation werden *p*-dotierte Siliziumbahnen verwendet, die gegen das Zellmedium durch eine Oxidschicht isoliert sind und somit als kapazitive Stimulatoren dienen. Der Stimulator ist ein Kondensator, bestehend aus zwei unterschiedlichen Kontakten: *p*-Leitung im Silizium und Ionenleitung im Badelektrolyt bzw. Zellkulturmedium. Als Dielektrikum wird 10 nm dünnes Siliziumoxid verwendet. Um die Sperrung des *pn*-Übergangs zum *n*-Siliziumsubstrat zu gewährleisten, wird dieses auf +6.5 V vorgespannt sowie die maximal angelegte Stimulatorspannung auf 5 V begrenzt. Eine an den Stimulator angelegte Spannungstransiente koppelt kapazitiv in die darüberliegende Zelle und löst ein Aktionspotenzial aus, siehe Abschnitt 5.1.

Zur extrazellulären Detektion werden Feldeffekttransistoren (FET) mit metallfreiem Gate verwendet. Ins *n*-Siliziumsubstrat implantierte *p*-Zuleitungen bilden Source und Drain des Transistors. Der Gatebereich zwischen diesen Zuleitungen ist mit einer 10 nm dünnen Siliziumoxidschicht gegenüber Badelektrolyt isoliert. Im Betrieb wird zwischen Drain und Source die Spannung V_{DS} sowie zwischen Badelektrolyt und Source die Spannung V_{GS} angelegt. Eine genügend negative Spannung V_{GS} bildet unter dem Gateoxid eine Inversionsschicht, einen *p*-leitenden Kanal. Wird der Arbeitspunkt des Transistors, bestimmt durch V_{DS} und V_{GS}, im sogenannten Triodenbereich gewählt, so hängt der Löcherstrom zwischen Source und Drain I_{SD} linear von V_{GS} ab.

$$\left.\frac{\partial I_{DS}}{\partial V_{GS}}\right|_{V_{DS}=\,const} = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{ox} \cdot \mu_p \cdot \frac{b}{l \cdot d_{ox}} \cdot V_{DS} \qquad \textbf{(GL 2.1)}$$

Der rechte Ausdruck in Gleichung 2.1 wird als Steilheit bezeichnet, $\varepsilon_0\varepsilon_{ox}$ ist die Dielektrizitätskonstante des Gateoxids, d_{ox} dessen Dicke, μ_p die Löcherbeweglichkeit, b die Kanalbreite, l die Kanallänge der Gateregion. Während einer Transistormessung werden die Spannungen V_{DS} und V_{GS} konstant gehalten. Ein auf der nichtmetallisierten Gateregion adhäriertes Neuron ändert während eines Aktionspotenzials das Oberflächenpotenzial des Gateoxids gegenüber dem geerdeten Badelektrolyt und damit den Source-Drain-Stroms I_{SD}. Die Stromänderung wird über die Transistorkennlinie umgerechnet in eine äquivalente Steuerspannung, die der Spannung im Adhäsionsspalt V_J entspricht.

2.1.2 Chipdesign

Um individuelle Neurone sowohl stimulieren als auch ihre Aktivität detektieren zu können, muß die bidirektionale Struktur Stimulator-Transistor auf die Größe der Zelle abgestimmt sein. Da Schneckenneurone einen Durchmesser von 40 - 120 µm haben, sollten die Ausdehnungen von Stimulator und Transistor daran angepaßt sein. Für den Stimulator wird eine möglichst große Fläche gefordert, da sie die Stimulatorkapazität erhöht. Für den Transistor gilt, dass eine große Gatefläche das Rauschen desselben vermindert. Von der Nervenzelle unbedeckte Gateregionen tragen jedoch nicht zum Signal bei. Es wurden

Gateabmessungen von 8x2 bzw. 10x3 µm^2 gewählt, die Stimulatorflächen betragen 2500 - 3000 µm^2 (Abb. 2.2a).

Es wurden in dieser Arbeit zwei Chipdesigns entwickelt. Beim ersten Design, womit die Mehrzahl der Messungen durchgeführt wurde, waren jeweils 16 Transistor und Stimulatorelemente kreisförmig angeordnet (Abb. 2.2b). Dies liefert für alle Zellen eine möglichst kleinen Abstand zueinander. Auch bei geringem Zellwachstum von 50 - 100 µm erreicht man somit eine genügend hohe Ausbeute an synaptisch verbundenen Paaren. Im zweiten Design wurden zwei parallele Linien mit jeweils 30 Transistoren und Stimulatoren prozessiert. Diese Anordnung erlaubt nur einigen Neuronen Paare zu bilden. Hingegen eignet sich dieses Design auch für Experimente mit Soma-Soma-Synapsen. Bei beiden Anordnungen gibt es für alle Transistoren eine gemeinsame Sourcezuleitung.

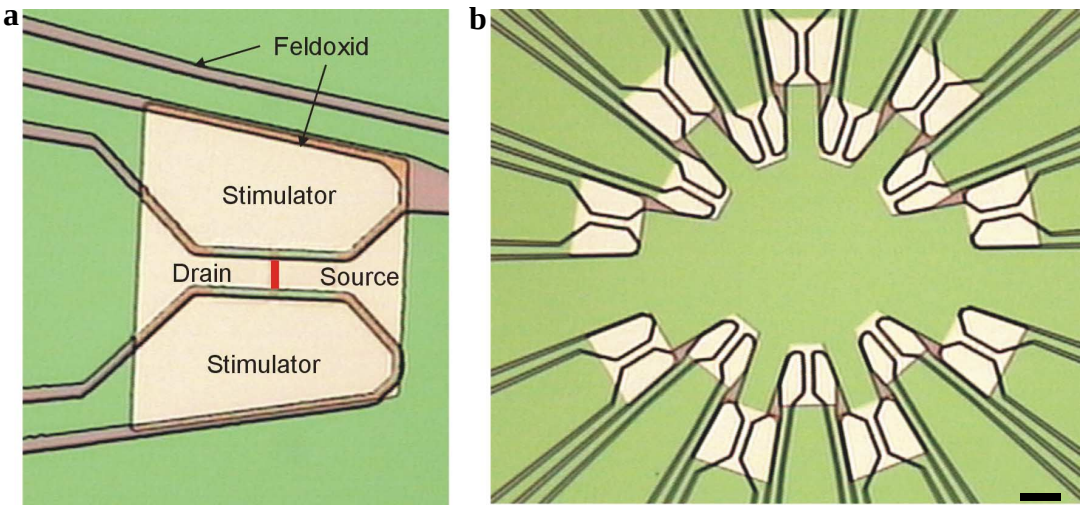


ABBILDUNG 2.2 Chipdesign. In (a) ist eine bidirektionale Struktur dargestellt, bestehend aus zwei Stimulatorflächen und einem dazwischenliegenden Transistor. Die Gateregion (8 x 3 µm^2) ist rot markiert. Stimulator und Transistor sind durch Feldoxid getrennt. In (b) ist die ringförmige Anordnung der bidirektionalen Strukturen auf einem Meßchip gezeigt. Skalenbalken 50 µm.

2.1.3 Chipprozessierung

Die Chipherstellung wurde, einem Silizum-Planar-Prozeß folgend [Kiessling 2000, Ulbrich 1999], im abteilungsinternen Reinraum durchgeführt. Ausgangsbasis sind *n*-dotierte Siliziumwafer. Für den Prozeß waren fünf Maskierungsschritte notwendig, die den Herstellungsprozeß gliedern und im Folgenden beschrieben werden. Die exakten Prozeßparameter sind im Anhang aufgeführt.

1. Maske: Isolierung der Zuleitungen

Möchte man möglichst kleine Strukturen mit unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften auf dem Chip integrieren, müssen diese voneinander isoliert sein. Bei dem hier beschriebenen Prozeß geschieht dies über lokal gewachsenes Feldoxid (LOCOS). Das

Oxid isoliert Drainzuleitungen von Stimulatoren und verhindert somit eine Ausbildung parasitärer Transistoren oder isoliert einzelne Drainzuleitungen und verhindert das Übersprechen zwischen einzelnen Transistoren.

In Abb. 2.3 sind Elektronenmikroskopiebilder des Feldoxids in zwei Stadien der Prozessierung dargestellt. Am Prozeßende erscheint das Oxid durch weitere Implantations-, Ätz- und Oxidationsschritte stark strukturiert, die Isolationseigenschaften bleiben jedoch erhalten.

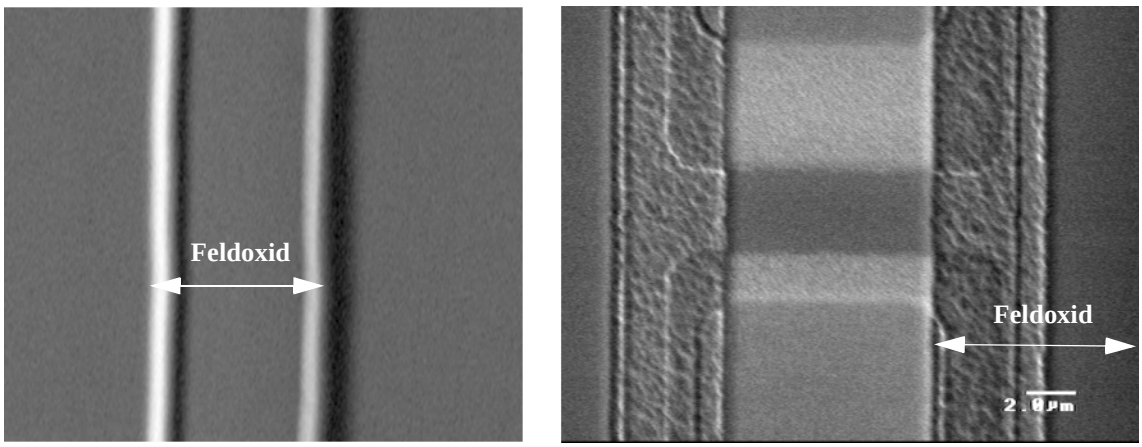


ABBILDUNG 2.3 Feldoxid zwischen den Zuleitungsbahnen. Nach dem thermischen Aufwachsen erscheint es im Elektronenmikroskop homogen (a), am Ende der Chipprozessierung ist der Randbereich durch Oxidations-, Implantations- und Ätzschritte stark strukturiert (b). Die Graustufen in (b) markieren unterschiedliche Implantationen, siehe Prozeßschritte zur Maske 2 und 4.

2. Maske: Dotierung der Zuleitungen

Die durch das LOCOS Oxid vorgegebenen Zuleitungsbahnen für die Stimulatoren, Drain- und Sourcezuleitungen werden in einem Implantationsschritt mit Bor *p*-dotiert (Maske 2, Abb. 2.4). Als Schutzmaske dient hier sowie in den folgenden Maskierungsschritten eine 2 µm dicke Photolackschicht.

3. Maske: Passivierung der Chipoberfläche

Damit Zuleitungssignale nicht kapazitiv ins Bad koppeln und eine unerwünschte Zellreizung bewirken, sowie als mechanischen Schutz wird auf der gesamten Waferoberfläche ein 600 nm dickes Schutzoxid in PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) abgeschieden. Dieses Oxid wird in einem Hochtemperaturschritt (1000 °C) nachgetempert und im Bereich der Stimulatoren und Transistoren heruntergeätzt (Maske 3, Abb. 2.4). Dabei kann durch zweimaliges Ätzen ein Oxidmuster auf den Chip prozessiert werden, womit zusätzlich zu elektrischen Messungen auch optische Messungen zur Abstandsbestimmung gemacht werden können. Die Abstandsbestimmung der Membranunterseite von der Oxidoberfläche wird in Kapitel 4 beschrieben.

4. Maske: Gatedefinition

Während der Herstellung des Passivierungoxids wird ein Hochtemperaturschritt durchlaufen, der zur Diffusion von Bor im Silizium führt. Deshalb wird bei der ersten Zuleitungsimplantation nicht bis zum gewünschten Kanalende von Drain- und Sourcezuleitung implantiert. Dies wird nun nachgeholt und bis auf eine Gatelänge von 2 µm implantiert (Maske 4, Abb. 2.4). Danach wird auf dem Wafer thermisch 10 nm Isolationsoxid aufgewachsen.

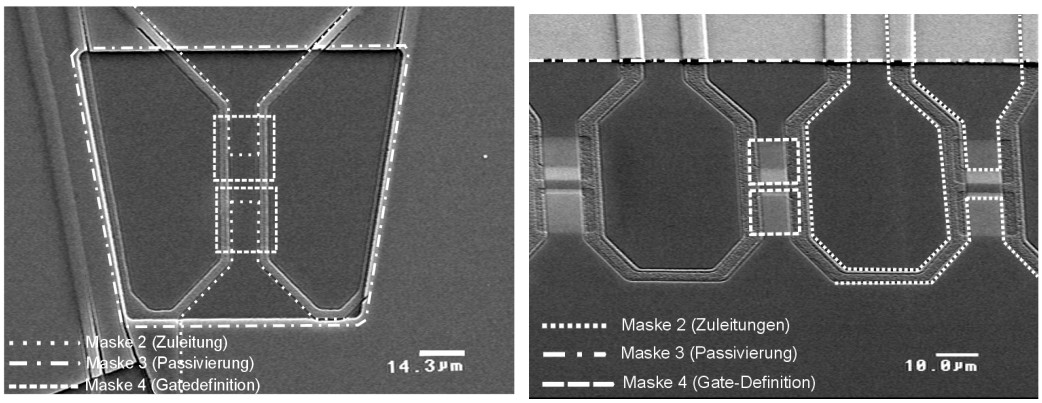


ABBILDUNG 2.4 REM-Aufnahmen von zwei verschiedenen Chipdesigns mit eingezeichneten Maskierungen. Der erste Maskierungsschritt für das Isolationsoxid ist nicht eingezeichnet. Er ist aus Abb. 2.3 ersichtlich. Im rechten Bild sind parallel angeordnete Stimulatoren und Transistoren dargestellt.

5. Maske: Metallisierung der Kontakte

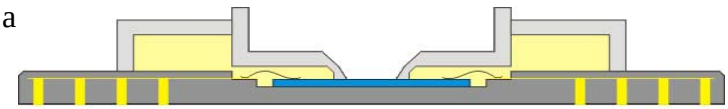
Um die Chips mit den Messverstärkern zu kontaktieren, werden die Enden der Zuleitungsbahnen mit Aluminium bedampft, welches in einem Legierungsschritt ins Silizium eindringt und einen Ohmschen Kontakt bildet (Maske 5, Abb. 2.6).

Montage und Bonden der Chips

Die aus dem Wafer ausgesägten Chips werden nach einem Reinigungsschritt im Ultraschallbad trockengeblasen und auf Keramiksockel mit einem medizinischen Silikonkleber (MK3, Sulzer Medica GmbH, Köln) befestigt. Vom Chip aus werden die metallisierten Kontakte für Source, Drain, Stimulator und Bulk mit entsprechenden Kontakten auf dem Keramiksockel über Aluminiumdrähte verbunden (Bonder KS 4523D, Kulicke, Tirol). Danach wird auf den Chip mit MK3 eine PMMA-Kammer geklebt [Jenkner 1999], die als Kulturschale dient und die elektrischen Kontakte vor Korrosion durch die Elektrolytlösung schützt (Abb. 2.5). Bei der Chipreinigung nach Zellkultur wird eine sogenannte Piranhalösung verwendet (Kapitel 3), die auch die PMMA-Kammer angreift. Um die Bonddrähte zu schützen, werden sie zusätzlich in Kunstharz (Epon) eingegossen. Dieses Harz wird frisch angesetzt und für 3 h bei 90 °C ausgehärtet. Abb. 2.5 zeigt einen schematischen Schnitt durch einen für die Zellkultur vorbereiteten Chip sowie die Foto-

grafie eines Chips. Die Stimulatoren und Transistoren befinden sich in der Mitte des 1 x 1 cm^2 großen Halbleiterchips.

a



b

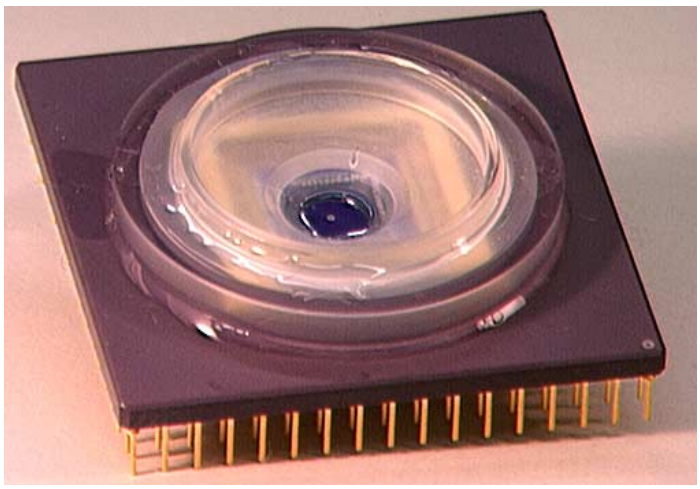


ABBILDUNG 2.5 a: Schematischer Querschnitt durch den Chip (blau), der mit den Goldkontakten des Keramiksockels (dunkelgrau) kontaktiert ist. b: Chip vor Zellkultur, mit PMMA-Wanne (Innendurchmesser 6 mm) und Goldkontakten auf dem Keramiksockel.

2.1.4 Charakterisierung der Chips

Optische Charakterisierung

Über ellipsometrische Messungen können Oxidations- und Ätzschritte kontrolliert werden. Da der Spotdurchmesser des Lasers am Ellipsometer (Plasmos, Phillips Analytical) 80 µm beträgt, kann die Oxiddicke nicht am Transistor oder Stimulator gemessen werden. Am Rand des Chips (Abb. 2.6) werden Messfenster entworfen, die eine Kontrolle der Prozeßschritte ermöglicht. Von Interesse für die Funktionsweise von Stimulator und Transistor ist die Oxiddicke über den dotierten Zuleitungen bzw. der undotierten Gateregion. Unterschiedliche Dotierung bedeutet auch unterschiedliche Aufwachsrate des Oxids. Es wurden beim neuen Chipdesign, beim alten Design wurden die Messfenster nicht entworfen, folgende Dicken gemessen: 15 nm Oxid auf dem Stimulator und 12 nm auf der Gatefläche.

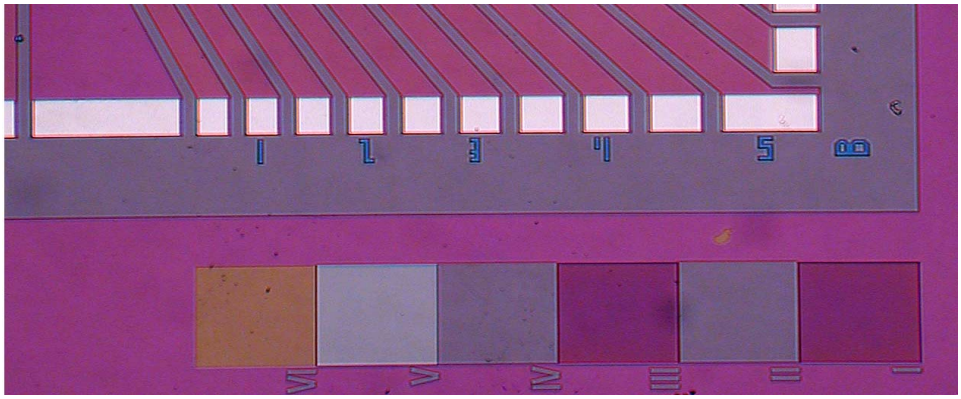


ABBILDUNG 2.6 Ellipsometrische Messfenster (I bis VI) zur Kontrolle der Oxidations- und Ätzprozesse. Die Länge eines Messfensters beträgt 500 µm. Weiß erscheinen die nummerierten, metallisierten Kontaktstellen der Stimulator- und Drainzuleitungen, an die der Keramiksockel gebondet wird.

Messung der Stimulatorkapazität

Aus den geometrischen Abmessungen der Stimulatorfläche, der über ellipsometrische Messungen bekannten Oxiddicke und der Dielektrizitätskonstanten des verwendeten Oxids (ε=3.9 für SiO_2) kann die Gesamtkapazität eines Stimulators berechnet werden. Alternativ kann die Kapazität über eine Impedanzmessung bestimmt werden. Es wird dazu Wechselspannung über den Frequenzbereich von 40 Hz - 50 MHz (Amplitude 500 mV, peak-peak) an Stimulatoren bekannter Abmessungen angelegt. Es kann an dem verwendeten Impedanzmessplatz (4294A, Agilent Technologies) die Kapazität mit Zellmedium auf den Chips gemessen werden. Es wird eine spezifische Kapazität c_{OX}=0.35 µF/cm^2 abgeschätzt. Im hochfrequenten Messbereich (f > 100 kHz) macht sich für große Stimulatorkapazitäten der Widerstand des Zellmediums bemerkbar. Da die Stimulationsmessungen im dieser Arbeit jedoch bei maximal 10 kHz durchgeführt werden, stören solche Tiefpaßeigenschaften nicht. Nachteilig bei der Messgenauigkeit wirken sich Streukapazitäten der Zuleitungen unter dem Passivierungsoxid aus.

Isolationsströme

An einem Probermessplatz (4155B, Agilent Technologies) kann vor dem Bonden der Chips der Schichtwiderstand der Zuleitungsbahnen gemessen werden, im Anhang bei der Prozeßbeschreibung eingetragen. Zudem kann der *pn*-Übergang zwischen *p*-Bahnen und *n*-Substrat gemessen werden (Abb. 2.7). Aus der Diodenkennlinie in Sperrrichtung (in Abb. 2.7 zur x-Achse gespiegelt dargestellt) folgt bei -5 V ein Widerstandwert von 65 MΩ. In Durchlaßrichtung erkennt man, dass sich schon bei geringen Spannungen Effekte von Serienwiderständen bemerkbar machen, die jedoch für die Chipfunktion keine Bedeutung haben. Als unterbrochene Linie ist die ideale *pn*-Kennlinie eingetragen.

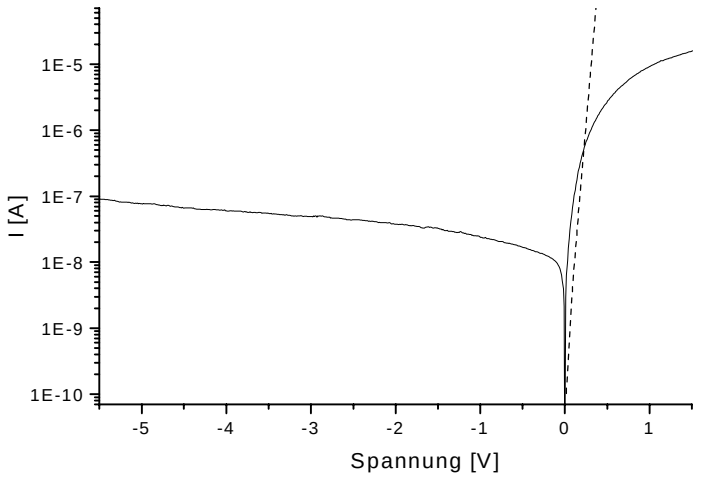


ABBILDUNG 2.7 *pn*-Diodenkennlinie. Der *pn*-Widerstand in Sperrrichtung beträgt bei -5 V 65 MΩ. In Durchlaßrichtung weicht die gemessene Kurve ab 0.5 V von der Idealkennlinie (unterbrochene Linie) ab.

Transistorkennlinien

Zur Charakterisierung der Transistoren und Messung der Steilheiten (Gleichung 2.1) wird der Strom zwischen Drain und Source I_{DS} in Abhängigkeit von V_{GS} und V_{DS} gemessen (für $V_{DS} \le V_{GS}$). Beim eingezeichneten Arbeitspunkt verhält sich die Kennlinie linear für Modulationen im 0.1 V Bereich. Die Steilheit beim gewählten Arbeitspunkt beträgt ca. 100 nA/mV.

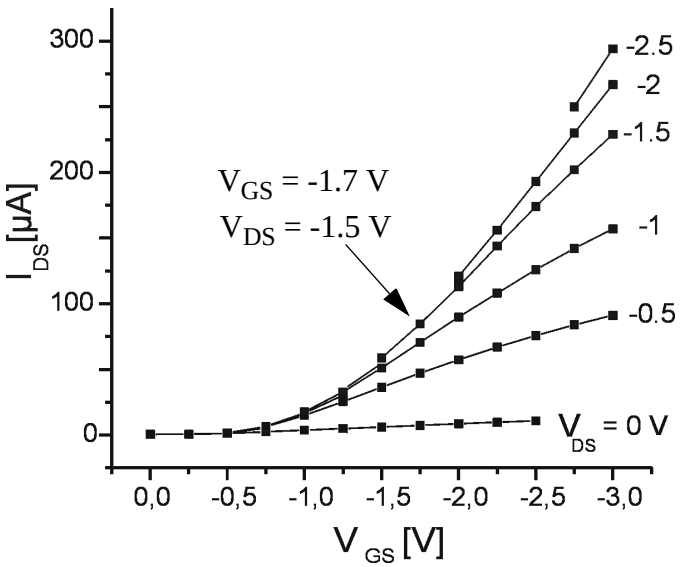


ABBILDUNG 2.8 Kennlinien eines verwendeten Transistors mit markiertem Arbeitspunkt.

2.2 Neurone der Schnecke Lymnaea stagnalis

In diesem Kapitel wird auf die Präparation und Kultur von Neuronen der Spitzhornschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* eingegangen. Es wurde einleitend begründet, dass schon kleine neuronale Netze aus Invertebratenzellen eine biologische Funktion haben und als Ausgangspunkt für ein neuroelektronisches System interessant erscheinen. Folgende Argumente fassen zusammen, weshalb in dieser Arbeit Neurone von *Lymnaea stagnalis* verwendet wurden:

- Die *in vitro* gebildeten Synapsen verhalten sich wie jene *in vivo* [Syed 1991, Magoski 1994, Spencer 1996].
- Die Zellen lassen sich einzeln präparieren.
- Die Zellen koppeln gut zum Siliziumchip, d.h. sie lassen sich reizen und ihre Aktivität ist detektierbar [Jenkner 1999].
- Die Zellen aus dem A-Cluster der Pedalganglien bilden starke elektrische Synapsen, die den Signalweg Silizium-Neuron-Neuron-Silizium mit nur zwei Neuronen möglich erscheinen lassen [Kyriakides 1989, Syed 1989, Prinz 2000b].

Die Präparationsmethode folgt der von Ridgeway und Jenkner [Ridgeway 1989, Jenkner 1999] beschriebenen. Im Folgenden wird eine Präparationsbeschreibung mit einigen Verbesserungen angegeben. Die verwendeten Lösungen und Pipetten sind im Anhang aufgeführt.

Vor der eigentlichen Präparation muß der Chip mit Proteinen oder Polyelektrolyten vorbeschichtet und das Präparationsbesteck sterilisiert werden.

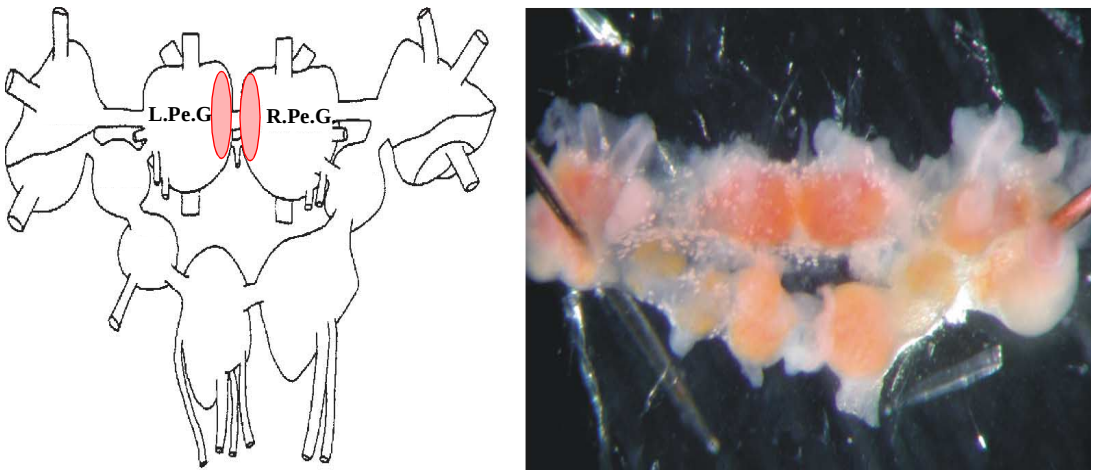


ABBILDUNG 2.9 a: Skizze des Hirns von *Lymnaea stagnalis* [Syed 1990]. Es besteht aus 11 Ganglien, 2 Ganglien sind nicht dargestellt, mit jeweils ca. 1000 Neuronen. In dieser Arbeit wurden Neurone aus dem A-Cluster (rot markiert) des linken (L.Pe.G.) und rechten Pedalganglions (R.Pe.G) präpariert. Rechts ist ein aufgespannten Hirns in der Präparationsschale gezeigt.

Es werden aus abteilungseigenen Aquarien Tiere mit einer Gehäuselänge von etwa 2 cm ausgesucht. Im ersten Schritt wird das Schneckengehäuse entfernt und die Schnecken für 10 min in 25%iger Lysterinelösung (Lysterine, Warner Lambert) anästhesiert. In einer mit Sylgard-Polymer (RTV615, Dow Corning, Midland, MI) ausgefüllten Glaspetrischale werden die Schnecken unter einer Lupe (Wild MZ5, Leica) mit Stecknadeln aufgespannt und ihre dorsale Seite mit einem Skalpell aufgetrennt. Die Schale ist mit steriler Salzlösung (Antibiotic Saline, ABS) gefüllt. Mit weiteren Nadeln wird der Körper so weit geöffnet, dass das Hirn zugänglich ist und mit einer Augenschere (FST, Heidelberg) herausgetrennt werden kann. Die Hirne, bestehend aus perlenartig aneinandergereiten Ganglien (Abb. 2.9a), werden in mit ABS gefüllten Petrischalen gesammelt. Nach dreimaligem Spülen mit ABS werden die für die weitere Neuronenentnahme vorgesehenen Hirne in einer sylgardbeschichteten und mit Zellmedium (Definiertes Medium, DM) gefüllten kleinen Glasschale gesammelt und mit Minutiennadeln aufgespannt (Abb. 2.9b). Nun wird mit einer feinen Pinzette (Dumont No.5, FST, Heidelberg) Gewebe über den Ganglien entfernt und eine Enzymbehandlung durchgeführt (Rezept im Anhang aufgeführt). Nach mehrmaligem Spülen wird hochosmolares Zellmedium (HODM) zugegeben. Die Ganglien werden nach 20 Minuten mit einer Wolframnadel aufgerissen, so dass die Neurone frei zugänglich werden. Es ist zu empfehlen, das Aufreissen gründlich vorzunehmen, so dass zur Entnahme der Neurone mit Glaspipetten wenig Saug- und Pustebewegung nötig ist. Je weniger mechanischem Streß die Zelle ausgesetzt ist, desto höher ist ihre Überlebenschance. Das Positionieren der Zellen auf die Transistoren erfolgt manuell unter einer zweiten Aufsetzlupe mit einer silanisierten Glaspipette.

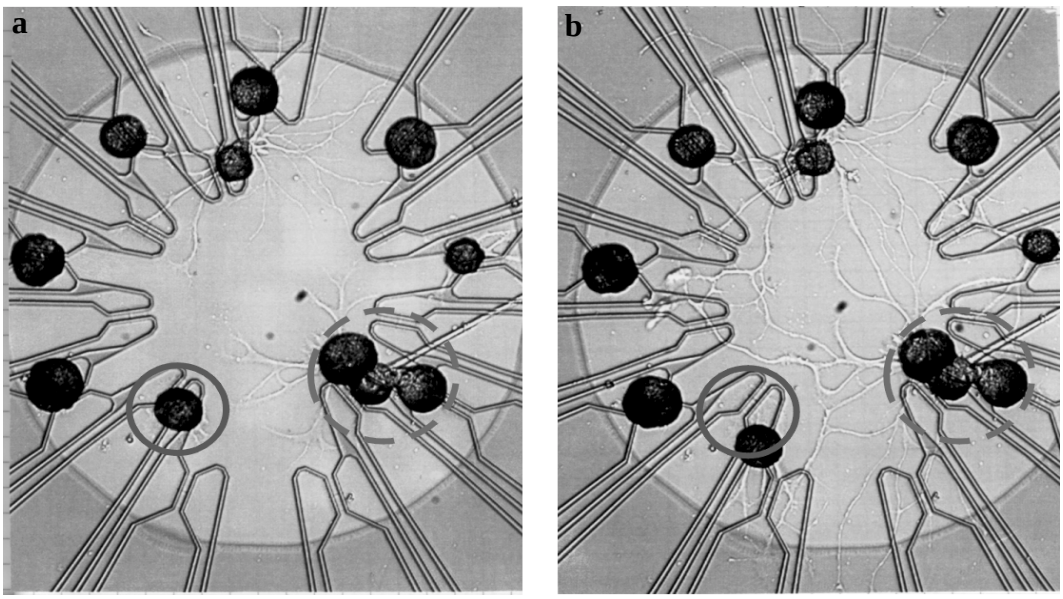


ABBILDUNG 2.10 Neuronenwachstum 24 h (a) bzw. 36 h (b) nach der Zellpräparation. Mit durchgezogener Kreislinie ist ein Neuron markiert, welches innerhalb von 12 h wächst und dabei Transistor- und Stimulatorfläche verläßt. Mit unterbrochener Kreislinie ist ein Neuroncluster markiert, der in dieser Zeit nicht wandert, dessen Neurite jedoch wachsen.

Nach dem Aufsetzen der Zellen werden die Chips möglichst wenig bewegt, deshalb für 12 h in der Präparationsbox gelassen. Danach werden sie bei 20°C inkubiert. Innerhalb

von zwei Tagen beobachtet man bei ca. 50% der Zellen Wachstum, siehe Abb. 2.10. Dabei werden die Zellsomata häufig von den auswachsenden Neuriten weg von ihrer ursprünglichen Position gezogen. Solche Neurone können vom Chip nicht mehr gemessen werden. Häufig tritt auch Aggregation von Neuronen in Kultur auf.

Um unerwünschte Wanderungs- und Clustereffekte zu beheben, müssen die Zellsomata über Transistor und Stimulator immobilisiert werden. Dies wird in Kapitel 3 ausführlich behandelt.

3 *Biologische neuronale Netze in Kultur*

Wie in Kapitel 2 ausgeführt, können Neurone durch geeignete Chipelemente, Stimulator und Transistor, angeregt bzw. ihre Aktivität detektiert werden. Möchte man Experimente an neuronalen Netzen in Zellkultur durchführen, müssen die Zellkörper, die Somata, nach einigen Tagen immer noch mit Stimulator und Transistor koppeln. Man muß dazu die den auswachsenden Neuriten folgende Bewegung der Zellen unterbinden. In einem ersten Abschnitt wird dargestellt, wie über käfigähnliche Strukturen die Zellsomata immobilisiert werden. Die Regenerierung der Chips mit dreidimensionalen Polymerstrukturen für Zellkultur erfordert eine neue Reinigungsmethode. Diese wird in Abschnitt 3.2 skizziert. Trotz der Immobilisierung bilden die Zellen in Kultur Neurite aus und verbinden sich über Synapsen zu einem neuronalen Netz (Abschnitt 3.3).

3.1 Polymerkäfige

In neuronalen Zellkulturen ziehen auswachsende Neurite die Zellkörper von ihren ursprünglichen Positionen weg. Wenn die Zellen von den aktiven Chipelementen wegwachsen, kann die Messung der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife offensichtlich nicht durchgeführt werden. In [Maher 1999] wurden Rattenzellen in sogenannten „neural wells“ fixiert. Immobilisierte man die Zellen jedoch in „neuronalen Brunnen“, so wuchsen diese an den Brunnenwänden hoch und entkoppelten von den sich am Boden befindenden Metallelektroden. Um die Somatabewegung zu unterbinden, wird in dieser Arbeit das Prinzip der Fixierung zwar beibehalten, jedoch eine andere mechanische Struktur gewählt. Um Stimulator und Transistor herum werden Säulen aus dem Polymer Polyimid (HTR3-200, Olin GmbH, München) prozessiert, wie in Abb. 3.1 skizziert. Zwischen den Säulen bleibt Freiraum, so dass die Neurite auf der Siliziumoxidoberfläche auswachsen können, ohne die Zellkörper zu bewegen.

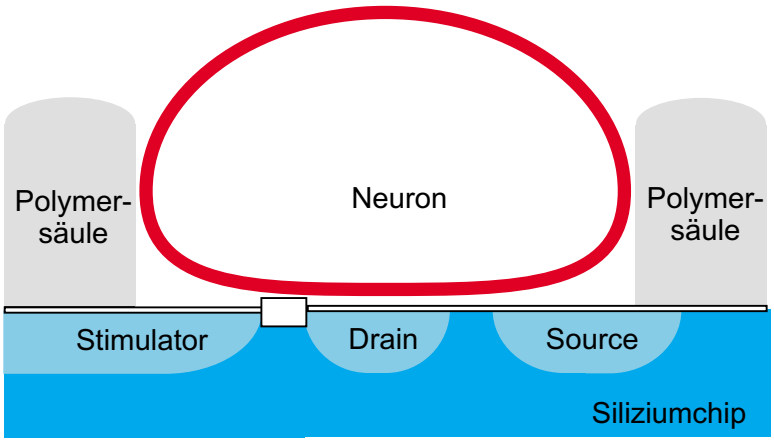


ABBILDUNG 3.1 Prinzip der mechanischen Fixierung der neuronalen Zellkörper mit Polymersäulen um die bidirektionale Struktur bestehend aus Stimulator und Transistor.

Die Prozessierung der Polymerkäfige beginnt nach dem Metallisierungsschritt (Kapitel 2), also nachdem alle Planar-Fotolithografieschritte abgeschlossen sind [Rentschler 1998]. Die dreidimensionale Käfigstruktur wird über einen Fotolithografieschritt erhalten, bei dem die belichteten Polymerbereiche vernetzen. Im Folgenden werden die einzelnen Prozessschritte detailliert beschrieben, da hier erstmals die Kombination von dreidimensionalen Polymermikrostrukturen auf einem Neurochip durchgeführt wurde.

Dehydratation: Die Chips müssen vor dem Aufschleudern der Polymerlösung dehydriert werden. Dehydratation in O_2-Plasma liefert gute Haftergebnisse, beschädigt allerdings das dünne Gate-Oxid des Transistors. Es kann alternativ im RTP (Rapid Thermal Processing) Ofen bei 400 °C (2 min) oder im Heraeus Umluftofen bei 220 °C (2 h) dehydriert werden. Beide Prozesse wurden angewendet.

Aufschleudern: Eine etwa 70 µm dicke Polymerschicht wird an einer Schleuder (Fairchild Convac, Vaihingen) aufgebracht, die das abgeschleuderte Material in einem Teflonteller auffängt. Die Schleudergeschwindigkeit bestimmt die Polymerdicke bzw. die Höhe der Polymersäulen. Die Höhe der Säulen kann nur am Prozessende gemessen werden. Bei einer Schleudergeschwindigkeit von 700 U/min waren die Säulen 40 - 50 µm hoch (siehe auch Abb. 3.3).

Prebaking: Vor der Belichtung und Vernetzung des Polymers muß Polymerlösungsmittel entweichen. Ein Volumenelement mit zu viel Polymerlösungsmittel wirkt sich negativ aus. Diese Bereiche vernetzen später unvollständig. Das Entweichen von Lösungsmittel geschieht bei Temperaturen, bei denen noch keine Polymerisierung stattfindet. Folgende Zeiten wurden verwendet: Start bei 40 °C, Anstieg bis 80 °C innerhalb von 4 h. Die Prebakingzeit kann auch verlängert werden. Bei kürzeren Prebaking-Zeiten entweicht das Lösungsmittel aus dem unteren Bereich der etwa 100 µm dicken Schicht nicht.

Belichten und Entwickeln: Der Siliziumwafer wird in UV Licht (436 nm) durch eine Chrommaske (ML&C, Erfurt) im Maskaligner (Karl Suess, Garching/München) belichtet. An der belichteten Stelle vernetzt die belichtete Schicht durch Ausbildung der Imidbindung. Die Belichtungszeit beträgt 90 Sekunden bei einer Lampenleistung von 21mW/cm^2. Die unbelichteten Bereiche werden in einem Entwicklungsschritt entfernt. Dazu

wurden zwei Verfahren getestet: Tauchentwicklung sowie Sprayentwicklung. Bei der Tauchentwicklung wird der Wafer in die Entwicklungslösung (Cyclopentan, Olin GmbH, München) eingetaucht, die die nichtpolymerisierten Bereiche löst. Bei dieser Methode kommt zu wenig frischer Entwickler zu den tieferen Strukturbereichen, während in die oberen Säulenbereiche Entwickler, welcher auch im Polymerlösungsmittel enthalten ist, eindringt. Besser geeignet ist die Sprayentwicklung. Hierzu wurde eine Sprayentwicklungsanlage gebaut, siehe Abb. 3.2. Sie besteht aus einer Schleuder und drei Sprühdüsen. Aus einer Höhe von ca. 10 cm wird auf den rotierenden Wafer Entwicklungslösung für 10-20 Sekunden gesprüht. Dabei rotiert der Wafer mit etwa 200 U/min. Im ersten Entwicklungsschritt wird Cyclopentan verwendet. Über Ventile wird im zweiten Schritt auf eine zweite Lösung (Cyclopentan/Isopropanol 1/1) umgestellt, im dritten schließlich auf wasserfreies Isopropanol.

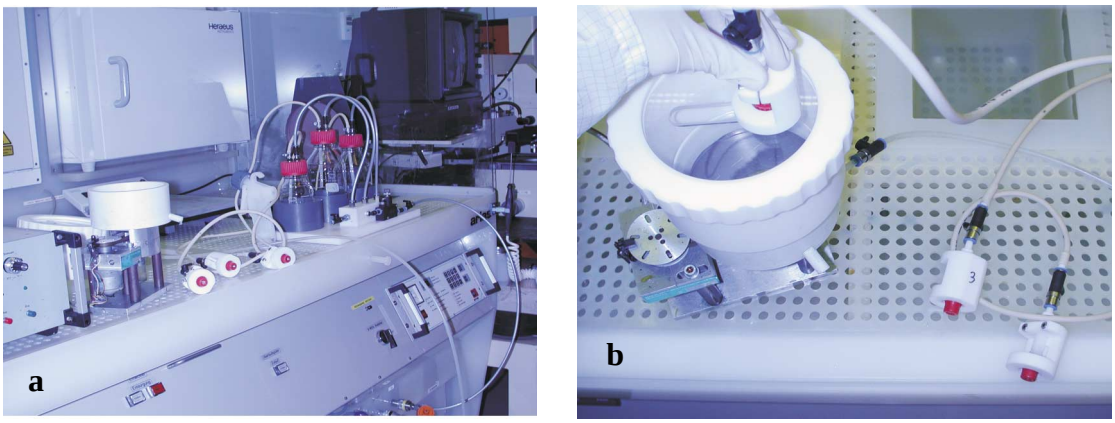


ABBILDUNG 3.2 Sprühentwicklungsanlage für die Säulenprozessierung. a: Seitenansicht mit 3 Druckflaschen mit Entwicklungslösung, daneben die Schleuder und deren Motorantrieb. b: Aufsicht der Schleuder. Über dem Wafer wird mit Sprühventilen die Entwicklungslösung aufgesprüht.

Hardbaking*:* In diesem Schritt wird die Polymerisierung beendet und das restliche Lösungsmittel verdampft. Dieser Prozeß wird in einem Quarzrohrofen (Heraeus, Hanau) bei 300°C in N_2 Atmosphäre durchgeführt. Dabei schrumpfen die Strukturen um ca. 30%. Die am Ende des Prozesses gemessenen Dicken sind in Abb. 3.3 dargestellt.

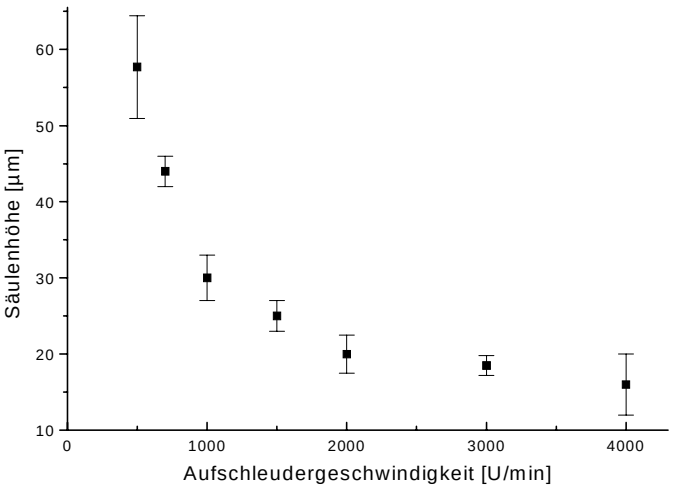


ABBILDUNG 3.3 Abhängigkeit der Polymerdicke von der Aufschleudergeschwindigeit. Die Messungen wurden nach dem Hardbakingschritt gemacht. Die Fehlerbalken folgen aus Messungen an jeweils 3 Chips.

In Abb. 3.4 ist die Elektronenmikroskopieaufnahme eines Polymerkäfigs um eine bidirektionale Chipstruktur dargestellt. Ein Käfig besteht aus 6 Säulen, die so angeordnet sind, dass sie den Zellkörper immobilisieren aber auswachsenden Neuriten genügend Freiraum bieten. Die verwendeten Säulen sind 40–50 µm hoch, ihr Durchmesser beträgt 20 - 25 µm. Die Innendurchmesser der Käfige betrugen 50 bzw. 70 µm.

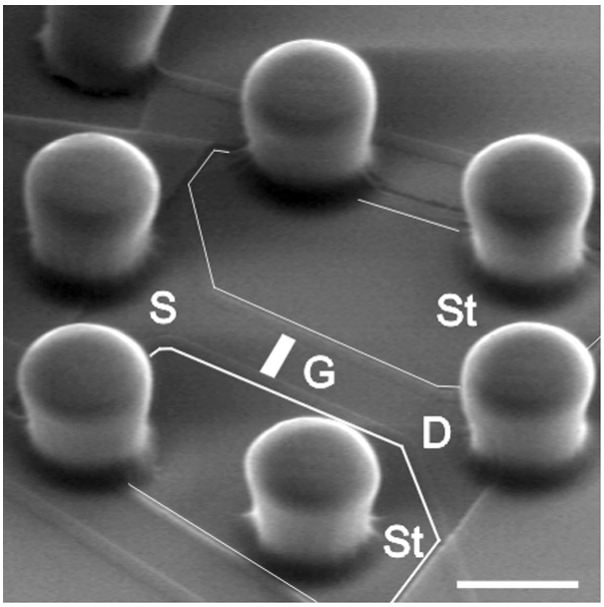


ABBILDUNG 3.4 Polymerkäfig um Struktur bestehend aus Stimulatoren (St), sowie Transistor, gebildet aus Drain- (D), Sourcezuleitung (S) sowie der markierten Gateregion (G). Elektronenmikroskopiebild. Skalenbalken 20 µm.

Fehlprozessierungen: Vor dem Hardbakingschritt lassen sich Fehlprozessierungen in 70°C heißer Pyrrolidinonlösung (Sigma, Deisenhofen) entfernen. Dieses Lösungsmittel ist auch Teil des ursprünglichen Polymerlösungsmittels.

Stabilität der Säulen: Es wird im folgenden Kapitel bei der Langzeitverwendung der Chips auf verschiedene Reinigungsmethoden eingegangen. Die Säulen sind stabil in Ultraschall sowie gegen Lösungsmittel (Methanol, Aceton, Toluol), die nicht das darunterliegende Oxid angreifen. Die mechanische Stabilität ist auch auf die spannungsfreie, runde Form zurückzuführen. Die Säulen sind stabil in Piranhalösung (H_2SO_4/H_2O_2), falls diese nicht länger als 2 min appliziert wird. Piranhalösung kann nicht zur Entfernung von Fehlprozessierungen verwendet werden, da sie die Aluminiumkontakte auf der Chipoberfläche oxidiert.

3.2 Chipbehandlung für wiederholte Zellkultur

Im Folgenden soll auf die Wiederverwendbarkeit der Siliziumchips eingegangen werden. Vor jeder Zellkultur muß die Chipoberfläche sauber und hydrophil sein. In den bisherigen Experimenten wurde Zellkultur auf planaren Oberflächen durchgeführt, die mechanisch mit basischen oder Detergenzlösungen gereinigt werden konnten [Vassanelli 1999, Prinz 2000a, Jenkner 1999].

Ultraschallreinigung mit basischen Lösungen kann in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da diese Siliziumoxid abtragen und die Säulen umfallen. Ultraschallreinigung mit Detergenzien führte nicht zu zellkulturverträglichen Chips. Weitere Lösungen (Enzymcocktail aus Chymotrypsin, Trypsin, Collagenase oder eine Ammoniak/H_2O_2-Mischung) reinigten die Chipoberfläche nach der Zellkultur ungenügend.

Als optimale Methode wurde die sogenannte Piranha-Lösung gefunden. Diese wird aus H_2SO_4 (96%) und H_2O_2 (31%) hergestellt (2/1 v/v). Mit einer Glaspipette, deren Öffnungsdurchmesser (6 mm) dem Kammerdurchmesser entspricht, wird die Lösung 1 Minute nach dem Ansetzen für 1 Minute auf die Chipoberfläche appliziert (Abb. 3.5), danach 5mal mit Millipore Wasser gespült. Die Applikation mit der Glaspipette ist notwendig, da ansonsten die Piranha-Lösung die aus PMMA bestehende Kulturkammer anlöst. Durch ihr hohes Oxidationspotenzial löst die Piranha-Lösung die organischen Verbindungen auf der Chipoberfläche. Die Polymersäulen werden durch eine so kurze Applikation wenig angegriffen, da sie ausgehärtet sind. Verzichtet man auf den Aushärtungsschritt (siehe Abschnitt. 3.1), der zur Schrumpfung der Säulen um ca. 30% führt, sind die Säulen nicht stabil und werden von der Piranha-Lösung aufgelöst.

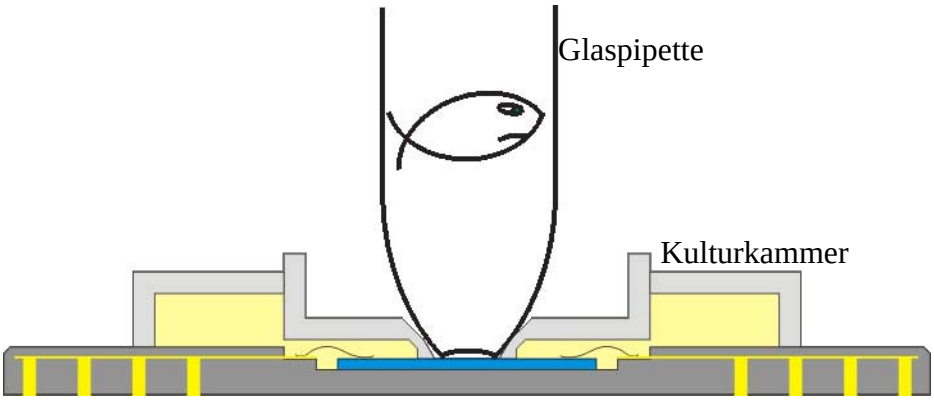


ABBILDUNG 3.5 Applikation von Piranha-Lösung zur Chipsäuberung nach Zellkultur. Der Öffnungsdurchmesser der Pipette entspricht dem Kammerdurchmesser (6 mm).

Die Piranhalösung reagiert, im Gegensatz zu basischen Lösungsmitteln, nicht mit der Siliziumoxidoberfläche. Die so gereinigten Chips können häufiger als 10 mal wiederverwendet werden.

3.3 Zellkultur auf Chips mit Polymerkäfigen

Damit Neurone auf Festkörpersubstraten wachsen, müssen diese mit Wachstumsfaktoren beschichtet sein. Für Neurone von *Lymnaea stagnalis* ist kein isoliertes Wachstumsprotein bekannt, auf dem alle Neurone wachsen [Hermann 2000]. Die Beschichtung der Siliziumoxidoberfläche mit einem solchen Protein wäre die einfachste Grundlage für Zellkultur. Im Fall der Schneckenzellen ist lediglich bekannt, dass intakte Schneckenhirne in Zellmedium Proteine absondern, die das Zellwachstum ermöglichen [Wong 1981]. Der Einfachheit und Zuverlässigkeit halber wurde in dieser Arbeit die Methode der Cokultur angewendet. Cokultur meint, dass Neurone in derselben Umgebung mit intakten, dissozierten Hirnen kultiviert werden.

Die hydrophile Chipoberfläche wird mit einer Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, das detaillierte Rezept ist im Anhang beschrieben. Vor Befüllen der Kulturkammer mit Zellmedium (Definiertes Medium DM) werden die Chips sorgfältig mit Millipore-Wasser gespült. Dies scheint sehr wichtig zu sein, andernfalls haftet die Zellmembran stark an den Säulen, siehe Abb. 3.6. Die Zellmembran ist zwischen den Polymersäulen gespannt und es wachsen keine Neurite aus.

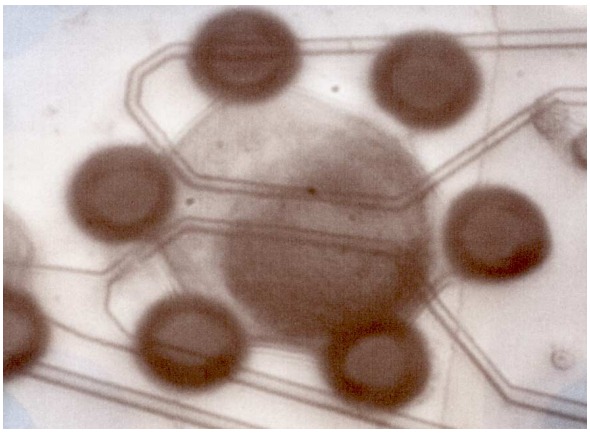


ABBILDUNG 3.6 Das Neuron adhäriert stark an Poly-L-Lysin beschichteten Polymersäulen, ohne Neurite auszubilden.

Nach Füllen der Kulturkammer mit 600 µl DM werden die Neurone auf den Chip positioniert. Anschließend werden zwei Hirne, die vorher in ABS (Antibiotic Saline) gespült wurden, zugegeben. Diese Hirne sondern neuronale Wachstumsfaktoren ab. Sie können bei der nächsten Zellkultur wiederverwendet werden, falls diese drei bis vier Tagen nach der ersten Zellkultur angesetzt wird.

Nach zwei bis drei Tagen beobachtet man neuronales Wachstum, wobei die Zellkörper durch die Polymerkäfige immobilisiert sind. Die Elektronenmikroskopieaufnahme (Präparationsrezept im Anhang) in Abb. 3.7 macht deutlich, dass die gewählte Struktur eine erfolgreiche Somataimmobilisierung ermöglicht.

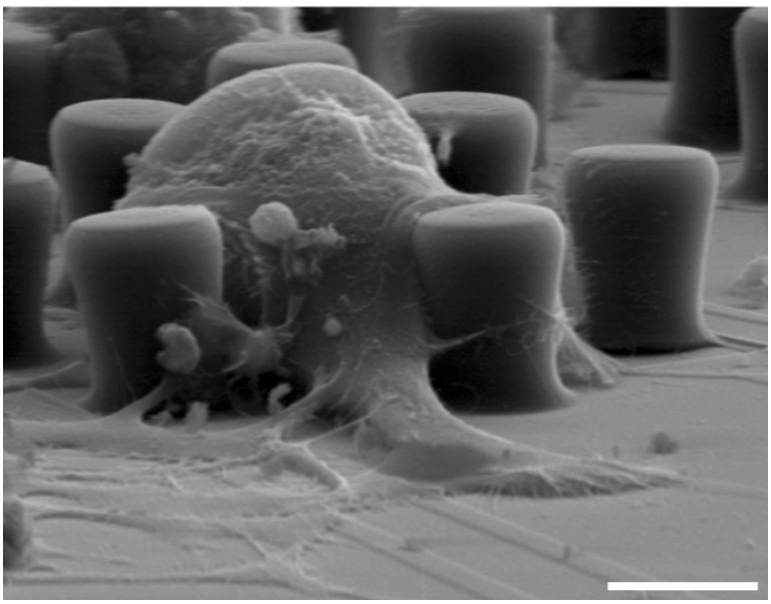


ABBILDUNG 3.7 Elektronenmikroskopieaufnahme eines Neurons, dessen Soma durch den Polyimidkäfig immobilisiert wurde, jedoch auswachsende Neurite bildete. Skalenbalken 20 µm. Die Zelle ist während der Fixierung für die Elektronenmikroskopieaufnahme geschrumpft.

Positioniert man je ein Neuron auf die bidirektionalen Chipstrukturen, so beobachtet man in Zellkultur ein dichtes neuronales Netzwerk (Abb. 3.8). Die Wachstumsausbeute ist nicht geringer als auf Chips ohne Polymerkäfige. An solchen Netzwerken in Kultur

kann die Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Signalschleife studiert werden. Um jedoch eine eindeutige Zuordnung der Signalweiterleitung zwischen den Neuronen zu gewährleisten werden in den folgenden Abschnitten jeweils nur zwei synaptisch verbundene Zellen betrachtet, das heißt weniger Zellen pro Chip aufgesetzt.

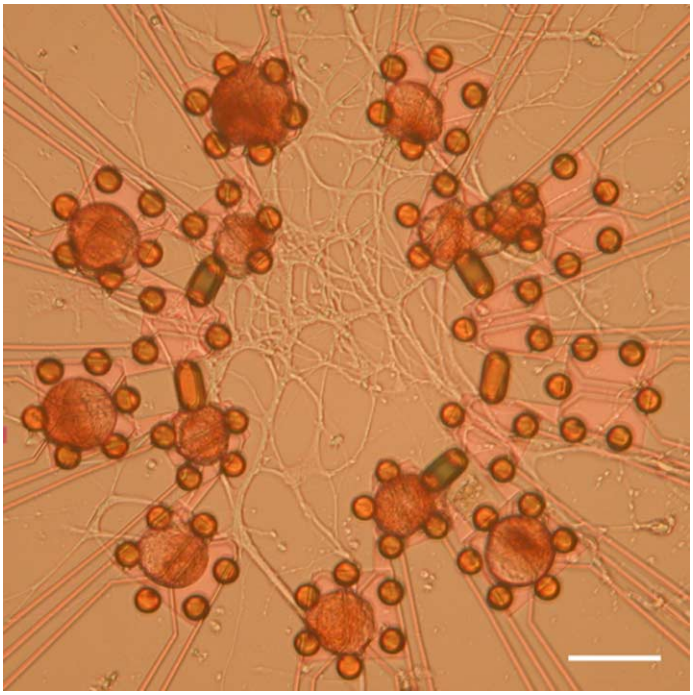


ABBILDUNG 3.8 Auf einem Chip mit Polymerkäfigen gewachsenes neuronales Netz nach 2 Tagen in Kultur. Skalenbalken 100 µm.

4 *Zur Neuron-Silizium-Schnittstelle*

Die Grundvoraussetzung zum Verständnis der Neuron-Silizium-Kopplung ist die korrekte Beschreibung im Bild eines elektrischen Ersatzschaltbildes [Fromherz 1993]. Im ersten Abschnitt wird damit die Ausbildung eines Aktionspotenzials sowie die Kopplung desselben zum Siliziumchip eingeführt. Zwischen Neuron und Silizium bleibt in Kultur ein nanoskopischer Spalt. Dessen elektrische Eigenschaften sowie dessen Abmessungen werden in den Abschnitten 4.2 und 4.3 experimentell bestimmt. Im letzten Abschnitt wird die Frage untersucht, worauf dieser Spalt zurückzuführen ist. Experimente mit Riesenlipidvesikel trennen die sterischen Beiträge der Zellglykokalix von denen der Beschichtung bzw. Extrazellulärmatrix bei der Zelladhäsion.

4.1 Modell der Neuron-Silizium-Kopplung

4.1.1 Aktionspotenzial eines Neurons von *Lymnaea stagnalis*

Die Erregung eines Neurons von *Lymnaea stagnalis*, ein Aktionspotenzial, beginnt mit dem schnellen Öffnen von Ionenkanälen, die für Natrium- und Calciumionen durchlässig sind. Das Öffnen der Kanäle wird durch die Depolarisation der Membran über einen Schwellwert hervorgerufen. Da die Natrium- und Calciumkonzentration im Äußern der Zelle größer ist als im Zellinneren, strömen Natrium- und Calciumionen in die Zelle und depolarisieren das Zellinnere. Verzögert zu den Natrium- und Calciumkanälen öffnen Ionenkanäle, die für Kaliumionen durchlässig sind. Kaliumionen, deren Konzentration im Zellinneren höher ist, strömen aus der Zelle und repolarisieren die Membran.

Eine quantitative Analyse der Ausbildung eines Aktionspotenzials wurde von A.L. Hodgkin und A.F. Huxley erstmals an Tintenfischneuronen bzw. deren Axonen durchgeführt [Hodgkin 1952]. Sie verwendeten spannungsabhängige Leitfähigkeiten g_{Na} für in die Zelle einströmende Ionen (in ihrem Modell Natrium), für auswärts strömende Ionen g_K (Kalium) sowie eine spannungsunabhängige Leckstromleitfähigkeit g_{leck}. Da die Ionenkonzentrationen von Natrium und Kalium im Innern und Äußern der Zelle unterschiedlich sind, wurde für jede Ionensorte eine unterschiedliche Batteriespannung V_0 eingeführt.

Die Gesamtstromdichte I durch die aktive Zellmembran setzt sich aus dem kapazitiven Strom sowie den Ionenströmen durch die Membran zusammen:

$$I = c_M \frac{dV_M}{dt} + g_{Na}(V - V_0^{Na}) + g_K(V - V_0^K) + g_{leck}(V - V_0^{leck}) \qquad \text{(GL 4.1)}$$

Um das Verhalten der Leitfähigkeiten g_i zu erklären, betrachtet man jeden Ionenkanal als aus unabhängigen Untereinheiten oder Teilchen bestehend. Jede Untereinheit kann im aktivierten oder inaktivierten Zustand sein. Für den Natriumstrom z.B. müssen drei gleiche Untereinheiten im aktivierten Zustand sein, damit der Kanal leitet. Die Wahrscheinlichkeit dafür wird mit m^3 angegeben. Eine weitere Untereinheit, das „h-Teilchen“ sorgt dafür, dass der Kanal zeitverzögert geschlossen wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal nicht geschlossen ist, wird durch die Wahrscheinlichkeit *h* beschrieben. Faßt man alle Natriumkanäle einer Zelle zusammen, kann man für die Natriumleitfähigkeit schreiben: $g_{Na} = g^{\infty} m^3 h$, mit g^{∞} der maximalen Natriumionenleitfähigkeit. *m* und *h* geben jetzt den Bruchteil der geöffneten bzw. geschlossenen Kanäle an. Für den Übergang des „m-Teilchens“ aus dem aktivierten in den inaktivierten Zustand bzw. die Änderung des Bruchteils m der Kanäle im offenen, leitenden Zustand kann man Ratengleichungen angeben. Aus den Ratenkonstanten α und β lassen sich der spannungsabhängige stationäre Endzustand m^{∞} und eine zugehörige spannungsabhängige Zeitkonstante τ_m bestimmen.

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1-m) - \beta_m m = \tau_m(m - m^{\infty}) \qquad \text{(GL 4.2)}$$

Analoge Gleichungen lassen sich für die h-Teilchen und alle anderen Ionenkanäle der aktiven Zellmembran schreiben. Die Gleichungen (4.1) und (4.2), bei bekannten Funktionen $g_i^{\infty}, m^{\infty}, \tau_i$, beschreiben das zeitliche Verhalten der Membranspannung V_M.

In Abb. 4.1a ist ein gemessenes Aktionspotenzial eines *Lymnaea*neurons aus dem A-Cluster der Pedalganglien dargestellt.

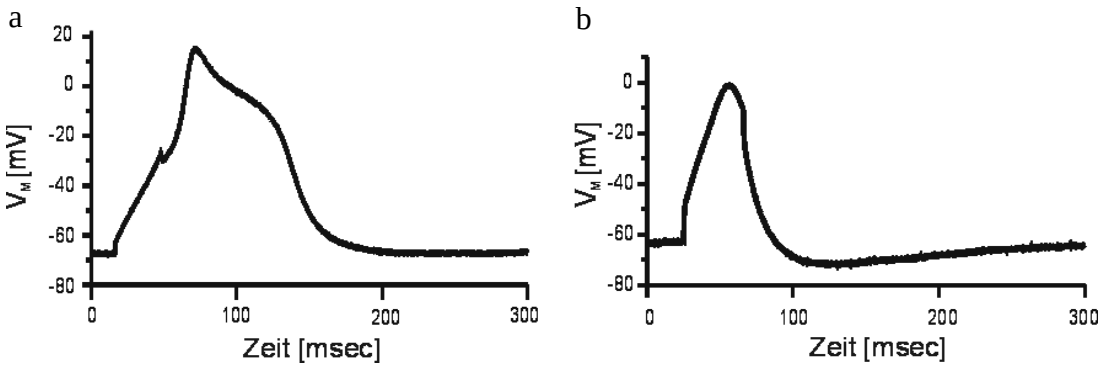


ABBILDUNG 4.1 Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotenzials (AP) eines Neurons von *Lymnaea stagnalis.* In a) ist ein AP gezeigt, welches durch Strominjektion ausgelöst wurde. Rechts ist die Membrandepolarisation desselben Neurons gezeigt, dessen Calciumionenkanäle vergiftet wurden. Man beachte in (b) das Verschwinden der „Schulter“-Form in der repolarisierenden Phase.

Die Anstiegszeit des Membranpotenzials, die Depolarisation, beträgt 10-20 msec. Die Repolarisation, bei der das Membranpotenzial einen negativeren Wert als im Ruhezustand erreicht, beträgt ca. 70 msec. Danach folgt die Refraktärphase von einigen 100 msec an deren Ende das Ruhepotenzial erreicht wird. Zum Vergleich ist in Abb. 4.1b die Membrandepolarisation am selben Neuron dargestellt, nachdem die Calciumkanäle mit Cadmiumionen (2 mM) vergiftet wurden. Die typische Schulter im AP verschwindet. Die Signalform weicht von der typischen AP-Form ab, was darauf hindeutet, dass auch Natriumionenkanäle vergiftet wurden [Kostyuk 1984].

Anders als für das Tintenfischaxon gibt es für die Ionenleitfähigkeiten g_i der Zellmembran von *Lymnaea stagnalis* keine umfassende Charakterisierung. An der Landschnecke *Helix pomatia* wurden die ersten detaillierten elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt [Connor 1971, Neher 1971, Kostyuk 1975], später folgten Messungen an *Lymnaea stagnalis* [Kostyuk 1977]. Es wurden folgende Unterschiede zum Hodgkin-Huxley-Modell gefunden, siehe Tabelle 4.1:

Der Einwärtsstrom wird von Natrium- und Calciumionen zu gleichem Anteil getragen. Die Calciumionenkanäle haben andere Zeitkonstanten als die Natriumionenkanäle. Sie inaktivieren viel langsamer und ihre Inaktivierung ist sowohl spannungs- als auch calciumabhängig [Tillotston 1979, Gera 1999]. Die langsame Inaktivierung des Calciumstroms bewirkt, ähnlich wie in Herzmuskelzellen, dass die Aktionspotenziale der A-Cluster Neurone in der abfallenden Seite eine sogenannte Schulter aufweisen (Abb. 4.1a). Diese Schulter verschwindet, wenn die Calciumionenkanäle vergiftet werden.

TABELLE 4.1 Elektrische Parameter der aktiven Zellmembran von *Lymnaea stagnalis* [Kostyuk 1977] bzw. *Helix pomatia* [Neher 1971, Kostyuk 1975]. V^0 bezeichnet das Umkehrpotenzial, g^∞ die Maximalleitfähigkeit des Ionenkanals, τ_m und τ_h die Aktivierungs- bzw. Inaktivierungszeitkonstanten des Ionenkanals bei einer Membranspannung von 0 V.

Ionenstrom	V^0 [mV]	g^∞ [mS/cm^2]	τ_m [msec]	τ_h [msec]
Na^+-Strom	58	9[a]	1	8
Ca^{2+}-Strom	130-200	15	2.4	320
schneller K^+-Strom	-65	7.6[a]	10	50
verzögerter K^+-Strom	-65		30	100 - 1000
Ca^{2+} abh. K^+-Strom	-60			

a. Werte gelten für Neurone von *Helix pomatia*

Der Auswärtsstrom wird von Kaliumionen getragen, jedoch gibt es mindestens drei elektrophysiologisch unterschiedliche Ströme: ein schnell aktivierender und wenig spannungsabhängiger Strom, ein verzögerter spannungsabhängiger Strom („delayed rectifier“) sowie ein calciumabhängiger Kaliumstrom. Für alle diese drei Kaliumkanäle gibt es unterschiedliche Parameter g_K, τ_m, τ_h. Der schnell aktivierende Kaliumausstrom läßt bei konstanter Strominjektion in die Zelle die Depolarisation linear ansteigen und be-

stimmt damit die AP Frequenz. Der verzögerte, spannungsabhängige Kaliumausstrom repolarisiert zusammen mit dem calciumabhängigen Kaliumstrom die Zellmembran.

4.1.2 Punktkontakt-Modell

Neurone der Schnecke *Lymnaea stagnalis* haben einen Durchmesser von etwa 40-120 µm, während ihre äußere Membran eine Dicke von nur 4 nm besitzt. Das leitende Zellinnere wird durch die Zellmembran von dem leitenden Zellmedium elektrisch getrennt. Die leitenden Siliziumelemente, Stimulator- und Transistorzuleitungen, werden ihrerseits durch eine dünne Oxidschicht von dem leitenden Zelläußeren isoliert (Abb. 4.2). Zwischen Zelle und Silizium bleibt in Kultur ein leitender Spalt. Der Zell-Halbleiter-Kontakt stellt einen Kern-Mantel-Leiter dar, der mit zweidimensionaler Kabeltheorie beschrieben werden kann [Weis 1997]. Für die Charakterisierung der Signalübertragung zwischen Neuron und Silizium wird folgendes elektrische Ersatzschaltbild aufgestellt (Abb. 4.2)

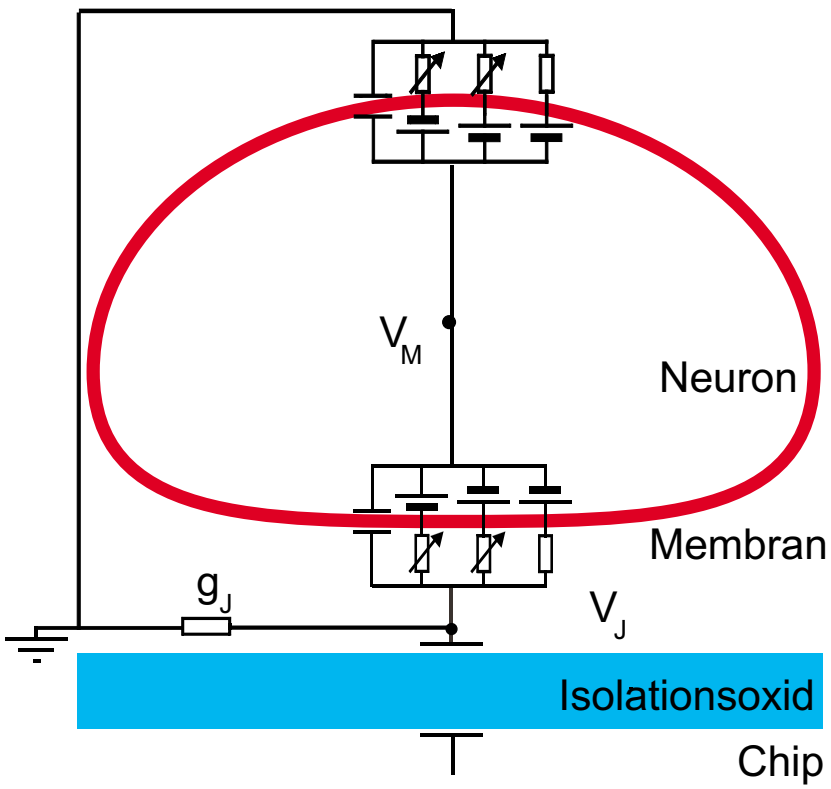


ABBILDUNG 4.2 Ersatzschaltbild der Neuron-Silizium-Schnittstelle. Das Isolationsoxid, der Adhäsionsspalt und die Zellmembran werden durch Kondensatoren und Leitfähigkeiten beschrieben. Spannungsabhängige Ionenleitfähigkeiten in der Adhäsionsmembran sowie der freien Membran werden getrennt berücksichtigt. V_M bezeichnet die Spannung zwischen Zellinnerem und geerdetem Badelektrolyt, V_J die Spannung und g_J die Leitfähigkeit im Adhäsionsspalt. Die neuronale Zellmembran ist durch eine Kapazität sowie spannungsabhängige Leitfähigkeiten charakterisiert.

Der Oxidmantel, die Isolation von Stimulator- und Transistorzuleitungen zum Bad, wird durch die spezifische Kapazität c_{ox} beschrieben. Es wird hier der Einfachheit halber für Stimulator und Transistor eine Kapazität angenommen, die nach Abschnitt 2.1 jedoch unterschiedlich sein kann.

Der Kernleiter wird durch den Flächenwiderstand r_J beschrieben, der vom spezifischen Widerstand ρ_J im Adhäsionsspalt und dem Abstand *d* zwischen Adhäsionsmembran und Siliziumoxid abhängt: $r_J = \rho_J / d$. In den Kapiteln zur Stimulation und Detektion von Aktionspotenzialen von Schneckenneuronen werden die ortsabhängigen Spalteigenschaften nicht weiter betrachtet. Über die Beziehung $G_J = 5\pi / r_J$ [Weis 1997] kann die globale Spaltleitfähigkeit G_J angegeben werden. Zusammen mit der Zelladhäsionsfläche A_{JM} läßt sich schließlich die spezifische Spaltleitfähigkeit $g_J = G_J/A_{JM}$ berechnen. Die Reduzierung der ortsabhängigen Variablen auf globale Größen stellt den Übergang vom sogenannten Flächenkontakt- zum Punktkontakt-Modell dar.

Dem Membranmantel bzw. der neuronalen Zellmembran (rot) wird die spezifische Membrankapazität c_M und Ruheleitfähigkeit g_M zugeordnet. Die spannungsabhängigen Leitfähigkeiten g_i in der Adhäsionsmembran und der freien Membran müssen a priori nicht gleich sein und werden im Folgenden getrennt betrachtet. Die exakte Definition der Adhäsionsmembran wird in Abschnitt 4.2 gegeben.

Wird an die Stimulatorleiterbahn eine Spannungsstufe angelegt, so lädt sie über den kurzgeschlossenen Adhäsionsspalt die Zellmembran auf. Je kleiner die Spaltleitfähigkeit ist, desto länger ist die Abklingzeit der Membrandepolarisation. In Kapitel 5 wird gezeigt, dass diese Spannungsänderung ausreicht, um ein Aktionspotenzial auszulösen.

Während eines Aktionspotenzials fließen Ionen durch die Adhäsionsmembran und die freie Zellmembran. Ist der Strom durch diese beiden Kompartimente verschieden, bleibt ein Nettostrom im Adhäsionsspalt übrig, siehe auch hierzu Kapitel 5. Dieser erzeugt über die Spaltleitfähigkeit des Adhäsionsspalts eine Spannungsänderung über der nichtmetallisierten Gatefläche eines Transistors. Der Transistor wird im Triodenbereich betrieben, so dass die verursachte Spannungsänderung im Spalt den Löcherstrom zwischen Source und Drain linear moduliert und genau bestimmt werden kann. Im nächsten Abschnitt wird die sowohl für die Stimulation als auch Detektion wichtige Spaltleitfähigkeit bestimmt.

4.2 Bestimmung der Spaltleitfähigkeit

Um die Leitfähigkeit im Adhäsionsspalt zu messen, wird die kürzlich entwickelte Methode des Lock-In Imaging spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoffe angewendet [Braun 2000, Braun 2001].

Messprinzip

Zwischen Stimulator und Zellmedium wird eine Wechselspannung V_S angelegt. Auf der Stimulatorfläche werden Neurone kultiviert (Abb. 4.3a). Die Wechselspannung koppelt kapazitiv über das Stimulationsoxid in den Adhäsionsspalt und verursacht eine Spannungsänderung der Zellmembran. Wird die Membran mit einem spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoff angefärbt, kann über ein konfokales Laserscan-Fluoreszenzmikroskop die relative Fluoreszenzänderung der Adhäsionsmembran gemessen werden (Abb. 4.3b). Es wird während der kapazitiven Stimulation für jedes Pixelement eine Lock-In Messung des Photomultipliersignals bzw. der Fluoreszenz durchgeführt Man erhält ein ortsaufgelöstes Amplituden- und Phasenbild der Fluoreszenzänderung.

An das Phasenbild der relativen Fluoreszenzänderung läßt sich die komplexe Übertragungsfunktion V_{JM}/V_S, als Lösung der zweidimensionalen Kabelgleichung, anpassen. V_{JM} bezeichnet die Spannung der Adhäsionsmembran. Bei Wechselspannungsmessungen erhält man im Flächenkontakt-Modell eine ortsabhängige Übertragungsfunktion im Adhäsionsspalt. Diese wird bei kleinen Stimulationsfrequenzen durch den Spannungsabfall im Spalt bestimmt, bei hohen Frequenzen durch die kapazitiven Beiträge von Zellmembran und Isolationsoxid [Fromherz 1999b, Kiessling 2000]. Durch Wahl der Stimulationsfrequenz im Übergangsbereich kann der Flächenwiderstand r_J als freier Parameter angepaßt werden.

Messung

Zur Messung des Spaltwiderstandes werden die Zellen unter ähnlichen Bedingungen kultiviert, wie in Kapitel 3 beschrieben. Es wird ein Chip mit einem großen Stimulationsspot (500 µm Durchmesser) verwendet, auf dem die Zellen nach zwei Tagen in Kultur wachsen (Abb. 4.3).

Es wird kapazitiv über ein 15 nm dickes Siliziumoxid stimuliert, wobei zur Vermeidung von Zuleitungswiderständen und Streukapazitäten hochdotiertes *n*-Silizium (10^{19}cm^3) verwendet wird und die Chipkontaktierung unmittelbar unter dem Stimulator erfolgt. Mit diesen Chips kann Wechselspannung bis zu 150 kHz angelegt werden. Schneckenneurone werden jedoch bei kleineren Frequenzen von 1-5 kHz stimuliert.

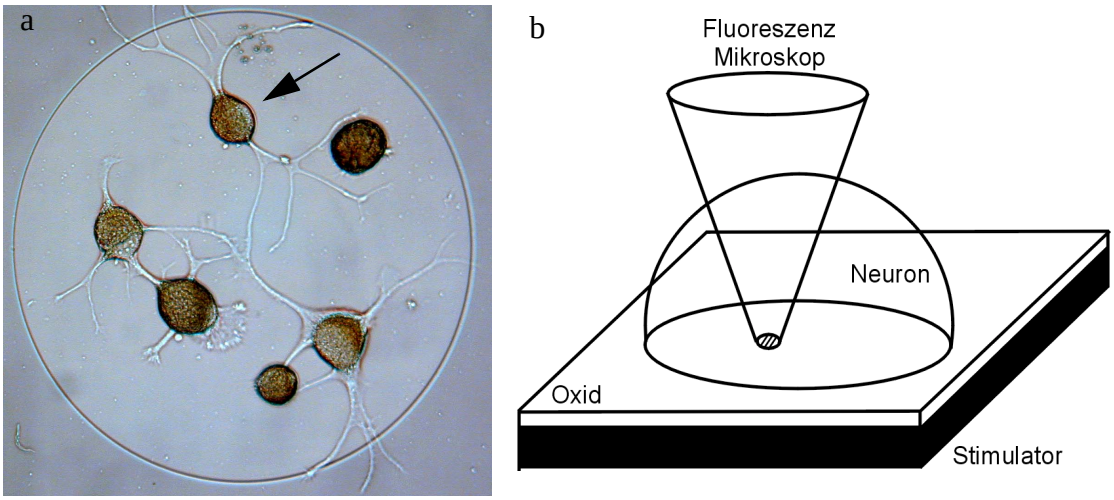


ABBILDUNG 4.3 a: Gewachsene Neurone auf einem Stimulationschip mit großem Stimulationsspot (Durchmesser 500 µm, Oxiddicke 15 nm). b: Die Fluoreszenz angefärbter Neurone wird über eine zwischen Zellmedium und Stimulator angelegte Wechselspannung V_S moduliert. Für die markierte Zelle in a wird die Spaltleitfähigkeit gemessen, siehe Abb. 4.4

Neurone werden mit dem spannungsabhängigen Hemicyaninfarbstoff ANNINE-5 angefärbt [Kuhn 2001, Hübener 2001]. Dazu werden 10 µl einer 3 mM Farbstoff/HCl Lösung zum Kulturmedium gegeben. Der Farbstoff baut sich in die Zellmembran ein. Nach 5 Minuten wird die Farbstofflösung gegen frisches Medium ausgetauscht. Fluoreszenzbilder werden an einem konfokalen Auflichtmikroskop (FluoView, Olympus, Tokio) aufgenommen. Der Farbstoff wird bei 472.7 nm mit einem Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics) angeregt und zwischen 540-680 nm detektiert. Zwischen Stimulator und Zellmedium wird eine Wechselspannung von 2 kHz (Amplitude 1 V) angelegt. Diese Wechselspannung moduliert die Fluoreszenz der adhärierten Membran, die über einen Photomultiplier (R928, Hamamatsu, Tokio) gemessen wird. Über einen Software Lock-In werden Fluoreszenz und die komplexe Fluoreszenzänderung bestimmt [Braun 2000, Gleixner 2001].

Zur Auswertung an der in Abb. 4.3 markierten Zelle werden zwei Messungen verwendet. Über ein Fluoreszenzbild wird die Ausdehnung der Adhäsionsmembran bestimmt (Abb. 4.4a). Der Adhäsionsrand wird als Ort höchster Fluoreszenzintensität des gesamten Fluoreszenzbilds definiert. Am Rand der Adhäsionsregion befinden sich mehr Farbstoffe im Mikroskopfokus und führen zu erhöhter Fluoreszenzintensität. Die zweite Messung (Abb. 4.4b) zeigt das Phasenbild der relativen Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$. Entlang der eingezeichneten Linie werden die Phasenwerte in Abb. 4.4c ortsabhängig aufgetragen und daran die theoretische Übertragungsfunktion (rot) angepaßt. Die Messpunkte in Abb. 4.4c zwischen 0 und 15 bzw. ab 65 µm gehen nicht in den Theoriefit ein, da sie nicht von der Zellmembran herrühren. Die Anfärbung der Membran von Schneckenneuronen mit ANNINE-5 erscheint inhomogen, was die Auswertung erschwert.

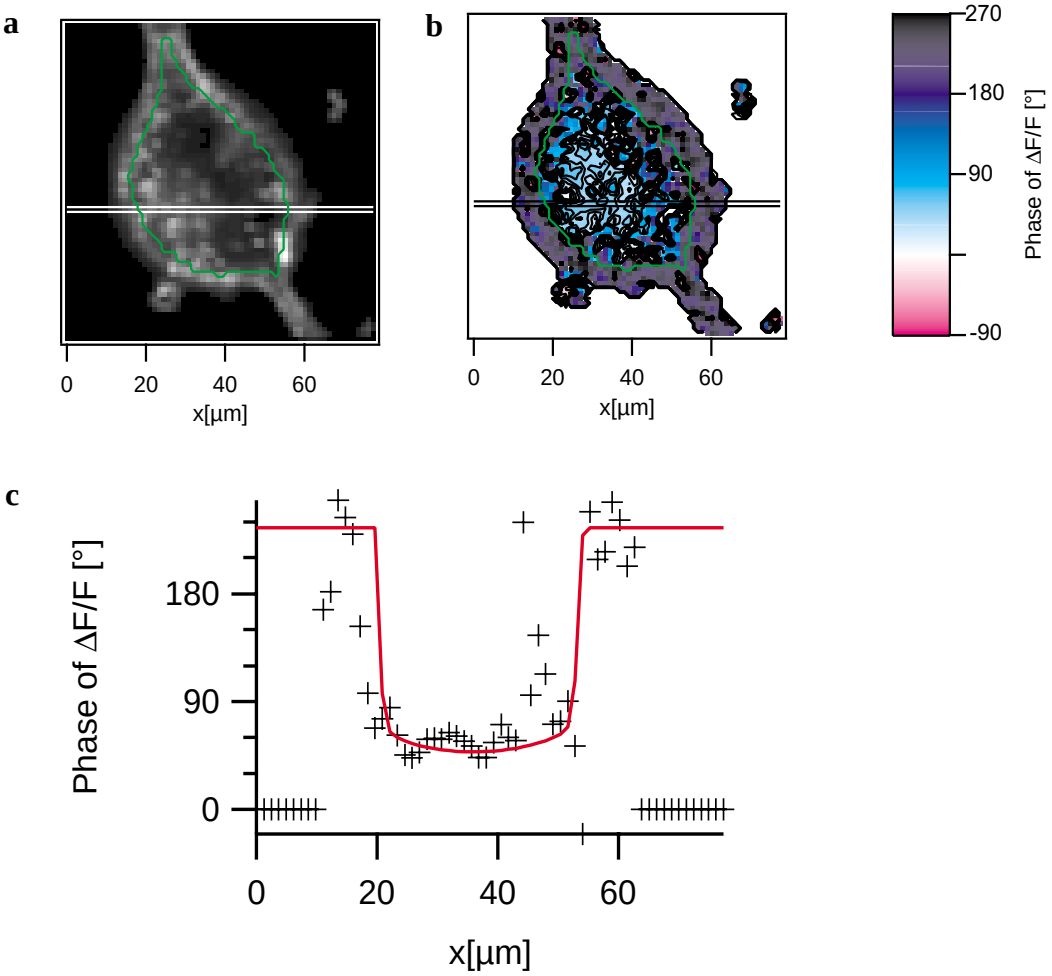


ABBILDUNG 4.4 Eine mit dem Farbstoff ANNINE-5 angefärbte Zelle (a) wird über eine Wechselspannung, die zwischen Stimulationschip und Zellmedium angelegt wird, in ihrer Fluoreszenz moduliert. In (b) ist die Phasenänderung der Fluoreszenz dargestellt, mit zugehöriger Legende. Die Auswertung (c) erfolgt entlang der eingezeichneten Linie. An die experimentellen Daten wird das Flächenkontakt-Modell angepaßt.

Ergebnis

An das Phasenbild der Fluoreszenzänderung (Abb. 4.4c) läßt sich der spezifische Flächenwiderstand r_J = 27 MΩ anpassen. Der Mittelwert von Messungen an 5 Zellen beträgt 25 MΩ. Über die Beziehung $G_J = 5\pi / r_J$ kann die globale Spaltleitfähigkeit G_J = 0.63 µS angegeben werden. Zusammen mit der mittleren Zelladhäsionsfläche A_{JM} von 2000 µm^2 läßt sich die spezifische Spaltleitfähigkeit $\mathbf{g_J} = G_J/A_{JM} =$ **30 mS/cm^2** berechnen. Dieser Wert stimmt mit dem für ähnlich große Retziuszellen des Blutegels *Hirudo medicinalis* überein [Weis 1997].

4.3 Bestimmung des Adhäsionsabstands

Der Adhäsionsabstand zwischen adhärierter Zellmembran und Oxidoberfläche kann mit Hilfe der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast Mikroskopie (FLIC) bestimmt werden [Lambacher 1996, Braun 1997]. Aus dem Adhäsionsabstand d und dem bestimmten Spaltwiderstand r_J kann eine Aussage über den spezifischen Spaltwiderstand $\rho_J = r_J \cdot d$ gemacht werden.

Messprinzip FLIC

Silizium wirkt für Licht als Spiegel. Einfallendes Licht bildet mit dem reflektierten Anteil über der Spiegeloberfläche eine stehende Welle. Befindet sich ein Farbstoff vor der Siliziumoberfläche, so wird die Absorption und Fluoreszenzemission je nach Position von der Oberfläche moduliert. Durch Einbau des Farbstoffs in eine Zellmembran kann der Abstand derselben zur Siliziumoberfläche bestimmt werden. Für die Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenz wird das optische Schichtsystem in Abb. 4.5a charakterisiert. Der optische Weg setzt sich zusammen aus jenem durch das auf dem Silizium aufgewachsene Siliziumoxid, durch den Adhäsionsspalt zwischen Zellmembran und Oxid, durch die Zellmembran selbst, in der der Farbstoff eingelagert ist, sowie durch das Zellinnere.

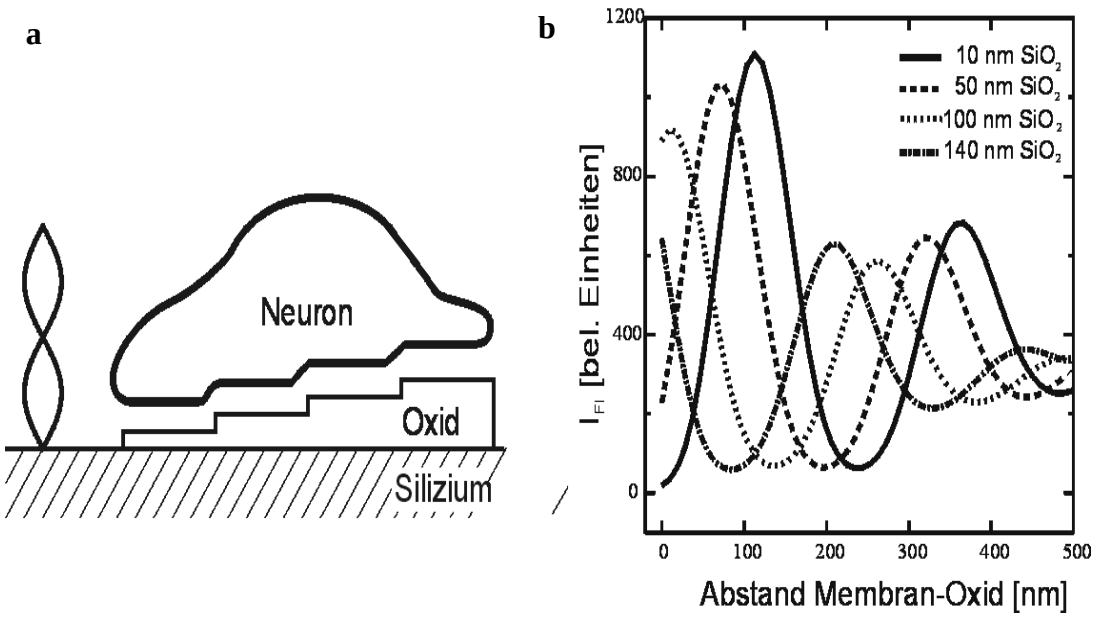


ABBILDUNG 4.5 Prinzip der FLIC Mikroskopie. (a): Ein Neuron wird auf einem Chip mit vier unterschiedlichen Oxiddicken kultiviert. Die Fluoreszenz der Adhäsionsmembran in der stehenden Welle hängt von der Oxiddicke und dem Abstand Adhäsionsmembran - Oxidoberfläche ab. In (b) ist der Adhäsionsabstand für vier Oxiddicken variiert [Zeck 1997].

Für eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität müssen die Richtung, Polarisation und Wellenlänge des einfallenden Lichts sowie der Fluoreszenz berücksichtigt werden, die Orientierung des Chromophors zur Membrannormalen, die Fluoreszenzlebensdauer, das Anregungs- und Emissionsspektrum. Da die Fluoreszenz an einem Mikroskop gemessen wird, muß die Objektivapertur berücksichtigt werden [Lambacher 2001]. Eine Lösung für das optische Schichtsystems gibt die in Abb. 4.5b dargestellte theoretische Funktion. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Chromophorabstand von der Siliziumoxidoberfläche für verschieden große Oxidhöhen.

Zur Übereinstimmung der theoretischen Fluoreszenzintensität mit der experimentellen müssen drei Parameter, Chromophorabstand *d*, Fluoreszenzhintergrund *a* sowie Proportionalitätsfaktor *b* angepaßt werden ($I_{FL}(d, experimentell)=a*I_{FL}(d,theoretisch) + b$). Für die Fehlerabschätzung des Adhäsionsabstands werden mindestens vier Intensitätswerte benötigt. Diese erhält man, wenn man den Farbstoff in vier unterschiedliche Höhen über das Silizium einbaut, und zwar indem man die Membran über vier unterschiedlich hohe Siliziumoxidstufen in verschiedene Orte der stehenden Welle positioniert. Unter der Annahme, dass die Membran auf diesen Oxidstufen homogen adhäriert, kann man an die vier Fluoreszenzintensitäten die gewünschten Parameter anpassen. Aus Abb. 4.5b ist ersichtlich, dass bei verschwindendem Membran-Oxid Abstand die Fluoreszenz auf der 10 nm Oxidstufe klein ist, mittel auf Oxid 2 und 4 und maximal auf Oxid 3.

Messung

Zur Messung des Adhäsionsabstands werden die Zellen unter denselben Bedingungen wie bei den elektrischen Messungen kultiviert (Kapitel 3). Es wird ein Siliziumchip mit Terassen unterschiedlicher Oxiddicke verwendet (Größe 5 µm x 5 µm, Höhe 10, 50, 100, 140 nm), wie in Abb. 4.5 dargestellt. Dieser Chip wird mit Poly-L-Lysin beschichtet und darauf Zellen zwei Tage unter Cokulturbedingungen wachsen gelassen. Danach werden die Zellen mit dem Cyaninfarbstoff $DiIC_{18}$ (Molecular Probes, Eugene) angefärbt. $DiIC_{18}$ ist 2mM in Ethanol gelöst. Es werden 30 µl davon direkt zum Kulturmedium zugegeben. Nach 15 min wird die Farbstofflösung gegen frisches Medium gewechselt und unter einem Auflichtmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) die Fluoreszenz gemessen. Der Farbstoff $DiIC_{18}$ wird monochromatisch mit der 546 nm Linie einer Quecksilberdampflampe durch ein 63x Objektiv angeregt (n.A. 0.9) und die Fluoreszenz zwischen 570 - 650 nm gemessen (Filtersatz AHF, Tübingen). Die Intensität wird mit einer 8-bit CCD-Kamera (Sony ICX039 AL,Theta Systems, München) mit einer Auflösung von 744 x 288 Pixel detektiert.

Über jeder der vier Oxidstufen wird die Intensitätsverteilung gemessen und Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Die Zuordnung der Intensitäten zu den Oxidstufen geschieht über ein Referenzbild, wobei der Stufenchip in Auflicht betrachtet wird. Mit Hilfe der Intensitätsmaxima wird in der FLIC-Theorie der Adhäsionsabstand angepaßt, die Standardabweichungen der Intensität zusammen mit den Oxiddickenschwankungen liefern den Fehler des Adhäsionsabstands [Braun 1997].

In einem zweiten Experiment wurde der Abstand von kultivierten Neuronen auf Laminin bestimmt [Zeck 2001b]. Laminin wird dabei in einer Konzentration von 10 µg/ml auf silanisierten Stufenchips bei 4 °C adsorbiert. Es wurden außer dem adsorbierten Laminin keine weiteren Wachstumsfaktoren zugegeben. Nach 4 h wird der Chip mit Zellkulturmedium DM gespült und die Neurone in frisches DM aufgesetzt. Nach zwei Tagen konnte schwaches Neuritenwachstum beobachtet werden. Die Fluoreszenzmessungen an den Neuronen geschieht wie oben beschrieben. Auf Laminin ist das Zellwachstum schlechter als auf Poly-L-Lysin unter Cokulturbedingungen [Wildering 1998] und deshalb für Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleifen ungeeignet. Es ist aber trotzdem als Vergleichsbeschichtung interessant. Es können kapazitive Stimulation und Signaldetektion mit Transistoren auf die Sustratabhängigkeit hin untersucht werden, siehe Abschnitt 5.5.

Ergebnisse

In Abb. 4.6 ist die Einzelmessung einer auf Poly-L-Lysin in Cokultur gewachsenen Zelle gezeigt. Man erkennt die vier unterschiedlichen Intensitäten über den Oxidstufen. In Abb. 4.6b sind diese Intensitäten gegen die Oxiddicke aufgetragen und die Theoriekurve angepaßt. Man erhält als Adhäsionsabstand d = 47 nm. Da sich das Fluoreszenzmuster über die gesamte Adhäsionsmembran wiederholt, folgt, dass die Zelle homogen im Abstand von 47 nm adhäriert. Der Mittelwert von 7 Neuronen beträgt $d = 50 \pm 5$ nm.

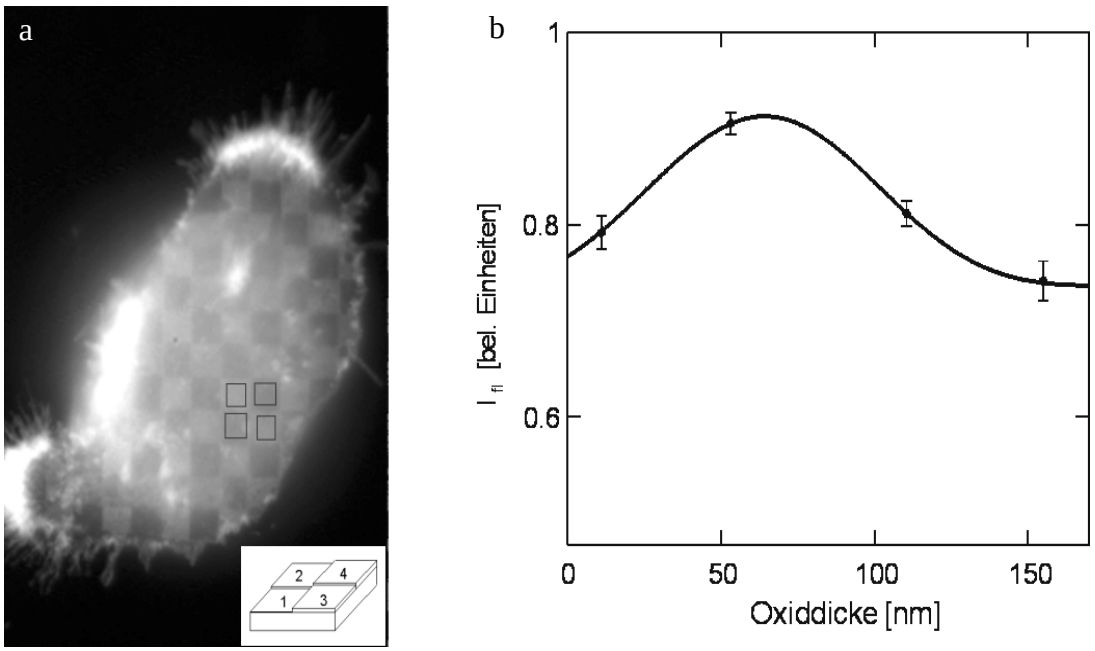


ABBILDUNG 4.6 a: Fluoreszenzbild eines adhärierten Neurons auf Poly-L-Lysin. Als Insert sind die vier Oxidterassen eingezeichnet, die den im Fluoreszenzbild markierten entsprechen. In (b) ist die an die vier markierten Fluoreszenzintensitäten angepaßte Theoriekurve dargestellt. Man erhält aus der Anpassung als Adhäsionsabstand 47 nm.

In Abb. 4.7 ist eine Messung auf Laminin dargestellt. Man erkennt, dass sich das Fluoreszenzmuster von dem in Abb. 4.6 unterscheidet. Durch Anpassung der FLIC Kurve erhält man einen Adhäsionsabstand von 87 nm. Der mittlere Adhäsionsabstand auf Laminin von 8 Messungen beträgt 88 nm, was nahezu doppelt so groß ist, als auf Poly-L-Lysin. Auf die Interpretation dieses Wertes wird in Abschnitt 4.4 eingegangen.

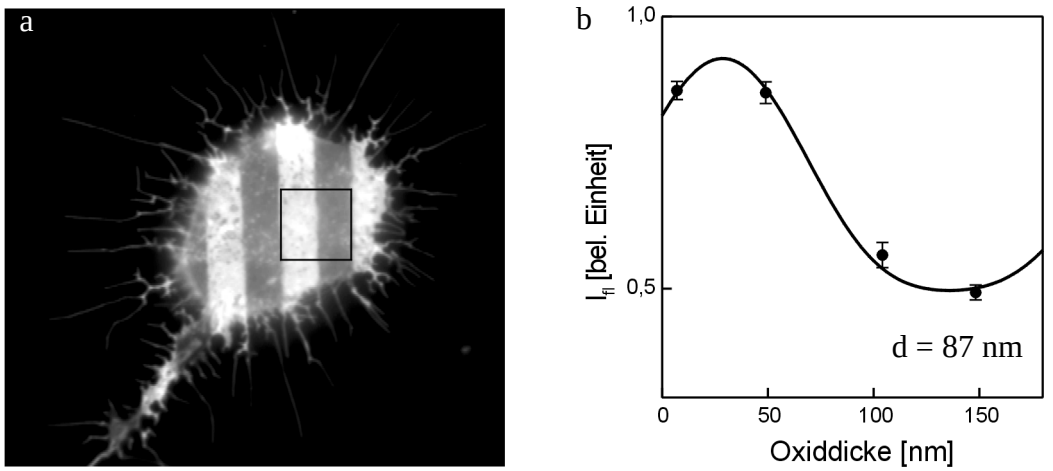


ABBILDUNG 4.7 a: Fluoreszenzbild eines adhärierten Neurons auf Laminin. In (b) ist die an die vier markierten Fluoreszenzintensitäten angepaßte Theoriekurve dargestellt, aus der sich ein Adhäsionsabstand von 87 nm anpassen läßt.

Mit dem in Kapitel 4.2 bestimmten Spaltwiderstand für mit Poly-L-Lysin beschichtete Chips und dem Adhäsionsabstand *d* läßt sich der spezifische Spaltwiderstand der Adhäsionsregion bestimmen: $\rho_J = r_J d = 125 \Omega cm$. Der spezifische Widerstand des Zellkulturmediums DM kann gesondert zu 150 Ωcm gemessen werden. Der Adhäsionsspalt unterscheidet sich in den elektrischen Eigenschaften, im Rahmen der Messgenauigeit, nicht von der freien Lösung.

TABELLE 4.2 Parameter des Adhäsionsspalts zwischen Schneckenneuron und Siliziumchip (1. und 2. Spalte) sowie zwischen Riesenlipidvesikel und Siliziumchip (3. Spalte). Die elektrischen Werte für Laminin sind aus dem spezifischen Badwiderstand berechnet und nicht gemessen.

	Neuron auf PLL	Neuron auf Laminin	Vesikel auf PLL
r_J [MOhm]	25	12	100000
A_{JM}[µm²]	2000	2000	2000
g_J [mS/cm²]	30	60	0,005
d [nm]	50	88	1
ρ_J[Ωcm]	125	-	11000
ρ_J/ρ_{bulk}	0.9	-	44

In Tabelle 4.2 sind die charakteristischen Parameter des Adhäsionsspalts zusammengefaßt. Die elektrischen Werte für Laminin sind aus dem spezifischen Badwiderstand und dem Adhäsionsabstand berechnet. Zum Vergleich sind Parameter aus einem Adhäsionsexperiment mit Riesenvesikeln angegeben [Fromherz 1999b].

Riesenvesikel haben dieselbe Größe wie Schneckenneurone und adhärieren auf Poly-L-Lysin beschichteten Chips. Der hohe Spaltwiderstand r_J = 100 GΩ und der kleine Adhäsionsabstand d = 1 nm bewirken eine 44fache Erhöhung des spezifischen Spaltwiderstands. In Wasser beträgt die Bjerrumlänge, innerhalb derer die Anziehung zwischen zwei einfach geladenen Ionen gleich der thermischen Energie k_BT ist, 0.7 nm. Innerhalb eines Spalts von 1 nm können dielektrische Wechselwirkungen die Ionendichte verringern, damit den Spaltwiderstand erhöhen.

4.4 Charakterisierung der Adhäsionsregion mit Riesenlipidvesikeln

Zellen besitzen an der Außenseite der Zellmembran Proteine und Polysaccharide, die in dem Außenraum ein 5-50 nm dickes Polymerkissen bilden, die sogenannte Glykokalix. Im Gewebe befindet sich zwischen den Zellen die Extrazellulärmatrix, gebildet aus Proteinen wie Kollagen, Fibronectin und dem oben erwähnten Laminin. Sowohl Glykokalix als auch Extrazellulärmatrix verhindern, dass die Zellen untereinander über unspezifische van der Waals-Wechselwirkungen koagulieren.

Bei der Charakterisierung des Zell-Substrat-Kontaktes stellt sich die Frage, welchen Beitrag Zellglykokalix und welchen Beitrag die Substratbeschichtung zur Adhäsion liefern. Eine Antwort kann mit Hilfe von Adhäsionsexperimenten mit Riesenlipidvesikeln gegeben werden.

Riesenvesikel können als Modellsysteme für Zellmembranen betrachtet werden. Sie sind aus künstlichen Lipiden hergestellt [Dimitrov 1988, Fromherz 1999b] und haben die Größe von Neuronen von *Lymnaea stagnalis*. Bei der Herstellung, die im Anhang beschrieben ist, wird zum Lipid POPC, Cholesterin sowie der Cyaninfarbstoff $DiIC_{18}$ zugegeben. Die Vesikel enthalten jedoch weder Membranproteine noch besitzen sie eine Glykokalix.

Um den Beitrag der Zellglykokalix und der Substratbeschichtung zu unterscheiden, werden ähnliche Adhäsionsexperimente und Abstandsmessungen, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, durchgeführt. Die Substratbeschichtung wird nach demselben Protokoll wie bei den Zellexperimenten vorgenommen. Durch Vergleich der Adhäsionsabstände von Neuronen und Vesikeln können die Beiträge von Glykokalix und Laminin separiert werden.

Adhäsionsabstände von Lipidvesikeln

Beschichtet man Siliziumchips (Abb. 4.5) mit PLL und läßt Lipidvesikel darauf adhärieren, so mißt man einen Adhäsionsabstand von 1 nm [Fromherz 1999b]. Läßt man jedoch auf den Stufenchips Schneckenhirne das Medium konditionieren, so bildet sich nach zwei bis drei Tagen ein Proteinteppich, der eingetrocknet eine ellipsometrische Dicke von 5-7 nm besitzt (verwendeter Brechungsindex: 1.46). Auf diesem Proteinteppich adhärieren Lipidvesikel in einem mittleren Abstand von 8.7 nm (Mittelwert von 9 Vesikeln) (Abb. 4.8a). Ein Vergleich mit dem Adhäsionsabstand von 50 nm von Neuronen läßt auf eine Glykokalixdicke von 40-50 nm schließen (Abb. 4.10).

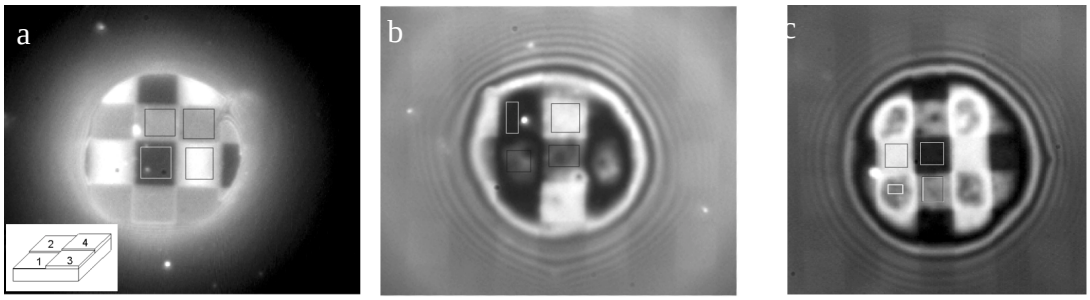


ABBILDUNG 4.8 Fluoreszenzbild adhärierter Vesikel auf PLL + neuronale Wachstumsfaktoren (a), Laminin (b) und auf BSA (c). Die eingezeichneten Quadrate markieren die vier ausgewerteten Oxiddicken. In (a) ist die Anordnung der vier unterschiedlichen Oxidstufen skizziert.

Auf mit Laminin beschichteten Stufenchips adhärieren die Lipidvesikel schwach und fluktuieren über dem Substrat im mittleren Abstand von 160 nm (Mittelwert von n = 14 Vesikeln)(Abb. 4.8b). Um diesen großen Abstand sowie den Effekt der Fluktuationen zu untersuchen, wird eine weitere Beschichtung zum Vergleich herangezogen. Ähnlich wie bei Laminin wird ein Chip mit dem Protein Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet. Laminin ist ein kreuzförmiges Protein, die Länge der „Arme“ beträgt 77, 48, 34 und 34 nm [Beck 1990], während BSA ein ellipsenförmiges Protein ist (2 x 7 nm) [Matsumoto 1993]. Für BSA-beschichtete Glassubstrate ist bekannt, dass Vesikel im Abstand von 40-50 nm fluktuieren und dass diese Fluktuationen durch unspezifische Wechselwirkungen, also ohne Einfluß von BSA, zustande kommen [Rädler 1995]. Auf BSA beschichteten Siliziumchips fluktuieren die Vesikel im mittleren Abstand von 51 nm (Mittelwert von 9 Vesikeln)[1](Abb. 4.8c). Der Adhäsionsabstand auf BSA liegt im Energieminimum gebildet von Gravitation und sterischer Fluktuationskraft[2].

Adhäsionsprofil

Um zu prüfen, ob die Vergrößerung des Adhäsionsabstands auf Laminin durch die Proteinbeschichtung oder durch veränderte Membraneigenschaften zustande kommt, wird das Adhäsionsprofil genauer untersucht. Wertet man die Interferenzringe am Rand der Adhäsionsregion für Laminin und BSA aus, so kann man Rückschlüsse auf die elasti-

1. Auf BSA haften Neurone nicht, ihr Adhäsionsabstand kann nicht bestimmt werden.
2. Eine gute Übersicht zu Membranfluktuationen findet man in [Seifert 1997]

schen Membranparameter, Membranspannung Σ und Biegesteifigkeit κ, ziehen [Bruinsma 1996, Albersdörfer 1997].

In Abb. 4.9a ist an einem Ausschnitt eines fluktuierenden Vesikels die Auswertung des Adhäsionsprofils gezeigt. Die Fluoreszenz entlang des Pfeiles ist als durchgezogene Linie in Abb. 4.9b dargestellt. In Abb. 4.9b ist als unterbrochene Linie die theoretische FLIC-Kurve eingetragen, berechnet aus dem bekannten Adhäsionsabstand *d*, dem Fluoreszenzhintergrund *b* und dem Skalierungsfaktor *a*.

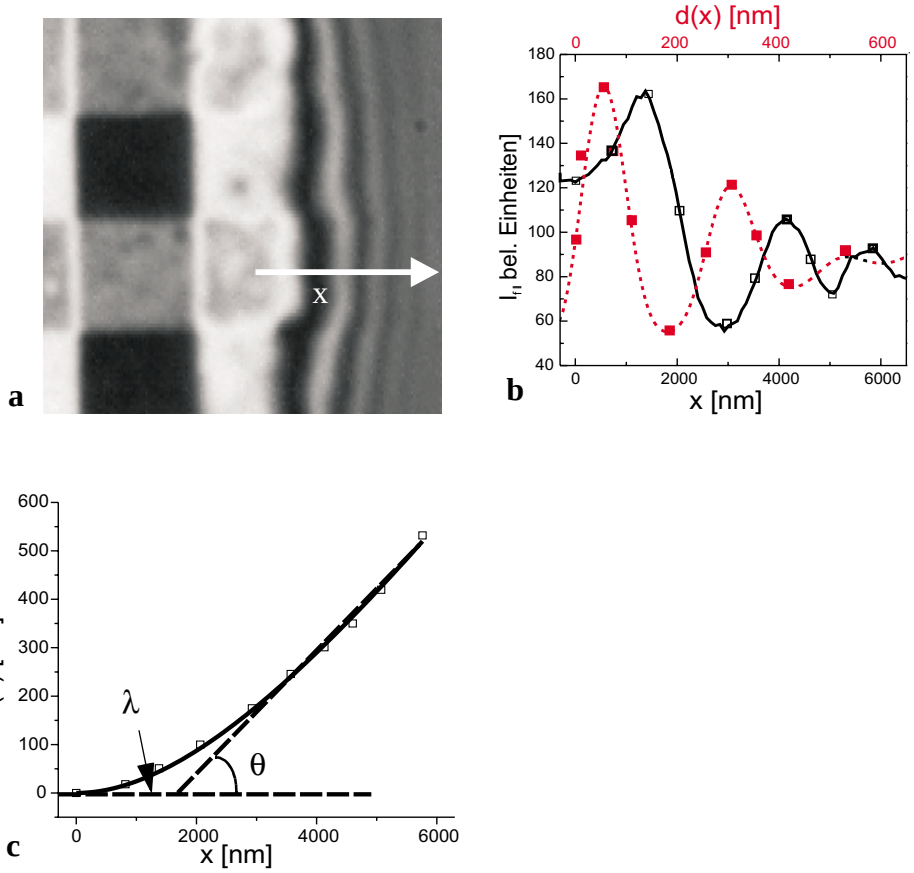


ABBILDUNG 4.9 Profilauswertung der Adhäsionsmembran anhand der Fluoreszenzinterferenzringe. (a) Ausschnitt des Fluoreszenz in der Adhäsionsregion. (b) Experimentell gemessene Fluoreszenzintensität entlang der Pfeilmarkierung in (a), als durchgezogene Linie dargestellt. Als unterbrochene Linie ist die theoretische FLIC-Kurve für den bekannten Adhäsionsabstand d eingetragen. (c) Aus dem Vergleich der beiden Kurven in (b) erhält man das Adhäsionsprofil.

An den markierten Punkten der beiden Kurven werden die x- und d(x)- Koordinaten des Adhäsionsprofils abgelesen, wie in Abb. 4.9c dargestellt. An die Punkte wird folgende Kurve angepaßt:

$$d(x) = d_0 + \theta \cdot (x - \lambda) + \theta\lambda \exp(-x/\lambda) \qquad \text{(GL 4.3)}$$

Dabei bezeichnen $\theta \approx R_{adh}/R$ den Adhäsionswinkel, mit R_{adh} dem Adhäsions- und R dem Vesikelradius, sowie $\lambda = \sqrt{\kappa/\Sigma}$ den Achsenabschnitt in Abb. 4.9c, mit κ der Mem-

branbiegesteifigkeit und Σ der Membranspannung. Typische Werte für den Adhäsionswinkel θ sind 10°, so dass die Änderung der theoretischen FLIC-Kurve durch den zum elektrischen Feld gekippten Chromophor vernachlässigt wird.

Da die Werte für λ auf BSA und Laminin im selben Bereich von 1-2 µm liegen, kann eine Änderung der Membranbiegesteifigkeit ausgeschlossen werden. Die Membranspannung Σ ist klein und trägt zur sterischen Fluktuationskraft wenig bei. Der erhöhte Adhäsionsabstand auf Laminin ist nicht auf die Änderung der Vesikelmembraneigenschaften zurückzuführen.

Zusammenfassender Vergleich der Adhäsionsabstände

Der erhöhte Adhäsionsabstand der Vesikel auf Laminin ist auf die Proteinbeschichtung zurückzuführen. Subtrahiert man den BSA-Adhäsionsabstand von den 160 nm auf Laminin, so bleibt die Dicke des Lamininkissens übrig, die etwa 110 nm beträgt. Um ca. 20 nm kleinere Abstände (88 nm) werden bei der Zelladhäsion auf Laminin gemessen. Diese 88 nm können einerseits nicht nur aus dem Beitrag der Zellglykokalix herrühren, andererseits auch nicht von einer additiven Superposition von Lamininkissen und Glykokalix. Als Schlußfolgerung kann behauptet werden, dass bei der Beschichtung sowohl die Glykokalix als auch Laminin einen Beitrag zum Adhäsionsabstand in der Zelladhäsion leistet (Abb. 4.10).

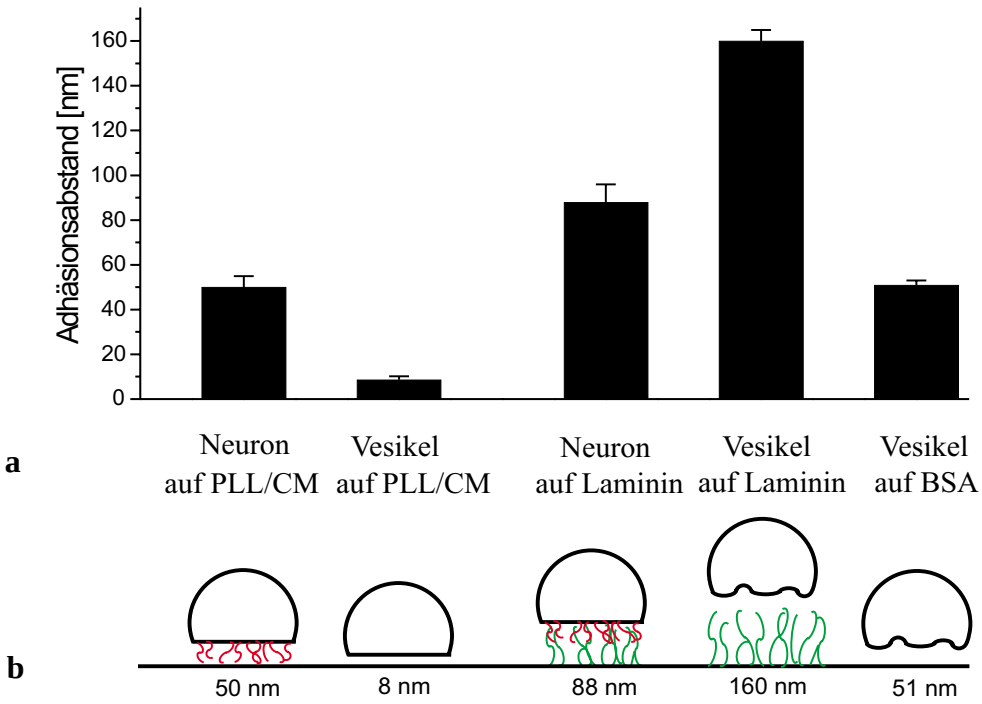


ABBILDUNG 4.10 a: Adhäsionsabstände von Neuronen von *Lymnaea stagnalis* und von POPC/Cholesterin-Vesikel auf Poly-L-Lysin+Wachstumsproteine(CM), Laminin und BSA. (b): Interpretation der Adhäsionsabstände. Bei neuronaler Adhäsion auf PLL wird der Adhäsionsabstand durch die Glykokalix (rot) bestimmt, bei der Adhäsion auf Laminin (grün) sowohl von der Glykokalix als auch von Laminin.

4.5 Zusammenfassung

Für die Charakterisierung der Neuron-Silizium Schnittstelle kann zusammengefaßt werden: Die Spaltleitfähigkeit g_J von adhärierten Schneckenneuronen auf einer mit Proteinen konditionierten Poly-L-Lysin beschichteten Oxidoberfläche beträgt 30 mS/cm^2, der mittlere Adhäsionsabstand 50 nm. Ein Vergleich mit dem spezifischen Widerstand des Zellmediums zeigt, dass dieser gleich dem spezifischen Spaltwiderstand ist. Durch Vergleich mit Adhäsionsexperimenten von Riesenvesikeln auf demselben Substrat kann geschlossen werden, dass der Abstand hauptsächlich durch die Zellglykokalix verursacht wird.

5 *Komponenten der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife*

In diesem Abschnitt werden in elektrischen Messungen die Komponenten der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Signalschleife charakterisiert. Einleitend wird der verwendete Messaufbau beschrieben. Der erste Schritt zur Realisierung der Signalschleife beginnt mit der Stimulation neuronaler Aktivität, die in Abschnitt 5.2 theoretisch und experimentell behandelt wird. Die Signalweiterleitung erfolgt im zweiten Schritt zwischen den Neuronen über elektrische Synapsen. Die Synapsen werden elektrophysiologisch charakterisiert, aus den Messungen werden die elektrischen Zellparameter Membranleitfähigkeit und Kapazität der Neurone bestimmt. Im folgenden Abschnitt wird auf die Detektion der Aktionspotenziale eingegangen. Sowohl theoretisch als auch experimentell wird gezeigt, dass, im Unterschied zu der wenig veränderlichen Form der Aktionspotenziale, im Transistor eine Vielfalt von Signalformen auftritt und diese auch interpretiert werden können. Im letzten Abschnitt wird schließlich die aus elektrophysiologischen Messungen bekannte Verbreiterung der Aktionspotenziale mit stimulierten APs sowie dem Transistornachweis verglichen.

5.1 Messaufbau

Für die Messung der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Signalschleife wurde in dieser Arbeit eine vorhandene Apparatur verwendet [Jenkner 1999] und nur geringfügige Veränderungen vorgenommen. Abb. 5.1 zeigt schematisch den Messaufbau. Kernstück desselben ist das Messchip mit Neuronen. Die Neurone werden mit zwei Mikroelektroden angestochen und deren Membranpotenzial[3] über zwei Brückenverstärker (npi Instruments, Tamm) und angeschlossene AD Wandler in den Computer eingelesen. Die Neurone können intrazellulär durch Injektion eines konstanten Strompulses stimuliert werden. Das Signal dazu wird als Analogspannung vom Messrechner vorgegeben. Die Messung des Membranpotenzials geschieht gleichzeitig über dieselbe Elektrode. Als Ausgangssignal erhält man also das verstärkte Membranpotenzial und das Stromsignal in Analogform.

Die kapazitiven Stimulatoren werden über einen Funktionsgenerator (33120A, Hewlett-Packard) und einen Kanalverteiler im FET-Verstärker angesteuert. Die Stimulationspulse werden vom Messrechner über einen GPIB-Bus an den Funktionsgenerator als Folge von maximal 16000 Stützstellen geliefert. Es kann vom Messrechner ein einzelner Stimulator oder mehrere davon angesteuert werden.

3. Im Folgenden wird häufig statt „Spannung“ auch der Terminus „Potenzial“ verwendet, wenn die Spannungsdifferenz gegenüber dem geerdeten Zellmedium betrachtet wird.

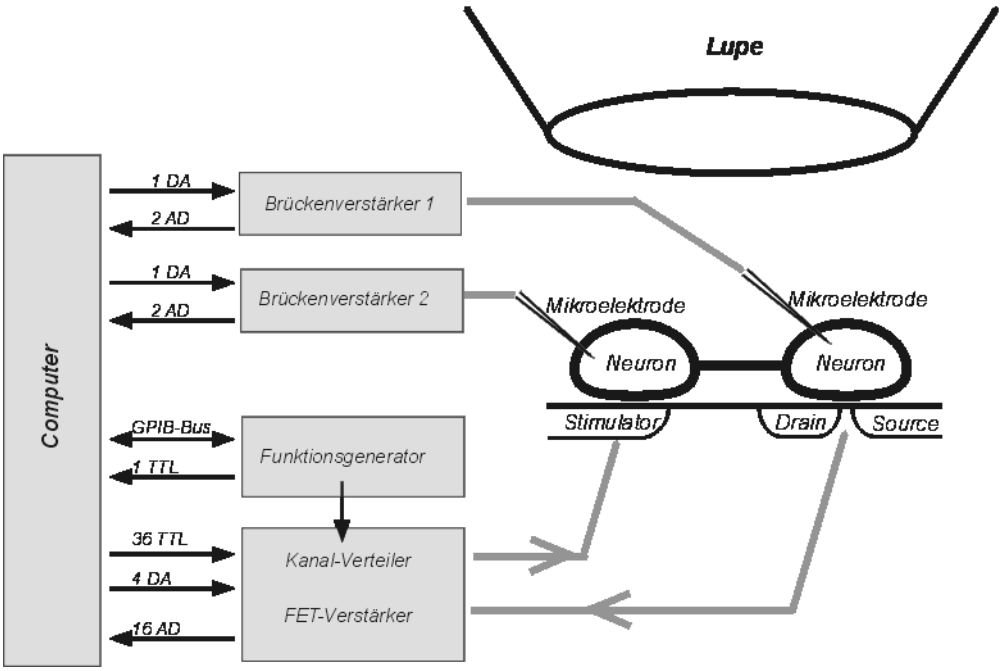


ABBILDUNG 5.1 Skizze des Messaufbaus nach [Jenkner 1999]. Mit Mikroelektroden kann jedes Neuron im Current-Clamp-Modus stimuliert werden. Der Funktionsgenerator liefert für jeden Stimulationsspot Spannungsrechteckpulse. Die Transistorsignale werden über einen FET-Verstärker am Computer in einem LabView-Programm dargestellt und gespeichert.

Der Arbeitspunkt für alle Transistoren wird über DA-Wandler eingestellt. Jedes Transistorsignal wird einzeln verstärkt und über AD-Wandler in den Messrechner eingelesen. Es können in einem LabView-Programm am Computer gleichzeitig bis zu sechs Transistorspuren dargestellt und gespeichert werden. Die Zeitauflösung hängt von der Länge der Aufzeichnung ab und beträgt maximal 0.13 µsec.

Die Beschaltung des Chips ist wie folgt: Der schwach *n*-dotierte Teil des Siliziumchips (bulk) wird auf 6.5 V bezüglich des auf Masse gelegten Badelektrolyten vorgespannt. Die Stimulatoren befinden sich auch auf Badpotenzial. Die maximal angelegte Spannungsstufe beträgt, um keinen elektrischen Durchbruch durch das 10 nm dünne Oxid zu riskieren, 5 V. Das Sourcepotenzial beträgt üblicherweise +1.7 V, das Potenzial der Drainzuleitung +0.5 V. Bei dem gewählten Arbeitspunkt beträgt der Source-Drain Strom 80-100 µA. Eine Änderung der Badspannung über dem Gate von 10 mV bewirkt einen Einbruch im Source-Drain- Strom von etwa -1µA, wie aus der Steilheit 100 nA/mV mit Gleichung 2.1 berechnet werden kann.

5.2 Silizium-Neuron: Kapazitive Stimulation

5.2.1 Zur Theorie der kapazitiven Stimulation

Die Silizium-Neuron-Kopplung läßt sich mit dem in Kapitel 4 eingeführten Punkt-Kontaktmodell charakterisieren. Zum Verständnis der kapazitiven Stimulation wird folgendes elektrische Ersatzschaltbild betrachtet (Abb. 5.2). Durch Anlegen einer veränderlichen Spannung V_S an die Stimulatorzuleitungen koppelt diese kapazitiv in den Adhäsionsspalt und lädt die Kapazitäten der Adhäsions- und freien Membran, c_M auf. Der kapazitive Entladungsstromstrom fließt über den Adhäsionsspalt und die Adhäsionsmembran der Zelle ab. Die Depolarisation der Zellmembran führt zur Auslösung eines APs.

Für die Stimulatorkapazität genügt es, die des Isolationsoxids c_{OX} zu betrachten. Die Stimulatorbahn ist *p*-dotiert und es werden gegenüber dem Badelektrolyt nur positive Spannungen angelegt. Dadurch werden bei der Stimulation Löcher zur Oxidoberfläche gezogen, so dass im Halbleitersubstrat keine Kapazität entsteht [Grove 1964]. Die zur Oxidkapazität in Reihe geschaltete Kapazität der Helmholtzschicht im Elektrolyt ist viel größer und vernachlässigbar. Für das verwendete Zellmedium beträgt die spezifische Kapazität der Helmholtzschicht $c_H = 60\ \mu F/cm^2$.

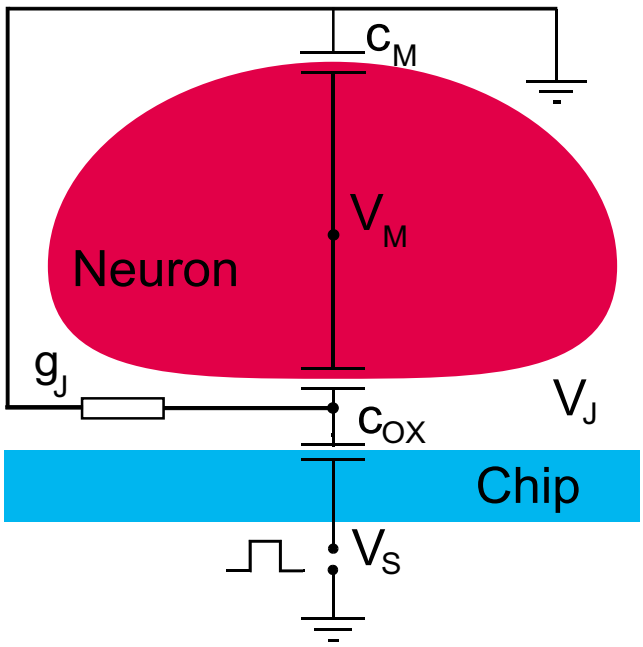


ABBILDUNG 5.2 Elektrisches Ersatzschaltbild für die kapazitive Stimulation. Es werden nur die spezifischen Kapazitäten des Chips c_{OX}, der Adhäsions- und freien Membran c_M sowie die spezifische Leitfähigkeit des Adhäsionsspalts g_J betrachtet. V_M bezeichnet die intrazelluläre Membranspannung, V_J die Spannung im Adhäsionsspalt, V_S die an den Stimulator angelegte Spannung.

In dieser Modellvorstellung wird die Membranruheleitfähigkeit g_M gegenüber der viel größeren Spaltleitfähigkeit g_J vernachlässigt, sowie die Ionenkanalleitfähigkeiten. Die zweite Annahme wird später plausibel.

Schreibt man die Kirchhoffschen Regeln für den Stromknoten im Adhäsionsspalt sowie für das Zellinnere auf, erhält man:

$$g_J V_J + c_M \frac{d(V_J - V_M)}{dt} = c_{OX} \frac{d(V_S - V_J)}{dt} \qquad \textbf{(GL 5.1)}$$

$$(1 + \beta_M) \frac{dV_M}{dt} = \beta_M \frac{dV_J}{dt} \qquad \textbf{(GL 5.2)}$$

$ß_M$ bezeichnet dabei das Verhältnis von Adhäsions- zu freier Membranfläche, V_J die Spannung im Adhäsionsspalt.

Substituiert man die Zeitableitung des Membranpotenzials V_M aus Gleichung 5.2 in Gleichung 5.1, erhält man eine Beziehung für V_J. Für das Verständnis der Auslösung von Aktionspotenzialen ist jedoch die Potenzialänderung der freien Membran V_M oder der Adhäsionsmembran V_{JM} wichtig. Es gilt:

$V_{JM} = V_M - V_J$ sowie $V_M = -\beta_M V_{JM}$.

Die zweite Beziehung erhält man, wenn man Gleichung 5.2 im Fourierraum betrachtet und eine nichtverschwindende Membranleitfähigkeit g_M berücksichtigt. Mit diesen zwei Gleichungen läßt sich aus den Gleichungen 5.1 und 5.2 eine Beziehung für V_M angeben:

$$V_M + \frac{c_M + (1 + \beta_M) c_{ox}}{(1 + \beta_M) g_J} \cdot \frac{dV_M}{dt} = \frac{\beta_M c_{ox}}{(1 + \beta_M) g_J} \cdot \frac{dV_S}{dt} \qquad \textbf{(GL 5.3)}$$

Im Folgenden wird ein Grenzfall für Spannungstimuli betrachtet: die Stimulation mit einer Spannungsstufe. Legt man eine Stufe an, so erhält man nach Einsetzen von $V_S = V_S^0 \cdot \Theta(t)$ in Gleichung 5.3:

$$V_M(t) = V_S^0 \cdot \frac{\beta_M \cdot c_{ox}}{(1 + \beta_M) c_{ox} + c_M} \cdot e^{-t/\tau_J} \qquad \textbf{(GL 5.4)}$$

wobei $\tau_J = \frac{c_M + (1 + \beta_M) c_{OX}}{(1 + \beta_M) g_J}$.

Aus Gleichung 5.4 wird ersichtlich, dass ein positiver Spannungspuls V_S am Stimulator eine Depolarisation der freien Membran hervorruft. Setzt man die aus Kapitel 2 und 4 bekannten Parameter (g_J = 30 mS/cm^2, c_{ox} = 0.35 µF/cm) sowie für $ß_M$ = 0.3 und c_M = 4 µF/cm^2 ein, erhält man bei einer positiven Spannungsstufe von +5 V eine Depolarisation der freien Membran von V_M = 130 mV mit einer Abklingzeit τ_J = 0.1 msec. Legt man eine negative Spannungsstufe von -5 V an, so depolarisiert man die Adhäsionsmem-

bran um 400 mV. Die Abklingzeit von 0.1 msec rechtfertigt das Vernachlässigen der Ionenkanäle, da deren Zeitkonstanten im Millisekundenbereich liegt.

5.2.2 Vorexperimente zur kapazitiven Stimulation

Die oben dargestellten theoretischen Überlegungen zur Membrandepolarisation können experimentell überprüft werden. Das einfachste Experiment besteht in der Stimulation einer aufgesetzten Zelle [Stett 1995] auf einem großen Stimulationsspot von 500 µm Durchmesser [Birkenmaier 2001]. Die große Spotfläche gewährleistet, dass die Zelladhäsionsfläche vollständig über der Stimulationsfläche liegt und die im vorigen Abschnitt abgeleiteten Gleichungen mit spezifischen Kapazitäten und Leitfähigkeiten angewendet werden können. Ein zweites Experiment besteht darin, eine Zelle auf einem Stimulationsspot wachsen zu lassen und nach zwei Tagen zu stimulieren. Dieses entspricht dem für die Schleifenmessung benötigten Einzelschritt. Der Messchip mit großem Stimulationsspot enthält keine Transistoren.

Stimulation einer aufgesetzten Zelle

Die Charakterisierung des Adhäsionsspalts für aufgesetzte Zellen und damit die Anwendung der hergeleiteten Gleichungen erweist sich als schwierig, da über Fluoreszenzmessungen weder die Spaltleitfähigkeit noch der Adhäsionsabstand gemessen werden kann. Die Fluoreszenz der adhärierten Zellmembran ist nach dem Aufsetzen sehr inhomogen [Zeck 1997].

Die in Abb. 5.3a dargestellte Messung zeigt, dass mit einer positiven Spannungsstufe an aufgesetzten Neuronen von *Lymnaea stagnalis* ein AP ausgelöst wird. Die Spannungsstufe depolarisiert die freie Zellmembran über die Schwellspannung, oberhalb derer ein AP durch schnelles Öffnen von Natriumionenkanälen ausgelöst wird. Das AP wird über eine Anstechelektrode aufgezeichnet, die das Potenzial der freien Membran mißt.

.

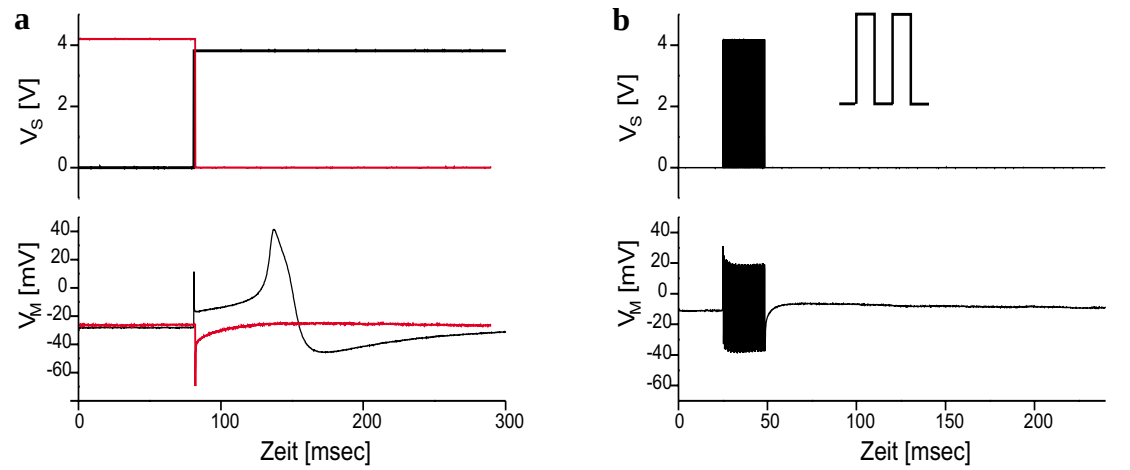


ABBILDUNG 5.3 (a): Stimulation einer aufgesetzten, nicht gewachsenen Zelle mit einer positiven Spannungsstufe (schwarz) und negativen Spannungsstufe (rot). (b): Stimulation mit einer Folge von 40 Rechteckpulsen. Die Rechteckpulse, zwei davon sind nicht maßstabsgetreu vergrößert, haben eine Länge von 0.2 msec. Nur mit positiven Flanken kann ein AP ausgelöst werden.

Mit einem negativen Spannungspuls, welcher die Adhäsionsmembran depolarisiert, konnte an einer aufgesetzten Zelle nie ein AP ausgelöst werden (Abb. 5.3a, rote Messspur). Dies läßt darauf schließen, dass nach dem Aufsetzen der Zellen die Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran inaktiv sind. Mit einer Folge von Rechteckpulsen, d.h. die positive Flanke wird von einer negativen Flanke gefolgt (Pulslänge und Zwischenzeit variabel zwischen 0.2-1 msec), konnte ebenfalls kein AP ausgelöst werden (Abb. 5.3b). Man beobachtet eine vollständige Repolarisation des freien Membranpotenzials durch die negative Flanke des Rechteckpulses.

Die in diesen Experimenten über die Mikroelektrode gemessenen Spannungsspitzen während der Spannungsstufe entsprechen nicht den über der freien Membran anliegenden Spannungen. Die Zeitdigitalisierung beträgt bei einer Aufnahmezeit von 300 msec 0.1 msec. Die Spannungsamplitude fällt mit der Zeitkonstanten von 0.1 msec ab. Misst man jedoch mit einer hohen zeitlichen Auflösung von 0.013 msec (Abb. 5.5) kann man Spannungsspitzen von bis zu 200 mV aufnehmen.

Stimulation einer gewachsenen Zelle

Analog zum Experiment an einer aufgesetzten Zelle wurde auch an gewachsenen Zellen die AP-Auslösung gemessen. Es wurden mehrere Neurone auf einem Stimulationsspot (Durchmesser 500 µm, Oxiddicke 10 nm) kultiviert (Abb. 5.4).

ABBILDUNG 5.4 Auf einem großem Stimulationsspot (Durchmesser: 500 µm, Oxiddicke: 12 nm) sind 4 Neurone gewachsen. Die Stimulation an der markierten Zelle ist in Abb. 5.5 dargestellt.

Der Adhäsionsspalt ist für dieses Experiment gut charakterisiert, siehe Kapitel 4. Es können sowohl mit positiven und negativen Spannungsstufen als auch mit Rechteckpulsen APs ausgelöst werden (Abb. 5.5). Erhöht man die Amplitude der Stufe, so wird das AP schneller ausgelöst. Eine Erklärung könnte sein, dass die Membran länger depolarisiert bleibt, da die Spannung von einer größeren Amplitude relaxiert.

Ob das AP bei negativen Spannungspulsen durch Membrandepolarisation oder durch die Hyperpolarisation der freien Membran ausgelöst wird, kann durch einen kurzen hyperpolarisierenden Strominjektionspuls von 3 nA getestet werden. Ein AP kann außer durch Depolarisation der Zellmembran auch durch eine kurze, starke Hyperpolarisation („postinhibitorischer Rebound“) ausgelöst werden. Die Hyperpolarisation führt zu geschlossenen Ionenkanälen. Bei einer schnellen Relaxation auf das Ruhepotenzial kann durch offene h-Untereinheiten[4] des Natriumkanals bei fehlendem Kaliumausstrom die Membran über die Auslöseschwelle depolarisiert werden. Es konnte bei obigen Experimenten durch einen stark hyperpolarisienden Strompuls jedoch kein AP ausgelöst werden. Dies deutet darauf hin, dass aktive Ionenkanäle in der durch kapazitive Stimuli depolarisierten Adhäsionsmembran für die Auslösung des APs verantwortlich sind.

4. Siehe Kapitel 4.1 zur Beschreibung der Ionenkanaluntereinheiten

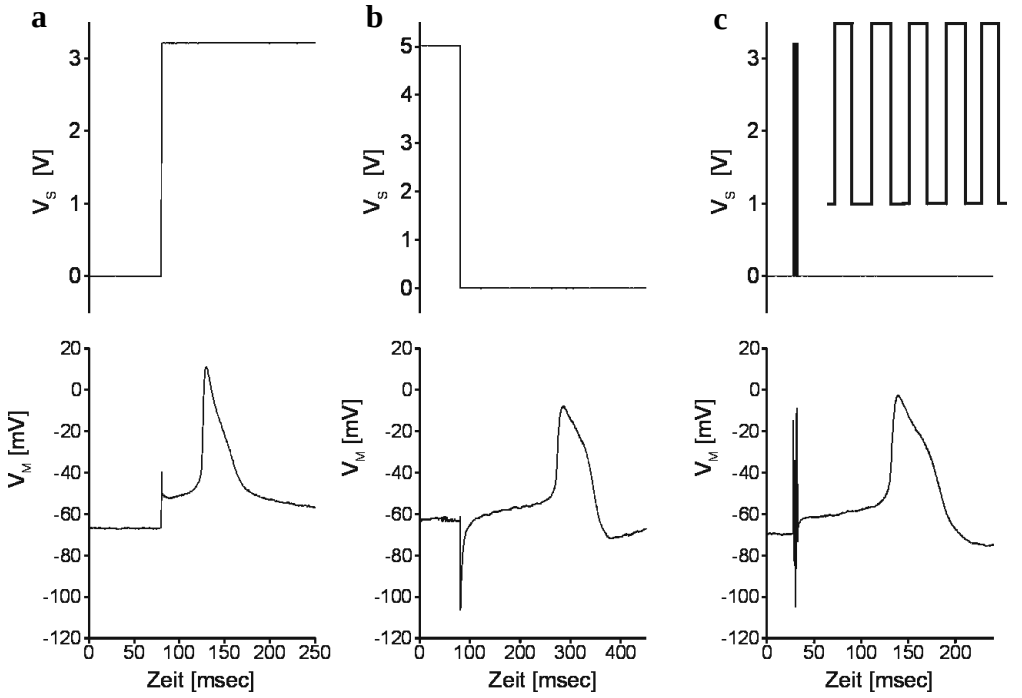


ABBILDUNG 5.5 Stimulation einer gewachsenen Zelle mit positiver Rechteckstufe (a), negativer Rechteckstufe (b) sowie einer Folge von Rechteckpulsen (c). Es können mit jeder dargestellten Stimulationsform APs ausgelöst werden. In (c) sind die fünf verwendeten Rechteckpulse vergrößert dargestellt. Die Amplitude beträgt 3.2 V, die Pulslänge 0.5 msec.

Bestimmung des Verhältnisses $ß_M$ von Adhäsions- zu freier Membranfläche

Mit positiven Spannungspulsen kann an der markierten Zelle aus Abb. 5.4 ein einfaches Experiment zur Überprüfung von Gleichung 5.4 durchgeführt werden. Es werden Stimulationspulse von 0 bis 5 V in 1 V Schritten angelegt und die Spannung der freien Membran mit hoher zeitlicher Auflösung (13 µsec) gemessen. In Abb. 5.6a sind drei Spannungsstufen und die zugehörigen Elektrodensignale dargestellt. Trägt man die Depolarisationsamplitude der freien Membran gegen die angelegte Spannung auf, liegen die Messpunkte auf einer Geraden (Abb. 5.6b). Aus der Geradensteigung erhält man, bei bekannter Zell- und Oxidkapazität, das Verhältnis von Adhäsions- zu freier Membranfläche $ß_M = 0.5$.

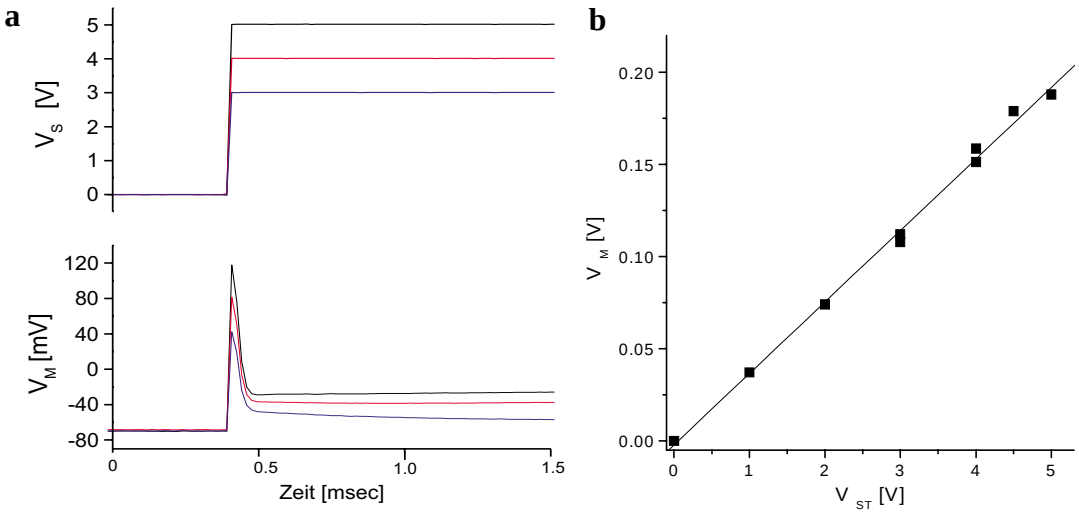


ABBILDUNG 5.6 (a): Stimulationsstufen steigender Amplitude depolarisieren die freie Membran stärker. (b): Trägt man die gemessene Depolarisation gegen die Stimulationsstärke auf, kann aus der Geradensteigung das Verhältnis Adhäsionsmembranfläche / freie Membranfläche β_M = 0.5, gemäß Gleichung 5.4 bestimmt werden.

Dieses Ergebnis kann mit folgender Messung verglichen werden. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Fluoview, Olympus) läßt sich ein Höhenprofil einer fluoreszenzmarkierten Zelle erstellen, in Abb. 5.7 dargestellt.

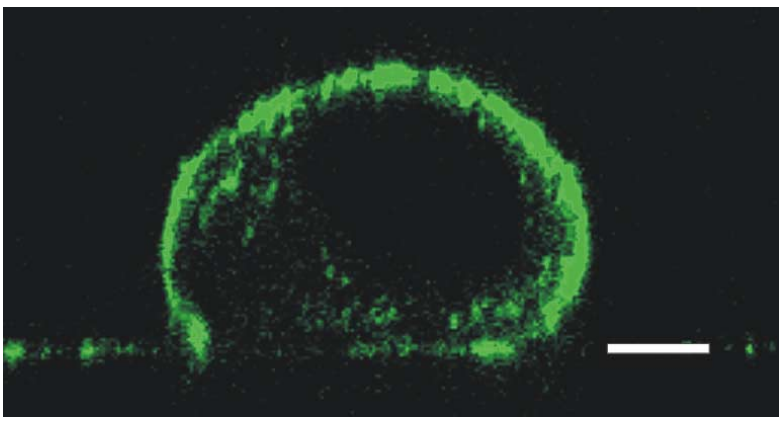


ABBILDUNG 5.7 Höhenprofil eines gewachsenen Neurons unter Cokulturbedingungen. Unter der Annahme von Rotationssymmetrie in z-Richtung und Vernachlässigung der Neurite wird das Verhältnis Adhäsions- zu freier Membranfläche $ß_M$ bestimmt. Skalenbalken: 20 µm

Die Zelle ist mit ANNINE 5 angefärbt [Kuhn 2001] und zusammen mit Zellen, die für die Spannungstransientenmessungen verwendet wurden, auf einem großen Stimulationsspot gewachsen, siehe Abb. 4.3. Unter der Annahme einer rotationssymetrischen Zelle erhält man für verschiedene Neurone Werte für $ß_M$ zwischen 0.3 - 0.5. Die Fluoreszenz im Innern der Zelle ist darauf zurückzuführen, dass der Farbstoff teilweise in die Zelle eindringt.

Transiente Löcherbildung bei kapazitiver Stimulation

Es stellt sich die Frage, ob die hohen Spannungsspitzen von einigen 100 mV zur Elektroporation der Zellmembran führen. Dielektrischer Durchbruch bei Lipidmembranen erfolgt erst bei 1 V [Benz 1974]. An Zellen der Zelllinie NG 108-15 wurde jedoch bei etwa 200 mV transiente Löcherbildung der Membran beobachtet [Ryttsen 2000]. Membranelektroporation führt zur Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Diese kann theoretisch über die Mikroelektrode gemessen werden (Abschnitt 5.3). Allerdings verfälscht das Anstechen die Messung; eine angestochene Zelle überlebt maximal einige Stunden. Um eine transiente Löcherbildung nachzuweisen, werden mehrere Neurone auf einem großen Stimulationsspot analog Abb. 5.4 kultiviert. Das Zellmedium im Äußeren wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (Anregung 488 nm, Emission 520 nm, Konzentration 100 µM) angefärbt (Abb. 5.8). Vor der Stimulation wurde ein Höhenprofil des Neurons mit einem konfokalen Laserscanmikroskop gemacht. Danach wird ein Referenzneuron angestochen und alle Neurone über den Stimulator zu APs angeregt. Nach 40 Minuten Dauerstimulation wird ein Laserscanschnitt des nichtangestochenen Neurons gemacht. Vergleicht man die Fluoreszenz im Zellinneren vor und nach der Stimulation, kann kein Unterschied beobachtet werden. Die Fluoreszenz im Innern der Zelle rührt von Reflexionen an der Siliziumoberfläche her, und nicht von Fluoresceinmolekülen in der Zelle. Daraus kann geschlossen werden, dass keine oder nur sehr geringe Löcherbildung auftritt. Kleine Poren, die für Ionen aber nicht für Fluorescein durchlässig sind, bleiben unentdeckt. Auch eventuelle Löcherbildung in der Adhäsionsmembran kann durch eine verminderte Diffusion von Fluorescein im Adhäsionsspalt nicht ausgeschlossen werden.

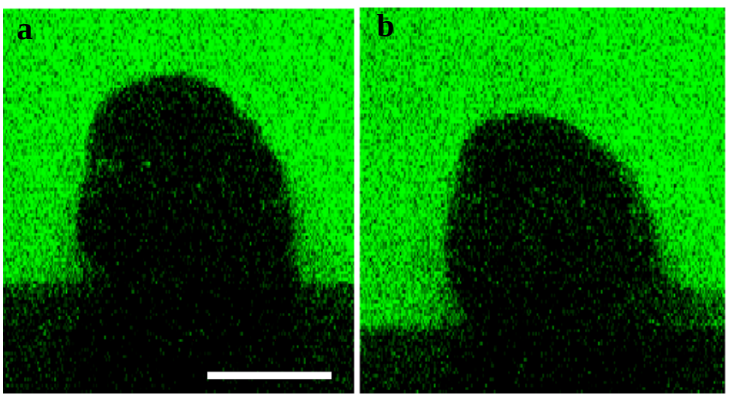


ABBILDUNG 5.8 Höhenprofil eines gewachsenen Neurons auf einem Stimulationsspot vor der Stimulation (a) und nach 40 Minuten Dauerstimulation (b). Die Fluoreszenz der Fluoresceinmoleküle ist grün markiert. Skalenbalken: 20 µm.

5.2.3 Kapazitive Stimulation auf bidirektionalen Strukturen

In den Experimenten auf Chips mit bidirektionalen Strukturen (Stimulator und Transistor) entspricht die Zelladhäsionsfläche nicht der Stimulationsfläche. Um die mit spezifischen Größen hergeleiteten Gleichungen beizubehalten, wird für die spezifische Oxidkapazität $\bar{c}_{ox}$ eingeführt, wobei:

$$\bar{c}_{ox} = c_{ox} \cdot \frac{\bar{A}_{JM}}{A_{JM}} \qquad \text{(GL 5.5)}$$

Dabei bezeichnet $\bar{A}_{JM}$ die den Stimulator bedeckende Adhäsionsfläche, A_{JM} die gesamte Adhäsionsfläche. An der Zelle in Abb. 5.9 beträgt die den Stimulator kontaktierende Membran nur etwa 1000 µm^2, der markierten Fläche entsprechend. Die Fläche der gesamte Adhäsionsfläche ist jedoch 2300 µm^2. Infolgedessen ist $\bar{c}_{ox}$=0.15 µF/cm^2 und durch den kapazitiven Spannungsteiler fällt eine kleinere Spannung über der Zellmembran ab. Bei einer Spannungsstufe von 5V wird die freie Membran um nur 28-45 mV depolarisiert (β_M = 0.3-0.5). Deshalb war in fast allen Stimulationsexperimenten eine Folge von Rechteckpulsen nötig, um durch kapazitive Stimulation ein AP auszulösen. Für die Zelle aus Abb. 5.9 waren sieben Rechteckpulse nötig, um ein Aktionspotenzial auszulösen (siehe auch Abb. 6.3).

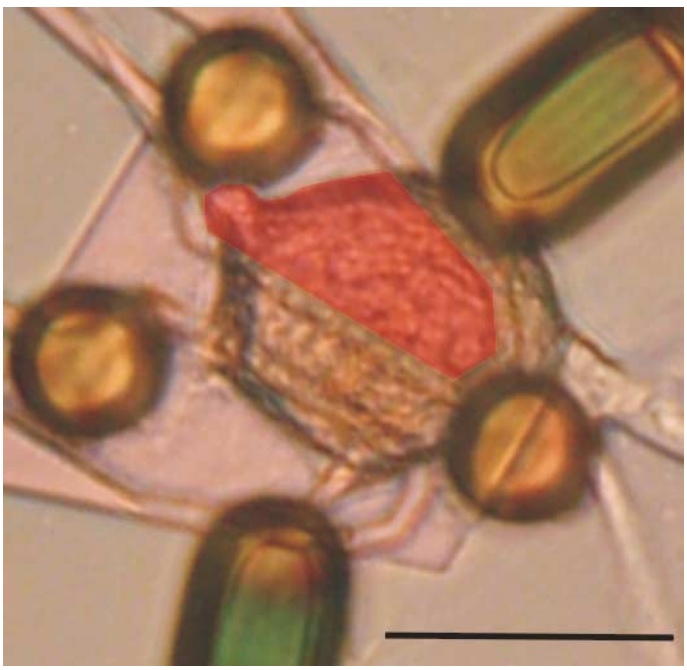


ABBILDUNG 5.9 Auf bidirektionalen Strukturen gewachsene Zellen bedecken nur zum Teil (rot hervorgehoben) die Stimulatorfläche. Skalenbalken 50 µm.

Experimentell wird bei den Stimulationsexperimenten so vorgegangen, dass die Zahl der Rechteckpulse erhöht wird, bis ein AP in der Mikroelektrode gemessen wird. Abb. 5.10 zeigt zwei Möglichkeiten, die bei einer Stimulation auftreten können. Im ersten Fall wird das AP nach einem Rechteckpuls ausgelöst (rot markiert). Erhöht man die Zahl der Rechteckpulse, so wird das AP früher ausgelöst und dem ersten AP folgt ein zweites, welches eine deutlich breitere Form aufweist. Aktionspotenzialverbreiterungen werden in der Literatur auf Inaktivierungen von Ionenkanälen zurückgeführt [Aldrich 1979].

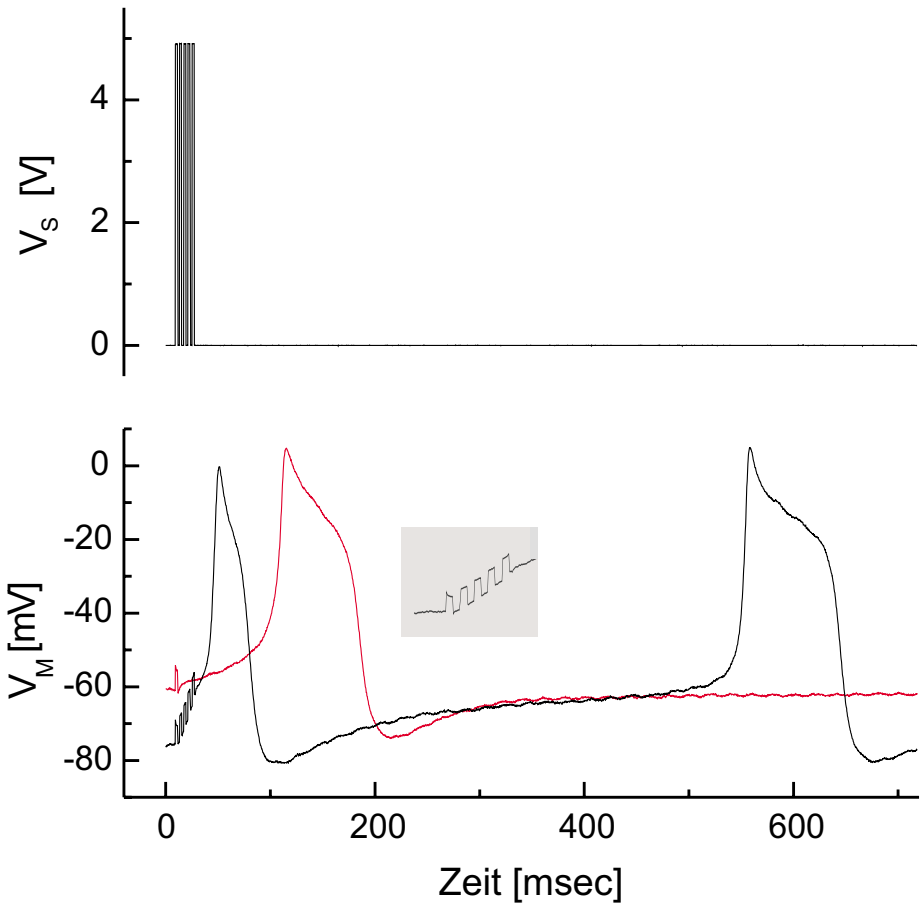


ABBILDUNG 5.10 Stimulation eines Neurons mit einem (rot) bzw. mit einer Folge („burst“) von 5 Rechteckpulsen (schwarz). Die Erhöhung der Stimuli löst zwei APs aus. In einer Folge von Rechteckpulsen wird die Membran immer stärker depolarisiert, in der Vergrößerung klar zu erkennen.

In einem zweiten Experiment wurde eine Folge von Stimulationsbursts angelegt. Wählt man den Abstand zwischen zwei Stimulationsbursts etwa 200 msec (Abb. 5.11a), so kann mit jedem einzelnen burst ein AP ausgelöst werden. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz (Abb. 5.11b) führt jedoch nicht zu einer Erhöhung der AP Frequenz. Zwischen den beiden APs befindet sich das Neuron in der Refraktärphase, in der die Membran schwerer depolarisiert werden kann.

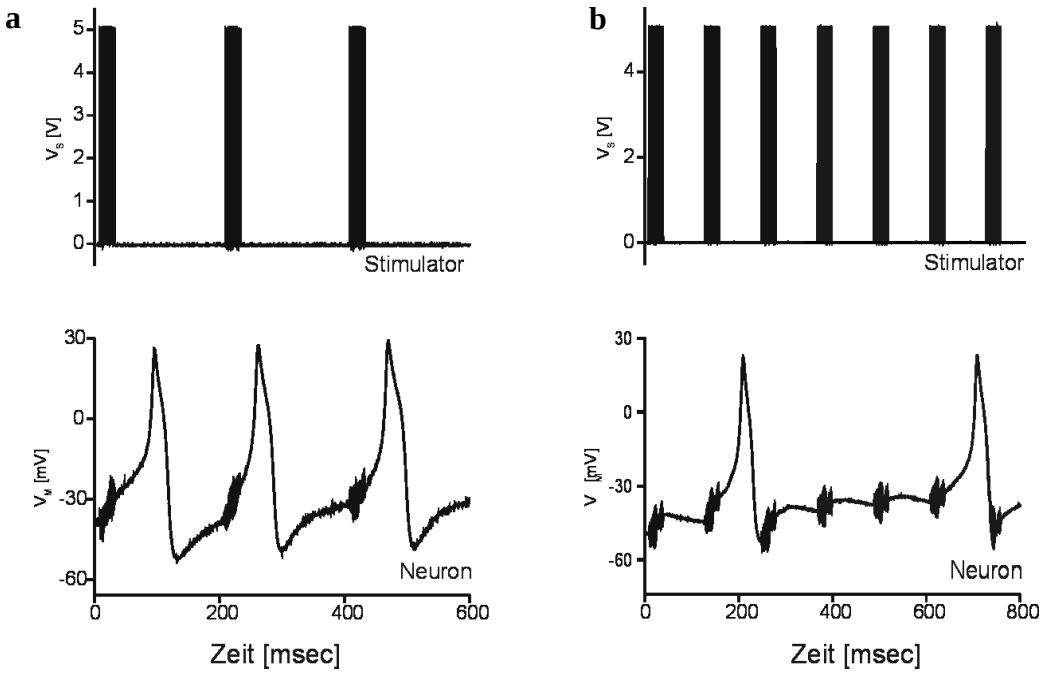


ABBILDUNG 5.11 Stimulation eines Neurons mit einer Folge von Stimulationsbursts. In a) wird mit einer Frequenz von 5 Hz bei jedem Stimulationsburst ein AP ausgelöst. Die Erhöhung der Stimulationsfrequenz in b) erhöht die AP Rate nicht.

Auch bei den APs in Abb. 5.11 ist eine Verbreiterung ihrer Form zu beobachten. In Kapitel 5.5 wird darauf ausführlich eingegangen.

5.3 Neuron-Neuron: Elektrische Synapse

Die in dieser Arbeit untersuchten Neuronen aus dem A-Cluster der Pedalganglien bilden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* elektrische Synapsen [Kyriakides 1989]. Unter einer elektrischen Synapse versteht man einen engen Zell-Zell-Kontakt gebildet durch die Dimerisierung zweier Halbkanäle (gap junction). Jede Kanalhälfte besteht aus 6 monomeren Untereinheiten [Hille 1992]. Bei Vertebraten gehören die Monomeren zur Proteinfamilie der Connexine. Bei Invertebraten werden die gap junction Proteine Innexine genannt (invertebrate connexin analogues). Der Porendurchmesser einer gap junction beträgt 1-3 nm, je nach untersuchter Spezies. Für *Lymnaea stagnalis* Neurone wurde ein Porendurchmesser kleiner 1 nm vorgeschlagen, da Farbstoffmoleküle (Lucifer Yellow) dieser Größe nicht durch die elektrischen Synapsen diffundieren [Prinz 2000b].

Obige Beschreibung der elektrischen Synapse zeigt, dass diese durch eine Leitfähigkeit beschrieben werden kann. Da bei A-Cluster-Neuronen keine Spannungsabhängigkeit bekannt ist [Kyriakides 1989], wird die elektrische Synapse durch eine Ohmsche Leitfähigkeit G_{syn} charakterisiert.

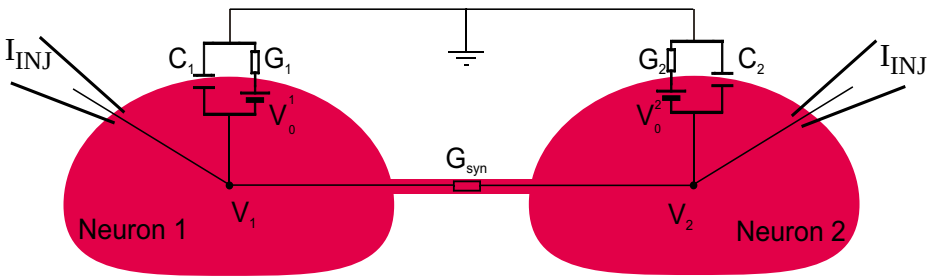


ABBILDUNG 5.12 Elektrisches Ersatzschaltbild für zwei über eine elektrische Synapse gekoppelte Neurone. In das präsynaptische Neuron 1 wird ein hyperpolarisierender Strom I injiziert. Aus der gemessenen Spannungsantwort in den beiden Zellen können die Membrankapazitäten C, die Membranleitfähigkeiten G, die Ruhepotenziale V_0 sowie die Synapsenleitfähigkeit G_{syn} bestimmt werden.

In Abb. 5.12 ist das elektrische Ersatzschaltbild für zwei über eine elektrische Synapse verbundene Neurone skizziert. Die Zellmembran wird dabei als Isopotenzialfläche beschrieben. Insbesonders werden Spannungsgradienten in den Neuriten vernachläßigt. In [Prinz 2000b] wurde gezeigt, dass diese Näherung keinen großen Fehler bei der Berechnung der Zellparameter hervorruft. Zusätzlich zur Membranleitfähigkeit G_i (i = 1,2) und der Membrankapazität C_i wird jede Zelle durch eine Spannungsquelle, ihre Ruhespannung V_0 beschrieben. In Abb. 5.12 sind die Neuronen nur über jeweils einen Neuriten verbunden. In der hier verwendeten Zellkultur ist dies nicht der Fall. Die Synapsenleitfähigkeit G_{syn} wird im Folgenden als Gesamtleitfähigkeit aller parallel geschalteten monosynaptischen Einzelleitfähigkeiten verstanden.

Um die Parameter des Ersatzschaltbilds zu bestimmen, geht man von den Kirchhoff-gleichungen für jede Zelle aus. Es gilt für Strominjektion in Neuron 1 (Der Index 1 steht im folgenden für präsynaptische Zelle):

$$I_{INJ} = C_1 \frac{dV_1}{dt} + G_1(V_1 - V_0^1) + G_{syn}(V_1 - V_2) \qquad \text{(GL 5.6)}$$

Die Spannungsänderung in der postsynaptischen Zelle berechnet sich bei präsynaptischer Strominjektion zu:

$$G_{syn}(V_1 - V_2) = C_2 \frac{dV_2}{dt} + G_2(V_2 - V_0^2) \qquad \text{(GL 5.7)}$$

Die elektrischen Parameter sind in Abb. 5.12 definiert und als absolute Größen angegeben, im Gegensatz zu den spezifischen Werten in Kapitel 5.2. In den obigen Gleichungen stehen sieben unbekannte Größen: jeweils zwei Membranleitfähigkeiten G_i, -kapazitäten C_i und Ruhepotenziale V_0^i sowie die Synapsenleitfähigkeit G_{syn}. Die zeitabhängigen Lösungen der beiden gekoppelten Differentialgleichungen 5.7 und 5.8 sind in [Prinz 2000b] detailliert hergeleitet.

Im Folgenden wird der einfache Fall konstanter Strominjektion in Neuron 1 behandelt und die Strombilanz für jede Zelle vor und nach Strominjektion betrachtet. Man erhält vier Gleichungen:

$$0 = G_1 \cdot (V_1^0 - V_0^1) + G_{syn} \cdot (V_1^0 - V_2^0) \quad \textbf{(GL 5.8)}$$

$$I_{INJ} = G_1 \cdot (V_1^\infty - V_0^1) + G_{syn} \cdot (V_1^\infty - V_2^\infty) \quad \textbf{(GL 5.9)}$$

$$G_{syn} \cdot (V_1^0 - V_2^0) = G_2 \cdot (V_2^0 - V_0^2) \quad \textbf{(GL 5.10)}$$

$$G_{syn} \cdot (V_1^\infty - V_2^\infty) = G_2 \cdot (V_2^\infty - V_0^2) \quad \textbf{(GL 5.11)}$$

Dabei bezeichnen V_i^0 die Membranpotenziale vor Beginn der Strominjektion, V_i^∞ am Ende eines hyperpolarisiernden Pulses

Aus den Gleichungen 5.10 und 5.11 läßt sich das Ruhepotenzial V_0^2 angeben:

$$V_0^2 = \frac{V_1^\infty V_2^0 - V_1^0 V_2^\infty}{\Delta V_1 - \Delta V_2} \quad \textbf{(GL 5.12)}$$

mit $\Delta V_i = V_i^\infty - V_i^0$. Dass Membranruhepotenzial und ohne Strominjektion gemessenes Potenzial nicht gleich sind, liegt daran, dass bei unterschiedlichen V_0 über die elektrische Synapse ein Reststrom fließt, der die Potenziale anzugleichen versucht.

Bei bekannten Ruhepotenzialen kann aus Gleichung 5.8 und Gleichung 5.9 die Membranleitfähigkeit G_1 bestimmt werden:

$$G_1 = \frac{V_1^0 - V_2^0}{(V_0^1 - V_0^2) \cdot (\Delta V_1 - \Delta V_2)} \cdot I_{INJ} \quad \textbf{(GL 5.13)}$$

Analog zum dargestellten Verfahren können V_0^1 und G_2 bestimmt werden.

Zur Charakterisierung der elektrischen Synapse wird der synaptische Kopplungskoeffizient k_{12} eingeführt. Er ist folgendermaßen definiert:

$$k_{12} = \frac{\Delta V_2}{\Delta V_1} = \frac{G_{syn}}{G_2 + G_{syn}} \quad \textbf{(GL 5.14)}$$

Die Beziehung von Kopplungskoeffizient zur synaptischen Leitfähigkeit G_{syn} erhält man durch Subtraktion von Gleichung 5.10 und Gleichung 5.11. Aus Gleichung 5.14 wird ersichtlich, dass für ein gegebenes Zellpaar k_{12} und k_{21} verschiedene Werte haben können, aufgrund von verschiedenen Membranleitfähigkeiten G_i.

Für die Bestimmung der Membrankapazität werden im Folgenden die Neurone als synaptisch unverbunden betrachtet. Injiziert man einen hyperpolarisiernden Strompuls in Neuron i, so gilt für die Potanzialänderung ΔV_i:

$$\Delta V_i = \frac{\Delta I}{G_i} \cdot e^{-t/\tau_i}, \quad \text{mit } \tau_i = C_i/G_i \; . \qquad \text{(GL 5.15)}$$

Bei bekannter Membranleitfähigkeit G_i lassen sich die Membrankapazitäten C_i bestimmen. Aus den Gleichungen 5.13 bis 5.15 lassen sich sukzessiv die sieben Parameter des elektrischen Ersatzschaltbilds, Leitfähigkeiten und Kapazitäten, bestimmen.

In Abb. 5.13 ist die experimentelle Bestimmung der Membranleitfähigkeiten und -kapazitäten gezeigt. Im dargestellten Experiment wird ein hyperpolarisierender Strompuls in Neuron 1 injiziert und die Potenzialänderungen von Neuron 1 und Neuron 2 gemessen. In Abb. 5.13b wird in Neuron 2 Strom injiziert und die Antwort der beiden Zellen gezeigt.

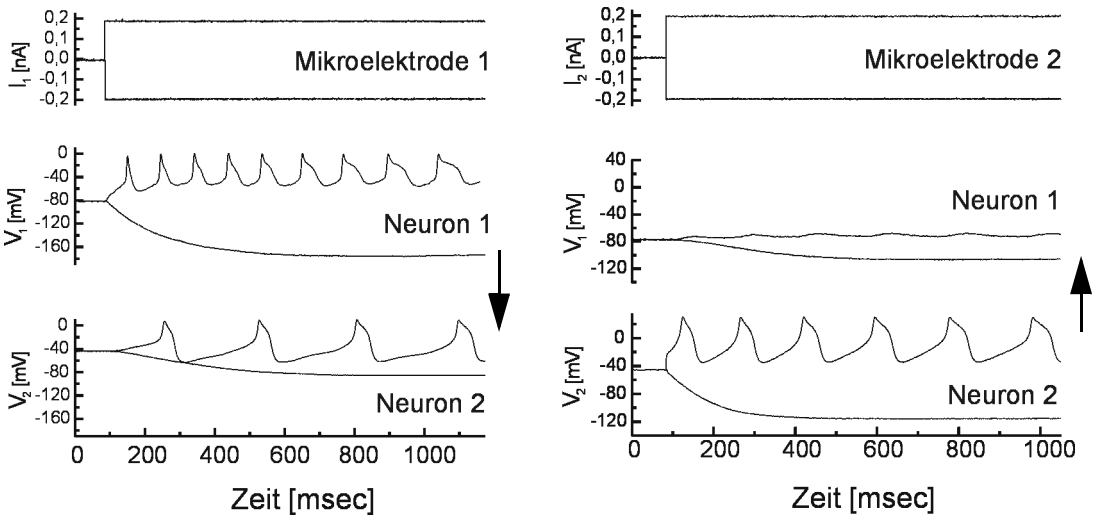


ABBILDUNG 5.13 Elektrische Kopplung für ein Paar synaptisch verbundener Neurone. Die erste Spur zeigt den injizierten Strompuls I (links oben in Neuron 1, rechts oben in Neuron 2). In der mittleren Spur ist die Antwort V_M von Neuron 1 gezeigt (links präsynaptisch, rechts postsynaptisch) und schließlich in der unteren Spur analog Neuron 2. Das verbundene Neuronenpaar wird in Kapitel 6.1 als Beispielpaar für eine Schleifenmessung besprochen.

Für alle ausgewerteten Signalschleifen wurden die Bestimmung der Zell- und Synapsenparameter analog Abb. 5.13 durchgeführt. Die berechneten Mittelwerte sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt.

Die berechneten Werte für die synaptischen Kopplungskoeffizienten k_{ij} variieren zwischen 0.07-0.55 (Mittelwert 0.25). Dieser Bereich ist in anderen Experimenten bestätigt [Bodmer 1984, Prinz 2000a]. Für G_{syn} erhält man als Mittelwert $1,3 \pm 0,8$ nS.

TABELLE 5.1 Mittelwerte der elektrischen Membranparameter: Zellmembranleitfähigkeit G_M [nS], Synapsenleitfähigkeit G_{syn} [nS], Membrankapazität c_M [nF] sowie Ruhepotenzial V_0 der ausgewerteten Schleifenmessungen. Der Index 1 gibt das präsynaptische Neuron der Schleife an, 2 das postsynaptische Neuron.]

G_1 [nS]	G_2 [nS]	G_{syn} [nS]	c_1 [nF]	c_2 [nF]	V_0^1 [mV]	V_0^2 [mV]
5, 4 ± 1, 6	*4, 6±1, 3*	*1, 3 ± 0, 8*	*0, 6 ± 0, 3*	*0, 55 ± 0, 30*	*– 63 ± 10*	*– 53 ± 10*

Bestimmt man die Membranoberfläche, wie in Abb. 5.9 gezeigt, so lassen sich für die Zellmembranleitfähigkeit und -kapazität spezifische Werte angeben. Als Mittelwerte erhält man $g_M = 0.05$ mS/cm^2 bzw. $c_M = 4\ \mu$F/cm^2.

In Abb. 5.13 ist zusätzlich zu hyperpolarisierender Strominjektion die Zellantwort für depolarisierende Strominjektion gezeigt. Nur in eine Richtung lassen sich über die Synapse postsynaptisch Aktionspotenziale auslösen. Entscheidend für die Anhebung des postsynaptischen Potenzials über die AP-Feuerschwelle ist nicht allein die synaptische Leitfähigkeit sondern auch das postsynaptische Ruhepotenzial. Aus Tabelle 5.1 erkennt man, dass für Neuron 2 das Ruhepotenzial im Mittel positiver als bei Neuron 1 ist. Die für die Auslösung eines APs benötigte postsynaptische Potenzialänderung ist für Neuron 2 geringer als für Neuron 1.

5.4 Neuron-Silizium: Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren

5.4.1 Zur Theorie der Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren

Die folgenden Überlegungen werden im Punktkontakt-Modell durchgeführt, d.h. es wird jedwelche Ortsabhängigkeit des Potenzials in der Adhäsionsmembran und -region vernachläßigt. Die hergeleiteten Gleichungen sind an die in [Fromherz 1999a] publizierten angelehnt.

In Abb. 5.14 ist der für die Detektion wichtige Ausschnitt des elektrischen Schaltbildes dargestellt. Das intrazelluläre Potenzial der freien Membran V_M wird über die Mikroelektrode aufgezeichnet. Durch diese oder durch die elektrische Synapse eines präsynaptischen Neurons kann ein Injektionsstrom I_{INJ} injiziert werden. Die vom Transistor gemessene Änderung des Source-Drain Stroms kann auf die Änderung der Spannung im Adhäsionsspalt V_J zurückgeführt werden.

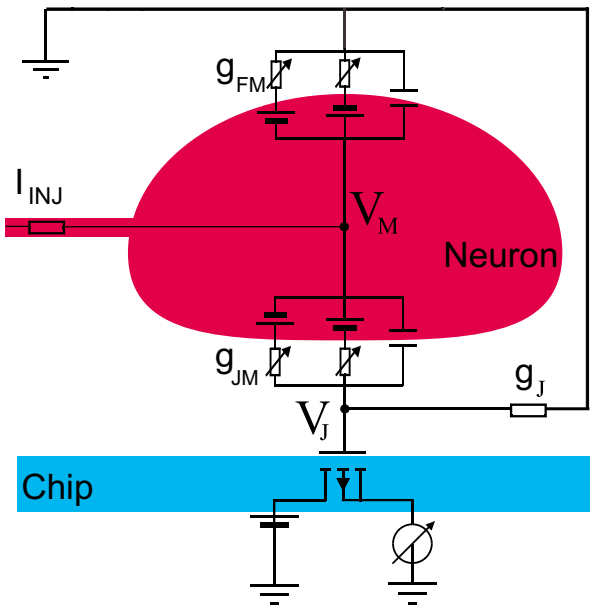


ABBILDUNG 5.14 Elektrisches Ersatzschaltbild für die extrazelluläre Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren. Die vom Transistor gemessene Spannungsänderung entspricht der Änderung von V_J. Die Membranionenleitfähigkeiten in der freien Membran g_{FM} und der Adhäsionsmembran g_{JM} werden getrennt betrachtet.

Unberücksichtigt bleibt im Folgenden die Membranruheleitfähigkeit g_M, da sie mit 0.05 mS/cm^2 viel kleiner g_j = 30 mS/cm^2 ist. Der kapazitive Strom durch das Gateoxid kann gegenüber dem kapazitiven Strom durch die Zellmembran vernachläßigt werden (c_{ox} = 0.35 µF/cm^2 < c_M = 4 µF/cm^2).

Wendet man die Kirchhoffschen Regeln auf das Schaltbild an, so gilt:

$$g_J V_J = c_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - V_0^i) \qquad \text{(GL 5.16)}$$

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

(GL 5.17)

In Gleichung 5.16 und 5.17 bezeichnen g_{FM}^i und g_{JM}^i die Ionenleitfähigkeit der freien bzw. Adhäsionsmembran für die Ionensorte i, V_0^i deren Ruhepotenzial, A_{FM} und A_{JM} die Fläche von freier und Adhäsionsmembran. Die weiteren Parameter wurden weiter vorne eingeführt.

Um aus diesen zwei gekoppelten Gleichungen eine einfache Beziehung für die gemessene Spannung V_J zu erhalten, wird die kapazitive Aufladung der Zellmembran über die Membranleitfähigkeiten der freien Membran ausgedrückt und in die erste Gleichung eingesetzt.

In [Fromherz 1999a] wurde auf eine schnelle, schwache und kleine Kopplung eingegangen, wie sie bei Rattenneuronen auftritt. Schnelle Kopplung bedeutet, dass das Signal im Adhäsionsspalt gegenüber dem Zellsignal schnell relaxiert. Schwache Kopplung bedeutet, dass die Spaltleitfähigkeit viel höher als die Ionenkanalleitfähigkeit ist. Eine kleine Kopplung bedeutet, dass die Adhäsionsmembranfläche kleiner als die freie Membranfläche ist, also der Ionenstrom hauptsächlich über die freie Membran fließt. Für die Schnekkenneurone sind die Näherungen der schwachen und kleinen ($A_{JM}/A_{FM} << 1$) Kopplung nicht notwendigerweise erfüllt. Allein die erste Näherung einer schnellen Kopplung soll beibehalten werden. In dieser Näherung wird der kapazitive Strom im Adhäsionsspalt gegenüber dem ohmschen vernachläßigt.

$$\frac{dV_J}{dt} \ll \frac{g_J}{c_M} V_J \qquad \text{(GL 5.18)}$$

Damit vereinfachen sich Gleichung 5.16 und Gleichung 5.17 zu:

$$g_J V_J = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - V_0^i) \qquad \text{(GL 5.19)}$$

$$\frac{I_{INJ}}{A_{FM}} = \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_0^i) + (\beta_M + 1) c_M \frac{dV_M}{dt} + \beta_M \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - V_0^i) \qquad \text{(GL 5.20)}$$

Aus den Gleichungen 5.19 und 5.20 läßt sich die Zeitableitung des Membranpotenzials substituieren und man erhält die allgemeine Beziehung für die gemessene Spannung im Adhäsionsspalt V_J :

$$V_J = \frac{1}{(1 + \beta_M) g_J + \sum_i g_{JM}^i} \cdot \left(\sum_i (g_{JM}^i - g_{FM}^i) \cdot (V_M - V_0^i) + \frac{I_{INJ}}{A_{JM} + A_{FM}} \right) \qquad \text{(GL 5.21)}$$

Für den Fall der schwachen Kopplung ($\sum_i g_{JM}^i \ll g_J$), kleinen Kopplung ß$_M$ <<1 und verschwindenden Injektionsstrom I_{INJ} erhält man die Beziehung:

$$V_J = \frac{\sum_i (g_{JM}^i - g_{FM}^i) \cdot (V_M - V_0^i)}{g_J} \qquad \text{(GL 5.22)}$$

Aus Gleichung 5.22 liest man die Voraussetzung der extrazellulären Signaldetektion mit Feldeffekttransistoren ab: **Die Ionenkanalleitfähigkeit mindestens einer Kanalsorte in der Adhäsionsmembran muß verschieden von der Ionenkanaleitfähigkeit in der freien Membran sein.** Das gemessene Signal skaliert mit der Leitfähigkeit von

Adhäsionsmembran und Adhäsionsspalt und ist abhängig von dem Verhältnis der Adhäsionsmembran zur gesamten Zellmembranfläche $ß_M$.

Ausgehend von den obigen Gleichungen können noch zwei Spezialfälle diskutiert werden. Bei verschwindender spezifischen Ionenleitfähigkeit der Adhäsionsmembran folgt aus Gleichung 5.19, dass das Transistorsignal der ersten Ableitung des Aktionpotenzials entspricht. In diesem Fall spricht man von A-Typ Kopplung. Dominiert jedoch eine unspezifische Leckleitfähigkeit in der Adhäsionsmembran den Ionenstrom ($g_{JM} > g_{FM}$), so folgt die Signalform im Transistor dem Aktionspotenzial. Dieser Kopplungstyp wird B-Typ Kopplung genannt. Die allgemeine Transistorsignalform, wie in Gleichung 5.22 hergeleitet, entspricht der sogenannten C-Typ Kopplung [Fromherz 1999a].

5.4.2 Charakterisierung gemessener Signalformen

Die ersten Kopplungstypen wurden an aufgesetzten Blutegelneuronen gemessen. Die Kopplung des Aktionspotenzials war bei verschwindendem g_{JM} kapazitiv (A-Typ) oder ohmsch bei vergleichbaren Werten von Spalt- und Membranruheleitfähigkeit (B-Typ) [Jenkner 1997]. In folgenden Experimenten wurde eine Vielzahl von Kopplungstypen beschrieben. Es wurde an Wachstumskegeln der Retziuszelle und an Rattenneuronen gezeigt, dass in der Adhäsionsmembran aktive Ionenkanäle vorhanden sein müssen (C-Typ) [Schätzthauer 1998, Vassanelli 1999].

In den hier durchgeführten Messungen an gewachsenen Zellen können die Signalformen ebenfalls mit aktiven Ionenkanälen erklärt werden. Abb. 5.15 zeigt das am häufigsten auftretende Kopplungssignal. Bei den gemessenen Schleifen wurde diese Signalform zu ca. 75% beobachtet. Das AP und das zugehörige Transistorsignal sind Teil der in Kapitel 6 behandelten vollständigen Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife.

Skaliert man das zugehörige Aktionspotenzial auf die Amplitude des Transistorsignals (rot eingezeichnet), so erkennt man, dass das Aktionspotenzialmaximum etwa 10 msec vor dem Transistormaximum liegt. Da beim Aktionspotenzial die Depolarisation von den in die Zelle strömenden Natrium- und Calciumionen, die Repolarisation durch Kaliumionen bewirkt wird, kann man von dieser Signalform auf unterschiedliche Membranleitfähigkeiten für Kaliumionen schließen.

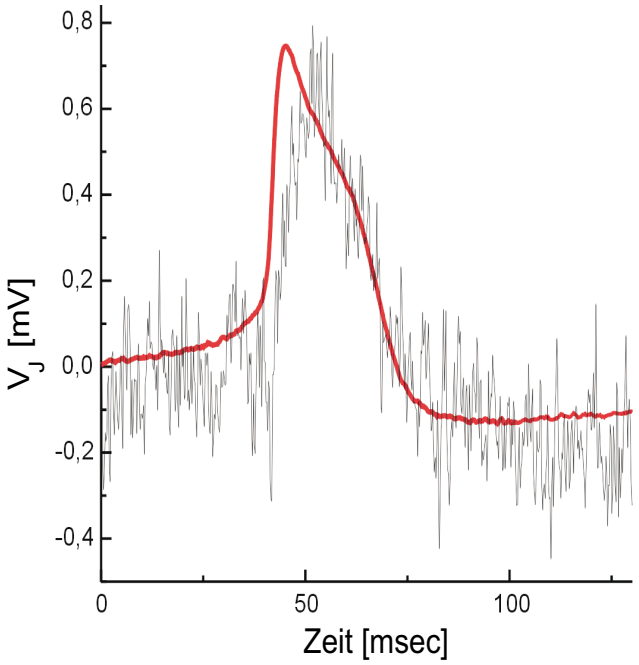


ABBILDUNG 5.15 Transistorsignal (schwarz) mit zugehörigem Aktionspotenzial (rot), welches über die Anstechelektrode gemessen wurde.

Auch über die Verteilung läßt sich eine Aussage treffen: da das Ruhepotenzial für Kaliumionen negativer als das Membranpotenzial ist, bedeutet ein positives Transistorsignal nach Gleichung 5.21 eine erhöhte Leitfähigkeit für Kaliumionen in der Adhäsionsmembran. Aus der Amplitude schließlich läßt sich der Grad der Umverteilung abschätzen. Für die spezifische Kaliumkanalleitfähigkeit wird ein Wert von etwa 10 mS/cm^2 angenommen [Neher 1971]. Die Inhomogenität der Leitfähigkeit läßt sich mit den in obigen Kapiteln bestimmten Parametern (g_J = 30 mS/cm^2, ß$_M$ = 0.3, V_J^{max} = 1 mV, V_M - V_0 = 100 mV) bestimmen. Man erhält g_{JM}/g_{FM} =1.05. Diese grobe Abschätzung zeigt, dass eine geringe Inhomogenität der Membranionenleitfähigkeit ausreicht, um im Transistor ein Signal zu erzeugen. Andererseits ist der Transistor ein empfindliches Messinstrument für solche Inhomogenitäten.

Außer der vorgestellten Signalform gab es mit einer geringen Häufigkeit weitere Typen. Die kapazitive A-Typ Kopplung trat bei gewachsenen Neuronen nie auf. Die ohmsche Kopplung (B-Typ) wird bei kapazitiv stimulierten und über die Mikroelektrode kontaktierten Neuronen beobachtet (Abb. 5.16a).

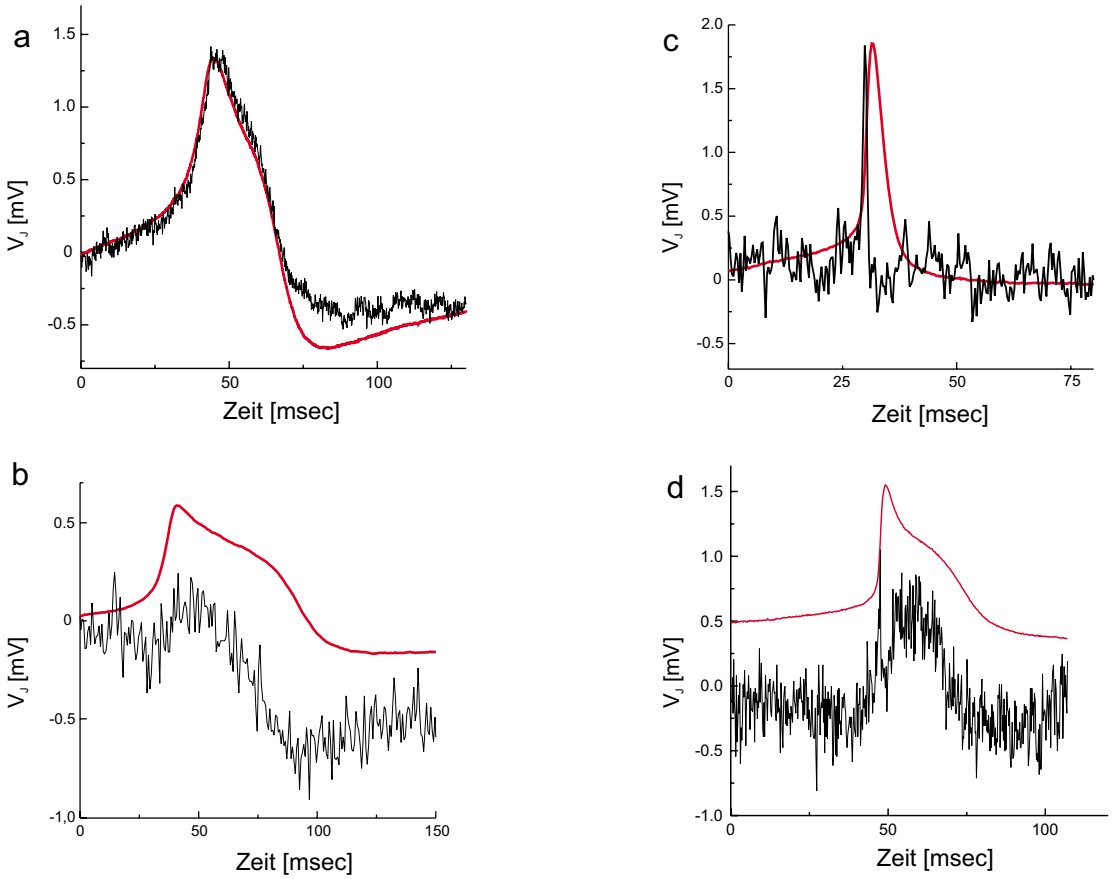


ABBILDUNG 5.16 Transistorsignalformen (schwarz) mit zugehörigem, skalierten Aktionspotenzial (rot). Zur Charakterisierung der Signale siehe Text.

Ein weiterer Signaltyp (Abb. 5.16b) hat eine negative Amplitude, das Maximum ist wie oben gegenüber dem AP-Maximum retardiert. Dies deutet auf eine reduzierte Kaliumleitfähigkeit in der Adhäsionsmembran hin. Diese Form wurde relativ häufig (4 mal) bei sich zeitlich ändernden Signalen beobachtet. Die Signalform ist auch in [Jenkner 2001] dokumentiert.

Für das AP in Abb. 5.16c gilt, dass es keine Schulter aufweist, also nicht von einem A-Cluster Neuron stammt. Das zugehörige Transistorsignalmaximum ist 1.5 msec vor dem AP-Maximum. Dies deutet auf eine erniedrigte Natriumionenleitfähigkeit in der Adhäsionsmembran hin. Solche Transistorsignalformen wurden bei A-Clusterneuronen nicht beobachtet.

Das Transistorsignal in Abb. 5.16d zeigt zwei Maxima. Der erste, schmale Transistorpeak wird 2 msec vor dem AP-Maximum gemessen. Das zweite Transistormaximum hat eine geringere Amplitude und folgt 10 msec auf das AP- Maximum. In [Schätzthauer 1998] wurde ein Signal mit zwei Maxima, allerdings negativen Amplituden, mit Hodgkin-Huxley-Parametern mit erhöhter Natriumleitfähigkeit und erniedrigter Kaliumleitfähigkeit in der Adhäsionsmembran modelliert. Das Signal in Abb. 5.16d kann analog auf erniedrigte

Ionenleitfähigkeit für einströmende Ionen und erhöhte Leitfähigkeit für ausströmende Ionen zurückgeführt werden.

5.5 Zeitliche Dynamik von Aktionspotenzialen und Transistorsignalen

Außer der vorgestellten Charakterisierung einzelner Signale kann die zeitliche Dynamik von Aktionspotenzialen und deren Transistornachweis untersucht werden. Hinsichtlich eines chipüberwachten neuronalen Netzes stellt sich die Frage, ob die aus elektrophysiologischen Messungen bekannte AP-Verbreiterung vom Stimulator ausgelöst und im Transistor nachgewiesen wird.

Die zeitliche Dynamik von Aktionspotenzialen von Schneckenneuronen ist seit den Arbeiten von P.G. Kostyuk et al. an Neuronen von *Helix pomatia* [Kostyuk 1975] sowie von R.W. Aldrich an Neuronen von *Archidoris* [Aldrich 1979] bekannt. Löst man durch Strominjektion in einem Neuron APs mit einer Frequenz von 1-7 Hz aus, so verändert sich ihre Form, sie werden breiter (Abb. 5.17). In Kapitel 4 wurde die Schulter der APs in der repolarisierenden Phase auf einwärtsgerichtete Calciumionenströme zurückgeführt. Die Verbreiterung könnte deshalb auf eine Verstärkung des Calciumeinwärtsstroms zurückzuführen sein. In den Experimenten von R.W.Aldrich wurde jedoch kein grösserer Calciumstrom gemessen. Andererseits wurde in Abwesenheit von Calciumionen keine Verbreiterung beobachtet. Elektrophysiologische Messungen in [Aldrich 1979] zeigten weiterhin, dass in einer Folge von APs Kaliumkanäle inaktivieren, ohne sich nach dem Ende des APs zu erholen. Der gemessene verzögerte Kaliumstrom wird kleiner. Die Inaktivierung ist stärker je breiter die APs sind. Die Verbreiterung wird auf das Zusammenwirken zweier Effekte zurückgeführt: ein langsam inaktivierender Calciumeinstrom depolarisiert die Zellmembran, die von dem Kaliumausstrom repolarisiert wird. Der Kaliumausstrom wird jedoch bei jedem folgenden AP kleiner, so dass die Repolarisationszeit länger wird.

In den Experimenten zur Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife ist die Signalverbreiterung klar zu erkennen (Abb. 5.17). Bei langen Strominjektionen war sie bekannt, sie tritt jedoch auch bei wiederholter kapazitiver Stimulation mit einer Folge von bursts auf (Abb. 5.17b). Löst man präsynaptisch eine Reihe von Aktionspotenzialen aus und ist die Synapse so stark, dass postsynaptisch auch ein Aktionspotentialburst erfolgt, so beobachtet man auch hier Signalverbreiterung (Abb. 5.17c).

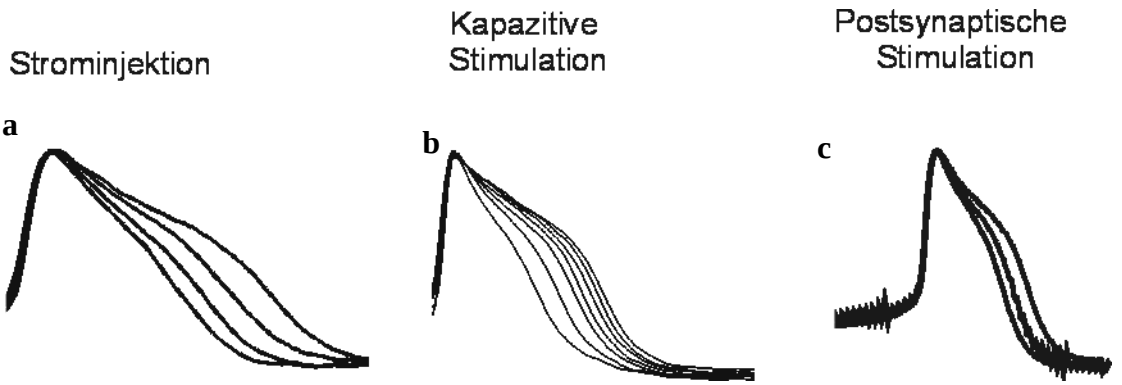


ABBILDUNG 5.17 Über die Mikroelektrode gemessene Aktionspotentialverbreiterung nach Strominjektion (a), wiederholter kapazitiver Stimulation (b) und postsynaptischer Stimulation (c). Die Verbreiterung gleicht der in der Literatur beschriebenen. In (c) sind präsynaptische Stimulationsartefakte zu erkennen.

Die Signalverbreiterung wird quantifiziert, indem die Breite des x-ten APs (D_x) auf die des ersten (D_1) normiert wird. Willkürlich wird die Breite des APs bei 1/4 des Maximalwertes abgelesen.

5.5.1 Aktionspotenzialverbreiterung bei kapazitiver Stimulation

Man kann durch kapazitive Stimulation mit Mehrfachpulsen eine Folge von Aktionspotenzialen auslösen (Abb. 5.17b) und die Verbreiterung gegen die AP Frequenz auftragen. Man beobachtet ähnlich wie bei der intrazellulären Strominjektion eine Abnahme der AP-Verbreiterung in einer ausgelösten Folge. Dies ist ein Indiz, dass bei der kapazitiven Stimulation Ionenkanäle sich ähnlich wie bei Experimenten mit intrazellulärer Strominjektion verhalten. Andererseits sollte, der Transistorsignalinterpretation aus Abschnitt 5.4 folgend, durch abnehmenden Kaliumausstrom die Amplitude im Transistor kleiner werden. Dies kann bei kapazitiv stimulierten und über die Mikroelektrode kontaktierten Neuronen im darunterliegenden Transistor in vielen Fällen nicht bestätigt werden (siehe z.B. Abb. 6.2a).

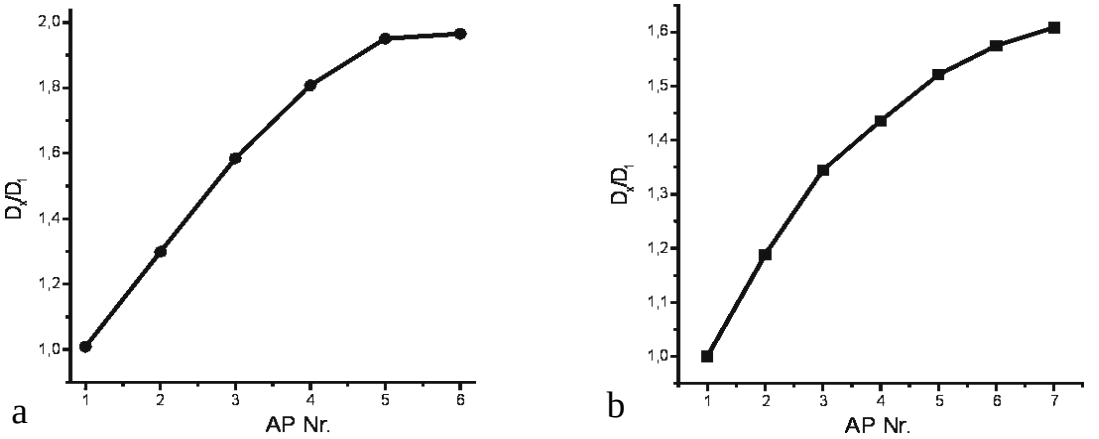


ABBILDUNG 5.18 Verbreiterung der Aktionspotenziale bei Strominjektion (a) und kapazitiver Stimulation (b). Aufgetragen ist das Verhältnis zwischen der Breite des x-ten APs (D_x) normiert auf die Breite des ersten APs (D_1) gegen die AP-Nummer.

Man beobachtet ähnliche Kurven, wie die in Abb. 5.18 dargestellten, für verschiedene AP-Frequenzen zwischen 1 und 7 Hz, wobei die Verbreiterung mit steigender Frequenz steigt.

5.5.2 Aktionspotenzialverbreiterung bei Stimulation über die elektrische Synapse

In elektrophysiologischen Voltage-Clamp-Messungen wurde gleichzeitig mit der Aktionspotenzialverbreiterung der Auswärtsstrom gemessen. Die Amplitude dieser Signale wird analog zu den Aktionspotenzialen auf die des ersten normiert. Trägt man nun die normierten Stromwerte gegen die Verbreiterung auf, so erkennt man eine eindeutige Korrelation (Abb. 5.19a). Die Abnahme des Auswärtsstroms korreliert mit der AP-Verbreiterung D_x/D_1 [Aldrich 1979]. In Schleifenexperimenten wird statt des Auswärtsstroms das Transistorsignal gemessen. Trägt man die normierte Amplitude der Transistorsignale gegen die AP-Verbreiterung auf, so erhält man eine vergleichbare Korrelation (Abb. 5.19b). Es wird die Abnahme der Transistorsignale sowohl bei Strominjektion über die Mikroelektrode als auch bei postsynaptischer Stimulation über die elektrische Synapse beobachtet.

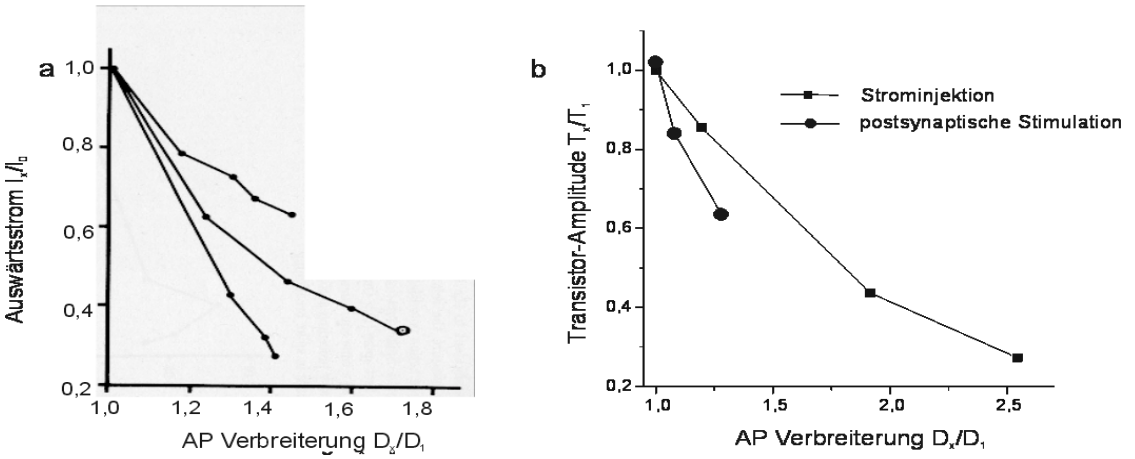


ABBILDUNG 5.19 AP Verbreiterung korreliert mit dem Kalium-Auswärtsstrom (a) [Aldrich 1979] bzw. mit der Amplitude der Transistorsignale (b). In (b) ist die Korrelation der AP- Verbreiterung mit der Transistorsignaländerung sowohl bei Strominjektion als auch bei postsynaptischer Stimulation eingetragen.

Abb. 5.18 und Abb. 5.19 suggerieren, dass bei Schleifenmessungen die zeitliche Dynamik einer Membranionenleitfähigkeit beobachtet werden kann. Allerdings müssen für die Untermauerung dieser Hypothese eine Reihe anderer Möglichkeiten ausgeschlossen werden: Das Adhäsionssubstrat könnte einen Effekt auf die Ionenkanäle haben, die Spaltleitfähigkeit g_j könnte sich zeitlich ändern und nach Gleichung 5.15 das Transistorsignal; das Umkehrpotenzial für eine bestimmte Ionensorte kann sich zeitlich ändern, die Ionenleitfähigkeit der Adhäsionsmembran g_{JM} für eine Ionensorte kann sich ändern. Die letzte Möglichkeit läßt ihrerseits zwei Mechanismen zu: Ionenkanaldiffusion oder Inaktivierung von Ionenkanälen. Es wird angenommen, dass Ionenkanäle in der Membran von Nervenzellsomata fest mit dem Zytoskelett verbunden sind und nicht diffundieren.

Im Folgenden werden diese Möglichkeiten eingehender untersucht:

1. **Substratunabhängige AP-Verbreiterung**

Es wurden zusätzlich zu den oben besprochenen Experimenten Neurone auch auf Laminin kultiviert. Auf Laminin ist das Neuritenwachstum schlechter als auf Poly-L-Lysin. Es konnten keine Transistorsignale gemessen werden. Da der Adhäsionsabstand doppelt so groß ist als auf PLL, die Spaltleitfähigkeit vermutlich auch, ist die erwartete Amplitude des Transistorsignals etwa halb so groß. Für die Detektion kleinerer Amplituden muß das Rauschen der Transistoren verkleinert werden. Es konnten jedoch über intrazelluläre Strominjektion oder über kapazitive Stimulation mit 100 Pulsen APs ausgelöst werden. Diese zeigen dieselbe Signalverbreiterung, wie in Abb. 5.17 dargestellt. Die Verbreiterung der Signale bedeutet, dass die Adhäsion auf Laminin die Dynamik der APs nicht ändert.

2. Zeitliche Änderung der Spaltleitfähigkeit g_J

Die zeitliche Änderung der Spaltleitfähigkeit wird durch die Änderung der Ionenkonzentration im Spalt nach einem AP bewirkt. Da in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, dass die Spaltleitfähigkeit gleich der Leitfähigkeit im Bad ist, wird davon ausgegangen, dass auch die Ionenkonzentrationen im Spalt und im Bad gleich sind. Die Ionenkonzentrationen im Zellmedium sind bekannt, siehe Anhang. Aus den Diffusionskonstanten der einzelnen Ionen läßt sich der theoretische Wert für den Spaltwiderstand angeben:

$$\rho = \left(\frac{F^2}{RT}\sum_i D_i z_i^2 c_i\right)^{-1} = 144\Omega cm$$

Dabei bezeichnet F die Faraday Konstante, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, D_i die Diffusionskonstante der Ionensorte i im Zellmedium, z_i deren Wertigkeit sowie c_i deren Molarität. Experimentell kann der spezifische Widerstand des Kulturmediums zu 125-150 Ωcm gemessen werden. Den größten Beitrag liefern Natrium- und Chlorionen. Während eines APs fließen etwa 10^9 Natriumionen aus dem Adhäsionsspalt in die Zelle (typische Dauer 10 msec, Amplitude 100 mV und Natriumleitfähigkeit 10 mS/cm^2), was etwa 30% der im Spalt vorkommenden Natriumionen ausmacht. Für den Adhäsionsspalt werden folgende Dimensionen angenommen: Adhäsionsradius 20 µm, Adhäsionsabstand 50 nm, Natriumkonzentration 50 mM. Es kann bei einer Diffusionskonstanten D_{Na}=1.33 10^{-5} cm^2/sec [Hille 1992] jedoch angenommen werden, dass die Natriumkonzentration im Adhäsionsspalt beim zweiten AP wieder ihren ursprünglichen Wert erreicht hat.

3. Änderung des Umkehrpotenzials

Das Umkehrpotenzial für eine Ionensorte ist gegeben durch : $V_0^i = -\frac{k_B T}{z_i e_0} ln \frac{c_i^{in}}{c_i^{out}}$. Da sich bei einem AP die Kaliumkonzentration im Adhäsionsspalt erhöht, kann lokal für Kaliumionenkanäle ein positiveres Umkehrpotenzial gelten. Dies wiederum würde bei gleichbleibender Kanalleitfähigkeit ein kleineres Transistorsignal bewirken. Die in Abb. 5.19 dargestellten Transistorsignaländerungen gelten für eine AP-Frequenz kleiner 2.5 Hz. In 400 msec ist jedoch ein Kaliumion (Diffusionskonstante D_K = 1.96 10^{-5} cm^2/sec) aus einem Spalt mit 40 µm Durchmesser wegdiffundiert [Hille 1982].

Diese einfachen Argumente stützen die Hypothese, dass mit Transistoren extrazellulär die Änderung der Membranionenleitfähigkeit, das „Kurzzeitgedächnis“ der Neurone, detektiert werden kann.

5.6 Zusammenfassung

Die Komponenten der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife konnten auf Halbleiterchips realisiert und charakterisiert werden. Kapazitive Stimulation gewachsener Neurone ist mit positiven sowie negativen Spannungsstufen möglich. Die elektrischen Synapsen wurden über Standardelektrophysiologie ausgewertet, wobei eine relativ hohe Synapsenleitfähigkeit von 20-50% der Zellmembranleitfähigkeit bei den erfolgreichen Signalschleifen gemessen wurde. Die Transistorsignale deuten auf eine relativ homogene Ionenkanalverteilung in der gesamten Zellmembran hin. Bei Neuronen aus dem A-Cluster der Pedalganglien waren die Signale verglichen mit den AP Signalen verzögert, was auf eine geringe Kaliumkanalinhomogenität (5-10%) hinweist. Analysiert man Folgen von Aktionspotenzialen, so findet man sowohl für die stimulierte Auslösung als auch im Transistornachweis die aus elektrophysiologischen Experimenten bekannte Aktionspotenzialdynamik.

6 *Die Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife*

In diesem Kapitel wird die „Elementarzelle“ des Systems Halbleiterchip-neuronales Netz eingeführt - die Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Signalschleife. Einleitend wird ein Beispielexperiment der Signalschleife beschrieben. In Kontrollexperimenten wird gesichert, dass die postsynaptischen Neurone nicht vom Chip aus stimuliert werden sondern nur über die elektrische Synapse vom präsynaptischen Neuron aus. Abschließend werden die wichtigsten Schleifencharakteristika anhand eines elektrischen Ersatzschaltbildes zusammengefaßt.

6.1 Beispielmessung zur Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife

In diesem Abschnitt wird der vollständige Signalweg vom Halbleiter über das neuronale Netz zurück zum Halbleiter illustriert [Zeck 2001a]. Als Beispielmessung wurde das Neuronenpaar aus Abb. 6.1 ausgewählt.

ABBILDUNG 6.1 Synaptisch verbundenes Neuronenpaar (1 und 2) nach zwei Tagen in Kultur. Die Neurone sind über mehrere Neurite verbunden. Die genaue Position der Synapsen ist nicht bekannt. Skalenbalken: 50 µm.

An diesem minimalen Netz ist zwar die genaue Position der Synapse unbekannt, es handelt sich jedoch um eine monosynaptische Verbindung, d.h. eine Verbindung, an der nur zwei Neurone beteiligt sind. Im Unterschied zu stark vernetzten Neuronenverbänden mit vielen beteiligten Zellen, wie in Abb.3.8 dargestellt, tritt bei monosynaptischen Paaren keine spontane Aktivität auf. Spontane Aktivität muß bei der Messung der Signalschleife ausgeschlossen werden, um abzusichern, dass der Signalweg vom Chip aus induziert wird.

In Abb. 6.2a sind fünf Messspuren der Signalschleife dargestellt. Die erste Spur zeigt das Signal, welches an den Stimulator angelegt wurde. Die mittleren Signale geben das Potenzial der freien, nicht adhärierten Zellmembran wieder, welches mit Mikroelektroden gemessen wurde. Links sind die Messungen am präsynaptischen Neuron 1 dargestellt, rechts am postsynaptischen Neuron 2. Die verwendeten Mikroelektroden sind in Abb. 6.1 nicht dargestellt. Die beiden unteren Messungen zeigen das von den prä- und postsynaptischen Transistoren detektierte Signal.

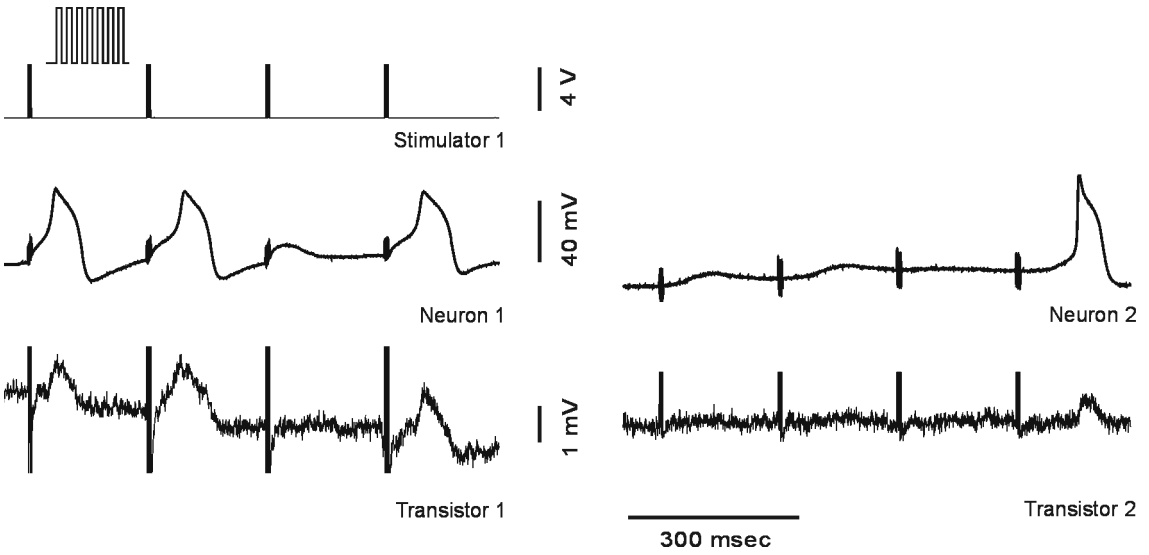


ABBILDUNG 6.2 Messung der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Schleife. Links sind die Messspuren des präsynaptischen Neurons 1 dargestellt, rechts die des postsynaptischen Neurons 2. Die jeweils oberste Spur links entspricht der an den Stimulator 1 angelegten Spannung. Es folgen die intrazellulären Membranpotenziale, darunter die vom Transistor gemessenen extrazellulären Spannungen. Das erste Pulsprotokoll am Stimulator ist vergrößert eingefügt. Die Stimulationsamplitude beträgt 5V, die Pulslänge 0.5 msec.

An Stimulator 1 wird eine Folge von 7 Rechteckpulsen („burst“) angelegt, die zu einer Depolarisation von Neuron 1 führt. Die Depolarisation reicht aus, um ein AP auszulösen, welches mit der Mikroelektrode und Transistor 1 nachgewiesen wird. In Neuron 2 führt dieses AP zu einer postsynaptischen Depolarisation, ohne ein Aktionspotential auszulösen. Der zweite Stimulationsburst an Neuron 1 führt zu einem weiteren AP und einer weiteren Depolarisation von Neuron 2. Ein dritter Stimulationsburst löst kein AP aus, da er in die Refraktärphase des neuronalen Membranpotentials fällt. Ein vierter Burst löst schließlich ein drittes AP in Neuron 1 aus, welches nun auch Neuron 2 soweit depolari-

siert, dass auch hier ein AP ausgelöst wird. Auch dieses AP wird im zugehörigen Transistor nachgewiesen, womit die Signalschleife Silizium-Neuron-Neuron-Silizium geschlossen ist.

Das Stimulationsprotokoll wurde 45 min später wiederholt und ist in Abb. 6.3 dargestellt. Es waren jetzt 11 Rechteckpulse in einem Stimulationsburst nötig, um in Neuron 1 ein AP auszulösen. Nach temporärer Summation von zwei postsynaptischen Potenzialänderungen wird in Neuron 2 ein AP ausgelöst, welches im zugehörigen Transistor nachgewiesen wird. Damit ist gezeigt, dass die Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife über eine lange Zeit erfolgreich gemessen werden kann.

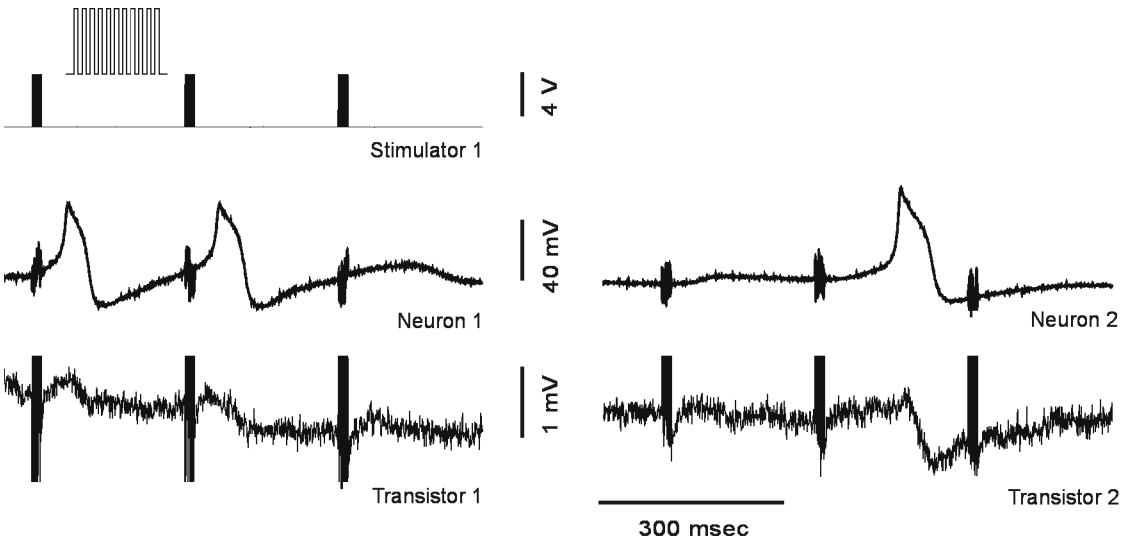


ABBILDUNG 6.3 Messung der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Schleife. Das Experiment wurde 45 min nach dem Experiment aus Abb. 6.2 durchgeführt. Links sind die Messspuren des präsynaptischen Neurons 1 dargestellt, rechts die des postsynaptischen Neurons 2. Die jeweils oberste Spur links entspricht der an den Stimulator 1 angelegten Spannung. Es folgen die intrazellulären Membranpotenziale, darunter die vom Transistor gemessenen extrazellulären Spannungen. Das erste Pulsprotokoll am Stimulator ist vergrößert eingefügt. Die Stimualtionsamplitude beträgt 5V, die Pulslänge 0.5 msec.

Die elektrischen Synapseneigenschaften wurden, wie in Kap. 5 beschrieben, über Mikroelektroden gemessen (siehe Abb.5.13). Dabei wird in Neuron 1 ein hyperpolarisierender Strom injiziert und in beiden Neuronen die Hyperpolarisation des Membranpotenzials über die Mikroelektroden gemessen. Die synaptische Leitfähigkeit betrug für die Synapse in Abb. 6.1 G_{syn} = 2 nS.

6.2 Kontrollexperimente

In Kontrollexperimenten wurde gesichert, dass der beschriebene Weg wie dargestellt zustande kommt. Wenn man Spannungspulse an einen Stimulator, auf dem kein Neuron adhäriert, anlegt, beobachtet man sowohl in der Mikroelektrode als auch in den Transistoren Störsignale (Abb. 6.4). Diese Störsignale führen nicht zur Auslösung eines Aktionspotenzials und sind kein Maß für Änderungen der Spannung über dem Transistorgate. Es gibt eine kapazitive Kopplung im Siliziumchip zwischen der Stimulatorzuleitung und der gemeinsamen Sourcezuleitung für alle Transistoren, da diese Störsignale in allen Transistoren gemessen werden, auch wenn sich kein Neuron über dem Transistor befindet. Auch in den Mikroelektroden mißt man kapazitive Signale, die größer sind, je näher sich die Elektrode am Stimulator befindet. Diese Signale werden auf kapazitive Kopplung über das Bad zurückgeführt.

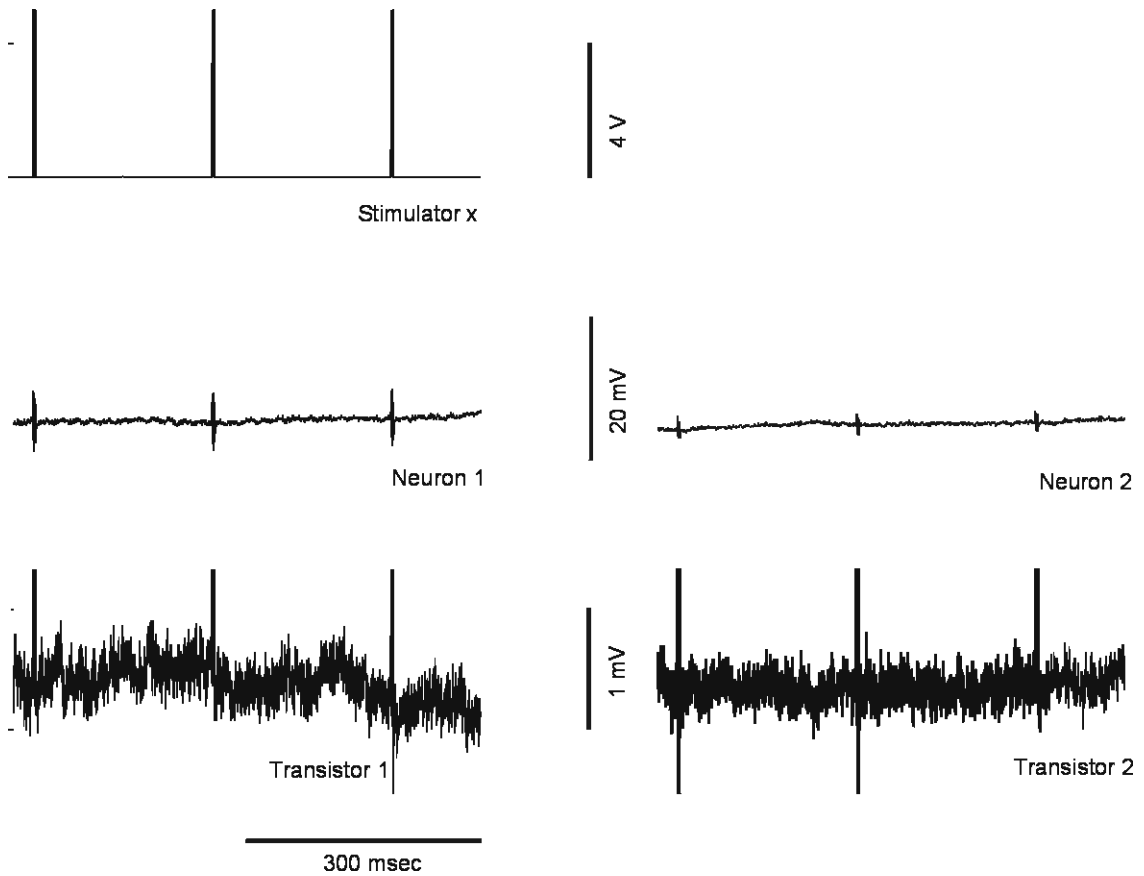


ABBILDUNG 6.4 Werden Stimulationspulse an einen Stimulator x (x = 1,2) angelegt, beobachtet man in den Mikropipetten sowie in den Transistoren unter Neuron 1 und 2 Störsignale, die jedoch nicht zu fälschlicher Detektion eines APs im Transistor führen.

Ein weiteres Kontrollexperiment soll ausschliessen, dass die Störsignale postsynaptisch zur Auslösung eines APs führen. In Abb. 6.5a ist ein zweites Schleifenexperiment gezeigt. In Abb. 6.5b wird statt über kapazitive Stimulation präsynaptisch über intrazelluläre Strominjektion ein AP ausgelöst, dieses wiederum depolarisiert Neuron 2 und dessen Aktivität wird im darunterliegenden Transistor nachgewiesen.

Die in Abb. 6.5 gegenübergestellten Messspuren zeigen eindeutig, dass das postsynaptische Aktionspotenzial nicht durch Reizartefakte ausgelöst wird. Die Zeit zwischen prä- und postsynaptischem AP ist in beiden Experimenten gleich. Auch die Transistorsignale sind ähnlich.

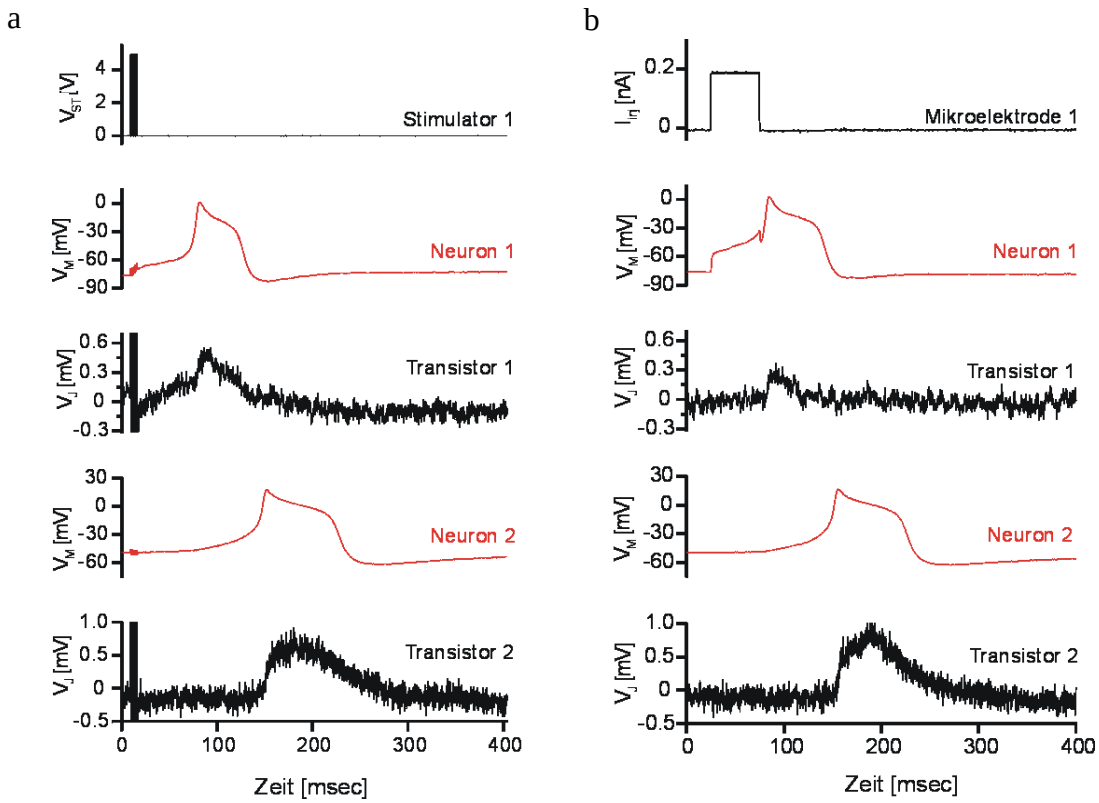


ABBILDUNG 6.5 Kontrollexperiment, um zu zeigen, dass postsynaptisch das AP über die elektrische Synapse und nicht über die Reizartefakte ausgelöst wird. a: Schleifenmessung, b: präsynaptische, intrazelluläre Strominjektion über Mikroelektrode.

6.3 Zusammenfassung der Schleifenexperimente

In Abb. 6.6 ist das elektrische Schaltbild der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife dargestellt. Die Elementarbausteine: der Adhäsionsspalt, die kapazitive Stimulation, die elektrische Synapse sowie die Detektion sind in den vorhergehenden Kapiteln behandelt worden. Die charakteristischen elektrischen Parameter sind: die Spaltleitfähigkeit g_J, das Verhältnis der spezifischen Kapazitäten von Zellmembran und Stimulationsoxid c_M/c_{ox},

die synaptische Leitfähigkeit G_{syn} und die Differenz der spezifischen Ionenleitfähigkeiten in der Adhäsions- und freien Membran g_{JM} und g_{FM}. Mithilfe dieser Größen läßt sich jeder Einzelschritt des Signalwegs verstehen.

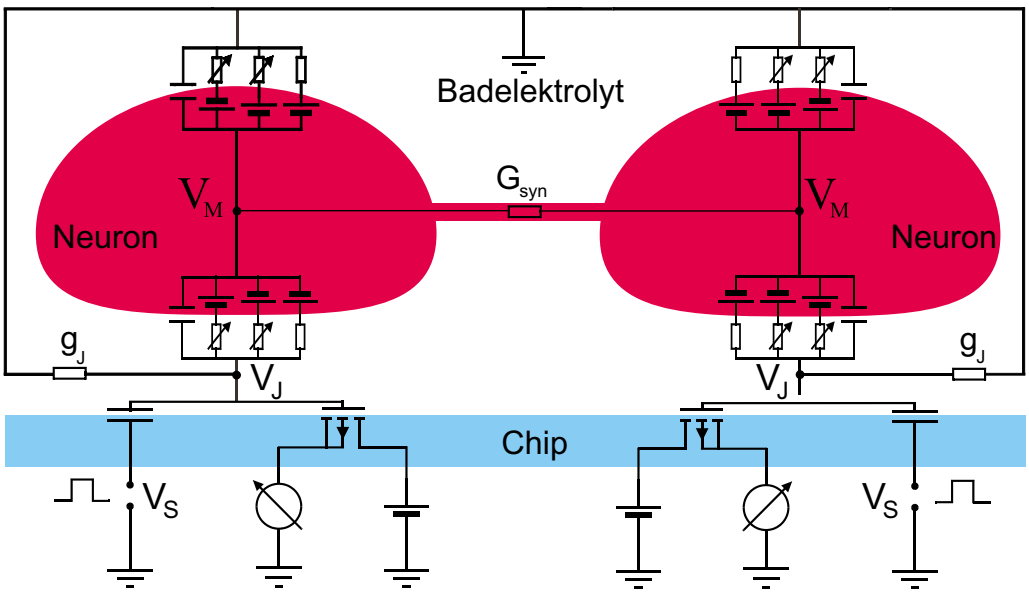


ABBILDUNG 6.6 Elektrisches Ersatzschaltbild der Silizium-Neuron-Neuron-Silizium-Schleife. Man erhält das Schaltbild durch Zusammenfassung der Abbildungen 4.1, 5.1, 5.10 und 5.13.

Insgesamt wurden elf vollständige Silizium-Neuron-Neuron-Silizium Schleifen mit jeweils fünf Signalspuren gemessen. Um im präsynaptischen Neuron Aktionspotenziale auszulösen, mußte die Zahl der **Stimulationspulse** V_S zwischen 1 und 20 variiert werden. Die Amplitude wurde nicht variiert und betrug 5V, die Pulslänge und Zwischendauer waren typischerweise 0.5 Millisekunden. Bedeckte das Neuron beide Stimulatorflügel, waren weniger Pulse nötig. Zum Vergleich wurden Neurone auf Laminin beschichteten Chips kultiviert. Die zur AP-Auslösung benötigte Pulszahl betrug mindestens hundert Pulse. Dies ist wahrscheinlich auf die erhöhte Spaltleitfähigkeit zurückzuführen.

Um über die **elektrische Synapse** im postsynaptischen Neuron ein AP auszulösen, waren zwischen ein und vier präsynaptische APs nötig. Diese Zahl korrelierte nicht mit der Synapsenleitfähigkeit G_{syn}. In Kapitel 5 wurde gezeigt, dass die postsynaptische Membranleitfähigkeit sowie das postsynaptische Ruhepotenzial eine entscheidende Rolle spielen. Ist die postsynaptische Membranleitfähigkeit klein, reicht eine geringere Ladung um die Membranspannung über die Auslöseschwelle für APs anzuheben. Ist das Ruhepotenzial nahe der Schwelle, reicht eine kleine Depolarisation um ein AP auszulösen.

Die Amplitude der prä- und postsynaptischen **Transistorsignale** V_J war 0.3-2 mV. Die Form der Signale war unterschiedlich. Präsynaptisch hatten die Transistorsignale immer

eine positive Amplitude. Diese Signale folgten entweder der AP-Form (6 Schleifen, B-Typ Kopplung) oder waren gegenüber dem AP um 5-25 Millisekunden verschoben (5 Schleifen, C-Typ Kopplung). Das Transistorsignal in Abb. 6.2 für Neuron 1 folgt dem zughörigen AP. Die postsynaptischen Transistorsignale waren positiv (7), negativ (2) oder aber ihre Form wechselte während der Messung von positiv zu negativ (2). Alle postsynaptischen Signale waren gegenüber dem zugehörigen AP zeitlich retardiert. Bei positiven Signalen betrug die Verzögerung zwischen 5-25 msec (Abb. 6.2, Abb. 6.5) bei negativen Signalen 25 msec. In Kapitel 5 wurden verzögerte Transistorsignale auf eine geringe Ungleichverteilung der Kaliumkanäle in Adhäsions- und freier Membran zurückgeführt. Dieser Interpretation folgend, bedeutet das postsynaptische Transistorsignal in Abb. 6.2 eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Kaliumionen in der Adhäsionsmembran, die jedoch nach 45 Minuten (Abb. 6.3) verschwindet bzw. gegenüber der Leitfähigkeit der freien Membran kleiner wird.

7 *Ausblick*

Es wurde in dieser Arbeit erstmals über die Immobilisierung der Zellsomata eine Verbindung eines Halbleiterchips mit einem einfachen biologischen neuronalen Netz hergestellt. Das verwendete System kann zu Langzeitstudien an kleinen Netzwerken von Invertebratenzellen verwendet werden.

Weitere notwendige Voraussetzungen zur Realisierung eines chipüberwachten, „lernenden“ Netzwerks, eines Hopfieldnetzes werden im Folgenden diskutiert.

1. Eine Reduzierung der Komplexität eines biologischen neuronalen Netzes auf ein System mit besser definierten biophysikalischen Eigenschaften erhält man mit topographisch strukturierten neuronalen Netzen. Bei **gerichtetem Neuritenwachstum** kann die Signalfortpflanzung in der Zelle und eventuell über definierte Synapsen nachverfolgt werden. Gerichtetes Neuritenwachstum kann mit strukturierten Proteinbahnen [Prinz 2000b] oder durch die Erweiterung der vorgestellten Methode des mechanischen Immobilisierens [Merz 2001] erreicht werden.

2. Eine notwendige Bedingung für ein biologisches Hopfieldnetz ist die Änderung der Synapsenstärke. Dies ist nur mit **chemischen Synapsen** möglich. In ersten Experimenten konnten in Kultur auf Siliziumchips Neurone von *Lymnaea stagnalis* über eine chemische Synapse verbunden werden. In Abb. 7.1a sind zwei Neurone, RPeD1 und VD2/3, in Soma-Soma-Konfiguration auf einem Chip mit linearen Arrays von Stimulatoren und Transistoren dargestellt. Die elektrophysiologisch gemessene exitatorische Synapse in Abb. 7.1b entspricht den Literaturdaten [Feng 2000]. Existenznachweis der chemischen Synapse ist die fehlende postsynaptische Menbranhyperpolarisation bei hyperpolarisierender präsynaptischer Strominjektion. Der Vorteil der Soma-Soma Konfiguration ist, dass der Beitrag synapsenmodulierender Proteine studiert werden kann, ohne den verfälschenden Einfluß von Wachstumsproteinen, die beim Neuritenwachstum exprimiert werden [Smit 2001]. Man erkennt an diesem Beispiel, wie notwendig die Immobilisierung der Zellsomata, selbst bei Soma-Soma-Konfiguration ist. Eines der Neuronen bedeckt die Transistorgatefläche nach einem Tag in Zellkultur nicht mehr.

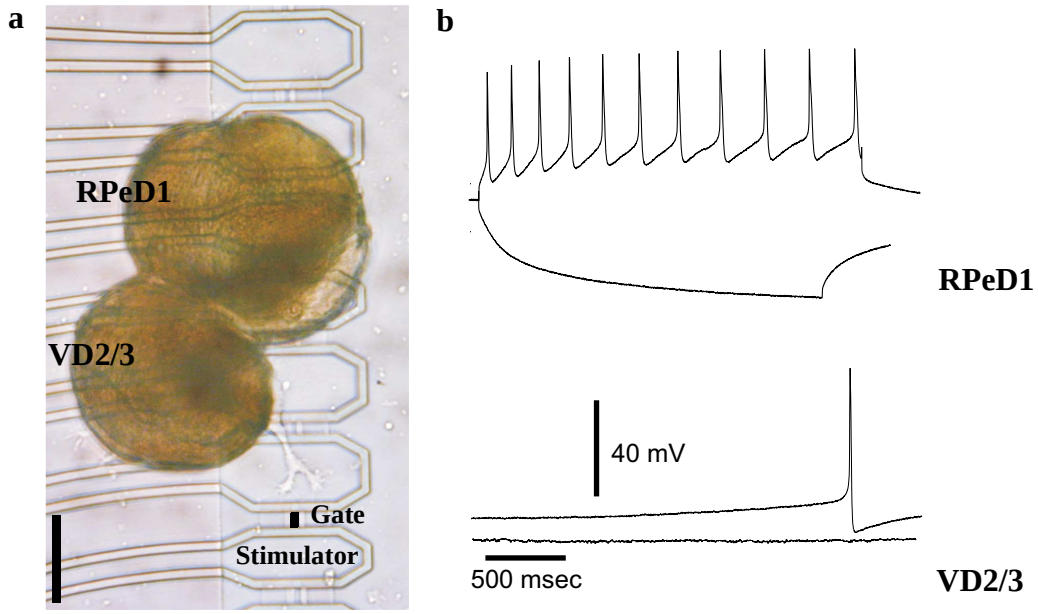


ABBILDUNG 7.1 a: Soma-Soma Konfiguration zweier über eine chemische Synapse verbundene Neurone (RPeD1 und VD2/3) auf einem Chip mit linear angeordneten Stimulatoren und Transistoren. Das geringe bzw. fehlende Neuritenwachstum ist erwünscht, siehe Text. Skalenbalken 40 µm. b: Elektrophysiologischer Nachweis der chemischen Synapse. Hyperpolarisierende Strominjektion in RPeD1 führt zu keiner Potenzialänderung in VD2/3. Depolarisierende Strominjektion löst in RPeD1 einen Aktionspotenzialzug aus, der über die chemische Synapse in VD2/3 ein AP induziert.

3. Ob ein gerichtet gewachsenes Netzwerk mit vielen Neuronen möglich ist, bleibt offen. Eine alternative Methode ein neuronales Netzwerk mit einem Chip zu koppeln, könnte darin bestehen, viel mehr Stimulatoren und Transistoren als Neurone auf einem Chip zu implementieren[5]. Eine notwendige Voraussetzung für eine **erfolgreiche Stimulation** mit kleinen Stimulatorflächen ist jedoch die Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten des verwendeten Isolationsoxids. Es konnte in Vorversuchen zusammen mit [Birkenmaier 2001] eine Reduktion der minimalen Stimulationsspannung auf 1.2 V erreicht werden. Rückschließend kann damit die Stimulatorfläche um den Faktor 3 verkleinert werden.

Bei Verwendung von Chips mit kleineren Transistorgateflächen muß die **Signaldetektion verbessert** werden. Dies könnte durch Chips mit geringerem Rauschen sowie durch genetische Transfektion von Neuronen mit Ionenkanälen, die bevorzugt in der Adhäsionsregion exprimiert sind, erreicht werden [Straub 2001].

5. Halbleitertechnisch bedeutet dies VLSI (very large scale integration) Technologie anzuwenden.

8 *Anhang*

8.1 Chipprozessierung

Im Folgenden werden die einzelnen Prozeßschritte zur Chipherstellung aufgelistet. Obwohl bei Chip 2 Änderungen vorgenommen wurden, waren keine wesentlichen Verbesserungen bezüglich Rauschen der Transistoren oder Übersprechen von kapazitiver Stimulation zum Transistor messbar. Chip 1 bezeichnet das Design mit kreisförmig angeordneten Stimulatoren und Transistoren, bei Chip 2 wurden diese in zwei parallelen Reihen prozessiert.

	Prozeß	**Chip 1**	**Messung**	**Chip 2**
1	Substrat	100 *n*-Silizium, 2-4 Ωcm		100, 2-4 Ωcm
2	Oxidation (Padoxid)	RTP, 1150 °C, N_2, O_2	25 - 30 nm	CT, Trockenoxidation 1000 °C
3	Nitrid abscheiden	CVD, NH_3, Silan, N_2, 300 °C	150 nm	CVD, NH_3, Silan, N_2, 300 °C
4	Maskierung 1 (Aktiv-Gebiete)	Positiv Photolack, Hartkontakt,13'' Belichtung, alkalihaltiger Entwickler		Positiv Photolack, Hartkontakt, 5'' Belichtung, alkalifreier Entwickler
5	Nitrid ätzen	RIE, O_2, CHF_3+O_2, O_2		RIE, O_2, CHF_3+O_2, O_2
6	Oxid entfernen	A-HF 12.5%, 10''		-
7	Implanatation (Channel stop)	Phosphor $10^{12}cm^{-2}$, 30 keV		Phosphor $10^{12}cm^{-2}$, 30 keV
8	Reinigung	Piranha-Lösung		Piranha-Lösung
9	Oxidation (Feldoxid)	CT, Nassoxidation, 1000 °C, 120 '	560 - 625 nm	CT, Nassoxidation, 1000 °C, 120 '
10	Oxid und Nitrid entfernen	3'HF 1%, 50' H_3PO_4 (85%) 160°C		3'HF 1%, 50' H_3PO_4 (85%) 160°C
11	Maskierung 2 (p+ Zuleitungen)	Parameter wie bei Schritt 4		Parameter wie bei Schritt 4
12	Nachentwicklung	RIE 1', O_2 Plasma		-

	Prozeß	Chip 1	Messung	Chip 2
13	Implanatation	Bor, $1.3^{16}cm^{-2}$, 50 keV	16 Ω	Bor, $1.3^{16}cm^{-2}$, 50 keV
14	Photolackstrippen	RIE O_2, 100'-120'		RIE CHF_3+O_2, 40'
15	Passivierungsoxid abscheiden	CVD O_2, 600 nm	580 - 610 nm	CVD O_2, 600 nm
16	Oxid verdichten	CT, 60',1000 °C, N_2	560 - 590 nm	CT, 60',1000 °C, N_2
17	Maskierung 3 (Passivierung)	Parameter wie bei (4)		Parameter bei (4)
18	Nachentwicklung	RIE O_2, 1'		-
19	Oxid ätzen	A-HF 12.5%, 400''		A-HF 12.5%, 400''
20	Photolack entfernen	Piranha-Lösung		Piranha-Lösung
21	Gateoxid aufwachsen	RTP, 1150 °C, N_2, O_2	10 - 12 nm	RTP, 1150 °C, N_2, O_2
22	Maskierung 4 (Gatedefinition)	Parameter wie bei Schritt 4		Parameter wie bei Schritt 4
23	Nachentwicklung	RIE O_2, 1'		-
24	Implanatation	Bor, $5^{15}cm^{-2}$, 25keV	28 Ω	Bor, $5^{15}cm^{-2}$, 25keV
25	Photolack entfernen	Aceton + Ultraschall		Aceton 2h, Aceton + Ultraschall 15'
26	Aktivierung	RTP, 1100 °C, N_2		RTP, 1100 °C, N_2
27	Maskierung 5 (Metallisierung)	Parameter wie bei (4)		Parameter wie bei (4)
28	Nachentwicklung	RIE 1' O_2		-
29	Kontaktfenster ätzen	A-HF 12,5%, 30''		A-HF 12,5%, 30''
30	Metallisieren	Al reinst, therm. Verdampfen	50 -70 nm	Al-Si-Sputtern
31	Photolack entfernen	Aceton + Ultraschall		Aceton + Ultraschall
32	Legieren	RTP, 450 °C, N_2		RTP, 450°C, H_2
33	Polyimid aufschleudern	Probimide HTR3-200, 700 U/min		
34	Prebaking	4 h, 40° - 80°C		
35	Maskierung 6 (Käfige)	Soft contact, 90'' Belichtung		
36	Entwicklung	Spray-Entwicklung, HTR-D2, Isopropanol		
37	Hardbaking	4h, 300 °C, N_2	40 - 50 µm	
38	Chips sägen			

TABELLE 1. Zusammenfassung der Prozeßführung zur Herstellung der Stimulator-Transistor-Chips. Die zweite Spalte gibt die Prozeßparameter für die erste Chipcharge an, die rechte Spalte für die zweite Chipcharge. Verwendete Abkürzungen: RTP: Oxidationsofen für schnelle thermische Prozesse, CT: Quarzrohrofen, CVD: *chemical vapour deposition* (chemische Abscheidung aus der Gasphase), RIE: *reactive ion etching* (reaktives Ionenätzen), A-HF: gepufferte Flußsäure. Der Positivphotolack ma-P 1215 wurde von microresist technologies, Berlin bezogen. Das Polyimid und der Entwickler wurde von Olin GmbH, München bezogen.

8.2 Zellkultur: Lösungen und Pipetten

Antibiotic Saline (ABS)

Die Schneckenpräparation sowie das Spülen der Hirne wurde in folgender Salzlösung durchgeführt:
NaCl 51.3 mM, KCl 1.7 mM, $CaCl_2$ 4.1 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, HEPES 5 mM, Gentamicin 150 mg/l in Reinstwasser (Millipore) bei pH 7.9. Alle Chemikalien waren von Sigma, Deisenhofen.

Definiertes Medium (DM)

Das Zellkulturmedium, ohne Wachstumsfaktoren, besteht aus:
NaCl 40 mM, KCl 1.7 mM, $CaCl_2$ 4.1 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM sowie allen Inhaltsstoffen von Leibovitz L-15 Medium bei halber Konzentration. Dieses Medium wurde von PAN Systems, Aidenbach bezogen. Vor Ansetzen der Zellkultur wurden 150 mg/l Glutamin (K0202, Biochrom KG, Berlin) sowie 20 mg/l Gentamicin zugegeben.

Hochosmolares DM

Zur Isolation der Schneckenneurone wurde HODM verwendet, bestehend aus DM und D-Glucose (Sigma) 30 mM. Die Verwendung von HODM führt zu einer geringfügigen Schrumpfung der Zellen und vermindert die Verletzung der Zellmembran bei der Neuronenisolation.

Enzyme

Die extrazelluläre Matrix zwischen den Neuronen im Ganglion wird mit folgenden Enzymlösungen für 30 Minuten verdaut: Trypsin (T-4665, Sigma): 0.67 g/l, Collagenase/Dispase (Boehringer Mannheim): 1.33 g/l. Die Enzymaktivität wird mit Trypsin Inhibitor (T 9003, Sigma), 0.67 g/l innerhalb von 15 Minuten gestoppt.

Poly-L-Lysin Beschichtung: Die Chips wurden nach Piranha-Säuberung und UV-Sterilisation (20 min) mit einer 1g/l Poly-L-Lysin Lösung (TRIS/HCl 0.15M, pH 8.4) für 4 h beschichtet. Es wird PLL (P6516, Sigma) mit 10 kDa Molekulargewicht verwendet. Vor der Zellkultur wurden die Chips mit sterilem Reinstwasser (15 min), mit ABS (15 min) und nochmals mit sterilem Reinstwasser (15 min) gespült. Vor dem Füllen der Kulturschalen mit DM wurden die Chips getrocknet.

Laminin Beschichtung: Die Chips wurden nach Piranha-Säuberung silanisiert (2% Dichlordimethylsila in Toluol). Nach UV-Sterilisation (20 min) wurden die Chips mit einer 10µg/ml Laminin-Lösung (L-2020, Sigma; Phosphatpuffer, pH 7.4) für 4h bei 4°C beschichtet. Vor der Zellkultur wurden die Chips mit DM gespült (15 min).

Pipetten

Saugpipetten zur Isolation der Neurone wurden aus nichtheparinisierten Glaskapillaren (Hämatokritglas, No564 Assistent) an einem DMZ-Universalpuller (Zeitz, Augsburg) mit einem „Multi-Pull-Programm“ gezogen (Öffnungsdurchmesser 100 µm). Mikroelektroden wurden aus Borsilikatglaskapillaren (No. 1403547, Hilgenberg, Malsfeld) an obigem Zeitzpuller mit einem Single-Pull Programm gezogen und mit 4 M K-Acetat Lösung befüllt.

8.3 Vesikelpräparation

Riesenlipidvesikel wurden nach der Methode des Elektroquellens hergestellt. Die Membran besteht aus POPC (Palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-choline, Avanti Polar Lipids, Alabaster), Cholesterin (Sigma) und $DiIC_{18}$ (Molecular Probes) im Molverhältnis 160:40:1. Zur Herstellung wurden POPC, Cholesterin und $DiIC_{18}$ in Diethylether/ Methanol (v/v 9/1) gelöst. 5 µl dieser Lösung wurden auf ein Paar planarer ITO-(Indium-Zinn-Oxid)-Elektroden gespreitet. Die Elektroden waren mit 70 nm aufgesputtertem Siliziumdioxid isoliert. Nach Vakuumtrocknung wurde eine 300 mM Saccharoselösung zugegeben und für 2 h eine 10 Hz Wechselspannung (beginnend mit 0.1 mV bis 3 V Amplitude) angelegt. Die Vesikel wurden von den Elektroden mit einer Wechselspannung von 4Hz (20 min), 1Hz (10 min), 0.1 Hz (10 min) gelöst. Die Saccharoselösung wurde in Glucoselösung (300 mM) in Petrischalen (35001, Falcon) übergesetzt und innerhalb von 24 h verwendet.

8.4 Zellpräparation für Elektronenmikroskopieaufnahmen

1. Fixierung der Zellen

Es wurde ein nichtkontaktierter Chip in einer Glaspetrischale verwendet, auf dem Zellen gewachsen sind. Das Kulturmedium wurde gegen folgende Fixierlösung ausgetauscht, die innerhalb von 45 min die Zellmembranproteine polymerisiert: 1 ml Glutaraldehyd (Sigma), 4.2 ml ABS (Rezept weiter oben), 4.2 ml Milli-Q Wasser (Millipore).

2. Dehydratation der Zellen

Bei der Dehydratation wurde die Fixierlösung gegen waaserfreies Aceton ausgetauscht. Folgende Schritte wurden im 10-Minutentakt durchgeführt: a) Ethanol 30 %, b) Ethanol 50 %, c) Ethanol 80 %, d) Ethanol 90 %, e) Ethanol 95 %, f) Ethanol 100 %, g) Ethanol 100 % / Aceton 3/1 v/v, h) Ethanol/Aceton 1/1, i) Ethanol/Aceton 1/3, j) Aceton. Sowohl Ethanol als auch Aceton wurden steril filtiert.

3. Kritisch Punkt Trocknung

In diesem Schritt wurde im Kritisch-Punkt-Trockner (Polaron, Watford, UK) das Aceton im Innern der Zelle gegen CO_2 ausgetauscht. Dies geschieht bei Druck (p = 80 bar) und Temperatur (T = 32 °C) oberhalb des kritischen Punkts für CO_2, bei dem der Übergang flüssig-gasförmig ohne Energieübertrag erfolgt. Das feste Präparat wurde vor dem Einbau ins Rasterelektronenmikroskop (SM 300, Topcon, Tokio) mit 6 nm Gold bedampft.

8.5 Abkürzungsverzeichnis

AP: Aktionspotenzial

FLIC: Fluoreszenzinterferenz Kontrast

V_J: Spannung zwischen Adhäsionsspalt und Badelektrolyt

V_M: Spannung zwischen Zellinnerem und Badelektrolyt

V_{JM}: Spannung zwischen Zellinnerem und Adhäsionsspalt

V_S: Spannung zwischen Stimulator und Adhäsionsspalt

PLL: Poly-L-Lysin

Literaturverzeichnis

Albersdörfer, A., Feder, T. und Sackmann, E. (1997) *Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short range attraction force: a model membrane study*, Biophys.J. **73**, 245 - 257

Aldrich, R.W., Getting, P.A. und Thompson, S.H. (1979) *Inactivation of delayed outward current in molluscan neurone somata*, J.Physiol. **291**, 507-530

Aldrich, R.W., Getting, P.A. und Thompson, S.H. (1979) *Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes*, J.Physiol. **291**, 531-544

Beck, K., Hunter, I. und Engel, J. (1990) *Structure and function of laminin:anatomy of a multidomain glycoprotein*, FASEB J. **4**, 148-160

Benz, R., Beckers, F. und Zimmermann U. (1979) *Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study*, J.Mem.Biol. **48**, 181-204

Birkenmaier, T. (2001) *Dünne Schichten mit hoher DK zur Optimierung von Neurochips*, Diplomarbeit, TU München

Bodmer, R., Verselis, V., Levitan, I.B. und Spray, D.C. (1988) *Electrotonic synapses between Aplysia neurons in situ and in culture: Aspects of regulation and measurement of permeability*, J.Neurosci. **8**, 1656-1670

Braun, D. und Fromherz, P. (1997) *Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon*, Appl.Phys.A **65**, 341-348

Braun, D. (2000) *Capacitive Stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes*, Dissertation, TU München

Braun, D. und Fromherz, P. (2001) *Fast voltage transients in capacitive Silicon-to-cell stimulation detected with a luminescent molecular electronic probe*, Phys.Rev.Lett **86**, 2905-2908

Bruinsma, R. (1995) *Adhesion and rolling of leukocytes: a physical model*, in: Physics of Biomaterials NATO ASI Ser. **332**, 61-75, Hrsg. Riste T. und Sherrington D.

Connor, J.A. und Stevens, C.F. (1971) *Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma*, J.Physiol. **213**, 31-53

Dimitrov, D.S. und Angelova, M.I. (1988) *Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields*, Bioelectrochem. Bioenerg.**, 19,** 323-336

DeFelipe, J. und Jones, E.G. (1988) *Cajal on the cerebral cortex - An annotated translation of the complex writings*, Oxford University Press

Feng, Z.-P., Hasa, S.U., Lukowiak, K. und Syed, N.I. (2000) *Target cell contact supresses neurite outgrowth from soma-soma paired Lymnaea neurons*, J.Neurobiol. **42**, 357-369

Fromherz, P., Offenhäuser, A., Vetter, T. und Weis, J. (1991) *A neuron-silicon junction: A Retzius-cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor*, Science **252**, 1290-1293

Fromherz, P., Müller, C.O. und Weis, R. (1993) *Neuron-transistor:electrical transfer function measured by the patch-clamp technique*, Phys.Rev.Lett **71**, 4090-4092

Fromherz, P. und Stett, A. (1995) *Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an individual neuron on a silicon chip*, Phys.Rev.Lett. **75**, 1670-1673

Fromherz P. (1999a) *Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane*, Eur.Biophys.J. **28**, 254-258

Fromherz, P., Kiessling, V., Kottig, K. und Zeck, G. (1999b) *Membrane-Transistor with Giant Lipid Vesicle touching a silicon chip*, Appl.Phys.A **69**, 571-576

Gera, S. und Byerly, L. (1999) *Voltage- and calcium-dependent inactivation of calcium channels in Lymnaea neurons*, J.Gen.Physiol. **114**, 535-550

Gleixner, R. und Fromherz, P. (2001) *Characterisation of the cell-silicon junction by fluorescent voltage-sensitive dyes*, 7th Conference on methods and applications of fluorescence, Amsterdam

Gross, G.W., Rieske, E., Kreutzberg, G.W. und Meyer,A. (1977) *A new fixed-array multimicroelectrode system designed for long-term recording of extracellular unit activity in vitro*, Neurosci. Lett. **6**, 101-105

Grove, A.S., Snow, E.H., Deal, B.H. und Sah, C.T. (1964) *Simple physical model for the sapce-charge capacitances of metal-oxide-semiconductor structures*, J.Appl.Phys. **35**, 2458-2460

Hille, B. (1982) *Ionic channels of exitable membranes*, 2. Aufl., Sinauer Verlag

Hodgkin, A.H. und Huxley, A.F. (1952) *A quantitative description of membrane current and ist application to conductance and exitation in nerve*, J.Physiol. **117** 500-544

Hopfield, J.J. (1982) *Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities,* Proc.Natl.Acad.Soc. USA **79,** 2554 - 2558

Hübener, G. und Fronherz, P. (2001) in Vorbereitung

Jenkner, M. und Fromherz, P. (1997) *Bistability of membrane conductance in cell adhesion observed in a neuron transistor,* Phys.Rev.Lett. **79**, 4705-4708

Jenkner, M. (1999) *Hybride Netzwerke aus Neuronen von Lymnaea stagnalis und Silizium-Chips*, Dissertation, TU München

Jenkner, M., Müller, B. und Fromherz, P. (2001) *Interfacing of a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapse*, Biol.Cybern. **84**, 239-249

Kießling, V. (1999) *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazellulär angelegten Wechselspannungen*, Dissertation, TU München

Kiessling, V., Müller, B. und Fromherz, P. (2000) *Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe*, Langmuir **16**, 3517-3521

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A. und Doroshenko, P.A. (1975) *Outward currents in isolated snail neurons - I. Inactivation kinetics,* Comp.Biochem.Physiol. **51C**, 259-263

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A. und Shakhovalov, Y.A. (1977) *Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusk neurones*, J.Physiol. **270**, 545-568

Kostyuk, P.G. (1984) *Intracellular perfusion of nerve cells and its effects on membrane currents*, Physiological Reviews **64**, 435-454

Kuhn, B. (2001) *Messungen von Aktionspotentialen in Dendriten von kultivierten und gentechnisch veränderten Hippocampusneuronen mit spannungssensitiven Farbstoffen*, Dissertation, TU München

Kyriakides, M., McCrohan, C.R., Slade C.T., Syed, N.I. und Winlow, W. *The morphology and electrophysiology of the neurons of the paired pedal ganglia of Lymnaea stagnalis (L.),* Comp.Biochem.Physiol. **93A**, 861-876

Lambacher, A. und Fromherz, P. (1996) *Fluorescence interference-contrats microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer*, Appl.Phys.A **63**, 207-216

Lambacher, A. und Fromherz, P. (2001) *Luminescence of dye molecule on oxidized silicon and fluorescence interference contrast (FLIC) microscopy of biomembranes*, J.Opt.Soc.Am.B. *in Druck*

Magoski, N.S., Syed, N.I. und Bulloch, G.M. (1994) *A neuronal network from the mollusc Lymnaea stagnalis*, Brain Research **645**, 201-214

Maher, M.P., Pine, J., Wright, J. und Tai, Y.C. (1999) *The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons,* J.Neurosci.Meth. **87**, 45-56

Matsumoto, T. und Inoue, H. (1993) *Small-angle x-ray-scattering and viscoelastic studies of the molecular shape and colloidal structure of bovine and rat serum albumins in aqueous systems,* Chemical Physics **178**, 591-598

Merz, M. und Fromherz, P. (2001) *Polyester microstructures for topographical control of outgrowth and synapse formation with snail neurons,* Adv. Materials, in Druck

Neher, E. (1972) *Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons,* J.Gen.Physiol. **58**, 36-53

Novak, J.L. und Wheeler, B.C. (1986) *Recording from the Aplysia abdominal gangkion with a planar microelectrode array,* IEEE Trans. Biomed. Eng. **33**, 196-202

Pine, J. (1980) *Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes,* J.Neurosci.Methods **2**, 19-31

Prinz, A.A. und Fromherz, P. (2000a) *Formation of electrical synapses by guided growth of cultured neurons from the snail Lymnaea stagnalis,* Biol.Cybern. **82**, L1-L5

Prinz, A.A. (2000b) *Towards defined networks: Guided growth, cable transmission and electrical synapses of cultured snail neurons,* Dissertation, TU München

Rädler, J.O., Feder, T.J., Strey, H.H. und Sackmann, E. (1995) *Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates,* Phys. Rev. E. **51**, 4526-4536

Rentschler, M. und Fromherz, P. (1998) *Membrane-Transistor Cable,* Langmuir **14**, 547-551

Ridgeway, R.L., Syed N.I., Lukowiak, K. und Bulloch, A.G.M. (1991) *Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail Lymnaea stagnalis,* J. Neurobiol. **22**, 377-390

Ryttsen, F., Farre, C., Brennan, C., Weber, S.G., Nolkrantz, K., Jardemark, K., Chiu, D.T. und Orwar, O. (2000) *Characterization of single-cell electroporation by using patch-clamp and fluorescence microscopy,* Bioph.J. **79**, 1993-2001

Schätzthauer, R. und Fromherz, P. (1998) *Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic channels,* Eur.J.Neurosci. **10**, 1956-1962

Seifert, U. (1997) *Configurations of fluid membranes and vesicles,* Adv. Physics **46**, 13-137

Smit, A.B., Syed, N.I. et al. (2001) *A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission,* Nature **411**, 261-268

Spencer, G.E., Syed, N.I., Lukowiak, K. und Winlow,W. (1996) *Halothane affects both inhibitory and excitatory synaptic transmission at a single identified molluscan synapse, in vivo and in vitro,* Brain Research **714**, 38-48

Stett, A., Müller, B. und Fromherz, P. (1997) *Two way silicon-neuron interface by electrical induction,* Phys.Rev.E **55**, 1779-1782

Straub, B., Meyer, E. und Fromherz, P. (2001) *Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of neuro-electronic interfacing*, Nature Biotech. **19**, 121-124

Syed, N.I. und Winlow,W. (1989) *Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in Lymnaea stagnalis (L.),* Comp.Biochem.Physiol. **93A**, 633-644

Syed, N.I., Bulloch, A.G.M. und Lukowiak, L. (1990) *In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk Lymnaea,* Science **250**, 282-285

Tillotston, D. (1979) *Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons*, Proc.Natl.Acad.Soc. USA **76**, 1497-1500

Ulbrich, M. (1999) *Selbsterregung eines Blutegelneurons durch Siliziumchip,* Diplomarbeit, TU München

Vassanelli, S. und Fromherz, P. (1999) *Transistor probes local potassium conductances in the adhesion region of cultured rat hippocampal neurons,* J.Neurosci. **19**, 6767-6773

Weis, R. und Fromherz, P. (1997) *Frequency dependent signal transfer in neuron transistors*, Phys.Rev.E **55**, 877-889

Wildering, W.C., Hermann, P.M. und Bulloch, A.G.M. (1998) *Neurite Outgrowth, RGD-dependent, and RGD-independent adhesion of identified molluscan motoneurons on selected substrates*, J.Neurobiol. **35**, 37-52

Wilson, R.J.A., Breckenridge, L., Blackshaw, S.E., Connolly, P., Dow, J.A.T., Curtis, A.S.G. und Wilkinson, C.D.W. (1994) *Simultaneous multisite recordings and stimulation of single isolated leech neurons using planar extracellular electrode arrays*, J. Neurosci.Meth. **53**, 101-110

Wong, R.G., Hadley, R.D., Kater, S.B. und Hauser, G.C. (1981) *Neurite outgrowth in molluscan organ and cell cultures: The role of conditioning factor(s),* J.Neurosci. **1**, 1008-1021

Zeck, G. (1997) *Adhäsion von Lipidvesikeln auf Siliziumchips,* Diplomarbeit, TU München

Zeck, G. und Fromherz, P. (2001a) *Noninvasive neuroelectronic interfacing of synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip,* Proc.Natl.Acad.Soc. USA **98**, 10457 - 10462

Zeck, G. und Fromherz, P. (2001b) *Giant lipid vesicles probe steric repulsion by Laminin in cell adhesion* in Vorbereitung

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Peter Fromherz für die gute Betreuung dieser Arbeit. Er hat mich gelehrt, in der Biophysik möglichst exemplarische Experimente zu definieren und zu realisieren.

Max Ulbrich und Helge Vogl für die Einführung in die Reinraumarbeit und den ersten Chipmaskensatz (M.U.).

Martin Jenkner für die Einführung in die Präparation von *Lymnaea stagnalis* und in die Meßapparatur.

Raimund Gleixner für die Hilfe bei der Bestimmung der Spaltleitfähigkeit.

Anne Zeck, Matthias Merz und Raimund Gleixner für das Korrekturlesen der Arbeit.

Tamara Birkenmaier und Dieter Braun für manch lebensphilosophische Lernstunde.

Den Kollegen der Abteilung Membran und Neurophysik für eine gute Zeit hierin.

Dank gilt schließlich meiner großen Familie für die dauerhafte, kritische Unterstützung.