

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

Hybride Netzwerke aus Neuronen von *Lymnaea stagnalis* und Silizium-Chips

Martin Jenkner

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 4. November 1999 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 16. November 1999 angenommen.

Inhalt

1. EINLEITUNG	9
2. MODELLIERUNG DES NETZWERKS	13
2.1 Neurone	13
2.1.1 Zellmembran	13
2.1.2 Zwei-Kompartiment-Modell	16
2.2 Neuro-Chip-Kontakt	17
2.3 Zwei-Neurone-Netzwerk	19
2.4 Reizung neuronaler Aktivität	21
2.4.1 Positive Einzelflanken	22
2.4.2 Negative Einzelflanken	24
2.4.3 Rechteckpulse	28
2.5 Detektion neuronaler Aktivität	29
2.5.1 Passiver Kontakt	29
2.5.2 Aktiver Kontakt	31
2.6 Signalübertragung mit zwei Neuronen	35
3. CHIPDESIGN	43
3.1 Eigenschaften realer, neuronaler Netze	43
3.2 Die Einzelschnittstellen	45
3.3 Die bidirektionale Struktur	48
3.4 Die Gesamtstruktur	50
4. NEURONE	54
4.1 Lymnaea stagnalis	57
4.1.1 Nervensystem	59
4.2 Präparation	63
4.2.1 Vorbereitungen	63
4.2.2 Hirne isolieren	64
4.2.3 Neurone entnehmen	67

5. KULTUR	72
5.1 Wachstumsbedingungen	72
5.2 Zellpositionierung	74
6. MESSAPPARATUR	78
6.1 Mechanischer Aufbau	78
6.2 Datenaufnahme	80
6.3 Brückenverstärker	82
6.4 Der Chip	83
6.4.1 Aufbau	83
6.4.2 Ansteuerung	83
6.5 Messablauf	86
6.5.1 Zellpenetration	87
7. RESULTATE UND DISKUSSION	90
7.1 Wachstum von Neuronen auf Chips	90
7.2 Reizung von Neuronen	95
7.2.1 Anregung mit Flanken	95
7.2.2 Anregung mit Rechteckpulsen	97
7.3 Detektion von Neuronen	101
7.3.1 Verarmung	101
7.3.2 Anreicherung	104
7.3.3 Leckdominanz	105
7.4 Lokale Schleifen	106
7.5 Die Dynamik des Neuro-Chip-Kontakts	110
7.5.1 Spontane Veränderungen	110
7.5.2 Veränderungen durch Chipeinfluss	112
7.5.3 Langzeitverhalten	125
7.6 Synapsen	130
7.6.1 Schwache, postsynaptische Potentiale	131
7.6.2 Postsynaptische Aktionspotentiale	131
7.6.3 Durchgriff der präsynaptischen Strominjektion	135
7.6.4 Dritte Neurone	138

7.6.5 Spontan feuernde Neurone	139
7.7 Hybride Wege	141
7.7.1 Die elementaren Wege	142
7.7.2 Kombinierte Wege	154
7.7.3 Vollständige Wege	161
8. ZUSAMMENFASSUNG	166
A. Chipherstellung	168
B. Präparation	170
C. Numerische Modellierung des Netzwerks	173
Literatur	175

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften hybrider Netzwerke aus in vitro gezüchtetem, neuronalen Gewebe auf Siliziumchips untersucht.

Dazu wurde eine Einzelzellkultur aus Neuronen der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis* aufgebaut und auf Halbleiterseite ein Chip entworfen, der angepasste Stimulations- und Detektionsstrukturen zur bidirektionalen Kontaktierung enthält.

Die Neurone konnten von Hand so exakt auf den Kontaktstrukturen positioniert werden, dass eine zuverlässige Grundlage für den Aufbau geometrisch definierter Netze geschaffen wurde. Sie bildeten in Kultur Synapsen aus und ermöglichten somit die Übertragung neuronaler Aktivität innerhalb des Netzwerks. Die erfolgreiche Stimulation und Detektion der Neurone zeigte, dass die Synaptogenese während der Wachstumsphase weder die Stimulations- noch die Detektionsfähigkeit verhindert.

Die Transistorsignale können umfassend mit dem Zwei-Kompartiment-Modell interpretiert werden. Sie zeigen fast ausnahmslos, dass die Kontaktmembran eines gewachsenen Neuro-Chip-Kontakts spannungsabhängige Ionenkanäle enthält. Außerdem konnte durch die qualitative Analyse der Transienten die Dynamik des Neuro-Chip-Kontakts besonders unter dem Einfluß von Stimulationspulsen verfolgt werden.

Die Folgen einer kapazitiven Stimulation decken einen breiten Bereich ab. Er reicht von der Auslösung von Aktionspotentialen über die Manipulation der Aktionspotentialform bis zur Zerstörung der Kontaktmembran. Hier besteht noch der Bedarf an einem Stimulationsmodell, das nicht nur die vorhandenen Ergebnisse interpretiert, sondern in Zukunft als Leitfaden zur Wahl optimaler Reizpulse dienen kann.

Es wurden die elementaren Kombinationen der Neuro-Neuro- und der Neuro-Chip-Schnittstellen sowie komplexere Situationen mit dem mehrfachen Durchlauf einer Schnittstelle belegt. Dabei zeigte sich, dass ein Zwei-Neuronen-System die volle Funktionalität eines hybriden Netzes aufweisen kann. Es ist jedoch zu erwarten, dass ein Netz aus mehreren Neuronen aufgrund der vermehrten synaptischen Eingänge an den Neuronen die Wahrscheinlichkeit eines postsynaptischen Aktionspotentials und damit die Detektierbarkeit durch den Chip erhöht.

Die Entwicklung des neuronalen Gewebes zeigte eine starke Dynamik mit der Tendenz den Neuro-Chip-Kontakt durch Abwanderung der Neurone zu trennen. Hier könnte eine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche die definierte Anordnung der Somata aufrecht erhalten. Für das weitere Verständnis hybrider Netze ist diese Entwicklungsphase von großem Interesse. Wie die mikroelektrodenfreien Messungen über mehrere Stunden andeuten, scheint der non-invasive Einsatz von Halbleiterstrukturen dafür gut vorbereitet zu sein.

Kapitel 1

Einleitung

Mit der zunehmenden Leistungsfähigkeit von Computern stellt sich oft die Frage, ob und wann die Fähigkeiten eines Computers mit denen des menschlichen Gehirns vergleichbar sein werden oder ob sie es nicht gar schon sind. Ein Grund, wieso keine einfache Antwort darauf gegeben werden kann liegt in der Komplexität des Gehirns, die eine Analyse sehr schwer macht. Schon die frühen histologischen Untersuchungen von Hirnschnitten, die Ramón y Cahal vor hundert Jahren gemacht hat, zeigen trotz selektiver Anfärbung eine unüberschaubare Komplexität.

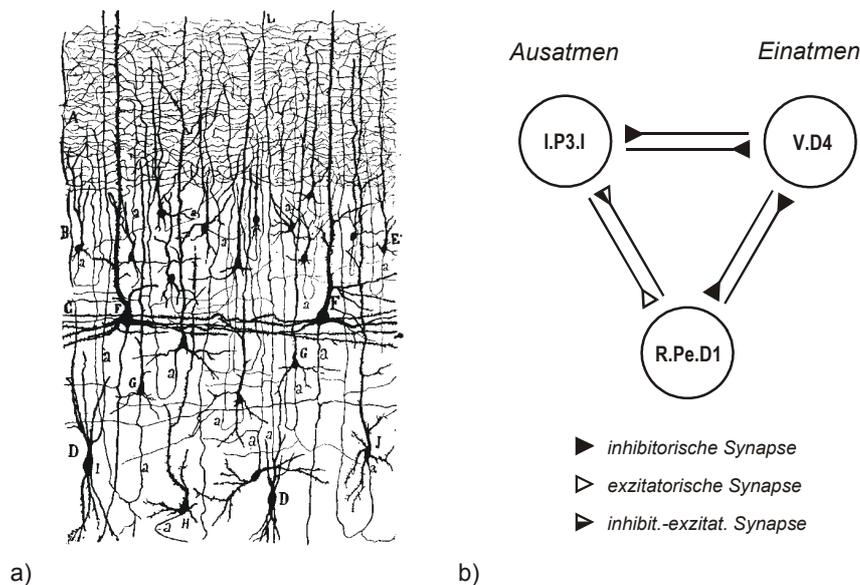


Abbildung 1.1: Komplexität und Einfachheit neuronaler Netze. a) Anfärbung eines Schnitts durch den visuellen Cortex von Ramón y Cahal 1899. (nach [15]) b) Die drei Neurone des Central Pattern Generator, der in *Lymnaea stagnalis* den Atemrhythmus erzeugt. Beim Einatmen und Ausatmen ist jeweils nur ein Neuron aktiv. (Schema nach [21])

In die Doktrin vom Neuron aus den zwanziger und die Modellierung des Aktionspotentials aus den fünfziger Jahren ist die Vorstellung eingeflossen, dass das Nervensystem räumlich und funktional in kleine Einheiten zerlegbar ist, die sich in allen Spezies wiederfinden. Dies erleichtert zwar theoretische Modelle, doch der simultane, experimentelle Zugang zu den ungefähr

10^{11} einzelnen Neuronen eines Gehirns [43] scheint derzeit undenkbar. Traditionelle Techniken wie intrazelluläre Ableitung, die an einzelnen Neuronen erfolgreich sind, scheitern aus apparativen Gründen, wenn die Aktivität von nur 10^1 Neuronen gleichzeitig beobachtet werden soll.

Ein Ansatz dieses Problem zu lösen ist die Beobachtung von Untereinheiten eines Gehirns oder von sehr einfachen Nervensystemen. Besonders attraktiv sind Central Pattern Generators (CPG). Diese neuronalen Subsysteme erzeugen Aktivitätsmuster die für die Ansteuerung rhythmischer Bewegungsvorgänge wie Atmen, Kauen oder Fortbewegung verantwortlich sind. In den Nervensystemen von Invertebraten wie Blutegel, Schnecken oder Hummern wurden einzelne Neurone identifiziert, die zusammen einen CPG bilden [39], [16]. Eine einfache Form eines CPG ist ein Oszillator, in dem zwei Neurone abwechselnd feuern. Diese neuronalen Kleinstnetzwerke können auch *in vitro* rekonstruiert werden [22], [21], [2].

Auf der apparativen Seite besteht durch die Entwicklung von dichten Anordnungen extrazellulärer Detektoren, wie Metallelektrodenarrays [19], [29] die Möglichkeit das Ungleichgewicht zwischen der Zahl der zu vermessenden Neurone und Zahl der Messsonden zu verbessern. Einen besonderen Platz unter den planaren, extrazellulären Systemen hat der Einsatz von Halbleiterstrukturen in Siliziumtechnik eingenommen. Mit einer bidirektionalen Kombination von Feldeffekttransistoren und Reizstrukturen können einzelne Neurone detektiert und stimuliert werden [41]. Neben der Kontaktierung eines neuronalen Gewebes auf Einzelzellebene kann mit dieser Technik von den Fortschritten der industriellen Miniaturisierung profitiert werden. So wurde bereits ein Array aus 2048 Detektionsstellen in CMOS-Technologie verwirklicht, denen jeweils ein Vorverstärker integriert ist [5]. Durch den Einsatz von Chips mit kundenspezifischem Design (ASIC) konnte ein hybrider Oszillator aus einem Neuron und einem Chip aufgebaut werden [44]. Die Miniaturisierungsfähigkeit der Feldeffekttransistoren konnte auch ausgenutzt werden um mit einer dichten Anordnung von mehrerer Transistoren unter einem Neuron ein allgemeines Modell zu entwickeln, das Neuro-Substrat-Kontakte beschreibt [47], [10].

Die erfolgreiche Stimulation und Detektion eines Einzelneurons durch Halbleiterstrukturen eröffnet einen konstruktiven Ansatz zum Verständnis neuronaler Netze. Baut man die übersichtlichen CPGs aus Invertebraten auf den bidirektionalen Kontakten eines Halbleiters wieder auf, so könnten schon jetzt neuronale Netze mit zwei Dutzend Neuronen beobachtet und kontrolliert werden. Dazu muss jedoch erst das Zusammenspiel von kontaktierten Neuronen mit den für ein neuronales Netz notwendigen Synapsen untersucht werden.

Solche Anordnungen sind auch aus abstrakter Sicht interessant. Die extrazelluläre Ableitung von Neuronen lässt sich ebenso wie die kapazitive Stimulation durch Reizspots auch als Signalübertragung über die Schnittstelle zweier unterschiedlicher Systeme ansehen. Man kann in dieser Sichtweise ein Aktionspotential, die Spitzen in einem Transistorsignal oder eine Folge von Rechteckpulsen, die an einem Reizspot angelegt werden, auch als Ereignis werten. Moduliert zum Beispiel ein Aktionspotential den Drain-Source-Strom eines Transistors so, dass erkennbare Spitzen auftreten, so kann diese Situation abstrakt als Signalübertragung über die Neuro-Chip-Schnittstelle betrachtet werden.



Abbildung 1.2: *Detektion (Kopplung an Feldeffekttransistoren) und Stimulation (Reizung mit Reizspots) als abstrakte Signalübertragung über die Neuro-Chip-Schnittstelle.*

Von beiden Systemhälften ist bekannt, dass mehrere solcher Schnittstellen zu Netzen zusammengeschaltet werden können. Auf Halbleiterseite ist die Zusammenschaltung von ungefähr 250 Millionen Feldeffekttransistoren zu einem Prozessor der aktuelle Stand der Technik und wird durch einfache Leitungsbahnen realisiert. In neuronalen Netzen sorgen Synapsen für die Signalübertragung zwischen Neuronen.



Abbildung 1.3: *Synapsen zwischen Neuronen als abstrakte Neuro-Neuro-Schnittstelle.*

Eine solche Zusammenschaltung zweier unterschiedlicher Netze wird hybrides Netz genannt. Kennzeichnend ist seine Kompaktheit, denn die Vernetzung der Elemente auf beiden Seiten der Neuro-Chip-Schnittstelle hat vergleichbare, räumliche Ausdehnung. Anordnungen, in denen die Vernetzung auf Halbleiterseite wie zum Beispiel in Computern räumlich stark vom biologischen Netz getrennt abläuft, fallen deshalb nicht in diese Definition eines hybriden Netzes.

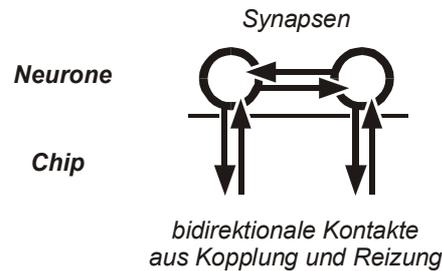


Abbildung 1.4: Ein hybrides Netz als Kombination von Neuro-Chip- und Neuro-Neuro-Schnittstellen.

Die Signalübertragung innerhalb neuronaler Netze ist aufgrund von Schwellwerteigenschaften und unterschiedlichen Übertragungsmechanismen deutlich komplizierter als innerhalb der Netze auf Halbleiterseite. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt deshalb im Zusammenspiel eines neuronalen Netzes mit der Neuro-Chip-Schnittstelle. Es stellen sich dabei die Fragen wie sich die Signalübertragung über mehrere Schnittstellen hinweg verhält, mit welcher Ausbeute die einzelnen Schnittstellen arbeiten und wie haltbar der hybride Verbund ist.

Diesen Fragestellungen soll in dieser Arbeit an einem hybriden System aus mindestens zwei Neuronen auf bidirektionalen Halbleiterstrukturen nachgegangen werden. Als erstes werden in einem hybriden Zwei-Neuronen-System die Übertragungseigenschaften modelliert. Danach werden die verwendeten Bauelemente, also die Neurone und der Chip vorgestellt. Schließlich folgen die Resultate, die einen geordneten Überblick über das Spektrum der unterschiedlichen Ergebnisse liefern.

Kapitel 2

Modellierung des Netzwerks

Das Übertragungsverhalten eines hybriden Netzwerks lässt sich mit Hilfe eines elektrischen Ersatzschaltbilds modellieren. Dabei müssen für die einzelnen Elemente Neuron, Neuro-Chip Kontakt und Synapse die entsprechende, elektrische Repräsentation gefunden werden. Eine zentrale Stellung nimmt dabei das Neuron ein, da seine nicht-linearen Eigenschaften das Gesamtsystem wesentlich prägen. Ziel ist es die Übertragungseigenschaften der einzelnen Schnittstellen und damit das Verhalten des Gesamtsystems qualitativ zu modellieren.

Zu einer exakten quantitativen Simulation wären elektrophysiologische Parameter jeder einzelnen Zelle, Informationen über Art und Stärke der Synapsen sowie Einzelheiten über den Neuro-Chip-Kontakt wie zum Beispiel die Zusammensetzung der Kontaktmembran und deren Abstand von der Chipoberfläche notwendig. Aufgrund der beschränkten Lebensdauer der vermessenen Netze ist diese allumfassende Charakterisierung jedoch nicht möglich.

Im Modell wird deshalb von einem Neuron ausgegangen, dessen elektrische Eigenschaften durch das Hodgkin-Huxley-Modell beschrieben werden, dessen Größe und Kontaktgeometrie jedoch an die experimentellen Ergebnisse angepasst sind. Die Daten dieses Neurons finden sich im Anhang.

Das Modell besteht aus zwei identischen, synaptisch gekoppelten Neuronen, die beide vom Chip stimuliert und detektiert werden können. Besonderes Ziel des Modells ist neben der Charakterisierung der Schnittstellen die synaptische Übertragung eines kapazitiv ausgelösten Aktionspotentials.

2.1 Neurone

2.1.1 Zellmembran

Ausreichend für die elektrische Beschreibung eines Neurons sind die Eigenschaften der Zellmembran. Es wurde das Modell von Hodgkin und Huxley [3] verwendet, nachdem sich die Membranstromdichte i_M durch ein homogene Membran aus einem kapazitiven Anteil i_C und ei-

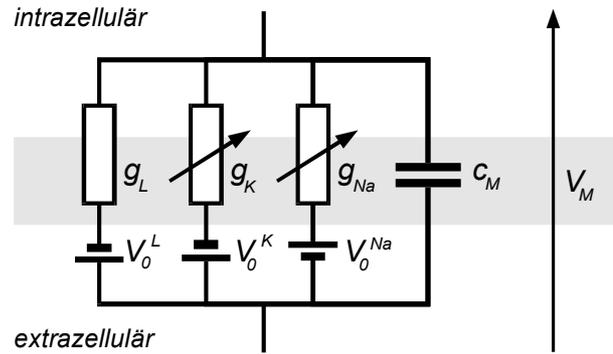


Abbildung 2.1: Modell einer aktiven Membran nach Hodgkin & Huxley.

nem ohmschen, ionenselektiven Anteil i_{Ion} besteht. Es wird angenommen, dass an der ohmschen Stromdichte i_{Ion} durch die Membran drei Klassen von Ionen beteiligt sind: Natrium- (Na) und Kaliumionen (K) sowie alle restlichen (L). Die Membran weist eine konstante, flächenspezifische Membrankapazität c_M und die flächenspezifischen, ionenselektiven Leitfähigkeiten g_i mit $i \in \{Na, K, L\}$ auf.

Die Unterschiede der Ionenkonzentrationen zwischen intra- und extrazellulärer Membranseite mit ihren entsprechenden Umkehrpotentialen werden durch die Spannungsquellen V_0^i dargestellt.

$$i_M = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_i (V_M - V_0^i) \quad (1)$$

Die nichtlineare Eigenschaft einer Membran steckt in den spannungsabhängigen g_{Na} und g_K . Der molekulare Aufbau der Kanäle aus Untereinheiten mit spannungsabhängiger Konformation wird durch die "Kanalteilchen" n , m und h abgebildet. Es wird angenommen, dass jede Untereinheit in geschlossener oder geöffneter Konformation vorliegen kann.

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (2)$$

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad (3)$$

Ihr Wert beschreibt den Prozentsatz der entsprechenden, geöffneten Kanaluntereinheiten. Dieser ändert sich durch Untereinheiten, die sich mit der spannungsabhängigen Rate α öffnen und mit β schließen. Am Beispiel des n -Teilchens ergibt sich die Relaxationsgleichung:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n \quad (4)$$

Für m - und h -Teilchen gilt Analoges mit den ebenfalls spannungsabhängigen Raten α_m und β_m sowie α_h und β_h . Die Gleichungen, die die Abhängigkeit der Raten von der Membranspannung V_M angeben, finden sich im Anhang.

Gleichung 4 sagt, dass die Kanaluntereinheiten exponentiell einem Gleichgewichtszustand zustreben, in dem die Anzahl der geöffneten und der geschlossenen Kanaluntereinheiten konstant bleibt. So strebt die n -Untereinheit des Na-Kanals mit der Zeitkonstante τ_n gegen den Gleichgewichtszustand n^∞ , bei dem gilt: $\frac{dn}{dt} = 0$. Aus Gleichung 4 ergibt sich:

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (5)$$

und

$$n^\infty = \alpha_n \tau_n \quad (6)$$

Für alle Untereinheiten hat $\tau_i = \tau_i(V_M)$ sein Maximum ungefähr in der Nähe des Ruhepotentials V_R .

Auslösung eines Aktionspotentials

Aktionspotentiale werden im Regelfall durch eine vorübergehende Depolarisation einer aktiven Membran ausgelöst. Die Depolarisation kann durch Strominjektion, Anlegen einer konstanten Spannung während eines voltage clamps oder durch kapazitive Stimulation mit kurzen Spannungsspitzen erfolgen. Die Inaktivierungsfähigkeit mancher Ionenkanäle erlaubt es jedoch auch, dass Aktionspotentiale *nach* einer starken Hyperpolarisation ablaufen. Ein Aktionspotential, das auf diese Weise entsteht wird als postinhibitorischer Rebound (PIR) bezeichnet. Der Mechanismus eines postinhibitorischen Rebounds wird später noch bei der Modellierung der kapazitiven Stimulation in Betracht gezogen.

Mechanismus der Depolarisation Bei Depolarisation einer aktiven Membran öffnen sich K- und Na-Kanäle. Da die m -Untereinheiten deutlich schneller sind als die Untereinheiten des K-Kanals, findet schnell ein starker Na-Einstrom in die Zelle statt, der anfänglich den K-Strom überwiegt und die Depolarisation bis zur Spitze des Aktionspotentials führt.

Mechanismus eines postinhibitorischen Rebounds (PIR) Eine starke Hyperpolarisation einer aktiven Membran führt zu einer Membran mit geschlossenen Na- und K-Kanälen. Die hyperpolarisierte Membran relaxiert nach dieser Auslenkung in erster Näherung passiv auf das Ruhepotential. Dort befinden sich die Untereinheiten der Kanäle noch im Zustand der Hyperpolarisation. So ist der K-Kanal noch geschlossen, die h-Teilchen vom Na-Kanal jedoch offen. Die große Zeitkonstante τ_h der h-Teilchen erlaubt nun bei fehlendem K-Ausstrom einen sehr schwachen Na-Einstrom. Während die h-Teilchen mit abnehmender Membranspannung nur langsam schließen, folgen die m-Teilchen dem langsam ansteigenden Zellpotential instantan. Schließlich über-

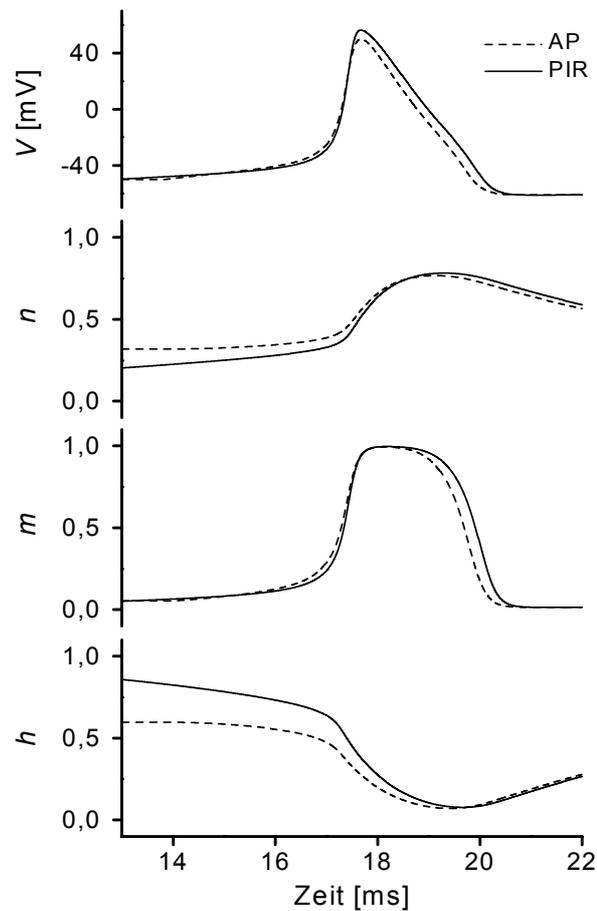


Abbildung 2.2: Vergleich des Membranmechanismus' eines postinhibitorischen Rebounds (PIR) und der Auslösung eines Aktionspotentials (AP) durch Depolarisation. Entscheidend für ein PIR sind die anfänglich hohen Werte der h -Einheiten und die niedrigen Werte der n -Einheiten.

schreiten sie die Schwelle von der aus sie den Na-Einstrom aufgrund ihrer starken Kooperativität immens steigern und das Aktionspotential auslösen.

Zusammengefasst sind es die vollkommen geöffneten h -Teilchen, die nach Erreichen des Ruhepotentials den depolarisierenden Na-Einstrom starten. Bei ihrer schwachen Wirkung auf den Na-Kanal ist jedoch auch das Versiegen des K-Stroms für die Auslösung des Aktionspotentials wichtig.

2.1.2 Zwei-Kompartiment-Modell

Bisherige Messungen von Neuro-Chip Kontakten zeigen [38], dass auf Substraten gewachsene Neurone keine homogenen Kanaldichten aufweisen. Die Zellmembran wird deshalb in zwei Kompartimente unterteilt, die auf dem Substrat aufliegende Membran mit der Fläche A_{JM} und

die freie Membran mit der Fläche A_{FM} . Die Zellgeometrie spiegelt sich im Verhältnis

$$\beta = \frac{A_{JM}}{A_{FM}} \quad (7)$$

wieder. Die unterschiedlichen Kanaldichten der beiden Membranen werden durch das Verhältnis μ_i der spezifischen Maximalleitfähigkeiten zwischen Kontaktmembran \bar{g}_i^{JM} und freier Membran \bar{g}_i^{FM} ausgedrückt, so dass gilt:

$$\mu_{Na} = \frac{\bar{g}_{Na}^{JM}}{\bar{g}_{Na}^{FM}}, \quad \mu_K = \frac{\bar{g}_K^{JM}}{\bar{g}_K^{FM}}, \quad \mu_L = \frac{\bar{g}_L^{JM}}{\bar{g}_L^{FM}} \quad (8)$$

Die Strombilanz einer Zelle mit zwei Kompartimenten, die über einen Injektionsstrom I_{inj} stimuliert wird, lautet damit:

$$I_{inj} = I_{FM} + I_{JM} \quad (9)$$

$$I_{inj} = A_{FM} \left(c_{FM} \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_0^i) \right) + A_{JM} \left(c_{JM} \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J + V_0^i) \right) \quad (10)$$

2.2 Neuro-Chip-Kontakt

Die elektrischen Eigenschaften des Neuro-Chip-Kontakts kommen zum Ersatzschaltbild hinzu, wenn Aussagen über die Form des erwarteten Transistorsignals oder über die Auswirkungen von Reizpulsen getroffen werden sollen. Er kann als planares Kabel betrachtet werden, dessen Seiten aus der Kontaktmembran und der Chipoberfläche bestehen und dessen Kern in erster Näherung mit dem gleichen Elektrolyt gefüllt ist, der auch den Rest der Zelle umgibt.

Flächenkontaktmodell

Eine differentielle Beschreibung des Kabels mit dem Flächenkontaktmodell [47], [26] ermöglicht es das Potential im Kontaktbereich zwischen Neuron und Chipoberfläche und damit das erwartete Transistorsignal ortsabhängig zu bestimmen.

Ein differentielles Flächenelement des Neuro-Chip-Kontakts wird in diesem Bereich beschrieben durch die Kontaktmembran und die Kapazität c_G des Gateoxids, das die Active Area des Chips bedeckt. Verbunden sind die Flächenelemente mit Widerständen, die die spezifische Flächenleitfähigkeit g_J des Elektrolyts zwischen Membran und Chipoberfläche wiedergeben.

Unter der Annahme, dass die Kontaktmembran passiv ist, lässt sich für einfache Kontaktgeometrien die Potentialverteilung im Kontaktbereich analytisch beschreiben. Für aktive oder inhom-

gene Kontaktmembranen muss mit numerischen Methoden eine Lösung gefunden werden. Der Vorteil des Flächenkontaktmodells liegt darin, dass die Einflüsse der Kontaktgeometrie, der Inhomogenitäten in der Kontaktmembran und die Position des Transistors innerhalb des Kabels berücksichtigt werden.

Punktkontaktmodell

Bei geeigneter Näherung [47] kann der Neuro-Chip-Kontakt auch mit einem diskreten Ersatzschaltbild beschrieben werden. In diesem Punktkontaktmodell wird der vollständige Neuro-Chip-Kontakt durch ein Element des Flächenkontaktmodells beschrieben. Aus den spezifischen Größen des Flächenkontaktmodells werden durch Multiplikation mit den entsprechenden Flächen die diskreten Bauelemente. Der Vorteil des Punktkontaktmodells liegt besonders im Hinblick auf die Modellierung von Mehrneuronesystemen im deutlich geringeren, numerischen Aufwand.

Die Bilanz im Stromknoten des Neuro-Chip-Kontakts zeigt die verwendeten Größen:

$$I_{JM} = I_J + I_G + I_S \quad (11)$$

Der Strom I_{JM} durch die Kontaktmembran der Fläche A_{JM} setzt sich zusammen aus dem ohmschen Strom I_J , der durch den Neuro-Chip-Spalt in das Bad fließt, sowie den kapazitiven Strömen I_G und I_S , die durch die Chipoberfläche treten. Dabei fließt I_G durch das Gate des Transistors mit der spezifischen Kapazität c_G und der Fläche A_G . I_S ist der kapazitive Verschiebungsstrom, der durch die Spannungsflanken der Reize in den Kontaktbereich injiziert wird. Er tritt durch den Reizspot, der aufgrund der Bauweise des Chips mit einer gemeinsamen Active Area die gleiche spezifische Kapazität c_G hat wie der Transistor. Die effektiv wirksame Größe ist aufgrund der großzügigen Dimensionsierung der Reizspots durch die Auflagefläche der Membran A_{JM} bestimmt. Die dabei nicht wirksame Gatefläche A_G wird vernachlässigt.

$$A_{JM} \left(c_{JM} \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_J + V_0^i) \right) = A_{JM} g_J V_J + A_G c_G \frac{dV_J}{dt} \quad (12) \\ + A_{JM} c_G \frac{d(V_J - V_S)}{dt}$$

Die Gleichungen 10 und 12 beschreiben zusammen ein Neuron, das bidirektional an einen Chip gekoppelt ist und zusätzlich noch über Strominjektion stimuliert werden kann.

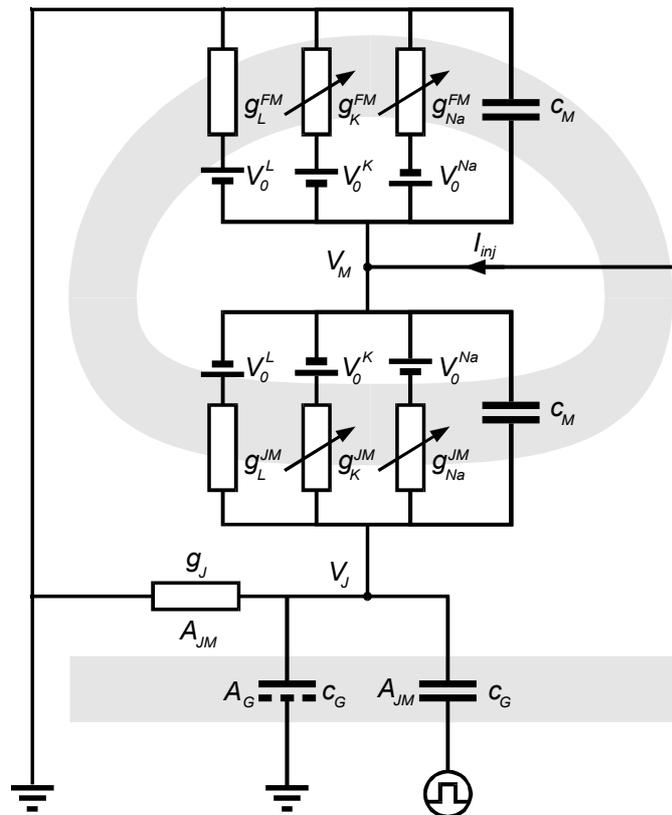


Abbildung 2.3: Das Modell des bidirektionalen Neuro-Chip-Kontakts. Das Neuron wird durch Zwei-Kompartiment-Modell dargestellt. Eingezeichnet ist der mögliche Injektionsstrom einer Mikroelektrode, der Feldeffekttransistor mit der Detektionsfläche A_G und der Reizspot mit der Fläche A_{JM} .

2.3 Zwei-Neurone-Netzwerk

Um aus einem Neuron ein Netz mehrerer Neurone zu erstellen wird die Vernetzung zweier Neurone betrachtet. Das präsynaptische Neuron ist über das Axon, mit dem Dendritenbaum des postsynaptischen Neurons über eine Synapse verbunden.

Kurze Verbindungen

Axone leiten Aktionspotentiale aktiv weiter. Sie stellen in der Übertragungskette ein Verzögerungsglied dar, das ein Aktionspotential in unveränderter Form zeitversetzt an der Synapse anliefern. In [1] wurde gezeigt, dass in Kultur gewachsenen Schneckenzellen mit ihren Neuritenbäumen ein elektrisch kompaktes System darstellen. Die Zeitverzögerung eines Aktionspotentials durch ein Axon ist sehr klein im Verhältnis zu seiner Breite und wird deshalb vernachlässigt.

Die nachfolgenden Synapsen zum Dendritenbaum des postsynaptischen Neurons wurden auf eine Ein-Punkt-Synapse reduziert, die direkt an das Soma des postsynaptischen Neurons koppelt.

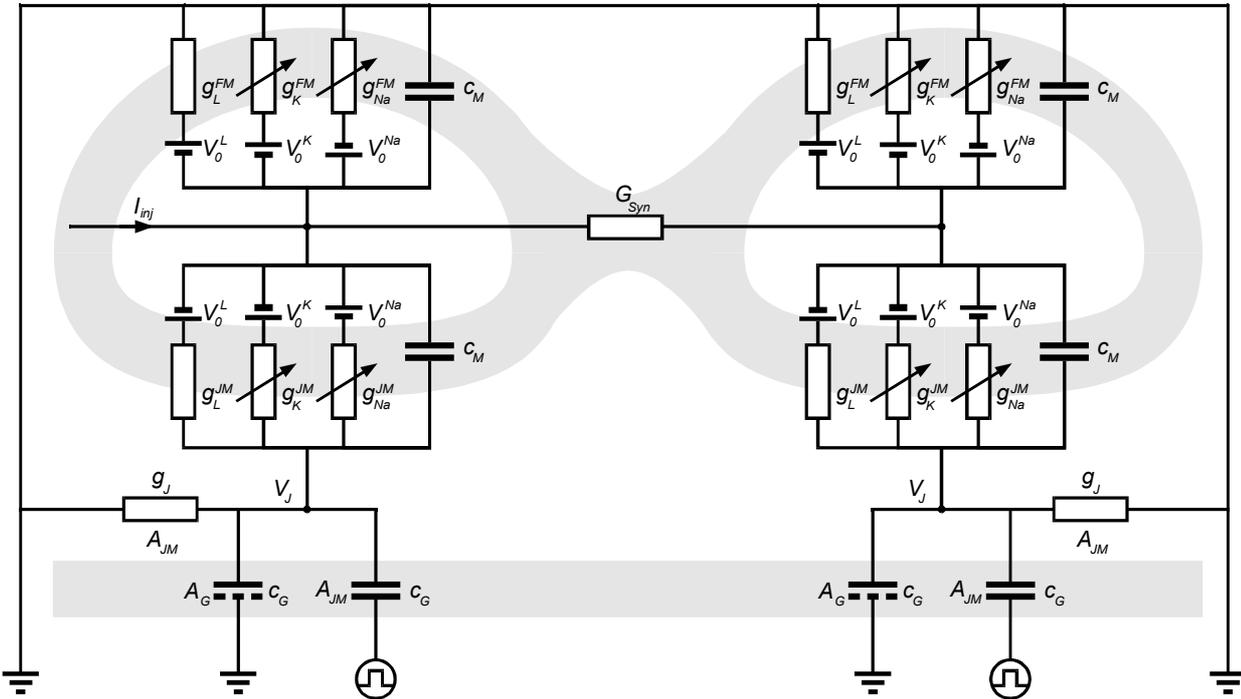


Abbildung 2.4: Modell des Zwei-Neuronen-Netzwerks mit vier aktiven Membrankompartimenten. Beide Neuronen können detektiert und stimuliert werden. Die Anordnung ist bis auf den Injektionsstrom im linken Neuron symmetrisch.

Damit erreicht man ein parameterarmes Netzwerk, dessen Eigenschaften primär durch die beiden Somata und die Neuro-Chip-Kopplung bestimmt sind.

Die Synapse wird durch die Leitfähigkeit G_{Syn} repräsentiert. Das entspricht den Eigenschaften einer elektrischen Synapse. Die synaptische Leitfähigkeit G_{Syn} wird auf die Membranleitfähigkeit G_M der präsynaptischen Zelle am Ruhepotential normiert. Die dimensionslose Synapsenstärke γ ergibt sich dann zu:

$$\gamma = \frac{G_{Syn}}{G_M} \quad (13)$$

Bei jedem vernetzten Neuron kommt in Gleichung 9 noch der synaptische Strom hinzu, so dass ein Netzwerk aus einem präsynaptischen (*prä*) und einem postsynaptischen (*post*) Neuron durch vier Gleichungen beschrieben werden kann. Aus Symmetriegründen wird $I_{Inj}^{post} = 0$ gesetzt.

$$\begin{aligned} I_{Inj}^{prä} - I_{FM}^{prä} - G_{Syn} (V_M^{prä} - V_M^{post}) &= I_{JM}^{prä} \\ I_{FM}^{post} - G_{Syn} (V_M^{post} - V_M^{prä}) &= I_{JM}^{post} \\ I_S^{prä} + I_J^{prä} + I_G^{prä} &= I_{JM}^{prä} \\ I_S^{post} + I_J^{post} + I_G^{post} &= I_{JM}^{post} \end{aligned}$$

2.4 Reizung neuronaler Aktivität

Erste Schnittstelle bei einer vollen Signalübertragung ist die Reizung des präsynaptischen Neurons. Bevor auf die Messergebnisse eingegangen wird, werden die grundlegenden Mechanismen der kapazitiven Stimualtion modelliert. Dabei wird zur Vereinfachung von einem einzelnen, also nicht vernetzten Neuron ausgegangen, das durch das Zwei-Kompartiment-Modell dargestellt wird.

Neurone können mit positiven und negativen Spannungsflanken angeregt werden. Die Entstehung eines Aktionspotentials erfolgt dabei auf deutlich unterschiedlichen Wegen. In diesem Abschnitt werden deshalb zuerst getrennt die Reizmechanismen von positiven und negativen Spannungsflanken beschrieben. Ziel ist es jeweils nach dem Verständnis des Reizmechanismus die Parameter zu finden, die für die Reizbarkeit im Wesentlichen verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Abschnitte legen die Grundlage für die darauf folgende Abschätzungen der Reizbarkeit mit Rechteckpulsen als auch der Übertragung von kapazitiv induzierten Aktionspotentialen über Synapsen.

Als Anregung werden im Folgenden Spannungsflanken von $+5V$ und $-5V$ gewählt. Neben dem Wechsel des Vorzeichens der Spannungsflanken wird noch die Möglichkeit einer passiven Kontaktmembran einbezogen. Ansonsten werden für das Neuron und den Kontakt zum Chip die obigen Standardparameter eingesetzt.

Teiler für Spannungsflanken

Für unendlich steile Spannungsflanken lassen sich zum Zeitpunkt t_0 des Spannungssprungs die beiden Membrankompartimente des Neurons allein durch ihre Kapazitäten beschreiben. Es entsteht deshalb ein dreifacher kapazitiver Teiler aus den Kapazitäten der Reizfläche $C_{OX} = c_{ox}A_{JM}$, der Kontaktmembran $C_{JM} = c_M A_{JM}$ und der freien Membran $C_{FM} = c_M A_{FM}$. Ein Sprung im elektrischen Potential des Reizspots setzt sich aufgrund der seriellen Verschaltung der Kapazitäten noch stark im Potential des Neuro-Chip Spalts aber nur noch schwach im intrazellulären Potential fort. Entscheidend für das Zustandekommen eines Aktionspotentials sind jedoch die Änderungen der Transmembranspannungen ΔV_{JM} und ΔV_{FM} . Für sie gilt bei einem Spannungssprung am Reizspot ΔV_S dann:

$$\Delta V_{JM} = -\Delta V_S \frac{C_{FM}C_{OX}}{C_{JM}C_{OX} + C_{FM}C_{OX} + C_{FM}C_{JM}} \quad (14)$$

$$\Delta V_{FM} = \Delta V_S \frac{C_{JM}C_{OX}}{C_{JM}C_{OX} + C_{FM}C_{OX} + C_{FM}C_{JM}} \quad (15)$$

Bei den benutzten Flankenhöhen des Standardmodells (s. Anhang) von $|\Delta V_S| = 5V$ ist somit $|\Delta V_{JM}| = 775,6mV$ und $|\Delta V_{FM}| = 32,3mV$. Der Vorzeichenunterschied zwischen den beiden Beziehungen gibt die spiegelbildliche Orientierung der beiden Membrankompartimente wieder.

2.4.1 Positive Einzelflanken

Im Fall einer positiven Einzelflanke wird zur Zeit t_0 nach Gleichung 14 die Kontaktmembran stark hyperpolarisiert und die freie Membran nach Gleichung 15 depolarisiert.

Im folgenden Abschnitt wird zwischen einer aktiven und einer passiven Kontaktmembran unterschieden. Dabei wird das Verhalten der jeweiligen Transmembranspannungen der beiden Kompartimente betrachtet und der Mechanismus der möglichen Aktionspotentialauslösung untersucht. Variiert wird dabei die Abdichtung des Neuro-Chip-Kontakts g_J .

Kontaktabdichtung und Mechanismus

Passive Kontaktmembran Das Aktionspotential kann im Fall einer passiven Kontaktmembran nur in der freien Membran entstehen. Nach der Flanke relaxieren die freie Membranspannung V_{FM} und die Spannung der Kontaktmembran V_{JM} mit der Zeitkonstante τ_J , die über

$$\tau_J = \frac{c_{OX} + c_M}{g_J + g_M}$$

mit der Abdichtleitfähigkeit des Neuro-Chip-Kontakts verknüpft ist. Da $g_M \ll g_J$ ist, kann einfacher geschrieben werden:

$$\tau_J g_J = const \quad (16)$$

Nach der Flanke relaxieren beide Membranen in Richtung ihres Ruhepotentials. Für Relaxationszeiten τ_J , die deutlich unterhalb der Zeitkonstanten τ_m der m -Untereinheit des Na-Kanals liegen, relaxiert auch eine aktive Membran in exponentieller Form. Während dieser Zeit wird die freie Membran depolarisiert. Für größere τ_J ist die Depolarisation stärker und dauert länger, was dazu führt, dass sich nach Gleichung 16 mit kleineren g_J Aktionspotentiale mit kürzeren Latenzzeiten stimulieren lassen. Oberhalb einer bestimmten Schwelle von g_J ist die Depolarisation zu kurz und zu schwach, es entsteht kein Aktionspotential.

Die passive Kontaktmembran wird sehr stark hyperpolarisiert. Für Latenzzeiten, die größer als τ_J sind, folgt die Spannung V_{JM} über die passive Kontaktmembran dem Aktionspotential der freien Membran fast instantan. Abbildung 2.5a) zeigt, dass bei größeren τ_J die Latenzzeit so kurz wird, dass die ansteigende Flanke des Aktionspotentials schon während der Zeit kommt, in der die Kontaktmembran noch nicht auf das Ruhepotential relaxiert ist. Deshalb wird bei sehr

dichten Membranen das Aktionspotential der freien Membran nicht mehr zeitgleich mit dem der Kontaktmembran abgebildet.

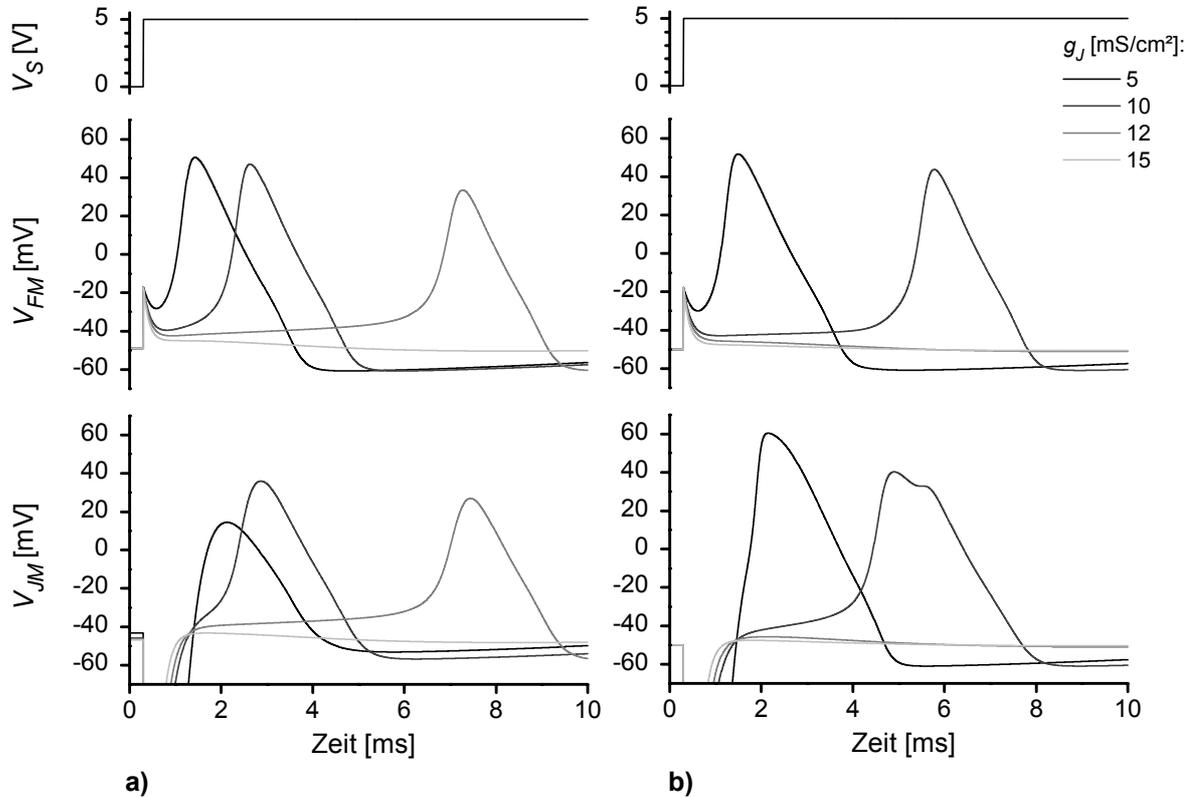


Abbildung 2.5: Verlauf der Transmembranspannungen von Kontaktmembran und freier Membran bei Reizanregung mit positiver Flanke von $5V$. Variiert wurde die spezifische Abdichtleitfähigkeit g_J . a) Bei passiven Kontaktmembranen treten die Aktionspotentiale in beiden Membranen gleichzeitig auf. Ausnahme sind sehr dichte Neuro-Chip-Kontakte b) In aktiven Kontaktmembranen hängt die Reihenfolge der Aktionspotentiale der beiden Membrankompartimente von der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J ab.

Aktive Kontaktmembran Ist die Kontaktmembran aktiv, so kann der starke Hyperpolarisationspuls in ihr ein Aktionspotential auslösen, das nach der Mechanik eines postinhibitorischen Rebounds abläuft. Es entstehen in beiden Membrankompartimenten Aktionspotentiale, deren zeitliche Reihenfolge von g_J abhängt. Für kleine g_J behindert das große τ_J wieder das Aktionspotential in der Kontaktmembran. Für größere g_J hingegen löst der postinhibitorische Rebound das Aktionspotential der Kontaktmembran mit kurzer Latenzzeit aus. Aufgrund des kleinen Flächenverhältnisses β der beiden Kompartimente, wird das Aktionspotential der freien Membran als zweiter Hügel im Verlauf des Aktionspotentials der Kontaktmembran in Abbildung 2.5b) sichtbar. Die Schwellleitfähigkeit g_J , bei der gerade noch ein Aktionspotential ausgelöst wird, liegt

bei aktiven Kontaktmembranen tiefer als bei passiven. Darin spiegelt sich der kleine Unterschied in den Ruhepotentialen von Kontaktmembran und freier Membran wieder.

Fazit Unabhängig davon, ob die Membran im Kontaktbereich aktiv oder passiv arbeitet, entstehen bei der gewählten Zellgeometrie Aktionspotentiale nur in Neuro-Chip-Kontakten mit geringer, spezifischer Junctionleitfähigkeit g_J . Bei realistischen Junctionleitfähigkeiten von $100\text{mS}/\text{cm}^2$ relaxiert das Zellpotential auf das Ruhepotential ohne dass ein Aktionspotential entsteht.

Reizbarkeitsparameter

Entspricht die Kontaktmembran in ihrer Zusammensetzung nicht der Standardmembran, sondern weist sie eine erhöhte Leckleitfähigkeit auf, so kann eine positive Spannungsflanke auch bei weniger dichten Neuro-Chip-Kontakten als oben aufgeführt Aktionspotentiale auslösen. Als Modell wurde eine Kontaktmembran angenommen, deren aktive Ionenkanäle durch $\mu_{Na} = \mu_K = 0$ ausgeschaltet wurden. Das Leck wird über die Variation von μ_L eingestellt. Die Werte von in Abbildung 2.6 sind nicht direkt mit der Leckleitfähigkeit g_{JM} zu vergleichen, da nach dem Modell von Hodgkin & Huxley noch das Umkehrpotential V_0^L zu beachten ist. Die Variation von μ_L gewährleistet jedoch später einen Vergleich mit Kontaktmembranen, die teilweise mit Na-Kanälen besetzt sind.

In Abbildung 2.6a) erkennt man, dass mit zunehmendem μ_L das Ruhepotential der Zelle angehoben und gleichzeitig das Neuron durch den Reizpuls stärker depolarisiert wird. Es gibt einen Schwellwert von μ_L , oberhalb dessen Aktionspotentiale entstehen. Dieser Schwellwert hängt von der Leitfähigkeit g_J des Neuro-Chip-Kontakts ab. Abbildung 2.6b) zeigt, dass losere Neuro-Chip-Kontakte eine undichtere Kontaktmembran zur Auslösung von Aktionspotentialen benötigen.

2.4.2 Negative Einzelflanken

Bei negativen Flanken mit $\Delta V_S = -5V$ wird die Kontaktmembran bei der angenommenen Geometrie um $775,6\text{mV}$ depolarisiert und die freie Membran um $32,3\text{mV}$ hyperpolarisiert.

Kontaktabdichtung und Mechanismus

Passive Kontaktmembran Im Fall der passiven Kontaktmembran kann mit negativen Einzelflanken ein Aktionspotential nur in der freien Membran ausgelöst werden. Als Mechanismus zur Auslösung eines Aktionspotentials steht bei Hyperpolarisation nur der postinhibitorische Rebound zur Wahl. Um jedoch einen postinhibitorischen Rebound auszulösen, müssten durch den Reizpuls die h -Einheiten auf eins und die n -Einheiten in die Nähe von Null gebracht werden. Die

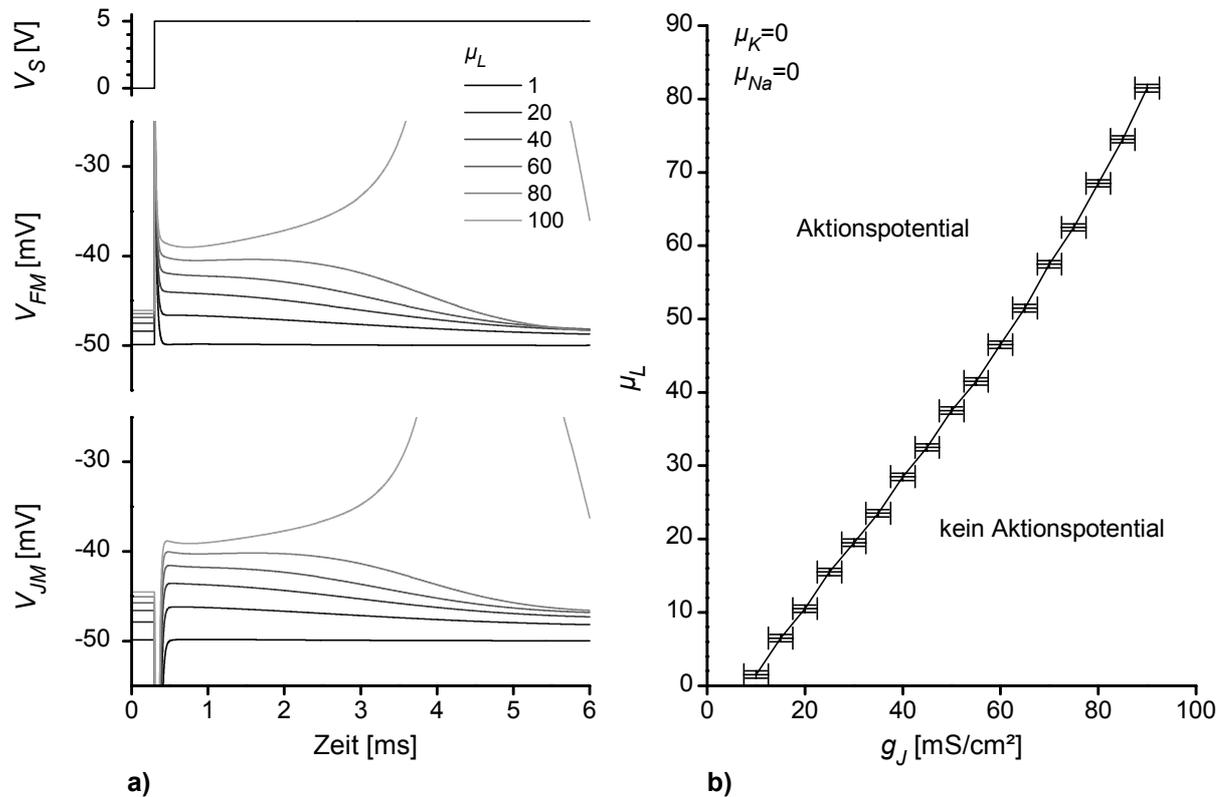


Abbildung 2.6: a) Einfluß der relativen Leckleitfähigkeit μ_L einer Kontaktmembran auf den Verlauf der Transmembranspannungen von Kontaktmembran und freier Membran bei Reizung mit positiver Flanke von 5V. Erst ab einer erhöhten Leckleitfähigkeit entsteht ein Aktionspotential. b) Zusammenhang zwischen relativer Leckleitfähigkeit μ_L der Kontaktmembran und Abdichtwiderstand g_J auf die Reizbarkeit eines Neurons. Die Kurve teilt den Raum fast linear in zwei Hälften. In der oberen löst die Kombination g_J, μ_L ein Aktionspotential aus, in der unteren nicht. Neuronen mit durchlässigerer Kontaktmembran müssen also keinen so dichten Neuro-Chip-Kontakt halten wie Neuronen mit dichter Kontaktmembran.

schwache Hyperpolarisation verschiebt die Werte der n , m und h -Einheiten jedoch nur um Werte im Prozent- bis Promillebereich. Eine erfolgreiche Stimulation ist unter diesen Umständen nicht zu erwarten.

Aktive Kontaktmembran Ist die Kontaktmembran aktiv, so kann durch den depolarisierenden Reizpuls ein Aktionspotential ausgelöst werden. Er öffnet die schnellen m -Einheiten in sehr kurzer Zeit. Mit dichter werdendem Neuro-Chip-Kontakt, werden sie durch die Spannungsflanke immer weiter geöffnet bis ab einer bestimmten Abdichtung der Reizpuls ausreicht um die m -Einheiten vollständig zu öffnen. Der dadurch einsetzende Na-Strom hält die freie Membran auch noch nach dem Abklingen des passiven Reizpulses depolarisiert. Ein dichterere Neuro-Chip-Kontakt führt zu stärkerer Depolarisation und damit zu einer kleiner werdenden Latenzzeit des

Aktionspotentials. Abbildung 2.7a) zeigt, dass die Latenzzeit unterhalb eines bestimmten Werts von g_J wieder ansteigt. In diesem Bereich ist die Depolarisation so stark, dass der Einfluss der n - und m -Einheiten des K- und des Na-Kanals zum Tragen kommen. Die n -Einheiten sind dabei schon so weit offen, dass ein immer größer werdender K-Strom das Aktionspotential verzögert. Den gleichen Effekt hat die dazu parallel zunehmende Inaktivierung des Na-Kanals.

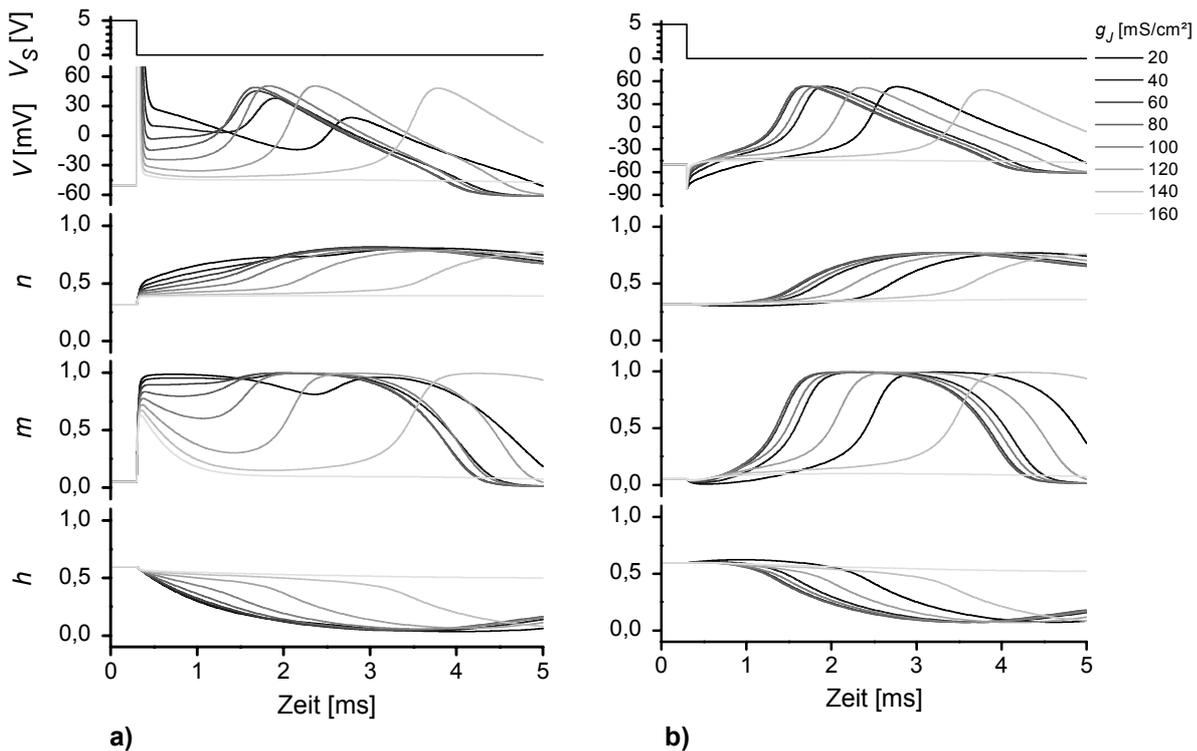


Abbildung 2.7: Verlauf von Transmembranpotential und Zustand der n , m und h -Einheiten nach Anregung mit einer negativen Spannungsflanke von $-5V$. a) Kontaktmembran b) freie Membran

In der freien Membran wird nach dem Ende der Hyperpolarisation ein Aktionspotential von der Kontaktmembran ausgelöst. Der Zeitverlauf der Kanaleinheiten der freien Membran in Abbildung 2.7b) zeigt, dass ihr Aktionspotential durch den Start des Aktionspotentials in der Kontaktmembran bestimmt wird.

Fazit Negative Reizflanken können nur bei aktiver Kontaktmembranen ein Aktionspotential auslösen. Im Vergleich zu positiven Flanken wird ein Aktionspotential noch bei eher schwachen Neuro-Chip-Kontakten bis $g_J = 160 \text{ mS/cm}^2$ ausgelöst. Entscheidende Rolle bei der Entstehung des Aktionspotentials spielen dabei die m -Teilchen des Na-Kanals in der Kontaktmembran.

Na-Kanäle und Reizbarkeit

Der oben diskutierte Mechanismus weist darauf hin, dass die Belegung der Kontaktmembran mit Na-Kanälen das Auslöseverhalten bei negativen Flanken bestimmt. In Abbildung 2.8 wurde die Dichte der Na-Kanäle in der Kontaktmembran variiert.

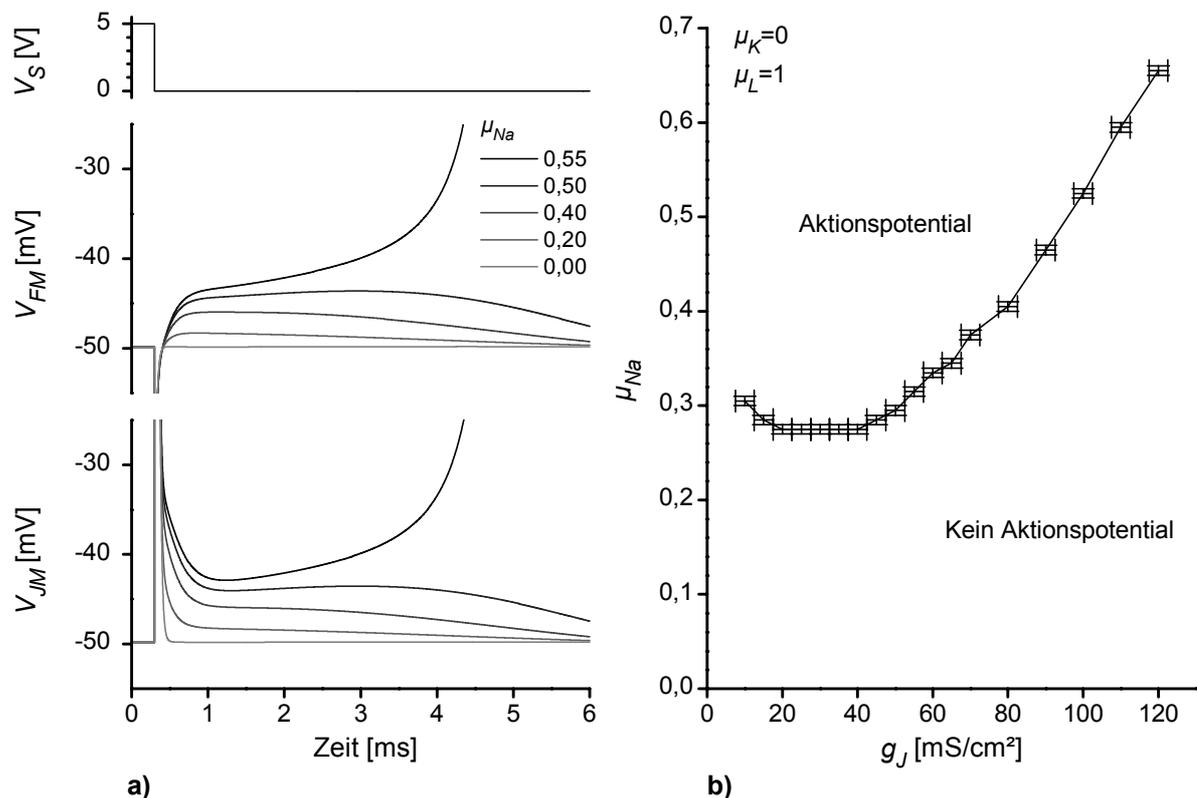


Abbildung 2.8: a) Einfluß der relativen Natriumleitfähigkeit μ_{Na} einer aktiven Kontaktmembran auf den Verlauf der Transmembranspannungen von Kontaktmembran und freier Membran bei Reizung mit negativer Flanke von $-5V$. Es genügt schon ungefähr die halbe Natriumdichte um ein Aktionspotential auszulösen. b) Zusammenhang zwischen relativer Natriumleitfähigkeit μ_{Na} der Kontaktmembran und Abdichtwiderstand g_J . Lose auf dem Chip sitzende Neuronen brauchen eine größere Na-Belegung der Kontaktmembran. Für sehr dichte Kontakte ist wieder erhöhte Belegung erforderlich um die schon erhöhte Na-Inaktivierung auszugleichen.

Schon ungefähr die halbe Dichte einer normalen Membran reicht aus um bei einer Abdichtleitfähigkeit von $g_J = 100 \text{ mS/cm}^2$ ein Aktionspotential zu ermöglichen. Für negative Flanken zeigt also die Na-Kanaldichte einen Schwellwert oberhalb dessen erst ein Aktionspotential abläuft. Ermittelt man diesen Schwellwert wie in Abbildung 2.6 in Abhängigkeit von der Abdichtleitfähigkeit, so ergibt sich für große Werte von g_J ein ähnliches Verhalten: Der erhöhte Leckstrom durch einen schwächeren Neuro-Chip-Kontakt muss durch eine Kontaktmembran kompensiert werden, die leichter depolarisierbar ist. Der passive Charakter der Membran in Abbildung 2.6,

der zu einer fast linearen Abhängigkeit von g_J führte, ist hier nicht vorhanden. Bei dichteren Kontakten zum Chip muss die Membran wieder mehr Na-Kanäle enthalten um ein Aktionspotential bilden zu können. Verantwortlich dafür ist der oben beschriebene Mechanismus. In Abbildung 2.8b) ist der Beitrag des K-Kanals auf Null gesetzt worden. Der Anstieg des Schwellwertes von μ_{Na} für kleine g_J ist also nur auf die schnelle Inaktivierung der Na-Kanäle durch den Reizpuls zurückzuführen.

2.4.3 Rechteckpulse

In vielen Situationen kann ein Aktionspotential nicht mit einer einzigen Spannungsflanke ausgelöst werden. Die Amplitude einer Flanke lässt sich nicht beliebig anheben, da das Reizoxid und die Kontaktmembran durchbrechen können. Als Ausweg bleibt die Kombination von positiven und negativen Flanken, die zu Rechteckpulsen führt.

Nach den obigen Ergebnissen wurde die Reizbarkeit eines Neurons mit zwei Membranparametern μ_{Na} und μ_L sowie der spezifischen Abdichtleitfähigkeit g_J charakterisiert. Kombiniert man die Reizbarkeitsdiagramme aus Abbildung 2.6b) und 2.8b) und erweitert sie in entsprechender Richtung, so ergibt sich der in Abbildung 2.9 gezeigte, dreidimensionale Parameterraum, in dem aus den Reizbarkeitskurven Reizbarkeitsflächen geworden sind.

Die senkrechte Fläche charakterisiert die Reizbarkeit mit positiven Flanken. Sie teilt den Parameterraum in die Quadranten 1 und 2 und die Quadranten 3 und 4. Das bedeutet, dass Kontaktmembranen, die durch einen Punkt in den Quadranten 1 und 2 charakterisiert sind, sich nicht durch eine einzelne, positive Flanke anregen lassen während das für Kontaktmembranen aus Quadrant 3 und 4 möglich ist. Für negative Flanken teilt die gekrümmte Fläche den Raum in die Quadranten 3 und 1 sowie die Quadranten 2 und 4. Reizbarkeit ist in den Quadranten 1 und 3 oberhalb der gekrümmten Fläche vorhanden.

Die Reizbarkeitsflächen aus Abbildung 2.9 sind qualitative Abschätzungen für Na-Kanal-besetzte, lecke Kontaktmembranen, die dem Hodgkin & Huxley-Modell folgen. Sie geben die Reizbarkeit für Neurone an, die sich vorher im Ruhepotential befanden. In der Interpretation des obigen Parameterraums wird vernachlässigt, dass zwischen den zwei aufeinanderfolgenden Flanken eines Rechteckpulses Zeit verstreicht, in der sich Zellpotential und Zustand der Membranen ändern können.

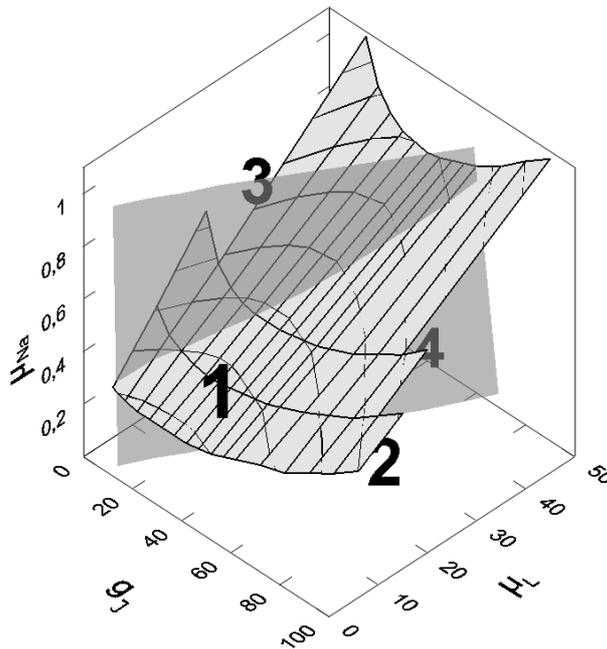


Abbildung 2.9: Reizbarkeitsflächen für Anregung mit negativen und positiven Spannungsflanken. Der Raum wird durch die Flächen in vier Quadranten eingeteilt. Parameterkombinationen aus den Quadranten 1 und 2 erlauben Reizung mit positiven Flanken, Kombinationen aus den Quadranten 1 und 3 Reizung mit negativen Flanken.

2.5 Detektion neuronaler Aktivität

Das Zusammenspiel von Kontaktmembran und freier Membran ist auch bei der Detektion von Aktionspotentialen mit Feldeffekttransistoren bestimmend für die Ereignisübertragung an der Neuro-Chip-Schnittstelle. Im Gegensatz zur Reizung von Neuronen muss keine Schwelle überwunden werden. Es gibt jedoch auch Konstellationen der Kontaktparameter, in denen das Signal im Transistor verschwindend gering wird.

2.5.1 Passiver Kontakt

Eine einfache Näherung des Neuro-Chip-Kontakts ist die Annahme einer passiven Kontaktmembran. Sie wird im Ersatzschaltbild durch eine Parallelschaltung der spezifischen Leitfähigkeit der Kontaktmembran g_{JM} und der spezifischen Membrankapazität c_M dargestellt. Diese Situation ist relevant für Membranen mit zerstörten oder inaktivierten Kanälen, deren Zeitkonstante deutlich über der der freien Membran liegen. Die Transistorsignale mit extrem hohen Werten von g_{JM} werden aus geschichtlichen Gründen als "A-Typ", die mit tiefen Werten als "B-Typ" bezeichnet.

Die Durchlässigkeit der Kontaktmembran formt das Transistorsignal Bei sehr hohen Werten von g_{JM} zeigt das Transistorsignal den Verlauf, des sogenannten "B-Typs". Er bildet das Aktionspotential in fast unveränderter Form ab, zeigt also ebenfalls ein kräftiges Maximum. Deshalb wird dieser Verlauf oder auch als "monophasischen" Typ bezeichnet. Die extreme Leitfähigkeit von $g_{JM} = 6 \text{ mS/cm}^2$ ist bei der angenommenen Situation knapp unterhalb der Schwelle zur spontanen Aktivität.

Mit dichter werdender Membran sinkt die Höhe des Maximums ab, ein Minimum folgt danach, dessen Tiefe zunimmt. Im Extremfall einer elektrisch vollkommen dichten Kontaktmembran mit $g_{JM} = 0 \text{ mS/cm}^2$ zeigt der Transistor den Verlauf der A-Typ-Kopplung. Das Aktionspotential wird kapazitiv zum Transistor übertragen und erscheint deshalb in Form der ersten Ableitung mit einem Maximum und einem Minimum. Das führt zur Bezeichnung "biphasischer" Typ.

Die Abdichtung des Neuro-Chip-Kontakts skaliert das Transistorsignal Während die Durchlässigkeit der passiven Membran die Form des Transistorsignals definiert, skaliert der Abdichtwiderstand g_J die Amplitude des Transistorsignals. In Abbildung 2.10b) wurde bei einer sehr durchlässigen Kontaktmembran mit $g_{JM} = 5 \text{ mS/cm}^2$ die Abdichtung des Neuro-Chip-Kontakts variiert.

2.5.2 Aktiver Kontakt

Nur ein Bruchteil der gemessenen Transistorsignale kann mit passiven Kontaktmembranen erklärt werden. Nimmt man die Kontaktmembran als aktiv an, so treten an die Stelle der passiven Membranleitfähigkeit g_{JM} die relativen Kanaldichten μ_{Na} , μ_K und μ_L . Das Verhalten von passiven Membranen lässt sich auch mit geeigneten Kombinationen von μ_{Na} , μ_K und μ_L darstellen. Für $\mu_{Na} = \mu_K = 0$ besteht der Unterschied nur noch im Umkehrpotential der Leckleitfähigkeit. Abbildung 2.11a) zeigt, dass die Form des Transistorsignals bei geeigneter Abstimmung von g_{JM} und μ_L dadurch nicht wesentlich beeinflusst wird. Mit μ_L lässt sich, wie Abbildung 2.11b) zeigt, als Ersatz für g_{JM} auch der Übergang von mono- zu biphasischen Kopplungen darstellen. So zeigt das Transistorsignal bei $\mu_L = 50$ monophasischen und bei $\mu_L = 0$ biphasischen Charakter.

Na- und K-Kanal bestimmen die Form des Transistorsignals

Die Kontaktmembran wird erst dann aktiv, wenn die spannungsabhängigen Na- und K-Kanäle eingebaut werden, wenn also $\mu_{Na} > 0$ oder $\mu_K > 0$. In Abbildung wurde die relativen Kanaldichten μ_{Na} und μ_K variiert und $\mu_L = 1$ gelassen. Die Werte $\mu_i = 0, 1, 2$ und 5 der Kanaldichten

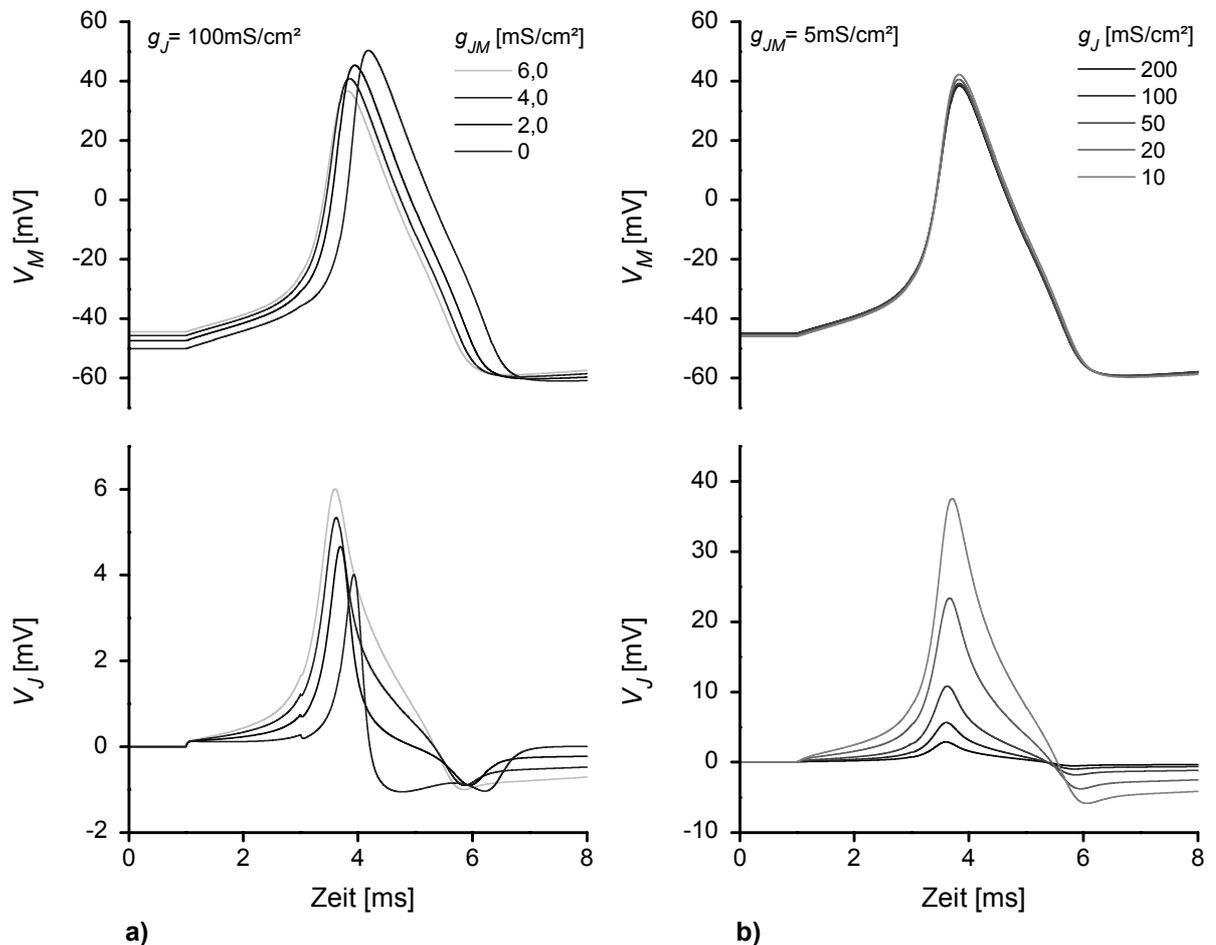


Abbildung 2.10: a) Die spezifische Leitfähigkeit einer passiven Kontaktmembran g_{JM} bestimmt wesentlich die Form des Transistorsignals. b) Die spezifische Abdichtleitfähigkeit g_J stellt hingegen die Amplitude des Signals ein.

stehen jeweils für vollständige Verarmung, Normaldichte, mittlere und starke Anreicherung der Kanäle.

Die Form des Transistorsignals lässt sich hauptsächlich durch zwei Hügel charakterisieren, deren Höhe und Vorzeichen nach Abbildung 2.12 von μ_{Na} und μ_K abhängen. Der erste Hügel taucht zur Zeit des Aktionspotentialanstiegs auf, der zweite hat sein Maximum während der Repolarisation des Zellpotentials und ist deutlich breiter.

Die Amplitude des ersten Hügels wird durch μ_{Na} beeinflusst. Ist in einer Kontaktmembran die Dichte der Na-Kanäle höher als in der freien Membran, so zeigt der erste Hügel nach unten, ist sie kleiner so zeigt er nach oben. Für homogene Na-Kanalverteilung über beide Membrankompartimente ist kein Hügel sichtbar. Aus dem Vorzeichen des ersten Hügels lässt sich also

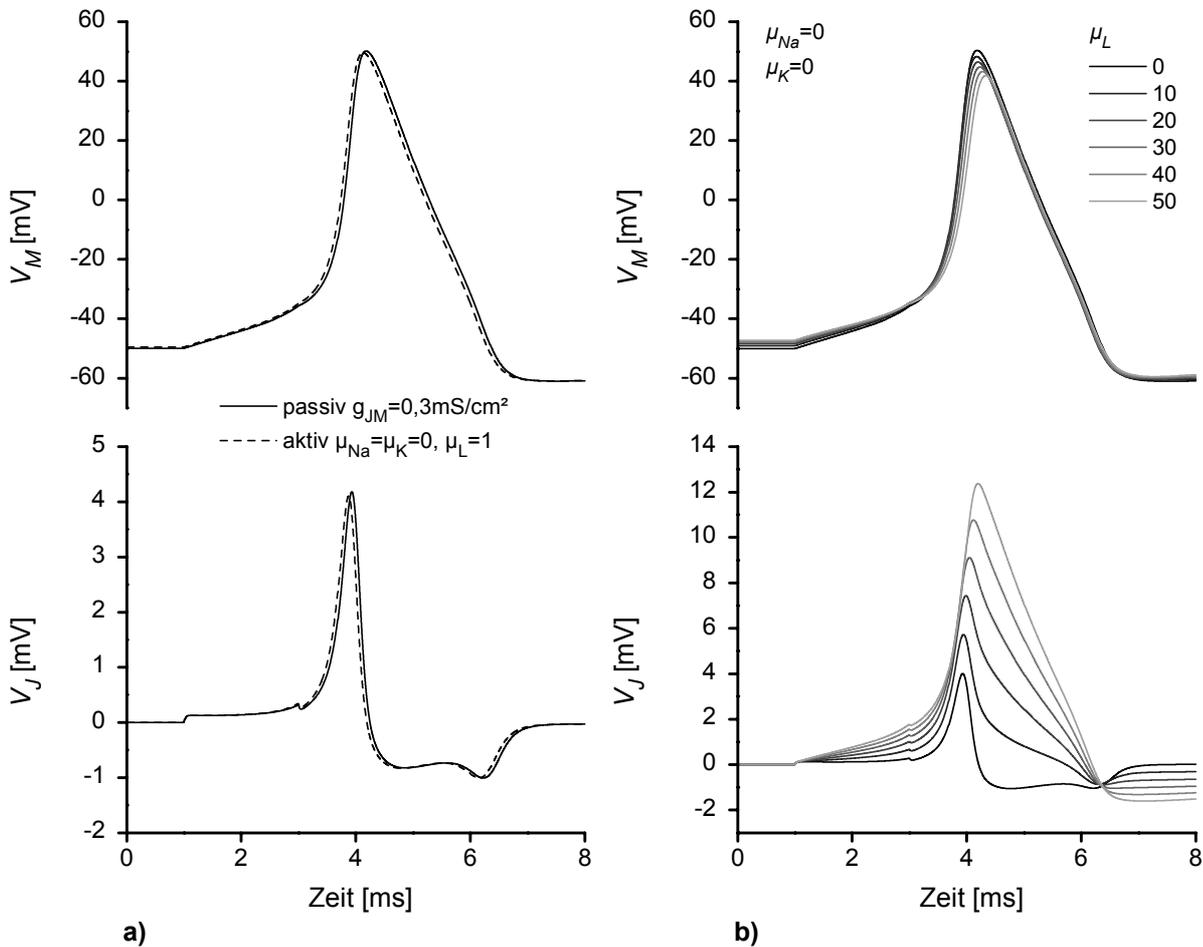


Abbildung 2.11: a) Mit dem Modell einer aktiven Kontaktmembran lassen sich auch passive Kontaktmembranen darstellen, indem $\mu_{Na} = \mu_{Ka} = 0$ gesetzt werden. $g_{JM} = 0,3\text{mS/cm}^2$ entspricht der Leckleitfähigkeit g_L des Hodgkin-Huxley-Modells. b) Der Übergang von biphasischem zu monophasischem Kopplungstyp kann dann durch μ_L realisiert werden.

direkt die Anreicherung oder Verarmung der Na-Kanäle in der Kontaktmembran ablesen. Da er im Vergleich mit dem zweiten Hügel sehr schmal ist, wird er im Folgenden auch als Na-Spitze bezeichnet.

Aus der Höhe und Form des zweiten Hügels lassen sich indirekt Schlüsse über Anreicherung oder Verarmung der K-Kanäle in der Kontaktmembran ziehen. Der zweite Hügel ist positiv, wenn $\mu_K > \mu_{Na}$ und negativ, wenn $\mu_K < \mu_{Na}$. Ist $\mu_K = \mu_{Na}$, so ist er nicht vorhanden. Um über Anreicherung oder Verarmung von K-Kanälen in der Kontaktmembran Aussagen treffen zu können muss also zuerst die relative Na-Kanaldichte aus dem ersten Hügel bestimmt worden sein.

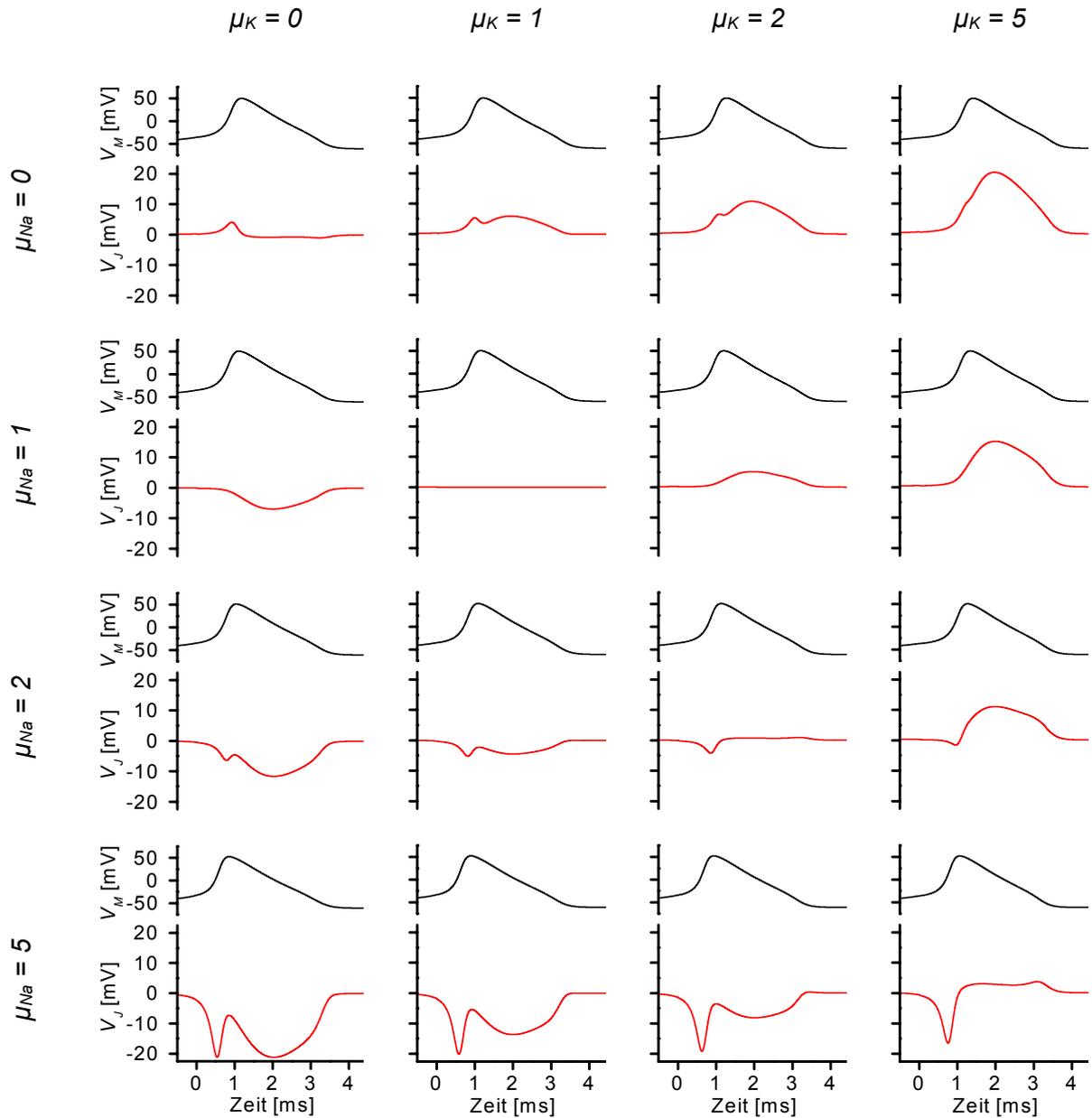


Abbildung 2.12: Variation von μ_{Na} und μ_K spannt einen 2-dimensionalen Raum auf, der fast das ganze Spektrum Kopplungssignale mit aktiven Kontaktmembranen umfaßt. Für alle Diagramme war $\mu_L = 1$.

Kein Signal für homogene Kanalverteilung

Besonders erwähnenswert ist der Fall mit $\mu_{Na} = \mu_K = 1$. Hier verschwinden beide Hügel und der Transistor zeigt fast kein Signal. Sichtbar sind in diesem Fall dann die kleinen Beiträge von "dritten" Strömen wie der Strompuls eines möglichen Current Clamps, der Verschiebungsstrom

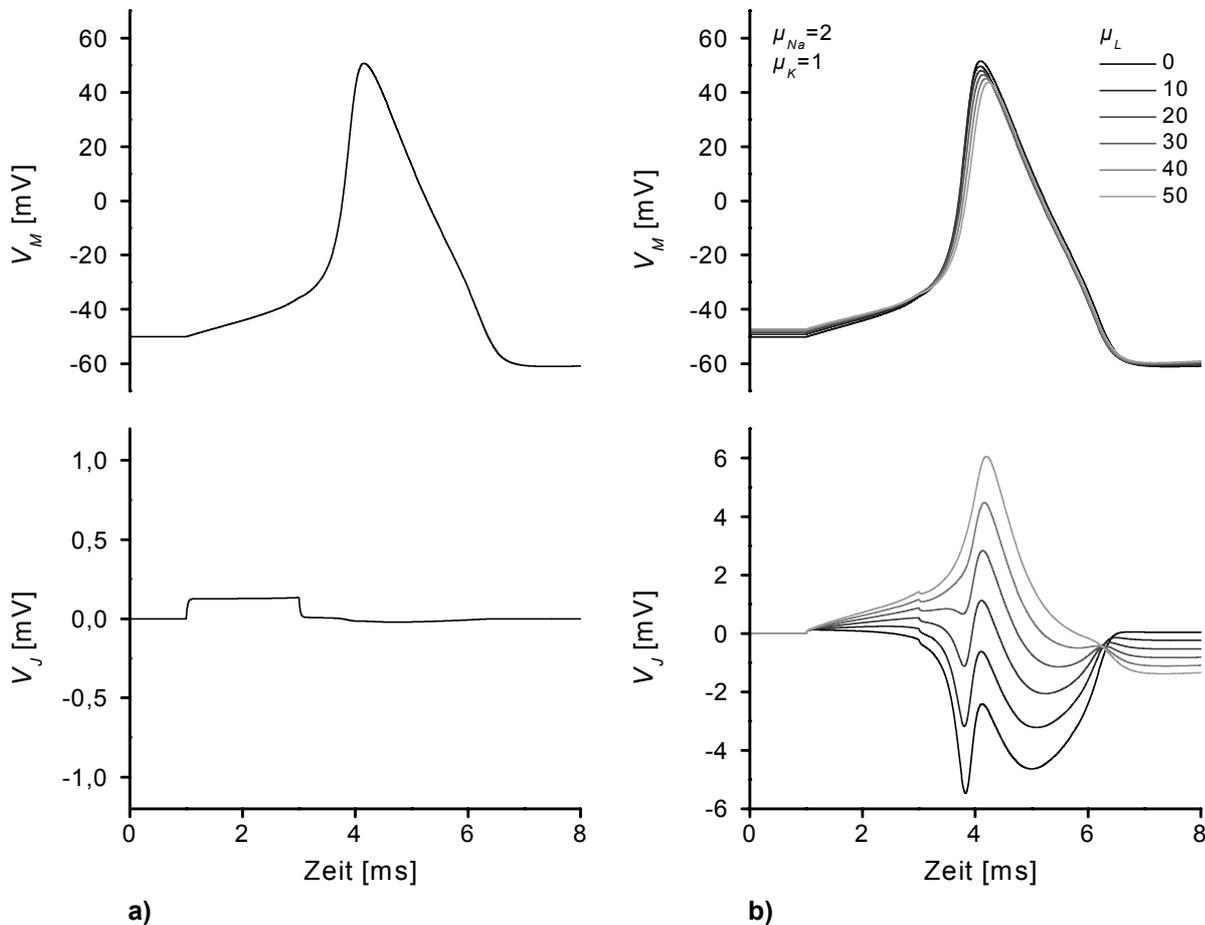


Abbildung 2.13: a) Transistorsignal eines Neurons mit homogener Kanaldichteverteilung. b) Durch zusätzliche Variation von μ_L lassen sich noch weitere Transistorsignalförmigkeiten interpretieren.

einer kapazitiven Stimulation oder der Strom durch synaptische Verbindungen. Die Höhe dieser Signale ist jedoch so klein, dass ihr Beitrag im Experiment nur selten sichtbar wird.

Leckdominierte Kontaktmembranen Angenommen wurde bisher, dass die Leckleitfähigkeit μ_L keine deutlich größeren Werte als μ_{Na} und μ_K annimmt. Setzt man dennoch hohe Werte ein, so nähert sich die Form des Transistorsignals immer mehr der des Aktionspotentials. In leckdominierten Kontaktmembranen kann der Einfluss der spannungsabhängigen Kanäle vernachlässigt werden. Das entspricht der Situation einer passiven Membran mit erhöhter Leitfähigkeit, also dem oben gezeigten B-Typ.

Die eindeutige Formanalyse von Transistorsignalen wird bei höheren Werten von μ_L erschwert. Besonders Kontaktmembranen mit starker K-Kanal-Anreicherung sind schlecht von undichten, passiven Membranen zu unterscheiden.

Vollständig verarmte Kontaktmembranen Im Fall von vollständig verarmten Kontaktmembranen (Graphen links oben in Abbildung 2.12) ist wegen $\mu_{Na} = \mu_K = 0$ nur passives Verhalten zu erwarten. Das zeigt der bereits angestellte Vergleich von Abbildung 2.11a).

Modelleigenschaften

Relative Kanaldichten Im Modell wird der Zustand der freien Membran als konstant angenommen. Damit lässt sich bequem der Wert der relativen Kanaldichten μ_i in Form von Anreicherung und Verarmung der Kanaldichten in der Kontaktmembran veranschaulichen. Treten nun Veränderungen im Transistorsignal auf, kann allerdings keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden in welchem Membrankompartiment die absolute Veränderung stattgefunden hat. Die Anreicherung eines Kanals in der Kontaktmembran hat den gleichen Einfluß auf das Transistorsignal wie die Verarmung dieses Kanals in der freien Membran. Um die Interpretation der gemessenen Transistorsignale nicht zu erschweren, wird davon ausgegangen, daß Veränderungen am ehesten in der Kontaktmembran stattfinden.

Einschränkungen durch das Hodgkin-Huxley-Modell Das für die Membrankompartimente verwendete Hodgkin-Huxley-Modell ist eigentlich zur Modellierung des Riesentintenfischaxons erstellt worden. Für die verwendeten Neurone aus *Lymnaea stagnalis* liegen keine detaillierten Beschreibungen von Membran- und Kanalzusammensetzung vor. Besonders die Aktionspotentialformen, der später noch charakterisierten Typ-2-Neurone, lassen sich nicht mit dem Hodgkin-Huxley-Modell erzeugen. Modelle von Gastropoden, die auf Voltage-Clamp-Daten beruhen, erweitern das Hodgkin-Huxley-Modell um einen weiteren K-Kanal (A-Typ) und weisen dem "Hodgkin-Huxley"-K-Kanal Inaktivierungsfähigkeit zu [14].

Dementsprechend lassen sich nicht alle Transistorsignale, besonders jedoch die von Typ-2-Neuronen, durch das bestehende Zwei-Kompartiment-Modell interpretieren.

2.6 Signalübertragung mit zwei Neuronen

Zur Modellierung eines vollständigen Übertragungswegs mit zwei Neuronen werden das postsynaptische und das präsynaptische Neuron durch den synaptischen Widerstand mit der Leitfähigkeit G_{Syn} miteinander verbunden.

Mechanismus Durch ein präsynaptisches Aktionspotential entsteht eine Spannungsdifferenz zu einem postsynaptischen Neuron, das sich anfänglich auf Ruhepotential befindet. Über die Synap-

se fließt damit, skaliert durch γ , ein synaptischer Strom, der das postsynaptische Neuron depolarisiert. Ab einer Mindestsynapsenstärke γ_{MIN} ist während des präsynaptischen Aktionspotentials der synaptische Strom zum postsynaptischen Neuron so groß, dass dort ein Aktionspotential entsteht.

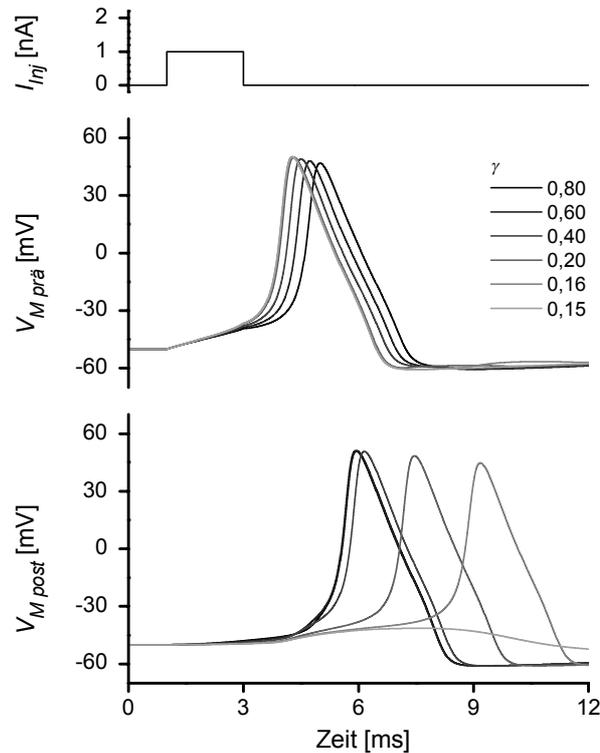


Abbildung 2.14: Variation der relativen Synapsenstärke γ . Wird γ kleiner so erhöht sich die Latenzzeit zwischen prä- und postsynaptischem Aktionspotential bis bei γ_{MIN} kein postsynaptisches Aktionspotential mehr folgt.

Verzögerungszeit Abbildung 2.14 zeigt, dass, wie bei der Stromstimulation eines Einzelneurons, ein synaptischer Strom die Latenzzeit des postsynaptischen Aktionspotentials verkürzt. Die Mindestsynapsenstärke liegt hier im Bereich $0,15 < \gamma_{MIN} < 0,16$. Für sehr leitfähige Synapsen ist die Verzögerungszeit so kurz, dass der Unterschied zwischen prä- und postsynaptischem Aktionspotential nur noch im Phasenraum sichtbar ist. Trägt man das Potential des präsynaptischen Neurons als Ordinate auf, so spiegelt die rechtslaufende Phasenkurve die Synapsenrichtung wieder. Für sehr große γ fällt die Keule zu einer Linie in Richtung der Winkelhalbierenden zusammen. Die enge Kurve der Keulenspitze nähert sich dabei von unten der Winkelhalbierenden und zeigt an, dass das Maximum des postsynaptischen Aktionspotentials nach dem Maximum des präsynaptischen Aktionspotentials folgt.

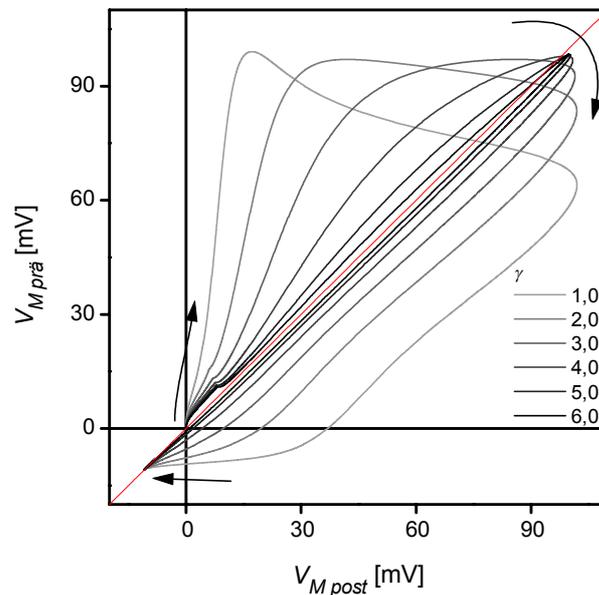


Abbildung 2.15: Darstellung der prä- und postsynaptischen Potentialverläufe in einem Phasendiagramm für große Werte von γ . Die Kurve nähert sich der Winkelhalbierenden für steigendes γ . Die Phase der Strominjektion nach dem Start bleibt in allen Fällen noch deutlich sichtbar.

Während der Hauptphase des postsynaptischen Aktionspotentials kehrt sich die Spannungsdifferenz um und der synaptische Strom fließt vom postsynaptischen Neuron ins präsynaptische. Dabei trifft er jedoch auf die präsynaptische Refraktärzeit, so dass selbst bei großen Verzögerungszeiten der Aktionspotentiale eine erneute Auslösung eines präsynaptischen Aktionspotentials nicht modellierbar ist.

Während der präsynaptischen Strominjektion hebt sich das präsynaptische Membranpotential, so dass das Neuron einen Teil des Injektionsstroms an das postsynaptische Neuron abgibt. Dadurch steigt die präsynaptische Latenzzeit an, was einen kleinen Beitrag zur Verzögerungszeit zwischen beiden Aktionspotentialen liefert.

Last für präsynaptisches Neuron Mit ansteigender Synapsenleitfähigkeit fließt ein immer größerer Teil des präsynaptischen Stimulationstroms in die postsynaptische Zelle. Bei zu schwachen Stimulationen kann dies dazu führen, dass im präsynaptischen Neuron und damit auch im postsynaptischen Neuron kein Aktionspotential entsteht. Während bei Strominjektionen durch Pulslänge und -höhe fast beliebig große Ladungen in das präsynaptische Neuron gebracht werden können, ist dies bei kapazitiver Stimulation durch die begrenzte Reizspannung und die begrenzten Kapazitäten nicht möglich.

Präsynaptische Reizung

Die Anregung eines Systems aus zwei Neuronen mit einer positiven Flanke auf präsynaptischer Seite zeigt Abbildung 2.16. Der präsynaptische Reizartefakt wird durch die Synapse nur so schwach weitergeleitet, dass er im postsynaptischen Membranpotential nicht mehr auszumachen ist. Die Übertragung eines kapazitiv stimulierten Aktionspotentials wird also durch den ursprünglichen Reiz nicht unterstützt, sondern nur vom präsynaptischen Aktionspotential gesteuert.

Wie auch bei Strominjektion gibt es hier eine Schwelle γ_{MIN} , unterhalb der kein postsynaptisches Aktionspotential entsteht. Der synaptische Strom ist in dieser Situation so gering, dass das postsynaptische Membranpotential nicht über die Schwelle gehoben wird.

Ist hingegen eine starke Synapse vorhanden, so führt jede präsynaptische Potentialanhebung zu einem abfließenden, synaptischen Strom, der den Aufbau eines präsynaptischen Aktionspotentials deutlich behindert. In Abbildung 2.16 hebt der synaptische Strom das postsynaptische Potential schon um mehrere Millivolt an bevor noch das präsynaptische Aktionspotential abläuft. Der Einfluss des Reizpulses ist hingegen schon nach der sehr kurzen Zeit τ_M nach der Flanke abgeklungen, so dass der erhöhte, synaptische Strom nicht durch verlängerte Strominjektion ausgeglichen werden kann.

Bei zu großen Synapsenstärken hat dies zur Folge, dass der präsynaptische Potentialanstieg verfrüht abbricht und kein präsynaptisches Aktionspotential entsteht. Damit entsteht natürlich auch kein postsynaptisches Aktionspotential. Damit existiert eine Schwelle γ_{MAX} für die Synapsenstärke, oberhalb der kein postsynaptisches Aktionspotential entsteht, weil sich schon kein präsynaptisches Aktionspotential ausgebildet hat.

Die Übertragung von Aktionspotentialen ist also nur für Synapsenstärken γ möglich, die im Bereich von $\gamma_{MIN} < \gamma < \gamma_{MAX}$ liegen.

Einfluss des präsynaptischen Zustands auf die Übertragung

Nachdem weiter oben schon gezeigt wurde, wie günstig eine gut leitende oder stark Na-Kanalbesetzte Kontaktmembran für die Reizung ist, soll hier deren Einfluss auf die synaptische Übertragung untersucht werden. Es stellt sich die Frage wie die Grenzen γ_{MIN} und γ_{MAX} , die den Übertragungsbereich eines Aktionspotentials beschränken, vom Ausgangszustand des präsynaptischen Neurons abhängen.

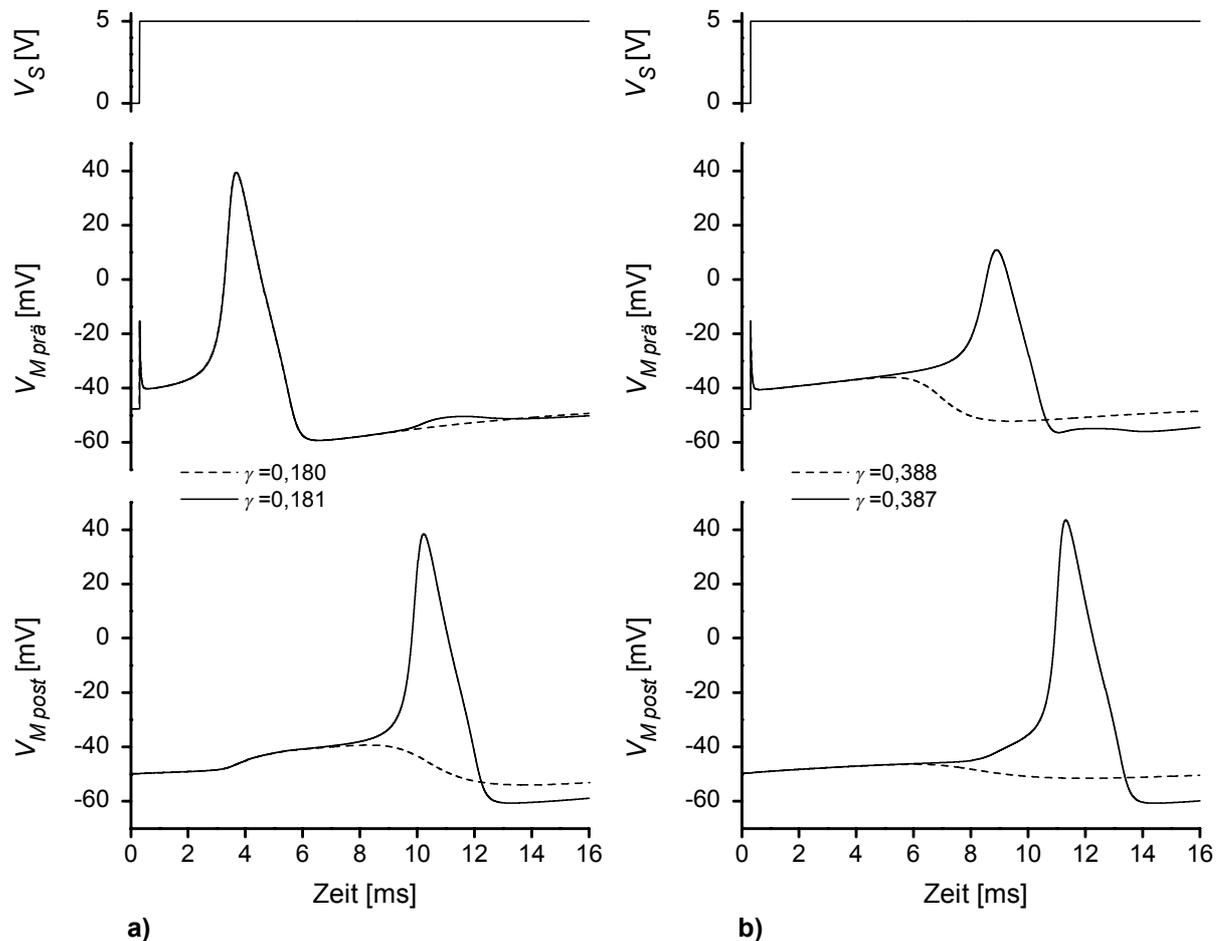


Abbildung 2.16: Die synaptische Übertragung von Aktionspotentialen findet nur in einem begrenzten Bereich der Synapsenstärke γ statt. a) Zu schwache Synapsen verhindern ein Aktionspotential auf post-synaptischer Seite. b) Zu starke Synapsen belasten das präsynaptische Neuron so stark, daß kein Aktionspotential entsteht.

Um eine übersichtliche Situation zu bewahren, wurde in den folgenden Modellierungen dem post-synaptischen Neuron die Standardwerte zugewiesen und nicht verändert. Das Gesamtverhalten eines Neurons bei Anregung mit Rechteckpulsen wurde wieder zerlegt in die Reaktion auf negative und positive Flanken. Wie schon gezeigt, hängt die Reizbarkeit eines Neurons je nach Vorzeichen des Reizpulses von der Leckleitfähigkeit μ_L oder der relativen Natriumkanaldichte μ_{Na} ab. Für negative Flanken ist die Besetzung der Kontaktmembran mit Na-Kanälen das Reizbarkeitskriterium. Für positive Flanken ist es die relative Leckleitfähigkeit. Es wurden die Synapsenstärken γ_{MIN} und γ_{MAX} ermittelt, an denen gerade noch ein postsynaptisches Aktionspotential entsteht. So werden für Synapsenstärken oberhalb der Kurven mit den gefüllten Kreisen keine Aktionspotentiale übertragen, weil kein präsynaptisches Aktionspotential entsteht. Für Synapsenstärken

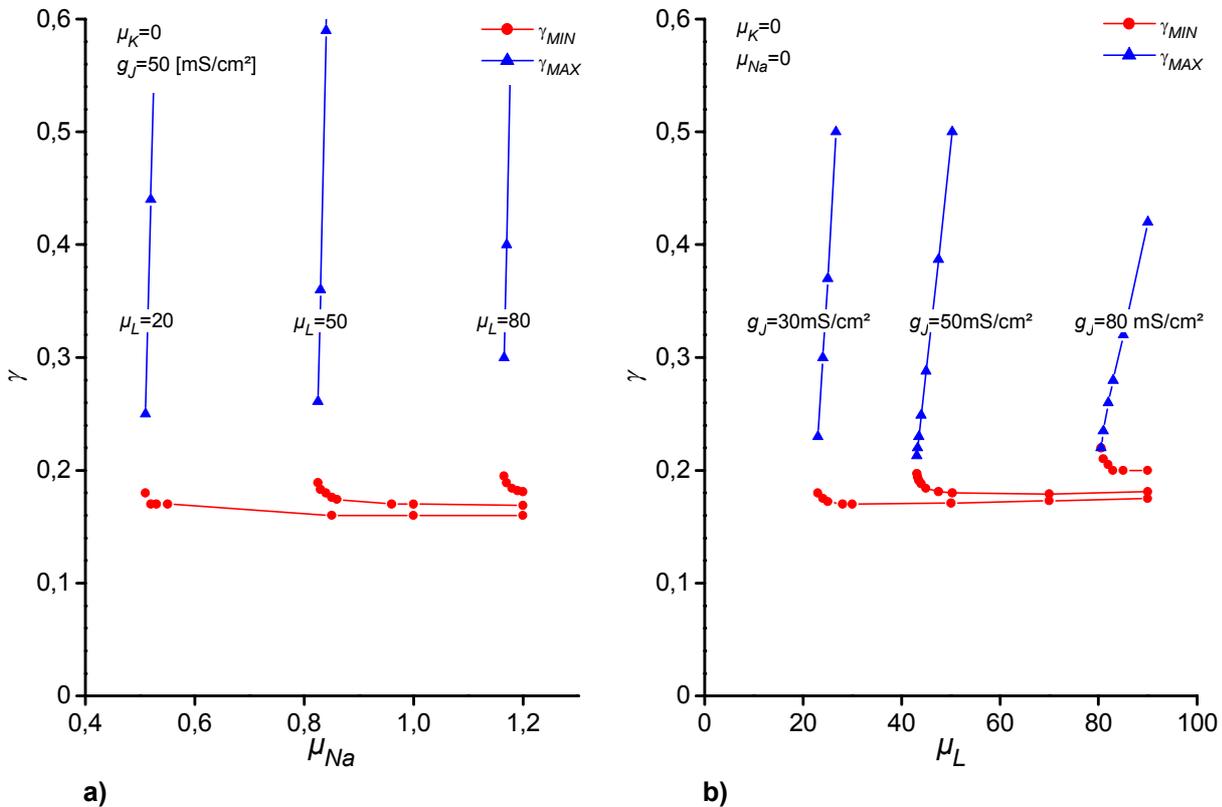


Abbildung 2.17: Die Übertragung eines Aktionspotentials hängt je nach Vorzeichen der Reizflanke von den Anregebarkeitsparametern des präsynaptischen Neurons μ_{Na} bzw. μ_L sowie von der Synapsenstärke γ ab. Es werden nur Aktionspotentiale übertragen für Punkte unterhalb der Kurve mit den Dreiecken und oberhalb der Kurve mit den Kreisen. a) Anregung mit einer negativen Spannungsflanke. b) Anregung mit einer positiven Spannungsflanke.

unterhalb der Kurven mit den gefüllten Dreiecken entsteht ein prä- aber kein postsynaptisches Aktionspotential mehr.

Anregung mit negativen Flanken Bei negativen Flanken wurde die Leckleitfähigkeit und die Na-Kanal-Besetzung der präsynaptischen Kontaktmembran variiert. Die untere Schwelle für Aktionspotentiale bleibt fast unabhängig von μ_L und μ_{Na} , also vom Zustand der präsynaptischen Zelle. Die Obergrenze jedoch wird von der Leckleitfähigkeit der präsynaptischen Kontaktmembran bestimmt. Die Kurven für γ_{MAX} verlaufen beinahe senkrecht und definieren dadurch eine Untergrenze von μ_{Na} , ab der überhaupt erst eine erfolgreiche Übertragung von Aktionspotentialen möglich ist. Diese Untergrenze von μ_{Na} hängt wiederum fast nicht von der Synapsenstärke γ ab. Für größer werdendes μ_L ist eine höhere Besetzung der präsynaptischen Kontaktmembran mit Natriumkanälen notwendig. Diese annähernd lineare Beziehung zwischen μ_L und μ_{Na} für die Übertragung eines Aktionspotentials wurde schon bei der Reizbarkeit eines Einzelneurons

in Abbildung 2.9 beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die Kurve für γ_{MAX} und damit das Minimum von μ_{Na} , ab dem postsynaptische Aktionspotentiale entstehen, von der präsynaptischen Zelle bestimmt werden.

Anregung mit positiven Flanken Für positive Flanken wurde in Abbildung 2.17 der Reizbarkeitsparameter μ_L als Abszisse gewählt. Auch hier hängt die minimal notwendige Synapsenstärke γ_{MIN} fast nicht vom Reizbarkeitsparameter der entsprechenden präsynaptischen Einzelzelle ab. Variiert wurde hier als zweiter präsynaptischer Parameter die spezifische Abdichtleitfähigkeit g_J . Sie bestimmt den Minimalwert von μ_L , ab dem von positiven Flanken ein Aktionspotential ausgelöst wird und synaptisch übertragen wird. Er hängt nur schwach von der Synapsenstärke aber dafür von g_J ab.

Detektion synaptisch verbundener Neurone

Der synaptische Strom beeinflusst auch das Potential im Kontaktbereich beider Neurone zum Chip. Wie weiter oben schon diskutiert, gehört der synaptische Strom zu den "dritten" Strömen, deren Einfluss dann gut sichtbar wird, wenn $\mu_{Na} = \mu_K = 1$ ist, das Neuron also eine homogene Membran aufweist. In Abbildung 2.18 wurden zwei Standardneurone durch eine schwache Synapse verbunden, deren Stärke knapp über γ_{MIN} lag. Dadurch wurde die synaptische Verzögerungszeit so groß, dass sich die prä- und postsynaptischen Aktionspotentiale zeitlich nicht mehr überlappten.

Das präsynaptische Neuron wurde mit einem einwärts gerichteten Strompuls stimuliert und der präsynaptische Transistor bildet ein positives Rechteck ab. Danach folgt das präsynaptische Aktionspotential, während dessen das präsynaptische Neuron Strom an das postsynaptische abgibt. Der gleiche Transistor zeigt nun den Stromverlust durch einen Signaleinbruch an. Bei Auftauchen des postsynaptischen Aktionspotentials dreht sich der Zustand um und der einfließende, synaptische Strom wird als positiver Hügel verzeichnet. Gleiches, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen, gilt für den postsynaptischen Transistor. Anstelle des Rechtecks des präsynaptischen Injektionsstroms taucht hier nur der schwache, präsynaptische Stromabfluss während der Injektionszeit auf.

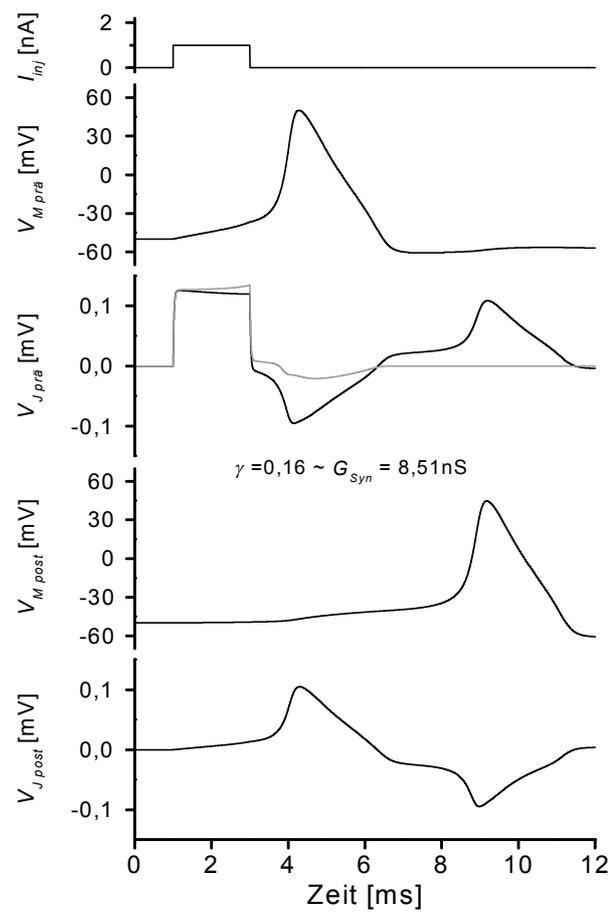


Abbildung 2.18: Der synaptische Strom tritt als "dritter Strom" in den Transistorsignalen des prä- und postsynaptischen Neurons auf. Sein Einfluß ist jedoch sehr schwach.

Kapitel 3

Chipdesign

Hat man bei hybriden Netzen als erstes eine Funktion im Auge, die durch einen elektrischen Übertragungsweg definiert ist, so zeigt sich bei der Realisierung, dass neben funktionierenden Schnittstellen die Topologie, also die Anordnung der Elemente, wichtig wird. Es müssen zwei Systeme aufeinander abgestimmt werden. Auf biologischer Seite muss ein geeigneter neuronaler Zellverband ausgewählt und optimiert, auf Halbleiterseite müssen Detektions- und Stimulationsstrukturen richtig dimensioniert und angeordnet werden. Um den Anforderungen beider Systemhälften gleichzeitig gerecht zu werden ist es vorteilhaft sich eine abstrakte Vorstellung eines Netzwerkes zu machen. Da der Einsatz von Halbleiterelementen eine planare Situation begünstigt, reicht eine zweidimensionale Vorstellung.

Zu den wesentlichen Merkmalen der extrazellulären, planaren Kontaktierungen gehört, dass die Lage der Schnittstellen einmal festgelegt wird und sich nachträglich nicht mehr an die Morphologie des jeweiligen Netzwerkes anpassen lässt. Dieser strukturelle Nachteil verleiht dem Entwurf einer optimalen Halbleiterstruktur besonderes Gewicht. Vor dem Chipdesign steht also eine morphologische Analyse der neuronalen Netze häufig verwendeter Zellkulturformen.

3.1 Eigenschaften realer, neuronaler Netze

Wenn man neuronale Gewebe unter dem Gesichtspunkt ihrer Netzwerktopologie betrachtet, dann kann man die Somata als Knoten eines Netzes ansehen, welche durch abstrakte Eigenschaften, wie z.B. Gesamtzahl, Dichte, räumliche Ausdehnung und mittlere Zahl der Verknüpfungen, beschrieben werden können. Art und Einstellung der verwendeten Zellkultur bestimmen somit die Strategie mit der die Gewebe kontaktiert werden.

Zahl der Knoten

Werden z.B. Hirnschnitte von Vertebraten verwendet, so ist, unabhängig davon, ob Feld- oder Einzelzelpotentiale aufgezeichnet werden, eine hohe Schnittstellenzahl sicherlich wünschenswert. Die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Kontakts wird nach dem "Schrotschußprinzip"

schon allein durch eine hohe Schnittstellenzahl angehoben. Gleiches gilt für Kulturen aus Zellsuspensionen.

Die Kultur individueller Nervenzellen erlaubt es hingegen mit wenigen Schnittstellen zu arbeiten. Jede Zelle wird einzeln herauspräpariert, so dass bei gängigen Präparationszeiten nicht mit mehr als ein paar Dutzend Zellen zu rechnen ist.

Knotendichte

Während bei organotypischen Kulturen per Definition die Knotendichte vorgegeben ist, lässt sie sich bei Zellsuspensionen und Einzelzellkultur durch präparative Techniken einstellen. Der Fall geringer Zelldichte entspricht einer geringen Strukturintegration, die technisch leichter zu bewältigen ist. Sie ist allerdings auf biologischer Seite nach unten begrenzt. Neurone und Helferzellen zeigen kooperatives Verhalten, das unterhalb einer Mindestdichte nicht mehr möglich ist [9].

Bei Einzelzellkultur ist es jedoch durchaus möglich wenige Zellen zu kultivieren. Da in den meisten Fällen zusätzlich Wachstumsfaktoren zugegeben werden, hat der Abstand dieser Zellen keinen Einfluß auf die Wachstumseigenschaften. Hier kann sich die Dimension der Gesamtstruktur also ausschließlich nach der erwarteten Größe der Neuritenbäume richten.

Anordnung

Auch hier unterscheiden sich stark die organotypischen Kulturen und Suspensionskulturen auf der einen und Einzelzellkulturen auf der anderen Seite. Wesentliches Merkmal von organotypischen Kulturen ist die Übernahme der In-Vivo-Konfiguration des neuronalen Netzes. Bei Suspensionskulturen wird zwar eine neue Anordnung der Neurone erreicht, aber eine genaue Positionierung der dort eingesetzten, kleinen Neurone ist nur schwer möglich.

Bei Einzelzellkulturen werden im Regelfall sehr große Neurone verwendet, die im Lichtmikroskop leicht erkennbar und auch einzeln gut handhabbar sind. Sie lassen sich deshalb an definierte Stellen setzen und benötigen keine besonders angepasste Chipstruktur. Eine flächenhafte Verteilung ist ausreichend.

Ausdehnung der Knoten

Die Frage nach der Größe der Neurone spielt nicht nur bei der Positionierung eine Rolle, sondern auch bei der erwarteten Auflagefläche. Die Ausdehnung der Neurone definiert damit die Größe der bidirektionalen Doppelstruktur aus Transistor und Reizspot. Die Aufteilung der Auflagefläche

in Reizspot und Transistor hängt von den besonderen Eigenschaften der Einzelschnittstellen ab und wird im Folgenden diskutiert.

3.2 Die Einzelschnittstellen

Feldeffekttransistor

Die neuronale Aktivität wird mit Feldeffekttransistoren (FETs) detektiert. Ihr Aufbau ist eine Abwandlung der in Computern verbreiteten MOSFETs. Anstatt die Oberfläche des Gateoxids zu metallisieren liegt direkt der Elektrolyt des Badmediums an.

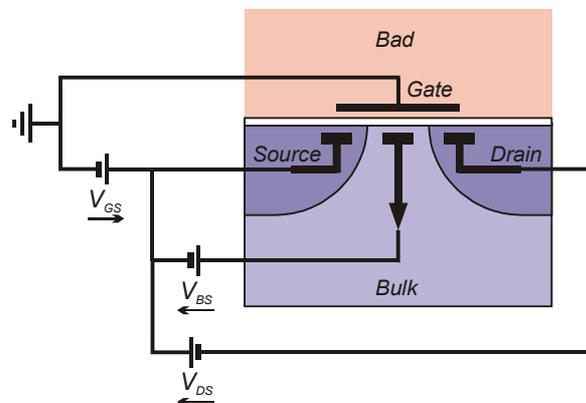


Abbildung 3.1: Beschaltung eines n-Kanal-Anreicherungs-FETs. Im Gegensatz zu traditioneller FET-Beschaltung liegen Bulk und Source nicht auf gleichem Potential.

Die FETs wurden als p-Kanal-Anreicherungs-FETs realisiert. Dabei sind in einem n-dotierten Substrat die Zuleitungsbahnen von Drain und Source mit Bor p-dotiert. Zum Betrieb werden die zwei Spannungen V_{DS} zwischen Drain und Source sowie V_{GS} zwischen Elektrolyt und Bulk angelegt. In einem Anreicherungs-FET fließt bei $V_{GS} = 0\text{ V}$ kein Strom I_{DS} zwischen Drain und Source, da zwei p-n-Übergänge gegeneinander geschaltet sind. Erst unterhalb eines bestimmten Werts von V_{GS} bildet sich unter dem Gateoxid ein Kanal aus, in dem die Löcherkonzentration größer als die Elektronenkonzentration ist, der also damit die beiden p-Gebiete Drain und Source über einen p-Kanal leitend verbindet. Nach Anlegen von $V_{DS} \neq 0$ fließt ein Strom I_{DS} unter dem Gateoxid hindurch, dessen Größe von V_{DS} und V_{GS} bestimmt wird.

Der Drain-Source-Strom I_{DS} hängt über bauartbedingte Parameter von V_{DS} und V_{GS} ab. Mit ansteigendem $|V_{DS}|$ verändert sich der p-Kanal und damit das Verhalten des Transistors. Der

Betriebsmodus von Feldeffekttransistoren wird deshalb anhand von V_{DS} in die Bereiche: Triodenbereich, Abschnürung und Sättigungsbereich unterteilt.

Für die Detektion von Neuronen ist der Triodenbereich $0 \leq V_{DS} \ll V_{GS} - V_T$ interessant, da dort nach [25] der Drain-Source-Strom I_{DS} linear von V_{GS} abhängt:

$$I_{DS} = \beta \left[(V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right] \quad (17)$$

mit

$$\beta = \varepsilon_{ox} \varepsilon_0 \mu_p \frac{b}{l d} \quad (18)$$

Der Wert V_T gibt die Schwellspannung von V_{GS} an, bei der ein merklicher Strom I_{DS} einsetzt. In die Bauart des Transistors geht die Dielektrizitätskonstante ε_{ox} und die Dicke d des Gateoxids, die Löcherbeweglichkeit μ_p im Bulk und die Breite b , die Länge l des Kanals ein.

Damit ist ein Feldeffekttransistor in der Lage Potentialänderungen an der Oberfläche des Gateoxids in Modulationen des Drain-Source-Stroms I_{DS} linear umzusetzen.

Für die Messtechnik ist die Abhängigkeit von V_{GS} interessant:

$$\left. \frac{\partial I_{DS}}{\partial V_{GS}} \right|_{V_{DS}=const.} = \beta V_{DS} \quad (19)$$

Das Produkt aus der Empfindlichkeit β und der Spannung V_{DS} wird als Steilheit bezeichnet. Ist die Steilheit bekannt, so lässt sich aus I_{DS} auf die Spannung V_{GS} zurückrechnen.

Sitzt ein Neuron dicht auf dem Gategebiet eines Feldeffekttransistors, so addiert sich auf die angelegte Spannung V_{GS} die Spannung V_J zwischen dem Neuro-Chip-Spalt und dem Bad. Da V_{GS} konstant anliegt, geben Änderungen des Drain-Source-Stroms I_{DS} die Änderungen von V_J direkt wieder.

$$\Delta V_J = Steilheit^{-1} \cdot \Delta I_{DS} \quad (20)$$

Reizspot

Der Reizspot stellt einen Kondensator dar, der auf der Oberseite vom Badelektrolyt und von der Unterseite durch p-dotierte Bahnen kontaktiert wird. Die p-Bahnen haben nur dann den Charakter einer isolierten Zuleitung, wenn der p-n-Übergang zum n-dotierten Substrat des Chips gesperrt

ist. Eine Reizzuleitung muss auch bei angelegtem Reizsignal immer auf niedrigerem Potential liegen als das Substrat. Nur dann kann selektiv gereizt werden.

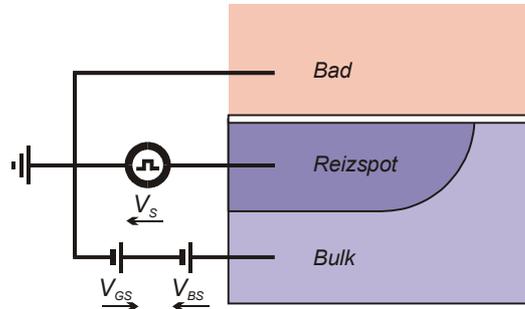


Abbildung 3.2: Beschaltung der Reizspots. Das Potential des Bulkgebiets wird bezüglich des Source-Potentials gesetzt. Das Potential des Reizspots wird von der Spannung eines Funktionsgenerator gegenüber Masse gesetzt.

Zur Sperrung des p-n-Übergangs wird eine positive Spannung V_{BS} zwischen Bulk und Source gelegt. Das hat den Vorteil, dass unabhängig vom gewählten Arbeitspunkt des FETs auch die p-n-Übergänge von Drain und Source gesperrt sind. Die Halbleiter-Oxid-Elektrolytstruktur eines Reizspots kann durch anodische Oxidation korrodieren, wenn eine positive Spannung vom Halbleiter über das Oxid abfällt. Für den Spannungsbereich der Reizpulse V_S , die bezüglich Masse angelegt werden, bedeutet dies:

$$0 < V_S < V_{BS} - V_{GS} \quad (21)$$

Da Neurone kapazitiv stimuliert werden, stellt es keine Funktionseinschränkung dar, wenn V_{Reiz} nur positive Werte annimmt.

Die Potentialdifferenz V_{BS} zwischen Bulk und Source beeinflusst das Transistorverhalten nach [25] durch eine Verschiebung der Schwellspannung um ΔV_T :

$$\Delta V_T \sim \sqrt{V_{BS}} \quad (22)$$

Bei der Charakterisierung der Chipeigenschaften muss also die für den Reizbetrieb notwendige Spannung V_{BS} bereits anliegen.

3.3 Die bidirektionale Struktur

Die Einzelemente eines Neurochips kennzeichnet, dass sie jeweils ausschließlich in eine Richtung arbeiten. Das bedeutet, dass ein Reizspot nur stimuliert, ein FET nur detektiert. Diese Funktionalität immer nur einem Neuron zuzuordnen würde die Struktur des Netzwerks schon vorwegnehmen. Neurone auf Reizspots hätten immer präsynaptische Funktion, Neurone auf FETs postsynaptische. In [41] ist schon gezeigt worden, dass Reiz- und FET-Struktur gemeinsam unter einem Neuron angeordnet werden können. Mit dieser bidirektionalen Struktur kann ein Neuron gleichzeitig gereizt und detektiert werden. Somit kann dieses Neuron auf prä- und postsynaptischer Seite des Übertragungswegs sitzen.

Der Ausgangspunkt bei der Entwicklung der Chipstruktur ist diese Kombination aus Reizspot und FET. Ihre Gesamtgröße wird durch die Auflagefläche eines durchschnittlichen Neurons bestimmt. Nimmt man ein kugelförmiges Neuron mit $50\ \mu\text{m}$ Durchmesser, so ergibt eine glaubwürdige Abflachung eine kreisförmige Auflagefläche von $20\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Diese Fläche wurde unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Funktion von FET und Reizspot aufgeteilt. Für den FET bedeutet dies ein bestmögliches Signal-Rausch-Verhältnis, für den Reizspot eine möglichst hohe wirksame Kapazität.

Rauscharme FETs

Als erstes wird ein Transistor mit möglichst hoher Steilheit angestrebt. Bei gleichem Feld erzeugt eine höhere Steilheit eine höhere Modulation des Drain-Source-Stromes und damit ein höheres Messsignal.

Aus Gleichung 17 liest man ab, dass breite und kurze Gates hohe Steilheiten liefern. Gateoxid-dicke und -material gehen in die laterale Struktur nicht ein. Die kleinstmögliche Kanallänge entspricht dem minimalen Abstand zweier p-n-Übergänge und wird durch den Herstellungsprozess bestimmt. Es bleibt zur Optimierung also noch die Kanalbreite übrig. Die Kanalbreite ist nach oben durch den Durchmesser der Auflagefläche beschränkt. Ein FET mit einem maximal breiten Kanal würde allerdings keinen Raum mehr für umgebende Reizspots bieten.

In diesem Zusammenhang ist die Kanalrichtung des FETs auszuwählen. Wie Abbildung 3.3 zeigt, kann er senkrecht oder quer zur Source-Drain-Richtung liegen. Die Breite eines querliegenden Kanals kann vergrößert werden, ohne die Gesamtbreite des Transistors zu erhöhen und damit Platz für Reizspots zu verbrauchen. Mit einer linearen Wiederholung dieser Anordnung können sehr gut Strukturen zur orts aufgelösten Vermessung von Spannungsprofilen in planaren

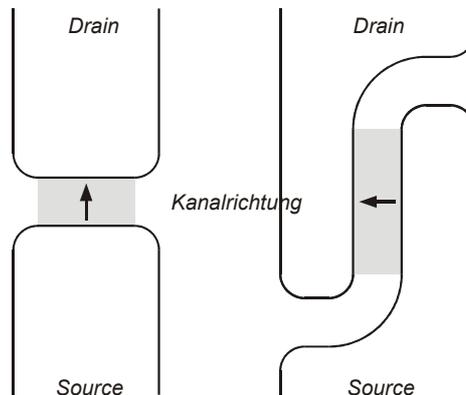


Abbildung 3.3: FET-Konfigurationen mit Kanalrichtung längs und quer zur Zuleitungsrichtung.

Kabeln gebaut werden [35], [18], [26]. Es ist jedoch nicht sinnvoll den erwarteten Auflagedurchmesser eines Neurons für die Kanalbreite auszuschöpfen. Je größer die Fläche des Kanals ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein fehlpositioniertes Neuron den Transistor nicht vollkommen abdeckt, was zu einem geringeren Transistorsignal führen kann.

Aus dem Parameterdreieck Steilheit-Rauschen-Platzverbrauch wurde die Lösung mit dem geringsten Rauschen ausgewählt, wo der Kanalrichtung in klassischer Weise in Source-Drain-Richtung liegt. Zwischen Steilheit, also Kanalbreite, und Platzverbrauch wurde ein mittlerer Ausgleich gefunden mit einem Kanal von $6\ \mu\text{m}$ Breite und $1,8\ \mu\text{m}$ Länge.

Zentrierte Reizspots

Mit einem FET von nur $6\ \mu\text{m}$ Breite kann noch viel Auflagefläche für die Reizspots reserviert werden. Als optimale Anordnung von FET und Reizspot wurde vom bisherigen Konzept [40] abgewichen, wo der Transistor neben dem Reizspot liegt. Der Mittelpunkt von FET und Reizspot fällt nun zusammen, so dass ein auf den FET zentriertes Neuron auch mittig auf dem Reizspot liegt und somit beste Voraussetzung für eine bidirektionalen Anschluß bietet. Der Reizspot wurde also aufgeteilt in zwei Hälften, die den FET umgeben. Es sind nun zwei Reizzuleitungen anstatt einer erforderlich.

Die Gesamtgröße der Reizspots ist weniger kritisch anzusehen, als die Kanalbreite des FETs. Mit zunehmender Reizfläche erhöht sich die Kapazität und damit die Reizbarkeit. Ein nicht abgedeckter Reizspot zeigt im Gegensatz zu einem nicht vollständig bedeckten FET jedoch keinen Einbruch im Signalübertrag. In diesem Fall steigt lediglich der kapazitive Übertrag ins Bad und damit die Gefahr einer unselektiven Anregung. Die Größe der Reizspotfläche bestimmt viel-

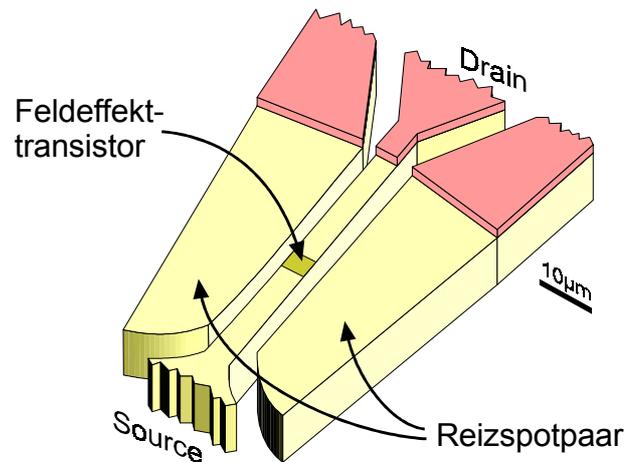


Abbildung 3.4: Doppelstruktur aus zwei Reizspots, die einen Feldeffekttransistor umgeben. Nach oben laufen die Zuleitungen der Reizspots und die Drainbahnen weg. Sie sind vom rosa eingefärbten Feldoxid bedeckt. Nach unten ist die Common Source angeschlossen.

mehr die Gesamtgröße der bidirektionalen Struktur. Ihre Ausdehnung legt den kleinst möglichen Abstand zweier Neurone fest, die jeweils auf einer bidirektionalen Struktur zentriert sind.

3.4 Die Gesamtstruktur

Ist die bidirektionale Struktur auf ein Neuron angepasst worden, so folgt die Gesamtstruktur des Chips der Netzwerktopologie mehrerer Neurone. Zum frühen Zeitpunkt des Chipentwurfs war die Zellkultur noch nicht so weit fortgeschritten, dass gesicherte Informationen über neuronale Netze von *Lymnaea stagnalis* auf Silizium vorlagen. Neben Bildern aus der Literatur [21], [19] gab es jedoch schon erste Fotografien von einzelnen, gewachsenen Zellen.

Anhand der verfügbaren Daten wurden von folgenden Wachstumseigenschaften ausgegangen:

- ▶ Dendriten und Axone sind nicht klar voneinander zu unterscheiden.
- ▶ Das Auswachsen einzelner Neurone scheint isotrop zu verlaufen.
- ▶ Nach 2 Tagen in Kultur können 100-200 μm Wachstum in eine Richtung angenommen werden.

Diese Eigenschaften von *Lymnaea stagnalis* begünstigen eine gitterhafte Anordnung der bidirektionalen Strukturen. Optimal wäre ein zweidimensionales Gitter, in dem jede Elementarstruktur die gleiche Anzahl von Nachbarn und einen konstanten Abstand zu den nächsten Nachbarn hätte.

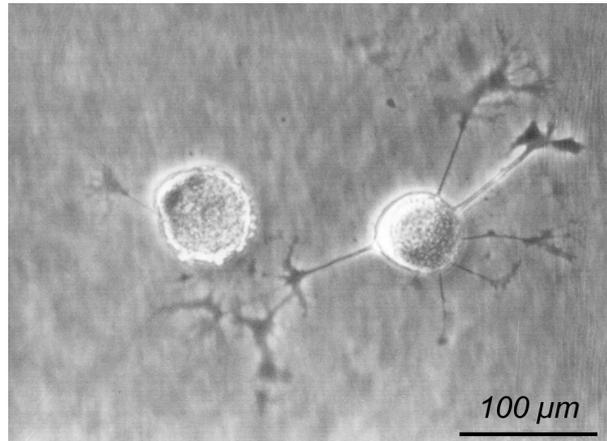


Abbildung 3.5: Erste Wachstumsergebnisse von Neuronen aus *Lymnaea stagnalis* in 35 mm Plastikschalen. Der Innendurchmesser der Gesamtstruktur wurde anhand dieser Ergebnisse auf $2 \times 100 \mu\text{m}$ festgelegt.

Beschränkung durch Zuleitungen

Bisher unberücksichtigt geblieben ist die Kontaktierung der Einzelstrukturen. Jeder FET benötigt zwei, jeder Reizspot eine Zuleitungsbahn als Verbindung zu den am Chiprand gelegenen Bondflächen. Es entsteht somit ein Platzproblem an den Rändern des Gitters, wo die Zahl der Zuleitungen maximal wird. Da die Bahnbreite von Drain, Source und Reizspot, wie schon bei der Konstruktion der bidirektionalen Struktur beachtet, nicht beliebig klein ausfallen soll, muss dieses Problem durch eine Reduktion der Zuleitungszahl gelöst werden.

Verzichtet man darauf alle Transistoren gleichzeitig zu betreiben, so bietet sich ein Multiplexverfahren an, in dem die einzelnen Transistoren in rascher Folge nacheinander ausgelesen werden. Bei einer kartesischen Anordnung von n Transistoren werden dann nur noch \sqrt{n} Kontaktleitungen benötigt. Dazu muss das Transistorsignal, das als modulierter Strom vorliegt, für jeden Transistor einzeln in eine Spannung gewandelt werden bevor es zum Multiplexer gelangt. Eine solcher Chip wurde bereits verwirklicht [5]. Für die Strom-Spannungswandler und die Multiplexerlogik sind allerdings Prozesstechniken erforderlich, die im Labormaßstab noch nicht verfügbar sind. Es fehlt außerdem noch an ausreichend kurzen Schaltzeiten des Multiplexers sowie einer zusätzlichen Integration von Reizstrukturen.

Eine zwar weniger mächtige, aber dafür elegantere Möglichkeit die Zuleitungszahl von FETs zu reduzieren ist die Benutzung einer "Common Source", die die Source-Anschlüsse der FETs zusammenfasst. Das reduziert die notwendigen Anschlüsse von $2n$ auf $n + 1$. Um keine unnö-

tiges Rauschen zu erzeugen, sollte die gemeinsame Source Leitung über ihre ganze Länge eine Querschnitt aufweisen, der größer als die Summe der kleinsten Drain-Querschnitte ist.

Das Konzept der gemeinsamen Source-Zuleitung ergibt zusammen mit der Forderung nach flächendeckender Anordnung der bidirektionalen Strukturen ein sternförmiges Gesamtbild, in dessen Mitte sich die gemeine Source befindet, welche von den bidirektionalen Strukturen umgeben ist. Ähnliche Konzepte sind in bisherigen Arbeiten [46], [40] erfolgreich eingesetzt worden.

Ringstruktur

Legt man die Einzelstrukturen auf einen Ring, so genügen sie eher als in einer rechteckigen Anordnung der Anforderung, dass jedes Neuron auf einer bidirektionalen Schnittstelle die gleiche Umgebung hinsichtlich Abstand und Richtung zum nächsten Nachbarn vorfindet. Damit ist die verwendete, C-förmige Ringstruktur *Lymnos* geschaffen. Die Aneinanderreihung von vierzehn Doppelstrukturen aus Reizspot und FET ergeben auf dem Ring ein sich abwechselndes Muster von zwei halben Reizspots und einem FET. Um die Beschreibung der Messsituationen später zu erleichtern werden die Reizspots und Transistoren durchnummeriert.

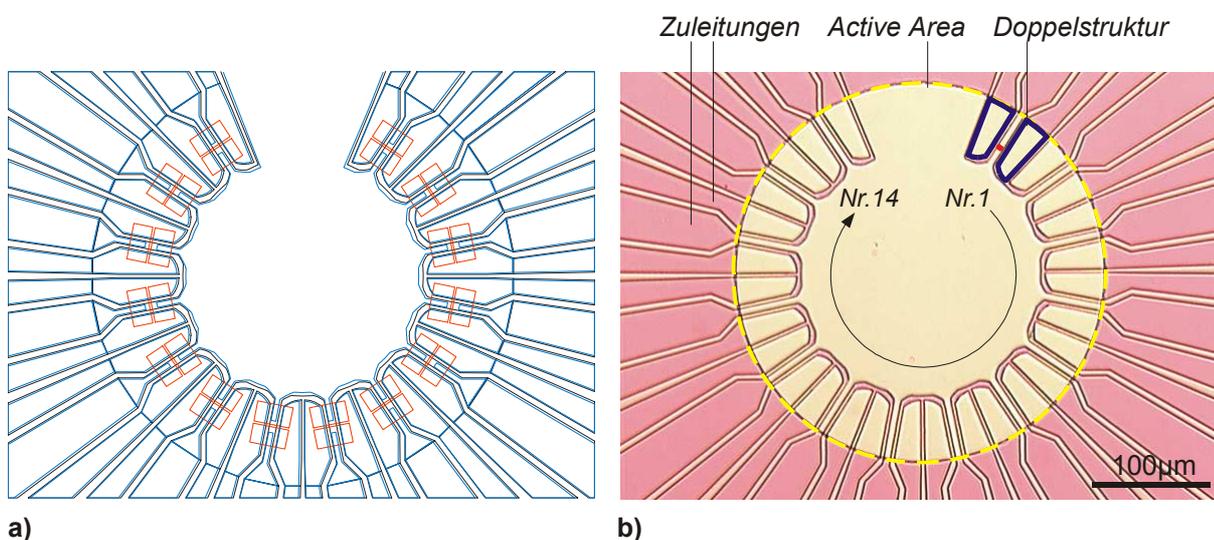


Abbildung 3.6: a) Maskensatz der Gesamtstruktur. Der Spalt zwischen den roten Rechteckpaaren definiert die Enden von Source und Drain und damit die Lage des Transistors. Alle Transistoren liegen auf einer Kreislinie mit Radius $125 \mu\text{m}$. b) Auflichtansicht mit dem Lichtmikroskop auf einen Chip. Eingezeichnet ist die Doppelstruktur Nr. 1, die aus den Reizflächen (blau) und dem Transistor (rot) besteht. Die helle, kreisrunde Fläche kennzeichnet das Gebiet der Active Area, in der das bedeckende Oxid eine Dicke von $6 - 8 \text{ nm}$ besitzt.

Der Ring ist auf minimales, neuronales Wachstum optimiert. Werden durchschnittliche Neurone auf benachbarten FETs zentriert, so können von der Struktur Soma-Soma-Synapsen vermes-

sen werden. Der größte FET-FET-Abstand beträgt hingegen nur $250\ \mu\text{m}$, so dass schon $100\ \mu\text{m}$ Wachstum der Neuriten eine periphere Synapse bilden können. Im Gegensatz zu einer rechteckigen Anordnung, wo sich die Somata einer Seite gegenseitig abdecken, wird in der Ringstruktur durch das Nachbarneuron nur das übernächste Nachbarneuron abgedeckt, alle weiter entfernten Neurone sind aufgrund der Ringkrümmung wieder in direkter Verbindung zu erreichen.

Kapitel 4

Neurone

Bei der Entwicklung des Chipdesigns standen zwei Aspekte im Vordergrund. Zum einen wurden Stimulations- und Detektionsstrukturen entworfen, die anhand des aktuellen Kenntnisstands über die Neuron-Halbleiterschnittstelle bestmögliche Übertragungseigenschaften bieten sollten. Zum anderen wurde der Chip auf die räumliche Ausdehnung und die vitalen Anforderungen eines neuronalen Gewebes maßgeschneidert. Ähnlich wurde auf der biologischen Seite des hybriden Netzes vorgegangen. Eine Zellkultur lässt sich zwar nicht so frei gestalten wie ein Chip, doch kommen der Auswahl des geeigneten Zelltyps und der Entwicklung einer zuverlässigen Kultur ähnliche Bedeutung zu. Mit der Auswahl einer geeigneten Zellkultur beschäftigt sich der erste Teil dieses Kapitels.

Der größte Aufwand bei der Herstellung eines Chips steckt im Chipdesign und in seiner Prozessierung. Nach seiner Verkapselung ist die Hauptarbeit geleistet. Er muss vor jedem Einsatz lediglich gereinigt werden. Auf Seite der Zellkultur verhält es sich umgekehrt. Hier sind die einmaligen Arbeiten schon nach kurzer Zeit vollbracht. Neuronale Gewebe, an denen Messungen vorgenommen werden, haben eine im Vergleich zu Chips eine kurze Lebensdauer. Das bedeutet, dass die meiste Arbeit auf Seiten der Zellkultur darin besteht immer wieder aufs Neue biologisches Gewebe aufwachsen zu lassen. Hinzu kommt, dass der Erfolg einer Präparation von vielen Parametern beeinflusst wird, die nur schwer erfassbar und damit konstant zu halten sind. Es wurde deshalb ein Großteil der Zeit auf die Perfektion einer reproduzierbaren Zellkultur verwendet. Diese besteht aus einer Präparation mit hoher Zellausbeute sowie einer präzisen Positionierung der Neurone auf dem Chip.

Der optimale Zelltyp

Das elementare Netzwerk stellt abstrakte Anforderungen an den Signalweg. Ein Ereignis soll messbar über die drei grundsätzlichen Schnittstellen Reizung, Synapse, Kopplung übertragen werden. Den beteiligten Neuronen kommt also eine doppelte Funktion zu. Sie sind über die Reizung und die Kopplung an der Schnittstelle zum Halbleiter beteiligt. Welche neuronalen Eigen-

schaften sind dafür relevant? Zusätzlich müssen sie noch untereinander Schnittstellen, Synapsen, bilden. Sind alle Synapsen gleichermaßen für ein elementares, hybrides Netzwerk geeignet? Im Folgenden werden die Kriterien besprochen, anhand derer der verwendete Zelltyp ausgewählt wurde.

Wenig Neurone Damit von einem eindeutigen Übertragungsweg ausgegangen werden kann, muss ausgeschlossen werden, dass das Signal, welches der Transistor am Ende aufzeichnet, aus undefinierten Quellen stammt. In einem typischen Vertebratengewebe besitzt ein Neuron allerdings ungefähr 10^3 synaptische Eingänge, deren einzelne Aktivität im Experiment schwer zu kontrollieren ist. Gefordert ist also ein Gewebe, das aus wenigen Neuronen besteht. Die synaptischen Verbindungen werden dadurch übersichtlicher und die Zahl der theoretisch möglichen Signalwege reduziert sich drastisch.

Um einen Signalweg in neuronalem Gewebe vollständig zu belegen werden als Referenz immer noch klassische Methoden wie intrazelluläre Ableitung eingesetzt. Der dafür notwendige mechanische Aufwand beschränkt die Zahl der überwachten Neurone. Auch aus diesem Grund ist ein Netzwerk mit wenigen Neuronen vorteilhaft.

Effiziente Synapsen Ein Neuron, das wie oben erwähnt, im Durchschnitt 10^3 synaptische Eingänge hat, zeigt nur dann ein Aktionspotential, wenn an einer Vielzahl dieser Eingängen in einem bestimmten Zeitfenster Aktivität anliegt. Ein solches Netzwerk lässt sich experimentell kaum steuern. Es ist der Topologie eines solchen Netzwerks nur schwer anzusehen, welche Neurone als Eingang zu einem postsynaptischen Neuron fungieren. Auch bei bekannten Verhältnissen müsste dafür gesorgt werden, dass die Eingangsneurone im gewünschten Zeitfenster aktiv sind. Stimulation mit Mikroelektroden scheidet aufgrund der hohen Zahl aus. Perfusion der präsynaptischen Neurone ist nur unter großem Aufwand selektiv durchzuführen.

Eine wesentliche Eigenschaft des gewünschten Zelltyps müsste also die Fähigkeit sein, Synapsen zu bilden, mit so großer Gewichtung, dass allein ein einziges, präsynaptisches Aktionspotential ausreicht um eine messbare Veränderung der postsynaptischen Aktivität zu erreichen. Im Hinblick auf die noch zu erläuternden Kopplungseigenschaften von FETs ist die Entstehung eines postsynaptischen Aktionspotentials optimal.

Periphere Synapsen Zur Übersichtlichkeit eines elementaren Netzwerks tragen auch periphere Synapsen bei, bei denen im Gegensatz zu den Soma-Soma-Synapsen die Zellsomata mehrere hundert Mikrometer voneinander entfernt sein können.

Der wichtigste Vorteil peripherer Synapsen ist jedoch die hohe Selektivität bei Detektion und Stimulation der Neurone. Bei guter räumlicher Trennung der Somata kann die Aktivität einzelner Neurone ohne Beeinflussung durch benachbarte Neurone aufgenommen oder ausgelöst werden.

Im Fall einer Einzelzellkultur kommt noch ein weiterer wichtiger Vorteil hinzu. Dort werden nacheinander die einzelne Zellen auf den jeweiligen Strukturen des Chips plaziert. Je größer der Abstand der Halbleiterstrukturen, desto weniger stören bereits aufgesetzte Neurone bei der Platzierung weiterer Neurone.

Zusätzlich eröffnet eine synaptische Verbindung über ausgedehnte Neuriten die Möglichkeit die Eigenschaften des neuronalen Netzes über gerichtetes Wachstum zu beeinflussen [30], [13], [42].

Große Neurone Es bleiben noch die Schnittstellen Kopplung und Reizung zu optimieren. Aus der Theorie für Kopplungen folgt, dass der Abdichtwiderstand R_J für gute Signalüberträge vom Neuron zum Transistor möglichst groß sein sollte. Das erfordert eine großflächige Abdeckung des Transistors mit der Kontaktmembran. Ein hoher Abdichtwiderstand R_J des Kopplungsspalt ist auch ein wesentlicher Faktor für eine gute Reizbarkeit der Neurone. Die Zeitkonstante τ_J , mit der die kapazitive Spitze einer angelegten Reizflanke abklingt, ist umso größer, je größer die Auflagefläche des Neurons ist.

Große Neurone haben nicht erst nach dem Adhären auf der Chipoberfläche Vorteile. Da die Stimulations- und Detektionsstrukturen auf dem Chip fest angelegt sind, geht in die Gesamtwahrscheinlichkeit einer guten Reizung oder Kopplung nicht nur die Übertragungsgüte der Schnittstellen ein, sondern auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Strukturen überhaupt von einem Neuron bedeckt werden. Diese Überlegung hat sich auch im Chipdesign niedergeschlagen. Für die Auswahl der geeigneten Zellkultur bedeutet es, dass große Neurone besser geeignet sind als kleine. Denkt man sich eine Zellsuspension mit konstanter Zelldichte von Zellen konstanter Adhäsionsfläche auf einem Transistorarray mit konstanter Transistordichte und Transistoren konstanter Gatefläche, so wird die Wahrscheinlichkeit, dass ein Transistor vollkommen von einem zufällig adhärenenden Neuron abgedeckt wird, mit der Größe der Adhäsionsfläche steigen. Gleiches gilt für Einzelzellkultur.

Einen guten Flächenkontakt zum Substrat können jedoch nicht nur Somata herstellen. An Blutegelneuronen [38] wurden schon Kopplungen unter Wachstumskegeln beobachtet. Das lenkt den Blick von der Größe der Adhäsionsfläche des Somas auf die Wachstumseigenschaften des ausgewählten Zelltyps. Offenbar ist die koppelbare Fläche des Wachstumskegels eines bestimmten Zelltyps keine konstante Größe, sie lässt sich vielmehr durch geeignete Oberflächenbeschichtungen manipulieren [37]. Die koppelbare Adhäsionsfläche eines Wachstumskegels kann dabei größer werden als die Auflagefläche eines spontan adhärenen Neurons.

Damit sind die wesentlichen Anforderungen an das neuronale Gewebe definiert.

4.1 Lymnaea stagnalis

Die Forderung nach großen Neuronen bietet die Verwendung einer Einzelzellkultur an. Die gut erforschten Kopplungseigenschaften [47], [48], [34], [38], [11], die seit langem bekannten Präparationstechniken und die persönliche Erfahrung [17] würden für den Einsatz der schon erwähnten Blutegelneurone, besonders der leicht präparierbaren und identifizierbaren Retziuszellen sprechen. Blutegelneurone bilden in Kultur jedoch bloß Soma-Soma-Synapsen und entsprechen damit nicht der Forderung nach peripheren Synapsen.

Es wurden deshalb Neurone der Schnecke *Lymnaea stagnalis* ausgewählt. Deren Nervenzellen sind im Schnitt so groß wie die Retziuszellen des Blutegels, einzelne erreichen sogar einen Durchmesser von über $100\mu\text{m}$. Die Präparation von *Lymnaea stagnalis* ist, wie die weiterer Schneckenarten, gut dokumentiert. An Neuronen dieser Schnecke werden in vivo als auch in vitro Eigenschaften kleiner neuronaler Netze untersucht [27], [23]. Dies rührt unter anderem von der Fähigkeit der Zellen her in Kultur auch unter einfachen Bedingungen schnelles Neuritenwachstum mit peripheren Synapsen auszubilden. Wie bereits erwähnt wurde der Central Pattern Generator, von *Lymnaea stagnalis*, der die rhythmischen Kontraktionen der Lunge steuert, in vitro kultiviert [21]. Die abwechselnden Bursts zur Ansteuerung der Motoneurone werden von nur drei zentralen Neuronen erzeugt. Es ist also zu vermuten, dass Neurone dieser Schneckenart in der Lage sind die geforderten, effizienten Synapsen zu bilden.

Anatomie

Lymnaea stagnalis ist eine Schlammschnecke und gehört zur Klasse der Gastropoden (Bauchfüßler), Subklasse der Pulmonaten, Ordnung Basommatophora. Sie ist in stehenden Gewässern der gemäßigten Breiten auf der ganzen Welt verbreitet [31]. Obwohl im Wasser lebend, gehört

Lymnaea stagnalis zu den Lungenatmern. Die Schnecke besitzt eine Kombination aus Lunge und Atemsack. Das ermöglicht ihr über längere Zeit unter Wasser zu bleiben. An der Wasseroberfläche, wo sich ihre Hauptnahrung in Form von niedergefallenen Blättern befindet, bewegt sie sich, indem sie mit dem Gehäuse nach unten ihre Fußsohle in die Wasseroberfläche einbringt. Das Zusammenwirken der Oberflächenspannung um den Fußrand und der Auftrieb durch den Atemsack verhindert, dass die Schnecke zu Boden fällt. Um zu atmen führt die Schnecke ihr Atemloch durch die Wasseroberfläche. Regelmäßige Kontraktionen der Lunge führen dann zum Luftaustausch.

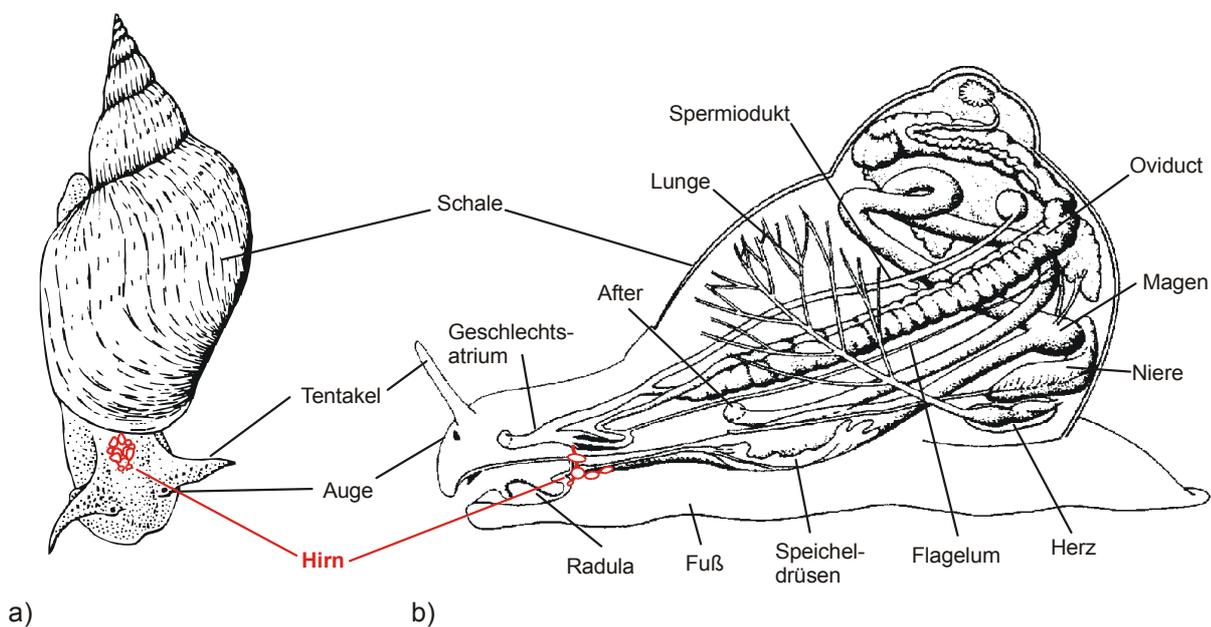


Abbildung 4.1: a) Aussehen von *lymnaea stagnalis*. b) Schemazeichnung eines Pullmonaten, angepasst auf *lymnaea*. Beide Zeichnungen aus [4].

Lymnaea stagnalis ist ein Zwitter. Befruchtete Schnecken kleben Laich in Form transparenter Hüllen mit 50 Eiern und mehr an größere Blätter, Pflanzen, Gehäuse anderer Schnecken und in Zucht auch an Aquarienwände. Die spitzen Gehäuse von adulten Tieren werden bis zu 5 cm groß.

Haltung

Lymnaea stagnalis kann leicht in Aquarien gehalten und vermehrt werden. Ausgehend von ungefähr 60 Exemplaren aus dem Bestand der Universität Ulm wurde kontinuierlich eine Zucht mit bis zu 2000 Tieren aufgebaut, die in Aquarien bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Gefüttert wurde vorwiegend mit Chinakohl, der sich lange im Wasser hält und von den Tieren gut akzeptiert wird. Zusätzlich wurden Karotten- oder Apfelscheiben beigegeben. Bei einer guten Fütterung,

wo die Wasseroberfläche mit Salatblättern deckend gefüllt ist, vermehren sich die Tiere ohne weiteren Aufwand. Das Wasser aller 4 eingesetzten 200l-Aquarien wurde 3 mal pro Woche zu zwei Dritteln ausgetauscht.

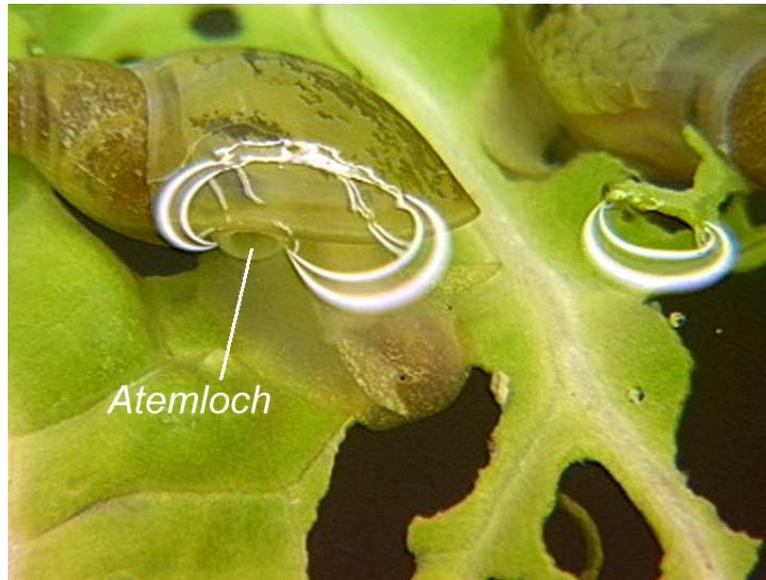


Abbildung 4.2: Haltung von *lymnaea stagnalis* in Aquarien. Dicht unter der Oberfläche können die Schnecken im Aquarium gleichzeitig fressen und atmen. Deutlich erkennbar ist das geöffnete Atemloch.

Um Degeneration durch übermäßige Inzucht zu vermeiden, wurden hin und wieder Tiere aus Gewässern der Umgebung in die Zucht eingebracht. Neue Tiere wurden in einem Quarantäne-Becken längere Zeit isoliert um das Einschleifen von Parasiten zu verringern.

4.1.1 Nervensystem

Überblick

Die ungefähr 25000 Neurone [27] des Nervensystems von *Lymnaea stagnalis* sind, wie bei Invertebraten üblich, in Ganglien organisiert. Die 11 Ganglien sind nicht über den ganzen Körper verteilt, sondern liegen dicht beieinander am Übergang zwischen bukkaler Masse und Schlund. Diese kompakte Anordnung der Ganglien wird deshalb auch als Hirn bezeichnet. Die Ganglien treten mit Ausnahme des Visceralganglions paarig auf, so dass das Hirn eine annähernd laterale Symmetrie aufweist. Verbunden über Nervenfaserbündel bilden die Ganglien drei Ringe. Den bukkalen Ring mit dem anterior gelegenen bukkalen Ganglionpaar, dem etwas ventral gelegenen Ring der Pedalganglien sowie dem Hauptring aller restlichen Ganglien.

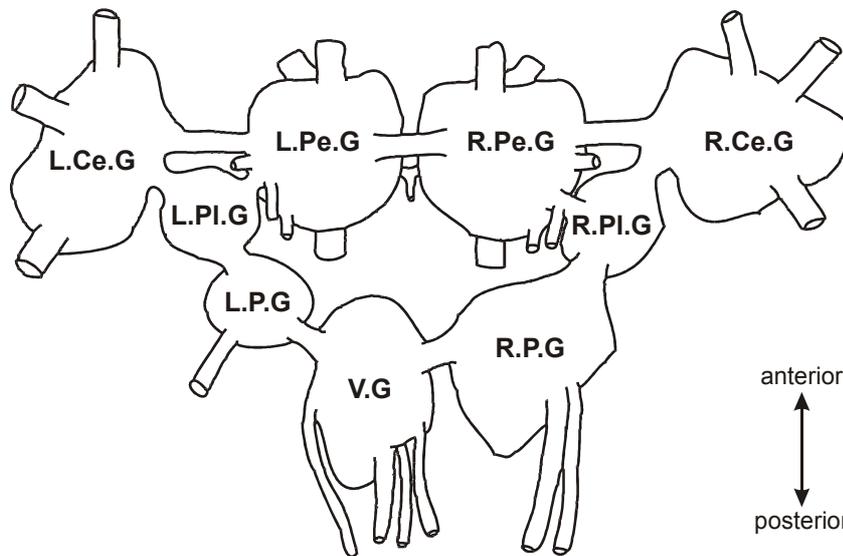


Abbildung 4.3: Dorsaler Blick auf die Ganglien von *Lymnaea stagnalis*. Das Bukkal-Ganglienpaar ist nicht eingezeichnet. Es ist über die Cerebralganglien mit dem restlichen Hirn verbunden. Der Hauptganglienring ist zwischen dem linken und dem rechten Cerebralganglion aufgetrennt. Die Ganglien werden nach Lage auf der linken oder rechten Körperseite $x \in \{L, R\}$ und Funktion bezeichnet. Cerebralganglien (x.Ce.G), Pedalganglien (x.Pe.G), Pleuralganglien (x.Pl.G), Parietalganglien (x.P.G) und des Visceralganglion (V.G). Nach Schema und Nomenklatur nach [21].

Anhand der Visceralganglien unterscheidet sich *Lymnaea stagnalis* auch von den meisten anderen Schnecken. Sie befinden sich hier dicht bei den anderen Ganglien im Kopfbereich. Auch fehlt die schneckentypische Überkreuzung der Konnektive zu den Pleuralganglien, die durch die Torsion bei der Entwicklung des Körperbaus entstanden ist. Bis auf die Cerebralganglien sind alle Ganglien über Nervenstränge mit den Organen des Körpers verbunden. Bei *Lymnaea stagnalis* werden die Neurone eines Ganglions nicht nur durch die Ganglienhülle, sondern noch durch ein weitere Gewebedecke, dem Outer Sheath, von der Körperhöhle getrennt.

Aufbau der Ganglien

Die Nomenklatur der Neurone in den Ganglien von *Lymnaea stagnalis* unterscheidet zwischen Einzelneuronen und Neuronengruppen, den Clustern. Die Zuordnung richtet sich danach wie gut ein einzelnes Neuron sich von seinen Nachbarneuronen unterscheidet. Einzelneurone werden nummeriert, und es fließt in die Bezeichnung die Lage dorsal oder ventral ein. So liegt das Neuron L.Pe.D.9 im linken Pedalganglion auf dorsaler Seite. Neuronale Cluster umlaufen häufig die Ganglienseiten, so dass eine Zuordnung zu ventraler oder dorsaler Seite nicht möglich ist. Sie werden mit Buchstaben gekennzeichnet. Der Cluster R.Pe.B liegt auf der anterioren Seite des rechten Pedalganglions und ist von Unter- und Oberseite aus zu sehen. Die exakte Identifizierung

einzelner Neurone anhand ihrer Lage im Ganglion ist leider nicht möglich, da zwischen den einzelnen Individuen sehr starke Schwankungen auftreten können, die sogar bis zum Wechsel des Ganglions reichen können [24, S. 108].

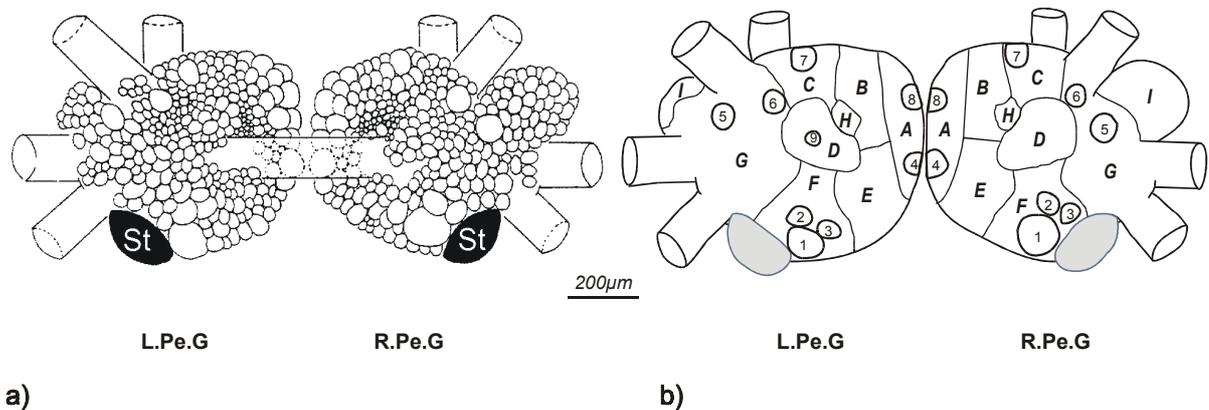


Abbildung 4.4: Aufbau und Nomenklatur von Ganglien am Beispiel des Pedalganglienpaares. a) Anordnung der Neurone. St = Statocyste b) Einteilung der Neurone in Cluster und Einzelneurone. Schema und Nomenklatur nach [6].

Neurone

Wie schon an der Nomenklatur zu erkennen, besitzen die Neurone in *Lymnaea stagnalis* sehr unterschiedliche Größen und Farben. Der Größenbereich geht von 10 µm bis ca. 150 µm. Die Neurone haben stark unterschiedliche Färbung, die von farblos über weiß, orange bis rot-orange reicht. Häufig ist Farbe und Größe ein Einteilungskriterium für Zellcluster.

Elektrophysiologisch werden die Neurone nach ihrer Aktionspotentialform eingeteilt. Die Einteilung erfolgt, wie in Abbildung 4.5 gezeigt, in zwei Klassen, die danach unterschieden werden, ob nach der Spitze des Aktionspotentials noch eine ausgeprägte Schulter, auch Pseudoplateau genannt, folgt [45], [20], [28].

Die Form der Phasenraumkurve erlaubt eine Identifizierung spontan feuender Neurone in vivo. Es wurde jedoch auch gezeigt [45], dass Injektionsströme die Aktionspotentialform irreversibel verändern können. Die Breite des Pseudoplateaus kann durch depolarisierende Injektionsströme, vergrößert werden [45]. Doch auch in Folge von PIRs ist eine rapide Verbreiterung des Pseudoplateaus beobachtet worden.

Neurone aus den Pedalganglien Die Neurone aus den Pedalganglien sind im Vergleich zu anderen Ganglien intensiv charakterisiert worden. So ist das Riesenneuron R.Pe.D.1, in vivo und

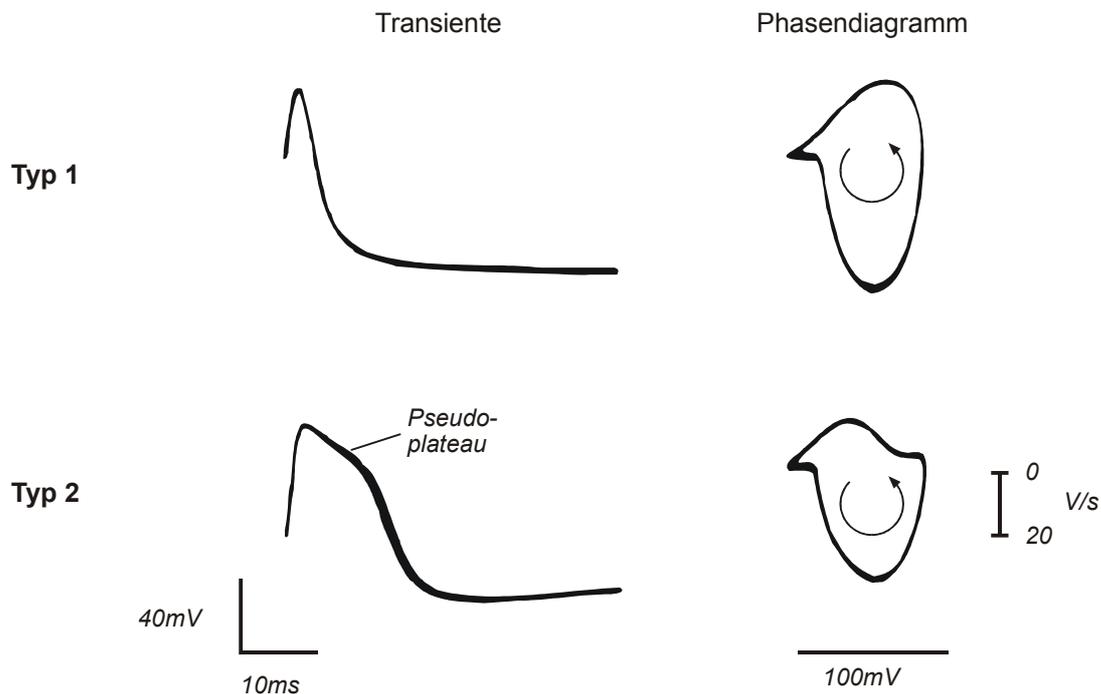


Abbildung 4.5: Elektrophysiologische Klassifizierung der Neurone von *Lymnaea stagnalis* anhand der Form des Aktionspotentials nach [45]. Neurone vom Typ 2 unterscheiden sich von Neuronen des Typ 1 durch ein Pseudoplateau, das der Aktionspotentialspitze folgt. Trägt man $\dot{V}(t)$ über $V(t)$ auf, so zeigt Typ 2 die charakteristische "Badeenten"-Form. Die Aufnahmen aus [45] sind eine Überlagerung mehrerer Aktionspotentiale spontan feuerner Neurone aus R.Pe.F (Typ 1) und R.Pe.B (Typ 2).

in vitro als Teil verschiedener neuronaler Netzwerke identifiziert worden [23], [21]. Interessant für neuronale Netze sind jedoch auch die Neurone aus den A- B- und C-Clustern der beiden Pedalganglien, da an ihnen elektrische Kopplungen mit Neuronen aus dem gleichen Cluster gefunden wurden [20]. Unter den Zellclustern weist der A-Cluster die größten Neurone mit einem Durchmesser von $40 \mu\text{m} - 70 \mu\text{m}$ auf. Innerhalb des Clusters liegen, wie in Abbildung 4.4 zu sehen, noch zwei große Einzelneurone Pe.D.8 und Pe.D.4 mit $50 \mu\text{m} - 70 \mu\text{m}$ Durchmesser. Der A-Cluster eines Ganglions beherbergt 30 – 35 Neurone und ist damit zusammen mit den synaptischen Eigenschaften sehr interessant für hybride Netze. Aus präparativer Sicht ist besonders der ungehinderte Zugang von anterior attraktiv. Eine dorsale Öffnung der Pedalganglien ausgehend vom verbundenen Pedalkonnektiv in Richtung der jeweiligen Cerebralganglien eröffnet neben dem Zugang zum A-Cluster auch den zum B-Cluster mit weiteren 50 Neuronen im Größenbereich zwischen $20 \mu\text{m}$ und $40 \mu\text{m}$ und zum C-Cluster mit ungefähr 40 kleinen Neuronen mit einem Durchmesser zwischen $15 \mu\text{m}$ und $40 \mu\text{m}$. Somit stehen mit einem Schnitt bis zu 125 Neurone zur Verfügung.

4.2 Präparation

Das Auswachsen der isolierten Neurone *in vitro* benötigt Wachstumsfaktoren, die von den Schneckenhirnen selber hergestellt werden können. Das Durchtrennen der Konnektive zwischen den Ganglien und den Organen stellt eine Axotomie dar, die eine Vielzahl von Neuronen dazu veranlasst neurotrophe Wachstumsfaktoren auszuschütten. Es reicht ein komplettes Hirn aus *Lymnaea stagnalis* herauszupräparieren, damit es in geeignetem Kulturmedium die benötigten Wachstumsproteine ausschüttet. Dieser Mechanismus wird in zwei unterschiedlichen Kulturformen benutzt. Grundlage beider Vorgehensweisen ist, dass diese Wachstumsfaktoren auf der Chipoberfläche adhären und somit das Substrat für das Zellwachstum herstellen. Ziel der Präparation ist also nicht nur die Isolation einzelner Neurone, die später auf der Chipoberfläche zu einem Netzwerk zusammenwachsen sollen, sondern auch die Auslösung ganzer Hirne.

Die Präparation ist auf dieses Doppelziel gut eingerichtet, denn die Neurone werden erst aus dem bereits isolierten Hirn entnommen. Somit unterscheidet sich die Präparation eines Neurons von der eines ganzen Hirns nur dadurch, dass die Präparation nach der Isolation des Hirns weiter fortgesetzt wird. Im Folgenden wird die Präparation bis zum Erhalt eines einzelnen Neurons ausgeführt.

4.2.1 Vorbereitungen

In einer Präparation werden nacheinander Neurone auf sechs Chips aufgebracht. Diese Chips werden einen Tag vor der Präparation gereinigt und beschichtet.

Chipreinigung

Um Wachstumsproteine und Gewebereste der letzten Zellkultivierung zu entfernen wird jeder Chip mit einer $60^{\circ} - 80^{\circ} C$ heißen Reinigungslösung mit ca. 10 Vol% Spülmittel in Reinstwasser geputzt. Die Chips werden aufgewärmt indem sie zuerst mehrfach mit der heißen Lösung überspült werden. Danach wird jeder einzelne Chip wieder mit Reinigungslösung befüllt und die Chipoberfläche als auch die Kulturwanne mit einem bereits nassen Wattestäbchen ausgerieben.

Zwischendurch werden die Chips mit Reinstwasser gespült. Ist sichergestellt, dass alle Reste des Spülmittels entfernt wurden, so kann am Ablaufverhalten des Wassers von der Chipoberfläche abgeschätzt werden wie hydrophil die Oberfläche durch die bisherige Reinigung geworden ist. Hydrophilizität ist allerdings keine primäre Bedingung, sondern nur ein Indikator für den Reinigungszustand des Chips. Bei häufigem Gebrauch der Chips werden schon nach kurzer Reinigung

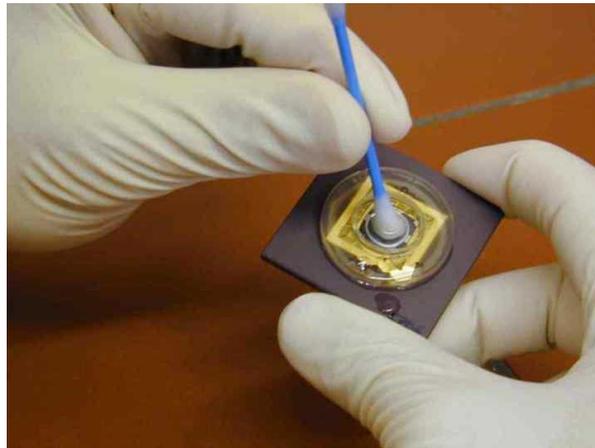


Abbildung 4.6: Die Chips werden mit einer $60^{\circ}\text{C} - 80^{\circ}\text{C}$ heißen Spülmittellösung gereinigt. Zur mechanischen Unterstützung dient ein Wattestäbchen.

hydrophile Oberflächen erreicht. Unmittelbar danach werden sie mit Reinststickstoff trockengeblasen und können nun sterilisiert werden.

Sterilisation der Chips

Die Wannens der Chips bestehen aus Plexiglas, das nur eine begrenzte Widerstandsfähigkeit gegen Ethanol besitzt. Deshalb wird die Oberseite der Chips mit UV-Licht sterilisiert. Die Chips werden nach der Trocknung zum späteren, sterilen Transport in Petrischalen gesetzt. In einer sterilen Flowbox werden sie bei geöffneten Schalen 45 min lang mit UV-Licht bestrahlt.

Beschichtung der Chips

Nach Versuchen mit Concanavalin A [19] und Laminin, hat sich die Beschichtung mit Poly-l-lysin nach [32] als erfolgreich herausgestellt.

Direkt nach der UV-Sterilisation wird eine Lösung von 1 mg/ml Poly-l-lysin in Trispuffer von $\text{pH } 8,4$ in die Chipwannen gefüllt. Von der Beschichtung bis zum Ende der Kultur wird darauf geachtet, dass die Chipoberfläche immer mit wässrigen Lösungen bedeckt ist, also nie trocken fällt. Der Start der Beschichtung wird so gewählt, dass das Ende nach 16 h direkt in den Zeitraum der Zellpräparation fällt, während der die Poly-l-lysin Lösung dann entfernt und die Chips gespült werden.

4.2.2 Hirne isolieren

Aus den Aquarien werden dem Augenschein nach gesunde Tiere mit einer Gehäuselänge von $2\text{ cm} - 3\text{ cm}$ ausgesucht. Schnecken, die sich in ihr Gehäuse zurückgezogen haben, werden nicht

verwendet. An ihnen lässt sich nicht feststellen, wie stark sie mit Parasiten belastet sind. Der am häufigsten vorkommende Parasit ist eine Nematodenart, die sich mit ihrer Saugöffnung am Körper anhaftet. Besonders stark betroffen ist der Kopfbereich, bei manchen Tieren wurden sogar Nematoden gefunden, die sich auf der Körperinnenseite ansiedelten. Offenbar schädigen die Parasiten die Neurone nicht direkt, es besteht jedoch die Gefahr, dass die Nematoden über Co-Kultur-Hirne in die Inkubation von Definiertem Medium (DM) oder, noch schlimmer, direkt in die Chipwannen eingeschleift werden. Nematoden sind um ein Vielfaches größer als Neurone und wischen durch ihre zuckenden Körperbewegungen die frisch aufgesetzte Zellen von den Chipstrukturen. Die Funktion von Co-Kultur-Hirnen, bzw. Definiertem Medium wird weiter unten im Zusammenhang mit verschiedenen Kulturformen näher erläutert.

Schale entfernen

Im ersten Präparationsschritt wird das Gehäuse der ausgesuchten Schnecken entfernt. Mit einem Pinzettenschenkel wird zwischen Schale und Mantel der Gehäusewindung bis zur rötlich schimmernden Niere nachgefahren. Dabei lösen sich Gehäusestücke ab ohne dass der Schneckenkörper verletzt wird. Er kann, nachdem die letzte Verbindung zur Schale durchtrennt wurde, aus dem Gehäuse leicht herausgedreht werden. Alle Schnecken werden in einem Becherglas gesammelt, das mehrfach mit kaltem Leitungswasser gespült wird um Futterreste und Parasiten auszuwaschen.

Als nächstes werden die Schnecken für 5 – 10 *min* in eine 20% Mundwasserlösung gegeben. Der Körper wird dadurch äußerlich von Keimen befreit und die Schnecken zusätzlich zum kalten Leitungswasser anästhesiert. Der Schleim an der Fußsohle lässt sich danach leicht entfernen, indem die Schnecken über einem fusselfreien Papiertuch abgerollt werden. Bis zur Öffnung der Körperhöhle werden die Schnecken in einer isoosmolaren Lösung, der Normalen Salzlösung (NS), aufbewahrt. Alle weiteren Schritte setzen ein höhere Sterilität voraus und werden in einer Flowbox ausgeführt. Die dort verwendeten Instrumente und Lösungen sind durch Filtration, Autoklavieren oder Lagerung in 70% Ethanol sterilisiert worden.

Dissektion

Die Körperhöhle wird in antibiotischer Umgebung geöffnet. Die Schnecke ist dabei von Antibiotischer Salzlösung (ABS) bedeckt, die man durch Zusetzen von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin zu NS erhält. Die Schnecke wird in einer silikongefüllten Glasschale immobilisiert, indem zwei Nadeln den Fuß unterhalb der Tentakeln fixieren und zwei Nadeln den zurückgeschlagenen Mantel abspannen. Nun wird mit einem Skalpell die dorsale Wandung vom vorderen Rand der Radula bis

zum Mantel aufgeschnitten. Der Schnitt legt zuerst die bukkale Masse frei, die die Radula und den Kiefer enthält. Es folgt der Schlund, der vom Pedal-Cerebral-Ganglienring umfasst wird. Von diesem Ring ist zu diesem Zeitpunkt jedoch nur die Verbindung des Cerebralpaars zu sehen, die im weiteren Verlauf noch durchtrennt werden wird.

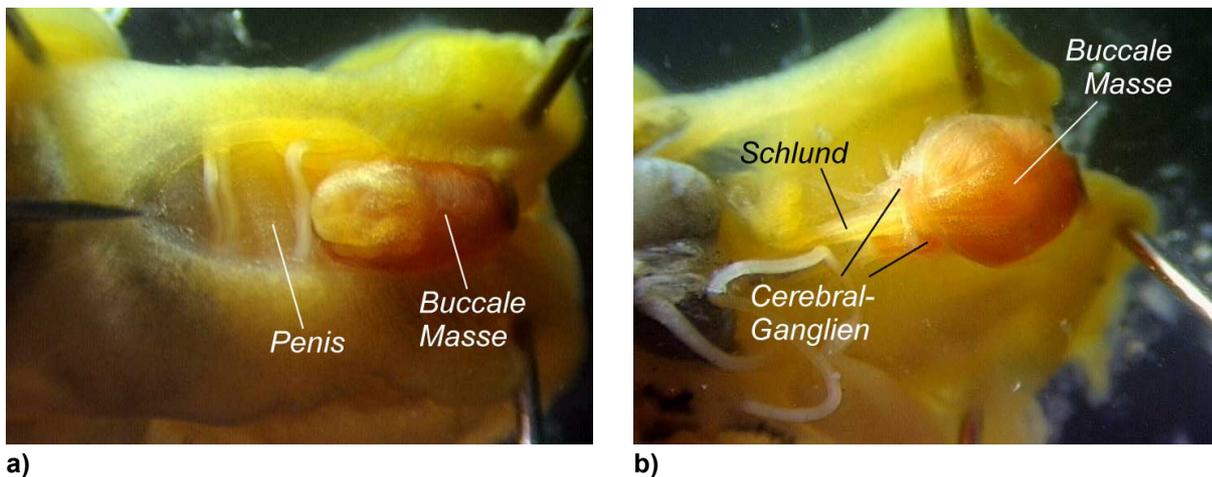


Abbildung 4.7: a) Öffnen der Körperhöhle auf dorsaler Seite. Der Schnitt erfolgt vom Kopf (rechts) bis zum Mantel (links, nicht im Bild) b) Bukkale Masse und Hirn liegen frei nach dem Abspannen der Körperwände und des Penis'.

Der Rest Gehirns ist durch Radula und Schlund geschützt. Weiter werden die Geschlechtsorgane freigelegt. Der Schnitt endet wenn der Mantel durchtrennt ist. Mit zwei weiteren Nadeln werden die beiden Seiten der Körperwand auseinander gezogen und abgespannt, so dass die Organe besser zugänglich werden. Die Nadel der rechten Körperseite fixiert gleichzeitig den nach außen geklappten Penis. Jetzt lassen sich an den Seiten schon Roots durchtrennen, die die Fußsole nervieren. Die gelben Speicheldrüsen und der Schlund werden mit der letzten Nadel Richtung Körperende abgespannt. Das erleichtert den nächsten Schritt, in dem mit einer Augenschere die Verbindung der Cerebralganglien durchtrennt wird. (Siehe Abbildung 4.7a))

Daraufhin werden der Schlund und die Speicheldrüsen nochmal mit einer Pinzette gespannt und direkt an der Radula durchgeschnitten. Der sich zurückziehende Schlund gibt den Blick auf das Gehirn mit den zuoberst liegenden Buccalganglien frei, deren Roots zur Radula und Speichelleitern jetzt durchtrennt werden. Zur weiteren Präparation wird die Radula nach vorne geklappt, von den restlichen Roots getrennt und entfernt.

Das Hirn ist jetzt frei zugänglich. Es sind der pedale und der buccale Ganglienring erhalten geblieben. Alle Roots werden durchschnitten und das ausgelöste Hirn in eine Schale für 20min

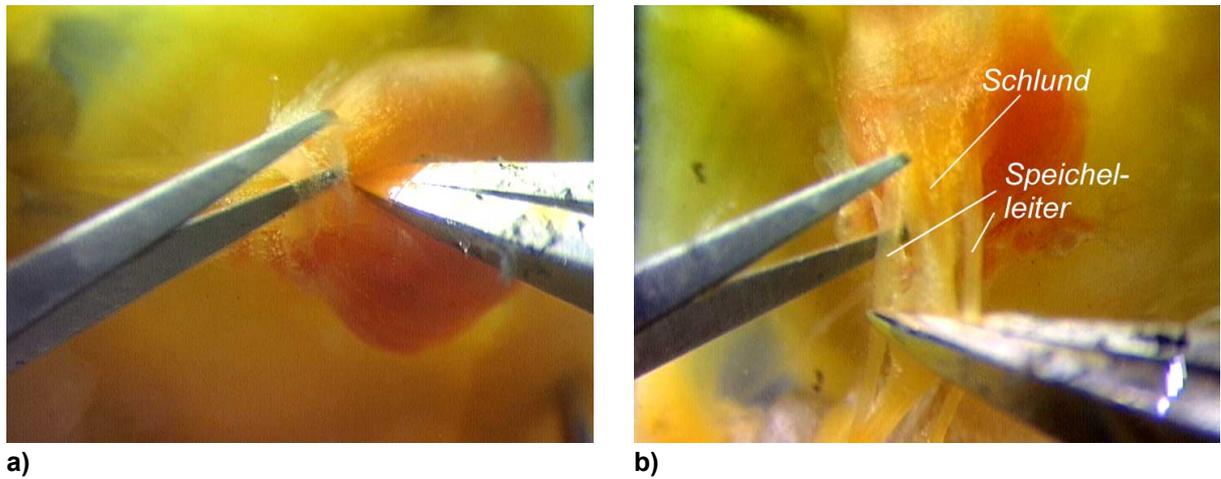


Abbildung 4.8: a) Durchtrennen der Verbindung zwischen den beiden Cerebralganglien. b) Nach Drehung um 90° werden der Schlund und die Speichelleiter durchgeschnitten.

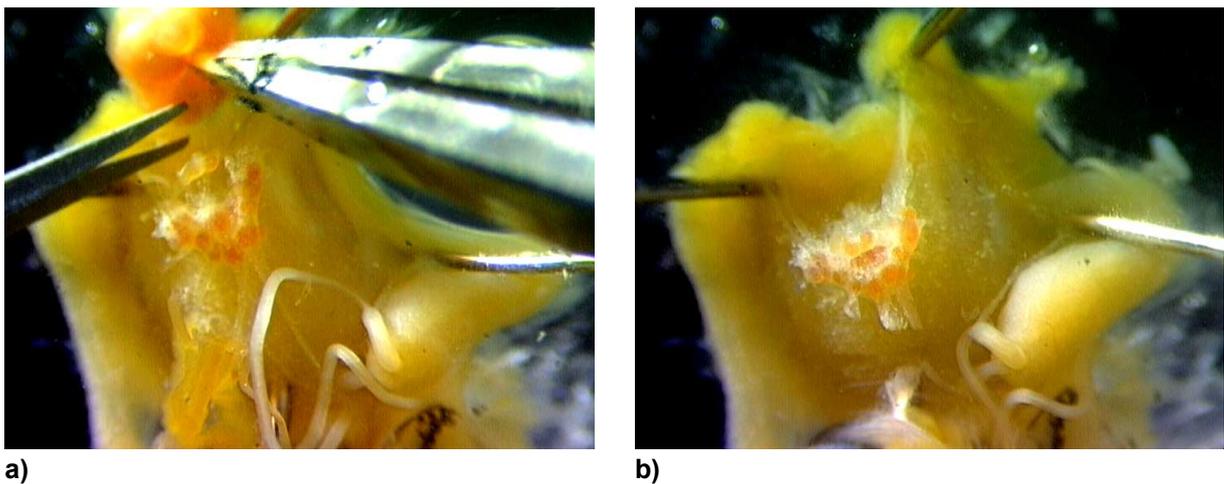


Abbildung 4.9: a) Die bukkale Masse wird nach oben geklappt und dann entfernt. b) Freipräpariertes Hirn. Zum vollständigen Auslösen müssen nur noch die Roots zum Fußbereich getrennt werden.

mit ABS gelegt. Nach dieser erneuten, antibiotischen Behandlung können die Hirne direkt für die Herstellung von Conditioniertem Medium (CM), zur Co-Kultur oder zur Neuronentnahme weiterwendet werden.

4.2.3 Neurone entnehmen

Bevor die Neurone entnommen werden können, müssen die Hirne fixiert werden, umgebendes Gewebe entfernt und die Ganglienhüllen nach enzymatischer Behandlung geöffnet werden.

Hirne fixieren und Outer Sheath entfernen

In einer kleinen silikongefüllten Schale werden die Hirne mit der ventralen Seite nach unten durch Minutiennadeln festgespannt. Als Fixierpunkte bieten sich seitlich die Enden der durchtrennten Cerebralganglienverbindung an, denn sie werden bei der nachfolgenden Enzymbehandlung nur schwach zersetzt. In Längsrichtung wird das Hirn an den Roots des Parietalganglions gespannt. Die wenigen, kleinen Neurone der Bukkalganglien wurden nicht zur Kultur genutzt und die Bukkalganglien deshalb entfernt. Es bleibt also der Ring aus Pedal-, Cerebral-, Pleural- und Visceralganglien übrig.

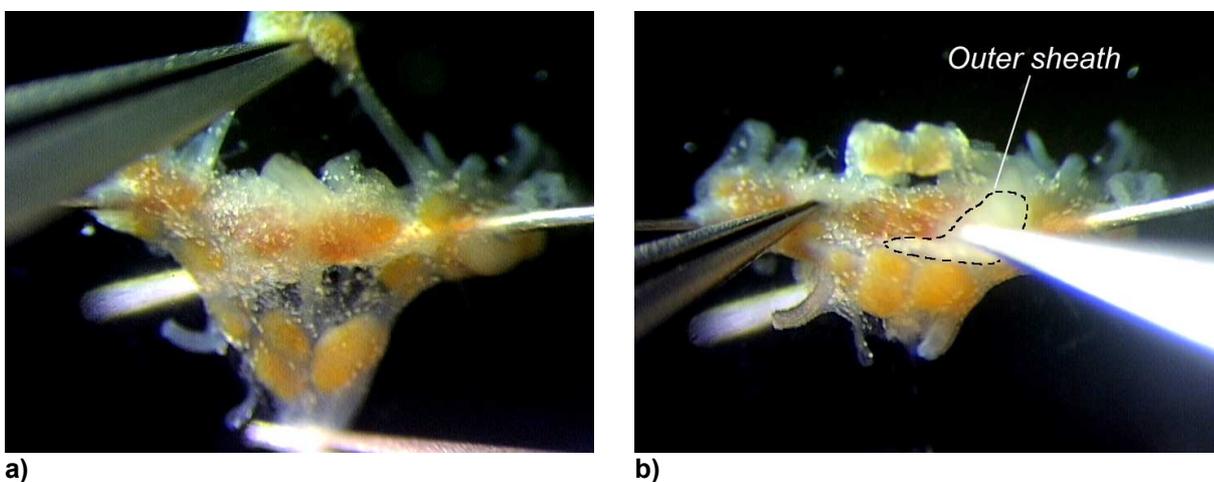


Abbildung 4.10: a) Das Hirn wird links und rechts mit zwei Minutiennadeln fixiert, die durch das aufgeschnittene Cerebralkonnektiv in die Cerebralganglien gesteckt werden. Die Pinzette links spannt das Bukkal-Ganglienpaar nach vorne, das nacher abgetrennt wird. Eine dritte Nadel spannt nachher das Hirn nach unten ab. b) Um Zugang zu den Ganglien zu bekommen muß erst die Gewebeschicht des Outer Sheath entfernt werden.

Die Mitte des Hauptrings ist noch mit einer Gewebedecke, dem Outer Sheath umhüllt. Sie wird mit zwei Pinzetten vorsichtig abgezogen und mit der Augenschere werden die letzten Enden zurückgeschnitten, die von Roots und Konnektiven, der Pedalganglien übriggeblieben sind. Das erleichtert später den Zugriff auf die Neurone im B-Cluster der Pedalganglien. Die antibiotische Salzlösung wird nun gegen das Kulturmedium, das Definierte Medium, ausgetauscht.

Enzymbehandlung

Jetzt werden in einer Enzymmischung von 1,33 mg/ml Collagenase-Dispase und 0,66 mg/ml Trypsin die Ganglienhäutchen aufgeweicht und die extrazelluläre Matrix zersetzt. Nach 30 min wird die Enzymlösung ausgetauscht und mehrfach gespült. Mit der Einwirkzeit der Enzymmischung kann das Hirn in den optimalen Ausgangszustand für die Entnahme der Neurone gebracht

werden. Kurze Zeiten um 25 *min* schonen die Neurone, verlangen aber intensivere, mechanische Manipulation beim Absaugen. Zeiten bis 35 *min* oder 40 *min* erleichtern zwar die Entnahme, belasten aber die Stabilität der Zellmembran.

Letzte Trypsinreste werden nach dem Spülen mit einer Lösung von 0,63 *mg/ml* Trypsin-Inhibitor 15min lang deaktiviert. Danach wird wieder mehrfach mit DM gespült. Bis zur Entnahme der Neurone werden die Hirne in hochosmolarem Medium (HODM) gelagert.

Spülen der Chips

Erst kurz vor dem Aufsetzen der Neurone auf die Chipoberfläche wird die Poly-l-ysin-Lösung aus den Chipwannen entnommen. Es wird noch dreimal mit Aqua ad injectabilia gespült und am Ende 450 μ l DM eingefüllt. Die Wannen zeigen durch die geringe Befüllung eine konkave Oberfläche, die im Luftstrom der Flowbox sehr stabil ist. Ihre guten optischen Eigenschaften erleichtern später die Zellpositionierung. Der Glasschale werden sterile, feuchte Wattestückchen zugegeben, die für eine mit Wasser gesättigte Atmosphäre sorgen und somit verhindern, dass verdunstendes Wasser die Osmolarität des Mediums verschiebt.

Zellentnahme

Zu den kritischsten Stationen der Präparation zählt die Zellentnahme. Das Öffnen des Ganglions und die Axotomie beim Absaugen bedeuten für die Neurone starken Stress, der sich im günstigeren Fall sofort durch das Auflösen des Neurons zeigt. Im schlechteren Fall scheinen die Neurone äußerlich intakt zu sein, verkümmern aber nach wenigen Tagen auf dem Chip. Die Entnahme einzelner Neurone gehört zu den Zellkulturverfahren mit dem größten manuellen Aufwand. Fehlerquellen wie scharfe Spitzen von Saugpipetten, inaktive Enzyme oder falsch angesetzte Instrumente lassen sich meistens erst nach mehreren Tagen Inkubation der Kultur am Gesamtergebnis erkennen. Die folgende Beschreibung ist das Ergebnis häufiger Variation von Verfahrensdetails, die von schnell veränderlichen Gegebenheiten wie zum Beispiel Enzym- oder Pipettenqualität abhängen, und deshalb permanent angepasst werden mussten.

Gute Saugpipetten Jede einzelne Zelle wird aufgrund ihres Erscheinungsbilds aus einem bestimmten Gebiet ausgewählt und mit einer Saugpipette entnommen. Die Saugpipette wird aus weichem Hämatokritglas gezogen und feuerpoliert. Ihr Öffnungsdurchmesser muss einige Mikrometer über dem Durchmesser der gewünschten Neurone liegen, damit die Zellen beim Absaugen nicht beschädigt werden. Mit einem maximalen, reproduzierbaren Durchmesser von 100 μ m können am besten Neurone bis 80 μ m – 90 μ m Größe entnommen werden. Die Öffnung je-

der einzelnen Saugpipette wird auf Glaszacken oder Risse kontrolliert. Jede Saugpipette wird mit einer stark konzentrierten Lösung von fötalem Kälberserum gespült. Das fötale Kälberserum passiviert die Glasoberfläche und verhindert dadurch das Anhaften von Neuronen. Solcherart beschichtete Pipetten sind eine wichtige Voraussetzung für erfolgreiche Entnahme und Transport von Neuronen. Nichtadsorbierte Serumrückstände wurden durch mehrfaches Spülen mit DM ausgewaschen.

Ganglion öffnen Vor der Entnahme des Neurons muss die Hülle des entsprechenden Ganglions aufgerissen werden. Es ist unumgänglich, dass bei diesem Schritt viele Neurone des Ganglions verletzt werden und absterben. Nach Versuchen mit individuell geformten Pinzettenspitzen hat sich das Öffnen mit ultradünnen Wolframspitzen etabliert [7]. Das Ganglion wird, meistens am einem seiner Konnektive, mit einer feinen Pinzette festgehalten. In unmittelbarer Umgebung sticht die Wolframspitze durch die Ganglienhülle und fährt möglichst schnell von der Pinzette weg, so dass in der Hülle ein langer Schnitt entsteht. Die Neurone entlang dieses Schnittes sind in der Regel nicht mehr zu verwenden, weshalb er durch Gebiete mit nicht relevanten Neuronen geführt wird. Mit zwei feinen Pinzetten wird das Ganglion an zwei Konnektiven, leicht auseinandergezogen. Je länger der Schnitt ist, desto leichter quellen nun die Neurone aus dem Ganglion heraus und sind zum Absaugen zugänglich.



Abbildung 4.11: Die feine Pinzette rechts hält das rechte Parietal-Ganglion fest, während mit der Wolframspitze eingestochen wird um die Hülle des Ganglions zu öffnen.

Auswahl In den ersten Präparationen wurde versucht das Neuron I.P3.1 auf der rechten Seite von R.P.G sowie V.D.4 und R.Pe.D.1 zu isolieren um den Oszillator, der die Atmung steuert, auf dem Chip nachzubilden. Die Ausbeute an Neuronen war allerdings sehr begrenzt, zudem konnte I.P3.1

nicht zuverlässig identifiziert werden. Nach Erfahrungen mit den Neuronen um V.D.4 und aus L/R.Pe.E/F wurden später fast ausschließlich die Neurone von L/R.Pe.A-C verwendet, die sich aufgrund ihrer Größe, Zahl, synaptischen Eigenschaften und ihrer Zugänglichkeit empfehlen.

Neuron entnehmen Nach einer Pause, in der andere Ganglien geöffnet wurden, werden frei liegenden Neurone leicht überblasen. Dabei lösen sich verletzte Neurone und Gewebereste. Es können nun die geeigneten Neurone ausgewählt werden. Optisch kann man Zellen mit unverletzter Membran an einem perlenhaften Glanz erkennen. Rund um das ausgewählte Neuron wird mit der Pipette in den Zellverband geblasen um letzte Verbindungen zu Nachbarzellen zu trennen. Jetzt kann die Pipette bis zum Axon hinab über die Zelle gestülpt werden. Mit einer ruckartigen Seitwärtsbewegung und einem kurzen Ansaugen wird das Neuron herausgerissen. Es befindet sich danach in der Pipette und wird wieder vorsichtig ausgeblasen. Neurone mit verletzter Membran verlieren ihren perlenhaften Glanz oder zerfallen sogar. Je nach Herkunft kann auch ein Axonstumpf mit herauspräpariert worden sein, der zwar nach einem Tag in Kultur degeneriert, aber für den vitalen Zustand des Neurons spricht. Vitale Zellen werden wieder eingesaugt und einzeln übergesetzt.

Kapitel 5

Kultur

Das Wachstum von Neuronen auf Halbleiterstrukturen bildet den aufwendigsten Teil des Experiments. Die Kulturmethode musste von Standardrezepten [19], [32] abgewandelt und an die besondere Umgebung einer Zellkultur auf Halbleitern angepasst werden. Die Neurone werden ohne Zwischenschritt in der Chipkammer kultiviert. Sie finden dort eine kleinräumige Umgebung mit nur 500-600 μl Volumen und eine heterogene Wannenkonstruktion aus Siliziumoxid, Silikon und Plexiglas vor. Der erste Abschnitt zeigt Vor- und Nachteile der verschiedenen, angewendeten Kulturtechniken.

Der zweite Abschnitt beschreibt den zweiten wichtigen Punkt neben einem erfolgreichen Wachstum: Die Neurone müssen bis auf weniger als einen Neurondurchmesser genau auf den aktiven Strukturen des Chips positioniert werden, damit sich von den zukünftigen Schnittstellen der Neuron-Halbleiter-Verbindung aus das Netzwerk aufbauen kann. Bei der Lösung dieses Problems sind technische Hilfsmittel wie Mikromanipulatoren dem manuellen Einsatz deutlich unterlegen. Zwar besitzen Mikromanipulatoren eine sehr große Positioniergenauigkeit, die verfügbaren Systeme besitzen jedoch nicht geeignete Bedienerschnittstellen um eine Saugpipette gleichzeitig zu rotieren und zu verschieben, wie das von Hand möglich ist.

Hinzu kommt, dass die Neurone nicht direkt von der Pipette angefasst werden dürfen und somit die große Positioniergenauigkeit von Mikromanipulatoren keinen Vorteil bringt. Wie Neurone trotzdem "angefasst" werden können wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben.

5.1 Wachstumsbedingungen

Die neuronalen Wachstumsfaktoren, die zur Neuriten- und Synapsenbildung in Kultur notwendig sind, können dem Kulturmedium auf verschiedene Weise zugeführt werden. Allen Verfahren ist gemein, dass keine synthetisch hergestellten Wachstumsfaktoren verwendet wurden, sondern Hirne für längere Zeit in DM inkubiert wurden, wo sie die natürlichen Wachstumsfaktoren freisetzen.

Konditioniertes Medium (CM)

Die am öftesten angewandte Form ist die Erzeugung von Medium, das die Wachstumsfaktoren in konzentrierter Form enthält. Dazu werden 2 Hirne/ml Medium (DM) für 72 h in silanisier-ten Glasschälchen inkubiert [23], [33]. Nach Zentrifugieren und Sterilfiltration können Aliquotschockgefroren werden. Der Vorteil dieser Prozedur liegt darin, dass in den Aliquoten Medium mit identischer Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren lagert, das später Präparationen mit gleichen Wachstumsbedingungen garantiert. Allerdings kommt das konditionierte Medium während der Herstellung mit mehreren Oberflächen in Kontakt, von denen sichergestellt sein muss, dass sie steril sind und minimal Wachstumsproteine adsorbieren.

Co-Kultur

Dieses Problem taucht bei Co-Kultivierung nicht auf. Hier werden die Hirne, die die Wachstumsfaktoren freisetzen, in der gleichen Umgebung inkubiert, in der die Neurone der Kultur wachsen [32]. Dieses Verfahren ist sehr einfach und zuverlässig. Die Hirne, die für die Produktion der Wachstumsfaktoren benötigt werden, werden gleichzeitig mit den Hirnen der Kulturneurone präpariert und kurz vor der Zellpositionierung der Chipwanne beigegeben. Dabei hat sich das Stufendesign der Chipwanne bewährt, das es ermöglicht die Co-Kultur-Hirne auf einem Ring zu lagern, der von der Chipoberfläche abgesetzt ist.

Dennoch besteht bei Co-Kultur immer die Gefahr, dass während der Kultivationszeit oder beim Transport die Co-Kultur-Hirne in das Gebiet der positionierten Neurone rutschen und den Aufbau zerstören. Ein weiterer Nachteil der Co-Kultur ist, dass die Neurone, die in die Chipwanne eingesetzt werden, noch kein Substrat vorfinden, das mit Wachstumsfaktoren belegt ist. Es ergibt sich dadurch ein verzögerter Wachstumsstart.

Prä-Co-Kultur

Um den verzögerten Wachstumsstart zu beschleunigen, wurde als Kompromiß eine Methode getestet, in der die Vorteile von konditioniertem Medium und Co-Kultur vereinigt sind. In der Prä-Co-Kultur werden die Hirne nicht kurz vor dem Aufsetzen der Neurone zugegeben, sondern schon 3 Tage vorher in der Chipwanne inkubiert. Hier fallen keine zusätzlichen Adsorptionsflächen an und es gibt keine weiteren Sterilitätsprobleme. Das Medium ist beim Einsetzen der Neurone schon mit Wachstumsfaktoren gesättigt.

Leider ist aber auch schon die Poly-l-lysin-beschichtete Chipoberfläche mit Proteinen abgedeckt. Dadurch wird die Haftung der positionierten Zellen stark verringert, viele Neurone verrutschen

schon beim ersten Transport des Chips. Das macht diese sonst sehr vorteilhafte Methode untauglich für die gezielte Positionierung von Neuronen, wie sie im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

Co-Kultur für definierte Soma-Anordnungen Für den Aufbau von Netzen auf Chips wurden jeder Messkammer mit einem Volumen von $650 \mu\text{l}$ jeweils 2 Co-Kultur-Hirne beigegeben. Die Chips wurden zusammen mit einem nassen Wattebausch in Petrischalen gesetzt um Osmolaritätsverschiebungen durch Eintrocknen des geringen Kulturvolumens zu verhindern. Das Wachstum fand bei 20°C in einem Brutschrank statt.

5.2 Zellpositionierung

Im bisherigen Verlauf der Präparation waren vitale, wachstumsfähige Neurone das Ziel. Beim Übersetzen der Zellen auf den Chip wird hingegen die Struktur des künftigen Netzwerks aufgebaut. Sie ist durch das Design des Chips vorgegeben und die Aufgabe beim Positionieren der Zellen besteht darin, diesem Design möglichst gut zu folgen.

Der Chip besitzt 14 Kombinationsstrukturen, die ein Neuron gleichzeitig stimulieren und detektieren können. Sie sind in einem Abstand von $50 \mu\text{m}$ ringförmig angeordnet. Es wird beim Positionieren der Neurone versucht möglichst viele Neurone auf die Struktur zu setzen. Die Einschränkungen, die dabei zu beachten sind, haben eine bestimmte Vorgehensweise entstehen lassen.

Klebstoff für Neurone

Die einfachste Möglichkeit Zellen an einer bestimmten Stelle zu positionieren wäre, ausreichend Zellen auf dem Chip anzuhäufen und danach die Zellen so lange auf der Struktur hin- und her zu schieben bis sich richtig verteilt sind. Dabei könnte man sogar Mikromanipulatoren einsetzen, deren Ortsauflösung leicht den Mikrometer-Bereich unterschreitet. Doch der Chip ist mit Poly-l-lysin beschichtet, was auf Neurone wie ein Klebstoff wirkt. Eigentlich ist das Poly-l-lysin dazu gedacht nur die Proteine zu adsorbieren, die von cokultivierten Hirnen freigesetzt werden. Man könnte also eine Beschichtung suchen, die nur die Wachstumsproteine bindet und mit der Zellmembran hingegen schwach wechselwirkt. Doch gerade die gute Fixierung der Neurone auf der Oberfläche ist für die ersten Stunden der Kultur sehr wichtig. Nach dem Belegen mit Neuronen werden die Chips in einen Brutschrank versetzt, ein Transport, der jede Zellanordnung auf dem Chip auflösen würde. Weiter garantiert die Beschichtung, dass die Zellen sich nicht

wieder von der Oberfläche entfernen. Nur adhärenierte Neurone zeigen Wachstum. Die Membran einer fixierten Zelle bindet so stark an die Poly-l-lysin-Schicht, dass sie nicht mehr zerstörungsfrei abgelöst werden kann. Ein Neuron, das die Oberfläche einmal berührt hat, kann also weder verschoben noch weggerollt werden.

Wie fasst man Neurone an?

Die unmittelbare, irreversible Adhäsion von Neuronen auf Poly-l-lysin erfordert, dass nach dem Übersetzen aus der Präparationsschale die Neurone sofort richtig positioniert werden. Das Neuron wird in der Chipwanne aus der Pipette ausgelassen und nicht wieder eingesaugt, denn jeder direkte mechanische Kontakt birgt die Gefahr einer Membranverletzung. Es steht zur Positionierung nur eine Zeitspanne zwischen 5 s – 10 s zur Verfügung, die ein Neuron braucht um ungefähr die Tiefe der gefüllten Chipwanne zu durchfallen. Während dieser Zeit wird das Neuron nur noch

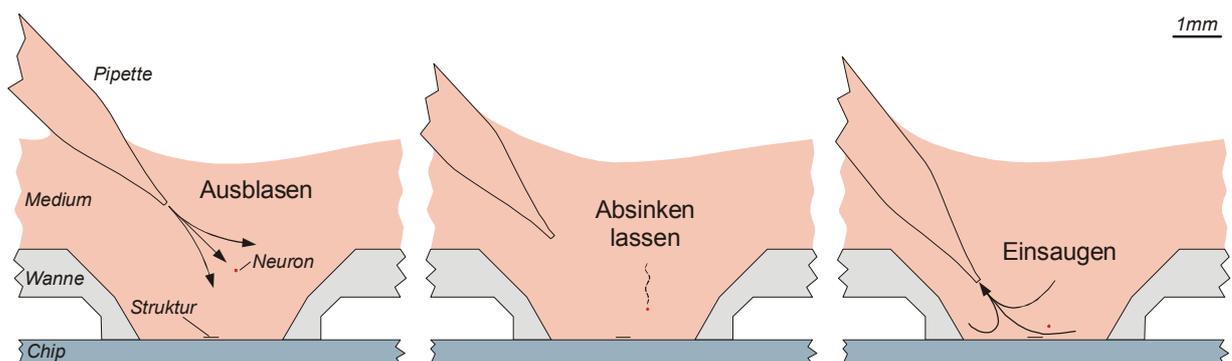


Abbildung 5.1: Von links nach rechts: Positionieren eines einzelnen Neurons. Das Neuron sinkt nach dem Austritt aus der Pipette langsam auf die Chipoberfläche. Durch geschicktes Ausblasen und Einsaugen wird das Neuron auf die Struktur manövriert. Vor dem Einsaugen des Neurons wurde gewartet bis sich die Füllhöhe in der Pipette im Gleichgewicht eingependelt hat. Das verhindert, daß das Neuron beim Eintauchen der Pipette in die Kulturwanne sofort hinausschießt und das Neuron aus dem Blickfeld gerät.

durch Anblasen oder Ansaugen bewegt. Die längste Positionierzeit ergibt sich, wenn das Neuron direkt unter der Medium-Luft-Grenzfläche mit geringer Geschwindigkeit ausgeblasen wird. Sehr kleine Ausströmgeschwindigkeiten erreicht man, wenn die Pipette beim Einsaugen des Neurons über die Gleichgewichtsfüllung, bei der sich Kapillarkräfte und Druck der Wassersäule kompensieren, hinaus vollsaugt. Nach dem Eintauchen in die Chipwanne wird das Neuron vom Überdruck der Pipette langsam und gleichmäßig ausgetrieben.

Die verbleibende Höhe des Neurons über der Oberfläche kann gut abgeschätzt werden, denn die Si-SiO-Grenzfläche im Chip wirkt wie ein Spiegel. Erst wenn das Neuron auf der Oberfläche ankommt vereinigen sich virtuelles und reelles Bild in der Stereolupe. Der Versatz zwischen

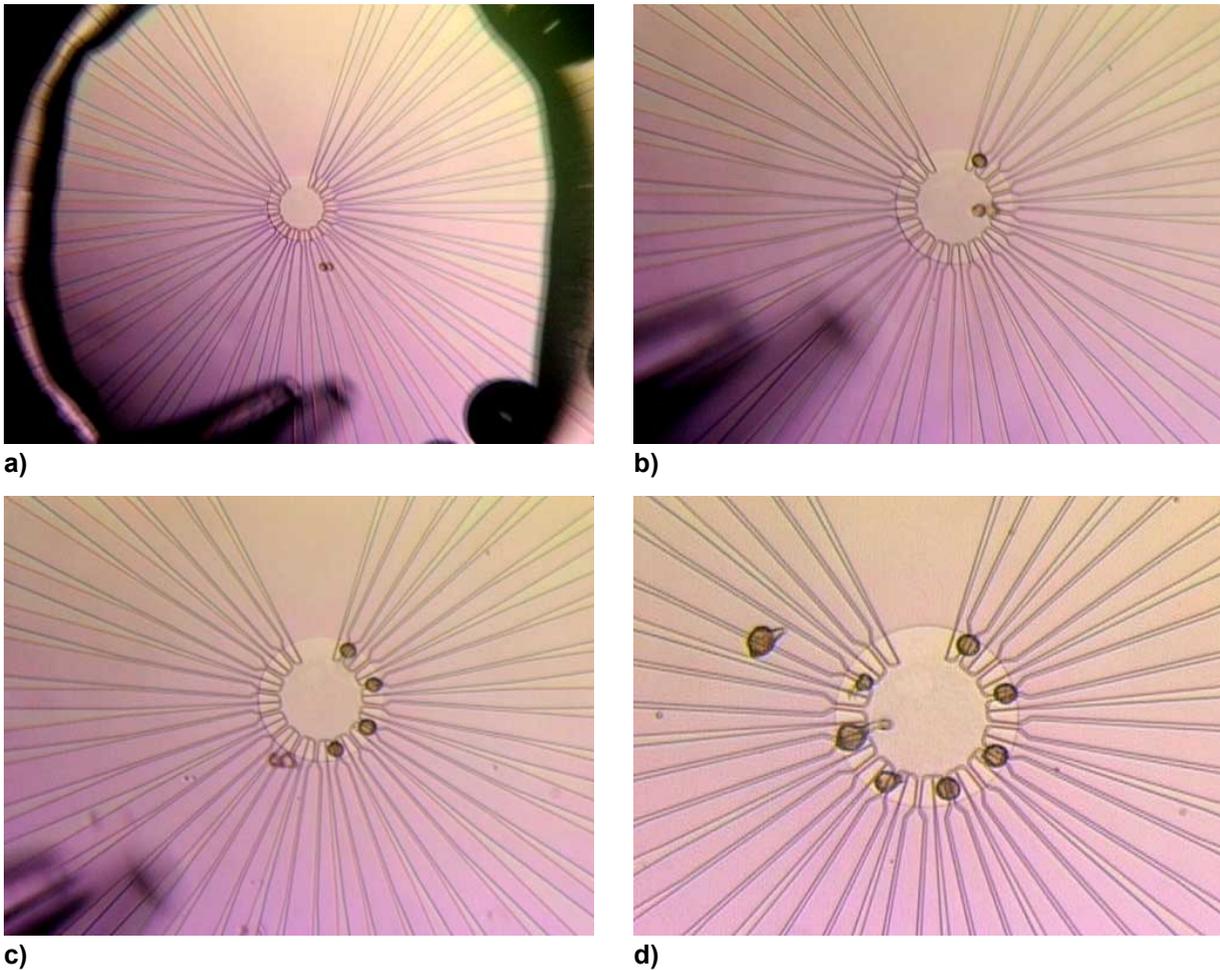


Abbildung 5.2: a) Das erste Neuron wird aus der Pipette geblasen. In der Auskopplung aus einem Strahlengang der Stereolupe zeigen sich reales Bild (links) und Spiegelbild (rechts) von Pipette und Neuron. b) Das zweite Neuron wird aufgesetzt. Zum genauen Positionieren wird gleichzeitig eingezoomt. c) Die Neuronen besetzen jede zweite Doppelstruktur. d) Es wurden hier noch zusätzlich Neuronen außerhalb der Struktur aufgesetzt. (nicht alle sichtbar). Der Axonstumpf des Neurons auf Doppelstruktur 11 zeigt wie gewünscht zum Zentrum der Chipstruktur.

reellem und virtuellem Bild liefert ein indirektes Maß für die Höhe des Neurons über der Oberfläche. Falls nötig kann das Absinken der Zelle verlangsamt werden, indem mit der Pipette von oben gesaugt oder zwischen Oberfläche und Neuron Medium eingeblasen wird.

Der richtige Platz, die richtige Ausrichtung

Ein Neuron ist dann richtig positioniert, wenn es auf einem FET zentriert gelandet ist. Es kann dann gereizt und detektiert werden. Das erste Neuron wird auf die Doppelstruktur 1 gesetzt. Wenn die Neurone einen Durchmesser kleiner als $50 \mu m$ haben, dann könnte das nächste Neuron auf die Doppelstruktur 2 plaziert werden. Dieser direkte Kontakt provozierte jedoch un-

erwünschte Soma-Soma-Synapsen. Es wird deshalb eine Doppelstruktur ausgelassen und das nächste Neuron erst auf der Doppelstruktur 3 abgesetzt. Der Chip kann somit bis zu 7 Neurone auf Doppelstrukturen aufnehmen. Natürlich können auch noch Neurone, die nur auf den Reizzungen zwischen zwei Transistoren platziert worden sind, an einem Netzwerk teilnehmen, allerdings ist deren Funktion als präsynaptisches Neuron somit vorbestimmt.

Bei einer geschätzten Auflagefläche von $20\ \mu\text{m}$ Durchmesser muss ein Neuron auf weniger als $40\ \mu\text{m}$, also weniger als der Zelldurchmesser, genau positioniert werden. Nachteilig wirkt beim Aufsetzen ein Neuron mit Axonstumpf, dessen Länge leicht des Vielfache eines Neurondurchmessers annehmen kann.

In diesem Fall muss auf zwei Dinge geachtet werden: Der Axonstumpf darf nicht vor dem Soma auf der Doppelstruktur auftreffen, denn die Spitze des Stumpfes würde adhärieren und das Soma um die Länge des Axonstumps fehlplazieren. Trifft, wie gewünscht, das Soma zuerst auf die Doppelstruktur, so muss noch vor dem Auftreffen der Axonstump korrekt ausgerichtet werden. Wie später noch zu begründen, lässt eine optimale Ausrichtung den Axonstumpf zur Chipmitte zeigen.

Kapitel 6

Messapparatur

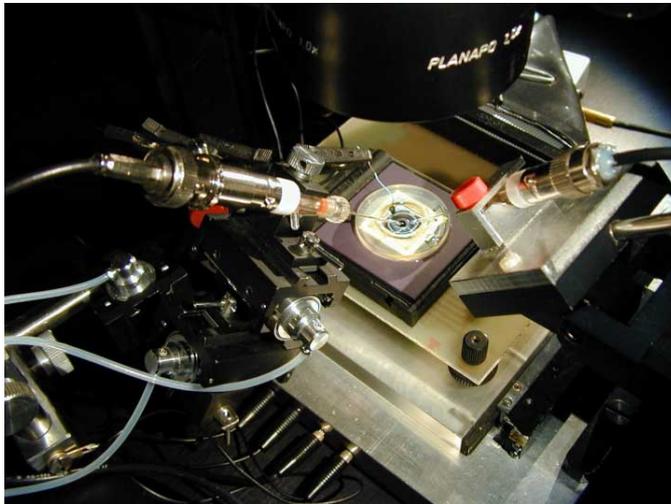
Der Verbund aus Chip und aufgewachsenem, neuronalem Gewebe ist kompakt und lässt sich leicht handhaben. Nachdem er in den entsprechenden Sockel gesteckt wurde ist er einsatzbereit. Ein solches System lässt sich eigentlich wie ein gewöhnliches Messgerät direkt auf einem Schreibtisch betreiben.

Es wurde jedoch nicht auf eine zusätzliche, klassische Vermessung des neuronalen Netzes mit Mikroelektroden verzichtet. Die Ableitung von Neuronen mit Mikroelektroden erlaubt es den Signalfloss durch das neuronale Netz vollständig zu dokumentieren. Aus dem Vergleich zwischen dem abgeleiteten Membranpotential und des Signal des FETs lassen sich zusätzlich Rückschlüsse über die Parameter der Neuron-Silizium-Schnittstelle ziehen. Nebenbei ergibt sich noch der Vorteil, dass noch mehr neuronale Konfigurationen des hybriden Netzes ausgemessen werden können. Und zwar zusätzlich solche, in denen nicht alle Neurone die aktiven Strukturen des Chips bedecken. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels wird deshalb der mechanische Aufbau der Apparatur beschrieben, der von den Anforderungen zur intrazellulären Ableitung geprägt ist. Schlägt sich der Einsatz von Mikroelektroden eher im mechanischen Aufbau der Apparatur wieder, so benötigen Chips eine aufwendigere elektrische Ansteuerung und die damit verbundene Programmierung. Der zweite Abschnitt ist deshalb dem Konzept der Chipansteuerung und dem Messprogramm gewidmet. Im letzten Abschnitt wird dann der Einsatz des Aufbaus anhand des Messablaufs beschrieben.

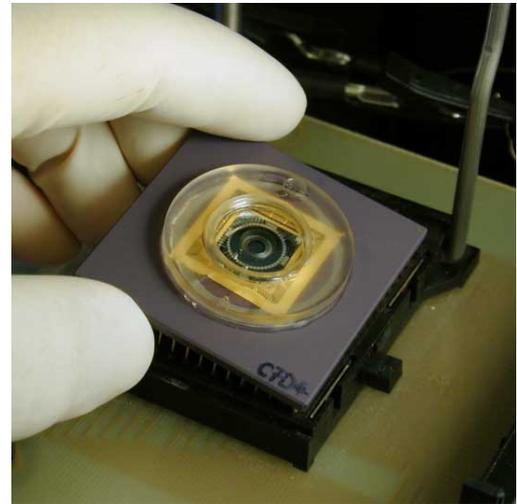
6.1 Mechanischer Aufbau

Der Aufbau besteht aus einem Tisch mit einer schweren, bedämpften Platte, welcher von einem mechanisch entkoppelten Faradaykäfig umgeben wird. In der vorderen Mitte der Platte ist ein kommerzieller, verschiebbarer ZIF-Sockel (Zero-Input-Force) aufgesetzt, der als mechanischer Träger des Chips und elektrischer Kontakt zum FET-Verstärker dient. ZIF-Sockel haben den

Vorteil, dass sie jeden Chip in der gleichen Position fixieren und dass beim Einstecken der Chip nur minimal erschüttert wird.



a)



b)

Abbildung 6.1: a) *Meßsituation: Eine Mikroelektrode wird von links mit einem hydraulischen Manipulator gehalten, die andere von einem elektrischen Manipulator von vorne (im Bild rechts). Der Chip sitzt in einem ZIF-Sockel, das Medium wird durch eine Badelektrode geerdet.* b) *Einsetzen eines Chips in den ZIF-Sockel.*

Als einziges, elektrisches Instrument steht der FET-Verstärker auf der Tischplatte innerhalb des Käfigs. Dadurch lässt sich der Kabelweg zum Chip kurz halten, über den der schwache Drain-Source-Strom fließen muss, bevor er in eine störteste Spannung gewandelt wird. Die Situation in der Messkammer, wo die Zellen penetriert werden, wird von oben mit einer Stereolupe im Aufsicht beobachtet. Das Bild der Lupe wird in ein Schwarz-Weiß-Videosystem ausgekoppelt, das Einzelbilder ausdrucken oder als Pixeldatei abspeichern kann.

Mikromanipulatoren Die zwei Mikroelektroden, mit denen intrazellulär abgeleitet wird, sind auf Mikromanipulatoren montiert, welche den Chip von vorne und von der Seite anfahren. Jede Mikroelektrode wird unter einem vertikalen Winkel von ca. 45° gehalten. Die Beschränkung auf zwei Mikromanipulatoren vereinfacht die Handhabung des Chips und den Ablauf der Experimente. In Messsituationen mit mehr als zwei beteiligten Neuronen werden die Zellen nacheinander angestochen, so dass die Mikroelektroden aus den schon vermessenen Zellen wieder herausgefahren werden müssen. Es besteht die Gefahr, dass die penetrierten Zellen dabei von den Mikroelektroden aus dem Netz gerissen werden, was zu einem Kollaps der restlichen Neurone führt. Werden die Mikroelektroden jedoch entlang ihrer axialen Richtung ruckartig aus

dem Zellkörper zurückgezogen, so bleiben die meisten Neurone und damit das Netzwerk intakt. Deshalb kamen zwei Manipulatortypen zum Einsatz, die beide schnelle Verfahrmöglichkeiten in Mikroelektroden-Richtung bieten. Der hydraulische Manipulator wurde so konfiguriert, dass einer der drei Arbeitskolben in Penetrationsrichtung verfährt und die anderen beiden die x-y-Ebene abdecken. Beim computergesteuerten Manipulator, dessen Achsen kartesisch angeordnet sind, wird die schnelle Rückzugsbewegung softwareseitig erzeugt und per Tastendruck ausgelöst. Die Manipulatoren können beim Rückzug in sehr kurzer Zeit Strecken zwischen $10\text{-}30\mu\text{m}$ zurücklegen.

6.2 Datenaufnahme

Die Ereignisse des untersuchten Systems liegen in Form von Transienten wie zum Beispiel einem Aktionspotential oder einer Folge von rechteckigen Reizpulsen vor. Um Zusammenhänge dieser Ereignisse festzustellen, müssen die Transienten der beteiligten Elemente gleichzeitig aufgezeichnet werden. Die Grobstruktur des Messprogramms entspricht also der eines Mehrkanaltransientenrekorders, der wie ein Oszilloskop die Daten aller Kanäle kontinuierlich aufzeichnet und in einem Zeitfenster vorbestimmter Länge nacheinander darstellt.

Im Unterschied zu kommerziellen, elektrophysiologischen Messprogrammen, die ebenfalls in diesem Modus arbeiten und darauf optimiert sind feste Pulsprotokolle zu durchfahren, ist für die Vermessung von Signalwegen in hybriden Netzen ein Programm erforderlich, in dem Pulse für Reizspots und Strominjektion rasch an die Erfordernisse angepasst werden können. Dazu gehören auch vereinfachte Chipsteuerung sowie automatische Verzeichnis- und Dateinamensverwaltung.

Angepasste Abtastraten

Je nach Abtastrate, Länge des Zeitfensters und Zahl der gleichzeitig dargestellten Kanäle kann ein Datenaufkommen entstehen, das vom Rechner nicht mehr bewältigt wird. Als Engstelle erweist sich nicht die Speicherung, sondern die Bildschirmdarstellung der grafischen Oberfläche. Die Zeit, die vom Rechner zur Darstellung der Kurven benötigt wird, ist in erster Näherung proportional zur Zahl der dargestellten Datenpunkte. Deshalb wurde ein Kompromiß zwischen Erfüllung des Nyquist-Kriteriums und optimaler Rechnerauslastung getroffen. Die Zahl der pro Zeitfenster aufgenommenen Abtastwerte ist konstant und wurde beim verwendeten Rechner auf 3000 Punkte gesetzt. Die Abtastrate hingegen ist variabel und hängt von der vorgegebenen Länge des Zeitfensters ab. Sollen schnelle Ereignisse, wie zum Beispiel die Zellantwort auf eine Reiz-

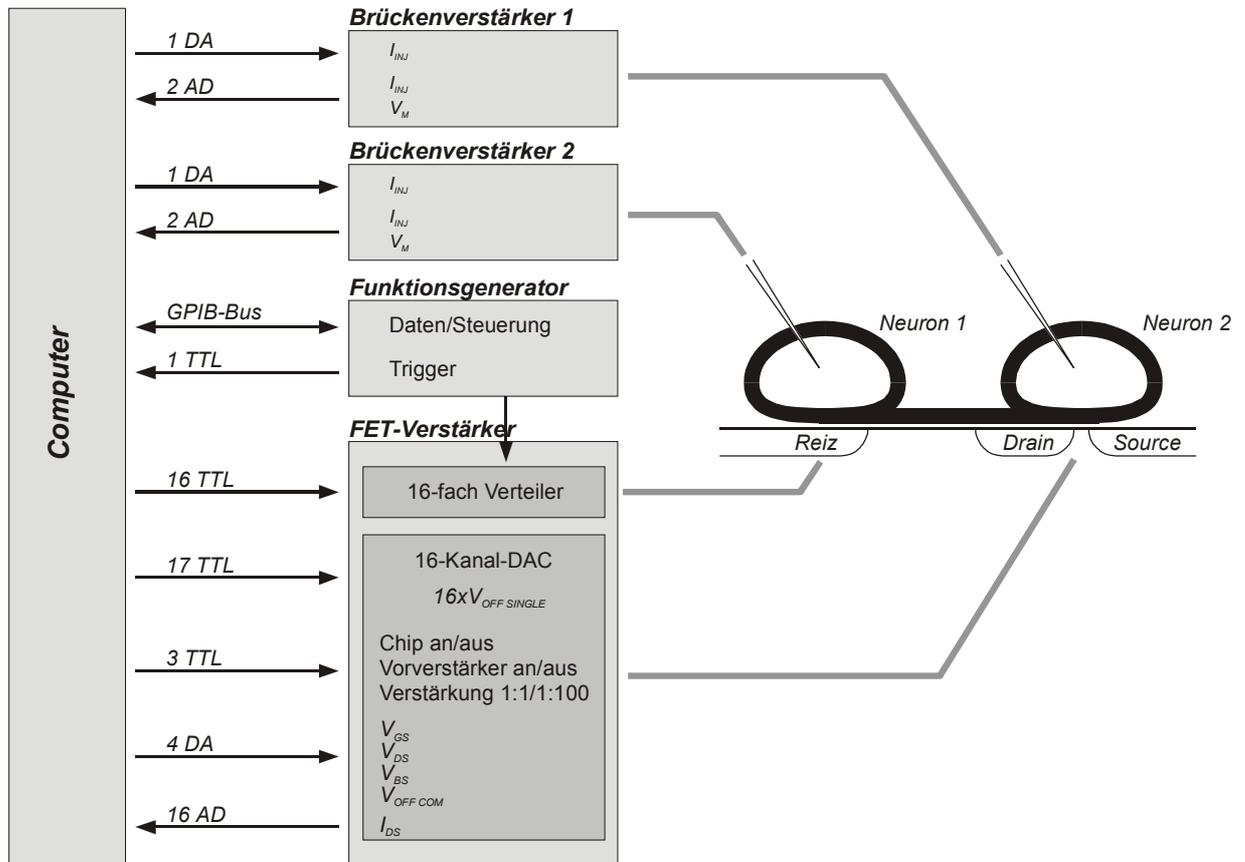


Abbildung 6.2: Schema des elektrischen Aufbaus. Als Referenz wird mit zwei Mikroelektroden das Zellpotential abgeleitet. Die Neuronen können damit auch im Current-Clamp-Modus stimuliert werden.

flanke, aufgezeichnet werden, so wird durch Verkleinerung des Zeitfensters "hineingezoomt", die erhöhte Zeitauflösung stellt sich dann automatisch ein. Zusammenhänge, die erst auf langer Zeitskala sichtbar werden, werden in einem großen Zeitfenster mit niedriger Abtastrate betrachtet. Der Rechner wird dabei nicht mit einer unnötig hohen Datenrate belastet.

$$N_{Sample} = const = 3000$$

Alle abgetasteten Kanäle wurden von einem zentralen AD-Wandler digitalisiert, dem ein vorge-setzter Multiplexer die abzutastenden Kanäle nacheinander zuschaltet. Die Abtastwerte der aufgezeichneten Kanäle sind deshalb nicht absolut synchron. Der Versatz durch den Multiplexer ist im Vergleich zu den verwendeten Samplingraten jedoch so klein, dass auf elektrophysiologischer Zeitskala die Abtastwerte der Transienten als gleichzeitig angesehen werden können. Bei sehr scharfen Spannungsspitzen, wie sie bei der kapazitiven Stimulation auftreten, kann dieser Effekt jedoch dazu führen, dass von zwei Kanälen dieselbe Reizspitze unterschiedlich hoch beziehungs-

weise gar nicht wiedergegeben wird. Unter Berücksichtigung der Druckauflösung stellen die in dieser Arbeit abgebildeten Graphen alle Kanäle als echt synchron dar.

Pulsgenerierung

Zur Strominjektion und zur Reizung von Zellen werden Pulsquellen benötigt, die in der Lage sind rechteckförmige Pulse und Kombinationen davon zu erzeugen. Pulsfolgen sind definiert durch Pulshöhe, -dauer, -abstand und -anzahl. Weiter kann noch ein allgemeiner Offset und ein Pulsinkrement angegeben werden, das die Pulshöhe nach jedem Puls verändert.

Die Pulse für Strominjektion und Reizung werden zwar gleich definiert, aber auf unterschiedliche Arten erzeugt. Das Kommandosignal für die Brückenverstärker erzeugt ein 2 Kanal Digital-Analog-Wandler auf einer Multi-I/O-Karte im Rechner. Der Puls liegt als Folge von bis zu 2048 Stützstellen vor, die von einem unabhängigen Oszillator mit bis zu 500kHz gewandelt werden. Die Reizung von Neuronen benötigt allerdings einen DAC mit höheren Flankensteilheiten, wie sie besser von Funktionsgeneratoren geliefert werden können. Die Reizpulse wurden deshalb von einem externen, frei programmierbaren 20MHz Funktionsgenerator erzeugt, dem die Pulse als Folge von bis zu 16000 Stützstellen über einen GPIB-Bus geliefert werden.

Beide Pulsgeneratoren können mit dem Analog-Digital-Wandler der Datenaufnahme synchronisiert werden, so dass ein wiederholt ausgegebener Puls immer an der gleichen Stelle des aufgenommenen Zeitfensters steht. Das Programm wird dabei im "Pulsmodus" betrieben, in dem die Antwort des Systems auf den Puls solange auf dem Bildschirm stehenbleibt, bis entschieden ist, ob ein neuer, veränderter Puls ausgegeben wird, oder der Zustand des Netzwerks ohne Stimulation beobachtet wird.

6.3 Brückenverstärker

Die intrazelluläre Ableitung wurde von zwei Brückenverstärkern übernommen, die im "current clamp"-Modus arbeiten. Der Zelle wird dabei eine vorbestimmter Strom injiziert. Gleichzeitig wird der Verlauf der Membranspannung aufgenommen. Der in die Zelle injizierte Strom setzt sich zusammen aus einem Offsetgleichstrom, der manuell am Verstärker eingestellt, und einem veränderlichen Stromsignal, das in Form einer Analogspannung vom Messrechner vorgegeben werden kann. An seinen Ausgängen liefert der Brückenverstärker das um den Faktor 10 verstärkte Membranpotential und den tatsächlich angewendeten Strom in Form zweier Ausgangsspannungen. Für eine Mikroelektrode sind bei der Datenerfassung durch den Messrechner also ein DA- und zwei

AD-Wandler einzurechnen. Mikroelektrodeneigenschaften wie Längswiderstand und Streukapazität, die die Transiente des Membranpotentials während der Strominjektion verfälschen, werden am Verstärker manuell kompensiert.

6.4 Der Chip

6.4.1 Aufbau

Die Strukturen wurden an der TU Berlin in LOCOS-Technologie [40] prozessiert, als einzelne Dices der Größe $12\text{ mm} \times 12\text{ mm} \times 0,5\text{ mm}$ geliefert und vor Ort zu einem zellkulturfähigen Chip verkapselt. Als Träger wurde ein kommerziell erhältlicher Keramikträger mit 17×17 Pins verwendet, der sich erschütterungsarm in entsprechende Prozessorsockel (ZIF-Sockel) stecken lässt.

Das Dice wird in der Aussparung des Keramikträgers mit Latexkleber fixiert. Die elektrische Verbindung zwischen Dice und Keramikträger erfolgt über Aluminiumdrähte, die auf die jeweiligen Kontakte gebondet werden. Geschützt wird diese Konstruktion durch eine zweiteilige Plexiglaskammer, die gleichzeitig als Kulturwanne für die Neurone dient. Befestigt werden Innen- und Außenwannen mit biologisch verträglichem Silikonkleber. Aus Sicherheitsgründen wird der Hohlraum der Plexiglaskammer mit Kunstharz ausgegossen.

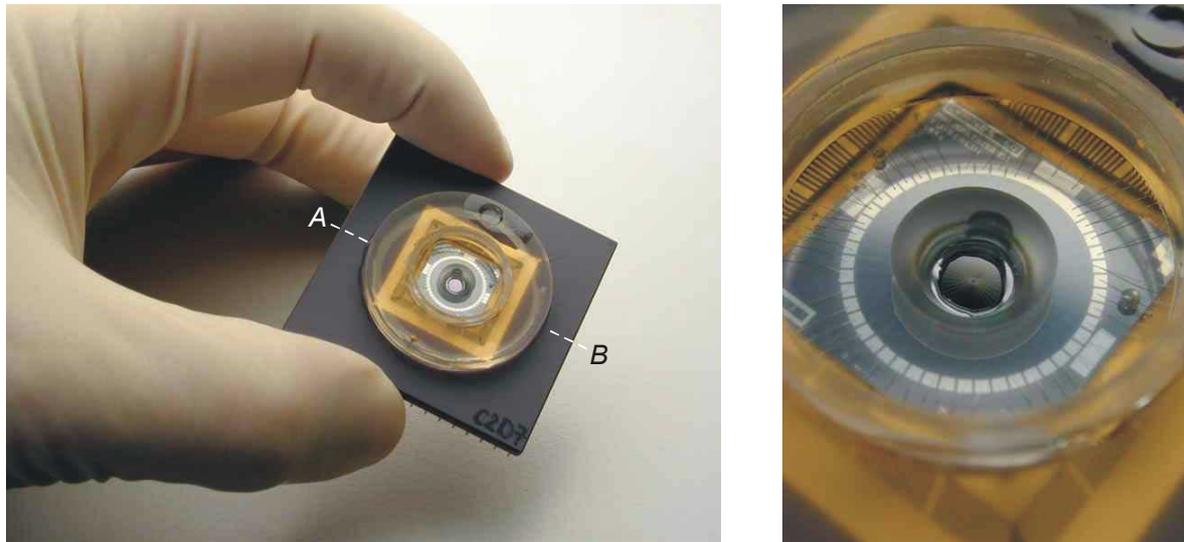
6.4.2 Ansteuerung

Von den beiden Elementen des Chips, den Feldeffekttransistoren und den Reizspots, benötigen die Transistoren den deutlich höheren Ansteuerungsaufwand. Während Reizspots direkt an eine Spannungsquelle angeschlossen werden können, die die Reizspannung erzeugt, muss bei den Transistoren zuerst der optimale Arbeitspunkt gesucht und an diesem der Transistor kalibriert werden.

Kennlinienbestimmung

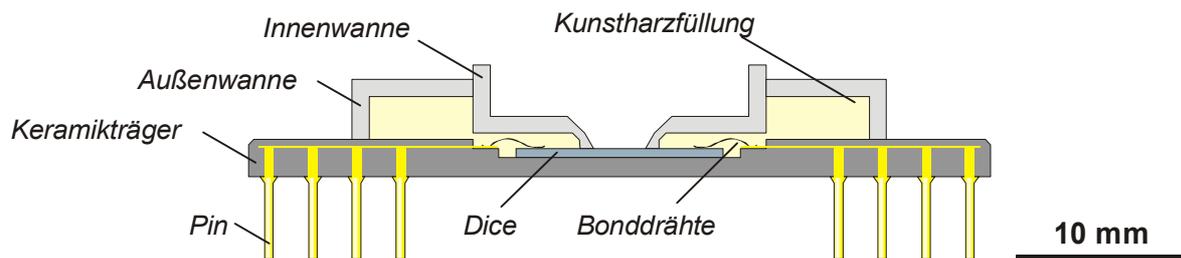
Zur Charakterisierung eines Transistors wird der Strom I_{DS} in Abhängigkeit der Kombinationen von V_{DS} und V_{GS} aufgenommen, wobei immer gilt $V_{DS} \geq V_{GS}$. Sie werden im Bereich von 0 bis -3 V in $0,25\text{ V}$ -Schritten durchfahren.

Aus der I_{DS} - V_{GS} -Abhängigkeit lässt sich der Bereich von V_{DS} und V_{GS} mit hohen Steilheiten ablesen. Bei einer Gate-Source-Spannung $V_{GS} = -1,5\text{ V}$ verhalten sich die Kennlinien bei Modulationen im Zehntel-Volt-Bereich linear.



a)

b)

Schnitt A-B

c)

Abbildung 6.3: a) Einsatzbereiter Chip, der aus Keramikträger, Dice und Wannenkonstruktion besteht. b) Der Ausschnitt aus a) zeigt wie die Plexiglaswannen die Kulturumgebung formen. Die Öffnung zum Dice hat 3 mm Durchmesser. Auf dem umgebenden, ringförmigen Absatz können später die Co-Kultur-Hirne abgelegt werden. c) Querschnitt durch den Chip.

Die Erfahrungen mit Neuro-Halbleiter-Kopplungen zeigen, dass die häufigsten Kopplungstypen von schwacher Natur sind und im Transistor eine Strom-Modulation erzeugen, die nur knapp über dem Eigenrauschen liegt. Arbeitspunkte mit betragsmäßig hohen Werten von V_{DS} und V_{GS} zeigen zwar hohe Steilheiten, aber auch ein überproportional starkes Rauschen, so dass ein Ausgleich zwischen großen Steilheiten und niedrigem Rauschen gefunden werden muss.

In den meisten Fällen hat sich ein Arbeitspunkt von von $V_{DS} = -1,0 V$ und $V_{GS} = -1,5 V$ bewährt. Um das Oxid der Active Area über den Drain-Bahnen zu schützen, liegt V_{DS} ca. $0,5 V$ über V_{GS} .

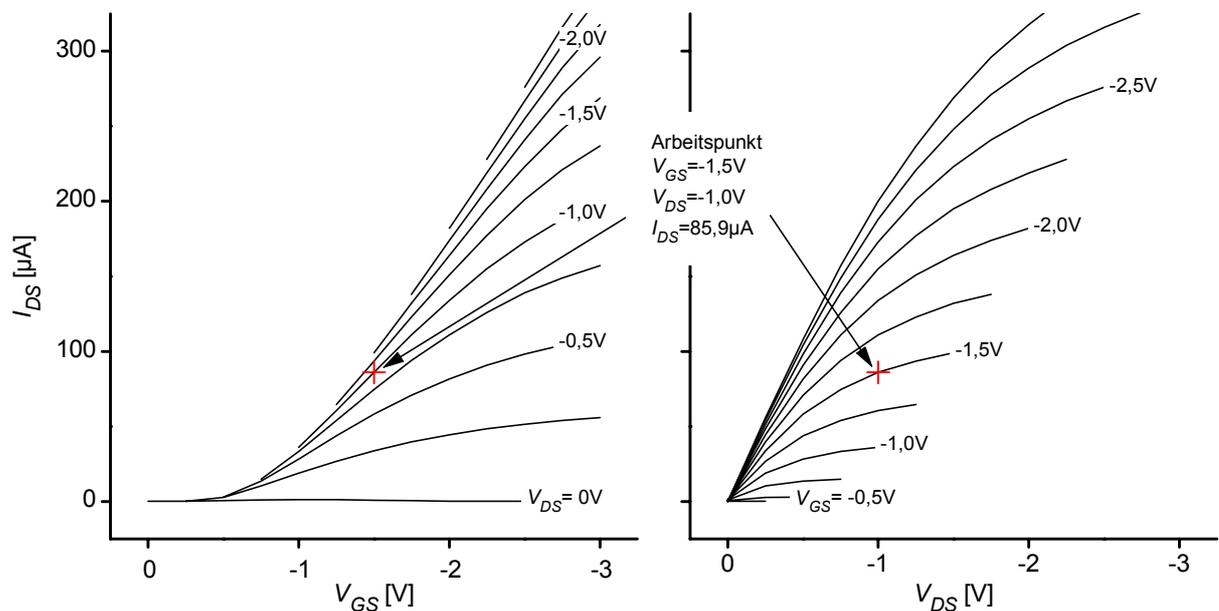


Abbildung 6.4: Kennlinienfeld eines verwendeten Chips zur Bestimmung des optimalen Arbeitspunkts.

Offsetabzug

Bei einem durchschnittlichen Transistor fließt beim Anlegen des Arbeitspunktes ($V_{DS} = -1,0\text{ V}$, $V_{GS} = -1,5\text{ V}$) ein Gleichstrom $I_{DS\text{off}} \approx 50\text{--}100\ \mu\text{A}$. Die Ergebnisse der Modellierung zeigen einen Hub von V_J im Millivolt-Bereich. Aus den Kennlinien kann man ablesen, dass eine solch kleine Modulation dem Gleichstrom ein Signal von nur wenigen Hundert $n\text{A}$ überlagert.

Um den Messbereich des AD-Wandlers optimal zu nutzen, wird deshalb in einem Vorverstärker nach der Strom-Spannungswandlung von I_{DS} ein Gleichspannungsoffset V_{off} vom Signal abgezogen. Eine nachfolgende Verstärkung um den Faktor 100 passt das Signal an den Wandlerbereich an. Aus historischen Gründen summiert sich V_{off} aus zwei Spannungen V_{offCOM} und $V_{\text{offSINGLE}}$, wobei V_{offCOM} auf alle Transistoren eines Chips wirkt und $V_{\text{offSINGLE}}$ für jeden Transistor einzeln eingestellt wird. Mit dieser individuellen Kompensation des Offsetstroms können alle vierzehn Transistoren eines Chips gleichzeitig in den Spannungsbereich des Messfensters eingepasst werden.

Steilheitenmessung

Ziel der Steilheitenmessung ist es bei gegebenem Arbeitspunkt V_{GS} , V_{DS} und V_{BS} den für den ganzen Chip gültigen Wert V_{offCOM} und die für jeden Transistor gültigen Werte von $V_{\text{offSINGLE}}$ sowie die Steilheiten zu messen. Die Ergebnisse dieser Messung werden in einer Datei abgelegt.

Bei einer späteren Messung werden diese Daten mit der Auswahl des Chips automatisch geladen zusammen mit den eigentlichen Daten der Messung abgespeichert.

Nach Anlegen des Arbeitspunktes wird gewartet bis sich alle Source-Drain-Ströme I_{DS} stabilisiert haben. Dann wird aus deren Mittelwert V_{OffCOM} berechnet und abgezogen. Im nächsten Schritt werden die hundertfach verstärkten Signale der einzelnen Transistoren mit $V_{OffSINGLE}$ jeweils auf die Mitte des Wandlerbereichs eingeregelt. Das übernimmt ein 12bit-16Kanal-DAC, der über TTL-Leitungen angesteuert wird.

Erst jetzt kann die eigentliche Steilheitenmessung beginnen. Die Vorspannung V_{GS} wird um 25mV in beide Richtungen variiert und die Stromwerte I_{DS} aufgezeichnet. Aus den Paaren I_{DS} und V_{GS} wird mit linearer Regression dann die Steilheit jedes einzelnen Transistors errechnet. Für $V_{DS} = -1,0V$, $V_{GS} = -1,5V$ und $V_{RB} = 5,0V$ wurden Steilheiten von $100 nA/mV$ gemessen.

Ein Chip kann auch mit aufgewachsenem Zellverband kalibriert werden. Störungen durch spontan koppelnde Neurone sind im Sub-Millivolt-Bereich und überlagern das Gleichsignal durchschnittlich nur für 1% – 5% der Zeit. Um exakt zu kalibrieren wurden vor jeder Messung die Steilheiten des verwendeten Chips ermittelt.

Reizspots

Reizspots müssen nicht kalibriert werden. Sie sind nach Anlegen von V_{BS} funktionstüchtig und können paarweise über TTL-Leitungen zu und abgeschaltet werden. Als Reizspotpaar sind die beiden Reizspots einer Doppelstruktur zusammengeschaltet.

6.5 Messablauf

Die Messung wurde dann angesetzt, wenn die Neuriten zweier Neurone sichtbar zusammengewachsen waren und damit eine synaptische Verbindung möglich war. Nach 1 – 2 *div* waren im Regelfall die ersten Neuriten zu sehen und zwischen 2 *div* und 3 *div* wurden die meisten Messungen gemacht.

Die co-kultivierten Hirne wurden vor der Messung entfernt. Nach dem Einsetzen des Chips in den ZIF-Sockel wird das Medium durch die Badelektrode geerdet.

Im Regelfall waren mehr als zwei Neurone miteinander vernetzt. Hier zeigt sich der zentrale Nachteil der klassischen Methoden zur Zellkontaktierung. Es können nicht alle Neurone gleichzeitig vermessen werden.

Unter Beachtung der räumlichen Anordnung der Mikromanipulatoren wurde deshalb vor dem Anstechen der ersten Zelle der Pfad der zu vermessenden Neurone festgelegt. Im Verlauf der Messung wurde er dann durch Umsetzen jeweils einer Mikroelektrode abgefahren. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist, dass die Mikroelektrode beim Herausfahren aus dem Neuron das Netzwerk nicht verletzt. Ebenso muss bei Bedarf eine verstopfte Mikroelektrode ausgetauscht werden können ohne dass Erschütterungen die andere angestochene Zelle zerstören.

6.5.1 Zellpenetration

Nach dem Eintauchen der Mikroelektrode in die Messkammer, wird der Brückenverstärker auf die benutzte Mikroelektrode kalibriert. Das beinhaltet die Kompensation von Zugangswiderstand und kapazitiven Artefakten.

Anstechen der Zelle Die Spitze der Mikroelektrode wird über der Zelle zentriert und mit langsamer Geschwindigkeit solange abgesenkt, bis das Potential um wenige Millivolt absackt oder vielleicht schon Fluktuationen zeigt. Dieser Zustand zeigt, das Erreichen bzw. eine Deformation der oberen Zellmembran an. Mit dem Brückenverstärker kann nun ein hochfrequenter Strompuls "buzz" ausgeschickt werden, der die Zellmembran an der Auflagestelle der Mikroelektroden spitze durchbricht. Die Spitze der Einstechelektrode befindet sich nun innerhalb der Zelle. Der weitere Messverlauf richtet sich nach der Reaktion der Zelle auf die Penetration.

Aktionspotential auslösen Nach dem Eindringen sinkt das Signal der Mikroelektrode auf den Wert des Ruhepotentials zwischen -50mV und -80mV ab. Hat sich der Wert stabilisiert, so wird die Vitalität des Neurons überprüft, indem mit einem schwachen depolarisierenden Puls versucht wird ein Aktionspotential auszulösen. Typische Pulse haben eine Höhe von $0,1-0,4\text{nA}$ und eine Länge zwischen $20-80\text{ms}$. Kann ein Puls ein Aktionspotential auslösen, so wird die Pulslänge soweit verkürzt, bis die ansteigende Flanke des Aktionspotentials nach dem Ende der Strominjektion einsetzt. Sollte sich die Mikroelektrode beim Einstechen zugesetzt haben, so lässt sich jetzt nochmal leicht ein Brückenabgleich durchführen, da die ohmschen und kapazitiven Artefakte der Injektion nicht dem Aktionspotential überlagert sind. Aus Höhe und Dauer des benötigten Strompulses lässt sich auch schon grob auf Zellparameter wie Membranwiderstand R_M und -kapazität C_M schließen.

Dauerfeuernde Neurone Manche Neurone zeigen nach dem Anstechen eine kontinuierliche Folge von Aktionspotentialen. Die Ursache ist wahrscheinlich die Verletzung der Membran durch

das Einstechen der Mikroelektrode. Das Neuron kann auf Dauer den starken Ionenumsatz der häufigen Aktionspotentiale nicht mehr über die Ionenpumpen abdecken. Das zeigt sich daran, dass der Hub der Aktionspotentiale kleiner wird, die Breite größer und das Ruhepotential stark ansteigt. Damit nicht zu verwechseln, sind wiederkehrende Aktionspotentiale, die ein Neuron als Teil eines aktiven Netzwerks zeigt. Diese Aktionspotentiale haben einen viel größeren Abstand, und es verändern sich im Gegensatz zu verletzten Neuronen weder die Form des Aktionspotentials noch das Ruhepotential.

Im Fall eines verletzten Neurons kann darauf gehofft werden, dass die Membran das Leck wieder von selber schließt. Damit der Ionenhaushalt des Neurons bis dahin nicht durch die wiederholten Aktionspotentiale übermäßig strapaziert wird, injiziert man einen hyperpolarisierenden Strom, der gerade so groß ist, dass die Aktivität zum Erliegen kommt. Im weiteren Verlauf sollte das Ruhepotential beobachtet und der Klemmstrom nachgeregelt werden.

Das optimale Reizmuster Bei der kontinuierlichen Strominjektion einer Mikroelektrode lassen sich reproduzierbare Kurven angeben, die einen Zusammenhang zwischen Latenzzeit des Aktionspotentials und der injizierten Ladungsmenge liefern [40]. Die Kombination der beiden einzigen Parameter einer Strominjektion, Pulsdauer und Pulshöhe, kann auf einen reduziert werden.

Die Situation bei der kapazitiven Stimulation von Neuronen zeigt sich jedoch im Experiment viel komplexer. Ladung wird nicht konstant über eine bestimmte Pulslänge, sondern nur in der Zeit während bis kurz nach den Pulsflanken transferiert. Viele Neurone lassen sich nicht mit nur einer Flanke reizen, was dazu führt, dass mehrere Pulse mit den damit verbundenen, unerwünschten Flanken in Gegenrichtung angewendet werden müssen. Die Zahl der zu optimierenden Parameter steigt so auf vier, nämlich Pulshöhe, Pulsdauer, Pulsabstand und Pulsanzahl an. Aus der bisher vorhandenen Theorie zur kapazitiven Stimulation von Neuronen konnte keine zuverlässige Methode abgeleitet werden, die, wenn nicht schon bei allen, so doch bei vielen Neuronen zur Reizung führen würde. Es wurde deshalb rein empirisch eine Vorgehensweise entwickelt, bei der schnell ermittelt werden konnte wie das Neuron am leichtesten zu reizen ist. Besonders hinderlich bei der Entwicklung eines allgemeinen Systems zur Ermittlung der optimalen Pulsparameterkombination ist die stark veränderliche Reizbarkeit der vermessenen Neurone. Pulsfolgenparameter, mit denen gerade eben noch ein Neuron stimuliert werden konnte, können schon nach 1000 *ms* nicht mehr wirksam sein.

Stufenanregung

Begonnen wird mit dem einfachsten Reiz; einer aufsteigenden Flanke von 0 bis +5 V. Reicht diese Stufenanregung schon um im Neuron ein Aktionspotential auszulösen, so wird der Flankenhub reduziert, bis das Neuron kein Aktionspotential mehr zeigt. Dabei steigt die Latenzzeit des Aktionspotentials, also der Abstand zwischen Stimulation und Spitze des Aktionspotentials bis die Reizstufe so klein ist, dass kein Aktionspotential mehr ausgelöst wird.

Mehrere Pulse

Ist mit einer einfachen Flanke kein Aktionspotential auszulösen, so werden mehrere Rechteckpulse von 5 V Flankenhub auf die Zelle gegeben. Jetzt müssen drei neue Pulsparameter, Pulszahl, Pulslänge und Pulsabstand gewählt werden. Da sich nicht Pulshub, Pulszahl, Pulslänge und Pulsabstand gleichzeitig variieren lassen, wurde der Pulshub auf den maximalen 5 V belassen und die Pulslänge gleich dem Pulsabstand zu 500 μs gesetzt. Um das Neuron zu aktivieren wird die Pulszahl sukzessive erhöht, bis ein Aktionspotential startet. Bei diesem Vorgang ist besonders das langfristige Verhalten des Membranpotentials interessant. Ist eine Netto-Erhöhung des Membranpotentials nach einem Puls mit aufsteigender und abfallender Flanke zu sehen? Lässt sich die Netto-Erhöhung des Membranpotentials durch mehrere Pulse so ausweiten, dass das Neuron über die Schwellenspannung für Aktionspotentiale gehoben wird?

Pulsdauervariation

Erst, wenn das Membranpotential im Verlauf mehrerer Pulse nicht mehr ansteigt oder sogar wieder abfällt, wird die Pulsdauer und der Pulsabstand variiert. Diese Parameter wurden bei den meisten Versuchen verkürzt bis zu einer Länge von 50 μs . In manchen Versuchen wurde auch das Verhältnis 1:1 zwischen Pulsdauer und Pulsabstand variiert.

Ist ein Neuron reizbar, so wird versucht den Reiz durch Verringerung der Pulshöhe oder der Pulszahl so weit abzuschwächen, dass das Aktionspotential mit deutlicher Verzögerung erst auftritt. Solche langen Latenzzeiten haben den Vorteil, dass die Reizartefakte nicht das Aktionspotential überlagern.

Kapitel 7

Resultate und Diskussion

7.1 Wachstum von Neuronen auf Chips

Mit dem Verfahren der Co-Kultur von 1-2 kokultivierten Hirnen pro Chip konnten Netzwerke aus vielfach miteinander verbundenen Neuronen auf dem Chip kultiviert werden. Die manuelle Positionierung mit Saugpipetten wurde so verfeinert, dass 62 % aller Neurone direkt nach dem Positionieren nicht mehr als ein Viertel ihres Somadurchmessers von der Transistor-Kreislinie (s. Abbildung 3.6) entfernt waren. Die Lage dieser Neurone erlaubt erfolgreiche Stimulation und Detektion. Bei den 87 % der Neurone, die nicht weiter als die Hälfte ihres Somadurchmessers von der Transistor-Kreislinie entfernt waren, bestanden noch gute Chancen auf erfolgreiche Stimulation.

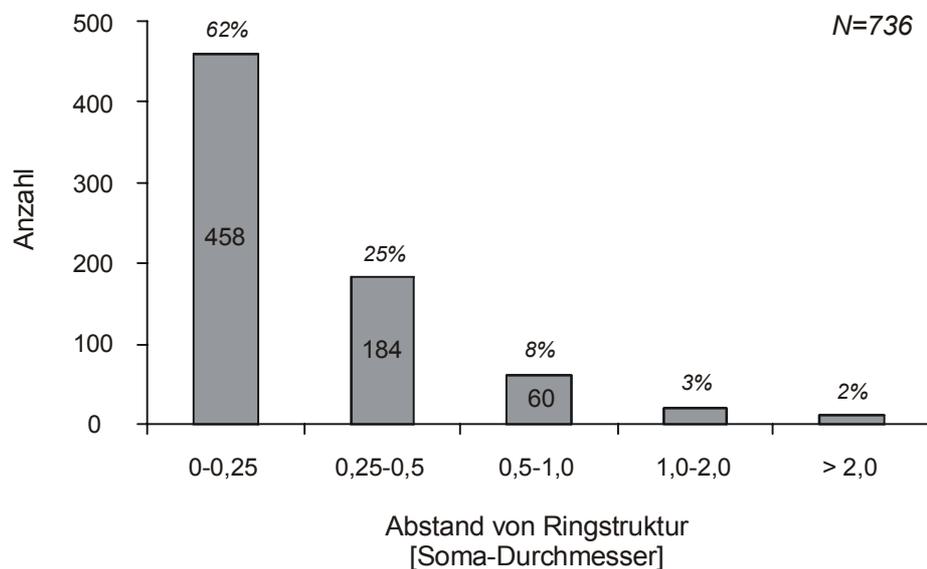


Abbildung 7.1: Trefferhäufigkeit beim Positionieren der 736 Neuronen aus den 19 Präparationen des Hauptmesseitraums. Ungefähr 62 % aller Neuronen war näher als $\frac{1}{4}$ des jeweiligen Somadurchmessers von der Mittellinie der Ringstruktur entfernt und damit korrekt positioniert.

Abbildung 7.2a) zeigt den Chip E7D4 mit 8 korrekt positionierten Neuronen direkt nach dem Ende der Präparation. Das Neuron auf Doppelstruktur 3 und 4 war für den Durchmesser der Saugpipette zu groß. Es zeigt das typisch sphärische Erscheinungsbild einer verletzten Zelle. Bild 7.2b) zeigt repräsentativ die Wachstumsentwicklung nach 2 *div.* Neurone, wie die auf Doppelstruktur 1 und 2, die sehr nah zusammensitzen, werden im Verlauf des Wachstums konglomerieren. Hier zeigt sich, dass die Dimensionierung der Chipstruktur sehr vorsichtig gewählt wurde. Die Kulturmethode ermöglicht Neuritenlängen, die den Durchmesser der Struktur ohne Probleme übertreffen. Sehr vorteilhaft ist die ringförmige Anordnung, in der die übernächsten Neurone, wie an den Neuronen auf Doppelstruktur 6 und 10 zu sehen, eine direkte neuritische Verbindung ohne Einfluss des dazwischen liegenden Neurons bilden können. An allen Neuriten, die die Grenze der Active Area überschreiten, kann man ablesen, dass die Höhenstufe zwischen dem Oxid der Active Area und dem Feldoxid keinen Einfluss auf das grundsätzlich isotrope Wachstum zu haben scheint.

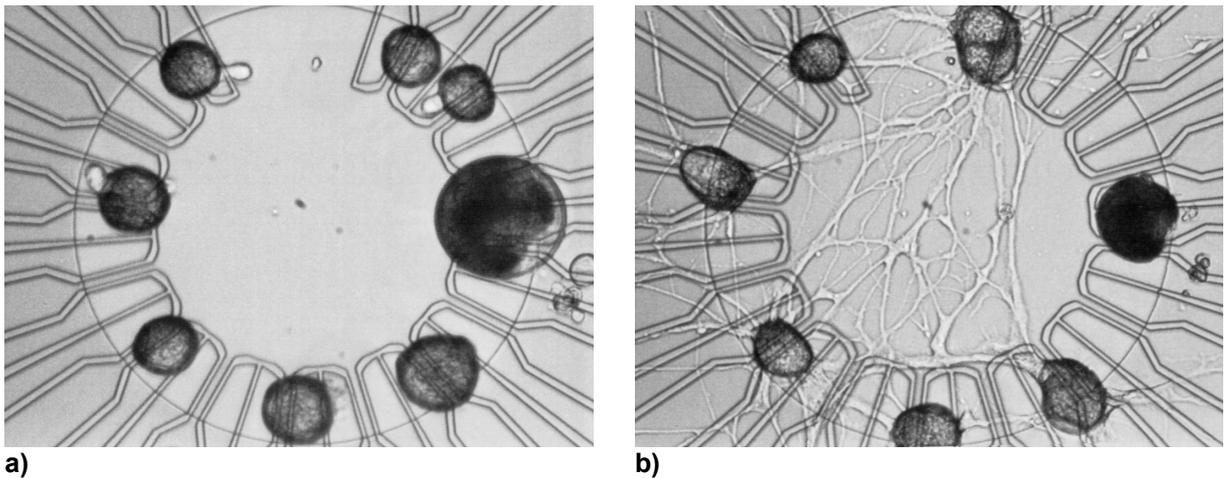


Abbildung 7.2: Mit den Neuronen von *Lymnaea stagnalis* konnten erfolgreich neuronale Netze auf Chips kultiviert werden. Das Wachstum der Neuriten überbrückt ohne Probleme die Chipstruktur und vernetzt die Neuronen mehrfach. a) Kurz nach dem Aufsetzen der Neurone bei 0,02 *div.* b) Bei 2,06 *div.*

Die Netzwerkbildung ist der entscheidende Schritt nach dem Chipdesign für ein topologisch funktionsfähiges, hybrides Netz. Deshalb wird in den folgenden Abschnitten noch genauer auf die Dynamik der Netzwerkbildung eingegangen.

Anisotropes Wachstum

Das Wachstum der Neurone auf der Chipoberfläche verlief in den meisten Fällen homogen. In manchen Fällen zeigte es jedoch anisotropes Verhalten. In Abbildung 7.3a) und b) verlaufen die

Neuriten in der unteren Bildhälfte in auffallend kreisförmiger Richtung bezogen auf den Chipmittelpunkt. Es wird vermutet, dass die mechanische Reinigung mit der rotierenden Bewegung eines Wattestäbchens (s. Abbildung 4.6) die Oberfläche kreisförmig strukturiert hinterließ. Da die Plexiglaswanne, die die Rotation des Wattestäbchens zentrierte, nicht exakt mittig auf dem Chip montiert war, liegt der Mittelpunkt des ringförmigen Wachstums nicht unbedingt in der Mitte der Chipstruktur.

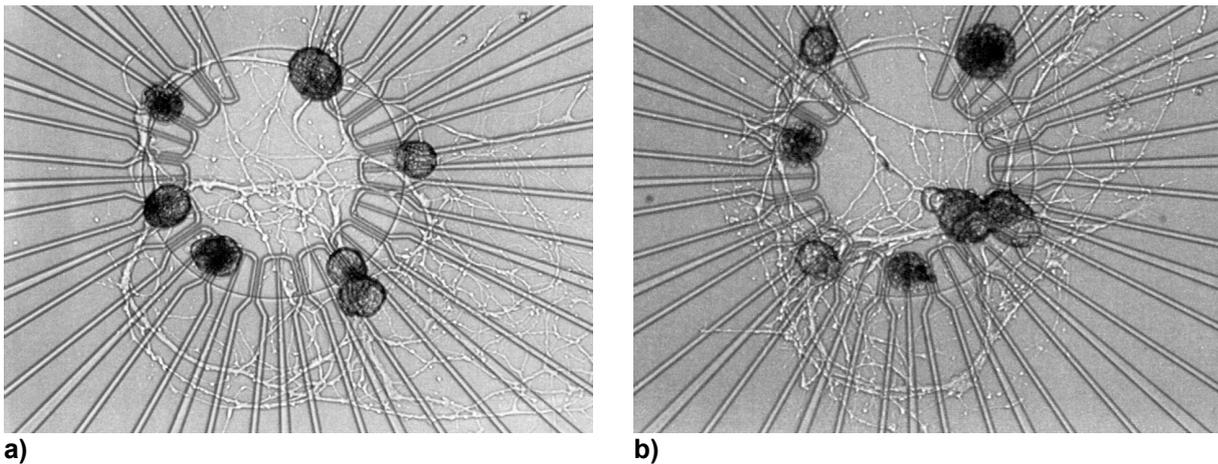


Abbildung 7.3: Ringförmiges Wachstum auf Chip C7D3. Zwischen den Bildern liegen 6 Monate. Alter der Kulturen: a) 2,01 div b) 2,63 div.

Das anisotrope Wachstum trat bei verschiedenen Chips auf, jedoch nicht regelmäßig. Es beeinflusste die Netzwerkbildung nicht in nachteiliger Form: Nimmt man an, dass ein Neuron in der Lage ist innerhalb einer bestimmten Zeit einen Neuritenbaum mit fester Gesamtlänge auszubilden, so ist diese unbeabsichtigte Form des gerichteten Wachstums sogar vorteilhaft, da sie, wie in Abbildung 7.3 zu sehen, den Neuritenbaum auf Ringen um die Struktur und damit in der Nähe der anderen Neurone gefangen hält.

Somatabewegungen

Zur vollen Funktionsweise einer hybriden Signalübertragung gehört die Stimulier- und Detektierbarkeit des Somas. Aus diesem Grund wurden die Neurone auf die Doppelstrukturen zentriert aufgesetzt. Abbildung 7.4a) zeigt einen mit acht Neuronen belegten Chip ungefähr 2,6 h nach dem Ende der Präparation. An den Neuronen 2 und 6 sind noch deutlich Reste des herauspräparierten Axonstumpfes zu erkennen. Die beiden Neurone 3 und 4 berühren sich über die Axonstümpfe. Ähnlich verhält es sich mit den Neuronen 7 und 8. Neuron 1 hat einen hellgrauen Außenring, der auf eine verletzte Membran hindeutet. Neurone, die beim Entfernen aus

dem Gehirn von der Saugpipette verletzt wurden, zeigten sehr schnell nach dem Aufsetzen dieses Erscheinungsbild. Sie verkümmerten fast immer und waren elektrisch nicht aktiv.

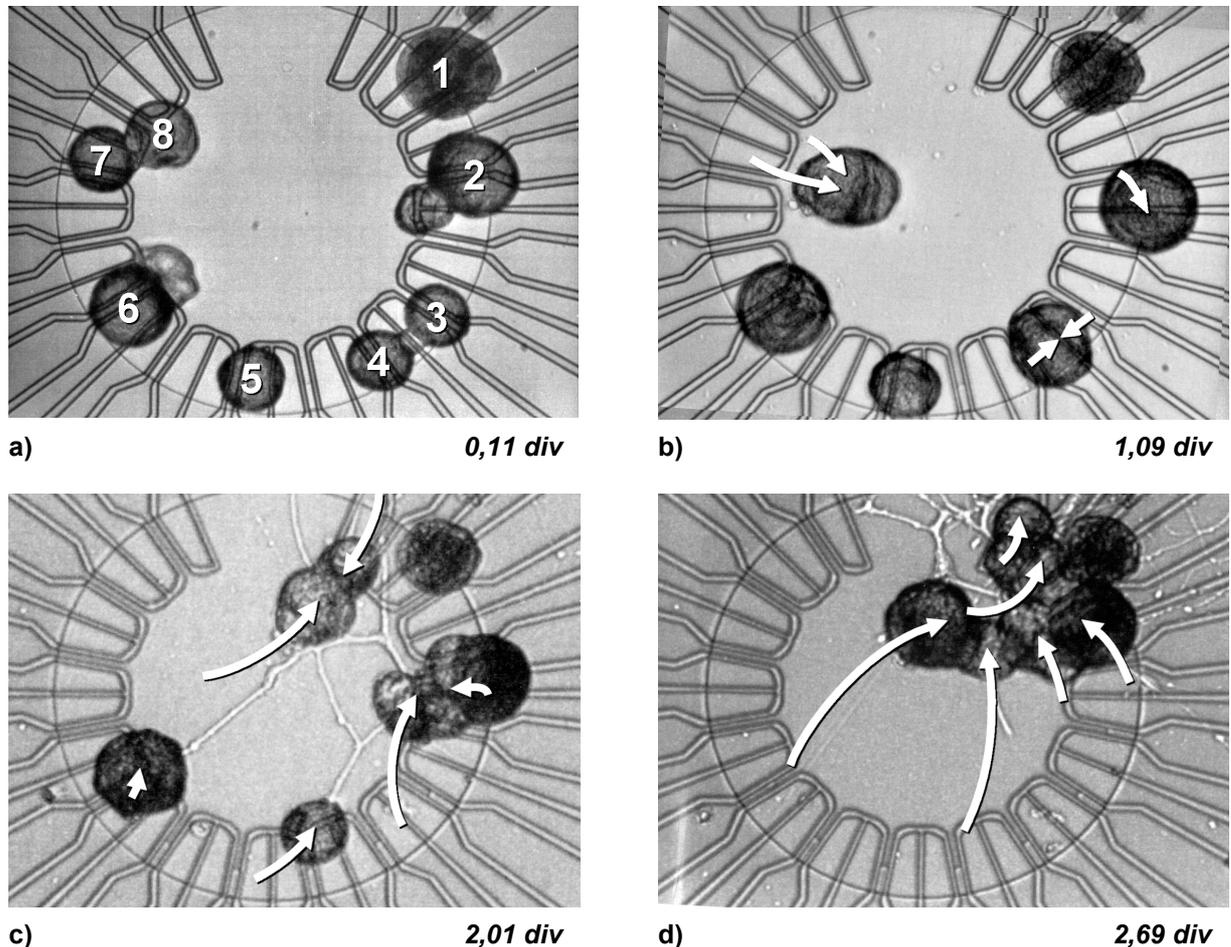


Abbildung 7.4: Bewegungen der positionierten Neurone während der Ausbildung der Neuriten. Die Pfeile geben die Bewegung der Somazentren relativ zum letzten Bild an. Die Neurone zeigten in Kultur häufig die Tendenz zu konglomerieren und verloren dabei den ihnen zugewiesenen Platz auf dem Chip.

Nach ungefähr einem Tag hat sich die Situation leicht verändert. Die Neurone, die sich nach dem Aufsetzen berührten, sind sehr eng zusammengedrückt und haben im Gesamten die sphärische Gestalt eines Einzelneurons angenommen. Alle Axonstümpfe sind verschwunden. Mit Ausnahme der Neuronen 7 und 8 hat sich die Lage der Somata nur schwach verschoben. Es sind noch keine Neuriten zu sehen.

Nach zwei Tagen in Kultur hat sich die Situation jedoch dramatisch geändert. Es haben sich Neuriten gebildet, die die ganze Struktur überziehen, und die Konglomerierung der Neurone ist weiter fortgeschritten. In diesem Beispiel haben sich schon nach fast drei Tagen alle Zellen zu

einem großen Cluster vereinigt. Von den ursprünglich 6 durch einzelne Neurone gut abgedeckten Doppelstrukturen sind nur noch 2 besetzt.

Dass die Somata mit Einsetzen des Neuritenwachstums anfangen sich von ihren ursprünglichen Positionen fortzubewegen, ist kein Zufall. Neuron 6 bewegt sich zwischen dem zweiten und dem dritten Tag entlang eines Neuriten, der, nach seinem Profil zu schließen, wahrscheinlich aus dem Cluster der Neurone 7 und 8 stammt. Auch Neuron 6 bewegt sich in dieser Zeit entlang eines Neuriten. Es scheint als würden die Neuriten, die zwei Somata miteinander verbinden, sich kurz nach dem Zusammenwachsen verkürzen und damit die Somata fortziehen. Diese Dynamik ist bereits in anderen Experimenten mit gerichtetem Wachstum von Neuronen aus *Lymnaea stagnalis* [30] und von Rattenhirnen [8] beobachtet worden.

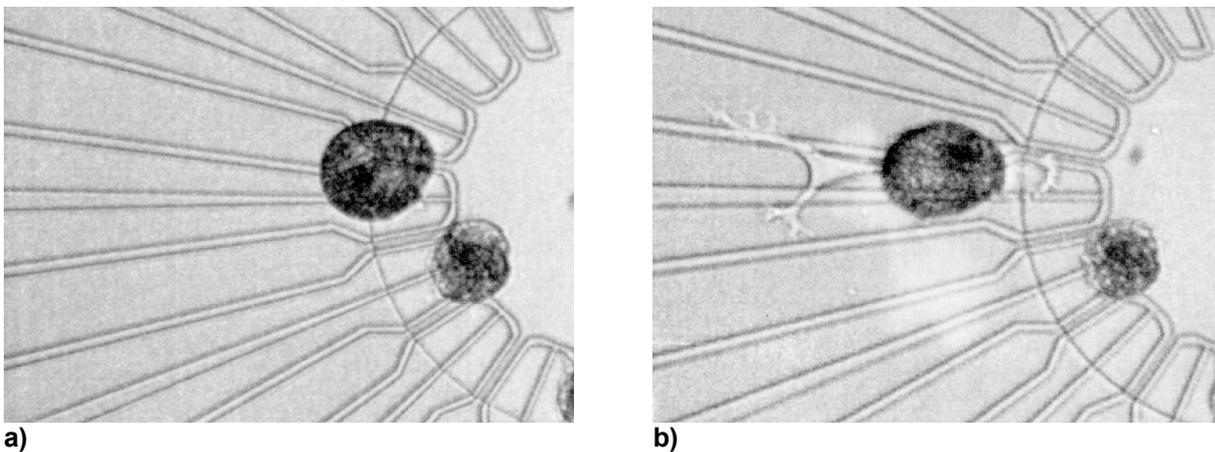


Abbildung 7.5: Anisotropes Wachstum der Neuriten verschiebt das Soma eines Neurons schon nach einem halben Tag. Aufnahme a) bei 1,19div b) bei 1,77div.

Auch Neurone, die keinen neuritischen Kontakt zu anderen Neuronen aufnahmen, zeigten nach Anisotropie des Wachstums Somabewegungen entlang der Neuriten. Die Anhaftpunkte des Neuriten, insbesondere der Wachstumskegel, scheinen offenbar deutlich besser mit der Oberfläche verbunden zu sein als das Soma. Je nach Asymmetrie der Haftstellen verschiebt sich das Soma. Die lose Anhaftung von verschobenen Somata spiegelte sich auch in der schlechten Kontaktierbarkeit durch Reizspots oder Feldeffekttransistoren wieder.

Nicht in jedem Fall führt das Ausbilden des Netzwerks zu so starken Zellbewegungen. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die oben beschriebene Dynamik nicht nur die Netzwerkgeometrie verändert, sondern, da es sich um einen dreidimensionalen Umbau handelt, auch den Neuro-Chip-Kontakt beeinflusst.

Zur besseren Kontrolle dieser Dynamik wird es nicht ausreichen die Neuriten auf definierten Bahnen wachsen zu lassen. Es müssen auch Vorkehrungen getroffen werden, die den Bewegungsradius der Somata in der Größenordnung der bidirektionalen Chipstruktur halten.

7.2 Reizung von Neuronen

Die erste Schnittstelle und die experimentell noch unbekannteste ist die kapazitive Stimulation von Neuronen mit Spannungspulsen. Verwendet wurden vorwiegend positive und negative Spannungsflanken mit $|\Delta V_S| = 5\text{ V}$. Als erstes wurde versucht im Neuron ein Aktionspotential mit einzelnen Flanken auszulösen, danach mit mehreren Flanken, was zu Rechteckpulsen führt.

Zur Variation standen die Höhe, der Abstand und die Zahl der Flanken. Ist dies bei der Anregung mit Einzelflanken ein experimentell übersichtlicher Raum, der vergleichbar ist mit dem Parameterraum einer Strominjektion, so wird die Optimierung der Parameter für Rechteckpulse sehr komplex.

In einem Versuch musste in möglichst kurzer Zeit das Reizmuster gefunden werden, das ein Aktionspotential zuverlässig auslöste, aber den Neuro-Chip-Kontakt nicht unnötig belastete. Die folgenden Absätze geben eine Auswahl von typischen Reizsituationen wieder.

7.2.1 Anregung mit Flanken

Die einfachste Anregung mit einer positiven Einzelflanke ist in Abbildung 7.6 gezeigt. Die Flanke von 5 V hebt das Potential des Neurons nach Abklingen des kapazitiven Peaks um $14,5\text{ mV}$ an und ca. 15 ms später erscheint die Aktionspotentialspitze. Die Höhe des kapazitiven Peaks bei $t = 30\text{ ms}$ kann nicht ausgewertet werden, da Streukapazitäten der Mikroelektrode und die Kapazitätskompensation des Brückenverstärkers das Frequenzspektrum nach oben abschneiden.

Nach dem Aktionspotential kehrt das Neuron auf erhöhtes Ruhepotential zurück, das noch 350 ms nach der Flanke um $1,5\text{ mV}$ über dem Potential vor der Flanke liegt. Es wird vermutet, dass der Reizpuls die Kontaktmembran perforiert hat.

Das gleiche Neuron wurde später mit negativen Flanken von -5 V stimuliert. Das Membranpotential wird hyperpolarisiert, doch nach der Relaxation ins Ruhepotential folgt keine Depolarisation. Mehrere Versuche zeigten keinen Erfolg, während mit positiven Flanken, wie in Abbildung 7.6 zu sehen, immer noch ein Aktionspotential ausgelöst werden konnte. Diese Messung ist repräsentativ für alle restlichen Messungen, in denen mit negativen Flanken gereizt wurde:

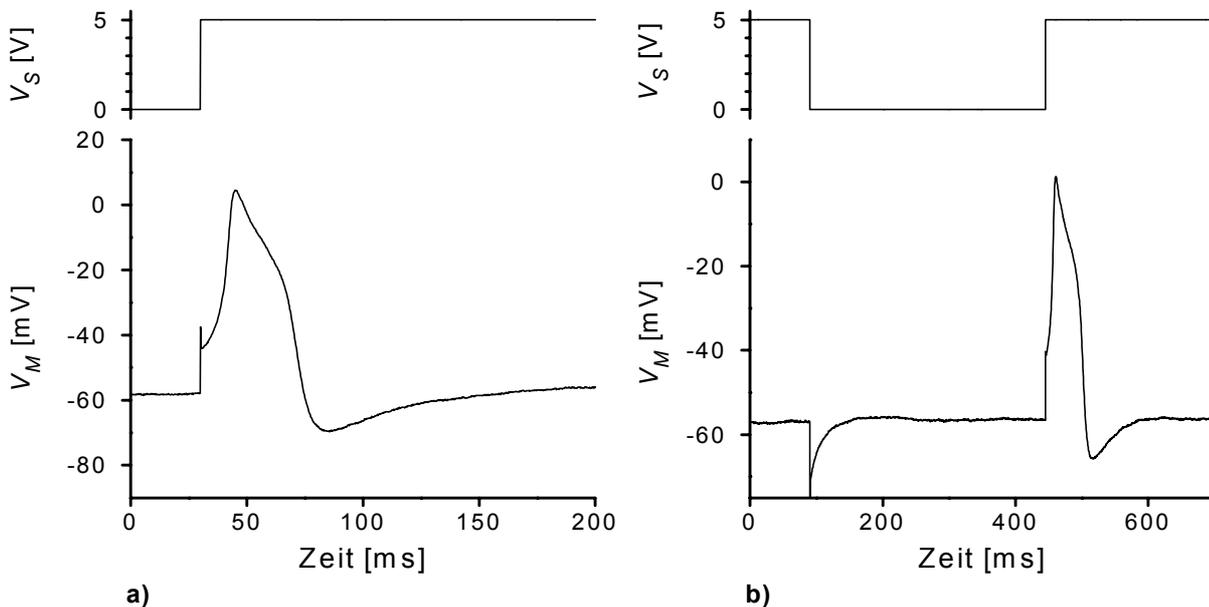


Abbildung 7.6: Kapazitive Stimulation von Neuronen mit Einzelflanken. Das gleiche Neuron wurde a) mit einer positiven Spannungsfanke und b) mit einer negativen und positiven Spannungsfanke stimuliert. Ein Aktionspotential entstand jedoch nur nach positiven Flanken.

Es ließ sich kein Neuron mit negativen Einzelflanken reizen.

Mit Blick auf den Mechanismus, der nach negativen Reizflanken ein Aktionspotential bildet, ist anzunehmen, dass die Kontaktmembranen eine zu schwache Belegung mit Na-Kanälen aufweisen. Diese Na-Kanal-Verarmung kann eine Folge der Wachstumsbedingungen sein und sich während der Kulturzeit ausgebildet haben. Es ist jedoch auch möglich, dass vorhergehende Reizpulse die Na-Kanäle in der Kontaktmembran deaktiviert oder zerstört haben.

Wiederholte Reizung mit dem gleichen Puls zeigen nur selten das gleiche Ergebnis. In Abbildung 7.7a) wurde ein Neuron mehrfach hintereinander mit einer positiven Flanke gereizt. Durch jeden Puls erhöhte sich das Ruhepotential, das in der Zeit vor dem Reizpuls abgelesen werden kann. Erst der letzte Puls stimulierte das Neuron überschwellig. Die Anhebung des Ruhepotentials lässt auf Elektroporation der Kontaktmembran durch die Reizflanken schließen. Zur genaueren Charakterisierung dieser Vorgänge reicht die Betrachtung des Ruhepotentials jedoch nicht aus. Wie im Abschnitt "Modellierung" gezeigt, muss die Zusammensetzung der Kontaktmembran genauer bekannt sein.

Unter diesen Umständen ist eine Ermittlung des Schwellwerts für Reizflanken, wie in Abbildung 7.7b) versucht, als sehr zweifelhaft einzuschätzen.

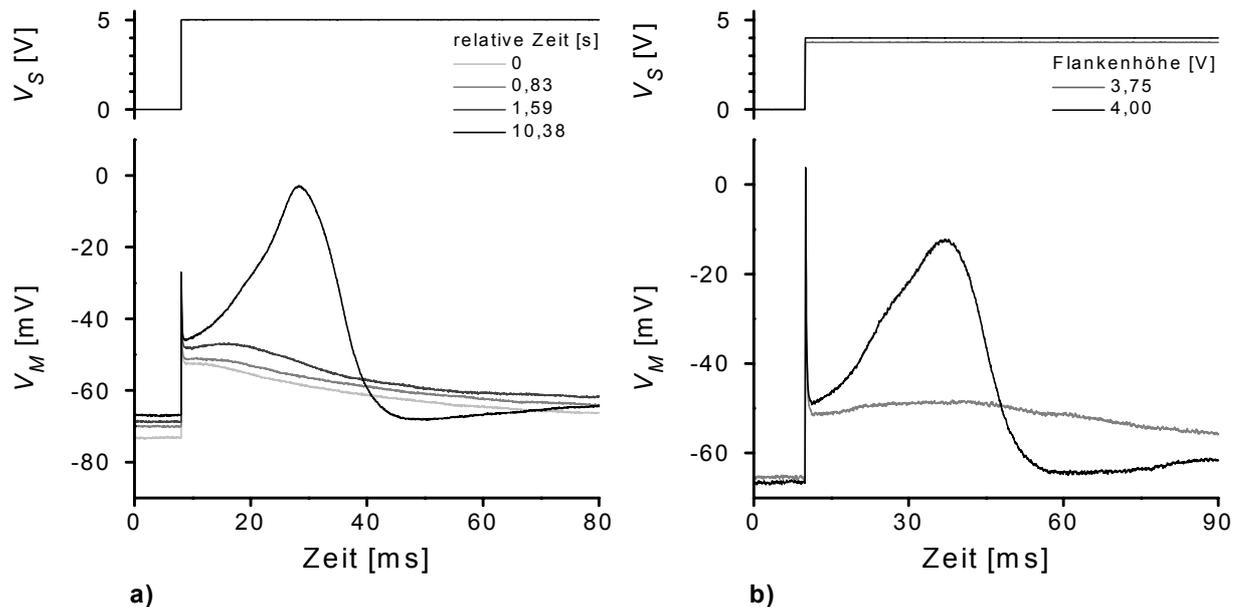


Abbildung 7.7: a) Mehrfache Versuche mit einer Einzelflanke ein Aktionspotential auszulösen führen zum Erfolg. Das Ruhepotential des Neurons steigt mit jedem Versuch an. b) Die Bestimmung von Flankenhöhen ist erst dann sinnvoll, wenn sichergestellt ist, daß der Zustand des Neurons durch die Reizpulse nicht langfristig verändert wird.

7.2.2 Anregung mit Rechteckpulsen

Konnte im Versuch ein Aktionspotential nicht mit einer positiven Flanke ausgelöst werden, so wurden mehrere angewendet. Der Einsatz von Rechteckpulsen bedeutet, dass zwischen jeder aktivierenden, positiven Flanke eine negative Flanke liegt. In Abbildung 7.8a) sieht man, dass der Großteil der Anhebung des Zellpotentials durch die positive Flanke wieder durch die negative Flanke aufgehoben wird. Die Differenz ist die Nettoanhebung durch ein Rechteckpuls. Mehrere Rechteckpulse können auf diese Art einen höheren Gesamthub erreichen als eine Einzelflanke.

Abbildung 7.8 zeigt zwei Neurone, die beide mit drei Rechteckpulsen gereizt wurden. Es ist zu vermuten, dass die Leckleitfähigkeit der Kontaktmembran in Abbildung 7.8a) deutlich größer ist als in Abbildung 7.8b). Dort folgt das Zellpotential den Rechteckpulsen sehr stark, während in Abbildung 7.8b) der Potentialhub durch die Flanken der Pulse klein bleibt. Am Potentialverlauf in Abbildung 7.8b) ist nicht eindeutig erkennbar, ob die Reizpulse und nicht etwa eine unerwünschte Störung das Aktionspotential ausgelöst haben. In diesem Fall wurde beobachtet, dass das Neuron ohne Pulse nicht feuerte aber auf Reizpulse zuverlässig antwortete.

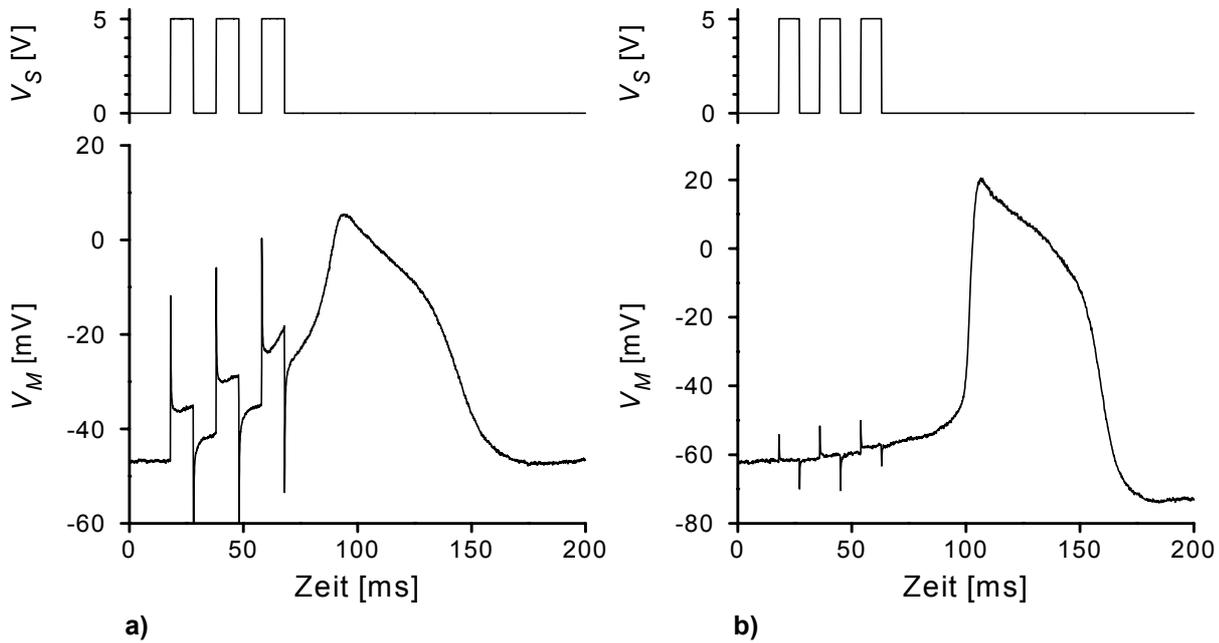


Abbildung 7.8: Kapazitive Stimulation mit Rechteckpulsen.

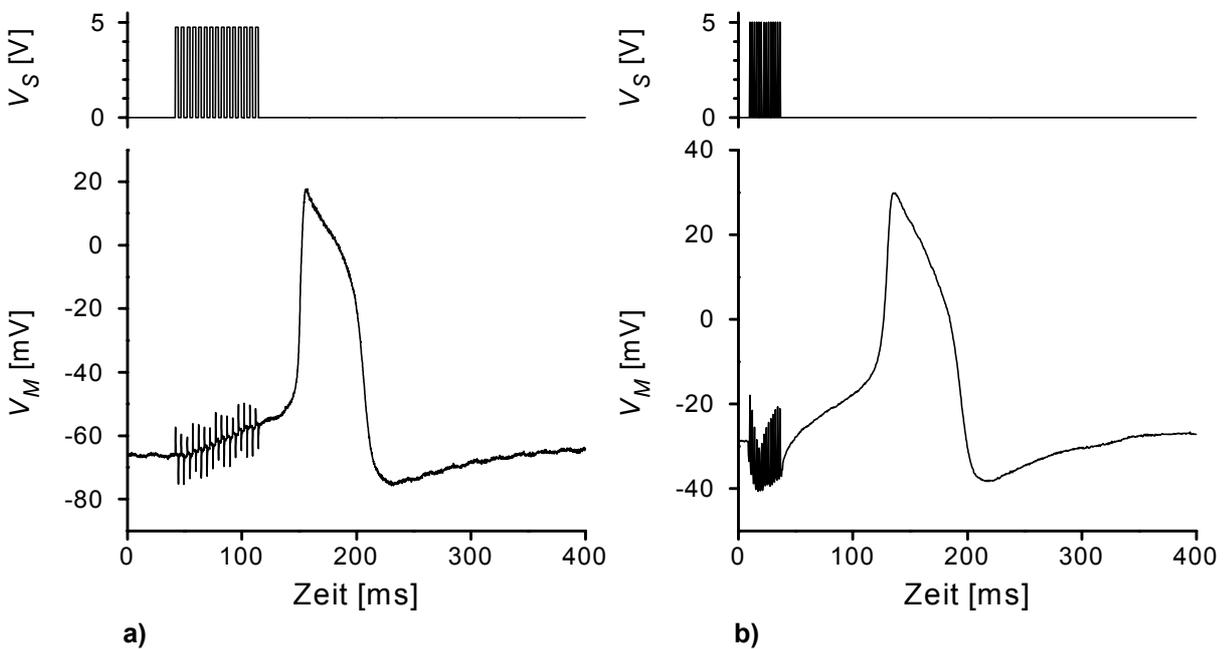


Abbildung 7.9: Kapazitive Stimulation mit vielen, kurzen Rechteckpulsen zeigt unterschiedliches Anregungsverhalten.

Fast 14 min später war das Ruhepotential des Neurons in Abbildung 7.8b) soweit abgesunken, dass viel mehr Rechtecke nötig waren um es über die Schwelle zum Aktionspotential zu heben.

Durch die vielen Pulse ist in Abbildung 7.9a) sehr schön zu sehen wie jeder Rechteckpuls mit Ausnahme der ersten beiden das Zellpotential um einen konstanten Wert anhebt und so zu einem mittleren, linearen Potentialanstieg führt. Nach dem Ende der Pulse hat das Potential der Zelle einen deutlich höheren Wert als vorher.

Nicht so im Fall eines anderen Neurons von Abbildung 7.9b), das auch mit sehr vielen Rechtecken gereizt wurde. Die Pulse waren so kurz, dass die Abtastfrequenz des AD-Wandlers nicht mehr ausreichte um die Rechtecke der Reizspannung und die kapazitiven Spitzen im Zellpotential ausreichend gut zu erfassen. Die Entwicklung des Zellpotentials kann zwar nicht mehr verfolgt werden, doch es fällt auf, dass nach dem Ende der Pulse das Neuron 10 *ms* lang *hyperpolarisiert* war und direkt aus dieser Hyperpolarisation heraus ein Aktionspotential startete. Das ist ein bislang noch nicht beobachteter Reizmechanismus. Die Auslösung eines Aktionspotentials nach Hyperpolarisation erinnert an den Auslösemechanismus eines postinhibitorischen Rebounds (PIR).

Pseudoplateau-Verbreiterung und Polarisation

Die Fähigkeit von Reizpulsen mit vielen, dichten Spannungsflanken Neurone zu hyperpolarisieren, wurde häufiger zusammen mit einer weiteren Eigenschaft beobachtet. Mit Reizmustern aus vielen, kurzen Rechteckpulsen können die Pseudoplateaus von Neuronen des Typ 2 sukzessive verbreitert werden. Abbildung 7.10 zeigt, wie sich durch wiederholte Anwendung des gleichen Reizes im Abstand von *ca.* 2 *s* die Länge des Pseudoplateaus fast verdreifachte.

Diese Plastizität der Aktionspotentiale wurde an *Lymnaea stagnalis* schon mit klassischer Elektrophysiologie beobachtet [45]. Messungen an der Schnecke *helisoma trivolvis* [36] zeigen auch diese Aktionspotentialverbreiterung in Folge langer Bursts. Als Ursache für die Verbreiterung werden in Erweiterung des Hodgkin-Huxley-Modells inaktivierbare K-Kanäle vermutet, wie sie durch Voltage-Clamp-Versuche an Nudibranchien [14] nachgewiesen wurden. Aktionspotentialverbreiterung wird als Grundlage zur langfristigen Veränderung der Eigenschaften neuronaler Netze diskutiert, die Depolarisation eines langen Pseudoplateaus in der Lage ist Transmitterreservoirs zu entleeren [45]. Bei der Betrachtung von Abbildung 7.10 muss bemerkt werden, dass der Reizmechanismus, der das Aktionspotential auslöste, eher dem Mechanismus von 7.9a) entspricht, denn eine Hyperpolarisation durch die Reizpulse ist nicht erkennbar.

Dies änderte sich jedoch nach wiederholten Reizversuchen. Schließlich wurde, wie Abbildung 7.11a) zeigt, das Aktionspotential doch nach Hyperpolarisation ausgelöst. Das Neuron hatte sich

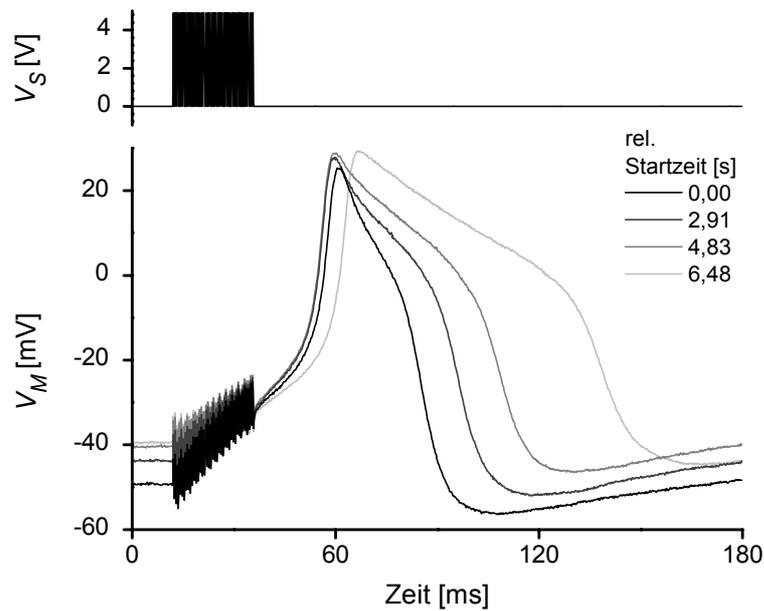


Abbildung 7.10: Die Anregung eines Neurons mit einem Reizmuster aus vielen, dicht folgenden Spannungsschritten im Abstand von ca. 2 s verbreitert nach und nach das Pseudoplateau eines Typ-2-Neurons.

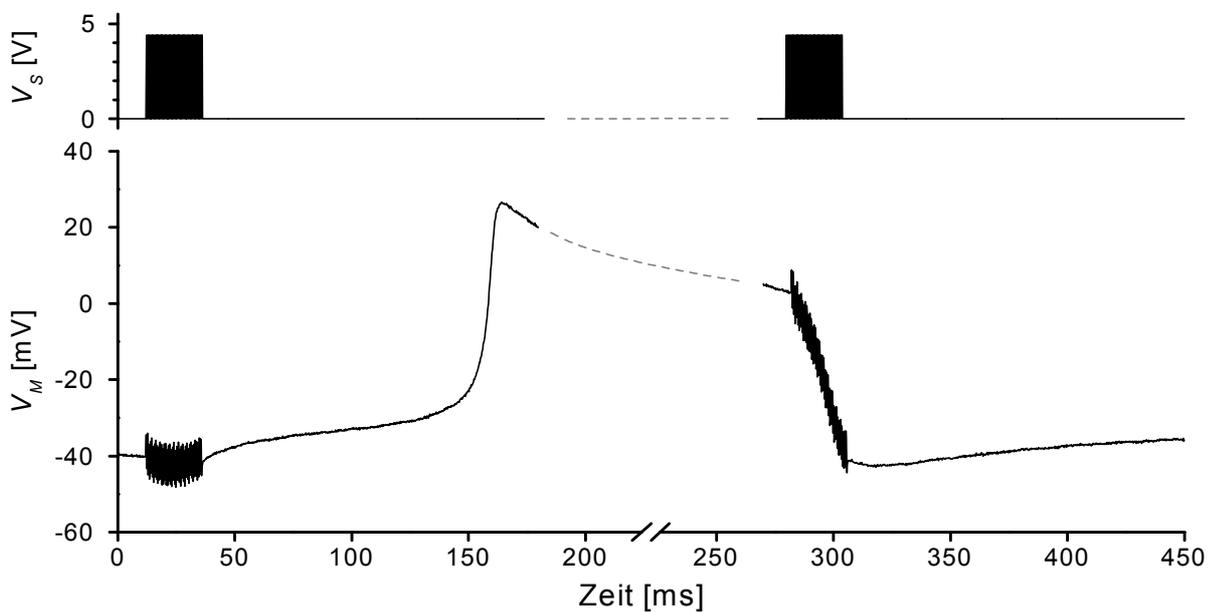


Abbildung 7.11: a) Nach wiederholter Reizung startet das Aktionspotential nach Hyperpolarisation und die Latenzzeit steigt stark an. In größeren Zeitfenstern konnte eine Länge des Pseudoplateaus von über 400 ms beobachtet werden. b) Das Pseudoplateau ist so lang, daß das folgende, gleiche Reizmuster, das das Aktionspotential auslöste, das Zellpotential um ca. 40 mV repolarisiert.

durch die Reize stark verändert: Die Latenzzeit war von 30 ms auf 130 ms gestiegen und das

Pseudoplateau hatte sich sogar so stark verlängert, dass das Aktionspotential nicht mehr in das Messfenster passte.

Anfänglich verkürzte sich die Länge des Pseudoplateaus wieder, wenn die Reizpulse ausgesetzt wurden. Deshalb wurden die Pulsmuster automatisch wiederholt, was die Länge wieder vergrößerte. Das Pseudoplateau wurde dabei so lang, dass der nächste Flankenzug das Aktionspotential noch in depolarisiertem Zustand traf. Die Abbildung 7.11b) zeigt, dass in diesem Fall der Reizpuls das Neuron repolarisierte. Diese Repolarisation des Neurons auf Ruhepotential belegt eindrucksvoll die oben schon beobachtete Polarisationsfähigkeit der kapazitiven Stimulation.

Über die Mechanismen, die für den oben beschriebenen Effekt der Reizung durch Hyperpolarisation verantwortlich sind, kann im Rahmen dieser Arbeit nur spekuliert werden. Bemerkenswert ist jedoch ihr Zusammenhang, da sich dadurch vielleicht einmal der Zugriff auf Netzwerkeigenschaften durch kapazitive Stimulation ergibt.

7.3 Detektion von Neuronen

Der besser verstandene Mechanismus der Detektion von Neuronen erlaubt es den Zustand der Kontaktmembran anhand der Transistorsignale zu charakterisieren.

7.3.1 Verarmung

Verarmung der Kontaktmembran ist vorhanden, wenn $\mu_{Na} < 1$ oder $\mu_K < 1$. Nach Abbildung 2.12 ist der Na-Kanal verarmt, wenn zur Zeit des Aktionspotentialanstiegs eine positive Spitze im Transistorsignal erkennbar ist. Notwendige aber leider nicht hinreichende Voraussetzung für K-Kanal-Verarmung ist ein Signaleinbruch des Transistors während beziehungsweise nach der Spitze des Aktionspotentials. Transistorsignale mit zwei Einbrüchen können, wie in 2.12 zu sehen, hinsichtlich der K-Kanal-Belegung der Kontaktmembran nicht eindeutig identifiziert werden.

Vollständige Verarmung

Die vollständige Verarmung der Kontaktmembran entspricht dem biphasischen A-Typ, der das Aktionspotential mangels Ionenfluss in der Kontaktmembran vorwiegend kapazitiv überträgt. Abbildung 7.12 zeigt zwei Kopplungen verschiedener Neurone, die beide den charakteristischen, positiven Na-Peak, aber danach keinen zweiten, positiven Peak mehr zeigen. Damit ist klar, dass $\mu_{Na} < 1$ und $\mu_K < \mu_{Na}$, also auch Kalium verarmt ist. In beiden Graphen wurde der Idealfall

einer biphasischen Kopplung mit $\mu_K = \mu_{Na} = 0$ modelliert. Das Mikroelektrodensignal wurde abgeleitet und so skaliert, dass die positiven Spitzen gleiche Amplitude haben.

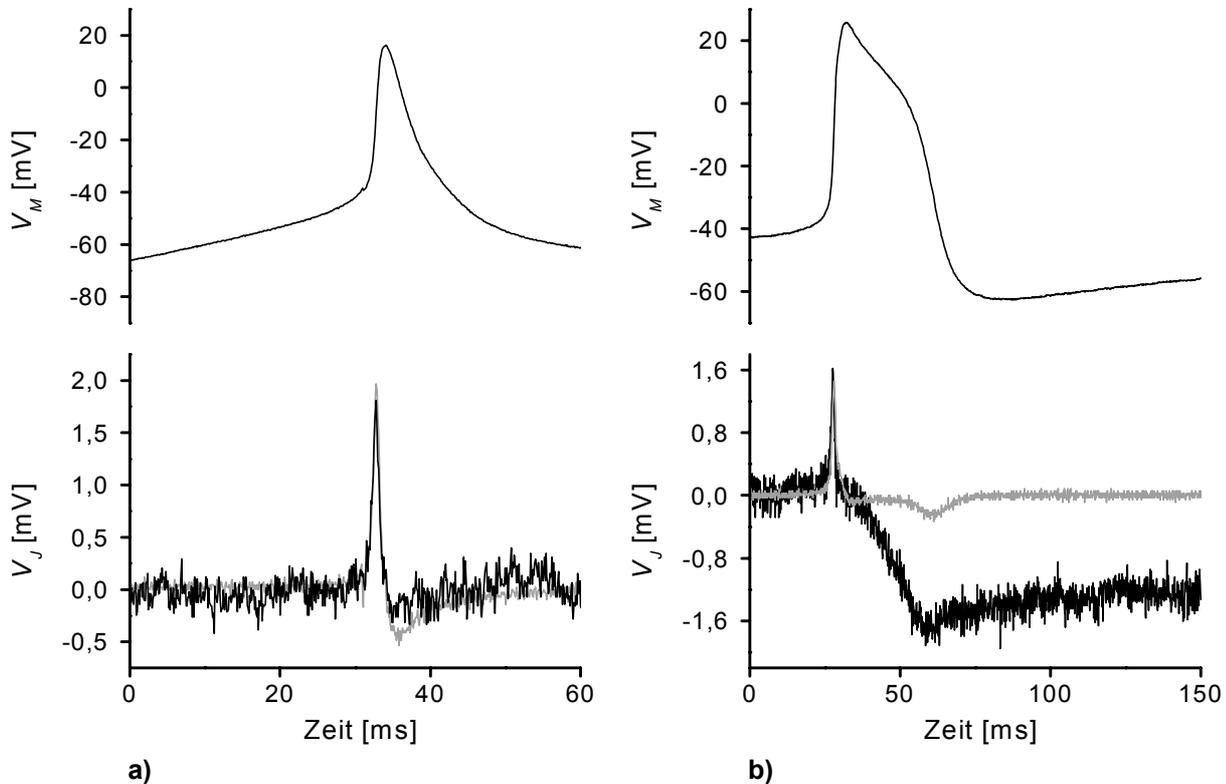


Abbildung 7.12: a) Vollständige Verarmung von Ionenkanälen in der Kontaktmembran. b) Vorwiegend kapazitive Kopplung eines Typ-2-Neurons. Zur Klärung des über 1,6 s anhaltenden Einbruchs im Transistorsignal reicht das verwendete Hodgkin-Huxley-Modell nicht aus.

Der Graph 7.12a) zeigt gute Übereinstimmung der beiden Transienten. In Graph 7.12b) stimmt zwar die Breite des Na-Peaks, doch das Transistorsignal weicht danach sehr stark vom modellierten Signal ab. Der Einbruch im Transistor relaxierte nur sehr langsam wieder gegen Null. Ein exponentieller Fit liefert eine Zeitkonstante von $\tau = 1,6$ s.

Eine Interpolation der Modellierungen in Abbildung 2.12 mit $0 < \mu_{Na} < 1$ und mit $\mu_K = 0$ zeigt, dass positive Na-Spitzen und K-Einbrüche gleichzeitig auftreten können. Es sind offenbar in der Kontaktmembran des Neurons doch noch Na-Kanäle vorhanden. Die Dauer und Lage des Einbruchs nach der Aktionspotentialspitze deutet jedoch eher auf den Einfluß von K-Kanälen. Beachtet man, dass das Neuron in Abbildung 7.12b) vom Typ 2 ist, so lässt sich die Situation ohne exakte Kenntnis der Ionenkanäle nicht mit dem verwendeten Hodgkin-Huxley-Modell klären.

Spezifische Verarmung

Na-Kanalverarmung ist, wie oben schon gezeigt, leicht an der positiven Spitze zur Zeit des Aktionspotentialanstiegs zu erkennen. In Abbildung 7.13a) folgt der ersten Spitze noch ein positiver Hügel, der anzeigt, dass mehr Kalium- als Natriumkanäle in der Kontaktmembran versammelt sind.

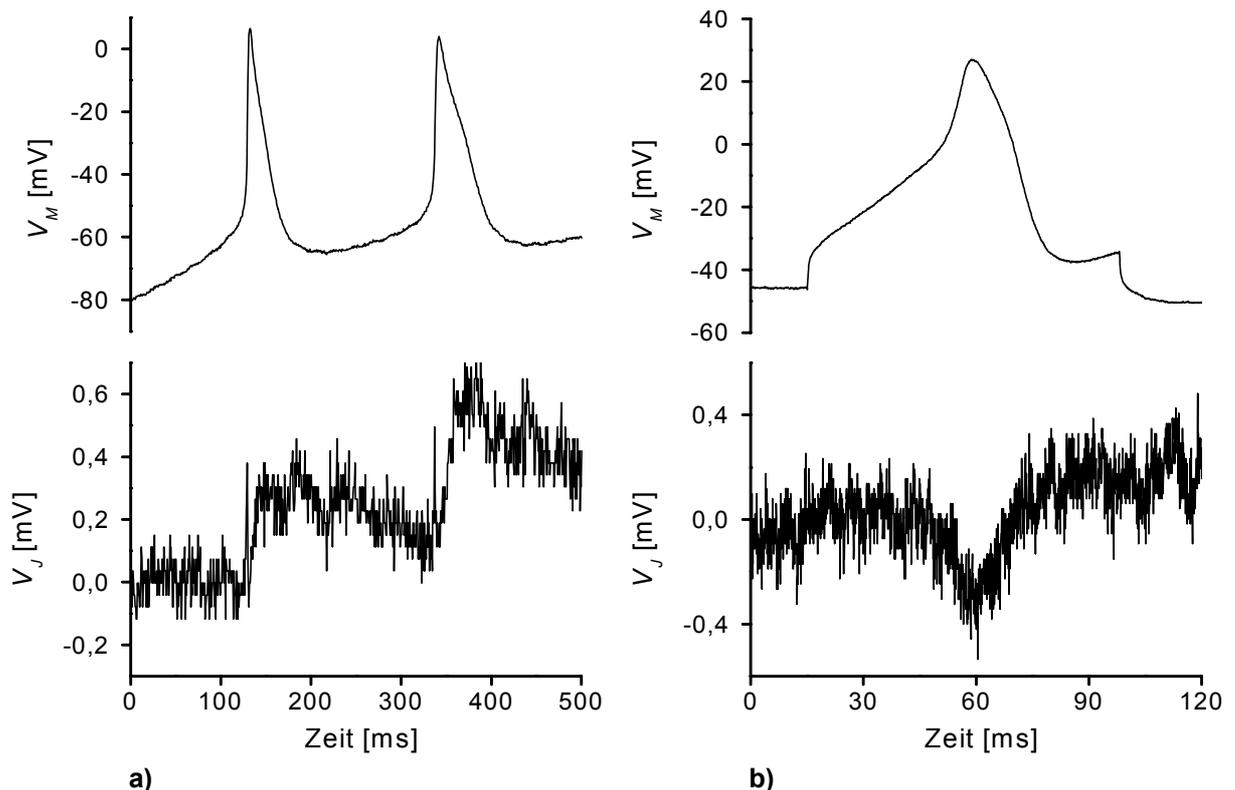


Abbildung 7.13: a) Na-Verarmung mit K-Kanalanteil, der größer als der von Natrium ist. b) K-Kanal-Verarmung mit $\mu_{Na} = 1$.

K-Kanalverarmung Um K-Kanal-Verarmung in der Kontaktmembran nachzuweisen, muss $\mu_{Na} \leq 1$ sein und $\mu_K < \mu_{Na}$ sein. Das ist in Abbildung 7.13b) der Fall. Es ist weder eine positive noch eine negative Spitze im Transistor während des Anstiegs im Zellpotential zu erkennen, so dass von $\mu_{Na} = 1$ ausgegangen werden kann. Der Einbruch zur Hauptzeit des Aktionspotentials sagt schließlich, dass $\mu_K < \mu_{Na}$ und damit $\mu_K < 1$. Die K-Kanäle in der Kontaktmembran sind also verarmt.

Die Abbildung 2.12 zeigt, dass es zwei sehr unterschiedliche Situationen gibt, in denen der Transistor nur einen Einbruch zeigt. Zum einen die oben beschriebene Situation mit K-Kanal-Verarmung, zum anderen die Situation mit vollständiger Anreicherung. Der Unterschied liegt in der Lage und Breite des Einbruchs relativ zum Aktionspotential. Für reine Transistormessungen ohne eingestochene Mikroelektrode kann in diesem Fall also keine eindeutige Aussage getroffen werden.

7.3.2 Anreicherung

Die vollständige Anreicherung zeigt Abbildung 7.14. Der Einbruch des Transistorsignals ist genau während der Anstiegsphase des Aktionspotentials. Während des Aktionspotentialabfalls ist nichts zu erkennen. Im Vergleich mit Abbildung 2.12 liest man $\mu_{Na} = \mu_K > 1$ ab.

Fälle von angereicherten Kontaktmembranen, in denen spezifisch angereichert wurde, also $\mu_{Na} \neq \mu_K$ werden später im Zusammenhang mit der Dynamik des Kontakts vorgestellt. Bemerkenswert ist, dass keine Messung für den angereicherten Fall mit $\mu_{Na} > \mu_K$ gefunden wurde.

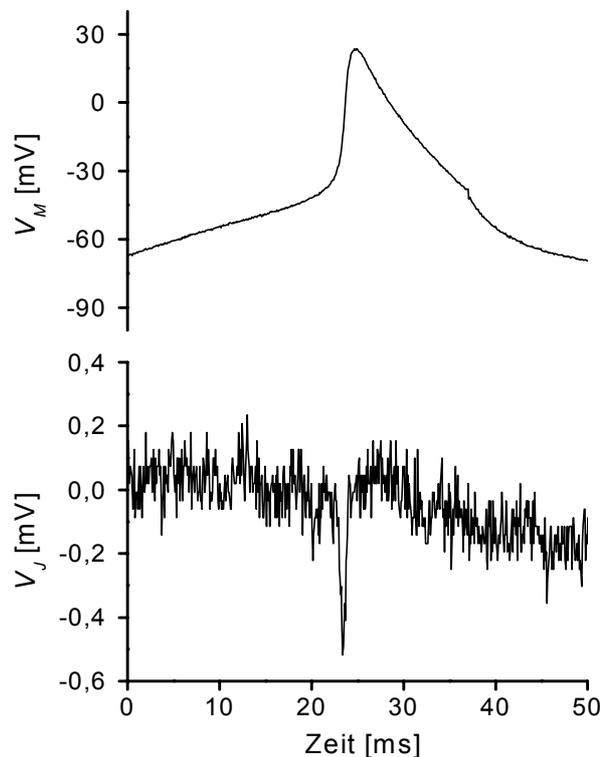


Abbildung 7.14: Vollständige Anreicherung der Na- und K-Kanäle in der Kontaktmembran.

7.3.3 Leckdominanz

In den beiden Abschnitten über Verarmung und Anreicherung von Ionenkanälen in der Kontaktmembran wurden die Transistorsignale unter der Annahme interpretiert, dass die ionenunspezifische, ohmsche Leckleitfähigkeit der Kontaktmembran keinen nennenswerten Beitrag zur Signalbildung liefert. Das ist in manchen Situationen nicht der Fall.

Schon bei Blutegeln [12], [44], [17] wurden Transistorsignale beobachtet, in denen kein Anteil aktiver Kanäle in der Kontaktmembran zu erkennen ist. Abbildung 7.15a) und b) zeigt Neurone von *Lymnaea stagnalis*, die nicht wie sonst auf dem Chip über längere Zeit kultiviert wurden, sondern direkt nach der Präparation auf einen stark mit Poly-l-lysin beschichteten Chip plaziert und sofort vermessen wurden. Das entspricht den Umständen der Kopplungsmessungen mit Blutegeln. Es liegt die Vermutung nahe, dass die konzentrierte Beschichtung ursächlich für die leckdominierte Antwort des Transistors ist. An Neuronen, die auf Chip gewachsen waren, wurden nur unter Einfluss von Reizpulsen leckdominierte Transistorsignale gefunden.

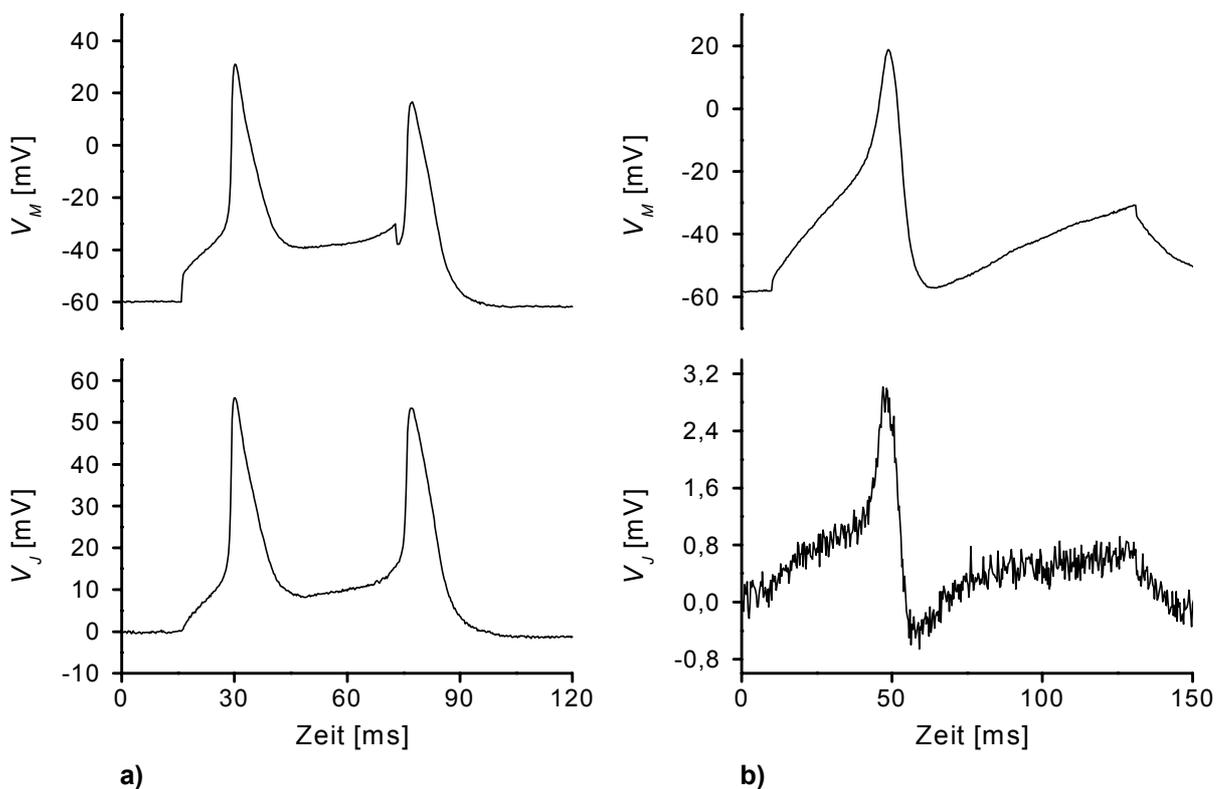


Abbildung 7.15: Transistorsignale von zwei Neuronen, die auf einen Chip mit stark konzentriertem Poly-l-lysin Film aufgesetzt wurden. Die Membran ist leck mit $\mu_L \gg 1$.

7.4 Lokale Schleifen

Im Sinne der Übertragung von Ereignissen, kann die Schnittstelle Neuron-Chip wie eine Synapse betrachtet werden. Dabei ist einmal das Neuron, einmal der Chip als Knoten anzusehen. Funktionieren beide Übertragungsrichtungen, also Stimulation und Detektion, so kann man eine einfache Schleife bilden, in der ein Ereignis die Schnittstelle nacheinander in beide Richtungen überquert.

In [44] wurde gezeigt, wie mit geeigneter Signalverarbeitung im Transistorsignal ein Aktionspotential erkannt und durch einen Reizpuls wieder ausgelöst werden kann. Der folgende Abschnitt zeigt die umgekehrte Situation, in der zuerst ein Reizpuls ein Aktionspotential im Neuron auslöst, welches in umgekehrter Richtung wieder vom Transistor detektiert wird. Zur Abtrennung von Systemen mit mehreren Neuronen, wo an verschiedenen Stellen gereizt und gekoppelt wird, wird diese Situation als lokale Schleife oder lokaler Loop bezeichnet.

Für die Übertragung von Ereignissen in der lokalen Schleife gelten die Einzelmechanismen von Detektion und Stimulation. Hier werden nur die Einflüsse der dichten Packung von Transistor und Reizspot auf die Signalform und die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung in der lokalen Schleife diskutiert.

Artefakte

Langsame Überlagerungen Die Spannungsänderungen, die Reizspot und Transistor im Betrieb durchlaufen, unterscheiden sich sehr stark. So wird das Potential der Reizbahnen im Regelfall um $4 - 5 V$ verschoben, der Transistor hingegen zeichnet Modulationen der Gate-Bulk-Spannung $V_{GB} = V_{GS} + V_{BS}$ noch im Bereich von $100 mV$ auf. Damit der Chip beide Elemente gleichzeitig betreiben kann, sind die Reizbahnen von den Drain- und Source-Gebieten durch ein $1 - 2 \mu m$ breites Oxid getrennt.

Ist das Oxid nicht ausreichend dicht, so kann das wechselnde Potential der Reizbahnen den Zustand des p-Kanals im Feldeffekttransistor modulieren. Dieser Artefakt zeigt sich in Form einer exponentiellen Kurve, die dem Transistorsignal überlagert ist.

Abbildung 7.16 zeigt diese Situation. Negative Flanken von V_S senken den Gleichanteil des Transistors, positive heben ihn. Eine Beeinflussung des Transistorsignals über einen schlecht gesperrten p-n-Übergang zwischen Reizbahn und Bulk war ausgeschlossen, da sich der Artefakt nur bei bestimmten Transistoren zeigte. Hätte der Reizpuls das Potential des Bulks moduliert, so hätte dieser Effekt in allen Transistoren bemerkt werden müssen.

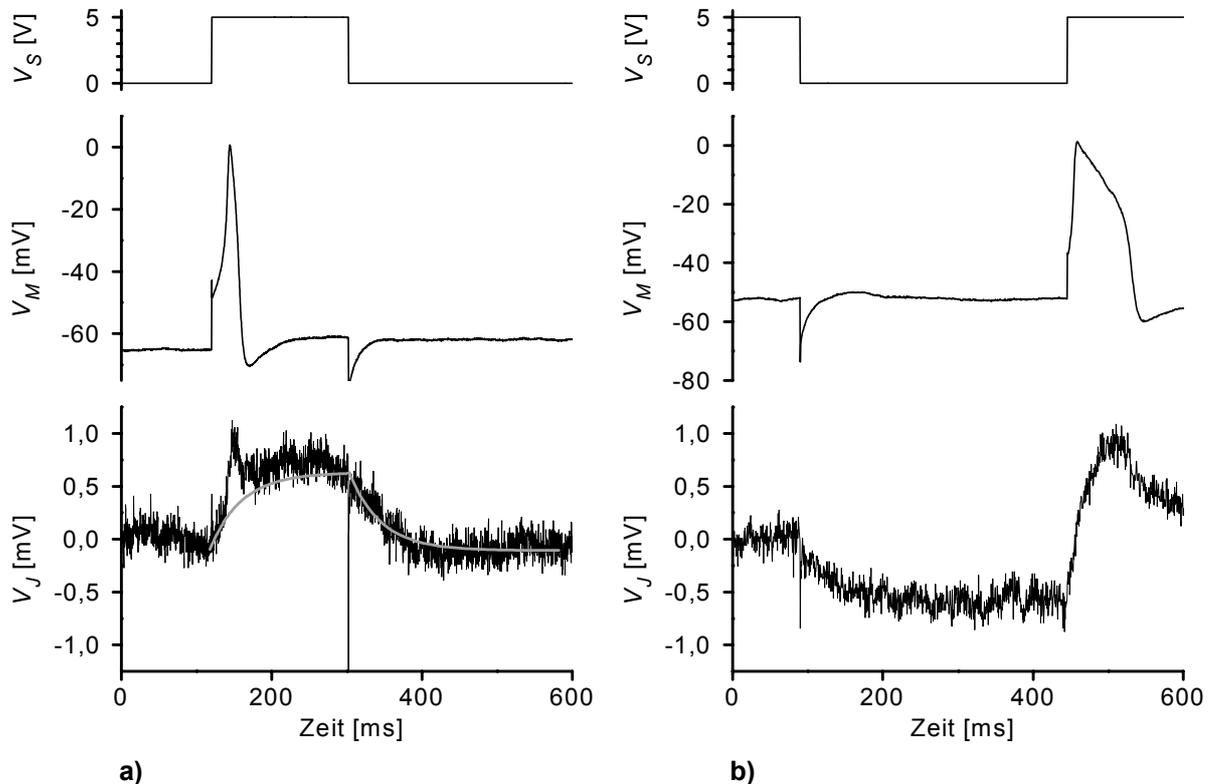


Abbildung 7.16: Die Nähe des Reizspots kann bei undichtem Recessed Oxid dem Transistor eine RC-Kurve überlagern.

Kurze Spitzen Die Reizbahnen sind bei dichtem Recessed Oxide zwar ohmsch von Drain- und Source-Bahnen getrennt, es besteht jedoch ein kapazitiver Kontakt über das Recessed Oxide und die Raumladungszonen der p-n-Übergänge zum Bulk und vom Bulk zu Source beziehungsweise Drain. Ein dritter, kapazitiver Verbindungsweg ist die Einkopplung über die Kapazitäten des Reizoxids ins Bad und von dort über das Gateoxid in den Transistor.

Der letzte Weg gibt das Vorzeichen der Reizartefakte korrekt wieder: Eine positive Flanke erzeugt im Bad eine positive Spitze, die vom Transistor ebenso aufgezeichnet wird. Die Einstreuung von nicht vollständig abgedeckten Reizspots ins Bad lässt sich mit Mikroelektroden nachweisen. Es ist dabei unerheblich ob sich die Spitze der Mikroelektrode im Neuron befindet, denn der Peak wird kapazitiv über die Wand der Mikroelektrode eingekoppelt. Die Spitze ist sehr kurz und überlagert deshalb nicht die eigentlichen Signale. Sie könnte bei Bedarf durch einen einfachen Tiefpass herausgefiltert werden.

Die Höhe der Spitzen hängt wegen ihrer geringen Breite von der Phasenlage des Abtastvorgangs der AD-Wandlertkarte ab und kann deshalb nicht ausgewertet werden. (Abbildung 7.17b)

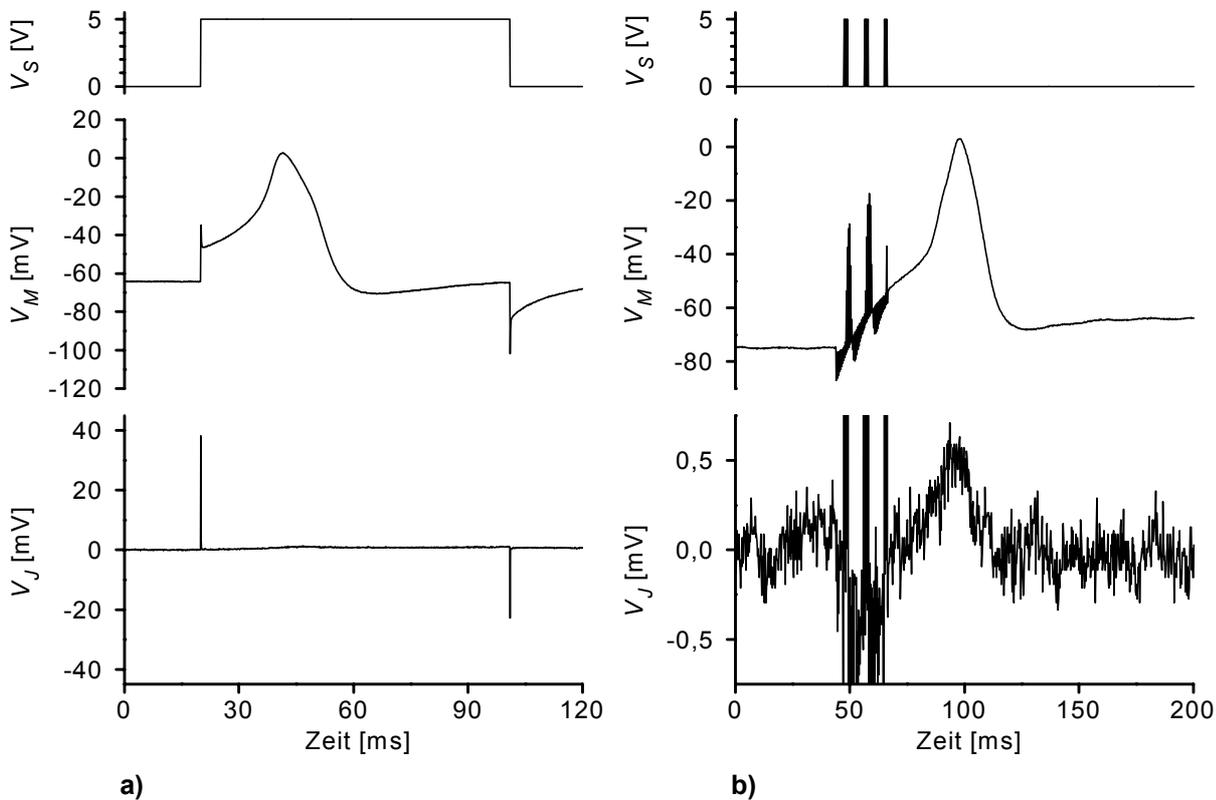


Abbildung 7.17: Kapazitive Einstreuung der Reizflanken in den Transistor und in das Signal der Mikroelektrode. a) Kapazitive Peaks durch die Spannungflanken der Reizpulse. b) Das Neuron wurde mit einer Serie von sehr dichten Rechteckpulsen angeregt. Weder die Rechteckpulse noch die kapazitiven Peaks wurden ausreichend schnell abgetastet.

zeigt, dass bei naheliegenden Abtast- und Reizpulsfrequenzen Schwebungserscheinungen auftreten können, die zum vollständigen Verschwinden der Spitzen führen kann.

Ausbeuten

Um einen lokalen Loop auszubilden, muss das Neuron so auf der Kombinationsstruktur sitzen, dass es den Transistor und Teile der Reizspots ausreichend abdeckt. Zusätzlich zur richtigen Platzierung muss noch ein ausreichend dichter Kontakt hinzukommen.

Abbildung 7.18 zeigt den Überblick über 67 vermessene Situationen, in denen ein Neuron entweder koppelte oder gereizt werden konnte. Als reizbar wurden Situationen eingestuft, in denen das Neuron nach den Reizpulsen ein Aktionspotential ausbildete. Koppelnde Neurone waren jene, deren Aktionspotential als merkliches Ereignis im Transistorsignal erkennbar war.

In 38,8% aller Messungen war beides der Fall, so dass ein lokaler Loop entstand. Bemerkenswert ist, dass deutlich mehr Neurone zur Kopplung fähig waren als in Gegenrichtung gereizt werden

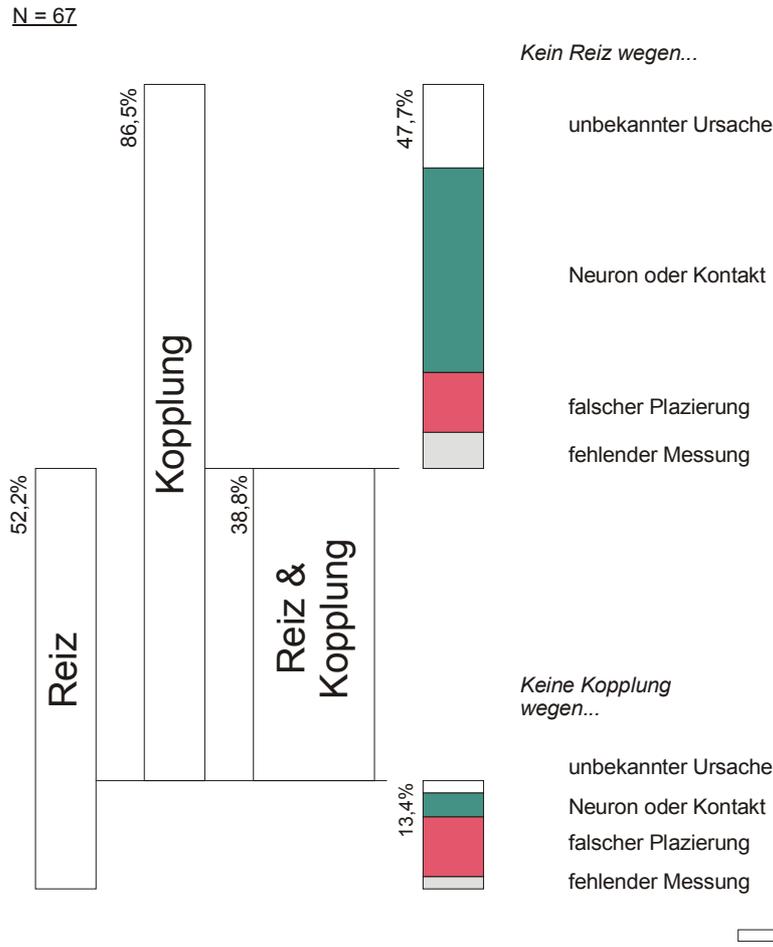


Abbildung 7.18: Die Wahrscheinlichkeit für eine lokale Schleife setzt sich aus den Wahrscheinlichkeiten für erfolgreiche Reizung und Kopplung der Neuronen zusammen. Es ist wahrscheinlicher, dass ein Neuron, das erfolgreich gereizt wird, auch koppelt als im umgekehrten Fall.

konnten. Die meisten Neurone, die ausschließlich koppelten aber nicht gereizt werden konnten, waren richtig positioniert, was für den Erfolg der Kombinationsstruktur spricht. Diese Neurone zeigten auf Reizpulse verschiedenster Art keine oder nur schwache Antwort.

Reizbare Neurone hingegen zeigten fast immer auch ein erkennbares Transistorsignal. Konnte ein Neuron nur gereizt, aber nicht mit dem Transistor detektiert werden, so war überwiegend eine Fehlplatzierung die Ursache. Das ist direkt auf die Größenverhältnisse sowie auf die Lage von Transistor und Reizspot zurückzuführen. Es ist deutlich wahrscheinlicher, dass ein Neuron eher einen Reizspot als einen Transistor ausreichend abdeckt.

Wichtigster Grund für die Asymmetrie des Neuro-Chip Kontakts ist die unterschiedlicher Erkennbarkeit der beiden Ereignisse Aktionspotential und Transistorsignal. Von einer Modulation

im Transistorsignal wird nur gefordert, dass sie mit gängigen Methoden wie z.B. Filterung vom Rauschen zu unterscheiden ist. Auf der Seite des Neurons wird jedoch als Übertragungserfolg ein Aktionspotential gefordert. Hier liegt im Schwellwertverhalten des Neurons der eigentliche Grund für die Asymmetrie.

7.5 Die Dynamik des Neuro-Chip-Kontakts

Das Neuro-Chip-System zeigt auch noch nach der Wachstumsphase Veränderungen. Während die langsamen Prozesse in der Wachstumsphase nur visuell beobachtet wurden, können mit Mikroelektrode und Feldeffekttransistor die Eigenschaften des Neuro-Chip-Kontakts ausgemessen werden.

Neben offenbar spontanen Veränderungen des Kontakts konnten auch äußere Einflüsse als Ursache für Veränderungen klar identifiziert werden. Da die Reizung zur vollständigen Übertragung eines hybriden Systems gehört, ist dabei besonders der Einfluss der Reizspots bei der kapazitiven Stimulation beachtenswert. Für die genauere Auswertung der Vorgänge im Kontaktbereich bietet sich die Analyse des Transistorsignals an.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit externen Einflüssen wie Einschalteteffekten, Reizpulsen und Anstechen mit Mikroelektroden. Am Schluß wird im Kontrast dazu das Verhalten eines über mehrere Stunden unbeeinflussten Systems analysiert.

7.5.1 Spontane Veränderungen

Na-Kanal-Anreicherung nach Penetration Es ist bei intrazellulärer Ableitung nicht ungewöhnlich, dass nach dem Einstechen der Mikroelektrode das Neuron eine bestimmte Zeit braucht, bis sich Form und Reizschwelle des Aktionspotentials stabilisiert haben. Im folgenden Versuch war der Transistor schon bei den ersten Aktionspotentialen zugeschaltet. Das Neuron wurde mit identischem Strompuls über eine Zeit von ungefähr 8 min wiederholt stimuliert. Nebenbei wurde der Brückenverstärker nochmal abgeglichen.

Die erste Aufnahme in Abbildung 7.19a) zeigt den positiven Hügel eines Neurons mit homogener Na-Kanaldichte und leichter K-Kanal-Anreicherung auf der Kontaktseite. In den folgenden Aufnahmen entsteht nach und nach ein spitzer Einbruch, der auf eine zunehmende Na-Kanal-Anreicherung der Kontaktmembran hinweist. Auf den K-Kanal-Hügel und damit die relative

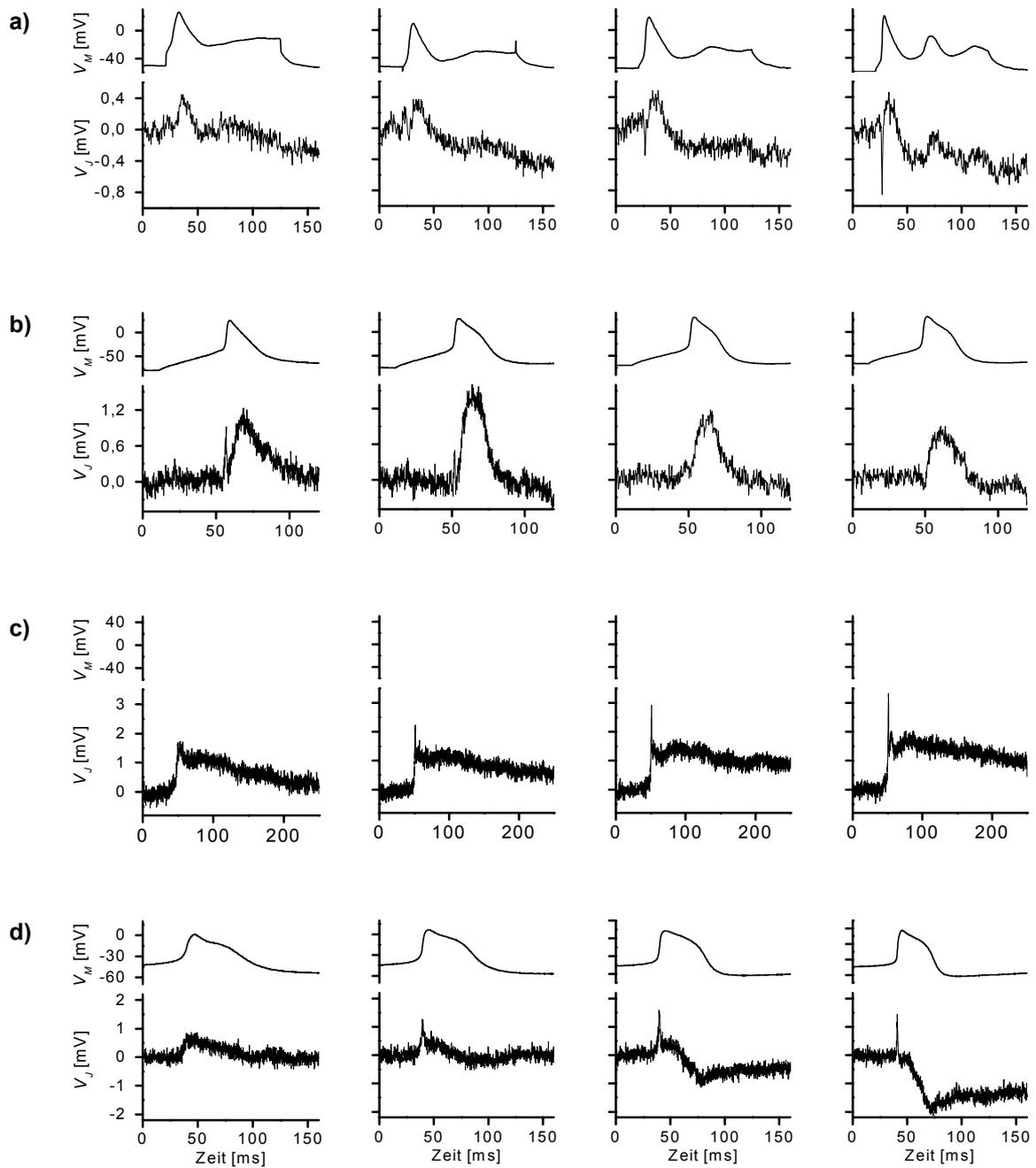


Abbildung 7.19: Vier Beispiele für die spontane, zeitliche Veränderung des Neuro-Chip-Kontakts. a) Na-Kanal-Anreicherung nach Penetration b) Allgemeine Anreicherung mit K-Kanal-Überschuß c) Na-Kanal-Verarmung ohne Mikroelektrodeneinfluß. d) Allgemeine Verarmung

K-Kanal-Verteilung hat das offenbar keinen Einfluss. Gleichzeitig verändert sich die Form des Aktionspotentials, es wird schmaler und die Refraktärzeit verkürzt sich.

Allgemeine Anreicherung mit K-Kanal-Überschuß Abbildung 7.19b) zeigt eine fortschreitende Anreicherung beider Kanaltypen im Kontaktbereich. Ausgangszustand des Neurons ist eine deutliche Na-Kanal-Verarmung und eine K-Kanal-Anreicherung in der Kontaktmembran.

Es fällt auf, dass die Spitze, die die Na-Verarmung anzeigt, absinkt, der Hügel, der die relative K-Kanaldichte charakterisiert, jedoch fast unveränderte Amplitude zeigt. Daraus können zwei Schlüsse gezogen werden. Klar ist, dass die relative Na-Kanaldichte ansteigt. Wäre das der einzige Vorgang, so würde nach Abbildung 2.12 auch der zweite Hügel verschwinden. Da er jedoch auch in der letzten Aufnahme noch vorhanden ist, in der schon ein leichter Na-Überschuß zu erkennen ist, folgt, dass am Ende der relativen Na-Kanal-Anreicherung die K-Kanaldichte über der der Na-Kanäle liegt und somit auch angestiegen sein muss.

Na-Verarmung ohne Mikroelektrodeneinfluss Den umgekehrten Weg durchlief ein Neuron, das zu Beginn der Messung spontan aktiv war und deshalb nicht mit der Mikroelektrode stimuliert werden musste. Der Transistor zeigt in der ersten Aufnahme einen positiven Hügel wie in der letzten Aufnahmen von Abbildung 7.19c). Auf diesen Hügel setzte sich innerhalb von 80 s eine Spitze, was eine fortschreitende Na-Verarmung kennzeichnet.

Kontaktmembran schließt sich Die Feuerfrequenz des gerade besprochenen Neurons sank mit der Zeit ab, bis kein Aktionspotential mehr auftauchte. Es wurde eine Mikroelektrode eingestochen und nach mehreren Reizversuchen entstand wieder spontane Aktivität. Dieser Effekt gehört zu den Einflussmöglichkeiten des Chips auf den Kontakt und wird deshalb im nächsten Abschnitt vorgestellt.

Nach den Reizpulsen gab es nur noch eine schwache, monophasische Kopplung. Mit der Zeit jedoch zeigte sich (Abbildung 7.19d)) ohne äußeren Einfluss eine positive Na-Spitze mit folgendem Signalabfall. Das letzte Signal nach 748 Kopplungen wurde schon weiter oben vorgestellt. Es kann mit einer vorwiegend passiven, dichten Kontaktmembran interpretiert werden. Es scheint, dass sich die Kontaktmembran, die wahrscheinlich durch die Reizpulse perforiert wurde, sich in den folgenden 34 *min* wieder schloss.

7.5.2 Veränderungen durch Chipeinfluss

Eine der am häufigsten gefundenen Ursachen für Veränderungen im Neuro-Chip Kontakt rührt von Reizpulsen her. Die folgenden Messungen zeigen, dass bei Spannungsflanken von $V_G = \pm 5V$ die Konformation der Ionenkanäle in der Kontaktmembran irreversibel verändert und sogar

die Membran im Gesamten zerstört werden kann. Noch stärkere Spannungsflanken können auf das Neuron wirken, wenn die Versorgungsspannungen für den Transistor abrupt an den Chip angelegt werden.

Elektroporation durch undefinierte Einschaltflanken

Der Transistor als Reizspot Das gesamte Gebiet der Active Area ist mit einem dünnen, homogenen Oxid überzogen, dessen Funktion von der darunterliegenden Struktur bestimmt wird. So fungiert dieses Oxid über dem Bulkmaterial zwischen den Enden der Source- und Drainbahnen als Gateoxid, über den Enden der p-dotierten Reizbahnen hingegen als Reizoxid.

Das Oxid der Active Area bedeckt ebenso die große, p-dotierte, zentrale Common-Source-Fläche sowie die trapezförmigen Enden der p-dotierten Drainbahnen. Beim Chipdesign wurde darauf verzichtet auf der Fläche der Common-Source ein Feldoxid aufzubringen, um durch weitere Stufen in der Chipoberfläche die Vernetzung der Neurone nicht zu beeinträchtigen.

Während des Betriebs der Transistoren werden die Source- und Drainpotentiale konstant gehalten, so dass keine unerwünschte Beeinflussung der Neurone durch die Transistoren vorliegt. Anders verhält es sich jedoch, wenn der Chip über Relais an den Vorverstärker, der die Gate-Source-Spannung bereitstellt, angeschlossen wird. Nimmt man an, dass zu Beginn dieser Situation der Chip statisch nicht aufgeladen ist und dass sich die Drain-, Source- und Bulkgebiete über ihre p-n-Übergänge auf gleiches Potential relaxiert haben, so werden die Potentiale der Source- und Drainzuleitungen durch das Zuschalten des Vorverstärkers abrupt auf ihr Arbeitspotential angehoben. Über den entsprechenden Gebieten entsteht also eine Reizsituation.

Solche Einschalt Effekte können auch an Reizspots allein auftreten. Um die Reizpulse des Funktionsgenerators auf ausgewählte Reizspots zu lenken, können die 14 Reizspotpaare über Relais unabhängig voneinander zu- und abgeschaltet werden. Sind beim Zuschalten eines Reizspotpaars die entsprechenden p-Bahnen nicht auf dem Potential des Funktionsgenerators, so erfahren die aufliegenden Neurone einen Spannungspuls undefinierter Größe und unbekanntes Vorzeichen, der nicht nur Aktionspotentiale auslösen, sondern auch den Neuro-Chip Kontakt stark verändern kann.

Zuschalten eines Reizspots bewirkt monophasische Kopplung Die Graphen von Abbildung 7.21 dokumentieren eine solche Situation. Neuron 2 sitzt auf Doppelstruktur 14, der Chip ist bereits in Betrieb und zwischen Neuron und Chip besteht keine Kopplung. Graph 7.21b) zeigt den

Zeitpunkt, an dem das Reizspotpaar 14 und ungefähr eine Sekunde später das Paar 13 zugeschaltet wurde. Wie Abbildung 7.20 zeigt, liegt Neuron 2 zum größten Teil auf dem Spotpaar 14, so dass die Einschaltflanke dieses Paares sich stärker auswirkt als die folgende des benachbarten Paares 13. Das Membranpotential von Neuron 2 springt ebenso wie das Signal von Transistor 14 zuerst in negative Richtung, danach folgt ein Aktionspotential, das monophasisch an den Transistor übertragen wird.

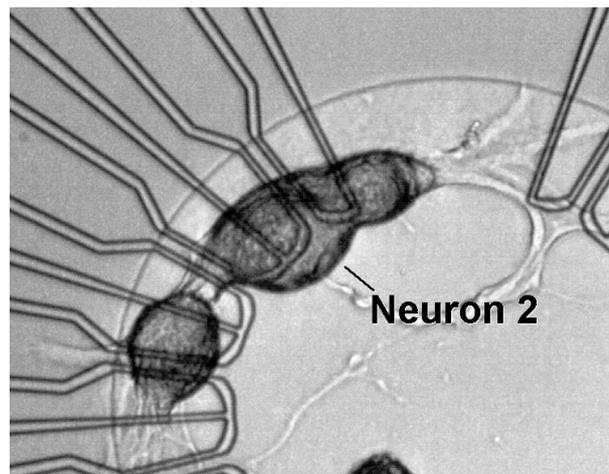


Abbildung 7.20: Neuron 2 liegt zum größeren Teil auf dem Reizspotpaar 14 als auf Paar 13.

Das Potential des Reizspots lag offenbar höher als das am Ausgang des Funktionsgenerators, so dass das Zuschalten wie eine negative Spannungstufe wirkte. Die Mikroelektrode zeigt einen Einbruch im Zellpotential bis -160 mV . Direkt danach kommt das Aktionspotential. Die Einschaltflanke war offenbar so stark, dass noch in der freien Membran nach der starken Hyperpolarisation ein Aktionspotential als postinhibitorischer Rebound folgte. Die Kontaktmembran wurde durch diese starke Flanke offenbar elektroperforiert. Dafür spricht das monophasische Transistorsignal, das auf eine passive Membran mit hoher Leitfähigkeit hindeutet.

Wie die nachfolgenden Aufzeichnungen zeigen, veränderte sich der Kopplungstyp nicht mehr. In der Zelle konnten noch eine Zeit lang durch Strominjektion oder Reizpulse Aktionspotentiale ausgelöst werden. Bei der Reizung zeigt sich die perforierte Kontaktmembran an den deutlichen Rechtecken im Mikroelektrodensignal während der Reizpulse. Die Reizbarkeit nahm jedoch ab und die Messung war zu Ende als auch mit einer hohen Strominjektion von 3 nA kein Aktionspotential mehr auszulösen war. Das Leck in der Kontaktmembran wurde also nicht mehr geschlossen und war so groß, dass die Zelle nicht überlebte.

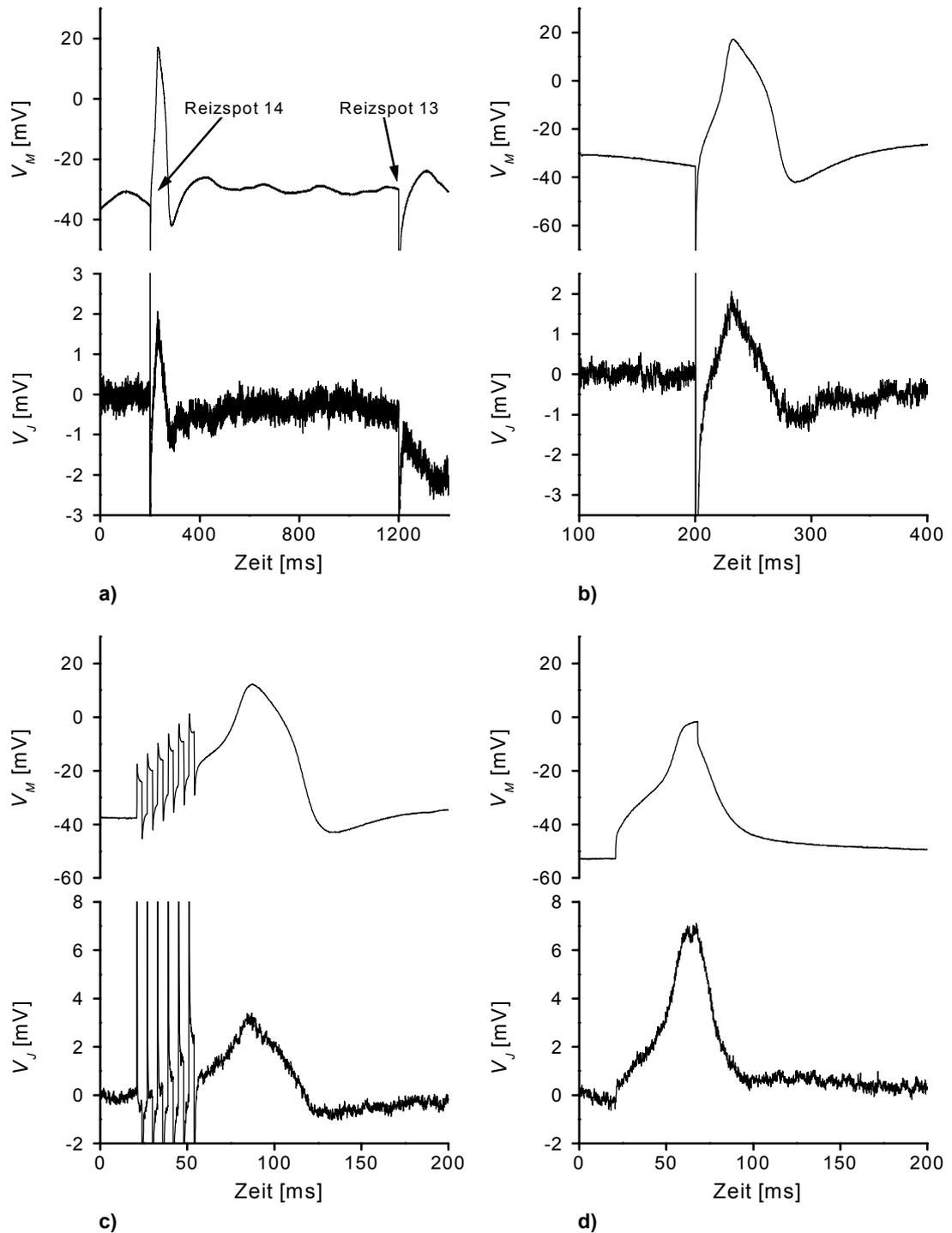


Abbildung 7.21: Die Spannungsflanken beim Zuschalten von Reizspots verändern den Neuro-Chip-Kontakt a) Spannungsflanken beim Einschalten von Reizspot 14 und Reizspot 13 b) Ausschnitt aus a). Der Typ des Transistorsignals ändert sich im Verlauf der Messung nicht mehr, unabhängig davon ob das Neuron c) gereizt oder d) mit Strom stimuliert wurde.

Zuschalten der Transistoren bewirkt monophasische Kopplung Eine noch eindeutigeren Manipulation des Neuro-Chip Kontakts durch Elektroporation zeigt die folgende Messung. Neuron 2 sitzt gut zentriert auf FET 12. Bei der routinemäßigen Überprüfung von Synapsen zeigte sich (Abbildung 7.22a)), dass es spontan und gleichmäßig mit einem Aktionspotentialabstand von ungefähr 500ms feuerte. Die stabile Feuerfrequenz, das unveränderte Ruhepotential und die gleichbleibende Form der Aktionspotentiale dürfen als Indiz für den vitalen Zustand des Neurons gewertet werden. Während der kontinuierlichen Aufzeichnung des Zellpotentials wurden dann die Transistoren auf den Vorverstärker und kurz darauf der Vorverstärker auf die Wandlerkarte geschaltet. Abbildung 7.22b) zeigt das letzte, spontane Aktionspotential des Neurons und 467ms später die Flanke des Einschaltimpulses. Mit dem Einschaltimpuls fängt Neuron 2 an ungefähr 13-fach schneller zu feuern. Die Aktionspotentiale haben nicht mehr den gesamten Hub wie vor dem Einschalten und erlahmen schon nach ca. $1,3\text{s}$. Am Ende hat sich das Ruhepotential um ungefähr 35mV angehoben. Dieses Verhalten ist typisch für ein Neuron, dessen Membran verletzt wurde und das danach durch den fortschreitenden Ausgleich zwischen intra- und extrazellulärer Ionenkonzentration depolarisiert wird.

Die gleiche Interpretation liefert auch der Verlauf des Transistorsignals. Der Einschaltimpuls wird durch Kanalübersprechen als kurzer, negativer Peak im offenen Wandlerkanal des Transistors 12 markiert. 408ms später wurde der Wandlerkanal mit dem Verstärkersignal belegt. Ab diesem Zeitpunkt wird jedes Aktionspotential monophasisch abgebildet. Es ist daraufhin ein länger anhaltender Abfall des Junctionpotentials zu sehen, der erst mit dem Erliegen der Aktionspotentiale auf einem konstanten Potentialniveau endet. Wie in der vorigen Messung deuten die monophasischen Kopplungen auf eine lecke Kontaktmembran hin. Der Abfall des Junctionpotentials hingegen scheint durch eine Vergrößerung des Lecks zustande zu kommen. Nimmt man an, dass der Abdichtwiderstand R_J des Kontakts konstant bleibt, so verschiebt sich bei absinkendem Widerstand der Kontaktmembran R_{JM} der Gleichspannungsteil von V_J in Richtung Zellpotential und wird also negativer. Mit dem Abklingen der spontanen Aktionspotentiale scheint dieser Vorgang beendet zu sein.

Durch die Elektroporation wurde das Neuron so geschädigt, dass auch über Strominjektion kein starkes Aktionspotential mehr ausgelöst werden konnte. Wie in Abbildung 7.22b) zu sehen, kopelte das verbleibende Potential auch nicht mehr auf den Transistor.

Verhinderung unerwünschter Einschalteneffekte Einschalteneffekte können ein hybrides Netz nicht nur manipulieren, sondern auch zerstören. Sie lassen sich vermeiden, wenn vor dem An-

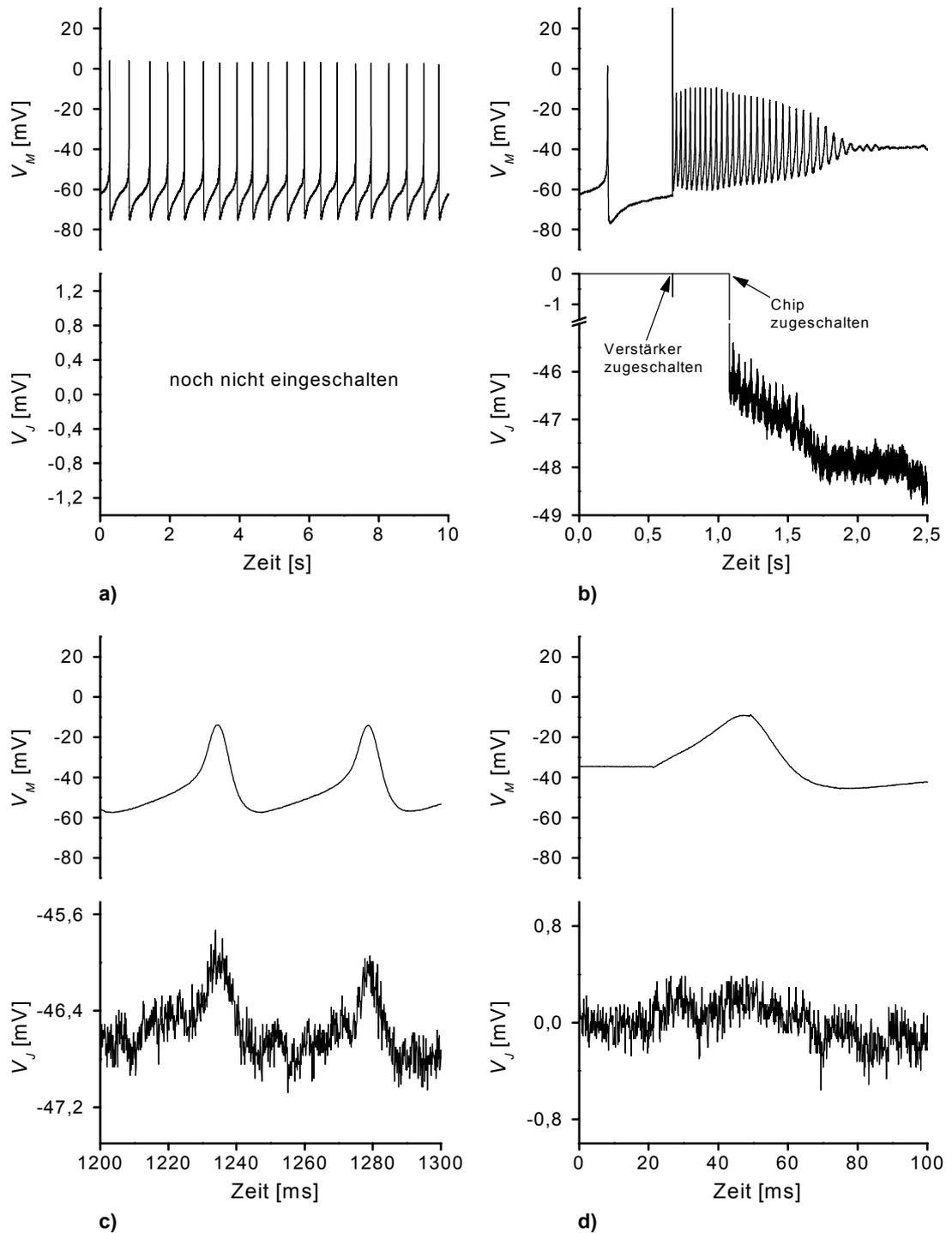


Abbildung 7.22: a) Vorher: Spontanes Feuern b) Zuschalten des Vorverstärkers dann Anlegen der Versorgungsspannungen des Transistors. c) Ausschnitt aus b). d) Letzte Prüfung der Kopplungssituation zeigt kein Signal im Transistor mehr.

schalten des Chips die Versorgungsspannungen kontinuierlich auf Null gefahren werden und nach dem Anhängen über eine Rampe auf den Arbeitspunkt hochgesetzt werden. Schon die eingesetzte softwareseitige Erzeugung der Spannungsrampen für V_{GS} , V_{DS} und V_{BS} , die aufgrund der digitalen Ansteuerung immer noch kleine Spannungssprünge erzeugte, reichte aus um messbare Beeinflussungen des Neuro-Chip Kontakts durch die Spannungsflanke eines Einschaltimpulses zu verhindern.

Die Auswirkungen definierter Spannungsflanken

Die Reizpulse mit maximal 5 V hohen Spannungsflanken, die zur Stimulation von Aktionspotentialen gedacht sind, zeigen in einzelnen Fällen eine langfristige Manipulation der Kontaktmembran. Das Spektrum reicht von Elektroporation bis zur Veränderung der Eigenschaften der Ionenkanäle in der Kontaktmembran.

Wiederholte Reizungen bilden monophasische Kopplung aus Neuron 1 sitzt zentriert auf FET 4. Die Zelle zeigte nach dem Anstechen spontane Aktivität. Einschalteneffekte wurden durch die oben beschriebene, langsame Einstellung der Versorgungsspannungen verhindert. Die ersten Transistorsignale in Abbildung 7.23a), die die spontane Aktivität aufnehmen, sind so klein, dass nur über längere Zeit ein schwacher Zusammenhang zu erkennen ist. Um die Reizbarkeit zu testen, wurden mehrere Reizpulse mit $V_G < 5 V$ auf das Spotpaar 4 gegeben. Die Zelle ließ sich schon mit 3 Rechtecken reizen, doch der Transistor zeigte immer noch eine schwache Kopplung.

Während der Variation der Pulsparameter und dem Nachjustieren des Transistoroffsets versiegte die Reizbarkeit. So wurde die Zellvitalität über eine Strominjektion getestet, die ein Aktionspotential mit einem deutlicheren Kopplungssignal zur Folge hatte. Abbildung 7.23c). Nach weiteren Pulsvariationen konnte das Neuron wieder stimuliert werden. Der gleiche Zyklus folgte nochmal. Das Neuron war am Ende nicht mehr reizbar, doch das Transistorsignal war bis zu einer Höhe von 1,5 mV angewachsen.

Diese Messung zeigt, dass auch definierte Reizpulse ähnliche Auswirkungen haben können wie unkontrollierbare Einschaltimpulse. Es reichen unter bestimmten Umständen auch schon einzelne 5V-Flanken aus, um Kontaktmembranen zu perforieren. Die Steigerung der Transistoramplitude nach wiederholten Reizpulsen belegt zudem, dass sich die Wirkung einzelner Flanken in der Perforationswirkung addieren kann. Als Ausgangspunkt kann dabei offenbar auch ein Neuro-Chip Kontakt dienen, dessen Kopplung an den Chip so schwach ist, dass der Transistor noch

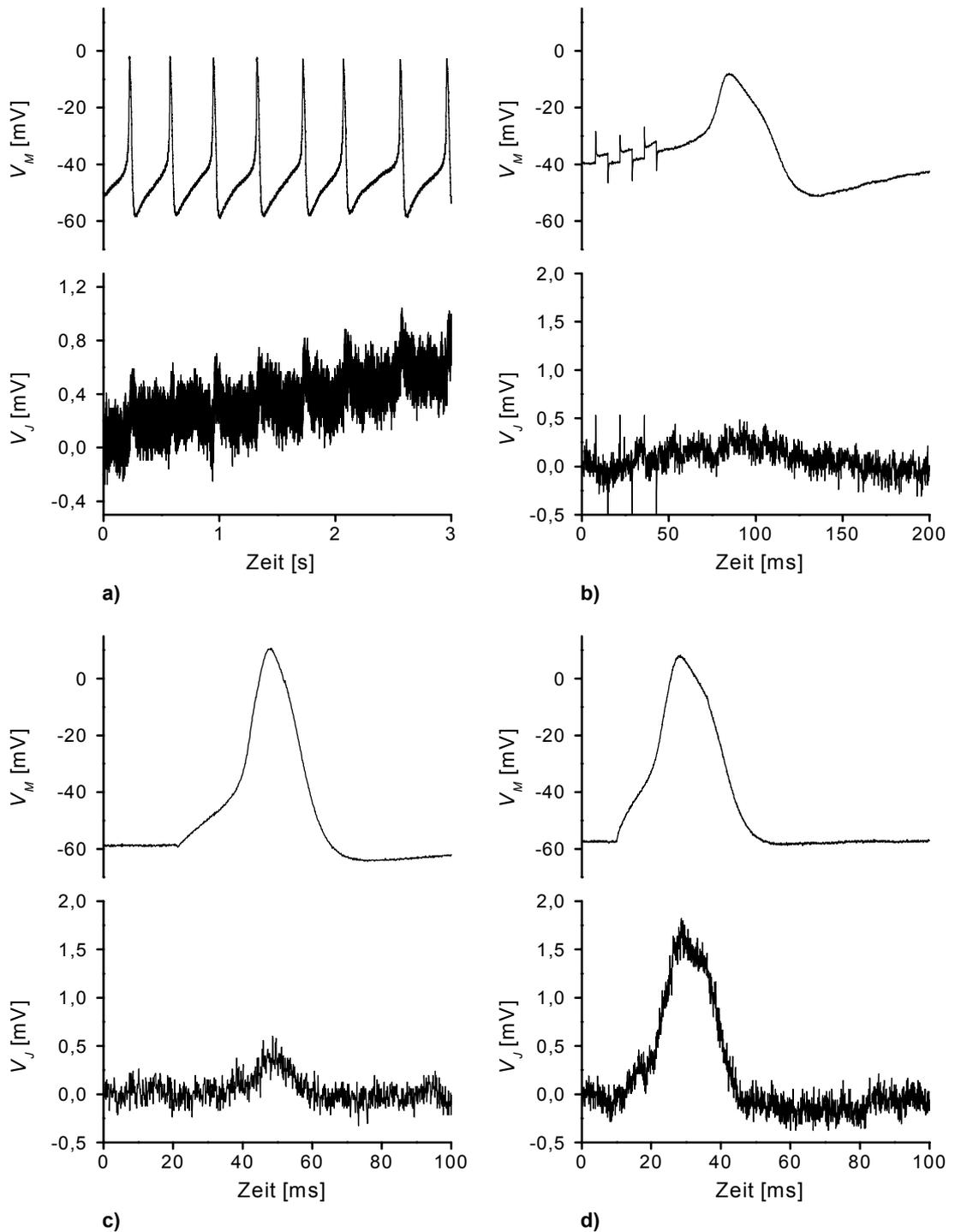


Abbildung 7.23: a) Spontane Aktivität im Neuron mit kaum erkennbarem Kopplungssignal im Transistor. b) Neuron läßt sich reizen, koppelt aber nicht. c) Nach mehrfachen Reizversuchen entsteht monophasisches Kopplungssignal im Transistor. d) Wiederholtes Reizen erhöht die Amplitude des Transistorsignals.

kein Signal sieht. Reizpulse sind also in der Lage einen funktionellen Neuro-Chip Kontakt zu schaffen.

Reizflanke deaktiviert sofort K-Kanäle

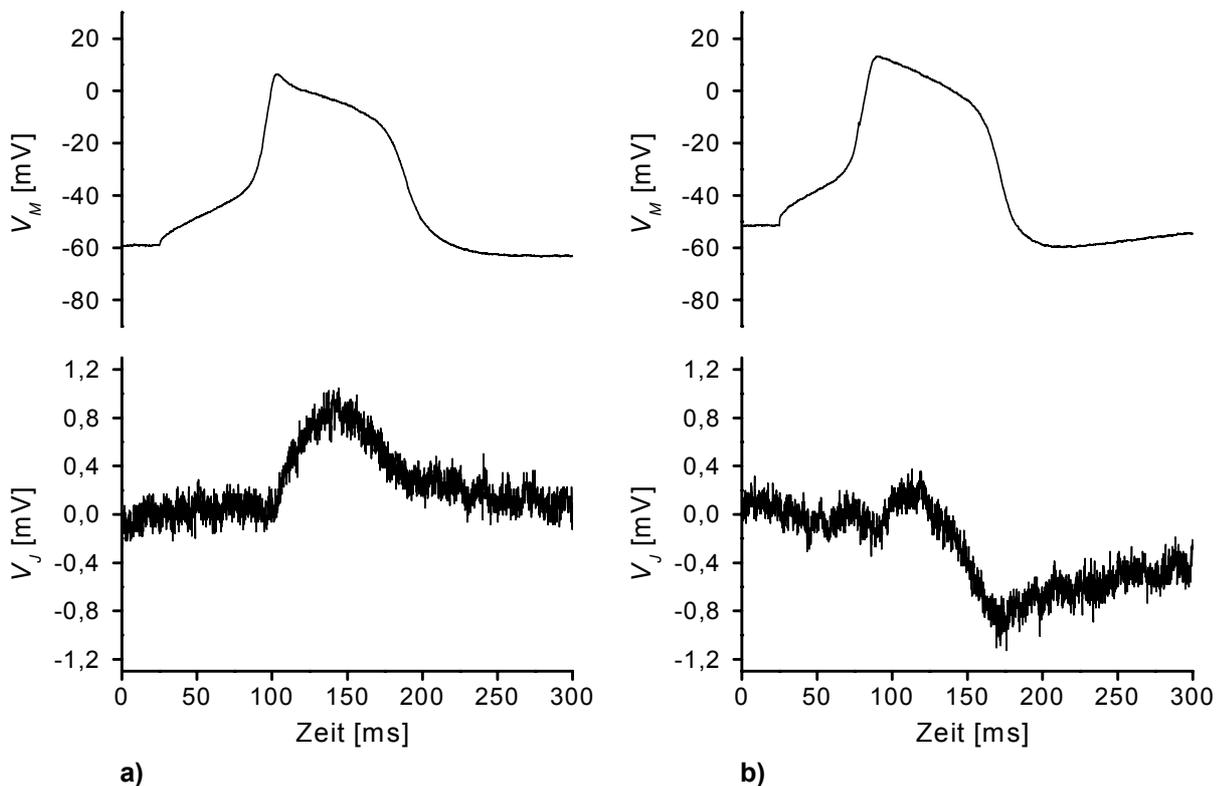


Abbildung 7.24: Einzelner Reizpuls deaktiviert K-Kanäle in der Kontaktmembran. Kopplungssignal a) vor dem ersten und b) direkt nach dem ersten Reizpuls.

Gleich nach dem Synapsentest zwischen Neuron 1 und Neuron 2 wurde die Kopplung von Neuron 2 auf FET 11 untersucht. Schon die ersten Aufnahmen zeigen eine homogene Verteilung von Na-Kanälen über die Gesamtmembran und eine leichte Anreicherung von K-Kanälen in der Kontaktmembran. Die Signalhöhe von 1mV in Abbildung 7.24a) gab Anlaß auf leichte Reizbarkeit zu hoffen. Doch eine einfache Reizstufe über 5V , einmal mit ansteigender, einmal mit abfallender Flanke, löste kein Aktionspotential aus.

Nach wenigen Versuchen mit Reizflanken zeigte die Überprüfung der Zellvitalität einen eindeutig veränderten Kopplungstyp. Der positive Hügel, der den K-Kanal-Überschuß in der Kontaktmembran anzeigt, hat sein Vorzeichen gewechselt, eine deutliche Na-Spitze ist nicht zu erkennen. Aus

der K-Kanal-Anreicherung der Kontaktmembran ist eine Verarmung geworden. Das Transistor-signal änderte sich nicht mehr in den weiteren Aufnahmen.

Die Reizpulse haben offenbar einen großen Teil der K-Kanäle in der Kontaktmembran zerstört beziehungsweise deaktiviert. Es fällt in diesem Zusammenhang wieder auf, dass der Einbruch des Transistors nur sehr langsam relaxiert.

In diesem Beispiel werden, im Gegensatz zum vorigen, die aktiven Eigenschaften der Kontaktmembran nicht vollkommen zerstört, sondern manipuliert. Das bedeutet, dass zwar einzelne Ionenkanäle deaktiviert sein können, aber immer noch eine spannungsabhängige Restaktivität in der Kontaktmembran vorhanden ist. Diese Veränderung konnte bei Einschaltpulsen nicht beobachtet werden.

Reizflanke deaktiviert schrittweise die Kontaktmembran Die ersten Kopplungen des Neurons, dessen Aktionspotentiale durch Strominjektion ausgelöst wurden, sind gekennzeichnet durch eine negative Na-Spitze, die Na-Kanal-Anreicherung in der Kontaktmembran anzeigt (Abbildung 7.25a)). Danach erscheint ein schwacher Hügel, der auf eine noch stärkere K-Kanal-Anreicherung hinweist. Im folgenden Reiztest ließ sich das Neuron schon im ersten Versuch mit einer 5V-Stufe stimulieren. Die Aktionspotentialspitze folgte mit 6 ms Verzögerung, so dass die ansteigende AP-Flanke, die durch den Na-Einstrom charakterisiert ist, fast vollständig erscheint.

Der Transistor hätte also wieder einen Na-Einbruch zeigen können, der jedoch schon bei der ersten Reizstufe verschwand. Nach dieser offenbar diskreten Änderung des Kopplungssignals, wie sie schon im vorherigen Beispiel dokumentiert wurde, zeigte das Transistorsignal mit jedem weiteren Reizpuls eine Veränderung. In den folgenden drei Anregungen der nächsten 40ms vergrößerte sich schrittweise die Latenzzeit des Aktionspotentials, wobei jedoch die Potentialform konstant blieb. Im Transistorsignal wurde die ansteigende Phase mit jedem Puls flacher. Am Ende der Messung bleibt nur noch der K-Hügel sichtbar.

Reversible Manipulation der Kontaktmembran

In einigen Messungen wurde entdeckt, dass mit Reizpulsen mehr als ein Aktionspotential ausgelöst werden konnte. Dies erhärtet die obige Vermutung, dass Spannungsflanken die Eigenschaften der Kontaktmembran langfristig verändern können.

Das Neuron war vor den ersten Pulsen spontan aktiv und koppelte. Nach dem Erlahmen der Aktivität wurde versucht über Reizspots Aktionspotentiale auszulösen. Die Abbildungen 7.26a)

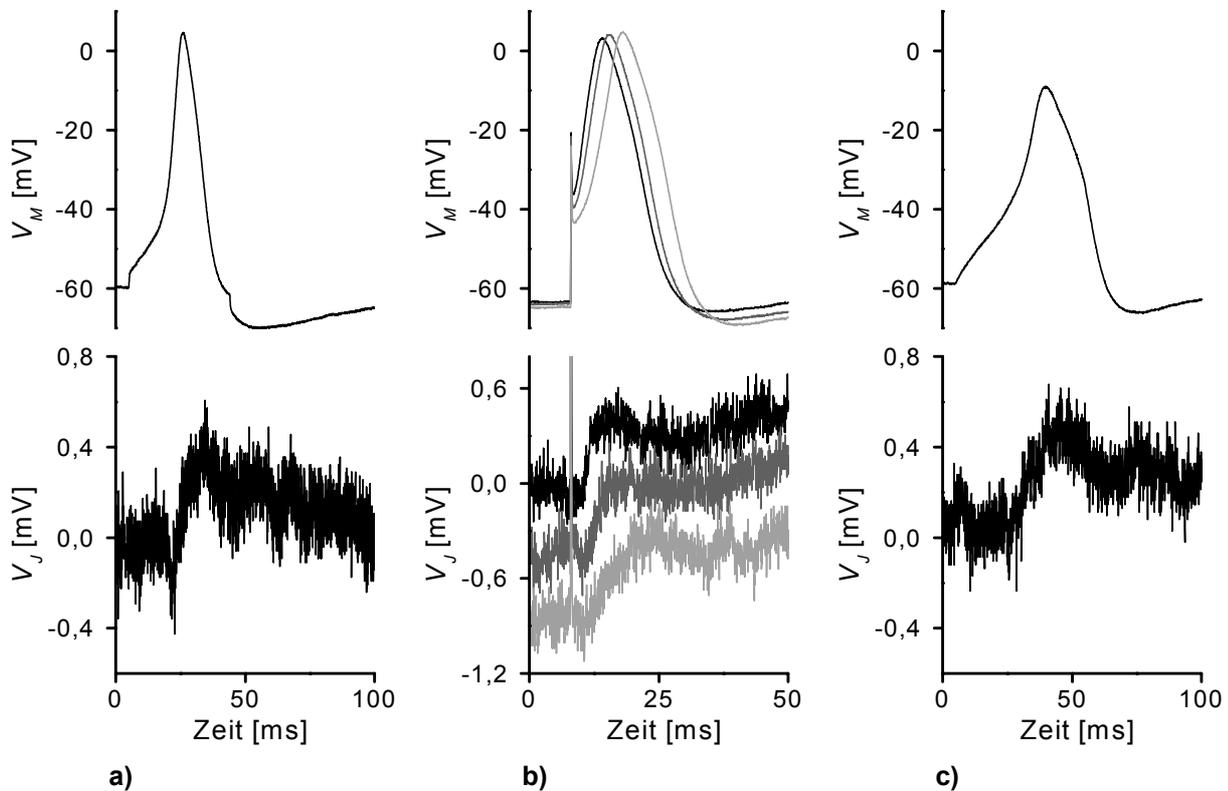


Abbildung 7.25: a) Leichte Na-Anreicherung in der Kontaktmembran vor dem ersten Reizpuls. b) Mehrere Reizpulse reduzieren den Na-Kanal-Anteil. c) Schwaches Transistorsignal nach Reizpulsen.

und b) zeigen eine Situation, in der nach vier Rechteckpulsen gleich zwei Kopplungssignale im Transistor zu sehen waren. Es wird davon ausgegangen, dass dafür zwei aufeinanderfolgende Aktionspotentiale verantwortlich waren. Das Neuron war nicht mit einer Mikroelektrode versehen, so dass das Signal des Transistors nur eingeschränkt interpretiert werden kann.

Abbildung 7.26b) zeigt nach wiederholten Reizpulsen ein ähnliches Bild. Die Spitze des Transistorsignals war nach mehreren Pulsen kleiner geworden. Gleichzeitig stellte sich eine länger anhaltende, spontane Aktivität ein.

Deshalb wurden die Reizpulse ausgesetzt und nur die spontane Aktivität aufgezeichnet. Während dieser Zeit stieg die Amplitude des Transistorsignals wieder an (Abbildung 7.26c) und d)). Dabei verschwand die spontane Aktivität allerdings, so dass eine neue Folge von Reizpulsen abgesetzt wurde, die das Neuron wieder zu spontaner Aktivität trieben. Dieser Zyklus konnte zwölfmal wiederholt werden.

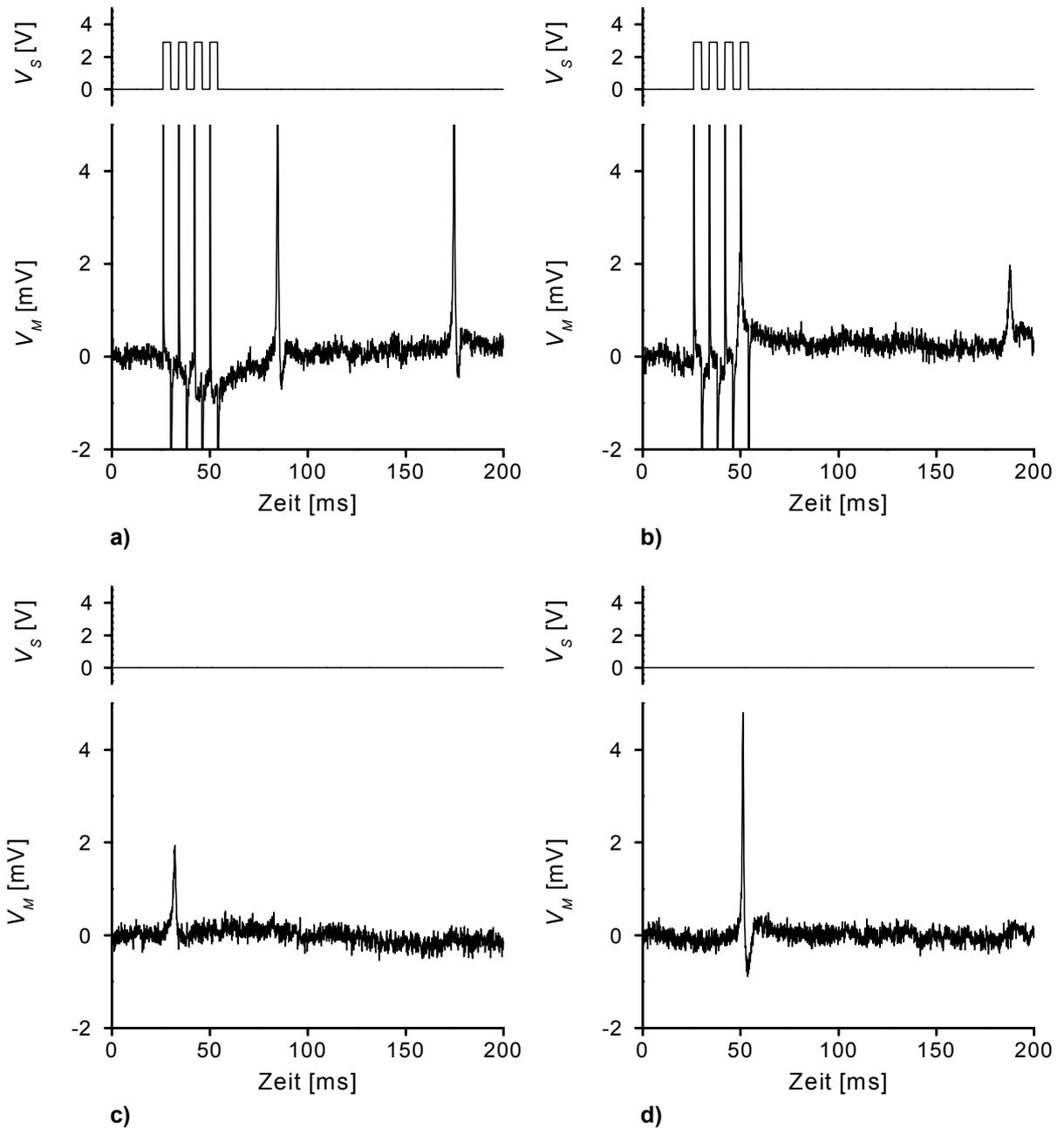


Abbildung 7.26: Reizmuster löst mehrere Aktionspotentiale aus. Die wiederholte Anwendung des Reizmusters verändert den Neuro-Chip-Kontakt. a) Erste und b) letzte Pulsfolge einer Reizserie. Feuerfrequenz und Höhe des FET-Signals sinken nach mehreren Anwendungen ab. Das inzwischen spontan feuernende Neuron zeigt eine Erholung des Neuro-Chip-Kontakts. Erstes c) und letztes d) Kopplungssignal. Die Amplitude des spontan feuernenden Neurons steigt an.

Neben der nachlassenden Feuerrate ist ein solcher Zyklus von dem starken Amplitudenabfall und -wiederanstieg gekennzeichnet. In Abbildung 7.27 stehen die Kreuze für die Höhe der Ampli-

tude eines FET-Signals, das nach einer Reizung aufgenommen wurde. Die gefüllten Kreise sind Kopplungsamplituden von Signalen, die in dem Zeitintervall ohne Reizung stattfanden.

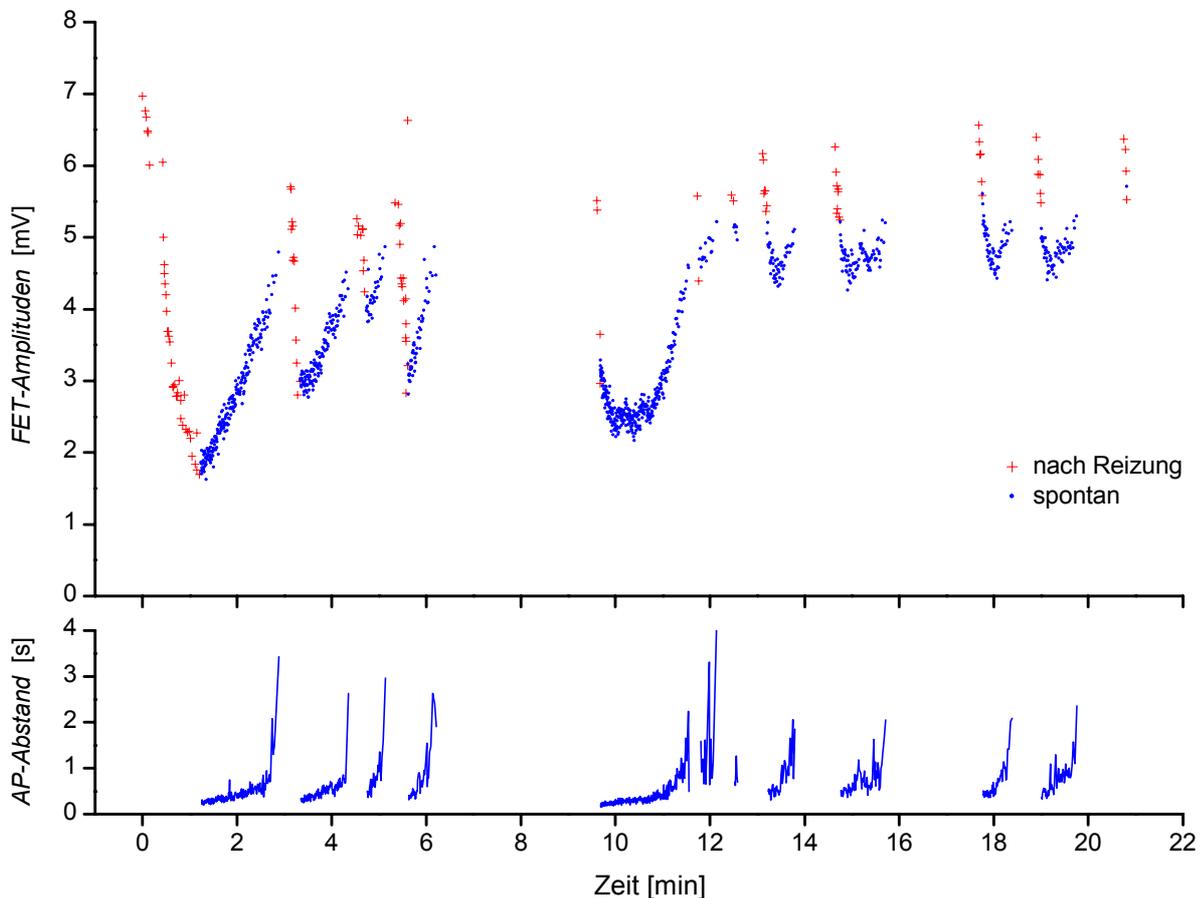


Abbildung 7.27: Reversible Manipulation einer Kontaktmembran mit Reizpulsen. Oben: Die Amplituden des FET-Signals während wiederholter Reizung sinken ab (Kreuze). Das nach der wiederholten Reizung frei feuernde Neuron zeigt eine ansteigende FET-Amplitude (Punkte). Unten: Abstand der Kopplungssignale des frei feuernden Neurons.

Die Messung ist in zwei Teile zu zerlegen. Die Zyklen in den ersten sechs Minuten zeigen, dass mit jedem Reizversuch die Amplitude des FETs absinkt, aber sofort, nachdem das Neuron ohne Reizeinfluss feuert, wieder ansteigt. Im zweiten Teil ab $t = 9 \text{ min}$ erreichten die FET-Amplituden erst nach einigen, ungepulsten Signalen ihr Minimum. Doch auch hier senkten die Reizpulse die Amplitude stetig ab, so dass sie sich erst ohne äußeren Einfluss wieder erholte. Dazwischen wurden die Reizparameter geändert, jedoch kein Aktionspotential ausgelöst.

Es scheint als hätten die Reizpulse Natrium-Kanäle aus einem inaktiven Zustand in einen aktiven versetzt. Dafür spricht direkt das Absinken der Na-Spitze nach wiederholten Pulsen. Mit einem

erhöhten Anteil aktiver Na-Kanäle ist das Neuron offenbar auch leichter stimulierbar, es feuert schneller. Über das wiederholte Erlahmen der spontanen Aktivität kann anhand der Daten nicht viel ausgesagt werden. Die Messung endet jedoch in einem Zustand, in dem das Neuron gar nicht mehr spontan feuert.

7.5.3 Langzeitverhalten

Schafft man es neuronales Gewebe für mehrere Tage in der Messkammer zu kultivieren, so stellt sich die Frage, wie gut sich die non-invasive Methode der Neuro-Chip-Kopplung eignet, über längere Zeit extrazellulär abzuleiten. Das ist zum einen die Frage ob die Bauart der Transistoren für längere Messzeiten geeignet ist, zum anderen ob die Kulturform Langzeitbeobachtungen zuläßt.

Situation

Es wurde ein Chip mit 0,76 Tage alten Neuronen ausgewählt. In der Messung wurde auf die Verwendung von Mikroelektroden vollkommen verzichtet. Deshalb wurde versucht die Zellen mit Reizspots zu stimulieren. Reizpulse mit unterschiedlicher Pulszahl, -höhe und -dauer, die auf Neuron 1 über Spot 10 gegeben wurden, zeigten am Transistorsignal keine erkennbaren Auswirkungen.

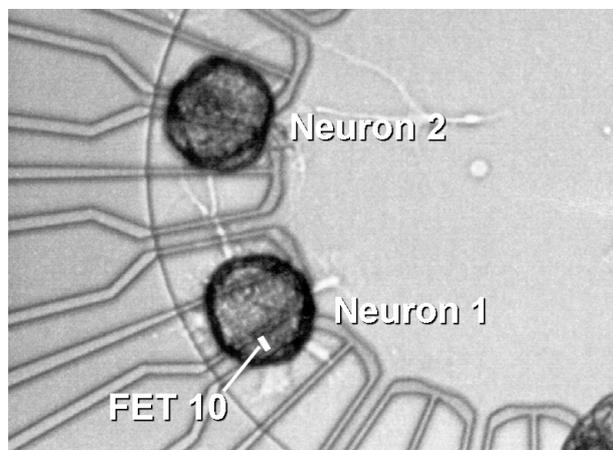


Abbildung 7.28: Die Situation auf dem Chip während der Langzeitmessung. Die Neurone waren erst 0,76 Tage in Kultur und zeigen eher flächenhaftes Wachstum.

Ähnlich wie im vorigen Abschnitt begann hier Neuron 1 nach den wiederholten Reizpulsen spontan zu feuern. Von da an wurde nur noch das Transistorsignal aufgezeichnet. Außer Korrekturen am Transistoroffset und der Verteilung auf mehrere Dateien lief die Messung eingriffsfrei ab. Nach 4,74 h wurde sie wegen mangelndem Speicherplatzes beendet.

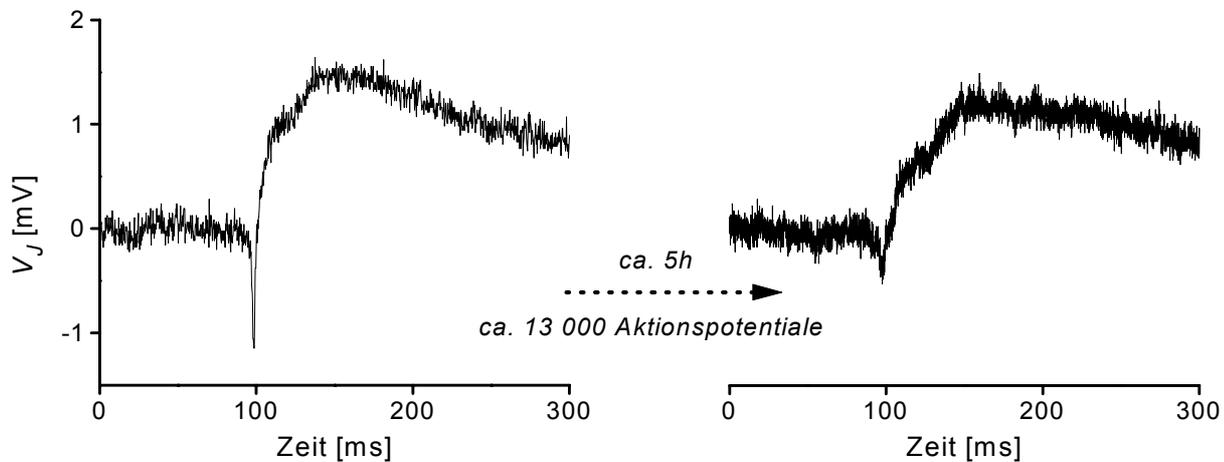


Abbildung 7.29: *Erstes und letztes Transistorsignal der Langzeitmessung. Die Veränderung des Gleichspannungsanteils ist bereits abgezogen. Nach ca. 5h hat sich der spitze Einbruch, der Na-Kanal-Anreicherung in der Kontaktmembran anzeigt, etwas zurückgebildet.*

Die Abbildung 7.29 zeigt eine der ersten und letzten Kopplungen eines Aktionspotentials. Im Transistorsignal erkennt man einen spitzen, scharfen Einbruch, dem ein sehr lang anhaltender, positiver Hügel folgt. Daraus lässt sich schließen, dass die Kontaktmembran stark mit Na-Kanälen und noch stärker mit K-Kanälen angereichert ist.

Die Signalform ändert sich nicht grundlegend. Am stärksten variieren Amplitude und Breite des Einbruchs. Zur Charakterisierung der Messung wurde deshalb die Entwicklung dieser negativen Spitze untersucht.

Auswertung

Die Messung besteht aus insgesamt 141689 aufeinanderfolgenden Einzelaufnahmen mit je 500 ms Länge, verteilt über 8 Dateien. Die Verarbeitung dieser großen Datenmenge wurde in zwei Schritten vollzogen. Im ersten wurden die negativen Spitzen gesucht und ihre zeitliche Lage festgehalten. Im zweiten Schritt wurde nur noch der Datenbereich um den Einbruch ausgewertet, der zur Bestimmung der gesuchten Parameter notwendig ist.

Einbrüche suchen Die Einbrüche können über einen Schwellwertalgorithmus gefunden werden. Am erfolgreichsten hat sich ein Algorithmus erwiesen, der die Daten in Blöcke einstellbarer Länge unterteilt, an ein Polynom 2. Ordnung fittet und das gefundene Minimum mit der gegebenen Mindestdiefe vergleicht. Ein Problem stellt die Angabe der Mindestdiefe für Situationen dar, in denen die Schwankung des Gleichspannungsanteils im Signal stärker ist als die Amplitude des Einbruchs. Ebenso kritisch sind die Situationen, in denen die Amplitude des Einbruchs in die

Nähe des Rauschens gerät. Am effizientesten war deshalb eine halbautomatische Anpassung von Mindesttiefe und Blockbreite während der Suche, mit der eine sehr hohe Trefferquote erreicht wurde.

Zum Vergleich einzelner Signale muss der Scheitelpunkt des Einbruchs genau bestimmt werden. Bedingt durch das Rauschen sitzt der kleinste Abtastpunkt des Signals nicht unbedingt in der Mitte des Einbruchs. Die vom Schwellwertalgorithmus gefundenen Einbrüche wurden deshalb auf einer anpassbaren Länge mit einer Gaußfunktion gefittet und deren Zentrum als exakter Zeitpunkt des Einbruchs definiert. Mit der Lage der Einbrüche kann schon der Verlauf der Feuerrate ausgewertet werden.

Parameter der Einbrüche ermitteln. Zur Charakterisierung der Einbrüche wurde jeder Einbruch erneut an eine Gaußkurve gefittet.

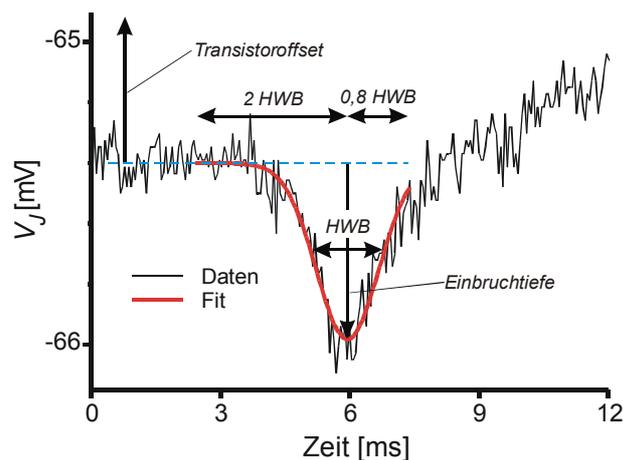


Abbildung 7.30: Um das Langzeitverhalten zu charakterisieren, wurde an den Signal-Einbruch eine Gauß-Funktion gefittet und die Veränderung der Parameter Transistoroffset, Halbwertsbreite (HWB) und Einbruchtiefe verfolgt.

Bestimmt wurde der mittlere Transistoroffset c_1 vor dem Einbruch, die Halbwertsbreite (HWB) c_4 und die Tiefe c_2 des Einbruchs.

$$f(t) = c_1 + c_2 e^{-\ln 2 \left(\frac{t-c_3}{0,5c_4} \right)^2}$$

Dazu wurden Daten aus einem Intervall der 2-fachen, geschätzten Halbwertsbreite vor dem Einbruch und der 0,8-fachen, geschätzten Halbwertsbreite nach dem Einbruch ausgewählt. Die geschätzte Halbwertsbreite wurde aus dem Mittelwert der letzten 100 Halbwertsbreiten errechnet. Startwert war 2 ms .

Diskussion

Die Abbildung 7.31 zeigt für jede gefundene Kopplung den zeitlichen Abstand zur letzten Kopplung und die oben beschriebenen Parameter des Einbruchs. Der Transistoroffset der ersten Signale wurde als Nullpunkt genommen.

Nicht erkannte Einbrüche Der Verlauf der Aktionspotential-Abstände zeigt besonders in der ersten halben Stunde linienförmige Punktwolken, die in ganzzahligem Vielfachen der Höhe der niedrigsten Anhäufung liegen. Diese Punkte sind Artefakte des Spitzensuchalgorithmuses, die darauf hinweisen, dass vor dieser Kopplung ein bis mehrere Kopplungen nicht erkannt wurden. Aussagekräftig ist deshalb nur die unterste Punkteschar.

Der Zustand des Neurons Neben diesen Sprüngen des mittleren Abstands fällt besonders ein Wechsel in der Regelmäßigkeit der Aktionspotentialfolge auf. Kommen die Aktionspotentiale in der erste halben Stunde mit einer Genauigkeit von $\pm 50 \text{ ms}$ so haben sie in der darauffolgenden Stunde nur noch eine Genauigkeit von $\pm 500 \text{ ms}$. Bemerkenswert ist der Zusammenhang zwischen längerem Pauslabstand und unregelmäßigem Feuern. Feuert das Neuron schneller, so scheint es auch regelmäßiger zu feuern.

Schließt man den Bereich zwischen $t = 30 \text{ min}$ und $t = 90 \text{ min}$ aus, so nimmt die Feuerrate des Neurons kontinuierlich ab und wird unregelmäßiger. Am Ende der Messung ab $t \approx 3,75 \text{ h}$ streut der Abstand der Aktionspotentiale so stark, dass eine mittlere Feuerrate nicht mehr erkennbar ist. Diese Situation ist von intrazellulären Ableitungen bekannt und kann als fortschreitende Ermüdung des Neurons interpretiert werden.

Stabile Kopplung Betrachtet man nur den Verlauf ab $t = 30 \text{ min}$, so scheinen die Kopplungsverhältnisse, also Tiefe und Breite des Einbruchs, von einer stetigen Entwicklung gekennzeichnet zu sein. Nach der ersten halben Stunde bis zum Ende der Messung wird der Einbruch geringer und breiter. Es wird vermutet, dass die langsame Ermüdung des Neurons sich nicht nur in der ansteigenden Feuerfrequenz, sondern auch in einem kleineren und breiteren Aktionspotential widerspiegelt.

Eine Ausnahme macht jedoch der Zeitraum in der ersten halben Stunde. Während dieser Periode feuert das Neuron sehr konstant und schnell. Der Einbruch im Transistorsignal wird jedoch, immer schwächer und breiter. Die Amplitude der Einbrüche liegt zwischen 15 min und 30 min so nah am Transistorrauschen, dass der Suchalgorithmus erhöhte Ausfälle zeigte. Bei so ungün-

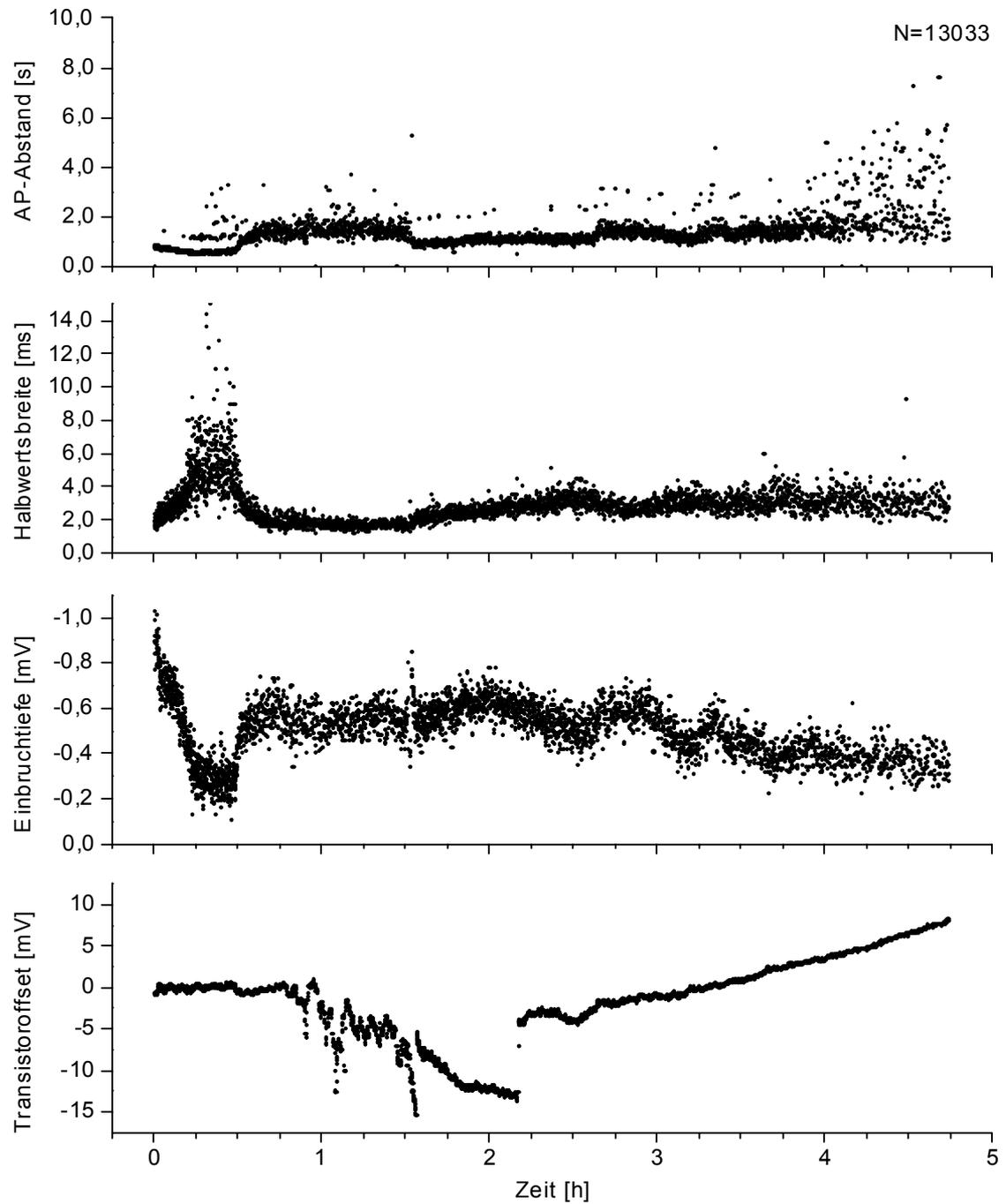


Abbildung 7.31: Langzeitverhalten einer aktiven Zelle, die über 13000 Aktionspotentiale in den Transistor eingekoppelte. (Dargestellte Punktzahl auf ca. 30% reduziert)

stigen Daten sind die ermittelten Halbwertsbreiten stark fehlerbehaftet. Es scheint als hätte die starke Anreicherung der Na-Kanäle in der Kontaktmembran während dieser Zeit vorübergehend abgenommen.

Transistorverhalten Der Transistoroffset gibt den Gleichspannungsanteil des Transistorsignals wieder und ist somit das Maß für das langfristige Driftverhalten des Transistors.

In der zweiten Messstunde wurde, wie an den spitzen Einbrüchen zu sehen ist, die Offsetspannung des Transistors mehrfach verändert. Während dieser Eingriffe gelangte Licht in das nicht vollständig abdeckbare System. Die Erhöhung des Transistorstroms I_{DS} durch den Photostrom erscheint als geringerer Gleichspannungsanteil nach der Strom-Spannungswandlung.

Abgesehen von den manuellen Eingriffen zeigt der Transistor einen leicht ansteigenden Gleichspannungsanteil, der von einem langfristig absinkenden Transistorstrom I_{DS} herrührt. Dieses Verhalten auf langen Zeiten zeigen auch Transistoren ohne Neuron. Ursache könnte der Einbau von Kationen in das dünne Gateoxid sein.

Fazit Die Messung belegt die grundsätzliche Haltbarkeit des Neuro-Chip-Kontakts über längere Zeit. Die Messung ist durch einen langfristig, gleichmäßigen Verlauf gekennzeichnet. Abrupte Änderungen der analysierten Parameter sind, soweit noch nachvollziehbar, auf Eingriffe von außen zurückzuführen.

Eine Drift des Transistoroffsets im einstelligen Millivoltbereich über 5 h ist als stabiles Verhalten einzuschätzen. Eine Veränderung der Steilheit, die sich durch diese Verschiebung des Arbeitspunkts ergibt, ist zu vernachlässigen und erfordert deshalb keine Neukalibrierung. Damit scheint der Chip für längere, extrazelluläre Ableitungen geeignet.

7.6 Synapsen

Neurone eines Netzwerks können über unterschiedliche Mechanismen elektrisch miteinander verbunden sein. Eine klassische Einteilung benutzt die Art und Weise des Transports der elektrischen Ladung zwischen dem Axon des präsynaptischen Neurons und dem Dendrit des postsynaptischen Neurons. Bei chemischen Synapsen transportieren Vesikel die Ladung über den synaptischen Spalt. In elektrischen Synapsen sind die prä- und postsynaptischen Membranflecken durch Poren elektrisch miteinander verbunden. Diese Proteine durchspannen die prä- und postsynaptische Membran und bilden einen Kanal, den Ionen in beide Richtungen durchqueren können.

Für einfache hybride Netze ist jedoch nicht der Mechanismus, sondern das elektrische Übertragungsverhalten der Synapsen ein Kriterium. Gewünscht sind exzitatorische Synapsen, bei denen präsynaptische Aktivität zu exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) führt. Bei inhibitorischen Synapsen (IPSP) hingegen behindert präsynaptische Aktivität eine vorhandene post-

synaptische Aktivität. Zum Nachweis einer synaptischen Übertragung mit inhibitorischen Synapsen ist postsynaptische Aktivität Voraussetzung, was im Vergleich zu exzitatorischen Synapsen eine zusätzliche, experimentelle Bedingung darstellt.

Aus der Struktur des Chipdesigns und der gewählten Zellkultur ist abzulesen, dass periphere Synapsen erwartet werden, jedoch nicht die einzig möglichen sind. Die gemessenen Soma-Soma-Synapsen haben ähnliche Funktionalität wie periphere Synapsen, zeigen unter Umständen jedoch eine zu schwache, zeitliche Trennung der prä- und postsynaptischen Potentiale.

Alle Modulationen des postsynaptischen Zellpotentials werden allgemein als postsynaptische Potentiale bezeichnet. Im Folgenden wird diese Bezeichnung übernommen, jedoch eine für hybride Netze wichtige Bezeichnung eingeführt.

7.6.1 Schwache, postsynaptische Potentiale

Die am häufigsten vorkommenden Synapsen zeigen als Antwort auf ein präsynaptisches Aktionspotential lediglich eine schwache Anhebung des postsynaptischen Zellpotentials im Bereich weniger Millivolt. Sie werden im Folgenden mit der Abkürzung SPSP (Schwache Postsynaptische Potentiale) versehen. Darunter sollen hier Modulationen des postsynaptischen Zellpotentials verstanden werden, die eindeutig synaptischen Ursprungs sind, aber keine vollen Aktionspotentiale darstellen.

Abbildung 7.32a) zeigt ein SPSP mit nur 3 mV Hub, dessen Maximum im abfallenden Bereich des präsynaptischen Aktionspotentials liegt. Der Anstieg startet zeitlich versetzt nach dem Einsatz der präsynaptischen Strominjektion. Die Halbwertsbreite des SPSPs liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie die des präsynaptischen Aktionspotentials. Eine vermutlich chemische Synapse ist in Abbildung 7.32b) zu sehen. Die beiden präsynaptischen Aktionspotentiale lösen zwei SPSP mit sehr langsamem Abfall aus, deren Amplitude sich zu ca. $3,5\text{ mV}$ addiert. Addition von postsynaptischen Potentialen ist eine Eigenschaft von chemischen Synapsen. Die Halbwertsbreite der einzelnen SPSPs liegt deutlich über der des präsynaptischen Aktionspotentials.

7.6.2 Postsynaptische Aktionspotentiale

Ist die synaptische Depolarisierung des postsynaptischen Neurons so stark, dass das Zellpotential über die Schwelle gehoben wird, so entsteht ein postsynaptisches Aktionspotential. Um diese wichtige Eigenschaft zu kennzeichnen, wird solch ein postsynaptisches Potential mit PSAP

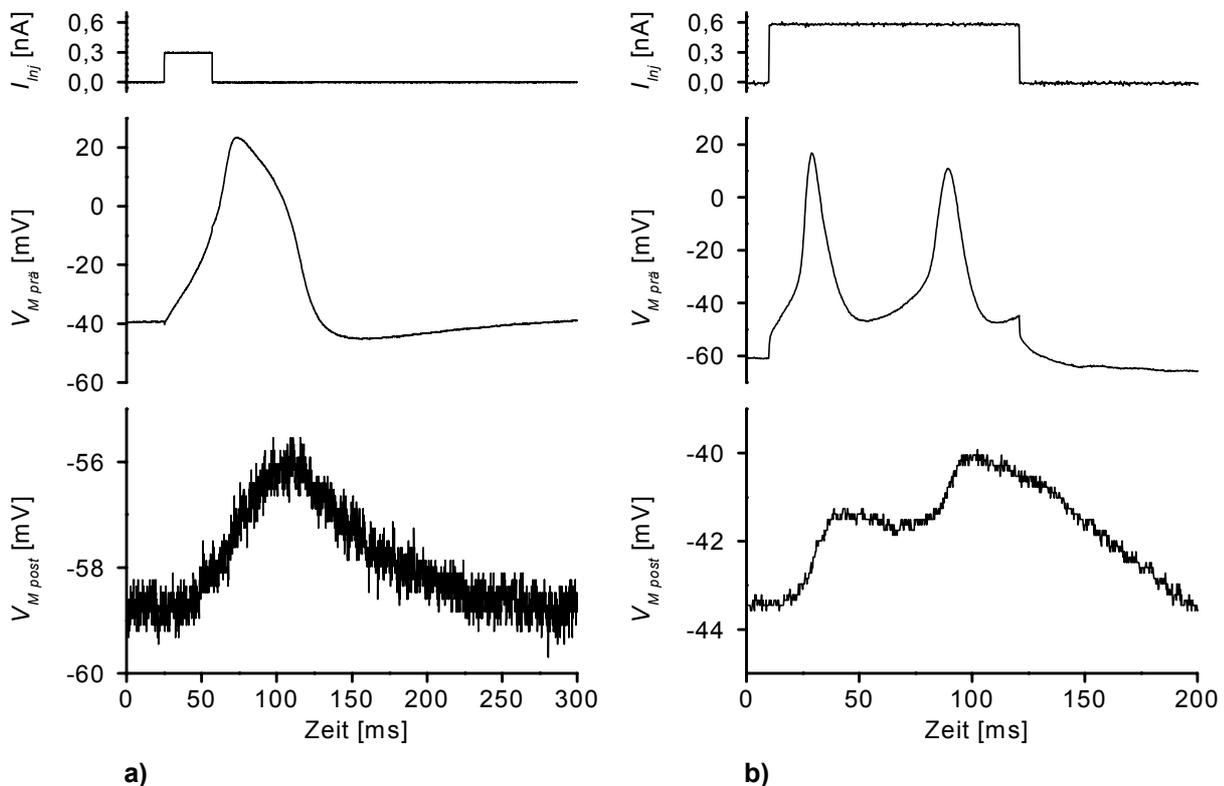


Abbildung 7.32: Häufig vorkommende, schwache, postsynaptische Potentiale (SPSP). a) Die Breite des SPSP deutet auf elektrische Übertragung hin. b) Die Addition der einzelnen postsynaptischen Antworten läßt eine chemische Synapse vermuten.

(Postsynaptisches Aktionspotential) abgekürzt. Wie beim einfachen SPSP muss auch hier gewährleistet sein, dass nur das präsynaptische Aktionspotential für das Entstehen des PSAPs verantwortlich ist.

In Abbildung 7.33a) wird das Zellpotential im postsynaptischen Neuron vom präsynaptischen Neuron während des präsynaptischen Aktionspotentials soweit angehoben, dass der Mechanismus des postsynaptischen Aktionspotentials ablaufen kann. Die ansteigende Flanke des PSAPs kommt zu einer Zeit, zu der sich das präsynaptische Aktionspotential wieder dem Ruhepotential nähert und der Strominjektionspuls schon längst wieder beendet ist.

Der präsynaptische AP-Burst wird in Abbildung 7.33b) vollständig in das postsynaptische Neuron als Folge von PSAPs übertragen. Der Abstand zwischen prä- und postsynaptischem Aktionspotential ist bei allen 5 Paaren sehr konstant und beträgt $35,1 \pm 1 \text{ ms}$. Die abnehmende Feuerrate des präsynaptischen Neurons wird also vollständig abgebildet. Der postsynaptische Potential-

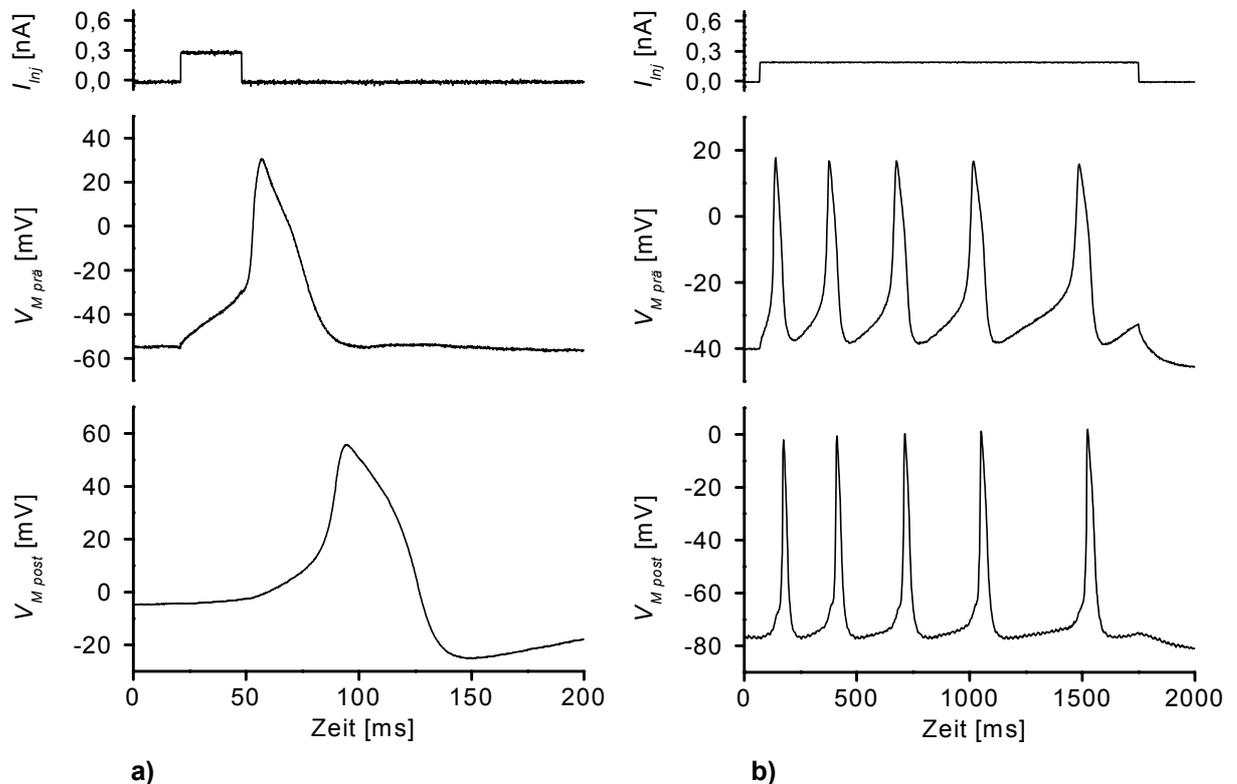


Abbildung 7.33: Starke Synapsen können postsynaptische Aktionspotentiale (PSAPs) auslösen. a) Synaptische Übertragung eines einzelnen Aktionspotentials b) Vollständige, synaptische Übertragung eines Bursts von Aktionspotentialen.

knick bei 1750 ms deutet jedoch auf einen starken Einfluss der präsynaptischen Strominjektion auf die postsynaptische Zelle hin.

Ausbeuten

Als zentrales Element hybrider Netze muss nach der Übertragungsstärke von Synapsen gefragt werden. Wie noch zu zeigen, ist die Häufigkeit von PSAPs für ein erfolgreiches Netz entscheidend.

Von den 48 vollständig vermessenen Neuronenpaaren wurde das synaptische Übertragungsverhältnis in beide Richtungen bestimmt, indem der Quotient aus post- und präsynaptischer Potentialamplitude gebildet wurde. Die Potentialamplitude ist die Differenz von Potentialmaximum zum direkt vorher herrschenden Ruhepotential. Bis auf eine Ausnahme, in der im präsynaptischen Neuron kein Aktionspotential ausgelöst werden konnte, wurden alle Synapsen mit Aktionspotentialen auf präsynaptischer Seite angeregt. Die Anregung mit Aktionspotentialen entspricht der Situation in einem hybriden Netz. Die Einordnung starker, postsynaptischer Potentiale in die

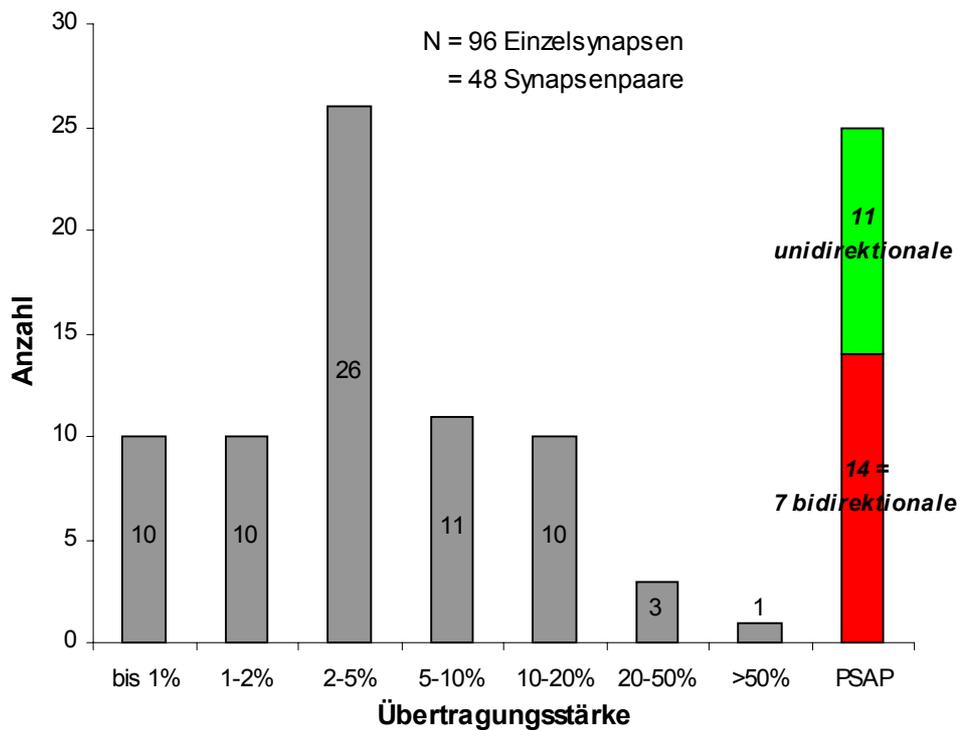


Abbildung 7.34: Die Verteilung der Synapsenstärken belegt, daß sich Synapsen in Bezug auf ihre Funktion im hybriden Netz gut in die zwei Kategorien der SPSPs (Balken <50%) und der PSAPs (rechter Balken) einteilen lassen.

Gruppe der PSAPs wurde nach Augenschein vorgenommen. Abbildung 7.34 zeigt die Häufigkeit bestimmter Synapsenstärken in Abhängigkeit der Übertragungsstärke. Sehr schwache Synapsen, bei denen kein postsynaptisches Potential erkennbar war, wurden zu den Synapsen mit einer Übertragungsstärke <1% eingruppiert.

Es zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit unter den gegebenen Bedingungen ein Neuronenpaar mit postsynaptischer Auslösung eines Aktionspotentials zu finden, bei ungefähr 25% liegt. Erwartet man, dass diese Übertragung in beide Richtungen stattfindet, so verringert sich die Wahrscheinlichkeit auf ungefähr 14%.

Am häufigsten sind SPSP mit einem Übertragungsverhältnis um 5%. Das bedeutet bei typischen, präsynaptischen Aktionspotentialamplituden von 70 mV einen postsynaptischen Hub von 3,5 mV. Derart geringe Änderungen des Zellpotentials können im Moment mit Feldeffekttransistoren nicht detektiert werden.

Die geringe Zahl der SPSP mit Amplituden über 20% spiegelt das Schwellwertverhalten der Neurone wieder. SPSP, deren Amplitude den Schwellwert für ein Aktionspotential überschreiten, werden zu PSAP.

7.6.3 Durchgriff der präsynaptischen Strominjektion

Kausalität

Neben der guten Erkennbarkeit eines postsynaptischen Potentials muss eine Synapse in einem hybriden Netz noch eine weitere Eigenschaft erfüllen: Seine Ursache darf ausschließlich das präsynaptische Aktionspotential sein. Als erstes muss sichergestellt sein, dass das postsynaptische Neuron nicht schon spontan aktiv ist. Es darf auch keine dritte Zelle die postsynaptische Aktivität auslösen oder begünstigen. Wird die präsynaptische Zelle mit Strom oder Reizpulsen zum Aktionspotential getrieben, so muss sichergestellt sein, dass weder Strom- noch Reizpulse das postsynaptische Neuron direkt stimulieren. Besonders bei präsynaptischen Strominjektionen ist die Isolation des Beitrags des Injektionsstroms nicht einfach.

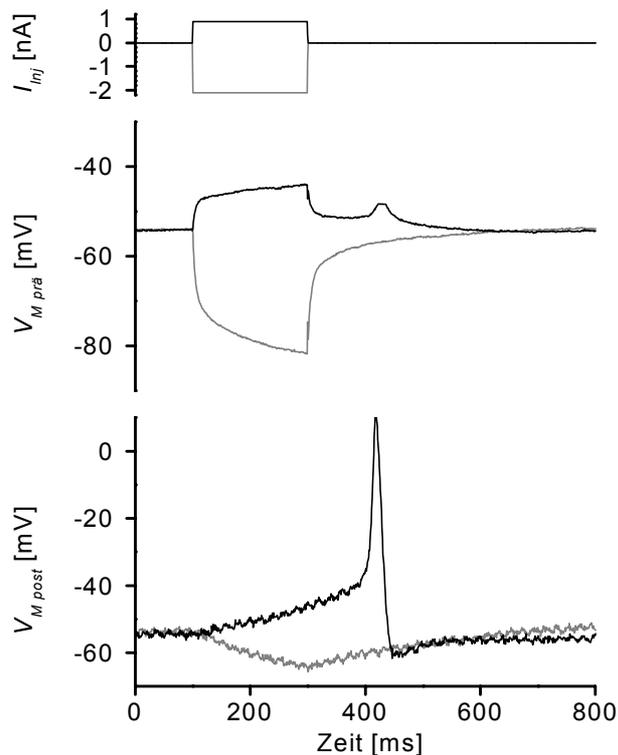


Abbildung 7.35: Präsynaptische Strominjektion löst nur in postsynaptischem Neuron ein Aktionspotential aus.

Unter besonderen Bedingungen kann der Einfluss jedoch klar sichtbar werden. Unterscheiden sich die Schwellenspannungen, also die Erregbarkeit, von prä- und postsynaptischem Neuron stark, so kann die Wirkung des durch die elektrische Synapse fließenden Injektionsstroms direkt beobachtet werden. Einen Spezialfall zeigt Abbildung 7.35, in dem das präsynaptische Neuron nicht durch einen Strompuls zu einem Aktionspotential veranlasst werden konnte.

Im postsynaptischen Neuron führte der über die Synapse fließende Teil des Injektionsstroms zur Aufladung des Neurons und schließlich zu einem Aktionspotential, welches sogar rückwirkend noch im präsynaptischen Neuron ein SPSP hervorrief. Der elektrische Charakter der Synapse wurde mit einem starken, hyperpolarisierenden Strompuls überprüft, der neben der starken, passiven Antwort im präsynaptischen Neuron eine passive Antwort im postsynaptischen Neuron ergab.

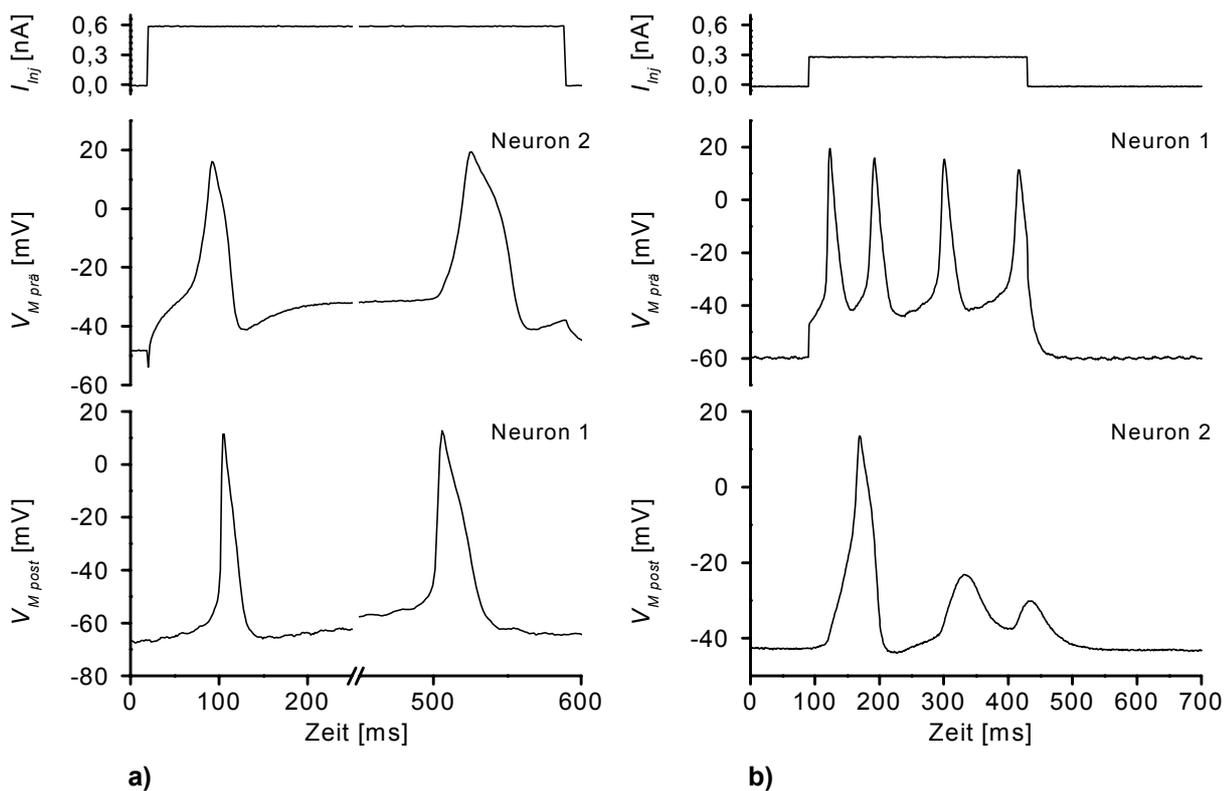


Abbildung 7.36: a) Wechsel der synaptischen Reihenfolge. b) Eigenschaften der Synapse in Gegenrichtung.

Auch bei einem aktiven, präsynaptischen Neuron kann der präsynaptisch injizierte Strom deutliche Folgen haben. Der Injektionsstrom in Abbildung 7.36a) erzeugt wie erwartet in Neuron 2 ein präsynaptisches Aktionspotential, gefolgt von einem PSAP in Neuron 1. Da das präsynaptische

Neuron nur schlecht stimulierbar war, wurde ein starker Strompuls mit $0,6 \text{ nA}$ eingesetzt. Zwischen den beiden präsynaptischen Aktionspotentialen bleibt das präsynaptische Potential konstant, das postsynaptische steigt jedoch an und führt zu einem Aktionspotential in Neuron 1, das nun auf der vormals präsynaptischen Seite in Neuron 2 ein PSAP nach sich zieht. Begünstigend für das PSAP in Neuron 2 wirkt zu diesem Zeitpunkt natürlich der noch immer injizierte Strom.

Die Synapse von Neuron 1 nach Neuron 2 wurde noch einmal getrennt vermessen. In Abbildung 7.36b) zeigt sich auf postsynaptischer Seite wieder die schlechte Erregbarkeit von Neuron 2. Auf vier präsynaptische Aktionspotentiale folgt nur nach dem ersten ein PSAP. Das zweite präsynaptische Aktionspotential fällt in die Refraktärzeit des PSAPs, den beiden letzten Aktionspotentialen folgen nur noch von SPSPs.

In den letzten Beispielen waren die Strompulse so lang, dass sie die Dauer der prä- und postsynaptischen Aktionspotentiale überdeckten. Die Länge der Strominjektion lässt sich jedoch soweit verkürzen, dass der Puls gerade so lange dauert, bis das präsynaptische Neuron über die Schwelle gehoben wird und dann allein die Kanaldynamik die Potentialdifferenz erzeugt, die den synaptischen Strom treibt.

In Abbildung 7.37a) sind in einer Aufnahme nochmal beide Situationen zu sehen. Das erste präsynaptische Aktionspotential und sein dazugehöriges PSAP laufen vollständig während der präsynaptischen Strominjektion ab. Der Injektionsstrom dauert sogar so lange, dass ein zweites präsynaptisches Aktionspotential gestartet wird. Der Strompuls endet jedoch noch vor der ansteigenden Flanke dieses Potentials, das ebenso wie das erste präsynaptische Aktionspotential ein PSAP auslöst. Im Unterschied zum ersten PSAP läuft dieses jedoch ohne direkten Einfluss des präsynaptischen Injektionsstroms ab. Der Knick im postsynaptischen Potential bei 162 ms , der den Start der postsynaptischen Aufladung kennzeichnet, findet 10 ms nach dem Ende der präsynaptischen Strominjektion bei 152 ms statt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der steile Potentialanstieg des zweiten, präsynaptischen Aktionspotentials die alleinige Ursache für das zweite PSAP ist.

Die fast injektionsstromfreie Übertragung eines Aktionspotentials ist in Abbildung 7.37b) gezeigt, in der die Latenzzeit des präsynaptischen Aktionspotentials den Einfluss des Injektionsstroms und des präsynaptischen Aktionspotentials zeitlich gut trennt. Der präsynaptische Strompuls hebt das postsynaptische Potential um 3 mV , was allein nicht reichen würde um ein Aktionspotential auszulösen. Erst mit dem steilen, präsynaptischen Potentialanstieg wird das postsynaptische Neuron über die Schwelle zum PSAP getrieben.

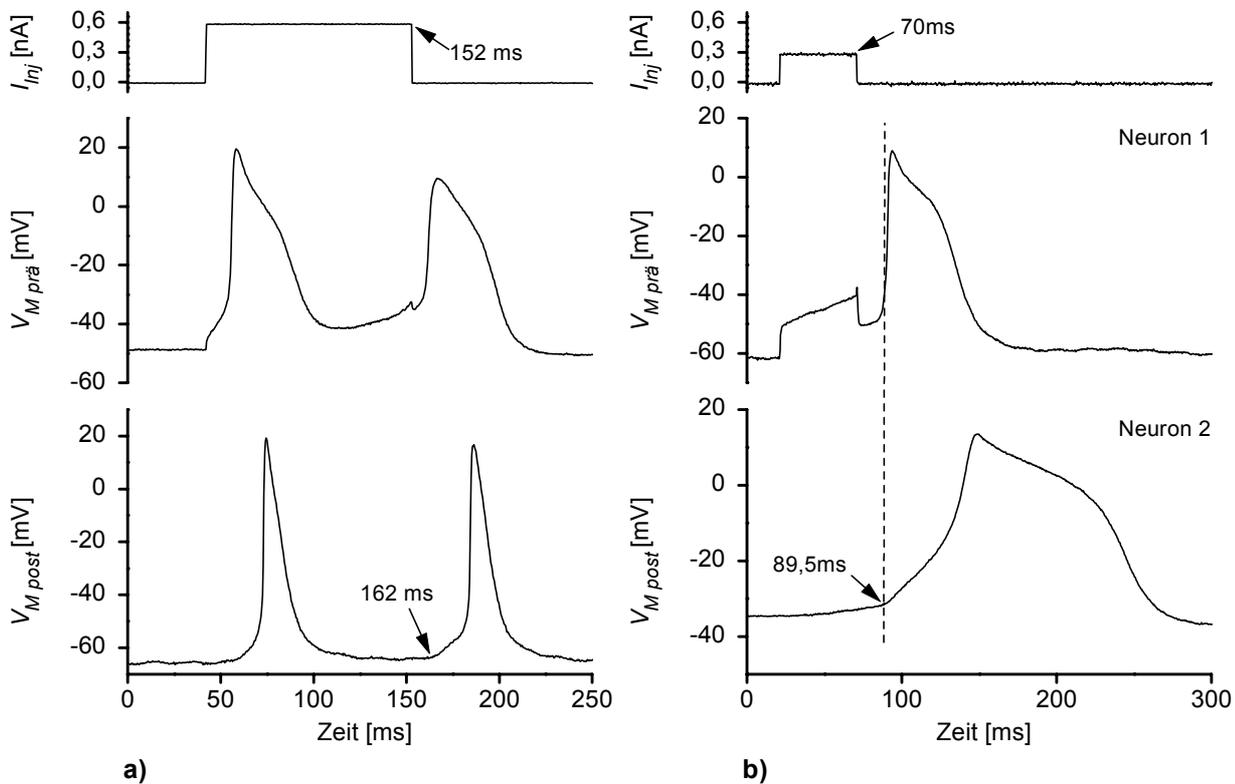


Abbildung 7.37: a) PSAP mit und ohne Stromeeinfluss b) PSAP ohne Stromeeinfluss

7.6.4 Dritte Neurone

Um die Zahl der Reizspots und der Transistoren auf dem Chip bestens zu nutzen, wurden mehrere Neurone gleichzeitig auf dem Chip kultiviert. Da die Form des Neuritenwachstums nicht kontrolliert wurde, konnte auch nicht sichergestellt werden, dass die Neurone nur paarweise synaptische Verbindungen eingehen. So entstanden häufig Netze mit mehr als zwei beteiligten Neuronen.

Die Abbildung 7.38 zeigt, wie ein drittes Neuron beim Ausmessen eines Synapsenpaares in Erscheinung treten kann. Das präsynaptische Neuron feuerte spontan und löste im postsynaptischen Neuron SPSPs aus. Zwischen diesen SPSPs sind jedoch größere SPSPs zu erkennen, die zeitlich nicht mit dem präsynaptischen Neuron korrelieren. Betrachtet man die Anordnung der Neurone, so erkennt man, dass direkt zwischen dem vermessenen Neuron noch ein weiteres Neuron liegt. Insgesamt sind noch drei weitere Neurone mit dem vermessenen, postsynaptischen Neuron verbunden.

Eine ähnliche Situation ist auch in Abbildung 7.39 zu sehen. Hier wurde das präsynaptische Neuron wiederholt stimuliert. Das postsynaptische Neuron antwortet mit einem SPSP, das in zeitlich

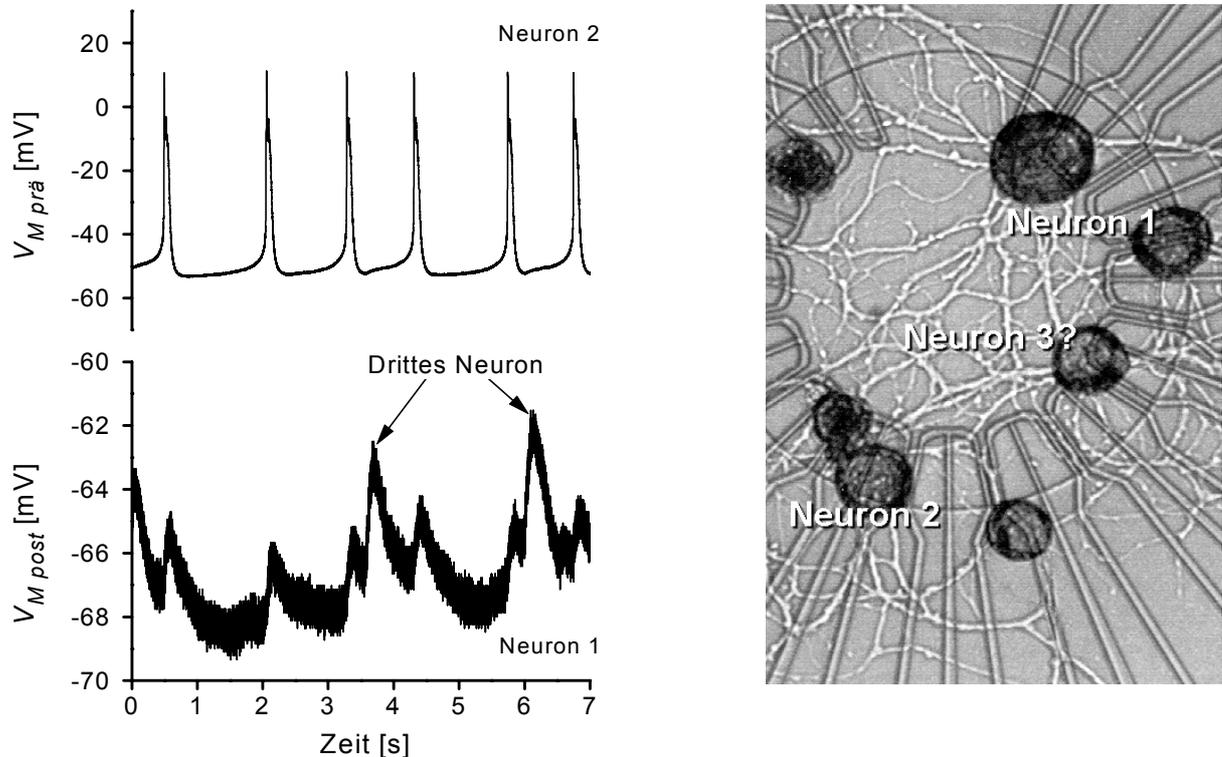


Abbildung 7.38: Neuronales Netz mit mehreren spontan feuernenden Neuronen. Nur zwei Neurone konnten angestoßen werden. Die postsynaptischen Potentiale eines dritten, spontan aktiven Neurons können anhand des zeitlichen Bezugs getrennt werden.

konstantem Abstand folgt. Danach erscheinen weitere SPSPs, die keinen festen, zeitlichen Bezug zum präsynaptischen Aktionspotential haben. Der Unterschied in der zeitlichen Korrelation und die Situation der beiden Neurone im Netz lassen auf ein drittes Neuron als Ursache der zweiten SPSPs schließen.

Ohne direkte Ableitung aller morphologisch miteinander verbundenen Neurone kann nicht restlos das Verhalten des vollständigen Netzwerks bestimmt werden. Der Auslöser eines postsynaptischen Potentials ist in einem solchen Fall nicht eindeutig.

7.6.5 Spontan feuernende Neurone

Spontane Aktivität von Neuronen, wie sie in Langzeitmessungen günstig ist um den Neuro-Chip-Kontakt zu studieren, erweist sich in einem Zwei-Neurone-Netzwerk als eher hinderlich. Dort hat jedes Neuron eine vorbestimmte Aktivitätsquelle. So soll das präsynaptische Neuron nur durch

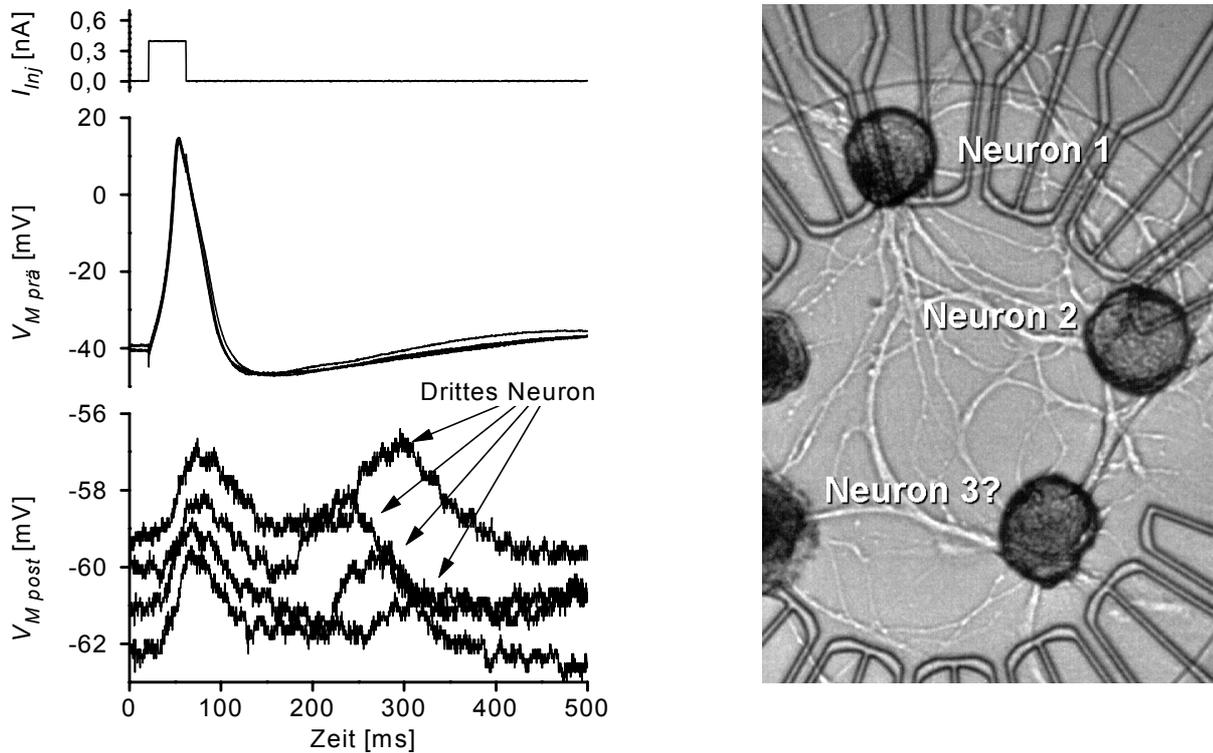


Abbildung 7.39: Beim Vermessen eines Neuronpaares wird über das präsynaptische Neuron noch ein drittes Neuron angeregt, dessen postsynaptische Potentiale mit denen des stimulierten, präsynaptischen Neurons zeitlich korrelieren.

den darunterliegenden Reizspot aktiviert werden, und das postsynaptische Neuron darf nur dann Aktivität zeigen, wenn das präsynaptische Neuron feuert.

Um klare Aussagen über die Kausalität der Übertragung in hybriden Netzen treffen zu können, sind deshalb auch Aufzeichnungen über die Aktivität des nicht stimulierten Netzes sehr wichtig.

Spontane postsynaptische Aktivität Die Messung in Abbildung 7.40a) zeigt die Antwort eines postsynaptischen Neurons auf fast identische präsynaptische Anregung mit drei Aktionspotentialen. Die Antworten mit den durchgezogenen Linien lassen sich auf den Einfluss der präsynaptischen Aktivität zurückführen. Das postsynaptische Potential ist vorher auf einem konstanten Wert und der Start der postsynaptischen Aufladung liegt nach dem Beginn der präsynaptischen Aktivität. Die gestrichelten Linie, die nur 6s vorher aufgenommen wurde, zeigt jedoch spontane, postsynaptische Aktionspotentiale, die bei zu kleinem Zeitfenster auch als PSAPs fehlinterpretiert werden könnten.

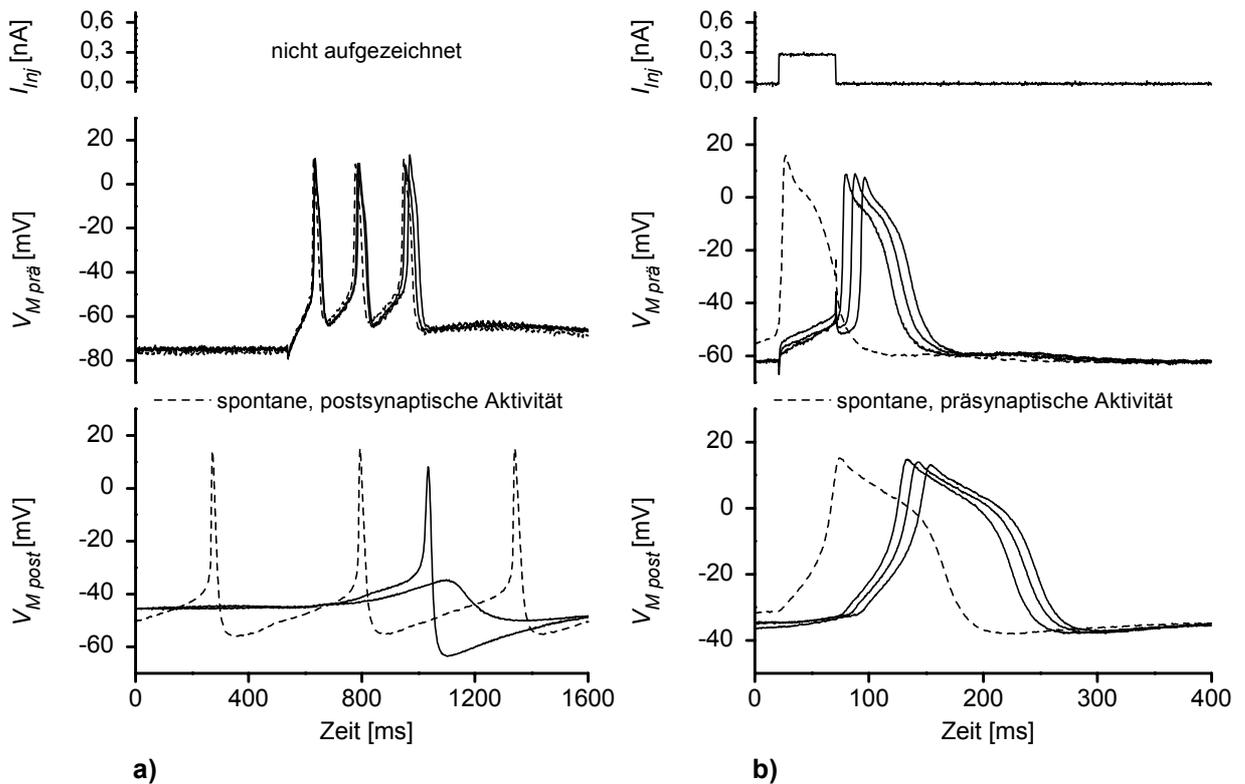


Abbildung 7.40: a) Spontane postsynaptische Aktivität b) Spontane präsynaptische Aktivität

Spontane präsynaptische Aktivität Analog zur obigen Diskussion besteht auf präsynaptischer Seite das Problem, die Ursache für das präsynaptische Aktionspotential klar auszumachen. Abbildung 7.40b) zeigt, wie zu unterschiedlichen Zeitpunkten des spontanen, synaptischen Zyklusses auf präsynaptischer Seite versucht wurde Aktionspotentiale auszulösen. Die gestrichelte Kurve zeigt ein präsynaptisches Aktionspotential, dessen Anstiegsflanke zwar kurz nach der Einschaltflanke des Strompulses von erhöhtem Ruhepotential aus startet und theoretisch auf den Strompuls zurückzuführen wäre. Diese sehr kurze Latenzzeit war jedoch nicht typisch für die Stimulierbarkeit dieses Neurons. Das zeigen die Spuren der durchgezogenen Kurven mit deutlich sichtbarer, strombedingter Aufladekurve.

7.7 Hybride Wege

Betrachtet man ein Zwei-Neuronen-System mit bidirektionaler Synapse, das mit beiden Neuronen bidirektional an den Chip angeschlossen ist, so ergeben sich eine Fülle theoretisch denkbarer Übertragungswege, auf denen Ereignisse zwischen den Neuronen und dem Chip hin- und herlaufen können.

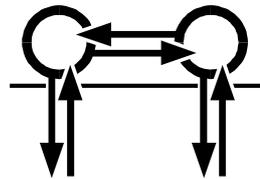


Abbildung 7.41: Mögliche Übertragungswege der bidirektionalen Schnittstellen eines hybriden Zwei-Neuronen-Netzwerks.

Als erstes werden all die Kombinationen vorgestellt, die zwei Eigenschaften aufweisen: Das Ereignis muss einmal eine Synapse und einmal die Neuro-Chip-Schnittstelle passieren. Auf diesen elementaren Übertragungswegen basieren die später gezeigten, kombinierten Wege und letztendlich auch die vollständigen Wege.

7.7.1 Die elementaren Wege

Ein ideales Zwei-Neuronen-System ist spiegelbildlich um seine Synapse. Das heißt, dass die Neurone nur in ihrer Eigenschaft als prä- und postsynaptische Zelle eingestuft werden müssen. Naheliegende Kombinationen sind deshalb zum einen die, in denen das präsynaptische Neuron gereizt wird (Abbildung 7.42c)), und zum anderen die, in denen das postsynaptische Neuron koppelt (Abbildung 7.42b)). Von den beiden anderen Situationen bleibt zur eindeutigen Signalübertragung nur noch die, in der das präsynaptische Neuron sein Signal in den Transistor einkoppelt (Abbildung 7.42a)). Im anderen Fall kann die Ursache für das Aktionspotential nicht eindeutig angegeben werden. Interessant wird die Situation (Abbildung 7.42d)) jedoch, wenn es gelingen könnte mit Reizpulsen den Zustand der Synapse oder des postsynaptischen Neurons gezielt zu beeinflussen.

Kopplung-Synapse

Ein präsynaptisches Neuron, das sein Aktionspotential durch die Synapse zum zweiten Neuron schickt und gleichzeitig koppelt, muss, wenn es nicht schon spontan aktiv ist, mit einer Mikroelektrode stimuliert werden.

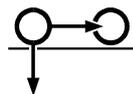


Abb 7.43 zeigt eine Messung, mit optimalem Verlauf. Das präsynaptische Aktionspotential von Neuron 1 koppelt klar in den Transistor ein und Neuron 2 antwortet mit einem postsynaptischen Aktionspotential. Der Kopplungstyp beruht auf K-Kanal-Anreicherung in der Kontaktmembran.

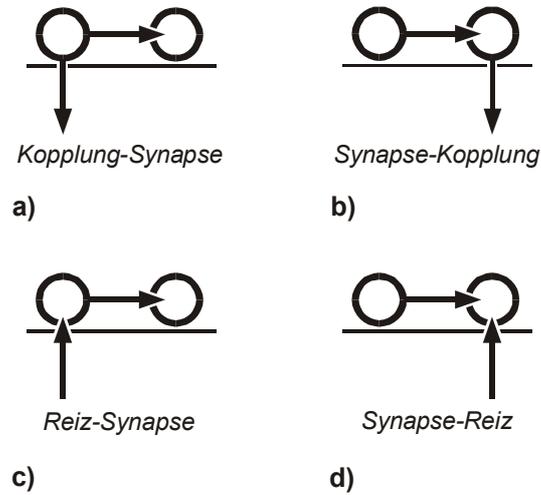


Abbildung 7.42: Übersicht über die elementaren Wege eines hybriden Netzes, in denen jeweils einmal die Neuron-Neuron-Schnittstelle und einmal die Neuron-Chip-Schnittstelle durchlaufen wird.

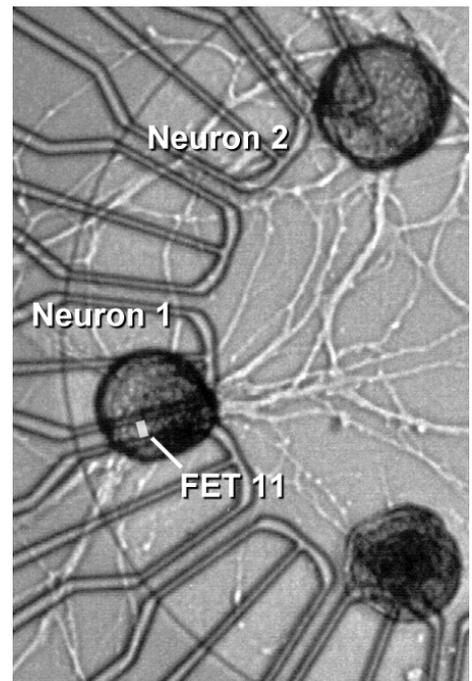
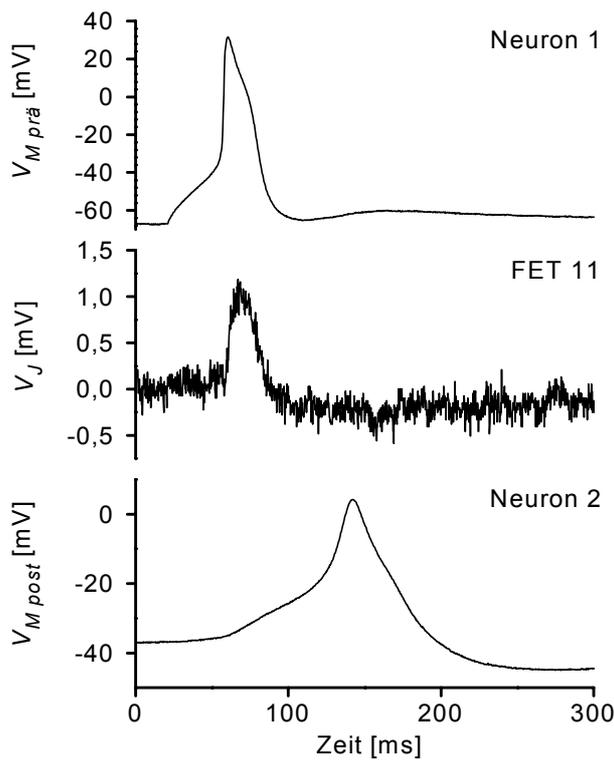


Abbildung 7.43: Situation Kopplung-Synapse: Neuron 1 wurde mit einem Strompuls stimuliert und kopelte auf FET 11. Neuron 2 reagierte mit einem PSAP auf Neuron 1.

Ähnlich die Situation in Abbildung 7.44. Hier wurde mit einem 375ms langen Strompuls stimuliert, der in Neuron 1 drei Aktionspotentiale erzeugte. Das postsynaptische Neuron 2 antwortete

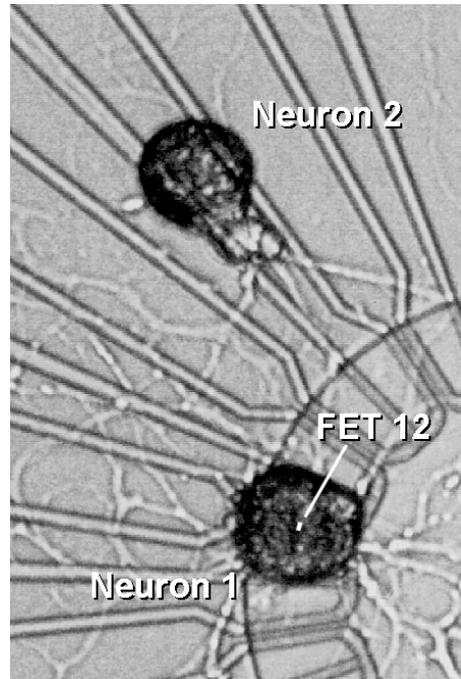
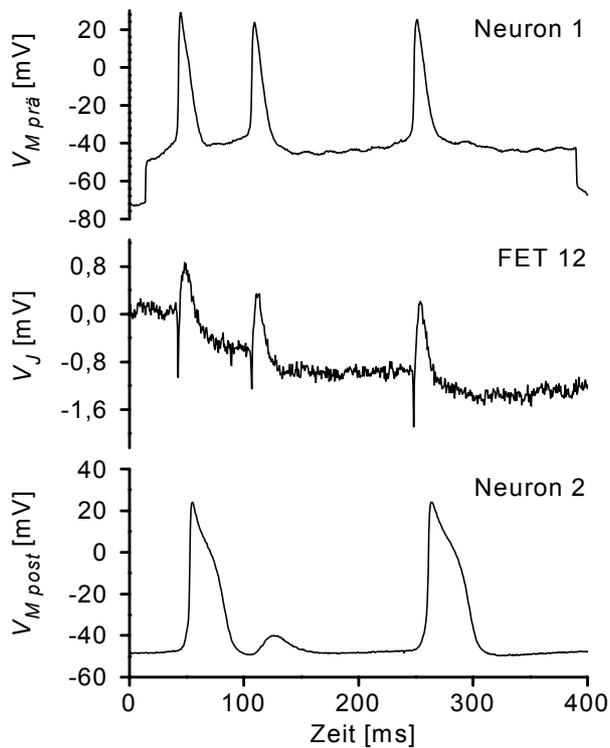


Abbildung 7.44: Situation Kopplung-Synapse: In Neuron 1 wurden mit einem langen Strompuls drei Aktionspotentiale ausgelöst, die alle von Transistor 12 aufgezeichnet wurden. Der unzureichende Abgleich des Brückenverstärkers von Neuron 1 zeigt die Länge der Strominjektion an. Neuron 2 bildet nur zwei PSAPs aus, denn das zweite präsynaptische Aktionspotential fällt in die postsynaptische Refraktärzeit.

jedoch nur mit zwei PSAPs. Das zweite präsynaptische Aktionspotential wirkte noch während der Refraktärzeit des ersten PSAPs, so dass zu diesem Zeitpunkt nur ein einfaches SPSP entstand. Das Transistorsignal lässt eindeutig auf aktive Kanäle in der Kontaktmembran schließen, die zum Teil eine sehr lange Zeitkonstante, bzw. Inaktivierungszeit haben müssen. So kehrte das Junctionpotential, das bei jeder Kopplung um fast $0,5\text{mV}$ absackte, erst nach ungefähr 1000ms wieder zur vorherigen Höhe zurück. Die Lage der Neurone auf dem Chip zeigt, dass nur das präsynaptische Neuron vom Chip kontaktiert werden kann. Reizversuche blieben jedoch erfolglos. Die Synapse zeigte in umgekehrter Richtung auch die Fähigkeit PSAPs auszubilden. Die dadurch mögliche Kombination von Synapse und Kopplung wird später gezeigt.

Anders ist schon die Situation in Abbildung 7.45. Hier gibt der Transistor in Hub und Form eine ähnliche Antwort wie in Abbildung 7.43, aber die Synapse erzeugt nur noch ein SPSP, das sich über 200ms erstreckt und nur 10mV Hub aufweist. Die Messsituation zeigt, dass prä- und postsynaptisches Neuron nicht nur direkt, sondern noch zusätzlich über ein dazwischenliegend-

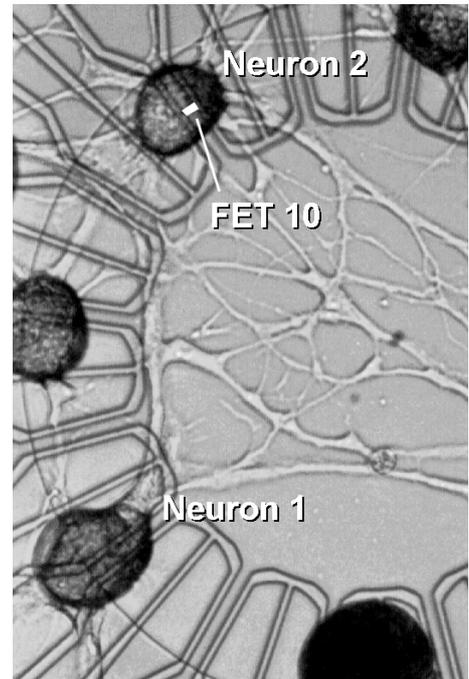
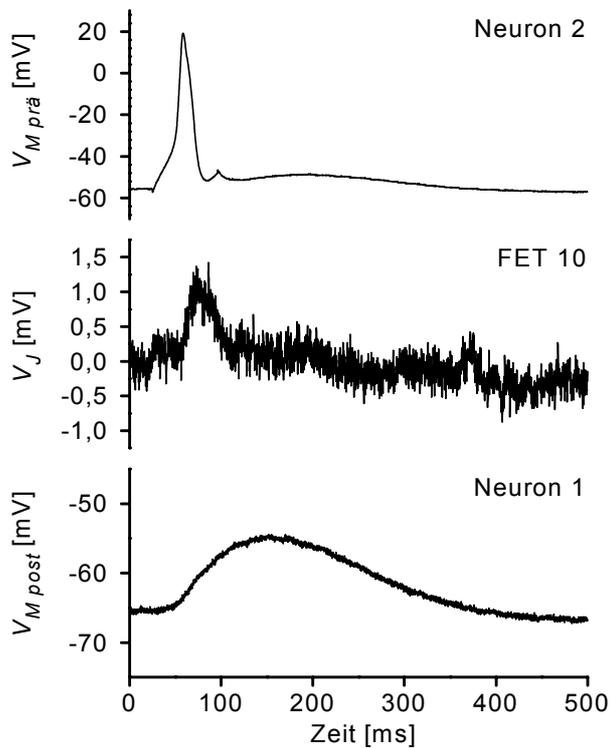


Abbildung 7.45: *Situation Kopplung-Synapse: Neuron 2 löste in Neuron 1 nur ein SPSP aus. Der Verlauf des SPSPs deutet auf eine chemische Synapse hin. Das Transistorsignal in FET 10 bildet Neuron 2 sehr gut ab.*

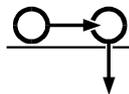
des Neuron verbunden sind. Obwohl Höhe und Zeitverlauf des postsynaptischen Potentials die typische Form einer chemischen Synapse aufweisen, kann hier nicht die Mitwirkung des dritten Neurons ausgeschlossen werden. In umgekehrter Richtung konnten PSAPs ausgelöst werden, die jedoch nach dem Zuschalten von FET 10 verschwanden. Sie hätten zusätzlich einen Signalweg vom Typ Synapse-Kopplung ermöglicht. Nicht nur die Synapsen, auch die Kopplung auf FET 10 war nicht sehr stabil. Weitere Messungen zeigen ein zwar erkennbares, aber in Höhe und Form stark schwankendes Transistorsignal. Nach mehreren Messungen konnte kein Aktionspotential mehr ausgelöst werden, so dass Reizversuche überflüssig wurden.

Fazit Die Gesamtheit der Messungen, in denen das präsynaptische Neuron koppelte, zeigen keine situationsbedingten Auffälligkeiten. Insbesondere war kein Zusammenhang zwischen synaptischen Eigenschaften und Kopplungseigenschaften erkennbar. Obwohl beide Kontakte auch in dieser hybriden Kombination nicht immer gleichzeitig auftreten, konnte kein Zusammenhang zwischen dem Aussetzen von Kopplungen und synaptischer Übertragung hergestellt werden.

Dies ist die einzige Kombination in den elementaren Wegen, in der das Neuron das Ereignis nicht überträgt, sondern nur verteilt. Das Aktionspotential wurde immer als vorhanden vorausgesetzt. Die besondere Eigenschaft von Aktionspotentialen, erst ab einer bestimmten Anregungsschwelle einzusetzen, war hier nicht von Belang. Das ist bei den folgenden Situationen anders.

Synapse-Kopplung

Nimmt man die vorige Situation und kehrt die Synapsenrichtung um, so erhält man einen seriellen Übertragungsweg. Ein präsynaptisches Aktionspotential erzeugt in der postsynaptischen Zelle wieder ein Potential, das vom Transistor ausgelesen wird. Das präsynaptische Aktionspotential kann aus spontaner Aktivität herrühren oder durch Strominjektion ausgelöst werden.



In der Messsituation von Abbildung 7.46 wurde nun mit der Mikroelektrode das Aktionspotential nicht in Neuron 1, sondern in Neuron 2 gestartet. Neuron 1 antwortete mit einem PSAP, das von Transistor 12 abgelesen wurde. Das Junctionpotential zeigt die gleichen Eigenschaften wie in Abbildung 7.44. Jedes Aktionspotential senkt das Junctionpotential um ca. $0,5mV$ ab und es braucht gute $1000ms$ um sich nach zwei Kopplungen wieder auf Ausgangshöhe einzufinden. Der Vergleich mit der Situation in Abbildung 7.44 zeigt weiter, dass die wesentlichen Eigenschaften der Aktionspotentiale von Neuron 1 und Neuron 2 nicht von der synaptischen Übertragungsrichtung und damit von der Anregungsart abhängen. Neuron 2 zeigt auch hier das Erscheinungsbild eines Typ-2-Neurons, Neuron 1 das eines Typ-1-Neurons. Ebenso scheinen die Kopplungseigenschaften von Neuron 1 nicht von dessen Lage bezüglich der Synapse abzuhängen. Bis auf die erfolglose Reizung von Neuron 1 sind in dieser Anordnung alle möglichen Schnittstellen erfolgreich passiert worden.

Die wenigsten Kopplungen zeigen so schmale, leicht erkennbare Spitzen wie in 7.46. In Abbildung 7.47 hat das Transistorsignal nicht nur einen geringeren Hub, es erstreckt sich auch über längere Zeit. Für dieses Verhalten ist eine Anreicherung von K-Kanälen in der Kontaktmembran verantwortlich. Hier kommt noch die offenbar besonders große Breite des postsynaptischen Aktionspotentials hinzu. Der Verlauf des Potentials zeigt zwischen Spitze und Schulter einen außergewöhnlichen Einbruch. In den ersten Aufnahmen der beiden Mikroelektroden zeigt sich ein komplexer synaptischer Zusammenhang, der auch durch das Bild des Netzwerks bestätigt wird. Neuron 1 ist Teil eines Soma-Soma-Clusters aus mindestens zwei Neuronen. Die syn-

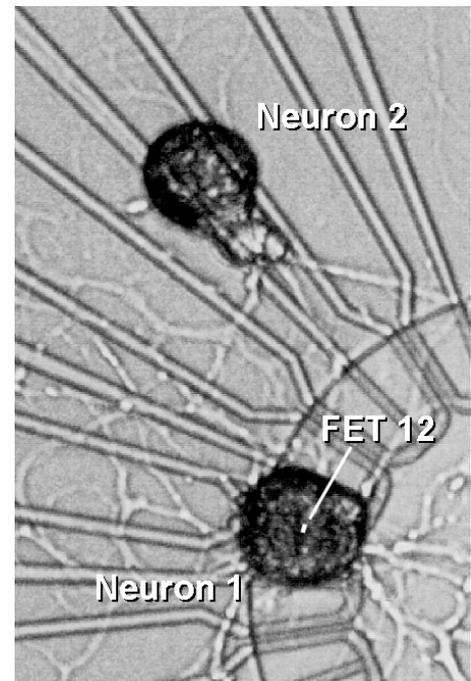
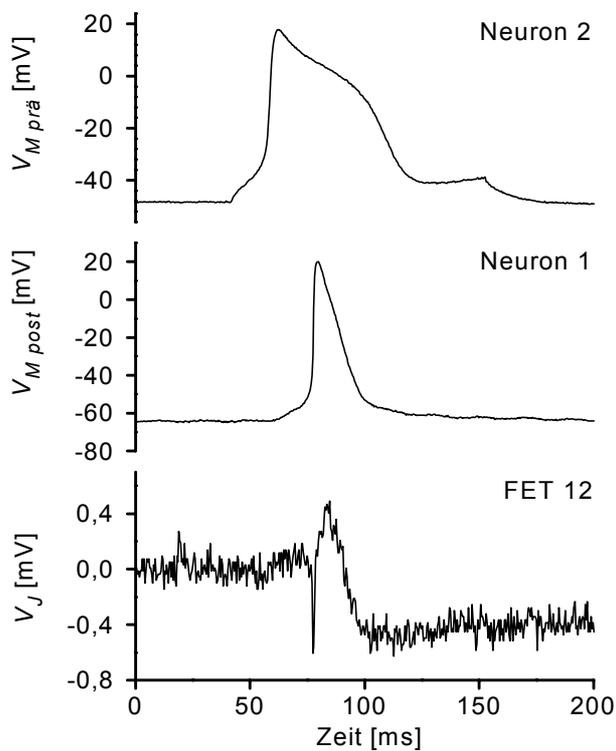


Abbildung 7.46: *Situation Synapse-Kopplung: Umgekehrter Signalweg des bereits vermessenen Signalwegs von Neuron 1 nach Neuron 2. Hier wurde Neuron 2 mit Strom stimuliert und es folgten in Neuron 1 PSAPs mit guter Kopplung in den Transistor.*

aptische Soma-Soma-Verbindung steht für kurze, synaptische Verzögerungen und hohe PSAP-Wahrscheinlichkeiten. Es ist also vorstellbar, dass an der Entstehung des PSAP in Neuron 2 die dritte Zelle des Clusters indirekt beteiligt war. Wahrscheinlich löste das Aktionspotential von Neuron 1 in der dritten Zelle ebenfalls ein ausreichend starkes postsynaptisches Potential aus, das zwar zeitlich verzögert, aber zusammen mit Neuron 1 selber auf Neuron 2 wirkte und die Gestalt des PSAP von Neuron 2 formte.

Trotz der schwachen Kopplung, spricht für diese Messung, dass die postsynaptische Antwort von Neuron 2, die bei ca. $t = 80 \text{ ms}$ einsetzt, keinen merklichen Einfluss der präsynaptischen Strominjektion aufweist, welche schon bei $t = 70 \text{ ms}$ beendet war.

Die zwei wesentlichen Hürden, die ein Ereignis beim Durchlaufen der Kombination Synapse-Kopplung zu überwinden hat, sind die Auslösung von PSAPs und das Erreichen guter Kopplungen. In Abbildung 7.48 wurde das präsynaptische Neuron so stark mit Strom stimuliert, dass ein ganzer Zug aus sieben Aktionspotentialen folgte. Dieser vorgegebenen Frequenz konnte das postsynaptische Neuron jedoch nur bedingt folgen. Das erste präsynaptische Aktionspotential

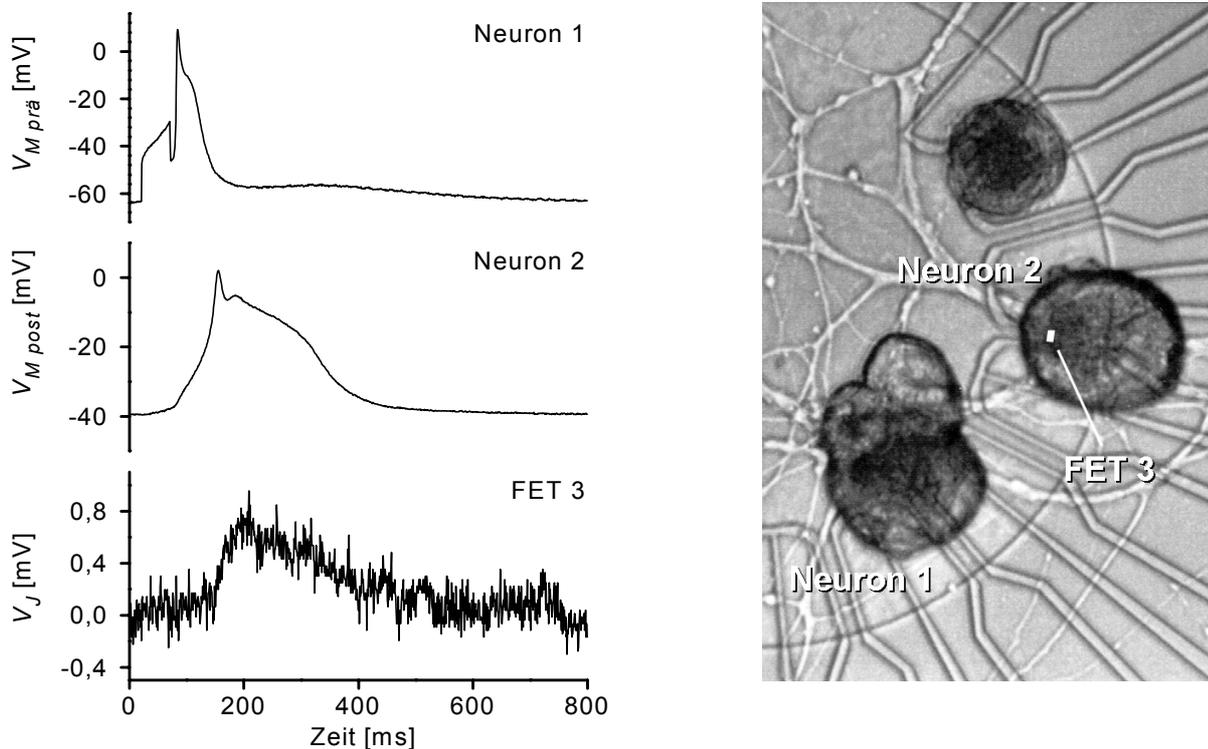


Abbildung 7.47: Situation Synapse-Kopplung: Das PSAP in Neuron 2 wird vom Cluster um Neuron 1 gebildet. Trotz des schwachen, langen Signals in FET 3 ist die Neuro-Chip-Kopplung erkennbar. Der Brückenverstärker von Neuron 1 war schlecht abgeglichen und bildete deshalb den Stimulationspuls ab.

zog noch ein PSAP in Neuron 2 nach sich. Doch schon das zweite traf in die Refraktärzeit des einzigen PSAPs. Alle weiteren präsynaptischen Aktionspotentiale brachten nur noch SPSPs hervor. Im nächsten Übertragungsschritt vom postsynaptischen Neuron zum Transistor zeigte sich, dass nur das PSAP eine merkliche Modulation im Transistorsignal auslösen konnte. Das Signal war insgesamt so schwach, dass zusätzlich noch mit einem Bandstop 1. Ordnung zwischen $30\text{ Hz} - 200\text{ Hz}$ gefiltert werden musste. Die Wirkung der SPSPs ist so schwach, dass ihr Abbild im Transistorsignal nur zu erahnen ist. Als eine Folge der Filterung lässt sich aus der Form des Kopplungssignals kein zuverlässiger Rückschluss auf den Kopplungstyp geben.

Fazit Die serielle Übertragung eines Ereignisses durch einen Neuro-Neuro- und danach durch einen Neuro-Chip-Kontakt kann nur dann erfolgreich sein, wenn beide Schnittstellen gleichzeitig ausreichend gute Übertragungsstärken zeigen. Als begrenzende Schnittstelle zeigt sich dabei der Neuro-Chip-Kontakt. Das typische Transistorsignal eines Aktionspotentials hat einen Hub im Millivolt bis Submillivoltbereich. Bei einem Grundrauschen des Transistors von $0,2 - 0,4\text{ mV}$ gehen, wie in Abbildung 7.48 zu sehen, postsynaptische Potentiale mit einem Hub kleiner als

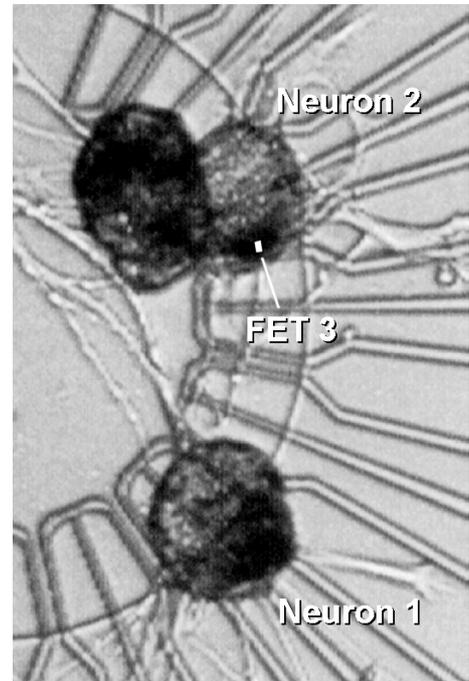
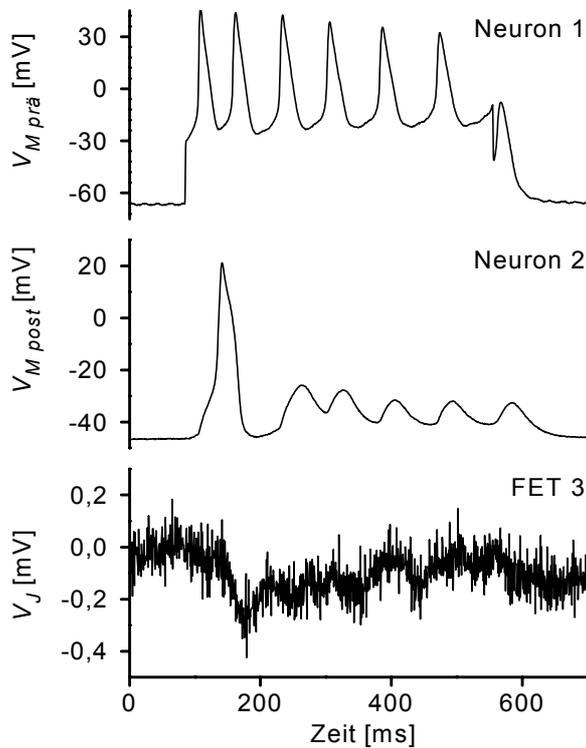


Abbildung 7.48: Situation Synapse-Kopplung: Nur PSAPs können derzeit vom Transistor detektiert werden. In diesem Fall war der postsynaptische Neuro-Chip-Kontakt so schwach, daß das Transistor-signal mit einem Bandstopp 1.Ordnung, 30Hz-200Hz gefiltert werden mußte um einigermaßen erkannt zu werden.

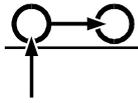
10 mV im Rauschen unter. Unter diesen Umständen muss die serielle Verschaltung von Synapse und Kopplung in der Lage sein im postsynaptischen Neuron Aktionspotentiale, also PSAPs, auszulösen.

Postsynaptische Aktionspotentiale sind momentan für eine vollständige Übertragung in hybriden Systemen unverzichtbar.

Es wurde keine Situation gefunden, in der postsynaptische Membranpotentiale, die schwächer waren als Aktionspotentiale, in den Transistor erkennbar einkoppelten.

Reiz-Synapse

Läßt man ein Ereignis zuerst über die Neuro-Chip-Schnittstelle und dann durch eine Synapse laufen, so gelangt man zu der Situation, in der das präsynaptische Neuron gereizt wird und seine Aktivität synaptisch auf das postsynaptische Neuron überträgt.



Die Definition einer erfolgreichen Reizung beinhaltet, dass das präsynaptische Neuron zu einem Aktionspotential stimuliert wird. In Abbildung 7.49 wurde Neuron 1 auf Spotpaar 4 mit einer Folge von 20 Pulsen innerhalb von 20 ms gereizt. Das postsynaptische Neuron antwortet mit einem SPSP von ca. 10 mV Hub. Die Reizartefakte sind nicht nur im Spannungsverlauf der Mikroelektrode von Neuron 1, sondern auch im Spannungsverlauf der Mikroelektrode in Neuron 2 zu sehen. Das rührt von einer unvollkommenen Abdeckung des Reizspots durch Neuron 1 her, die eine Einstreuung der Reizartefakte ins Bad ermöglicht. Eine Auswirkung dieser Artefakte auf das synaptisch verbundene Neuron ist nicht zu erkennen. Am Ende der Reizpulse hat das postsynaptische Neuron noch das gleiche Membranpotential wie vor den Pulsen. Das Potential des präsynaptischen Neurons hingegen wurde durch die Pulse um fast 20 mV angehoben. Ein Blick auf die Netzwerksituation zeigt, dass das postsynaptische Neuron ausschließlich und direkt mit dem präsynaptischen verbunden ist. Es liegt weiterhin vollkommen außerhalb des aktiven Chipgebiets, so dass ein direkter Einfluss des Reizspots ausgeschlossen ist. Hier kann also das postsynaptische Potential direkt und ausschließlich auf das Aktionspotential des präsynaptischen Neurons zurückgeführt werden.

Die Situation in Abbildung 7.50 zeigt eine komplexere Situation, in der zwischen prä- und postsynaptischem Neuron noch ein Verbund aus zwei Neuronen sitzt. Auf dem Photo sind neuritische Strukturen zu erkennen, die die beiden vermessenen Neurone direkt verbinden, doch die Breite der Verbindung lässt es wahrscheinlicher erscheinen, dass der Cluster der zwischenliegenden Neurone an der Übertragung beteiligt ist. Die Graphen in 7.50 zeigen zwei Aufnahmen mit sehr unterschiedlichen Antworten auf postsynaptischer Seite. Im linken Graph erscheint ein sehr schwaches SPSP in Neuron 1, das auf die direkte, synaptische Verbindung zwischen den beiden Neuronen zurückzuführen sein könnte. Es zeigt die typische, zeitliche Überlappung von prä- und postsynaptischem Potential. Im rechten Graph findet der Hauptteil des SPSP deutlich nach dem Ende des präsynaptischen Aktionspotentials statt. Der stark vergrößerte Hub lässt darauf schließen, dass dritte Neurone beteiligt sind.

Beide Aufnahmen zeigen ein präsynaptisches Neuron, das sich mit maximal drei Flanken reizen lässt. Das Ruhepotential des gereizten Neurons wurde durch die Reizpulse nach oben geschoben. In anderen Aufnahmen folgten auf einen Reizpuls zuweilen mehrere Aktionspotentiale. Das

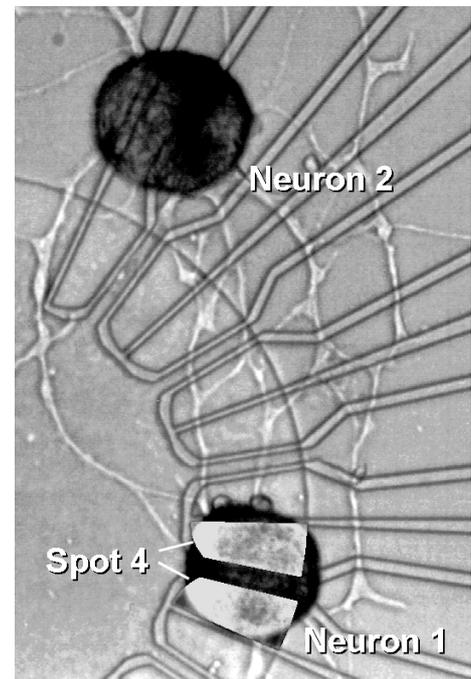
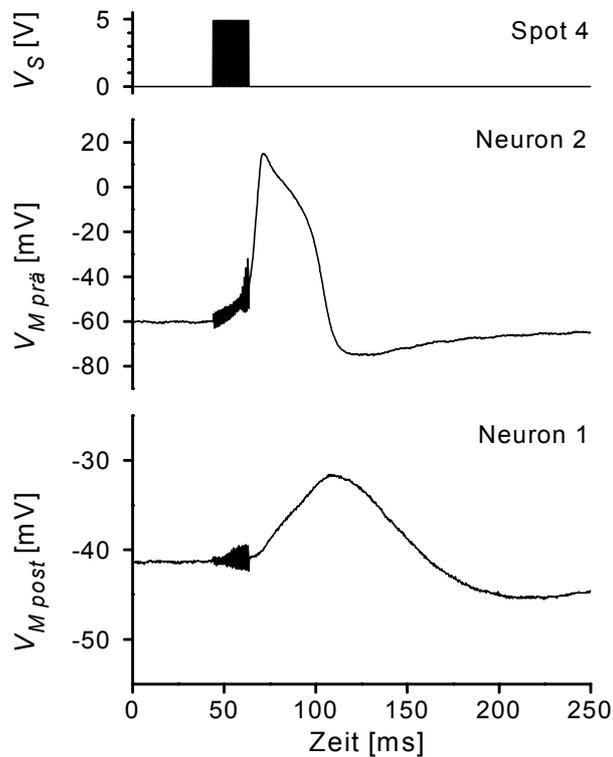


Abbildung 7.49: Situation Reiz-Synapse: Dichte Reizpulse von Spotpaar 4 lösen ein Aktionspotential in Neuron 1 aus, das wiederum ein SPSP in Neuron 2 erzeugt. Die Reizartefakte des nicht vollständig abgedeckten Spotpaars 4 wurde über das Bad direkt in die Mikroelektrode von Neuron 2 übertragen.

lässt, wie bei vorigen Messungen schon gezeigt, darauf schließen, dass die Reizpulse die Kontaktmembran stark perforierten.

Die direkte Auswirkung des Reizspots auf das postsynaptische Neuron konnte bisher durch einen ausreichenden Abstand zu dessen Soma ausgeschlossen werden. Sitzen die Neurone jedoch so nah zusammen, dass sich ihre Somata berühren, so wird eine selektive Reizung des präsynaptischen Neurons schwierig. Abbildung 7.51 zeigt ein solches Neuronenpaar, das eine Soma-Soma-Synapse bildete. Die Kontaktfläche lag genau zwischen den Spotpaaren 11 und 12, so dass versucht wurde mit den Spots 10 und 11 Neuron 1, das auf Spotpaar 11 lag, zu reizen. Es folgten quasi gleichzeitig Aktionspotentiale im prä- und postsynaptischen Neuron. Der Potentialverlauf ist fast identisch, in beiden Neuronen tauchen ähnlich starke Reizartefakte auf.

Damit müssen zwei Fragen geklärt werden: Ist von den Mikroelektroden dasselbe Soma angestochen worden? Falls nein, welches Soma ist das präsynaptische?

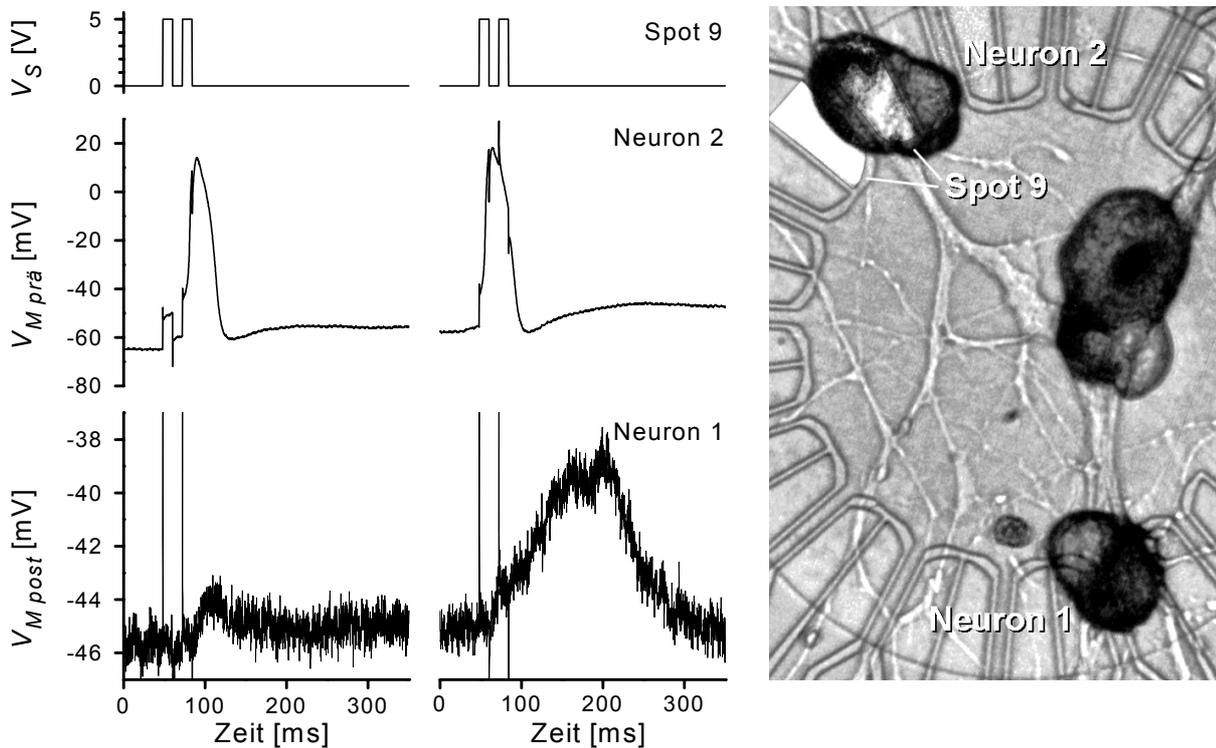


Abbildung 7.50: *Situation Reiz-Synapse: Das SPSP in Neuron 1 ist deutlich vom externen neuronalen Cluster zwischen Neuron 2 und Neuron 1 beeinflusst. Transistorsignal gefiltert mit Bandstop 1.Ordnung 40,9 Hz – 50,9 Hz*

Anstatt zu reizen wurde Neuron 1 mit Strom stimuliert. Es zeigte sich wieder ein ähnliches Verhalten wie bei Reizung. Die Potentialverläufe der beiden Neurone hatten verschwindend geringe zeitliche Verzögerung und ähnliche Form. Um die Formen der beiden Aktionspotentiale besser zu vergleichen wurde ein Phasendiagramm aus beiden Potentialverläufen erstellt. Zur leichteren Lesbarkeit wurde das Ruhepotential der beiden Ableitungen auf Null gesetzt.

Die Kurve in 7.52a), in der das präsynaptische Aktionspotential durch Strominjektion ausgelöst wurde, zeigt die rechtslaufende Keule einer sehr starken Synapse mit Richtung von Neuron 1 nach Neuron 2. Zuerst hat Neuron 1 sein Maximum, 1,264ms danach Neuron 2. Im Fall der Stromstimulation ist also klar zu erkennen, dass nicht das gleiche Neuron von zwei Mikroelektroden angestochen wurde und dass das Aktionspotential in Neuron 2 als postsynaptische Antwort auf Neuron 1 angesehen werden kann.

Bei der Reizung von Neuron 1 entsteht eine viel schmalere Phasenraumkurve, die jedoch ähnliche Eigenschaften besitzt. Die Keulenspitze liegt fast an der gleichen Position unterhalb der Winkelhalbierenden, doch im Unterschied zur Stromstimulation wird die Keulenspitze nicht im

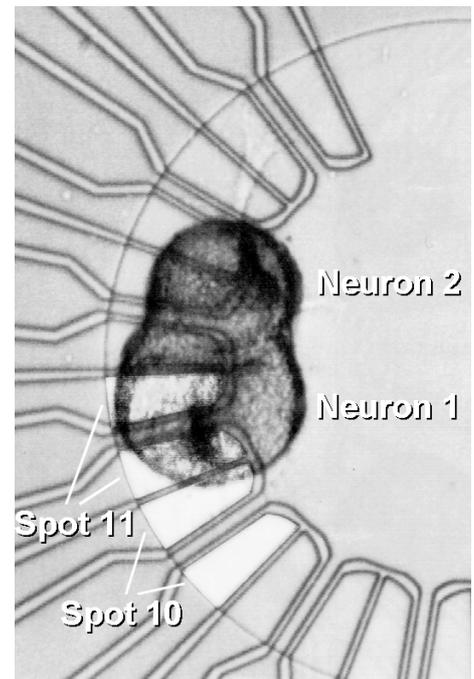
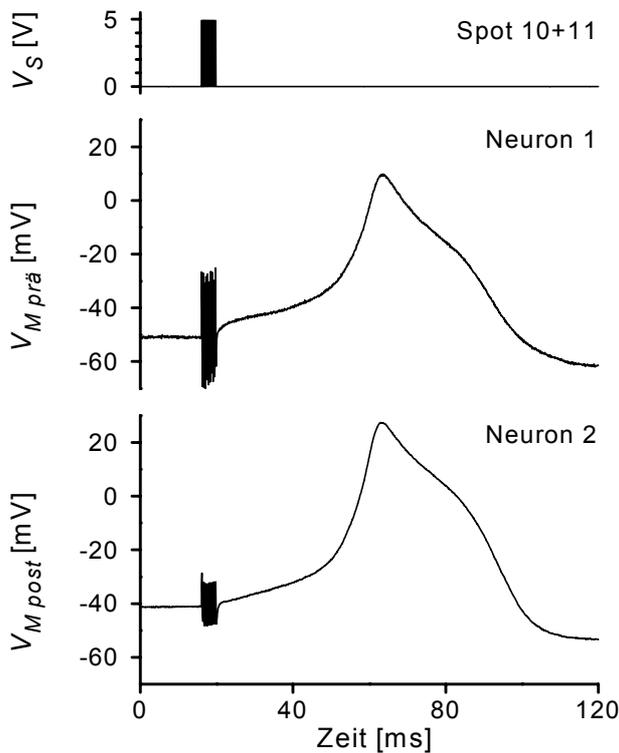


Abbildung 7.51: *Situation Reiz-Synapse: Die Neuronen 1 und 2 sind über eine Soma-Soma-Synapse miteinander verbunden, was zu Problemen mit der selektiven Reizung von Neuron 1 führt.*

negativen, sondern im positiven Drehsinn durchlaufen. Das bedeutet theoretisch, dass die Spitze des Aktionspotentials in Neuron 2 vor der in Neuron 1 kommt. Die Phasenraumkurve ist an ihrer Spitze jedoch so schmal, dass das vertikale und horizontale Maximum im Rauschen untergeht. Der Rest der Kurve folgt wieder den Eigenschaften der stromstimulierten Kurve.

Die beiden Messungen zeigen, dass es sich unabhängig von der präsynaptischen Anregung um ein elektrisch stark gekoppeltes System aus zwei Neuronen handelt, das zur dichten Folge der Aktionspotentiale führt. Die Auftragung in Form der Phasenkurve zeigt, dass die Neurone noch als getrennte Einheiten aufgefasst werden können. Es handelt sich also hier um einen elementaren, hybriden Weg der Art Reiz-Synapse.

Fazit Die Messungen zur Signalkombination Reiz-Synapse zeigen, dass mit selektiver Reizung ein hybrider Signalweg gestartet werden kann. Obwohl Reizartefakte immer in beiden beteiligten Neuronen festzustellen waren, konnte sogar die Konstellation einer Soma-Soma-Synapse selektiv gereizt werden. In dieser Situation zeigte das postsynaptische Neuron ein Aktionspotential. Das war in den restlichen sechs Messungen mit peripheren Synapsen nicht der Fall. Das hier

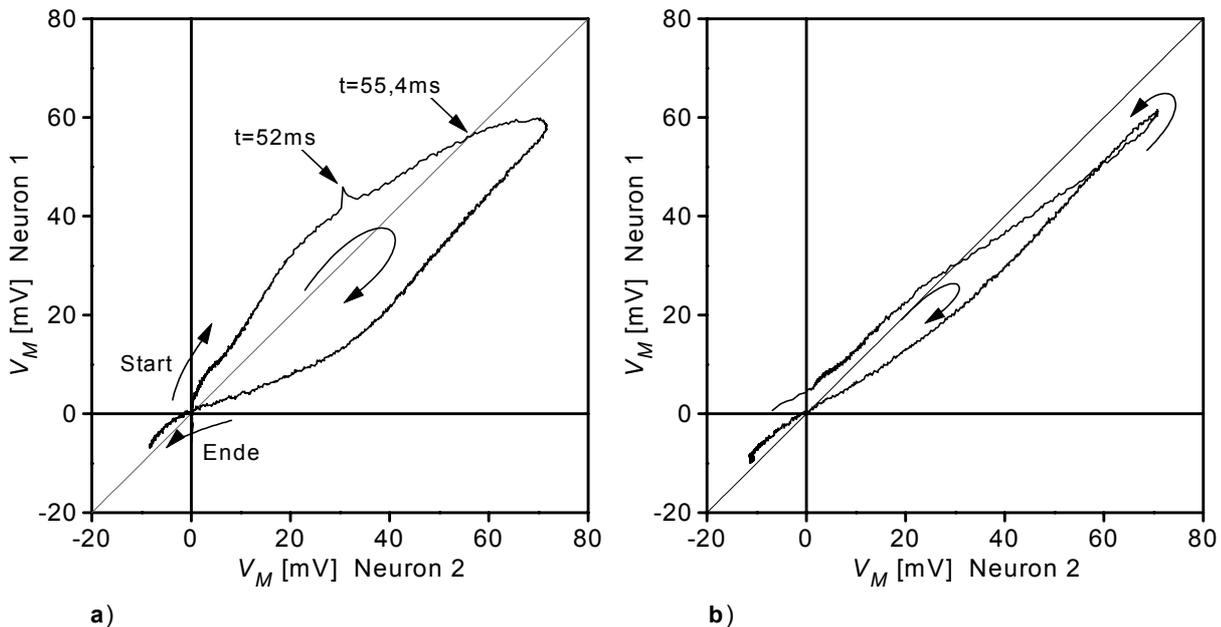


Abbildung 7.52: Phasenanalyse der synaptischen Übertragung von Neuron 1 nach Neuron 2. In Graph a) wurde Neuron 1 mit Strom stimuliert und ist deshalb eindeutig als präsynaptisches Neuron definiert. In Graph b) wurde Neuron 1 durch die Reizpotenpaare 10 und 11 gereizt. In Graph a) wurde der schlechte Abgleich des Brückenverstärkers nachgeholt und Neuron 1 zwischen $t=11,02$ und $t=51,99$ um $4,55\text{mV}$ herabgesetzt. Das Ruhepotential der beiden Neurone wurde auf Null gesetzt jeweils anhand des Mittelwerts der ersten fünf Meßpunkte.

gefundene Verhältnis zwischen SPSPs und PSAPs entspricht nicht dem von Kapitel 7.6, in dem die präsynaptischen Aktionspotentiale fast ausschließlich durch Strominjektion verursacht wurden. Die Einflüsse des präsynaptischen Injektionsstroms auf das Entstehen von PSAPs erhärten zusammen mit den unterschiedlichen Phasenraumkurven des eben beschriebenen Soma-Soma-Kontakts den Verdacht, dass die präsynaptische Reizung nicht das gleiche synaptische Verhalten liefert wie die präsynaptische Stromstimulation.

In ein Zwei-Neuronen-System, in dem eine Strominjektion ein präsynaptisches Aktionspotential auslöst, wird während der Injektionszeit Ladung injiziert. Bei präsynaptischer Reizung wird jedoch keine Nettoladung in das Zellsystem gegeben. Die Reizpulse bewirken vielmehr eine transiente Erhöhung der präsynaptischen Membranleitfähigkeit, die dann das Aktionspotential nach sich zieht.

7.7.2 Kombinierte Wege

Die meisten, vermessenen, hybriden Netze weichen von einem idealen Zwei-Neuronen-System ab. So sind, wie schon in den elementaren Wegen gezeigt, meistens noch dendritische Verbin-

dungen zu weiteren Neuronen vorhanden, manchmal liegen dritte Neurone direkt im Signalweg zwischen den beiden beobachteten Neuronen.

Am häufigsten jedoch scheitert eine vollständige Übertragung der Art Reiz-Synapse-Kopplung an der schwachen Übertragung einer der drei Schnittstellen. Das bedeutet jedoch nicht, dass andere Signalwege, zum Beispiel in Gegenrichtung, nicht möglich sind. Um alle Verbindungswege eines Zwei-Neurone-Systems auszuloten wurde deshalb versucht das Netzwerk nacheinander über gut gelegene Reizspots und die beiden Mikroelektroden zu stimulieren. Da die vorhandenen Stimulationsmethoden nicht gleichzeitig angewendet werden können, erhält die zeitliche Konstanz der Netzwerkeigenschaften große Bedeutung.

In diesem Abschnitt werden Netzwerksituationen beschrieben, die sich durch eine hohe Zahl vermessener Schnittstellen auszeichnen. Allen ist gemein, dass sie keinen gleichzeitigen, vollständigen Durchlauf mit den Schnittstellen Reiz, Synapse, Kopplung aufweisen. Dies wird im nächsten Abschnitt über vollständige Wege beschrieben.

In Abbildung 7.53 sind zwei Neurone beobachtet worden, von denen nur Neuron 1 auf einer Kombinationsstruktur sitzt. Es fallen dadurch zwei von sechs möglichen Schnittstellen weg.

Um die restlichen Schnittstellen aufzulösen, wurde zuerst Neuron 1 von Spotpaar 4 mit einer Pulsfolge von 20 Pulsen der Dauer $500\ \mu s$ innerhalb von $20\ ms$ gereizt. Das entstandene Aktionspotential konnte von FET 4 abgeleitet werden. Zusätzlich löste dasselbe Aktionspotential in Neuron 2 ein SPSP von ungefähr $14\ mV$ Hub aus. Die fehlende vierte Schnittstelle, die Synapse von Neuron 2 zu Neuron 1 wurde durch Stromstimulation in Neuron 2 vermessen. Die postsynaptische Antwort von Neuron 1 war so stark, dass ein Aktionspotential entstand. Die Kopplung von Neuron 1 auf FET 4 wurde also doppelt vermessen. Der Vergleich der beiden Transistorantworten zeigt, dass das PSAP trotz identischem Hub nur halb so stark koppelt wie das Aktionspotential, das im lokalen Loop stimuliert wurde. Das Transistorsignal ähnelt im lokalen Loop dem Aktionspotential stärker wie im Fall der Kopplung des PSAPs. Das führt zu der Vermutung, dass der Reiz die Membranleitfähigkeit im Kontaktbereich erhöht, also Elektroperforation stattgefunden hat.

Nicht jede Netzwerksituation lässt sich mit zwei Messungen erfassen. Abbildung 7.54 zeigt zwei Neurone mit Soma-Soma-Synapse. In der ersten Aufnahme wurde Neuron 1 mit Strom stimuliert. Das Aktionspotential koppelte mit sehr scharfer Spitze auf FET 4 und löste ein sehr "langsames",

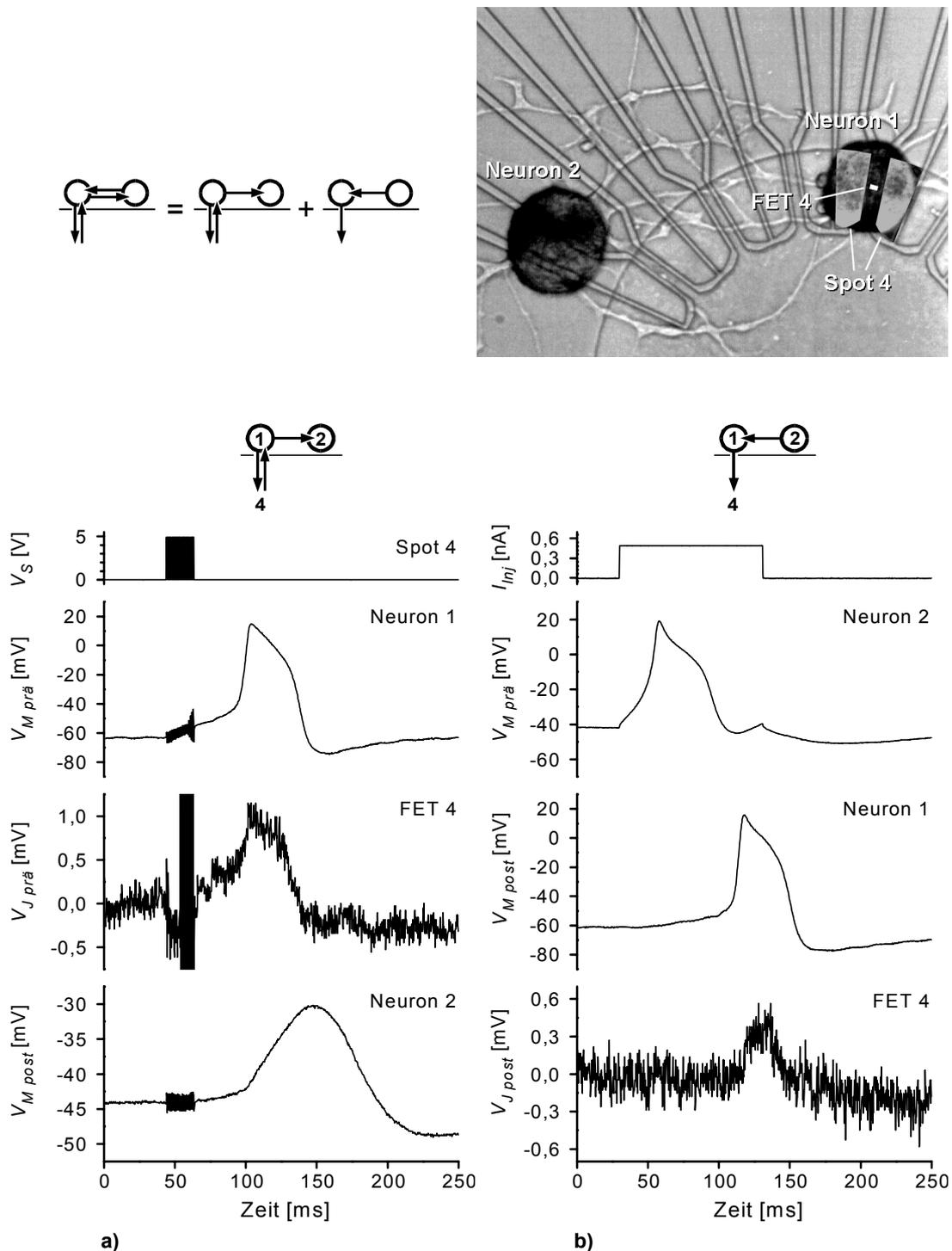


Abbildung 7.53: Neuron 2 hatte sich während der Wachstumsphase von Doppelstruktur 1 entfernt. Damit gingen 2 der 6 möglichen Schnittstellen verloren. Alle restlichen wurden jedoch ausgemessen.

SPSP in Neuron 2 aus, das sich über ungefähr 100 ms erstreckt. In Gegenrichtung war trotz Soma-Soma-Kontakt keine, erkennbare, synaptische Verbindung vorhanden.

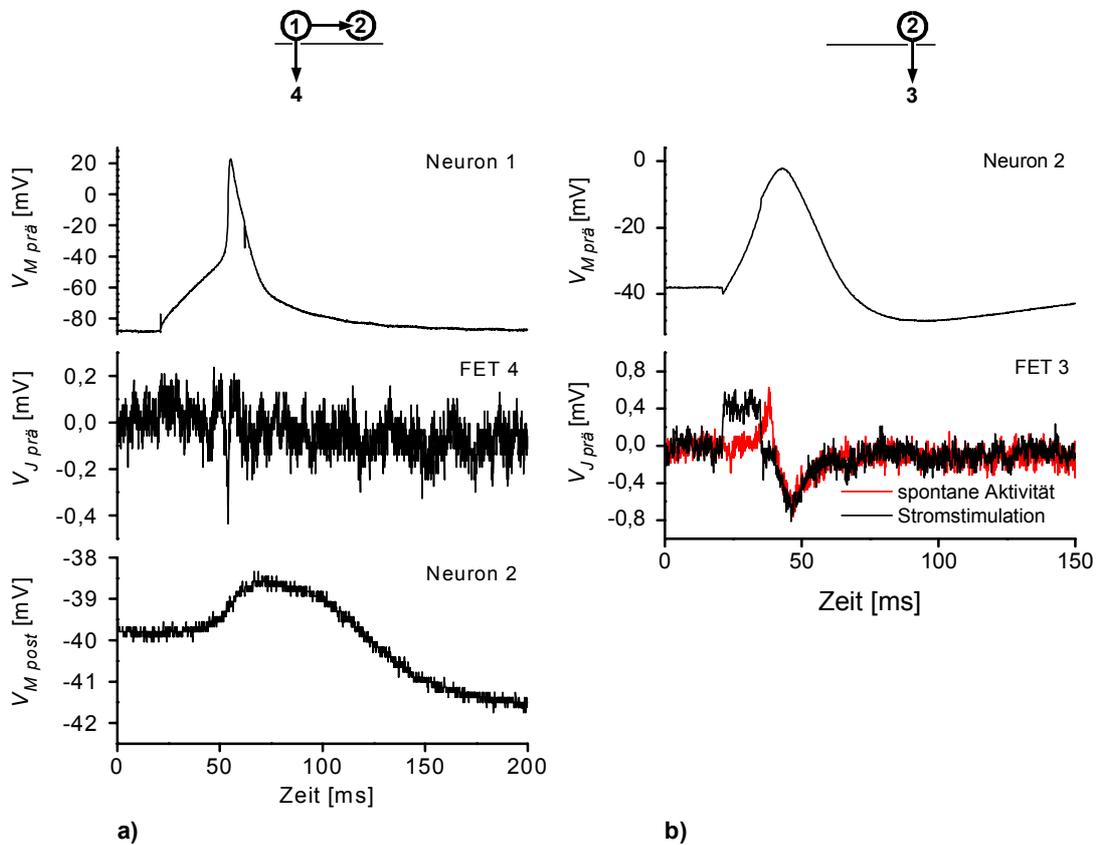
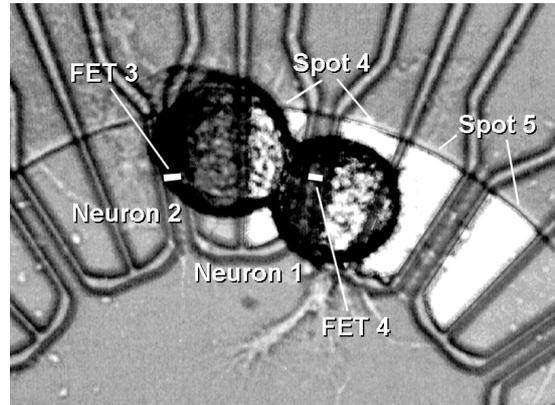
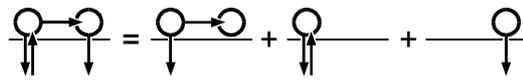


Abbildung 7.54: a) Situation Kopplung-Synapse bei Neuron 1. Der Kopplungstyp deutet auf Anreicherung beider Kanaltypen in der Kontaktmembran hin, die Synapse ist trotz Soma-Soma-Kontakt sehr schwach und wahrscheinlich chemischer Natur. b) Neuron 2 feuerte vor dem Anstechen spontan und zeigte Kopplungssignale, die auf vollständige Verarmung der Kontaktmembran schließen lassen (rote Kurve). Nach dem Anstechen wird die Na-Verarmung nicht mehr angezeigt, dafür ist der Einfluß der Strominjektion gut sichtbar.

Neuron 2 war weniger vital als Neuron 1, was sich im geringen Hub des Aktionspotentials von Neuron 2 niederschlägt. Während die Mikroelektrode auf Neuron 2 hinabgefahren wurde zeigten

sich im Signal von FET 3 schon Kopplungen des offenbar spontan feuernenden Neurons (Abbildung 7.54b)), die jedoch vorübergehend verschwanden als mit dem Penetrationspuls des Brückenverstärkers die Zellmembran durchbrochen wurde. Nach geraumer Zeit erholte sich die Zelle wieder und lieferte gute Kopplungssignale im Transistor.

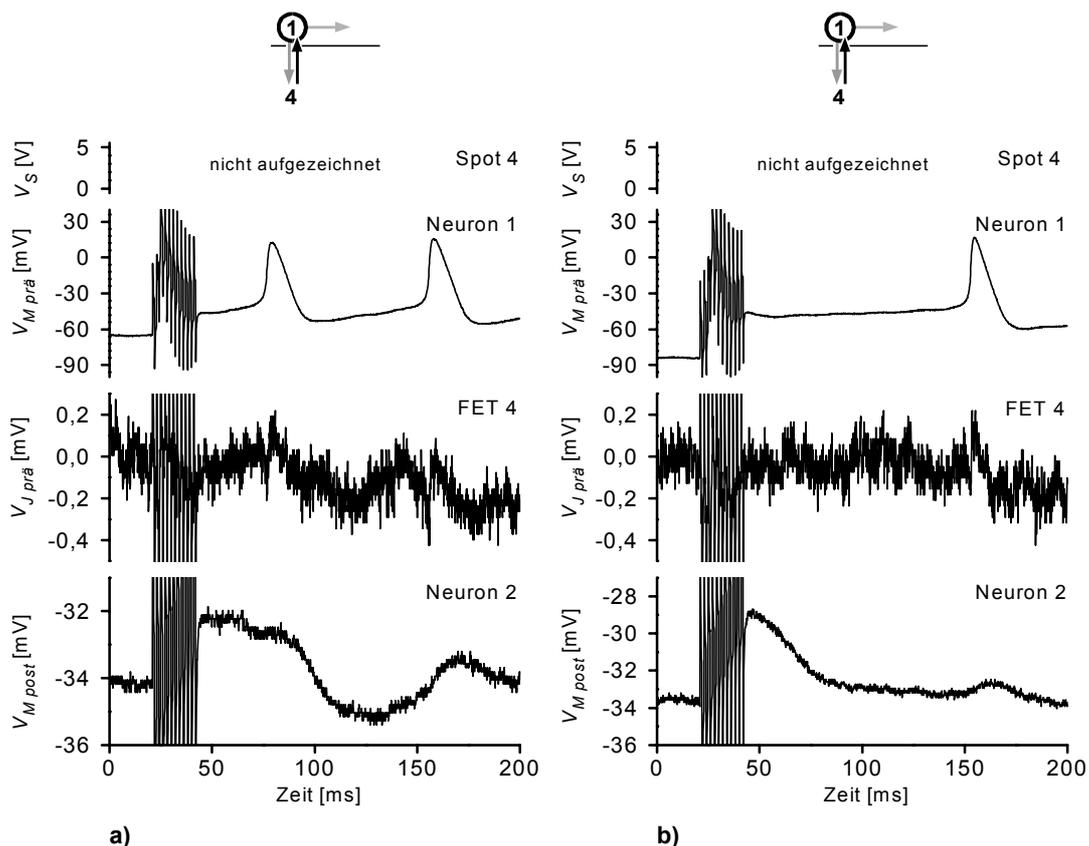


Abbildung 7.55: Wechselhafte Kopplung von Neuron 1 auf FET 4. Auch die Synapse von Neuron 1 nach Neuron 2 zeigt kein konstantes Verhalten. Neuron 2 wurde wegen der schlechten Selektivität der Soma-Soma Konfiguration leicht von Spotpaar 4 gereizt.

Durch das Anstechen war Neuron 2 vermutlich so stark verletzt worden, dass sich ein hohes Ruhepotential einstellte und das Aktionspotential nur einen geringen Hub hatte. Es konnte nicht gereizt werden. Nach kurzer Zeit lief es aus und beendete damit die Messung. Noch während des Auslaufens von Neuron 2 konnte jedoch Neuron 1 gereizt werden.

Die Messung in Abbildung 7.55 spiegelt den Verfall der Stabilität des Netzwerks und den sich daraus ergebenden Zeitdruck wieder. Es wurde darauf verzichtet die Zahl der Reizpulse für Neuron 1 zu optimieren. Anstatt dessen wurden nur die Reizspots auf Nr. 4 und Nr. 5 gewechselt. Zur Reizung von Neuron 1 hätten zwei bis drei Pulse gereicht. Die Latenzzeit ist so kurz, dass das erste

Aktionspotential von Reizpulsen überlagert ist. Durch die starke Reizung wurde die Membran so stark perforiert, dass ein länger anhaltende Depolarisation mehrere Aktionspotentiale nach sich zog. Der Vorteil dieses unangepassten Reizmusters ist jedoch, dass die folgenden Aktionspotentiale mit ihren Kopplungen im Transistor 4 gut beobachtet werden konnten. In Abbildung 7.55a) waren noch deutliche Signale zu erkennen, deren Form und Vorzeichen im Einklang mit den Kopplungssignalen von Abbildung 7.54a) steht. Zusätzlich ist noch der Potentialverlauf in Neuron 2 mit aufgezeichnet. Dort ist zu erkennen, dass nicht ausschließlich Neuron 1, sondern auch, wie in Bild von Abbildung 7.54 gezeigt, Neuron 2 partiell gereizt wurde. Die synaptische Übertragung von Abbildung 7.54a) konnte hier nicht mehr so deutlich beobachtet werden. Eine weitere Aufnahme zeigt jedoch eine andere Situation. In Abbildung 7.55b) folgte erst nach gut $120ms$ das zweite Aktionspotential. In FET 4 ist eine Antwort nur noch zu erahnen, doch im Potentialverlauf von Neuron 2 erhebt sich ein unerwartet kurzer Hügel bei $160ms$, der als SPSP gewertet werden kann.

Fazit Die besprochenen Messung zeigt wie schnell sich die Eigenschaften eines hybriden Netzwerks unter dem Einfluss von Reizpulsen und Mikroelektroden verändern können. Im Gegensatz zu Messung von Abbildung 7.51 bringt die Soma-Soma-Synapse kein PSAP zustande. Es ist sogar der besondere Nachteil der schlechten Reizselektivität dieser engen Konfiguration gut zu beobachten. Im Falle eines PSAPs hätten gute Chancen auf die Konfiguration Reiz-Synapse-Kopplung bestanden.

In einem weiteren Beispiel zeigt sich wie wichtig PSAPs für vollständige Signalübertragung in hybriden Netzen ist. In der Situation von Abbildung 7.56 waren zwei Neurone über eine periphere Synapse miteinander verbunden. Neuron 1 lag nicht vollständig zentriert auf Doppelstruktur 1, FET 1 war nicht abgedeckt, so dass nur gereizt werden konnte.

Mit wenigen Stufen wurde ein Aktionspotential ausgelöst, das in Neuron 2 ein SPSP erzeugte. Direkte Stromstimulation in Neuron 2 zeigte ein Aktionspotential mit einer Schulter von fast $100ms$ Länge und eine Kopplung, die während dieser Zeitspanne um $1mV$ abfiel. Alle drei Schnittstellen, die Reizung von Neuron 1 mit Spotpaar 1, das SPSP von Neuron 1 nach Neuron 2 und die Kopplung von Neuron 2 auf FET 11, konnten mit großer Zuverlässigkeit wiederholt werden. In keinem Fall aber koppelte das SPSP von Neuron 2 auf FET 11. Ebenso entwickelte sich aus dem SPSP nie ein PSAP.

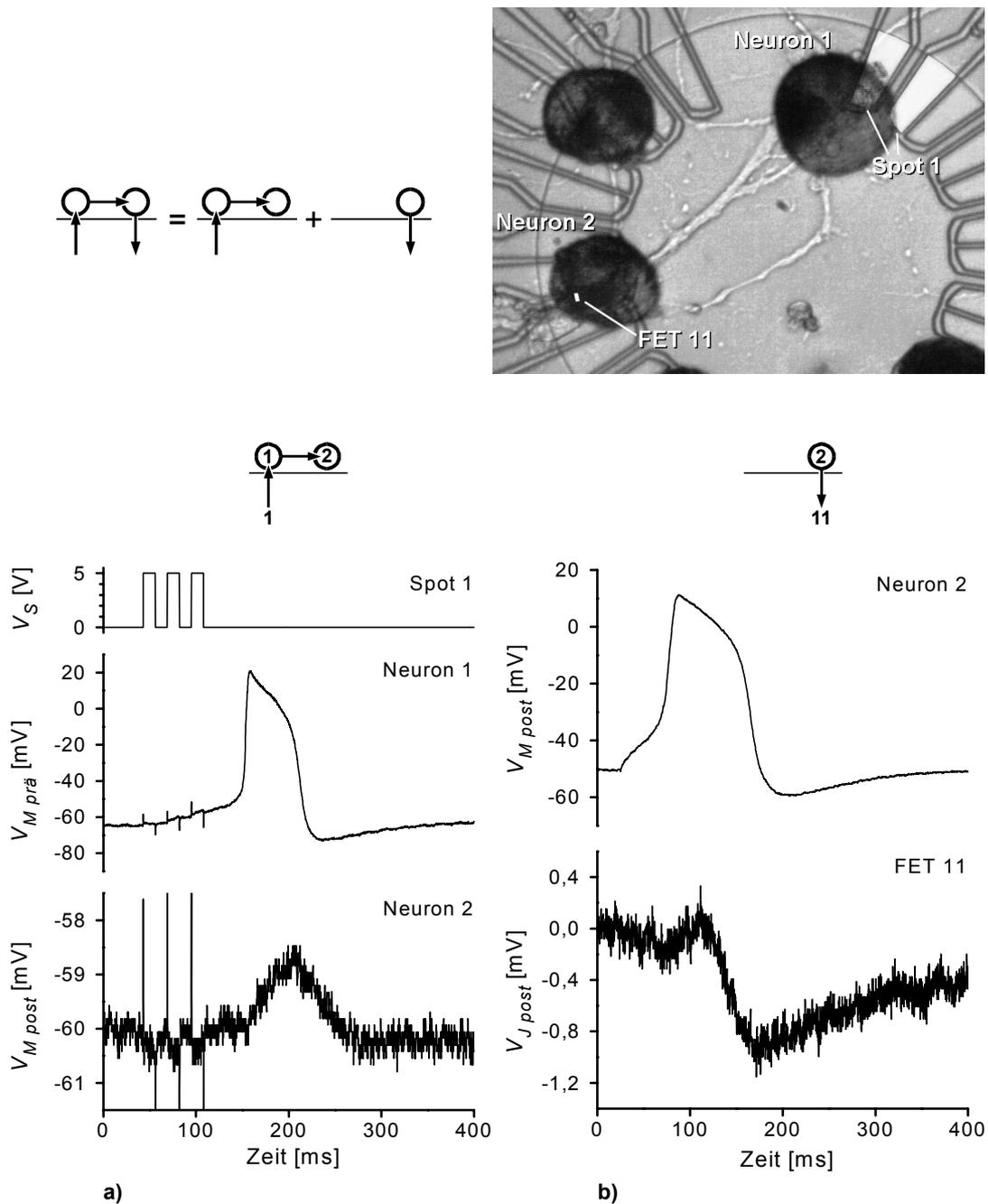
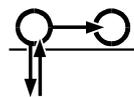


Abbildung 7.56: Trotz schlechter Abdeckung des Spotpaars 1 kann Neuron 1 gereizt werden. Die Übertragung wäre vollständig gewesen, wenn die Synapse von Neuron 1 nach Neuron 2 ein PSAP erlaubt hätte.

In Gegenrichtung konnte weder Neuron 2 gereizt werden, noch ergab sich ein postsynaptisches Potential in Neuron 1.

7.7.3 Vollständige Wege

In den bisher vorgestellten Messungen waren schon zwei Situationen enthalten, in denen ein Ereignis die Schnittstellen Reiz, Synapse, Transistor durchlaufen hatte. Erzeugt nämlich ein Neuron, das in einem lokalen Loop steht, noch ein postsynaptisches Potential im zweiten Neuron, so sind strenggenommen alle Schnittstellen verwendet worden. Allerdings sind sie in dieser Kombination nicht seriell, sondern parallel verschaltet.



Eigentliches Ziel der Kombination Reiz-Synapse-Kopplung ist jedoch die serielle Verschaltung, in der das postsynaptische Neuron auf den Transistor koppelt.

Die verteilte Schleife

Die Situation in Abbildung 7.57 zeigt zwei Neurone, von denen Neuron 2 auf FET 1 und Neuron 1 zwischen Reizspotpaar 2 und 3 liegt.

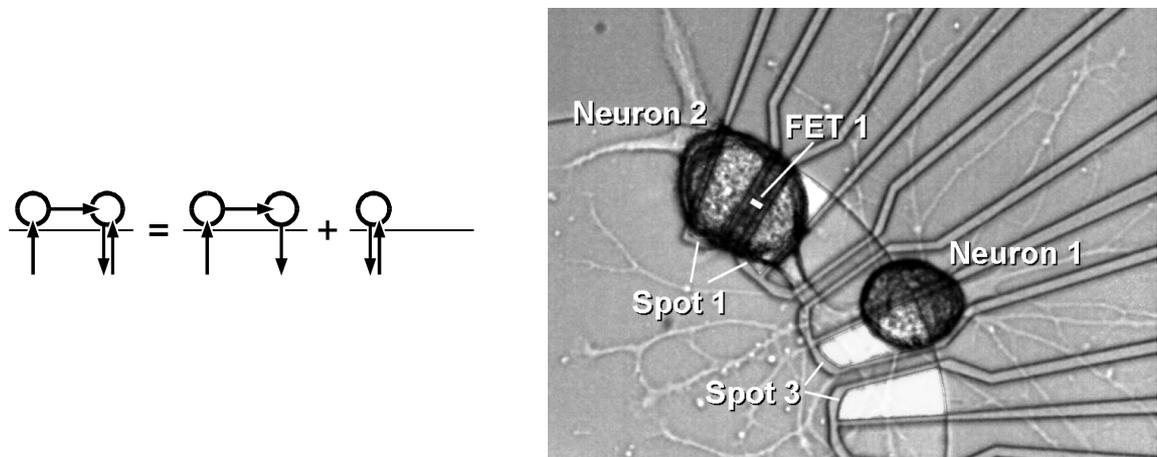


Abbildung 7.57: Vollständige, serielle Übertragung in einer verteilten Schleife. Neuron 2 bildet mit der bidirektionalen Struktur 1 eine lokale Schleife. Neuron 2 wurde nicht angestochen.

Vorgeschichte Zu Beginn der Messung wurde versucht eine lokale Schleife ohne eingestochene Mikroelektrode ablaufen zu lassen. Nach Anregung über Spot 1 zeigte der Transistor einen starken RC-Artefakt, jedoch auch kleinere Abweichungen davon, die auf eine schwache Kopplung schließen ließen (Abbildung 7.58a)). Um die Situation zu klären wurde mit der Mikroelektrode

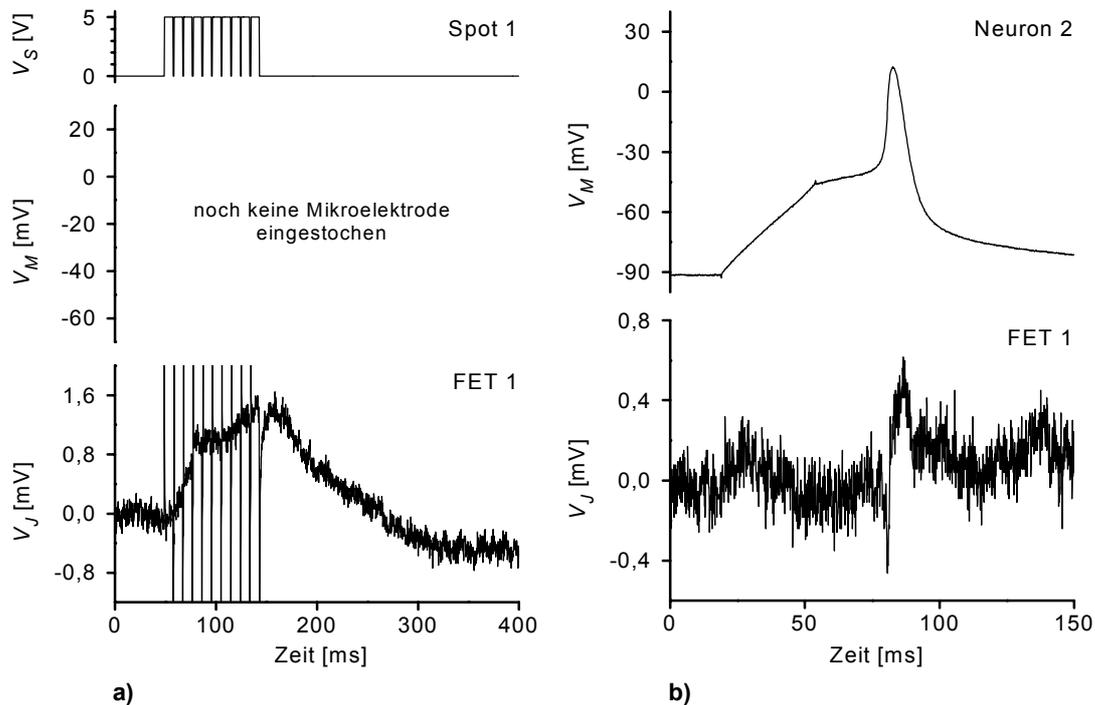


Abbildung 7.58: a) Erste Reizpulse vor dem Einstechen der Mikroelektrode zeigen nur eine schwache Kopplung von Neuron 2 auf FET 1. b) Nach dem Einstechen in Neuron 2 ist eine klare Kopplung mit Na- und K-Kanalreicherung zu sehen.

angestochen und ein Kopplungstyp gefunden, der auf eine stark mit Na- und K-Kanälen angereicherte Kontaktmembran schließen lässt (Abbildung 7.58b)).

Jetzt konnte auch mit einem einzelnen Stufenreiz von 4 V ein Aktionspotential ausgelöst werden. Die Stufe elektroporierte die Membran so stark, dass das entstandene Loch die Zelle über längere Zeit depolarisierte und dadurch zum Teil mehrere, koppelnde Aktionspotentiale erzeugte (Abbildung 7.59a)). Wieder ist eine starke RC-Kurve zu sehen, auf der Kopplungsspitzen von monophasischer Form sitzen. Der Einbruch des Transistorsignals zur Zeit der positiven Flanke und die von einer Exponentialfunktion abweichende RC-Kurve lassen schließen, dass trotz Perforation der Kontaktmembran noch aktive Ionenkanäle vorhanden sind. Ohne Reizpulse sank das Potential wieder auf seinen Ausgangswert bei -70 mV ab und die restliche Aktivität verlosch (Abbildung 7.59b)). Wurde die Zelle nur mit Strom stimuliert, so zeigte sich wieder das Transistorsignal mit spitzem Einbruch von Abbildung 7.58b). Das belegt, die Vermutung einer Kontaktmembran, deren Kanäle spannungsabhängig bleiben, obwohl die Membran selber perforiert wird.

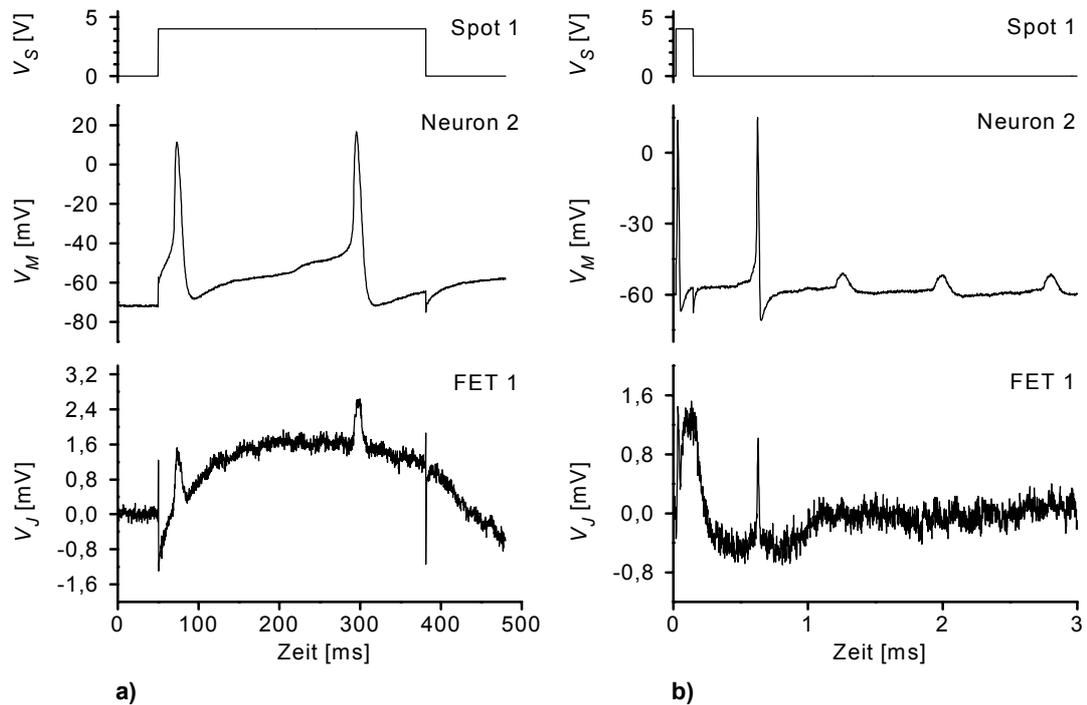


Abbildung 7.59: a) Stufenreiz elektroporiert Neuron 2, was zu einem leckdominierten Kopplungstyp führt. b) Die Elektroporation löst mehrere Aktionspotentiale aus.

Dieser Zyklus wurde länger untersucht bis das Neuron nur noch rein monophasische Kopplung zeigte. Durch die wiederholten Reize hatte sich das Ruhepotential mittlerweile dauerhaft im Bereich zwischen $50mV$ und $60mV$ eingependelt.

Vollständige Übertragung In dieser Situation wurde der Reizspot gewechselt und über Nr. 3 gereizt. Neuron 1 zeigt anfänglich nur SPSPs (Abbildung 7.60), die jedoch in fester zeitlicher Korrelation zum Reiz liegen. Wurde kein Reiz abgeschickt, so folgte auch kein SPSP. Bei weiteren Aufnahmen entstanden schließlich PSAPs, die auch auf FET 1 koppelten. In Abbildung 7.60b) sind zwei aufeinanderfolgende Aufnahmen, die einen schwachen Potentialhügel und ein Aktionspotential enthalten, übereinander gelegt. In beiden Fällen findet der wesentliche Potentialanstieg nach dem Ende der Reizpulse statt. Es ist nicht das typische "Hochpumpen" des Membranpotentials wie in einer direkten Reizung mit vier Reizpulsen zu beobachten. Deshalb wird gefolgert, dass die Potentiale postsynaptischer Natur sind, also nicht direkt vom verwendeten Reizspot Nr. 3 ausgelöst werden. Gegen eine direkte Reizung von Neuron 1 spricht auch die große Entfernung von Reizspot 3 zum Soma von Neuron 1.

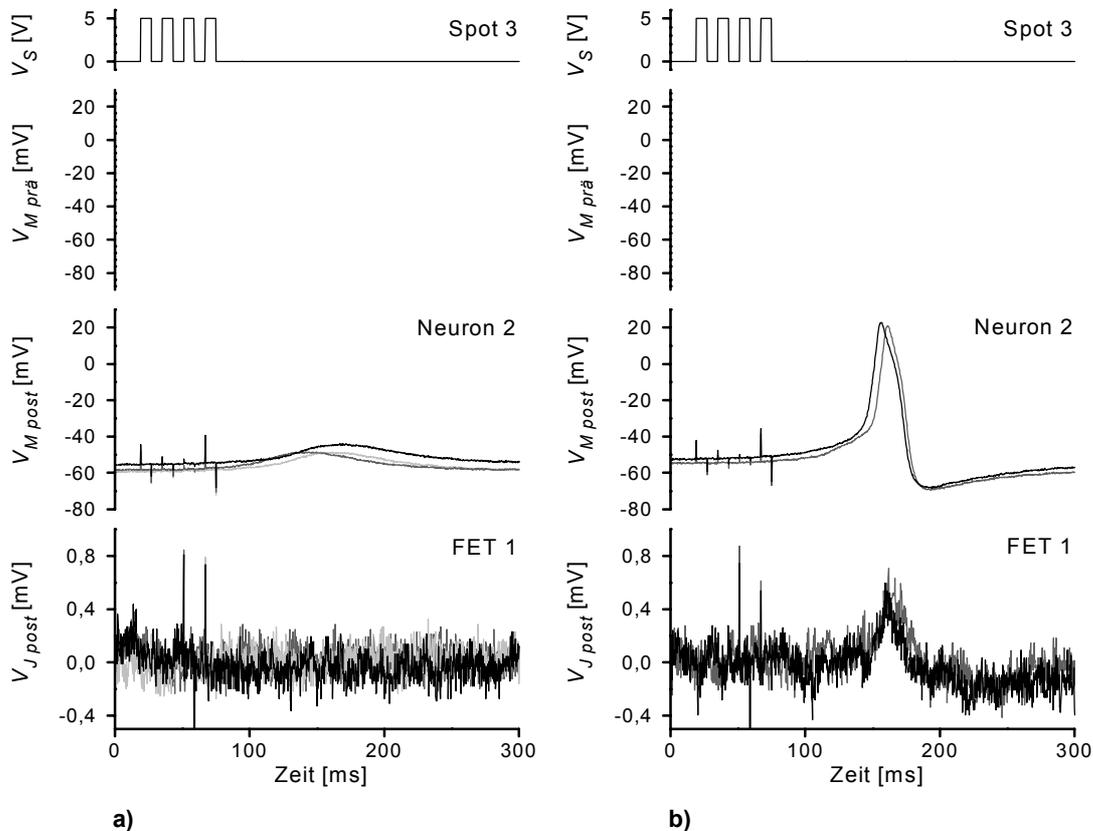


Abbildung 7.60: a) Die Synapse von Neuron 1 nach Neuron 2 löst anfänglich nur SPSPs in Neuron 2 aus, die vom Transistor nicht aufgelöst werden können. b) Nach mehreren Versuchen entstehen auch PSAPs in Neuron 2, die auf FET 1 koppeln. Eine direkte Stimulation von Neuron 3 durch Spot 3 ist nicht anzunehmen, da die Pulse keinen sichtbaren Potentialhub in Neuron 2 bewirken.

Diese Situation kann offenbar auch ohne Kenntnis des präsynaptischen Potentialverlaufs als die gesuchte Kombination einer verteilten Schleife angesehen werden. Der Reiz von Spot Nr. 3 löst in Neuron 2 wahrscheinlich ein Aktionspotential aus, das wiederum in Neuron 1 ein SPSP nachsichzieht. Dieses SPSP ist in 35 Fällen so stark, dass sogar ein PSAP entsteht, welches auf FET 1 einkoppelt. Wie in den einfachen Wegen auch gesehen, koppeln nur die PSAPs, nicht jedoch die SPSPs. Der Kopplungstyp hat, bedingt durch wiederholte Reizung in der lokalen Schleife, monophasischen Charakter.

Die beschriebene Gesamtsituation besteht aus einer verteilten Schleife, in der noch die lokale Schleife des postsynaptischen Neurons enthalten ist. Im Kontrast zu den anderen Messungen konnte das für die postsynaptische Kopplung benötigte PSAP mit präsynaptischer Reizung erzeugt werden. Begünstigend hat sich wahrscheinlich die häufige Reizung der postsynaptischen Zelle im lokalen Loop erwiesen. Dadurch wurde das Ruhepotential des Neurons so nah an die

Schwelle gehoben, dass schon schwache Depolarisationen in der Größenordnung von SPSPs in der Lage waren ein Aktionspotential zu starten.

Kapitel 8

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften hybrider Netzwerke aus in vitro gezüchtetem, neuronalen Gewebe auf Siliziumchips untersucht.

Dazu wurde eine Einzelzellkultur aus Neuronen der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis* aufgebaut und auf Halbleiterseite ein Chip entworfen, der angepasste Stimulations- und Detektionsstrukturen zur bidirektionalen Kontaktierung enthält.

Die Neurone konnten von Hand so exakt auf den Kontaktstrukturen positioniert werden, dass eine zuverlässige Grundlage für den Aufbau geometrisch definierter Netze geschaffen wurde. Sie bildeten in Kultur Synapsen aus und ermöglichten somit die Übertragung neuronaler Aktivität innerhalb des Netzwerks. Die erfolgreiche Stimulation und Detektion der Neurone zeigte, dass die Synaptogenese während der Wachstumsphase weder die Stimulations- noch die Detektionsfähigkeit verhindert.

Die Transistorsignale können umfassend mit dem Zwei-Kompartiment-Modell interpretiert werden. Sie zeigen fast ausnahmslos, dass die Kontaktmembran eines gewachsenen Neuro-Chip-Kontakts spannungsabhängige Ionenkanäle enthält. Außerdem konnte durch die qualitative Analyse der Transienten die Dynamik des Neuro-Chip-Kontakts besonders unter dem Einfluß von Stimulationspulsen verfolgt werden.

Die Folgen einer kapazitiven Stimulation decken einen breiten Bereich ab. Er reicht von der Auslösung von Aktionspotentialen über die Manipulation der Aktionspotentialform bis zur Zerstörung der Kontaktmembran. Hier besteht noch der Bedarf an einem Stimulationsmodell, das nicht nur die vorhandenen Ergebnisse interpretiert, sondern in Zukunft als Leitfaden zur Wahl optimaler Reizpulse dienen kann.

Es wurden die elementaren Kombinationen der Neuro-Neuro- und der Neuro-Chip-Schnittstellen sowie komplexere Situationen mit dem mehrfachen Durchlauf einer Schnittstelle belegt. Dabei zeigte sich, dass ein Zwei-Neuronen-System die volle Funktionalität eines hybriden Netzes auf-

weisen kann. Es ist jedoch zu erwarten, dass ein Netz aus mehreren Neuronen aufgrund der vermehrten synaptischen Eingänge an den Neuronen die Wahrscheinlichkeit eines postsynaptischen Aktionspotentials und damit die Detektierbarkeit durch den Chip erhöht.

Die Entwicklung des neuronalen Gewebes zeigte eine starke Dynamik mit der Tendenz den Neuro-Chip-Kontakt durch Abwanderung der Neurone zu trennen. Hier könnte eine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche die definierte Anordnung der Somata aufrecht erhalten. Für das weitere Verständnis hybrider Netze ist diese Entwicklungsphase von großem Interesse. Wie die mikroelektrodenfreien Messungen über mehrere Stunden andeuten, scheint der non-invasive Einsatz von Halbleiterstrukturen dafür gut vorbereitet zu sein.

Anhang A

Chipherstellung

Nach Bernt Müller, Institut für Mikroelektronik und Festkörperelektronik, Jebensstraße 1, 10623 Berlin

Substrat: n-Phosphor (100) mit $0,45 - 0,75 \Omega cm$, $n: 10^{16} cm^{-3}$.

Oxidation (Padoxid) $35 nm, 900^\circ C, 10 min$
 Nitrid abscheiden $150 nm, LPCVD 750^\circ C$

Maskierung 1 (Active Area)

Nitrid ätzen RIE CF_4/O_2 , RO, LO
 Oxid ätzen RIE CF_4/O_2 , RO, kein LO
 Graben ätzen REI $CBrF_3$ $200 - 250 nm$, kein LO
 Implantation (Channel Phosphor $10^{12} cm^{-2}$, $30 keV$
 Stop)
 Oxidation (Feldoxid) $630 nm, 1000^\circ C, 160 min$
 Oxid auf Nitrid entfernen $7 nm$, naß, HF $0,5\%$, $3,5 min$
 Nitrid entfernen H_3PO_4 , $160^\circ C$, $50 min$, $3,8 nm/min$
 Oxid entfernen
 Oxidation (Padoxid) $25 nm, 900^\circ C, 5 min$

Maskierung 2 (p+ - Zuleitungen)

Implantation Bor, $1,3 \cdot 10^{16} cm^{-2}$, $40 keV$

Maskierung 3 (Substratkontakt)

Implantation Phosphor $7 \cdot 10^{15} cm^{-2}$, $50 keV$
 Passivierungsoxid $700 nm$, PECVD, $300^\circ C$
 abscheiden
 Diffusion und Oxid verdichten $1000^\circ C$, $60 min$, N_2/O_2

Maskierung 4 (Passivierung)

Oxid ätzen naß, HF-AF $6,5\%$, $23^\circ C$, ca. $16 min$
 Oxidation (Streuoxid) $35 nm, 900^\circ C, 6 min$
 Implantation (Schwellspannung) Bor, $5 \cdot 10^{11} cm^{-2}$, $25 keV$
 Oxid entfernen naß, HF-AF $6,5\%$, ca. $25 s$
 Oxidation (Gateoxid) $15 nm, 900^\circ C$

Maskierung 5 (Source & Drain)

Implantation Bor, $5 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-2}$, 25 keV
Aktivierung 1100° C, 20 s

Maskierung 6 (Kontaktfenster)

Oxid ätzen naß, HF-AF 6, 5%, 50 s

Maskierung 7 (Sensorfenster)

Dip Etch 0,5 % HF, 23° C, Ätzrate 3 nm/min, 49 + 90 s
Metallisieren Al, reinst, 1,3 µm

Maskierung 8 (Metall)

Aluminium ätzen naß, H₃PO₄/AC, 50° C
Tempern 400° C, N₂/H₂, 20 min

Anhang B

Präparation

Medien und Lösungen

Defined Medium (DM)

pH 7,9 mit den Salzen:

NaCl	40 mM
KCl	1,7 mM
CaCl ₂	4,1 mM
MgCl ₂	1,5 mM

Der Rest entspricht halbkonzentriertem HL-15 ohne Salze:

HEPES	10 mM
D(+)-Galactose	450,00 mg/l
Na-Pyruvat	275,00 mg/l
Phenolrot	5,00 mg/l
L-Alanin	112,50 mg/l
L-Arginin	250,00 mg/l
L-Asparagin	125,00 mg/l
L-Cystein	60,00 mg/l
Glycin	100 mg/l
L-Histidin	125,00 mg/l
L-Isoleucin	125,00 mg/l
L-Leucin	62,50 mg/l
L-Lysin	37,50 mg/l
L-Methionin	37,50 mg/l
L-Phenylalanin	62,50 mg/l
L-Serin	100,00 mg/l
L-Threonin	150,00 mg/l
L-Thryptophan	10,00 mg/l
L-Tyrosin	150,00 mg/l
L-Valin	50,00 mg/l
D-Ca-Panthenat	0,50 mg/l
Cholinchlorid	0,50 mg/l
Folsäure	0,50 mg/l
i-Inosit	1,00 mg/l
Nicotinamid	0,50 mg/l
Pyridoxin·HCl	0,50 mg/l
Riboflavin-5-Phosphat-Na	0,05 mg/l
Thiaminmonophosphat	0,50 mg/l

DM wurde in der obigen Zusammensetzung bei PAN (PAN Systems GmbH, Biotechnologische Produkte, Wissenschaftlicher Service, Gewerbepark 6, 94501 Aidenbach) beziehungsweise (Biochrom KG, Leonorenstraße 2-6, 12247 Berlin) bestellt.

Direkt vor der Verwendung wird zugegeben:

N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	150 mg/l	K0202, Biochrom*
Gentamycin	20 µg/ml	G-3632, Sigma

*Biochrom KG, Leonorenstraße 2-6, 12247 Berlin

High Osmolarity Defined Medium (HODM)

HODM basiert auf DM mit 30 mM D-(+)-Glucose (G-7021, Sigma)

Normal Saline (NS)

pH 7,9, in Reinstwasser (Millipore)

NaCl	51,3 mM	S-5886, Sigma
KCl	1,7 mM	P-4504, Sigma
CaCl ₂	4,1 mM	C-7902, Sigma
MgCl ₂	1,5 mM	M-2393, Sigma
HEPES	5,0 mM	H-0887, Sigma

Antibiotic Saline (ABS)

ABS basiert auf NS mit 150 µg/ml Gentamycin (Sigma G-3632) ebenfalls bei pH 7,9.

Tris-Puffer

Tris[hydroxymethyl]aminomethane 150 mM in Reinstwasser bei pH 8,4

Poly-L-Lysin

Zum Beschichten der Chips: 1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma P-6516) in Tris-Puffer (pH 8,4). Es wurden Lösungen zu 25 ml angesetzt und nach spätestens einer Woche verworfen.

Lysterine (Mundwasser)

20% Lysterine ad NS (Lysterine, Warner Lambert)

Enzyme und Inhibitor

Auf 1800 µl DM wurden 100 µl einer Lösung von 26,6 mg/ml Collagenase/Dispase (Nr. 269 638, Boehringer Mannheim GmbH) ad DM und 100 µl einer Lösung von 13,4 mg/ml Trypsin (Sigma T-8253 oder Fluka Nr. 93614) ad DM gegeben.

Auf 1900 μl DM wurden 100 μl einer Lösung von 13,4 mg/ml Trypsin-Inhibitor (Sigma T-6522 oder Sigma T-9003) gegeben.

Reinigungslösung für Chips

Ca. 5% – 10% Geschirrspülmittel ("FOR", Dr. Schnell, 80807 München) in Reinstwasser.

Besteck und Zubehör

Präparationsbesteck

Pinzetten: Dumont No. 5, Dumont No. 2

Augenschere: Vannas Nachstarschere 5cm, gebogen, Fa. Martin, Tuttlingen

Minutiennadeln zur Fixierung der Hirne: No. 300/15, Schreinerei Heinrich Meier GmbH, Voslerstraße 9, 80689 München

Skalpelli: No. 24, C. Bruno BAYHA GmbH, 78532 Tuttlingen

Aqua ad iniectabilia: B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen

Silikonsubstrat zur Fixierung der Schnecken und Hirne: Sylgard 184

Mikronadeln aus Wolfram (Nr. 10130-10) und Halter (Nr. 26018-17, Fine Science Tools GmbH, Quinckestraße 4, 69120 Heidelberg)

Saugpipetten und Mikroelektroden

Saugpipetten: Hämatokritglas, nicht heparinisiert (No. 564 Assistent) gezogen auf Zeitz DMZ Universalpuller (Zeitz, Augsburg) mit "Multi-Pull"-Programm.

Mikroelektroden: Borosilikatglas (Nr. 1403547, Hilgenberg, Strauchgraben 2, 34323 Malsfeld) gefüllt mit 4M K-Acetat, gezogen auf Zeitz DMZ Universalpuller (Zeitz, Augsburg) mit "Single-Pull"-Programm.

Anhang C

Numerische Modellierung des Netzwerks

Für die numerische Modellierung werden dem Neuron und dem Neuro-Chip-Kontakt einheitliche Parameterwerte zugewiesen, die immer dann gelten, wenn sie im Einzelfall nicht anders angegeben sind.

Die Zustände der n , m und h -Teilchen wurden anhand der analytischen Lösung ihrer Differentialgleichungen berechnet. Zur Berechnung der Transmembranspannung wurde ein einfacher Euler-Algorithmus mit Schrittweitenanpassung verwendet. In jedem der vier Membrankompartimente wurde Δt anhand von

$$\Delta t = 0,005 \tau_m \geq 0,1 \mu s$$

berechnet. Verwendet wurde der kleinste der vier Werte für Δt .

Aktive Membran

Spezifische Kapazität:	c_M	$2 \mu F/cm^2$
------------------------	-------	----------------

$$\begin{array}{ll} \text{Na-Kanal:} & V_0^{Na} = 65mV \quad \bar{g}_{Na} = 120 mS/cm^2 \\ \text{K-Kanal:} & V_0^K = -62mV \quad \bar{g}_K = 36 mS/cm^2 \\ \text{Leck:} & V_0^L = -39,4mV \quad g_L = 0,3 mS/cm^2 \end{array}$$

Ratengleichungen des Hodgkin-Huxley-Modells

Die Auslenkung des Zellpotentials vom Ruhezustand V von Hodgkin & Huxley wurde an die heutige durch $V = V_R - V_M$ angepasst. $V_R = -50mV$.

$$\begin{aligned} \alpha_n &= 0,01 \frac{V_R - V_M + 10}{e^{\frac{V_R - V_M + 10}{10}} - 1} \\ \beta_n &= 0,125 e^{\frac{V_R - V_M}{80}} \\ \alpha_m &= 0,1 \frac{V_R - V_M + 25}{e^{\frac{V_R - V_M + 25}{10}} - 1} \\ \beta_m &= 4 e^{\frac{V_R - V_M}{18}} \\ \alpha_h &= 0,07 e^{\frac{V_R - V_M}{20}} \end{aligned}$$

$$\beta_h = \frac{1}{e^{\frac{V_R - V_M + 30}{10}} + 1}$$

Passive Membran

Berechnet wird der Wert g_M nach Hodgkin & Huxley für die Zustände von n , m und h am Ruhepotential. Die spezifische Kapazität ist c_M wie in der aktiven Membran.

Leitfähigkeit	g_M	$0,67727 \text{ mS/cm}^2$
---------------	-------	---------------------------

Neuron

Es wird ein Neurondurchmesser von $60 \mu\text{m}$ und eine Adhäsionsfläche von $20 \mu\text{m}$ angenommen.

Daraus ergibt sich:

Fläche der freien Membran	A_{FM}	$7540 \mu\text{m}^2$
Fläche der Kontaktmembran	A_{JM}	$314 \mu\text{m}^2$
Flächenverhältnis $\frac{A_{JM}}{A_{FM}}$	β	$0,042$

Kontakt

Die effektive Reizfläche A_S entspricht der Adhäsionsfläche A_{JM} der Kontaktmembran. Die Gatefläche des Transistors mit den Maßen $1,8 \mu\text{m} \times 6,0 \mu\text{m}$ wird näherungsweise nicht von der effektiven Reizfläche abgezogen.

Effektive Reizfläche	A_S	$314 \mu\text{m}^2$
Gatefläche des Transistors	A_G	$10,8 \mu\text{m}^2$
Spezifische Kapazität von Gate und Reizspot	c_{ox}	$0,37 \mu\text{F/cm}^2$
Abdichtwiderstand des Kontakts	g_J	100 mS/cm^2

Literatur

- [1] P. Fromherz A. A. Prinz, *Synapses by guided collision of growing neurons from lymnaea stagnalis in culture*, submitted (1999).
- [2] N. I. Syed A. G. M. Bulloch, *Reconstruction of neuronal networks in culture*, TINS **15** (1992), no. 11, 422–427.
- [3] A. F. Huxley A. L. Hodgkin, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, J. Physiol. **117** (1952), 500–544.
- [4] U. Welsch A. Remane, V. Storch, *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1981.
- [5] M.S. Brenner, *Messung neuronaler Aktivität mit einem 2048 Transistoren Chip*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1995.
- [6] W. Winlow C. T. Slade, J. Mills, *The neuronal organisation of the paired pedal ganglia of lymnaea stagnalis (l.)*, Comp. Biochem. Physiol. **69A** (1981), 789–803.
- [7] S. B. Kater D. J. Beadle, G. Lees (ed.), *Cell culture approaches to invertebrate neuroscience*, Academic Press, 1988.
- [8] S. Dertinger, *Kontrolle des neuronalen Wachstums durch elektrische Felder auf chemisch mikrostrukturiertem Silizium*, Dissertation, Technische Universität München, 1998.
- [9] R. Ian Freshney, *Culture of animal cells*, Wiley-Liss Inc., 1994.
- [10] P. Fromherz, *Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane*, Eur. Biophys. J. **28** (1999), 254–258.
- [11] P. Fromherz, C.O. Müller, and R. Weis, *Neuron-Transistor: Electrical Transfer Function Measured by the Patch-Clamp Technique*, Phys. Rev. Lett. **71** (1993), 4079–4082.
- [12] P. Fromherz, A. Offenhäuser, T. Vetter, and J. Weis, *A Neuron-Silicon Junction*, Science **252** (1990), 1290–1293.
- [13] Y. Iwanaga, *Neuronal outgrowth on micromechanically structured silicon*, Diplomarbeit, MPI für Biochemie, Martinsried/München, 1996.
- [14] C. F. Stevens J. A. Connor, *Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata*, J. Physiol. **213** (1971), 21–30.

- [15] E. G. Jones J. DeFelipe, *Cajal on the cerebral cortex*, Oxford University Press, New York, Oxford, 1988.
- [16] J. W. Jacklet (ed.), *Neuronal and cellular oscillators*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1989.
- [17] M. Jenkner and P. Fromherz, *Bistability of Membrane Conductance in Cell Adhesion Observed in a Neuron Transistor*, *Phys. Rev. Lett.* **79** (1997), 4705–4708.
- [18] K. Kottig, *Flache Membrankabel auf Silizium Feldeffekt-Transistoren*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1995.
- [19] P. Connolly A. S. G. Curtis J. A. T. Dow S. E. Blackshaw C. D. W. Wilkinson L. J. Breckenridge, R. J. A. Wilson, *Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording*, *Journal of Neuroscience Research* **42** (1995), 266–276.
- [20] C. T. Slade M. Kyriakides, C. R. McCrohan, *The morphology and electrophysiology of the neurones of the paired pedal ganglia of lymnaea stagnalis*, *Comp. Biochem. Physiol.* **93A** (1989), 861–876.
- [21] K. Lukowiak N. I. Syed, A. G. M. Bulloch, *In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk lymnaea*, *Science* **250** (1990), 282–285.
- [22] R. L. Rigdway L. G. Bauce K. Lukowiak A. G. M. Bulloch N. I. Syed, I. Roger, *Identification, characterisation and in vitro reconstruction of an interneuronal network of the snail helisoma trivolvis*, *J. exp. Biol.* **174** (1993), 19–44.
- [23] A. G. M. Bulloch N. S. Magoski, N. I. Syed, *A neuronal network from the mollusk lymnaea stagnalis*, *Brain Research* **645** (1994), 201–214.
- [24] W. Kutsch O. Breidbach (ed.), *The nervous system of invertebrates: An evolutionary and comparative approach*, Birkhäuser, Basel, 1995.
- [25] DeWitt G. Ong, *Modern MOS technology: Processes, devices and design*, McGraw-Hill Book Company, 1984.
- [26] K. Kottig G. Zeck P. Fromherz, V. Kiessling, *Membrane transistor with giant lipid vesicle touching a silicon chip*, *Appl. Phys. A* **69** (1999), 571–576.
- [27] G. P. Ferguson P. R. Benjamin, C. J. H. Elliott, *Neuronal network analysis of the snail brain*, Plenum Press, New York, 1985.

-
- [28] W. Winlow P. R. Benjamin, *The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurons in the isolated brain of lymnaea stagnalis*, Comp. Biochem. Physiol. **70A** (1981), 293–307.
- [29] J. Pine, *Recording Action Potentials From Cultured Neurons with Extracellular Microcircuit Electrodes*, J. Neurosci. Meth. **2** (1980), 19–31.
- [30] A. A. Prinz, *In vorbereitung*, Doktorarbeit, MPI für Biochemie, Martinsried/München, 1999.
- [31] G. Falkner R. Fechter, *Weichtiere*, Mosaik Verlag, München, 1990.
- [32] S. B. Kater G. C. Hauser R. G. Wong, R. D. Hadley, *Neurite outgrowth in molluscan organ and cell cultures: The role of conditioning factor(s)*, The Journal of Neuroscience **1** (1981), no. 9, 1008–1021.
- [33] K. Lukowiak A. G. M. Bulloch R. L. Rigdway, N. I. Syed, *Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail lymnaea stagnalis*, Journal of Neurobiology **22** (1991), 377–390.
- [34] R. Weis, *Neuron-Silizium-Kopplung: Bestimmung der elektrischen Übertragungseigenschaften*, Dissertation, Universität Ulm, 1994.
- [35] M. Rentschler, *Feldeffekt-Transistoren in einem Lipid-Polyimid-Silizium-Kabel zur Untersuchung raumzeitlicher Membranstrukturen*, Dissertation, Universität Ulm, Max-Planck-Institut für Biochemie Abteilung Membran- und Neurophysik, 1995.
- [36] C. R. S. Kaneko S. B. Kater, *An endogeneously bursting neuron in the gastropod mollusc, helisoma trivolvis*, J. comp. Physiol. **79** (1972), 1–14.
- [37] R. Schätzthauer, *Elektrische Charakterisierung des Adhäsionsgebiets wachsender Nervenzellen mit Feldeffekttransistoren*, Dissertation, Technische Universität München, 1998.
- [38] R. Schätzthauer and P. Fromherz, *Neuron-Silicon Junction with Voltage-Gated Ionic Currents*, Eur. J. Neurosci. **10** (1998), 1956–1962.
- [39] A. I Selverston (ed.), *Model neural networks and behaviour*, Plenum Press, New York, 1985.
- [40] A. Stett, *Extrazelluläre kapazitive Stimulation und Detektion elektrischer Signale individueller Nervenzellen mit planaren Silizium-Mikrostrukturen*, Dissertation, Universität Ulm, 1995.
- [41] A. Stett, B. Müller, and P. Fromherz, *Two-Way Silicon-Neuron Interface by Electrical Induction*, Phys. Rev. E **55** (1997), 1779–1782.

-
- [42] C. Stichaner, *Zur Wachstumsdynamik von Neuronen aus Hirudo medicinalis auf linearen und verzweigten Proteinmustern*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1994.
- [43] R. F. Thompson, *The brain*, W. H. Freeman and Company, New York, 1985.
- [44] M. Ulbrich, *Selbsterregung eines Blutegelneurons durch Siliziumchip*, Diplomarbeit, Physikdepartment der Technischen Universität München, Max-Planck-Institut für Biochemie, 1999.
- [45] P. G. Haydon W. Winlow, A. V. Holden, *Characterization of lymnaea neurones by determination of action potential trajectories*, J. exp. Biol. **99** (1982), 207–221.
- [46] R. Weis, *Neuron-Silizium-Kopplung mit einer quadratischen Anordnung von Feldeffekttransistoren*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1992.
- [47] R. Weis and P. Fromherz, *Frequency Dependent Signal Transfer in Neuron Transistors*, Phys. Rev. E **55** (1997), 877–889.
- [48] R. Weis, B. Müller, and P. Fromherz, *Neuron Adhesion on Silicon Chip Probed by an Array of Field-Effect Transistors*, Phys. Rev. Lett. **76** (1996), 327–330.

Dank

Mein Dank gilt...

Prof. Dr. Peter Fromherz, für die herausfordernde Aufgabenstellung und die motivierenden Gespräche,

Prof. Dr. Erich Sackmann für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Astrid Prinz für die fruchtbare Zusammenarbeit beim Aufbau und Management der Zellkultur,

Bernt Müller von der TU Berlin für die saubere Umsetzung des Chipdesigns und die Prozessierung von *”Lymnos”*,

Karsten Kottig und Bernd Kuhn für das geduldige Gegenlesen der Arbeit,

den Mitarbeitern der Abteilung Membran- und Neurophysik für die angenehme Atmosphäre der *”offenen Türen”*,

sowie Karin und meinen Eltern für den warmen Rückhalt und die vorbehaltlose Unterstützung.

Lebenslauf

Martin Jenkner

geboren am 30. Mai 1968

in Aalen/Württemberg

1974-1978	Mittelschule, Heidenheim
1978-1987	Max-Planck-Gymnasium, Heidenheim
1987	Abitur
1987-1989	Zivildienst, Lebenshilfe Ulm e.V.
1989-1995	Physik-Studium, Universität Ulm
1994-1995	Diplomarbeit: "Optimierung der Kopplung von Neuronen und Feldeffekttransistoren", Universität Ulm, Abteilung Biophysik / Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Membran- und Neurophysik, Martinsried
Seit 1995	Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Membran- und Neurophysik, Martinsried