

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

Fluoreszenzspektroskopische Messung des spezifischen Elektrolytwiderstands in der Adhäsionsregion des Neuron-Silizium-Kontakts

Raimund Johannes Gleixner

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. S. Fischer
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. J. Rädler
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 10.11.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 15.01.2004 angenommen.

Zusammenfassung

Bei der Kultivierung von Zellen auf einem festen Substrat bildet sich zwischen der unteren Zellmembran und dem Substrat ein mit Elektrolyt gefüllter Bereich aus. Die Eigenschaften dieser Adhäsionsregion zwischen Zelle und Oberfläche bestimmen einige der entscheidenden Parameter der Neuron-Silizium-Kopplung. Einer der wichtigsten Parameter ist der zweidimensionale Flächenwiderstand in der Adhäsionsregion.

In dieser Arbeit wurde eine fluoreszenzspektroskopische Methode zur Messung dieses Flächenwiderstands weiterentwickelt, einerseits durch Verbesserung des Versuchsaufbaus, andererseits durch Korrektur des theoretischen Modells. In Verbindung mit FLIC, eine Methode zur Bestimmung des Zell-Substratabstandes, kann daraus der spezifische Elektrolytwiderstand in der Adhäsionsregion bestimmt werden.

Dadurch besteht die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen dem spezifischen Widerstand des Bades und dem der Adhäsionsregion zu untersuchen. Dazu wurde für eine Reihe von Badeelektrolyten mit unterschiedlichen spezifischen Widerständen Messreihen an HEK293-Zellen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der spezifische Elektrolytwiderstand in der Adhäsionsregion identisch ist mit dem der Extrazellulärlösung. Man erkennt vor allem die Möglichkeit, durch Manipulation des Badeelektrolyten Einfluss auf die Spalteigenschaften zu nehmen, um die Zell-Chip-Kopplung zu optimieren.

Außerdem wurde unter Standard-Bedingungen für MDCK, Ratten- und Schneckenneuronen ebenfalls der spezifische Elektrolytwiderstand der Adhäsionsregion bestimmt. Es konnte keine Abweichung im Vergleich zu Badeelektrolyten festgestellt werden.

Zusätzlich ist es von grossem Interesse, die Ionenkonzentration in der Adhäsionsregion zu ermitteln, da der spezifische Elektrolytwiderstand von ihr abhängt. Von grossem Interesse sind außerdem diese Ionenkonzentrationen, da die Signale von den in anderen Arbeiten verwendeten Feldeffekttransistoren stark durch die Ionenkonzentration beeinflusst werden. Vorbereitend zur Anwendung von ionensensitiven Farbstoffen in der Adhäsionsregion wurde die Detektion eines Konfokalmikroskops optimiert, um die Fluoreszenzanregung präziser messen zu können. Das Anregungslicht wird akustooptisch moduliert und eine Lock-In-Methode zur Auswertung angewandt. Bei gleichzeitiger Verwendung zweier Anregungswellenlängen ist die Methode sehr gut geeignet zur Anwendung ratiometrischer Farbstoffe. Mit Hilfe eines pH-sensitiven Farbstoffes wurde die praktische Anwendbarkeit der Methode verifiziert.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Inhaltsverzeichnis	iii
1 Zellen auf Silizium	1
2 Theoretische Modelle des Zell-Chip-Kontakts	5
2.1 Flächenkontaktmodell	5
2.2 Punktkontaktmodell	19
2.3 Vergleich der Modelle	26
3 Methoden	31
3.1 Messung des Zell-Substratabstands	31
3.2 Spaltcharakterisierung mittels spannungssensitiver Farbstoffe	33
3.3 Ratiometrische pH-Messung	41
3.4 Farbstoffe	46
3.5 Zellkultur	49
3.6 Vorbereitung der Chips	53
4 Bestimmung des spezifischen Spaltwiderstandes	57
4.1 Zell-Substrat-Abstand bei HEK293	57
4.2 Schichtwiderstand bei HEK293	61
4.3 Transienten	70
4.4 MDCK-Zellen	76
4.5 Rattenneuronen	80
4.6 Schneckenneuronen	85
5 Ergebnisse - pH-Imaging	89
5.1 Charakterisierung der verwendeten Farbstoffe	89
5.2 Test der Apparatur	90
5.3 Scheinbarer pK-Wert von HAF in der Membran von HEK-293	94
5.4 Anwendungsmöglichkeit ratiometrischer Messverfahren	96

6 Zusammenfassung und Ausblick	97
6.1 Spezifischer Spaltwiderstand	97
6.2 Ionenkonzentration	97
Anhang	99
A Flächenkontaktmodell für runde Zelle	99
B Stimulation Stufenförmiger Pulse	102
C Anfärbemethoden	105
D Titrationskurven für mehrere Protonierungsgrade	106
Verwendete Abkürzungen	107
Literaturverzeichnis	109
Danksagung	113

Kapitel 1

Zellen auf Silizium

Elektronische Geräte und Computer haben innerhalb der letzten Jahrzehnte Einzug in fast alle Bereiche des täglichen Lebens gehalten. Die Siliziumtechnologie ist dementsprechend aufgrund ihrer wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Bedeutung sehr hoch entwickelt. Es existieren daher viele ausgefeilte Verfahren und Methoden, um verschiedenste Systeme auf der *nm*-Skala herzustellen. Schon aufgrund der vergleichbaren Dimensionen ist es naheliegend, sich bei der Untersuchung biologischer Systeme dieser gut gefüllten "Werkzeugkiste" zu bedienen. Auf Siliziumchips kultivierte Zellen können mit verschiedenen Zielvorstellungen angewandt werden. Die Möglichkeit, nichtinvasiv und an vielen Orten parallel messen und stimulieren zu können, bietet z.B. interessante Möglichkeiten für neurobiologische Untersuchungen, sei es nun am Hirnschnitt oder an kleinen Netzwerken von Neuronen. Praktische Anwendungen dieser Neurochips klingen natürlich auch sehr verlockend, jedoch sind Systeme wie z.B. Neuroprothesen bisher nur in sehr einfachen Modellsystemen möglich. Weitergehende Anwendungen der Gehirn-Maschine-Kopplung bleiben somit weiterhin Hollywood vorbehalten.

Nicht nur Fragestellungen der Neurobiologie können mit Hilfe der Siliziumtechnologie bearbeitet werden. Es bieten sich die Möglichkeiten, Fragen der Adhäsion zu klären oder bestimmte Eigenschaften von Ionenkanälen zu erforschen. Es sind auch vielfältige Möglichkeiten denkbar, das Zell-Silizium-System als Biosensor zu verwenden.

Zur Entwicklung geeigneter Halbleiter-Bauelemente und geeigneter Methoden der Zellkultur ist es notwendig, einen Blick auf das Zell-Chip-System zu werfen. Die Zelle befindet sich in Elektrolytflüssigkeit (Nährmedium oder Extrazellulärlösung) und ist direkt auf der Oberfläche des Chips adhäriert. Die Zell-Chip-Kopplung hängt offensichtlich stark von den Eigenschaften der Kontaktregion ab. Dies sind die Eigenschaften des Substrats, der adhärierten Membran selbst und vor allem die Eigenschaften des extrazellulären Raums zwischen Adhäsionsmembran und Chipoberfläche.

Dem extrazellulären Raum kommt in einem komplexen vielzelligen Lebewesen eine große Bedeutung zu. Dem Zellverband muss durch mechanische Verbindung benachbarter Zellen die nötige Stabilität gegeben werden. Zusätzlich müssen Signale und

Stoffe gezielt zwischen Zellen weitergegeben werden und Volumina müssen voneinander getrennt werden, um nur wenige wichtige Aufgaben zu nennen. Um diese unterschiedlichen Aufgabenkomplexe erfüllen zu können, existiert eine Vielzahl von Proteinen und Molekülen. Speziell die Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Collagen oder Laminin sind verantwortlich für die mechanische Verbindung zwischen benachbarten Zellen. Man bedient sich dieser Moleküle um ein Substrat (Glas oder Chip) biokompatibel zu machen, um also die Adhäsion überhaupt erst zu ermöglichen. Dazu beschichtet man das Substrat mit geeigneten Proteinen. Zwischen der Zellmembran und dem Substrat bildet sich ein Spalt aus, gefüllt mit Extrazellulärflüssigkeit, Proteinen und Polysacchariden.

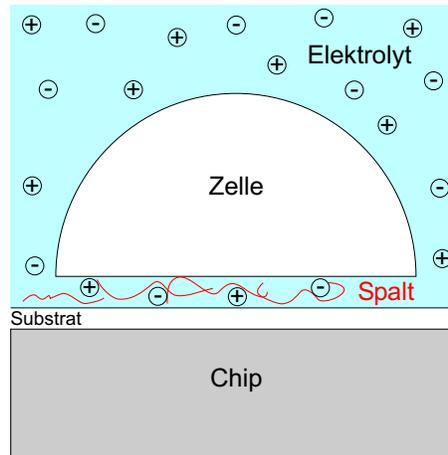


Abbildung 1.1: Zwischen der unteren Zellmembran und dem Substrat befindet sich ein mit Elektrolyt und adhäsionsvermittelnden Molekülen gefüllter Spalt

Aufgrund der Komplexität der Adhäsionsregion stellen sich viele Fragen bezüglich der Spalteigenschaften und deren Einfluss auf die Zell-Chip-Kopplung. Um diesen Einfluss verstehen zu können, ist es zuerst nötig, für die gewünschte Anwendung (z.B. Neurochip, Biosensor ...) die Zell-Chip-Kopplung in einem geeigneten Modell zu beschreiben. Zwei Gruppen von Parametern bestimmen die Zell-Chip-Kopplung. Die eine ist bestimmt durch die Technologie, z.B. durch die dielektrischen Eigenschaften des Substrats oder bei einem Sensor durch die Geometrie und Qualität des Sensors. Die andere Gruppe von Parametern ist bestimmt durch die Biologie, Oberflächen- und Elektrochemie. Wie gross ist der Zell-Substratabstand? Ob und wie verändern sich Ionenkonzentrationen und somit den spezifische Widerstand in der Adhäsionsregion? Lassen sich diese Spalteigenschaften gezielt beeinflussen und somit für die gewünschte Anwendung optimieren?

Ziel dieser Arbeit war es, die Adhäsionsregion mit unterschiedlichen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Diese Mikroskopie-Methoden haben insbesondere den Vorteil des besseren räumlichen Auflösungsvermögens im Vergleich zu

Transistormessungen. Durch Fluoreszenzmethoden hat man so Zugang zu Messgrößen die anders bei kleinen Zellen nicht zugänglich sind. Mit Hilfe spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoffe kann der Flächenwiderstand des Spaltelektrolyten bestimmt werden, eine der zentralen Größen der Zell-Chip-Kopplung. Dazu werden bei sinusförmiger Stimulation optisch orts aufgelöst Amplitude und Phase des Spannungsprofils über die Adhäsionsfläche bestimmt. Die so bestimmte Phase wird mit einem zweidimensionalen Kern-Mantel-Leiter-Modell verglichen. Der Zell-Substrat-Abstand ist bekannt durch Anwendung der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie. Daher kann der spezifische Widerstand des Elektrolyten im Spalt bestimmt werden.

Der spezifische Elektrolytwiderstand ist abhängig von der Ionenkonzentration und der Beweglichkeit der Ionen. Farbstoffe, die ihre Fluoreszenzeigenschaften abhängig von der Konzentration von Ionen ändern, bieten hier die Möglichkeit spezifisch für eine Ionensorte die Konzentration zu bestimmen. Bei einer eventuellen Veränderung des spezifischen Elektrolytwiderstands im Spalt wäre die Information über die Ionenkonzentration sehr wertvoll. Außerdem ist es für das genaue Verständnis von Transistormessungen wichtig, den Übergang vom Substrat zum Elektrolyten zu verstehen.

Kapitel 2

Theoretische Modelle des Zell-Chip-Kontakts

In diesem Kapitel werden zwei Modelle erarbeitet, mit denen der Zell-Silizium-Kontakt einer Einzelzelle beschrieben werden kann. In beiden Fällen betrachtet man die elektrischen Potentiale im Elektrolyt, im Zellinneren, im Spalt und im Silizium. Das ausführlichere Flächenkontaktmodell beschreibt den Zell-Chip-Kontakt orts aufgelöst. Der ohmsche Widerstand des Spalts wird als (spezifischer) Flächenwiderstand angenommen, die Membran und der Chip werden über ihre spezifischen Kapazitäten berücksichtigt. Das Flächenkontaktmodell ist jedoch nur auf einige Situationen anwendbar, da man nur in seltenen Fällen Zugang zu orts aufgelösten Daten hat.

Falls nur gemittelte Daten zur Verfügung stehen, bietet sich ein integrales Modell an. Hier wird das Potential im Spalt ortsunabhängig angenommen. Der ohmsche Widerstand des Spalts wird über einen einzigen Ersatzwiderstand beschrieben. Das sogenannte Punktkontaktmodell ist dadurch einfacher zu handhaben und somit leichter interpretierbar. Wie ein Vergleich zeigt beschreiben beide Modelle die wesentlichen Eigenschaften des Zell-Chip-Kontakts sehr ähnlich. Es muss allerdings der Zusammenhang zwischen dem globalen Ersatzwiderstand des Punktkontaktmodells und dem Flächenwiderstand des Punktkontaktmodells hergestellt werden.

2.1 Flächenkontaktmodell

Im Flächenkontaktmodell (siehe Abbildung 2.1) wird der Zell-Chip-Kontakt zweidimensional orts aufgelöst beschrieben.

Das Potential im Spalt ϕ_j wird als Funktion von x und y angenommen.¹ Die Eigenschaften des Spalt-Elektrolyten werden durch den spezifischen zweidimensionalen

¹ Ist eine Zelle auf einem Substrat adhäriert, so ist der Abstand d_j zwischen Zellmembran und Substratoberfläche klein im Vergleich zu den Abmessungen der Zelle. Die Zellgröße ist in der Größenordnung von wenigen $10\mu m$, der Zell-Substrat-Abstand in der Größenordnung von $50 - 100nm$.

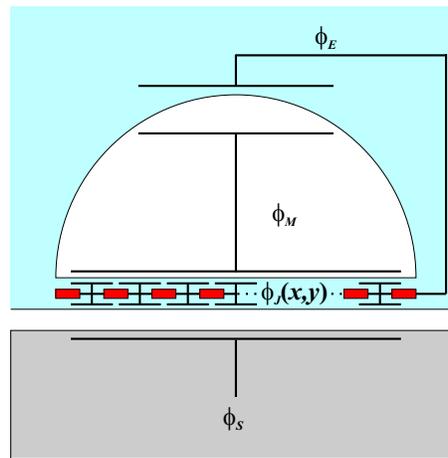


Abbildung 2.1: Das Flächenkontaktmodell. Die Systemeigenschaften sind bestimmt durch die spezifischen Kapazitäten von Zellmembran (c_M) und Substrat (c_S) und durch den spezifischen Flächenwiderstand r_J der Adhäsionsfläche, veranschaulicht durch die kleinen Widerstände und Kapazitäten

Spaltwiderstand $r_J = \frac{\rho_J}{d_J}$ bestimmt. Man nimmt an, dass der Zell-Substrat-Abstand d_J und der spezifische Widerstand ρ_J im Spalt konstant sind. Damit ergibt sich ein konstantes r_J . Die Membraneigenschaften sind bestimmt durch die spezifische Kapazität c_M und die spezifische Membranleitfähigkeit g_M . Jedoch ist die Membranleitfähigkeit sehr gering, weshalb sie im weiteren nicht berücksichtigt wird. Das Substrat (Silizium- oder Titanoxid) ist nichtleitend, weshalb die Chipeigenschaften nur über die spezifische Substratkapazität c_S berücksichtigt werden. Die obere Membran hat die selben Eigenschaften wie die untere und wird durch eine Ersatzkapazität berücksichtigt.

Definitionen

- ϕ_E ist Referenz.
- $V_S = \phi_S - \phi_E$ Chipspannung bezüglich Bad
- $V_M = \phi_M - \phi_E$ Spannung im Zellinneren bezüglich Bad. (Spannung über freie Membran häufig auch als V_{FM} bezeichnet.)
- $V_J(x,y) = \phi_J(x,y) - \phi_E$ Spannung zwischen Spaltinnerem und Bad
- $V_{JM}(x,y) = \phi_M - \phi_J(x,y)$ Spannung über Adhäsionsmembran. (JM = "Junction Membrane").
- $V_{JS}(x,y) = \phi_S - \phi_J(x,y)$ Spannung zwischen Chip und Spalt.
- A_{JM} Adhäsionsfläche

- A_{FM} Fläche der freien (oberen) Membran
- $\beta_M = \frac{A_{JM}}{A_{FM}}$ Flächenverhältnis zwischen oberer und unterer Membran
- Die effektive spezifische Membrankapazität

$$\tilde{c}_M = \frac{c_M}{1 + \beta_M} \quad (2.1)$$

\tilde{c}_M entspricht der spezifischen Kapazität zweier in Reihe geschalteter spezifischer Kapazitäten mit c_M und $\beta_M c_M$.

2.1.1 Ladungserhaltung im Spalt

Um eine Gleichung herzuleiten, welche das System beschreibt, betrachtet man die Strombilanz im Spalt. Dazu verwendet man die dreidimensionale Kontinuitätsgleichung aus der klassischen Elektrodynamik. (Um Verwechslungen mit dem spezifischen Widerstand ρ zu vermeiden, wird die Ladungsdichte mit q bezeichnet.)

$$-\partial_t q_{3D} = \nabla \cdot \vec{j} \quad (2.2)$$

$$-\partial_t q_{3D} = \nabla_{xy} \vec{j}_{xy} + \partial_z j_z \quad (2.3)$$

Man betrachtet nun das Spaltinnere. Der Spalt wird zweidimensional ortsaufgelöst beschrieben. Dazu definiert man die zweidimensionale Stromdichte \vec{J}_{xy} und zweidimensionale Ladungsdichte q_J im Spalt:

$$\vec{J}_{xy} = \vec{j}_{xy} d_J \quad (2.4)$$

$$q_J = q_{3D} d_J \quad (2.5)$$

Die Ableitung $\partial_z j_z$ wird diskret dargestellt:

$$\partial_z j_z = \frac{j_{up} - j_{down}}{d_J} \quad (2.6)$$

Angewandt auf Gleichung (2.3) erhält man:

$$-\partial_t \frac{q_J}{d_J} = \nabla_{xy} \frac{\vec{J}_{xy}}{d_J} + \frac{j_{up} - j_{down}}{d_J} \quad (2.7)$$

Da d_J nicht vom Ort abhängt, erhält man durch Multiplikation mit d_J :

$$-\partial_t q_J = \nabla_{xy} \vec{J}_{xy} + j_{up} - j_{down} \quad (2.8)$$

j_{up} und j_{down} sind Umladeströme der Membran- und Chipkapazität. Der laterale Strom \vec{J}_{xy} wird bestimmt durch das Ohmsche Gesetz:

$$\vec{J}_{xy} = \frac{1}{r_J} \vec{E}_{xy} = -\frac{1}{r_J} \nabla_{xy} V_J \quad (2.9)$$

Außerdem gilt:

$$\partial_t q_J = 0 \quad (2.10)$$

Daraus erhält man die folgende Gleichung.

$$c_M \partial_t V_{JM} + c_S \partial_t V_{JS} = \vec{\nabla}_{xy} \left(-\frac{1}{r_J} \vec{\nabla}_{xy} V_J \right) \quad (2.11)$$

Die Umladeströme der Membran- und Chipkapazitäten (linke Seite) sind die Quellen der zweidimensionalen Stromdichte (rechte Seite).

Gleichung (2.11) muss so umgeformt werden, dass sie nur von einer Funktion abhängt. Die experimentell zugängliche Messgröße ist V_{JM} . Trotzdem ist es sinnvoll, Gleichung (2.11) in Abhängigkeit von V_J zu formulieren und V_{JM} aus V_J zu berechnen. Diese Vorgehensweise ist begründet in den verschiedenen Randbedingungen.

Betrachtet man die Randbedingung von V_J , so geht V_J am Rand der Adhäsionsfläche über in die Badspannung. V_J ist so definiert, dass das Bad als Referenz gilt. Man erhält die Randbedingung

$$V_J(\text{Rand}) = 0$$

Die Adhäsionsmembran geht über in die freie Membran. Für V_{JM} muss daher am Rand gelten:

$$V_{JM}(\text{Rand}) = V_M$$

Man hat eine komplizierte Randbedingung, die von der Lösung selbst abhängt. Der Lösungsweg gestaltet sich dadurch deutlich komplizierter, insbesondere für die numerische Lösung.

Gleichung (2.11) wird also abhängig von V_J formuliert. Mit $V_{JM} = V_M - V_J$ und $V_{JS} = V_S - V_J$ ergibt sich:

$$c_M \partial_t V_M - c_M \partial_t V_J + c_S \partial_t V_S - c_S \partial_t V_J = -\frac{\Delta V_J}{r_J} \quad (2.12)$$

oder:

$$\frac{\Delta V_J}{r_J} - (c_S + c_M) \partial_t V_J = -c_S \partial_t V_S - c_M \partial_t V_M \quad (2.13)$$

$\Delta = \left(\vec{\nabla}_{xy} \right)^2 = \partial_x^2 + \partial_y^2$ bezeichnet den Laplaceoperator in der Spaltebene.

2.1.2 Die Freie Membran

Gleichung (2.13) ist noch abhängig von V_M . Ein Zusammenhang zwischen V_M und V_{JM} kann gefunden werden, indem man die Strombilanz für das Zellinnere betrachtet. Die Summe der in das Zellinnere fließenden Ströme muss identisch Null sein (Elektroneutralität des Zellinneren). Daher muss gelten:

$$\int_{A_{FM}} dA j = - \int_{A_{JM}} dA j \quad (2.14)$$

Für die Stromdichte gilt:

$$j_{(J)M} = c_M \partial_t V_{(J)M}$$

Setzt man dies in Gleichung (2.14) ein, so erhält man:

$$A_{FM} c_M \partial_t V_M = -A_{JM} c_M \int_{A_{JM}} dA \frac{\partial_t V_{JM}}{A_{JM}} \quad (2.15)$$

$$\partial_t V_M = -\beta_M \partial_t \langle V_{JM} \rangle \quad (2.16)$$

$\langle V_{JM} \rangle$ bezeichnet hierbei den Mittelwert von V_{JM} über die Adhäsionsmembran. Gleichung (2.16) beschreibt den Zusammenhang zwischen Zeitableitungen von V_M und $\langle V_{JM} \rangle$. Setzt man noch $V_{JM} = V_M - V_J$ ein und berücksichtigt, dass V_M nicht vom Ort abhängt:

$$\partial_t V_M = \beta_M \partial_t \langle V_J \rangle - \beta_M V_M \quad (2.17)$$

$$\partial_t V_M = \frac{\beta_M}{1 + \beta_M} \partial_t \langle V_J \rangle \quad (2.18)$$

2.1.3 Die Gleichung

Setzt man (2.18) in (2.13) ein, so erhält man die gesuchte Gleichung, die nur V_J enthält.

$$\frac{\Delta V_J}{r_J} - (c_S + c_M) \partial_t V_J = -c_S \partial_t V_S - \tilde{c}_M \beta_M \partial_t \langle V_J \rangle \quad (2.19)$$

Bei Gleichung (2.19) handelt es sich um eine inhomogene lineare partielle Integral-Differentialgleichung zweiter Ordnung. Durch den Mittelwert im letzten Term von (2.19) wird der Einfluss der oberen Membran mitberücksichtigt. Der letzte Term hängt zudem als einziger vom Flächenverhältnis β_M ab und beschreibt den Einfluss der oberen Membran. Für $\beta_M = 0$ erhält man den Fall $V_M = 0$ und der letzte Term verschwindet. Dies entspricht einer konstanten Intrazellulärspannung, wie man sie durch Voltage-Clamp erreichen kann.

Man möchte das Flächenkontaktmodell für den Fall sinusförmiger Stimulation lösen. Daher führt man eine Fouriertransformation von Gleichung (2.19) durch:

$$\frac{\Delta V_J}{r_J} - i\omega(c_S + c_M)V_J = -c_S i\omega V_S - \tilde{c}_M \beta_M i\omega \langle V_J \rangle \quad (2.20)$$

2.1.4 Vereinfachung der Gleichung durch Substitution

Man möchte eine partielle Differentialgleichung finden, die nicht mehr von dem Integral $\langle V_J \rangle$ abhängt. Dies lässt sich erreichen, indem man in Gleichung (2.20) eine geschickte Substitution durchführt:

$$V_J(x, y) = \gamma_J^\beta u(x, y) \quad (2.21)$$

Dabei wird \mathcal{V}_J^β so definiert, dass folgende Eigenschaft erfüllt ist:

$$i\omega(c_S + c_M)\mathcal{V}_J^\beta = c_S i\omega V_S + \tilde{c}_M \beta_M i\omega \langle V_J \rangle \quad (2.22)$$

Somit erhält man:

$$(c_S + c_M)\mathcal{V}_J^\beta = c_S V_S + \tilde{c}_M \beta_M \mathcal{V}_J^\beta \langle u \rangle \quad (2.23)$$

$$\mathcal{V}_J^\beta = \frac{c_S V_S}{c_S + c_M - \tilde{c}_M \beta_M \langle u \rangle} \quad (2.24)$$

\mathcal{V}_J^β ist proportional zur Stimulationsspannung V_S . Gleichung (2.20) wird dadurch vereinfacht zu:

$$\Delta u - i\omega r_J (c_S + c_M) u = -i\omega r_J (c_S + c_M) \quad (2.25)$$

Bei Gleichung (2.25) handelt es sich um eine inhomogene lineare partielle Differentialgleichung zweiter Ordnung, die von keinem Integral mehr abhängt. $u(x, y)$ ist dimensionslos und kann somit einfach durch elementare Funktionen ausgedrückt werden. Die Randbedingung lautet $u(Rand) = 0$ und bleibt durch die Substitution unberührt. Wenn man eine Lösung u zu Gleichung (2.25) gefunden hat, berechnet man $\langle u \rangle$ und daraus $V_J = \mathcal{V}_J^\beta u$.

Gleichung (2.25) ist nicht Abhängig von β_M . Die Abhängigkeit von β_M steckt in \mathcal{V}_J^β . Der Einfluss der Oberen Membran wird also nur über Multiplikation mit einem Faktor berücksichtigt. Hat man beispielsweise eine Lösung $V^{\beta=0}$ für $\beta_M = 0$ gefunden so kann mit

$$V_J = \frac{\mathcal{V}_J^{\beta \neq 0}}{\mathcal{V}_J^{\beta=0}} V_J^{\beta=0} = \frac{c_S + c_M - \tilde{c}_M \beta_M \langle u \rangle}{c_S + c_M} V_J^{\beta=0} = \left(1 - \frac{\tilde{c}_M \beta_M \langle V_J^{\beta=0} \rangle}{c_S V_S} \right) V_J^{\beta=0} \quad (2.26)$$

die Spaltspannung V_J berechnen, also durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor.

2.1.5 Analytische Lösung für runde Zellgeometrie

Betrachtet wird eine runde Adhäsionsfläche mit Radius a_J . Wenn man das Flächenkontaktmodell für eine runde Zellgeometrie lösen will, ist es nötig, den Laplaceoperator in Polarkoordinaten darzustellen.

$$\Delta \rightarrow \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial^2}{\partial a^2} + \frac{1}{a^2} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \quad (2.27)$$

Aus Symmetriegründen braucht die φ -Komponente nicht berücksichtigt werden. Für (2.25) erhält man dadurch die inhomogene modifizierte Besselsche Differentialgleichung nullter Ordnung:

$$\partial_a^2 u + \frac{\partial_a u}{a} - \gamma^2 u = -\gamma^2 \quad (2.28)$$

Die Längskonstante γ wurde folgendermaßen definiert:

$$\gamma := (1+i) \sqrt{\frac{\omega r_J (c_S + c_M)}{2}} \quad (2.29)$$

Nach einer längeren Rechnung (Siehe Anhang A) ergibt sich folgende Lösung für V_J :

$$V_J = \frac{c_S (I_0(\gamma a_J) - I_0(\gamma a))}{(c_S + c_M) I_0(\gamma a_J) - \tilde{c}_M \beta_M I_2(\gamma a_J)} V_S \quad (2.30)$$

Mit Hilfe von

$$V_{JM} = V_M - V_J = \frac{\beta_M}{1 + \beta_M} \langle V_J \rangle - V_J \quad (2.31)$$

(siehe Gleichung (2.18)) lässt sich V_{JM} berechnen:

$$V_{JM} = \frac{c_S [-(1 + \beta_M) I_0(\gamma a_J) + \beta_M I_2(\gamma a_J) + (1 + \beta_M) I_0(\gamma a)]}{(1 + \beta_M)(c_S + c_M) I_0(\gamma a_J) - c_M \beta_M I_2(\gamma a_J)} V_S \quad (2.32)$$

Definition der Zeitkonstante

Der Übersichtlichkeit halber ist es praktisch, die Lösung durch leichter interpretierbare Größen darzustellen. Man formuliert deshalb die Lösung in Abhängigkeit des relativen Radius $\frac{a}{a_J}$ und der Zeitkonstante

$$\tau := \frac{(c_S + c_M) r_J a_J^2}{5,783} \quad (2.33)$$

Dadurch ergibt sich:

$$\gamma a = (1+i) 4,262 \sqrt{v \tau} \frac{a}{a_J} \quad (2.34)$$

Die Konstante 5,783 in der Definition von τ erscheint an dieser Stelle willkürlich. Sie ist aber sinnvoll, um zu erreichen, dass die Zeitkonstante des noch zu beschreibenden Punktkontaktmodells bis auf eine kleine Korrektur² identisch ist mit der des Flächenkontaktmodells.

2.1.6 Diskussion der analytischen Lösung

In Abbildung 2.2 zeigt Phase und Amplitude von V_{JM} in Abhängigkeit der Frequenz für die Mitte der Adhäsionsfläche und gemittelt über die gesamte Fläche. Man erkennt eine der wesentlichen Eigenschaften des Modells. Es handelt sich um einen Hochpass,

²Im Punktkontaktmodell ist die Zeitkonstante auch abhängig von $\beta_M \cdot c_M$ geht über in $\tilde{c}_M = \frac{c_M}{1 + \beta_M}$

das heisst die Amplitude ist für kleine Frequenzen gering und nähert sich für bei hohen Frequenzen dem Grenzwert

$$V_{JM}^{\infty} = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)} V_S \quad (2.35)$$

an. Die Phase nimmt für niedrige Frequenzen den Wert -90° , für hohe Frequenzen -180° an. In den Grenzfällen verhält sich V_{JM} wie ein Hochpass aus passiven Bauelementen (RC-Glied, jedoch um 180° zur üblichen Bezeichnung phasenversetzt).

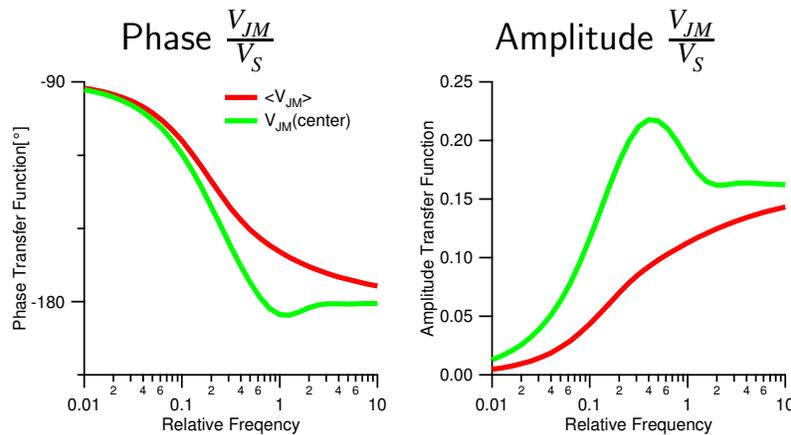


Abbildung 2.2: Amplitude und Phase der analytischen Lösung für verschiedene Frequenzen, betrachtet für $a = 0$ und über die gesamte Adhäsionsfläche gemittelt. Die Frequenz wird aufgetragen in Einheiten der inversen Zeitkonstante τ^{-1} . $\frac{c_S}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$

Abweichend von der Frequenzcharakteristik eines RC-Hochpasses ist auffallend, dass die Amplitude in der Mitte der Adhäsionsfläche für Frequenzen nahe $\nu = \tau^{-1}$ ein Maximum annimmt, und die Phase ein Minimum annimmt.

Um die räumlichen Eigenschaften erkennen zu können, betrachtet man die Phasen und Amplitudenprofile der theoretischen Lösung in Abbildung 2.3:

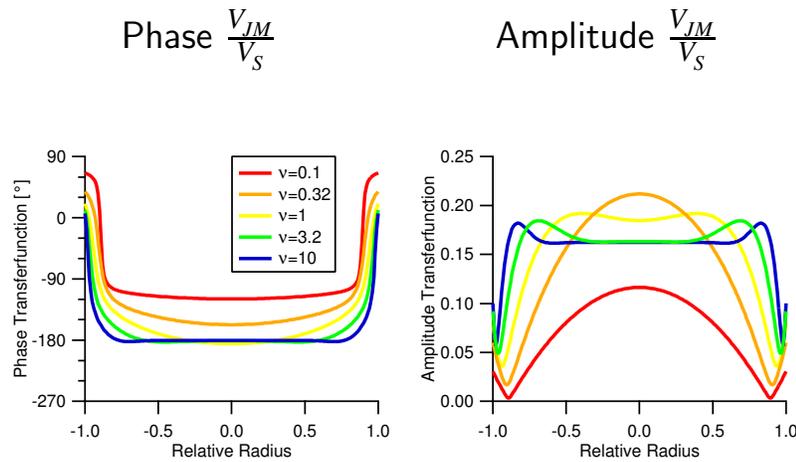


Abbildung 2.3: Amplituden- und Phasenprofile für ausgewählte Frequenzen. (Frequenz aufgetragen in Einheiten von τ^{-1}). $\frac{c_s}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$

Vergleicht man die unterschiedlichen Profile miteinander, so erkennt man wieder die Frequenzcharakteristik. Wesentlich interessanter ist das charakteristische Aussehen der Profile. Dieses ist begründet in der Randbedingung:

$$V_{JM}(\text{Rand}) = V_M = -\beta_M \langle V_{JM} \rangle$$

Damit diese Bedingung erfüllt sein kann, muss V_{JM} über den dominierenden Teil der Adhäsionsfläche um ca. 180° zum Rand phasenversetzt sein (Vorzeichen!). Deshalb kann man im Phasenprofil nahe am Rand einen steilen Abfall der Phase um ca. 180° erkennen. Das Aussehen der Amplitudenprofile lässt sich nicht so einfach mit physikalischen Argumenten begründen. Die Amplitude am Rand ist deutlich kleiner als im zentralen Bereich, da

$$\beta_M |\langle V_{JM} \rangle| \underbrace{\leq}_{\beta_M < 1} |\langle V_{JM} \rangle| < \langle |V_{JM}| \rangle < \max(|V_{JM}|)$$

gilt. Das für die Amplitudenprofile so charakteristische Minimum nahe am Rand ergibt sich aus der komplexen Lösung der partiellen Differentialgleichung. Man betrachtet eine Parameterdarstellung der Lösung für V_{JM} dargestellt in der komplexen Ebene, parametrisiert nach dem Radius:

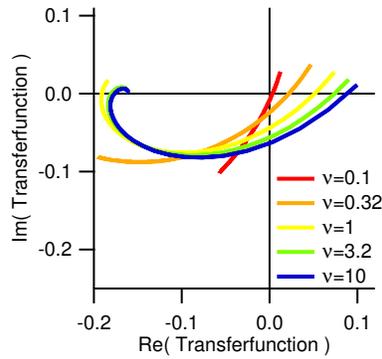


Abbildung 2.4: Parameterdarstellung der Lösung für verschiedene Frequenzen. Als Laufparameter dient der Radius. (Frequenz ν aufgetragen in Einheiten von τ^{-1}). $\frac{c_S}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$.

Die Punkte für $a = a_J$ liegen im ersten Quadranten, die für $a = 0$ im dritten bzw. zweiten Quadranten. Die Punkte sind verbunden durch eine Linie durch den vierten Quadranten. Im vierten Quadranten kommt diese Linie dem Ursprung sehr nahe, dieser geringe Abstand entspricht einem Minimum der Amplitude.

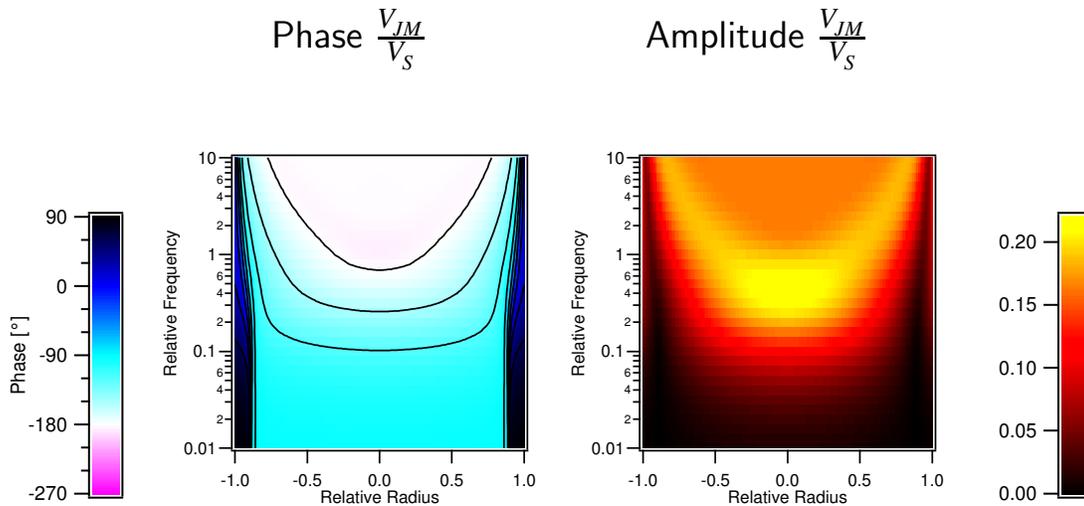


Abbildung 2.5: Lösung des Flächenkontaktmodells für runde Zellgeometrie in Abhängigkeit der relativen Frequenz (d.h. in Einheiten von τ^{-1}). $\frac{c_S}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$

Abbildung 2.5 zeigt Falschfarbenplots der analytischen Lösung, gelöst für V_{JM} . Aufgetragen sind Amplitude und Phase von V_{JM} gegen den Radius und die Frequenz. Die zuvor besprochenen charakteristischen Eigenschaften der Phasen- und Amplitudenprofile sowie die Frequenzcharakteristik sind ebenfalls zu erkennen. Falschfarbenbilder werden später häufig verwendet um die Ergebnisse der Messungen darzustellen.

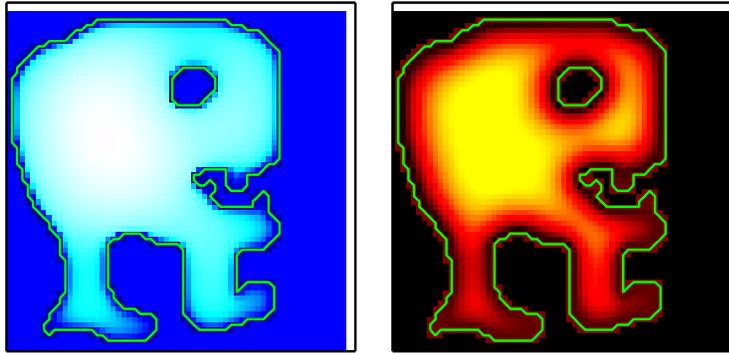


Abbildung 2.6: Das Flächenkontaktmodell kann numerisch für beliebige Geometrien gelöst werden links die Phase, rechts die Amplitude.

2.1.7 Numerische Lösung

Die Diskussion für runde Zellgeometrie ist sehr wichtig für das Verständnis des Flächenkontaktmodells. Die zu untersuchenden Zellen sind jedoch nicht rund. Es ist daher nötig, das Flächenkontaktmodell für beliebige Zellgeometrien zu lösen.

SOR

Hierzu wurde der SOR-Algorithmus aus [6] verwendet um Gleichung (2.25) zu lösen. Der verwendete Algorithmus basiert auf dem Quelltext aus [34], jedoch werden bei jedem Iterationsschritt nur die Werte auf einer zuvor definierten Fläche ausgetauscht. Außerhalb dieser bleiben die Werte gleich Null.

$\langle u \rangle$ und \mathcal{V}_J^β werden numerisch berechnet. So dass man mit

$$V_{JM} = \mathcal{V}_J^\beta \left(\frac{\beta_M}{1 + \beta_M} \langle u \rangle - u \right) \quad (2.36)$$

die gesuchte Membranspannung V_{JM} erhält. Abbildung 2.6 zeigt exemplarisch die numerische Lösung für beliebige Zellgeometrie. Die in 2.1.6 diskutierten charakteristischen Eigenschaften sind ebenfalls zu erkennen. Von außen nach innen fällt die Phase sehr schnell ab. Die Amplitude ist in der Zellmitte maximal, nimmt in der Nähe des Randes ein Minimum an, steigt am Zellrand wieder leicht an.

2.1.8 Transienten

Möchte man einen Vergleich zwischen Flächenkontaktmodell und dem noch zu beschreibenden Punktkontaktmodell erstellen, ist es hilfreich, das Flächenkontaktmodell in der Zeit zu lösen. [6] und [10] beschreiben eine Möglichkeit, das Flächenkontaktmodell nach Exponentialfunktionen zu entwickeln; diese folgen dem Ansatz aus [13].

Nach einem Spannungssprung der Höhe V_S zum Zeitpunkt $t = 0$ kann man V_J bzw. V_{JM} als Reihe von Exponentialfunktionen darstellen. Am einfachsten macht man dies für den Fall einer konstanten Intrazellulärspannung (z.B. erreichbar durch Voltage-Clamp).³ Diesen Fall erhält man, wenn man in Gleichung (2.19) $\beta_M = 0$ setzt. Nach einem Übergang zu Polarkoordinaten erhält man für Zeiten $t > 0$

$$\frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial a} \left(a \frac{\partial}{\partial a} V_J \right) - (c_S + c_M) r_J \partial_t V_J = 0 \quad (2.37)$$

Mit dem Separationsansatz $V_J(a, t) = v(a) e^{-\frac{t}{\tau}}$ erhält man

$$\frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial a} \left(a \frac{\partial}{\partial a} v \right) + \underbrace{(c_S + c_M) r_J \tau^{-1}}_{\alpha^2} v = 0 \quad (2.38)$$

Dies ist eine Besselsche Differentialgleichung nullter Ordnung mit folgender Besselfunktion als Lösung:

$$J_0(\alpha_n a) \quad (2.39)$$

Die andere Lösung $Y_0(\alpha_n a)$ der Besselschen Differentialgleichung ist ausgeschlossen, da Y_0 für $a = 0$ divergent ist. Damit die Randbedingung $V_J(a) = 0$ erfüllt ist, muss τ so gewählt werden, dass $J_0(\alpha_n a_J) = 0$ gilt. $J_0(x)$ hat Nullstellen bei:

$$x_1 = 2,40483$$

$$x_2 = 5,52008$$

$$x_3 = 8,65373$$

$$x_4 = 11,7915$$

$$x_5 = 14,9309$$

...

(Siehe [1].) Für jede Nullstelle x_n berechnet man die dazugehörige Zeitkonstante τ_n :

$$\sqrt{(c_S + c_M) r_J \tau_n^{-1} a_J} = x_n \quad (2.40)$$

$$\tau_n = \frac{(c_S + c_M) r_J A_{JM}}{x_n^2 \pi} \quad (2.41)$$

³ Wenn man diese Rechnung für $\beta_M \neq 0$ durchführt, ist eine analytische Lösung wesentlich schwieriger. Da man nicht die tabellierten Nullstellen von J_0 verwenden kann, muss man für jedes α_n eine implizite Gleichung lösen. Es wäre aber möglich, mit der lokalen Näherung aus [24] zu arbeiten. Dies ist einfach möglich, indem man in Gleichung (2.37) c_M durch \tilde{c}_M ersetzt ([10]).

Die Funktionen $J_0(\alpha_n a)$ sind Lösungen eines Eigenwertproblems. Somit sind die zu den Eigenwerten gehörigen Eigenfunktionen orthogonal zueinander d.h.:⁴

$$\langle J_0(\alpha_n a) | J_0(\alpha_m a) \rangle = \int_0^{a_J} da (a J_0(\alpha_n a) J_0(\alpha_m a)) = \delta_{nm} \frac{1}{2} a_J^2 J_1(\alpha_n a_J)^2 \quad (2.44)$$

Man kann die Lösung also nach den normierten Funktionen

$$v_n = \frac{\sqrt{2} J_0(\alpha_n a)}{a_J J_1(\alpha_n a_J)} \quad (2.45)$$

entwickeln. Kennt man die Anfangsbedingung für $V(a, t = 0)$. So gilt:

$$V_J(r, t) = \sum_n \frac{2 J_0(\alpha_J a)}{a_J^2 J_1(\alpha_J a_J)^2} e^{-\frac{t}{\tau_n}} \int_0^{a_J} da (a V_J(a, t = 0) J_0(\alpha_n a)) \quad (2.46)$$

Nach einem Spannungssprung der Höhe V_S gilt $V_J(a, t \rightarrow 0) = \frac{V_S c_S}{c_S + c_M}$. Zur Berechnung des Integrals wendet man Gleichung (A.9) an und erhält:

$$V_J(r, t) = \frac{V_S c_S}{c_S + c_M} \sum_n \frac{2 J_0(\alpha_n a)}{\alpha_n a_J J_1(\alpha_n a_J)} e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (2.47)$$

Mittelt man über einen Teil der Fläche mit $a < a_G$, so erhält man nach Anwendung von Gleichung (A.10)

$$\langle V_J(r, t) \rangle_{a < a_G} = \frac{V_S c_S}{c_S + c_M} \sum_n \frac{4 J_1(\alpha_n a_G)}{\alpha_n^2 a_J a_G J_1(\alpha_n a_J)} e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (2.48)$$

Speziell für $a_G = a_J$ gilt also

$$\langle V_J(r, t) \rangle = \frac{V_S c_S}{c_S + c_M} \sum_n \frac{4}{\alpha_n^2 a_J^2} e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (2.49)$$

Abbildung 2.7 zeigt die orts aufgelöste Transiente. Für $t = 0$ existiert eine konstante Spannung über die gesamten Fläche. Diese nimmt mit der Zeit ab, in der Mitte am langsamsten, am Rand besonders schnell. Die Gleichung (2.48) wird später verwendet, um zwischen Punkt- und Flächenkontaktmodell zu vergleichen. Damit lässt sich einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Parametern der Modelle herstellen.

⁴ Das Integral berechnet man mit partieller Integration:

$$\int_0^{x_n} dx (x J_0^2) = \frac{1}{2} x^2 J_0^2 \Big|_{x=0}^{x_n} - \int_0^{x_n} dx (x^2 J_0 J_0') \quad (2.42)$$

Der erste Term ist für $x = 0$ und $x = x_n$ gleich Null. Auf den zweiten wendet man die Identitäten $J_0' = -J_1$ und $x J_0 = x J_1' + J_1$ an ([1]).

$$\int_0^{x_n} dx (x J_0^2) = \int_0^{x_n} dx (x^2 J_1' J_1 + x J_1^2) = \frac{1}{2} x^2 J_1^2 \Big|_{x=0}^{x_n} = \frac{1}{2} x_n^2 J_1(x_n)^2 \quad (2.43)$$

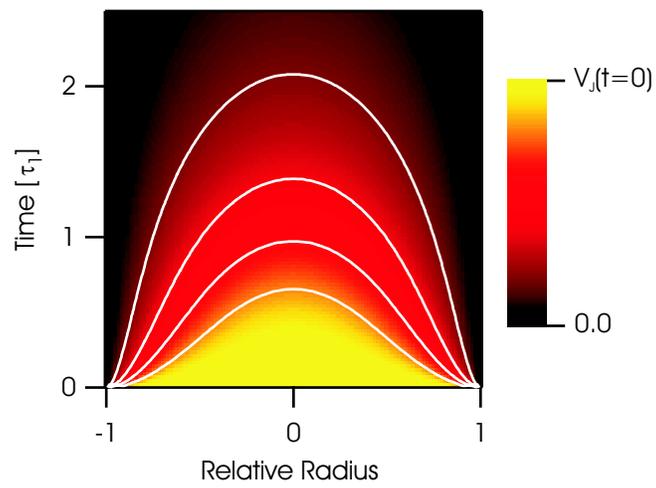


Abbildung 2.7: Ortsaufgelöste Transiente nach Spannungssprung

2.2 Punktkontaktmodell

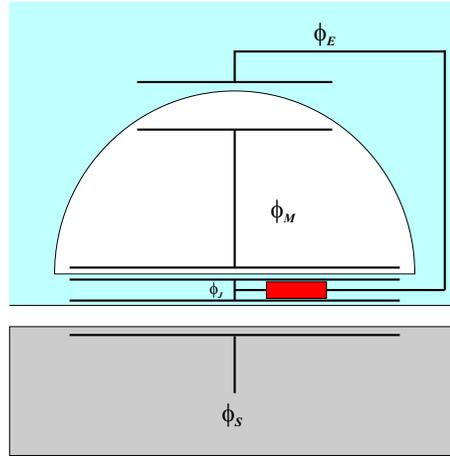


Abbildung 2.8: Das Ersatzschaltbild des Punktkontaktmodells. Anstatt des spezifischen Flächenwiderstandes wird ein einziger Spaltwiderstand angenommen.

Für die Interpretation nicht orts aufgelöster Messungen, wie z.B. Transistormessungen, hat sich ein einfacheres theoretisches Modell bewährt. Anstatt eines spezifischen zweidimensionalen Flächenwiderstands r_J im Spalt wird ein einziger Spaltwiderstand R_J und für die Adhäsionsmembran eine einzige Kapazität $C_{JM} = c_{JM} * A_{JM}$ verwendet. V_J bzw. V_{JM} sind also nur noch Funktionen der Zeit, nicht mehr des Ortes. Durch diese Vereinfachungen ist es auch einfacher möglich, eine nichtsinusförmige Anregung zu simulieren. In [9] wurde beispielsweise mit rechteckförmiger Anregung gearbeitet. Außerdem kann man auch andere Effekte zu berücksichtigen, wie z.B. den Einfluss von spannungssensitiven Ionenkanälen [37].

2.2.1 Die Gleichungen

Analog zur Herleitung des Flächenkontaktmodells, betrachtet man die Ladungserhaltung im Spalt. Durch Anwendung der Kirchhoffschen Knotenregel erhält man:⁵

$$0 = -I_{CJ} - I_{JM} + I_J \quad (2.50)$$

$$0 = -C_S \partial_t V_{JS} - C_{JM} \partial_t V_{JM} + \frac{V_J}{R_J} \quad (2.51)$$

Die Größen c_M und c_S sind bekannt. Deshalb ist es geschickt, durch die Fläche A_{JM} zu teilen, um zu spezifischen Größen überzugehen. Dabei wird $g_J := \frac{1}{R_J A_{JM}}$ definiert.

$$0 = -c_S \partial_t V_{JS} - c_M \partial_t V_{JM} + g_J V_J \quad (2.52)$$

⁵ Die Spannungen V_{JM} , V_{FM} , V_J , V_M und V_{JS} wurden analog zu Kapitel 1 definiert.

Um nach V_{JM} auflösen zu können, muss die obere Membran noch mit berücksichtigt werden. Die Kapazitäten der oberen und unteren Membran bilden einen kapazitiven Spannungsteiler, daher muss gelten:

$$-\frac{V_M}{V_{JM}} = \frac{C_{JM}}{C_{FM}} = \frac{A_{JM}c_M}{A_{FM}c_M} = \beta_M \quad (2.53)$$

oder umgeformt

$$V_M = -\beta_M V_{JM} \quad (2.54)$$

Eine Umformulierung von (2.52) ergibt damit: ⁶

$$\left(\frac{c_S + \tilde{c}_M}{g_J}\right) \partial_t V_{JM} + V_{JM} = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)g_J} \partial_t V_S \quad (2.56)$$

$$\tau_\beta \partial_t V_{JM} + V_{JM} = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)} \tau_\beta \partial_t V_S \quad (2.57)$$

Die Zeitkonstante des Punktkontaktmodells τ_β wurde dazu definiert:

$$\tau_\beta := \left(\frac{c_S + \tilde{c}_M}{g_J}\right) \quad (2.58)$$

Das Punktkontaktmodell kann natürlich auch in Abhängigkeit von V_J formuliert werden:

$$\tau_\beta \partial_t V_J + V_J = \frac{c_S}{(c_S + \tilde{c}_M)} \tau_\beta \partial_t V_S \quad (2.59)$$

2.2.2 Lösung für einfache Fälle

Zuerst die Lösung der Differentialgleichung für zwei einfache Fälle. Diese sind wichtig, um das Aussehen von Transienten zu verstehen.

Konstante Stimulationsspannung

Für eine konstante Stimulationsspannung wird Gleichung (2.57) zu einer homogenen Differentialgleichung:

$$\tau_\beta \partial_t V_{JM} + V_{JM} = 0 \quad (2.60)$$

mit der Lösung

$$V_{JM} = V_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_\beta}\right) \quad (2.61)$$

Die Membranspannung nimmt also exponentiell mit der Zeit ab.

⁶ Hierbei wurden folgende Identitäten verwendet:

$$V_{JS} = V_S - V_J = V_S + V_{JM} - V_M = V_S + (1 + \beta_M)V_{JM} \quad (2.55)$$

Stimulationsspannung mit konstanter Steigung

Nimmt man $V_S = \dot{V}_S t$ an, so erhält man für Gleichung (2.57):

$$\tau_\beta \partial_t V_{JM} + V_{JM} = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)} \tau_\beta \dot{V}_S \quad (2.62)$$

Die spezielle Lösung der inhomogenen Differentialgleichung ist

$$V_{JM}^\infty = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)} \tau_\beta \dot{V}_S \quad (2.63)$$

Dies ist einfach eine Konstante. Für den allgemeinen Fall muss man noch eine Lösung der homogenen Differentialgleichung addieren, so dass man für V_{JM} eine exponentielle Annäherung an einen konstanten Wert V_{JM}^∞ erhält.

2.2.3 Periodische Stimulation

Sinusförmige Stimulation

Für den häufigen Fall sinusförmiger Stimulation berechnet man die Transferfunktion für V_{JM} durch Fouriertransformation von Gleichung (2.57):

$$i\omega \tau_\beta V_{JM} + V_{JM} = -\frac{c_S}{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)} i\omega \tau_\beta V_S \quad (2.64)$$

aufgelöst nach V_{JM}

$$V_{JM} = -\frac{c_S}{(1 + \beta)(c_S + \tilde{c}_M)} \frac{i\omega \tau_\beta}{1 + i\omega \tau_\beta} V_S \quad (2.65)$$

V_{JM} hat eine typische Hochpasscharakteristik, wie man sie auch für ein RC-Glied findet (V_{JM} ist jedoch aufgrund der Vorzeichenkonvention um 180° phasenversetzt). Wie man in Abbildung 2.9 sieht, geht für niedrige Frequenzen die Amplituden gegen Null, für hohe nähert sie sich dem Grenzwert $|V_{JM}| = \frac{c_S}{(1 + \beta)(c_S + \tilde{c}_M)} V_S$. Die Phase von V_{JM} ist für kleine Frequenzen -90° und nähert sich bei hohen Frequenzen -180° an. Abbildung 2.9 zeigt die Frequenzcharakteristik von V_{JM} . Die so gefundene Transferfunktion kann benutzt werden, um für den Fall periodischer Stimulation für beliebige Pulsformen die Membranspannung zu berechnen. Dazu führt man eine Fouriertransformation des Stimulationspulses durch und multipliziert mit der Transferfunktion für V_{JM} . Durch Rücktransformation des Produkts erhält man die gesuchte Pulsform der Membranspannung V_{JM} . Im folgenden werden zwei wichtige Beispiele periodischer Stimulation beschrieben.

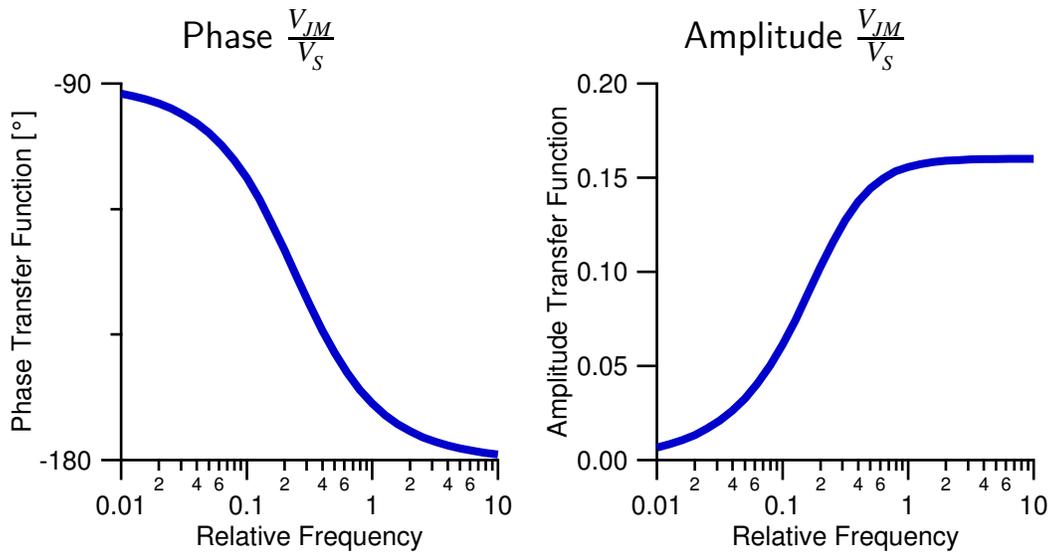


Abbildung 2.9: Phase und Amplitude von V_{JM} . (Frequenz in Einheiten von τ^{-1}). $\frac{c_S}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$

Rechteckpuls

Ein Spannungssprung der Stimulation bewirkt einen Sprung in der Membranspannung V_{JM} , gefolgt von einem exponentiellen Abfall der Membranspannung mit der Zeitkonstante τ_β .

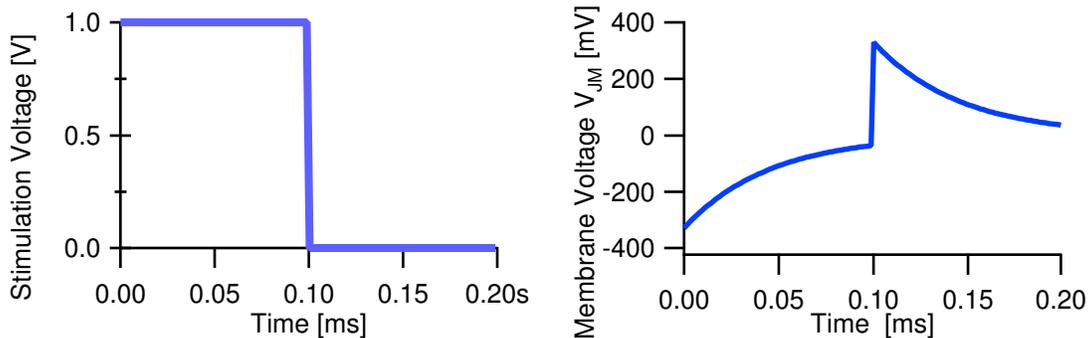


Abbildung 2.10: Rechteckförmige Stimulation und resultierende Membranspannung für $\tau_\beta = 50\mu s$, $\beta_M = 0,7$ und $\frac{c_S}{c_M} = 1$

Stimuliert man periodisch mit einem Rechteckpuls wie in Abbildung 2.10, so erhält man über die Membran zwei entgegengesetzte Spannungssprünge, gefolgt von einem exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ_β .

Dreieckspuls

Eine konstant ansteigende Stimulationsspannung führt im Grenzwert $t \rightarrow \infty$ zu einer konstanten Membranspannung.

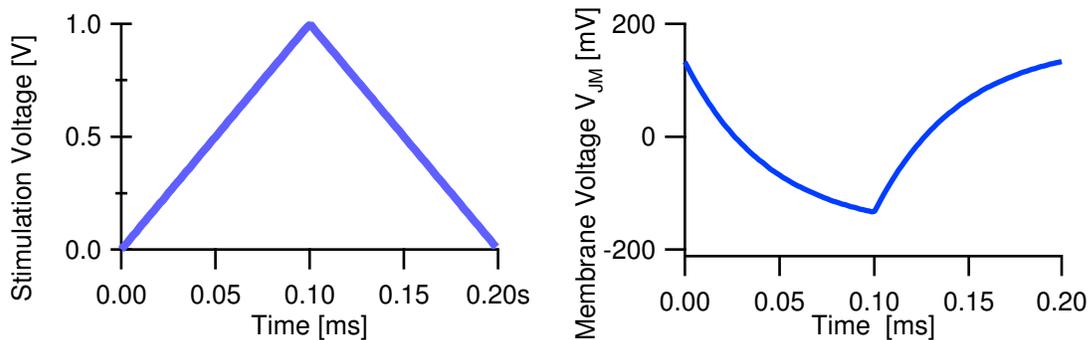


Abbildung 2.11: Dreieckförmige Stimulation und resultierende Membranspannung für $\tau_\beta = 50\mu s$, $\beta_M = 0,7$ und $\frac{c_S}{c_M} = 1$

Abbildung 2.11 zeigt den Fall dreieckförmiger Stimulation. Man erkennt dass sich in den Bereichen konstanter Steigung die Membranspannung exponentiell dem Grenzwert annähert, mit der Zeitkonstante τ_β .

Rechteckförmige Membranspannung

Für Experimente zur Untersuchung spannungssensitiver Ionenkanäle ist es wünschenswert, periodisch Rechteckpulse über die Membran zu stimulieren [38]. Durch eine geeignete Addition aus Rechteckpulsen und Dreieckspulsen ist es möglich, eine rechteckförmige Spannung über die Membran zu stimulieren. Man kann sich dies leicht veranschaulichen, wenn man die Abbildungen 2.10 und 2.11 betrachtet. Es müssen die Amplituden des Dreieck- und des Rechteckpulses so gewählt werden, dass der exponentielle Abfall des Rechteckpulses der exponentiellen Annäherung an den Grenzwert der Dreieckspannung entspricht. Abbildung 2.12 zeigt Stimulation und Membranspannungen für verschiedene Kombinationen von Dreieck- und Rechteckpulsen. Für die grüne Linie wurde die Kombination passend gewählt. Im realen Experiment ist jedoch zusätzlich zu berücksichtigen, dass das Bad-Chip-System ein Tiefpass ist, weshalb in Abbildung 2.12 die Transienten auch für diesen Fall berechnet wurden. Da die Zeitkonstanten des Bad-Chip-Tiefpasses deutlich kürzer sind als die Pulsdauer, ist dies jedoch nicht weiter störend. Durch eine leichte Erhöhung von V_R kann man erreichen, dass die tiefpassgefilterte Transiente eine bessere Näherung an eine Rechteckfunktion ist.

In Abbildung 2.13 sieht man ein Beispiel, wie man im allgemeinen Fall die Pulsform zu wählen hat. V_T bezeichnet die Amplitude (Peak to Peak) der Dreiecksfunktion, V_R die der Rechteckfunktion und θ das gemeinsame Tastverhältnis (Duty Cycle) von Rechteck- und Dreieckfunktion.

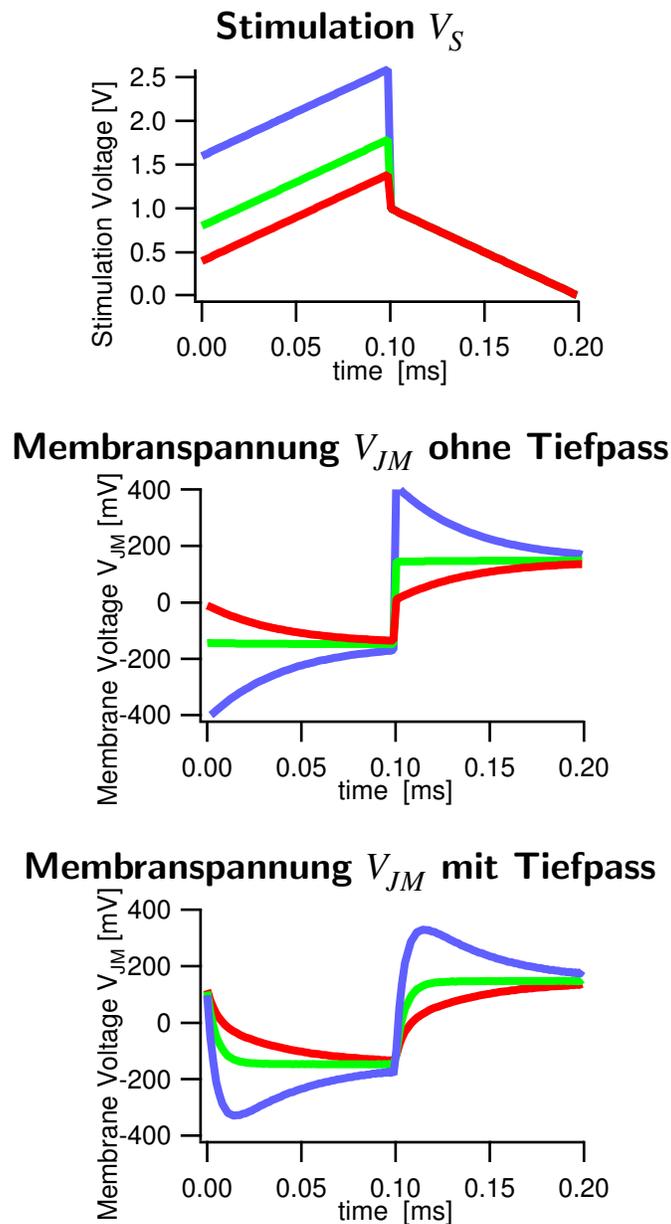


Abbildung 2.12: Berechnete Transienten bei periodischer Stimulation, für unterschiedliche Pulsformen. Es wurden die typischen Werte für HEK-293 auf TiO_2 -Chips in hochohmiger Extrazellulärlösung verwendet: $\tau_{RC} = 5\mu\text{s}$, $\tau_\beta = 50\mu\text{s}$, $\beta_M = 0,7$ und $\frac{c_S}{c_M} = 1$. Grün eingezeichnet ist die Transiente mit optimal gewähltem V_R und V_T .

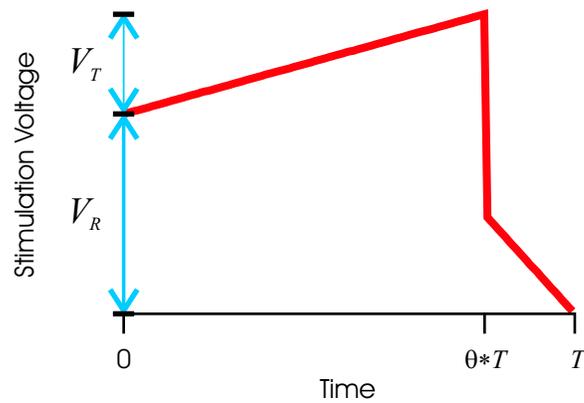


Abbildung 2.13: Beispiel für einen Stimulationspuls. V_R ist die Größe des Spannungssprungs, V_T die Höhe der Dreieckfunktion .

Um eine Rechteckspannung mit $V_{JM} = V_{JM}^a$ für $t < \theta * T$ zu erreichen, müssen V_T und V_R folgendermaßen gewählt werden:

$$V_T = \frac{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)}{c_S} V_{JM}^A \frac{\theta * T}{\tau_\beta} \quad (2.66)$$

$$V_R = \frac{(1 + \beta_M)(c_S + \tilde{c}_M)}{c_S} \frac{V_{JM}^A}{1 - \theta} \quad (2.67)$$

Eine genaue Herleitung für die Wahl von V_T und V_R befindet sich im Anhang B.

2.3 Vergleich der Modelle

Bei der Herleitung des Punktkontaktmodells wird der Widerstand R_J postuliert. Jedoch wird er nicht auf die elementaren Größen d_J und ρ_J zurückgeführt. Durch einen Vergleich zwischen den beiden Modellen muss noch ein Zusammenhang zwischen g_J und r_J gefunden werden.

2.3.1 Übergang vom Flächenkontaktmodell zum Punktkontaktmodell

Abschätzung der Zeitkonstante

In 2.1.8 wurde das Flächenkontaktmodell für den Fall stufenförmiger Stimulation gelöst. Es ergab sich eine Reihenentwicklung nach Exponentialfunktionen. Die Dynamik ist im wesentlichen durch die langsamste Zeitkonstante des Systems bestimmt. Setzt man in Gleichung (2.41) $n = 1$ so erhält man:

$$\tau_1 = \frac{(c_S + c_M)r_J A_{JM}}{5,783\pi} \quad (2.68)$$

Vergleicht man mit der Zeitkonstante des Punktkontaktmodells (Gleichung (2.58)), so erhält man folgenden Zusammenhang zwischen g_J und r_J

$$g_J = \frac{5,783\pi}{r_J A_{JM}} \quad (2.69)$$

Allgemein erhält man eine Relation der Form:

$$g_J = \frac{k\pi}{r_J A_{JM}} \quad (2.70)$$

Wobei der Übergangsfaktor k abhängt von der Art und Weise, wie der Übergang zwischen den Modellen stattgefunden hat.

Fit der Zeitkonstante

Durch das Experiment bedingt mittelt man meist über einen zentralen Bereich der Adhäsionsfläche (Der Bereich ist z.B. bestimmt durch die Gatefläche). Berechnet man im Flächenkontaktmodell die über einen zentralen Bereich gemittelte Transiente, so kann man das Punktkontaktmodell anfitten, um k zu bestimmen. Abbildung 2.14 zeigt Beispiele solcher Fits. Mittelt man über die halbe Adhäsionsfläche also bis $\frac{a_G}{a_J} = \frac{1}{\sqrt{2}}$ so ergibt sich ein k von 5,3. Bei Mittelung über die gesamte Fläche erhält man $k = 8,4$. Betrachtet man nur $a = 0$, so erhält man $k = 3,9$. Wie man sieht, beschreibt das Punktkontaktmodell die Dynamik besonders gut für eine teilweise Mittelung über die Adhäsionsmembran.

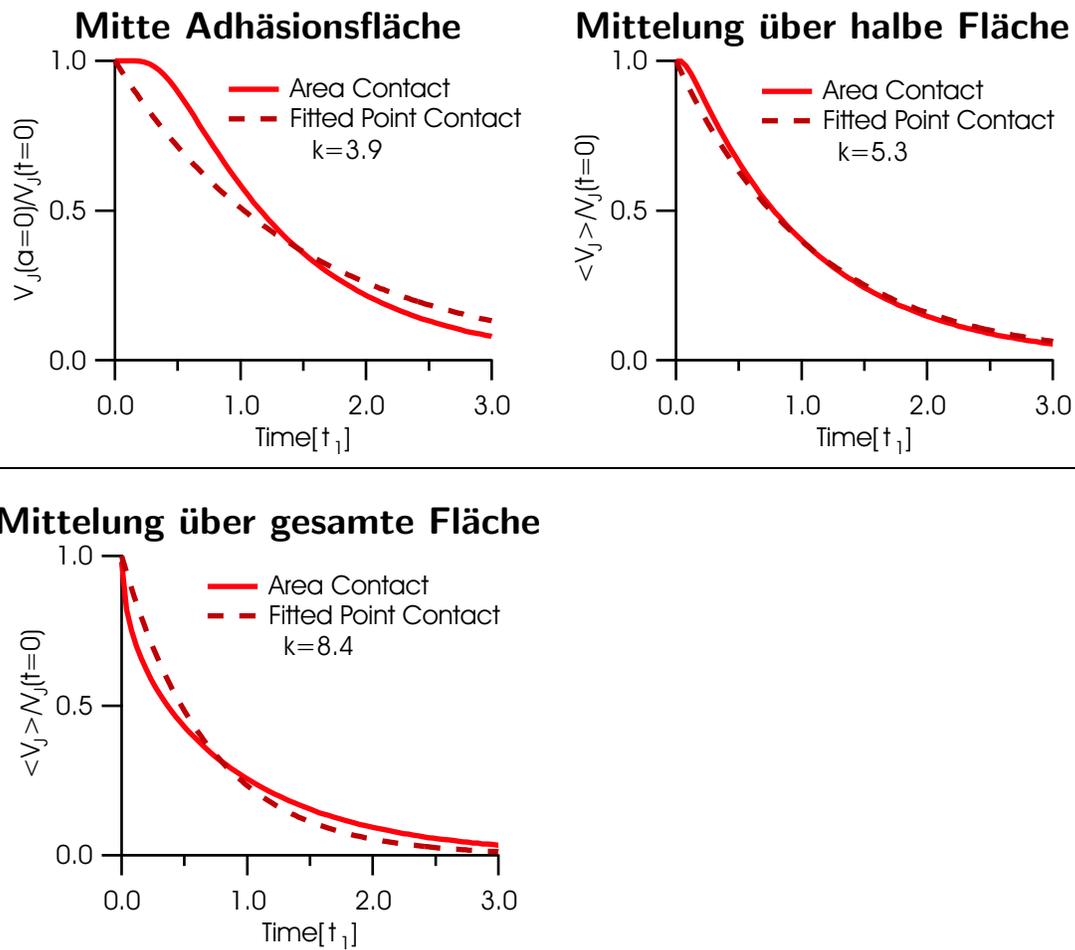


Abbildung 2.14: Fit des Punktkontaktmodells an Transienten des Flächenkontaktmodells, mit k aus Gleichung (2.70) als Fit-Parameter. Links Oben ist die Transiente für $a = 0$ zu sehen. Rechts Oben wurde über die halbe Adhäsionsfläche gemittelt und Links unten über die ganze.

Entwicklung der Lösung nach Potenzen von ω

Eine einfache Möglichkeit für einen Vergleich der beiden Modelle besteht darin, für die Lösung des Punktkontaktmodells und des gemittelten Flächenkontaktmodells eine Potenzreihenentwicklung durchzuführen. [35] Dies entspricht dem Fall kleiner Frequenzen. Man entwickelt bis zu Termen erster Ordnung in ω bzw. zweiter Ordnung in γ . Der Einfachheit halber nimmt man den Fall $\beta_M = 0$ an (Voltage-Clamp). Eine Entwicklung des Punktkontaktmodells ergibt:

$$V_J = \frac{c_S V_S}{c_S + c_M} \frac{i\omega\tau}{1 + i\omega\tau} = \frac{c_S V_S}{c_S + c_M} (i\omega\tau + \dots) \quad (2.71)$$

$$= \frac{i\omega c_S V_S}{c_S + c_M} \frac{c_S + c_M}{g_J} \quad (2.72)$$

Für das Flächenkontaktmodell betrachtet man den Mittelwert von V_J gemittelt vom $a = 0$ bis $a = a_G$. Mit Hilfe von Gleichung (A.10) erhält man aus Gleichung (2.30)

$$\langle V_J \rangle_G = \frac{c_S V_S}{c_S + c_M} \frac{I_0(\gamma a_J) - \frac{2I_1(\gamma a_G)}{\gamma a_G}}{I_0(\gamma a_J)} \quad (2.73)$$

Für den Nenner des zweiten Terms gilt:

$$\frac{1}{I_0} = 1 - \frac{1}{I_0(0)} \underbrace{I_0'(0)}_{=0} \gamma a_G + \dots = 1 + \dots \quad (2.74)$$

Für den Zähler betrachtet man die übliche Potenzreihenentwicklung für Besselfunktionen

$$1 + \left(\frac{\gamma a_J}{2}\right)^2 + \dots - \frac{2}{\gamma a_G} \left[\frac{\gamma a_G}{2} + \frac{1}{2} \left(\frac{\gamma a_G}{2}\right)^3 + \dots \right] \quad (2.75)$$

$$= \frac{(\gamma a_J)^2}{4} - \frac{(\gamma a_G)^2}{8} + \dots \quad (2.76)$$

$$= \frac{(\gamma a_J)^2}{4} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{a_G}{a_J}\right)^2 \right] + \dots \quad (2.77)$$

Für den Mittelwert gilt also:

$$\langle V_J \rangle_G = \frac{c_S V_S}{c_S + c_M} \frac{(\gamma a_J)^2}{4} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{a_G}{a_J}\right)^2 + \dots \right] \quad (2.78)$$

$$= \frac{i\omega c_S V_S}{c_S + c_M} \frac{r_J (c_S + c_M) a_J^2}{4} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{a_G}{a_J}\right)^2 + \dots \right] \quad (2.79)$$

Vergleicht man die Gleichungen (2.72) und (2.79) so kann folgende Beziehung zwischen g_J und r_J aufstellen:

$$\frac{1}{g_J} = \frac{r_J a_J^2}{4} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{a_G}{a_J} \right)^2 \right] \quad (2.80)$$

$$g_J = \frac{4\pi}{r_J A_{JM}} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{a_G}{a_J} \right)^2 \right]^{-1} \quad (2.81)$$

Der Übergangsfaktor k hängt also von a_G ab, d.h. von der Größe der betrachteten Fläche.

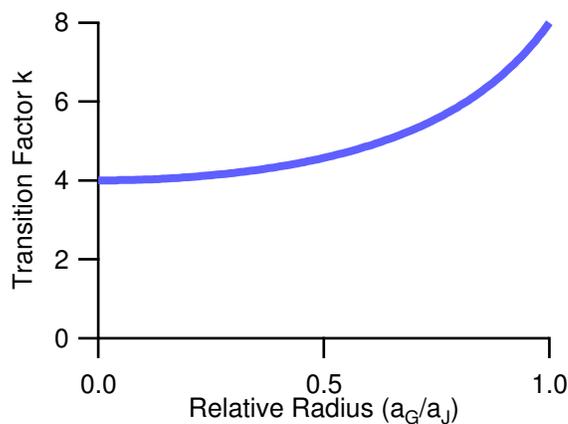


Abbildung 2.15: Übergangsfaktor k in Abhängigkeit des Grenzradius der Mittelung.

Abbildung 2.15 zeigt, wie k von a_G abhängt. Berechnet man k für die $a_G = 0$, $\frac{1}{\sqrt{2}}a_J$ und a_J , so erhält man $k = 4$, $k = 5.33$ und $k = 8$. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Werten, die durch einen Fit der Zeitkonstante ermittelt werden, (wie aus Abbildung 2.14 hervorgeht.)

Welcher Wert von k ist der beste?

Sind die experimentellen Gegebenheiten sehr gut bestimmt, so kann man k mit den zuvor bestimmten Gleichungen bestimmen. Meist hat man es jedoch nicht mit runden Zellen zu tun. Bei Transistormessungen ist die genaue Position des Sensors unter der Zelle auch nicht immer zentral. Daher ist es sinnvoll, standardmässig den Wert $k = 5,783$ zu verwenden, wie man ihn durch den Vergleich der Zeitkonstanten erhalten hat (Gleichung (2.68)).

2.3.2 Frequenzcharakteristik beider Modelle für $\beta_M \neq 0$

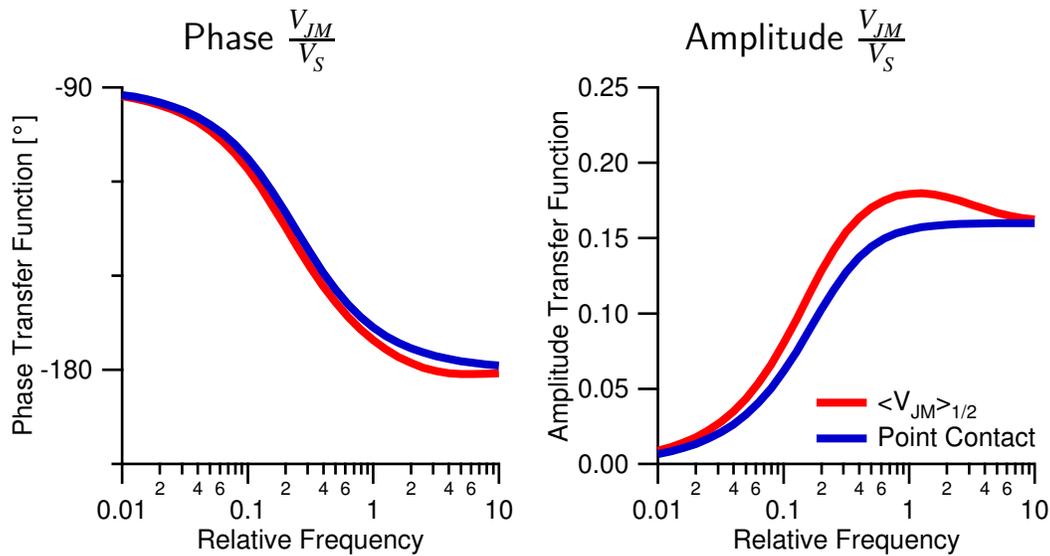


Abbildung 2.16: Vergleich zwischen Punktkontakt- und Flächenkontaktmodell in Abhängigkeit der Frequenz. Blau das Punktkontaktmodell, rot das über die halbe Fläche ($a_G = \frac{1}{\sqrt{2}}a_J$) gemittelte Flächenkontaktmodell. Die Frequenz ist aufgetragen in Einheiten von τ^{-1} , der inversen Zeitkonstante des Flächenkontaktmodells ($\frac{c_S}{c_M} = 0,22$, $\beta_M = 0,7$)

Zuvor wurde der Sonderfall $\beta_M = 0$ behandelt. Relevant für diese Arbeit ist jedoch der Fall $\beta_M \neq 0$. Abbildung 2.16 zeigt die Lösung des Punktkontaktmodells ($k = 5,783$) und die des über die halbe Fläche gemittelten Flächenkontaktmodells. Offensichtlich beschreiben beide Modelle das System als Hochpass. Die Grenzwerte für niedrige und hohe Frequenzen sind identisch. Im Übergangsbereich sind leichte Unterschiede erkennbar, jedoch hängen diese Unterschiede stark davon ab, wie gross man den zu mittelnden Bereich wählt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass beide Modelle die grundlegenden Eigenschaften des Systems identisch beschreiben. Außerdem konnte der Zusammenhang zwischen den Größen r_J und g_J gefunden werden.

Kapitel 3

Methoden

Es werden die verwendeten Mikroskopietechniken zur Bestimmung des spezifischen Widerstandes des Spaltelektrolyten vorgestellt. FLIC (Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie) dient der Bestimmung des Zell-Substratabstandes. Ausführlich vorgestellt wird eine Lock-In-Methode zur Bestimmung des Flächenwiderstands r_f mittels spannungssensitiver Farbstoffe. Eine neue Lock-In-Methode zur Anwendung Ratio-metrischer Farbstoffe wurde entwickelt.

Der zweite Teil dieses Kapitels gibt einen Überblick über die verschiedenen Materialien. Zuerst wird ein Überblick über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gegeben. Dabei wird auch auf die Funktionsweise dieser molekularen Sonden eingegangen. Danach werden die verwendeten Zellsysteme und deren Kultur beschrieben. Ein gern unterschätzter Aspekt für die erfolgreiche Durchführung von Experimenten ist die vorbereitende Behandlung der Chips, d.h. Reinigung, Oberflächenbehandlung, Sterilisation und die geeignete Beschichtung.

3.1 Messung des Zell-Substratabstands

Zur Untersuchung der Adhäsion auf einem festen Substrat haben sich verschiedene Methoden etabliert, wie z.B. IRM (Interference Reflection Microscopy) oder TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy). Beide Methoden sind sehr gut geeignet, Veränderungen in der Adhäsionsregion festzustellen. Die Bestimmung absoluter Abstände ist aber nicht zuverlässig möglich. In der genauen Bestimmung des absoluten Zell-Substrat-Abstands liegt die Stärke der hier vorgestellten Methode.

Die FLIC-Mikroskopie (Fluorescence Interference Contrast Microscopy) hat den Vorteil, dass genau die selben Materialien verwendet werden wie für fast alle anderen Messungen dieser Arbeit, nämlich Siliziumoxid auf Silizium.

3.1.1 FLIC-Mikroskopie

Befindet sich ein Farbstoffmolekül in einem Schichtsystem aus mehreren Materialien, so hängt die detektierbare Fluoreszenz stark von den Eigenschaften des Schichtsystems, des Chromophors und des optischen Systems ab [31] [32]. Dabei handelt es sich um einen Interferenzeffekt. Die Probe wird monochromatisch durch ein Mikroskopobjektiv beleuchtet. Vor der spiegelnden Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche bildet sich eine stehende Welle des Anregungslichts aus, weshalb die Anregungswahrscheinlichkeit des Chromophors stark vom Ort abhängt. Analoges gilt für das längerwellige in Richtung des Objektivs emittierte Fluoreszenzlicht. Die detektierbare Fluoreszenz hängt also stark ab von der Anregungswellenlänge, dem Emissionsspektrum, den gewählten Emissionsfiltern und der Objektiv-*Apertur*. In der FLIC-Mikroskopie wird dies ausgenutzt, um die Spaltdicke d_j zu charakterisieren.

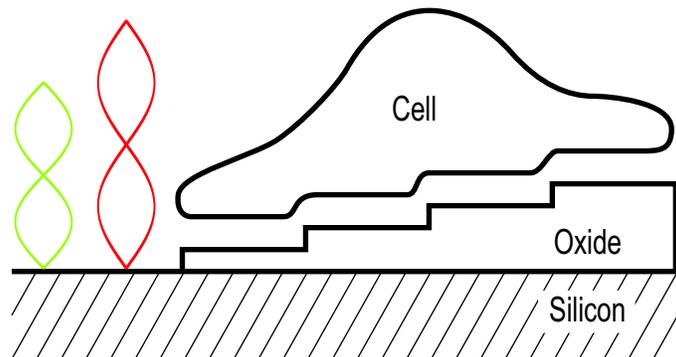


Abbildung 3.1: Veranschaulichung der FLIC-Methode. Die Zelle ist über verschieden hohe Stufen (ca. 10 – 150nm) gewachsen. (Abbildung ähnlich in [32])

Dazu werden die zu untersuchenden Zellen auf einem geeignet strukturierten Chip kultiviert. Auf der gesamten Fläche des Chips ist eine regelmäßige Struktur aus Rechtecken von vier verschiedenen Dicken eingätzt. Eine Zelle ist über verschiedene solcher Rechtecke gewachsen. Betrachtet man mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioskop mit Achroplan 100x/1,0 Wasser) die Adhäsionsmembran, so erkennt man eine Rechteckstruktur, die abhängt von den Oxidhöhen und dem Zell-Substratabstand, der für alle Rechtecke gleich angenommen wird [7, 8]. Man nimmt dieses Bild mit einer CCD-Kamera (Theta-System, Gröbenzell, SIS1-s285) auf und bestimmt zur Auswertung die Intensitäten auf den verschiedenen Oxiden. Mit diesen Informationen kann man die in [32] beschriebene Theorie anfitzen und den gesuchten Abstand d_j bestimmen (siehe Abbildung 4.1).

Herstellung der FLIC-Chips

In einem Röhrenofen (Centrotherm, Blaubeuren) wird SiO_2 nass aufoxidiert. Danach wird mit Ammoniumfluorid-Ätzmischung (Merk, 1:9 verdünnt) auf ca. 150nm her-

abgeätzt. Mit Hilfe fotolithographischer Methoden wird ein Streifenmuster eingätzt. Dieser Vorgang wird mit einer um 90° gedrehten Maske wiederholt, so dass am Schluss ein regelmäßiges Muster aus Rechtecken mit Höhen von ca. 10, 50, 100 und 150nm entsteht. Die Oxidhöhen werden an den dafür vorgesehenen Referenzpunkten ellipsoidisch bestimmt (Plasmos).

3.2 Spaltcharakterisierung mittels spannungssensitiver Farbstoffe

In Kapitel 2 wurden theoretische Modelle erarbeitet, wie die Membranspannung V_{JM} von der Stimulation V_S abhängt. Will man gezielt, etwa zum kapazitiven Öffnen von Kaliumionenkanälen ([38]), periodische Pulsformen über die Adhäsionsmembran stimulieren, so ist es zwingend notwendig, die Vorhersagen des Punktkontaktmodells zu überprüfen, um die ideale Pulsform zu finden.

Zur Bestimmung des Flächenwiderstands r_j benötigt man die experimentelle komplexe Transferfunktion. Diese kann für den Fall sinusförmiger Stimulation aus den Spannungstransienten berechnen. Im folgenden werden die experimentelle Vorgehensweise und der Versuchsaufbau vorgestellt.

3.2.1 Transienten der Membranspannung

Dazu werden periodische Pulsformen zwischen Bad und Chip angelegt. Mit den in 2.2.3 beschriebenen Pulsformen sollten rechteckförmige Membranspannungen möglich sein. Um dies zu überprüfen, werden die Zellen mit dem spannungssensitiven membrangebundenen Farbstoff Annine-5 angefärbt. Spannungssensitiv bedeutet, dass die detektierte Fluoreszenz von der Membranspannung abhängt. Der Farbstoff wird später in 3.4.2 beschrieben. Mit einem Konfokalmikroskop wird die untere Membran einer Zelle betrachtet. Für jeden Punkt der unteren Membran wird mehrere Stimulationsperioden lang der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz gemessen. Da das Fluoreszenzsignal stark verrauscht ist, muss die Transiente über mehrere Perioden gemittelt werden.

Man hat für jeden Punkt N Samples S_j aufgenommen. Jede Periode der Stimulation besteht aus l Samples. N ist ganzzahliges Vielfaches von l .¹ Um die durchschnittliche Spannungstransiente T_j zu bestimmen, berechnet man

$$T_k = \frac{l}{N} \sum_j S_{lj+k} \quad (3.1)$$

Wenn man lange Transienten betrachten will, ist es auch möglich zeitliches Binning durchzuführen.

¹ Für diese Anwendung ist es zwingend notwendig, dass Stimulation und Detektion perfekt synchronisiert sind.

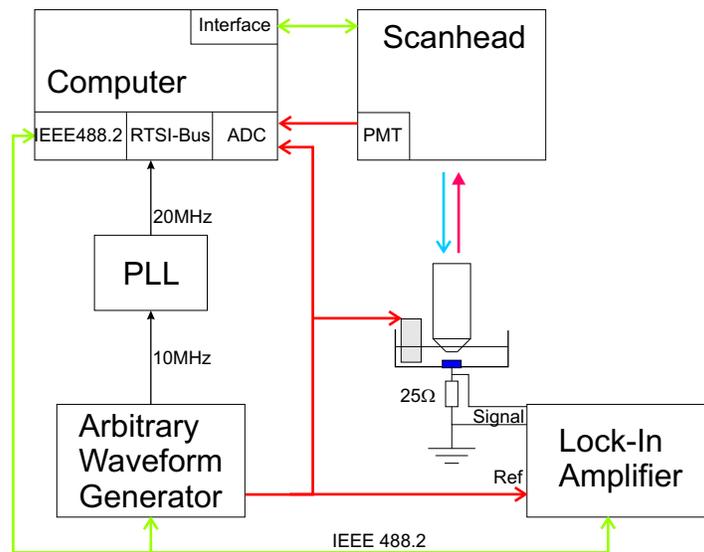


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der wesentlichen Apparaturkomponenten.

3.2.2 Messung der Ortsaufgelösten Transferfunktion

Das Flächenkontaktmodell bietet die Möglichkeit, ortsaufgelöste Transferfunktionen für beliebige Zellgeometrien zu berechnen. Im speziellen Fall sinusförmiger Anregung hat man mit der zuvor beschriebenen Methode der Transientenmessung die Möglichkeit, solche Transferfunktionen zu messen. Dazu misst man bei sinusförmiger Stimulation Transienten und führt eine zeitliche Fouriertransformation durch. Daraus bestimmt man die ortsaufgelöste komplexe Transferfunktion bei der Stimulationsfrequenz ν .² Sowohl das Messsystem als auch das Bad-Chip-System beeinflussen das Ergebnis. Deshalb muss noch durch die entsprechenden Transferfunktionen korrigiert werden. An das Ergebnis wird das numerisch gelöste Flächenkontaktmodell angefügt, um den spezifischen Flächenwiderstand r_j zu bestimmen.

3.2.3 Versuchsaufbau

Abbildung 3.2 zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Herzstück der Apparatur ist ein Konfokalmikroskop (Olympus Fluoview 200, an BX50WI). Dieses wird durch einen Computer angesteuert. Dieser ist mit einer IEEE488.2-Schnittstelle (National Instruments) und einer Multifunktionsmesskarte (National Instruments, PCI6110E) ausgerüstet. Die Messkarte ist mit zwei Analog-Input-Kanälen ausgestattet. Diese können gleichzeitig mit 5MSamples pro Sekunde ausgelesen werden.

² In [6] wurden Amplitude und Phase bestimmt aus einer Korrelation zwischen Referenz und Signal, was den Nachteil hat, dass synchron eingefangene Störungen sich auf das Ergebnis auswirken. Durch diese Methode machen sich Probleme durch Auseinanderlaufen von Stimulation und Detektion nicht bemerkbar.

Zur Stimulation dient ein Arbitrary Waveform Generator (Agilent, 33120A), kurz Funktionsgenerator genannt. Als Badelektrode dient eine Platinelektrode für die Lock-In-Messungen, für die Transientenmessungen eine Ag/AgCl-Elektrode.

Das Signal des Photomultipliers, PMT (Hamamatsu R928, Verstärker von Olympus) und als Referenz das Signal des Funktionsgenerators werden über die Messkarte erfasst.

Aufgrund einiger Verbesserungen der Apparatur musste das Messprogramm neu programmiert werden. Das Messprogramm ist in LabView (National Instruments) programmiert. Zur Ansteuerung des Mikroskops wurden die in [6] beschriebenen FluoLab VIs verwendet.

Korrektur des Bad-Chip-Systems und der Detektionselektronik

Das Bad-Chip-System stellt im wesentlichen ein RC-Glied dar. Relevant für das Experiment ist die über das Oxid abfallende Spannung. Um diese berechnen zu können wird mit einem Lock-In-Verstärker (Stanford Research Systems, SR830) der Strom (Amplitude und Phase) durch den Chip gemessen. Daraus wird die zur Korrektur von Lock-In-Messungen notwendige Transferfunktion berechnet.

Die Transferfunktion des Messsystems, die zur Korrektur notwendig ist, wurde mit Hilfe einer LED bestimmt. Die LED wurde als Lichtquelle benutzt, um für die verwendeten Messfrequenzen die Charakteristik des PMT-Verstärkers zu bestimmen.

Der Laser

Als Lichtquelle dient ein Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics, Stablelite 2017). Die 457nm -Linie dient zur Anregung³. Zu Beginn der Arbeit wurde der Laser im Single-Line Modus verwendet. Später wurde der Multiline-Spiegelsatz eingebaut. Mit Hilfe eines polychromatischen akustooptischen Modulators wird die zu verwendende Anregungswellenlänge ausgewählt (vergleiche 3.3.1). Über eine Glasfaser wird das Laserlicht in den Scanhead des Mikroskops eingekoppelt. Die laserseitige Einkopplung in die Faser ist von großer Wichtigkeit. Falls man nicht den Kern trifft, sondern den Mantel, verschlechtert sich die Bildqualität des Mikroskops drastisch. Dies hat sich kurz nach Einbau des polychromatischen akustooptischen Modulators bemerkbar gemacht. In dem grösseren mechanischen Aufbau machen sich Wärmeausdehnungen aufgrund von Temperaturschwankungen deutlicher bemerkbar. Der Laser hat eine Leistungsaufnahme von ca. 15kW , was trotz Wasserkühlung ohne zusätzliche Massnahmen zu einer spürbaren Temperaturerhöhung im Raum führte. Durch den Betrieb einer im Raum vorhandenen Klimaanlage konnte dieses Problem gelöst werden.

³ Anfangs wurde die 476nm -Linie verwendet, da die Empfindlichkeit dort höher ist. Für Transientenmessungen machte sich jedoch das Problem der Asymmetrie der Signale bemerkbar (Vergleiche 3.4.2).

Verbesserungen im Vergleich zu [6]

- Räumliche Trennung von Funktionsgenerator und Detektion zur Reduzierung von Störungen.
- Reduzierung der elektrischen Störungen durch Austausch der Anschlussbox (National Instruments, BNC-2090) und des Anschlusskabels (National Instruments, SH6868) gegen einen Eigenbaustecker. Das Übersprechen der Kanäle wurde dadurch eliminiert, die eingefangenen Störungen stark reduziert. Die Abschirmung der Original National Instruments Lösung ist erstaunlich wenig wirksam.
- Zur Bestimmung der Chipcharakteristik wird anstatt eines Speicheroszilloskops ein Lock-In-Verstärker (Stanford Research Systems, SR830) verwendet. Dazu wird der durch das Bad-Chip-System fließende Strom gemessen. Durch dieses Gerät, konnte der Fehler der Chipkorrektur verkleinert werden. Durch weitere Automatisierung der Messung werden Fehler durch Fehlbedienungen vermieden.
- Der Funktionsgenerator (Agilent, 33120A) wurde durch ein Zusatzmodul erweitert. Dieses Modul gibt über eine BNC-Buchse die interne Zeitbasis von 10MHz nach außen. Durch Frequenzverdopplung mittels einer Phase-Locked-Loop (PLL) (Texas Instruments, TLC2932-Evaluation Board) wird ein 20MHz Referenzsignal erzeugt, das von der Messkarte als Zeitbasis verwendet wird. Dazu ist es nötig, in den sogenannten RTSI-Bus der Messkarte einzugreifen. Dieser wird normalerweise zur Synchronisation verschiedener National Instruments-Systeme verwendet. Diese Synchronisation ist insbesondere für Transientenmessungen wichtig.

3.2.4 Verwendete Chips

Den beiden für das Experiment verwendeten Chip-Typen haben einen ähnlichen Aufbau. In der Mitte des Chips befindet sich ein kleiner kreisförmiger Spot mit dünnem Dielektrikum. Dieser Spot wird für die Stimulationsexperimente verwendet. Auf der restlichen Fläche ist dickes Feldoxid. Die Gesamtkapazität des Chips muss gering gehalten werden, da das Bad-Chip-System als Tiefpass wirkt. Durch eine zu hohe Kapazität wäre eine hochfrequente Stimulation nicht möglich. Deshalb musste auch für die Hoch-DK Chips mit TiO_2 -Dielektrikum die Spotgröße verkleinert werden.

Herstellung SiO_2 -Chips

Es wurden wesentlich einfachere Chips verwendet als in [6] beschrieben. Diese zeichnen sich insbesondere durch eine deutlich einfachere Herstellung aus. Stark p-dotierte 4-Zoll Wafer (WaferNet INC., San Jose, CA, USA) werden zunächst einer RCA-Reinigung unterzogen. Danach wurde in einem Röhrenofen (Centrotherm, Blaubeuren) ca. $1\mu\text{m}$ dickes Oxid aufoxidiert. Durch die üblichen photolithographischen

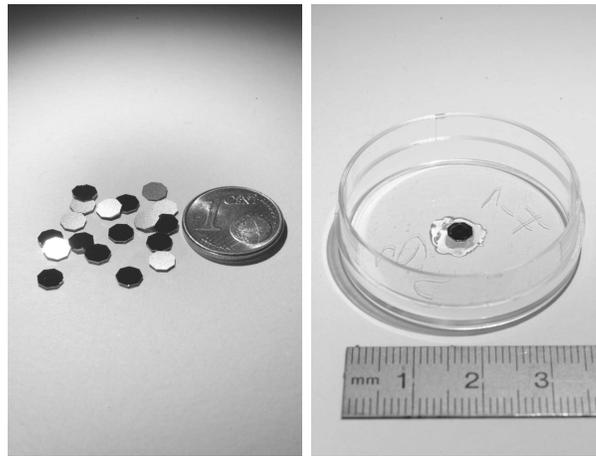


Abbildung 3.3: Links die losen einzelnen Chips, rechts ein in eine Petrischale eingeklebter Chip. Die Schale ist durchbohrt, so dass man den Chip von unten kontaktieren kann.

Methoden wurde im Bereich des späteren Feldoxides eine dünne Photolackschicht aufgebracht. Auf der verwendeten von Dieter Braun entworfenen Maske befinden sich Spots verschiedener Größen, verschiedene andere Strukturen und die zum Zersägen notwendigen Markierungen. Die ungeschützten Bereiche des Feldoxides, die Bereiche der späteren Stimulationssots, wurden mit Ammoniumfluorid-Ätzlösung komplett weggeätzt. Nach Entfernen der Photolackschicht (CARO), einer RCA-Reinigung und einem HF-Dip (um das natürlich gewachsene Oxid zu entfernen) wurde definiert eine 15nm dicke Schicht Siliziumdioxid im RTP-Ofen aufoxidiert. Um die Rückseite kontaktieren zu können, musste dort noch Aluminium aufgedampft werden. Danach wurde der Wafer so zersägt, dass achteckige Chips entstanden. Verwendet wurden nur Chips mit einem $500\mu\text{m}$ Spotdurchmesser. Diese wurden mit einem speziellen medizinischen Kleber (MK3, Sulzer Osypka) in angebohrte Petrischalen (Falcon, 3001) eingeklebt, so dass man sie von unten kontaktieren kann. Abbildung 3.3 zeigt die fertigen Chips

Herstellung der TiO_2 -Chips

Um mit der Arbeit von Maximilian Ulbrich [38] vergleichen zu können, mussten die Transientenmessungen mit den selben Chips durchgeführt werden wie in [38]. Diese wurden von Frank Wallrapp im Rahmen seiner Diplomarbeit ([40]) prozessiert. Um besser kapazitiv stimulieren zu können, ist es nötig, die spezifische Oxidkapazität zu erhöhen. Durch dünnere SiO_2 Spotoxide kann man das nur beschränkt erreichen. Deshalb ist es sinnvoll, zu Materialien mit höherer Dielektrizitätskonstante überzugehen. Bis zum Herabätzen der Spots ist die Chipherstellung vergleichbar. Es wird jedoch eine andere, von Tamara Birkenmaier entworfene Maske [5] verwendet. Die

Spotdurchmesser auf dieser Maske sind kleiner, aufgrund der höheren spezifischen Kapazität von TiO_2 muss der Spotdurchmesser gesenkt werden, um die Gesamtkapazität und damit die Tiefpasswirkung des Bad-Chip-Systems zu verkleinern. Ein Problem stellt das Silizium-Oxid dar, das sich normalerweise zwischen Titanoxid und Siliziumwafer bildet. Um dies zu verhindern, wurde vor dem Aufbringen der TiO_2 -Schicht die Oberfläche im RTP-Ofen (AST) nitridiert. Die Titanoxidschicht wird danach mittels ALD (Atomic-Layer-Deposition) aufgebracht (ASM Microchemistry, Finnland). Die Rückseite wurde vor dem Zersägen zur Kontaktierung mit Aluminium bedampft. Die Chips wurden ebenfalls in angebohrte Petrischalen geklebt.

3.2.5 Auswertung der Lock-In Messungen

Auch bei sinusförmiger Anregung werden die Messungen als Transienten abgespeichert. Zur Berechnung der Transferfunktion wird jede Transiente fouriertransformiert.⁴ Zur Korrektur des Bad-Chip-Tiefpasses und des Messsystems muss durch die entsprechenden Transferfunktionen geteilt werden, um die korrekte Transferfunktion zu erhalten. Von dieser korrigierten Transferfunktion wird nur die Phaseninformation verwendet. Dies hat folgende Gründe:

- Unspezifische Anfärbungen im Zellinneren führen zu Hintergrundfluoreszenz, die nicht zum Signal beiträgt. Dies hat zur Folge, dass der Betrag von $\frac{\Delta F}{F}$ stark verfälscht wird, während die Phase nicht beeinflusst wird.
- Durch Fehler bei der Hintergrundkorrektur wird die Amplitude verzerrt. Die charakteristischen Bereiche der Amplitude sind am Rand der Zelle, in Bereichen geringer Amplitude. Zusätzlich wirken sich Fehler bei der Festlegung der Adhäsionsfläche drastisch aus.

Einer der kritischen Schritte bei der Auswertung ist die Bestimmung der Adhäsionsfläche. Ein Fehler hier hat grossen Einfluss auf das Ergebnis. Die Bestimmung der Adhäsionsfläche geschieht mit Hilfe der absoluten Fluoreszenzintensität. Dazu werden im Randbereich der Zelle lokal die Punkte maximaler Fluoreszenz bestimmt. Diese werden als Randpunkte angenommen, miteinander verbunden und der Innenraum aufgefüllt. Die so gewonnene Fläche wird verwendet, um numerisch das Flächenkontaktmodell zu lösen.

Die Numerik für Berechnung des Flächenkontaktmodells wurde neu programmiert (es wurde lediglich der SOR-CIN-Knoten übernommen). Dies war nötig, da der ursprüngliche Lösungsweg aus [6] sich als zu kompliziert erwiesen hatte, vor allem wenn man die Randbedingung $V_{JM} = -\beta_M \langle V_{JM} \rangle$ berücksichtigen will.

Im Flächenkontaktmodell zeichnen sich die Randbereiche der Adhäsionsfläche durch sehr starke Veränderungen in der Phase aus. Fehler bei der Bestimmung der

⁴ Immer wenn möglich wurde die Stimulationsfrequenz so gewählt, dass die Anzahl der Samples pro Transiente eine Potenz von zwei ist. Dadurch kann man den Fast-Fourier-Algorithmus anwenden. Nur für die höchste Frequenz von 100kHz war dies nicht möglich.

Adhäsionsfläche machen sich hier besonders stark bemerkbar, weshalb nur der zentrale Bereich der Adhäsionsfläche für den Fit verwendet wird.

Zur Bestimmung von r_J wird ein Levenberg-Marquart-Fit verwendet. Dazu wurde die in LabView integrierte Levenberg-Marquart-Fit-Routine modifiziert. Diese Routine benötigt eine Funktion einer Variablen in Abhängigkeit eines oder mehrerer Parameter. Die zu fittende Funktion ist jedoch eine Funktion zweier Variablen, also von x und y . Durch einfaches Aneinanderhängen der auszuwertenden Punkte in definierter Reihenfolge wurde der benötigte Datensatz in Abhängigkeit einer Variablen gewonnen.

In dem ursprünglichen LabView-VI ist die zu fittende Funktion als analytischer Ausdruck gegeben, der für jeden Punkt und Parametersatz unabhängig gerechnet werden kann. Das Flächenkontaktmodell kann aber nur jeweils für die gesamte Adhäsionsfläche gerechnet werden. Deshalb musste die Struktur des Programms so modifiziert werden, dass bei jedem Iterationsschritt das Flächenkontaktmodell nur zweimal⁵ berechnet wird. Dies ist zwar kein Eingriff in den eigentlichen Fit-Algorithmus, machte jedoch eine nennenswerte Umarbeitung der VI notwendig.

3.2.6 Fehler

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit von r_J müssen diverse Fehlerquellen und ihr Einfluss auf das Ergebnis bestimmt werden.

Fehler durch Phase

Zur Auswertung wird an die Phase der experimentell erhaltenen Transferfunktion die numerische Lösung angefügt. Man berechnet den relativen Fehler des Flächenwiderstands pro Phasenfehler folgendermassen:

$$\frac{\Delta r_J}{r_J} = \frac{1}{r_J} \left(\frac{\partial \varphi}{\partial r_J} \right)^{-1} \Delta \varphi \quad (3.2)$$

$$= \frac{1}{\omega r_J} \left(\frac{\partial \varphi}{\partial (\omega r_J)} \right)^{-1} \Delta \varphi \quad (3.3)$$

Multipliziert man Gleichung (2.20) mit r_J , so erhält man:

$$\Delta V_J - i\omega r_J (c_S + c_M) V_J = -c_S i\omega r_J V_c - \tilde{c}_M \beta i\omega r_J \langle V_J \rangle \quad (3.4)$$

Wie man erkennt, tritt die Frequenz nur als Produkt mit dem Flächenwiderstand r_J auf. Dementsprechend ist die Lösung abhängig von $r_J \omega$. Jeder Wert von $r_J \omega$ entspricht einer Phasenlage und umgekehrt (zumindest im relevanten Bereich ist die Funktion umkehrbar). Man kann also den relativen Fehler von r_J darstellen in Abhängigkeit der Phase und unabhängig von r_J . Durch geschickte Wahl der Messfrequenz kann man eine Phasenlage erreichen, die mit einem möglichst geringen relativen Fehler von r_J verbunden ist.

⁵ Partielle Ableitung nach r_J muss auch berechnet werden!

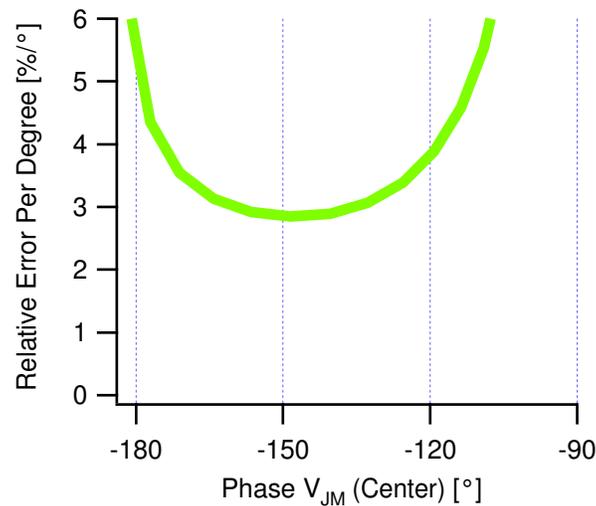


Abbildung 3.4: Relativer Fehler pro Grad Fehler in Abhängigkeit der Phase für $a = 0$.
 $(\frac{c_S}{c_M} = 0,22, \beta_M = 0,7)$

Abbildung 3.4 zeigt den relativen Fehler pro Grad Phasenfehler in Abhängigkeit der Phase. Wie man sieht sollte man die Frequenz so wählen dass man in der Mitte eine Phase zwischen -170° und -120° erhält.

Mit einer Messfrequenz

$$v = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{4\tau}$$

ist dies gut erfüllt.

Fehler durch Flächendefinition

Ausgewertet wird nur in den zentralen Bereichen der Zelle, wo die Amplitude ausreichend hoch ist. Die Randbereiche können aufgrund des niedrigen Signals nicht beim Fit berücksichtigt werden. Es stellt sich jedoch das Problem, dass die Definition der Adhäsionsfläche mit einem Fehler behaftet ist. Dieses Problem muß in die Fehlerrechnung mit aufgenommen werden. Im wesentlichen bestimmt man durch den Fit die Zeitkonstante τ . Für den Flächenwiderstand r_J erhält man im Fall einer runden Zelle dann:

$$r_J = \frac{\tau 5,784\pi}{(c_S + c_M)A_{JM}} \quad (3.5)$$

Der relative Fehler von r_J , hervorgerufen durch die Flächendefinition ist in diesem Fall gleich dem relativen Fehler von A_{JM} .

Der Flächenfehler wird folgendermassen bestimmt: Von der verwendeten Adhäsionsfläche werden die äußeren Pixel entfernt. Der Unterschied der beiden Flächen wird als Fehler angenommen. Der Fehler durch die Flächendefinition ist die wichtigste Fehlerquelle der Methode.

Gesamtfehler

Der Gesamtfehler setzt sich zusammen aus vier unabhängigen Fehlerquellen:

1. Statistischer Fehler
2. Chipkorrektur
3. Photomultiplikatorkorrektur
4. Flächendefinition

Zur Bestimmung des Gesamtfehlers müssen die Varianzen der Einzelfehler addiert werden.⁶ In diese Rechnung gehen nur relative Fehler ein, weshalb der Gesamtfehler auch ein relativer Fehler ist.

3.3 Ratiometrische pH-Messung

Natrium und Kalium sind die häufigste Kationensorte in der Extrazellulärlösung. Wenn von irgendeiner Substanz ein merklicher Effekt zu erwarten ist, so von diesen beiden Ionensorten. Um speziell die Eigenschaften des Spalts zu untersuchen, benötigt man einen membrangebundenen ionensensitiven Farbstoff. Für Natrium und Kalium waren jedoch keine geeigneten Farbstoffe verfügbar. Daher wurde, bevor man versucht, einen entsprechenden Farbstoff zu synthetisieren, mit einem pH-sensitiven Farbstoff gearbeitet, um eine geeignete Methode zu entwickeln. HAF ist wie Sodium-Green durch die 488nm-Linie eines Argon-Ionen-Lasers gut anregbar.⁷ Wenn es also möglich ist, den pK-Wert von HAF in Zellmembranen zu bestimmen, so sollte man auch die Gleichgewichtskonstante einer noch zu synthetisierenden membrangebundenen Sodium-Green Variante bestimmen können. Ein unterschiedlicher der Gleichgewichtskonstanten für obere und untere Membran wäre ein starker Hinweis auf eine Veränderung der Ionenkonzentration im Spalt.

⁶ In [3] kann lange vergessenes Statistikgrundwissen nachgelesen werden.

⁷ Was angesichts der Struktur von Sodium Green nicht verwunderlich ist. Bei Sodium Green sind zwei Fluorescein-Moleküle an einen geeignet grossen Kronester gebunden.

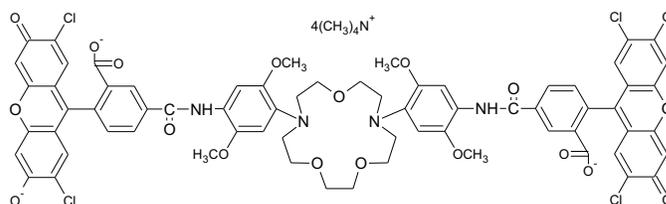


Abbildung 3.5: Struktur Sodium Green [22]

Bei ionensensitiven Farbstoffen werden sehr häufig ratiometrische Methoden angewandt. Das heisst, man bildet den Quotienten aus zwei Fluoreszenzintensitäten. Dieser Quotient ist stark abhängig von der Konzentration des Analyten. Nach geeigneter Kalibrierung kann man also die Ionenkonzentration bestimmen. Abhängig vom Farbstoff wird entweder die Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen betrachtet oder die Fluoreszenz in zwei unterschiedlichen Bereichen des Emissionsspektrums.

Im Fall von Fluorescein ist das Anregungsspektrum abhängig vom pH-Wert der betrachteten Lösung. In diesem Fall werden bei typischen ratiometrischen Messmethoden nacheinander zwei Bilder der selben Probe bei verschiedenen Anregungswellenlängen aufgenommen. Teilt man die Bilder durcheinander, so ist der Quotient der Fluoreszenzintensitäten abhängig von der zu bestimmenden Größe.

Bei der Laserscanmikroskopie stellt sich hier die Problematik, dass meist nur eine Anregungswellenlänge zur Verfügung steht. Ein Wechsel des Lasers oder der Wellenlänge ist oft nur mit großem Aufwand möglich. In modernen Konfokalmikroskopen wird dieses Problem durch polychromatische akustooptische Filter gelöst.

3.3.1 Wellenlängenselektion Mittels Akustooptischer Modulation

Mechanische Belastung bewirkt in transparenten Medien eine Änderung des Brechungsindex. Läuft eine ebene akustische Welle durch ein Medium, so erhält man in Richtung der Schallausbreitung eine sinusförmige Modulation des Brechungsindex. Diese Brechungsindexwelle wirkt wie ein Gitter, dessen Gitterkonstante bestimmt ist durch die Frequenz der akustischen Welle. Dieser Effekt kann technisch auf vielfältige Art und Weise verwendet werden. [20] beschreibt kurz die physikalischen Grundlagen, Details kann man in [25] nachlesen. Realisiert wird ein akustooptisches Gerät durch einen Piezo, welcher auf einen geeignet geformten Glasblock aufgeklebt ist. Dieser Piezo wird mit einer Hochfrequenzspannung versorgt.

Im Experiment dient ein Argon-Ionen-Laser als Lichtquelle. Dieser wird im Multiline-Modus betrieben. Dies hat zur Folge, dass man kollinear verlaufende Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen hat. Daraus müssen die gewünschten Wellenlängen gewählt werden. Möchte man mit einem AOM (Akustooptischer Modulator) gezielt Licht einer Wellenlänge in einen bestimmten Winkel abbeugen, so hängt die benötigte Frequenz stark von der Lichtwellenlänge ab (siehe Abbildung 3.6). Durch die Überlagerung mehrerer geeigneter Frequenzen kann man auch mehrere Lichtwellenlängen gleichzeitig in diesen Winkel abbeugen. Die Intensität des abgelenkten Laserstrahls ist abhängig von der verwendeten Amplitude der Hochfrequenz.

3.3.2 Mehrfarb-Lock-In Messungen

Wie zuvor beschrieben ist es also möglich, gleichzeitig Laserlicht verschiedener Wellenlängen auszuwählen und selektiv die Lichtintensitäten zu modulieren. Dieses Licht

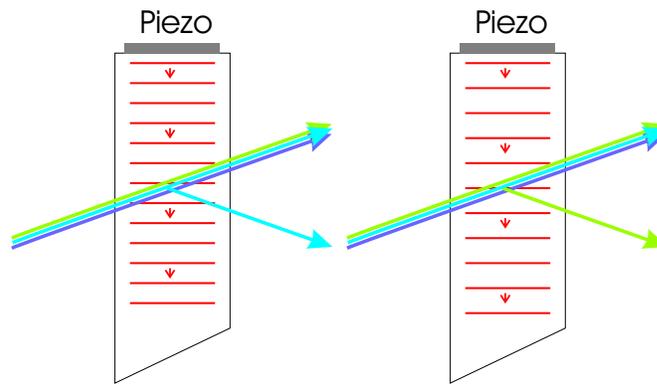


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung eines polychromatischen akustooptischen Filters. Durch den Piezo wird eine ebene akustische Welle im Glas erzeugt. Die Gitterkonstante ist bestimmt über die Hochfrequenz und die Schallgeschwindigkeit im Glas. Links ist die Frequenz so gewählt, dass der türkise Anteil in den gewünschten Winkel gebeugt wird rechts so dass der grüne entsprechend gebeugt wird. Durch eine Überlagerung zweier Frequenzen können mehrere Strahlen gleichzeitig unter dem selben Winkel gebeugt werden.

wird in eine Glasfaser eingekoppelt. Bei der hier vorgestellten neuartigen Methode werden die Anregungswellenlängen 457nm und 488nm ausgewählt und mit $48,8\text{kHz}$ bzw $58,6\text{kHz}$ zu 100% rechteckförmig moduliert.

Durch eine Fourieranalyse des PMT-Signals ist es möglich, die Fluorezenzanteile, die durch die beiden Anregungswellenlängen hervorgerufen werden, zu bestimmen. Der mit $48,8\text{kHz}$ modulierte Anteil wurde mit 457nm angeregt, der mit $58,6\text{kHz}$ modulierte mit 488nm . Die so bestimmten Fluoreszenzintensitäten sind außerdem unabhängig vom Hintergrundlicht und dem Dunkelstrom des PMTs. Die Intensität des Laserlichts wird ebenfalls gemessen, so dass man die Anregung absolut messen kann. Für die später geplante Anwendung von Natrium-Green ist die reproduzierbare Messung der Anregung die wichtigste Eigenschaft, da Natrium-Green kein ratiometrischer Farbstoff ist. Die realisierte Lösung hat den Vorteil, dass man für andere Anwendungen ohne Neujustage des Lasers die Anregungswellenlänge verändern kann. (Man benötigt z.B. zur Anwendung von Dil und Fluorescein eine Anregungswellenlänge von $\lambda = 488\text{nm}$, während man bei Annine-5 mit 457nm arbeitet)

Versuchsaufbau und Durchführung

Abbildung 3.7 zeigt das Schema der verwendeten Apparatur. Der Hochfrequenz-Generator des polychromatischen akustooptischen Modulators (NEOS, West Melbourne, USA) kann über TTL-Signale schnell geschaltet werden. Über eine Steuerungsspannung kann die Intensität eingestellt werden. Der Hochfrequenz-Generator ist mit vier Kanälen ausgestattet, das heisst vier überlagerte Hochfrequenzen können gleich-

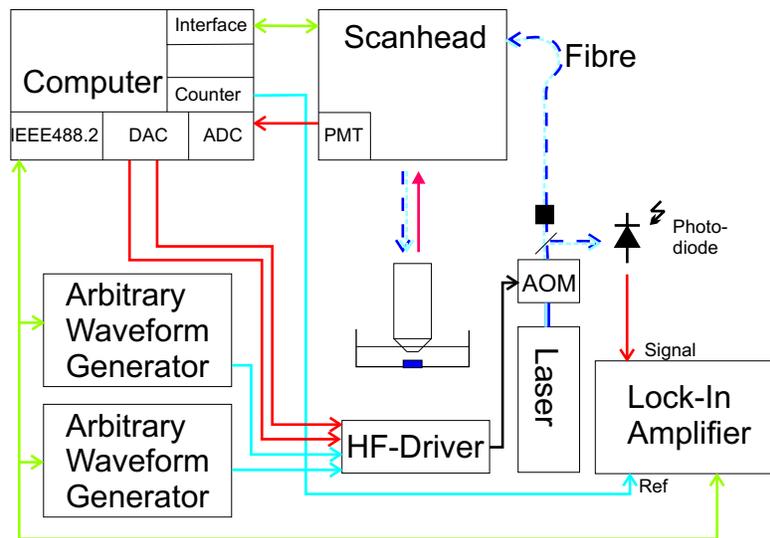


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der wesentlichen Apparaturkomponenten. Die beiden Funktionsgeneratoren sind mit über den RTSI-Bus mit der Detektion synchronisiert.

zeitig und unabhängig voneinander moduliert werden. Es werden jedoch nur zwei davon gleichzeitig verwendet.

Mit Hilfe zweier Funktionsgeneratoren (Agilent, 33120A) werden TTL-Pulse erzeugt. Zwei von den DA-Wandlern der Messkarte ausgegebenen Spannungen regeln die Amplitude der Modulation. Eine schnelle Photodiode (5972, Hamamatsu, Verstärker Eigenbau) dient zur Detektion des Anregungslichts. Mit einem Lock-In-Verstärker (Stanford Research Systems) werden die Intensitäten des Anregungslichts bestimmt.⁸

Im Gegensatz zu den Stimulationsmessungen interessiert hier nicht eine Aufnahme der Adhäsionsregion, sondern eine Aufnahme einer senkrechten Schnitt-Ebene, da man einen Vergleich zwischen unterer und oberer Membran haben möchte. Wie in 3.2.1 beschrieben wird für jeden gescannten Punkt über mehrere Perioden des Referenzsignals ($9,77\text{kHz}$) das Photomultiplier-Signal aufgenommen und gemittelt. Nach Fouriertransformation dieser Transiente erhält man aus der fünften (entspricht $48,8\text{kHz}$) und sechsten (entspricht $58,6\text{kHz}$) Harmonischen die zur jeweiligen Anregungswellenlänge gehörige Fluoreszenzintensität. Um Schwankungen der Laserintensität (auf der Zeitskala von Minuten) zu korrigieren, wird die Fluoreszenz durch die Intensität des Anregungslichts geteilt (gemessen mit Photodiode und Lock-In Verstärker).

⁸Die Messkarte gibt zusätzlich als Referenz ein $9,77\text{kHz}$ Rechtecksignal als Referenz für den Lock-In Verstärker aus. Der Verstärker misst dann die fünfte und sechste Harmonische dieses Referenzsignals.

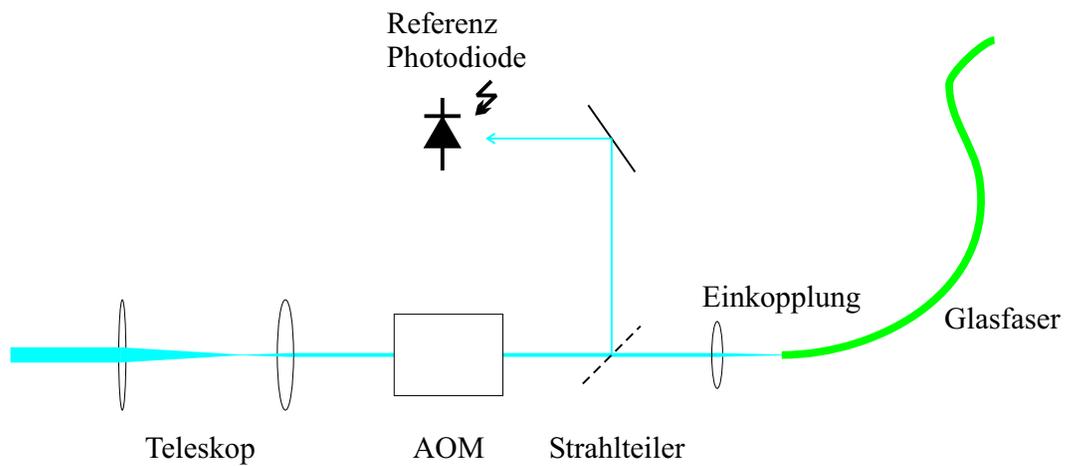
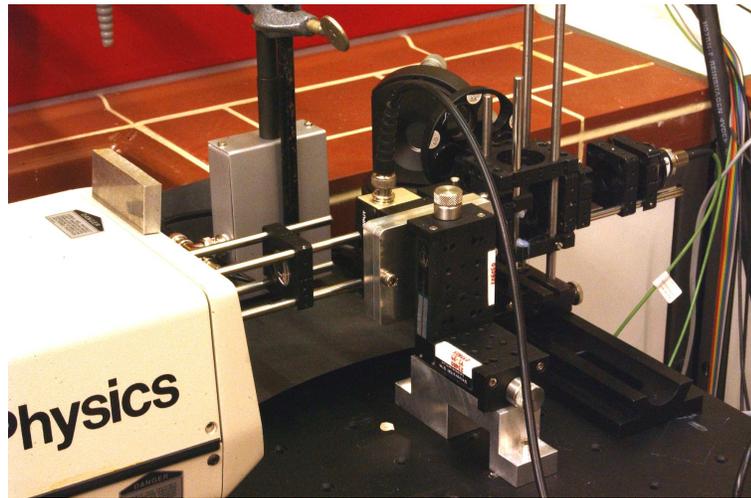


Abbildung 3.8: Bild des Aufbaus zur Wellenlängenselektion und schematische Darstellung. Links der Laser, rechts die Fasereinkopplung. Die Lichtintensität wird mit Hilfe der Referenzphotodiode gemessen.

3.4 Farbstoffe

Zur Untersuchung der Adhäsionsregion bzw. der Membraneigenschaften kamen in dieser Arbeit fluoreszenzspektroskopische Methoden zum Einsatz. Im Folgenden werden die verwendeten Farbstoffe und ihre Eigenschaften vorgestellt. Die Prozeduren zum Anfärben der Zellmembran werden in Anhang C beschrieben.

3.4.1 Membranmarker, DiIC₁₈(3)

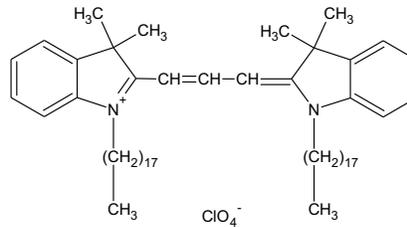


Abbildung 3.9: Struktur von DiIC₁₈(3) (1,1'-Diiodo-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat).

Durch Anhängen von hydrophoben Ketten an den Chromophor kann man Farbstoffe lipophil machen. Mit Hilfe dieser Membranmarker ist es also möglich, spezifisch Membranen von Zellen oder Vesikeln anzufärben. In dieser Arbeit wurden fast nur solche membrangebundenen Farbstoffe verwendet. Der Farbstoff DiIC₁₈(3) (1,1'-Diiodo-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat) ist ein typisches Beispiel. Durch die Symmetrie der Struktur ist sogar die horizontale Orientierung des Chromophors innerhalb der Membran vorgegeben, was bei der Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands mittels FLIC (Fluorescence Interference Contrast) von Nutzen ist.⁹

3.4.2 Annine-5, ein spannungssensitiver Farbstoff

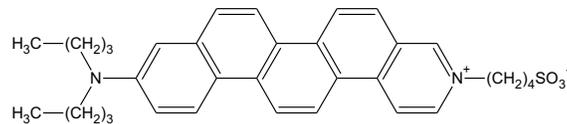


Abbildung 3.10: Struktur von Annine-5.

In der Elektrophysiologie von Zellen betrachtet man die Spannung zwischen dem Zellinneren und der Extrazellulärlösung. Betrachtet man schnelle Prozesse, so kann

⁹ Man kann die FLIC-Theorie auch für statistisch verteilte Chromophorwinkel berechnen.

man neben der Standardmethode Patch-Clamp auch spannungssensitive Farbstoffe verwenden. Diese membrangebundenen Farbstoffe besitzen die Eigenschaft, dass sie ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit der Membranspannung ändern. Im Fall des neuartigen Hemicyaninfarbstoffes Annine-5 [23] führt die Membranspannung zu einer Verschiebung sowohl des Anregungs- als auch des Emissionsspektrums. Dies wird dem linearen Stark-Effekt zugeschrieben, hervorgerufen durch eine intramolekulare Ladungsverschiebung. Der Effekt entspricht der Verschiebung einer Elementarladung um $0,65\text{nm}$ [29].

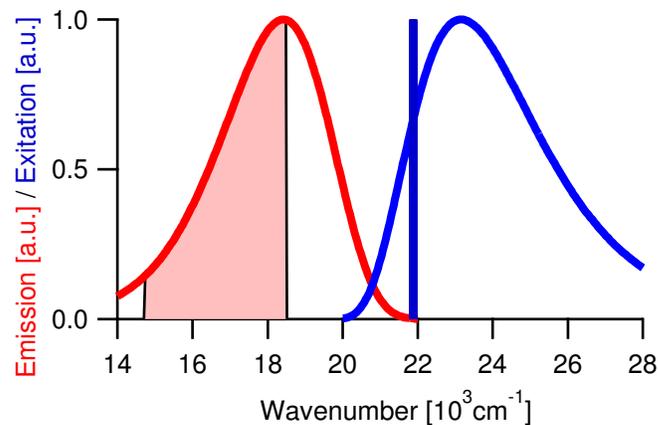


Abbildung 3.11: Berechnetes Anregungs- und Emissionsspektrum von Annine-5. Die schraffierte Fläche markiert den Bereich des Emissionfilters. Die senkrechte Linie zeigt die Anregungswellenzahl $\bar{\nu} = \lambda^{-1}$.

Durch entsprechende Auswahl der Anregungswellenlänge und des spektralen Detektionsbereichs können bei HEK293-Zellen Empfindlichkeiten von $10 \frac{\%}{100\text{mV}}$ und mehr erreicht werden. Dazu muss die Anregungswellenlänge an der Flanke des Anregungsspektrums gewählt werden, so dass sich durch Verschiebung des Spektrums die Anregungswahrscheinlichkeit verändert. Die detektierte Fluoreszenz ist proportional zu dem Integral über das Emissionsspektrum. Um eine möglichst große Veränderung des Messsignals zu erzielen, muss die Filter- bzw. Integrationsgrenze im Maximum der Fluoreszenz liegen. Abbildung 3.11 zeigt die für Annine-5 verwendeten Werte. Anregungs- und Emissionsspektrum wurden gemäß [29] berechnet. Der Gesamteffekt setzt sich zusammen aus

$$F \propto (1 + s_{ex}V)(1 + s_{em}V) = 1 + (s_{ex} + s_{em})V + s_{ex}s_{em}V^2 \quad (3.6)$$

s_{ex} bezeichnet den Empfindlichkeit hervorgerufen durch die Veränderung der Anregungswahrscheinlichkeit, während s_{em} hervorgerufen ist durch eine Veränderung der Detektionswahrscheinlichkeit eines Photons. (Durch Verschiebung des Emissionsspektrums in Abbildung 3.11 ändert sich der Wert des Integrals über den schraffierten

Bereich.) Wie Experiment und Simulation zeigen, steigt die Empfindlichkeit, je weiter die Anregungswellenlänge vom Anregungsmaximum entfernt ist. Jedoch muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen hoher Empfindlichkeit und hoher Anregungswahrscheinlichkeit. Insbesondere bei Transientenmessungen ist darauf zu achten, dass der Term zweiter Ordnung in Gleichung (3.6) nicht zu groß wird, da dieser Term zu einer Asymmetrie von Spannungstransienten führt.¹⁰

3.4.3 pH-Sensitive Farbstoffe, Fluorescein

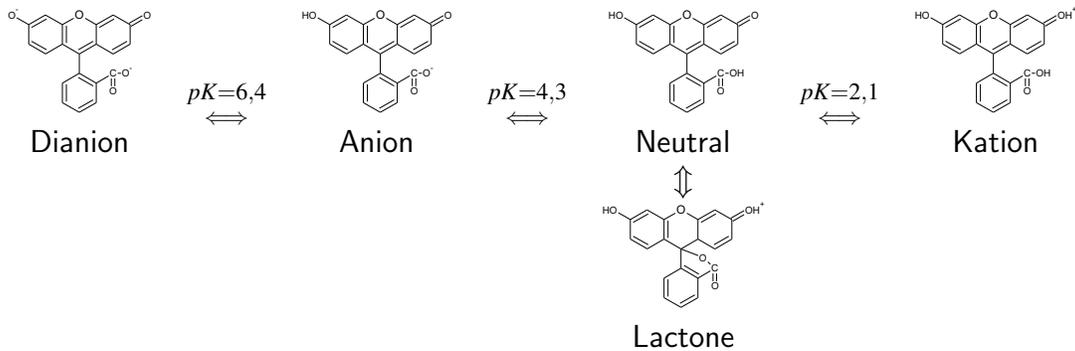


Abbildung 3.12: Die verschiedenen Protonierungsgrade von Fluorescein. Die einfach und zweifach deprotonierten Formen tragen zur Fluoreszenz bei. (Das Lacton tritt meist nur in organischen Lösungsmitteln wie Aceton auf.) Die pK -Werte stammen aus [36]. Ähnliche Abbildung in [22]

Der Farbstoff Fluorescein zeichnet sich durch viele gute Eigenschaften aus, wie z.B. durch hohe Quantenausbeute, ein Anregungsspektrum in einem sehr interessanten Bereich und einen niedrigen Preis. Nur ist die Fluoreszenz stark pH-abhängig, was die Verwendbarkeit in biologischen Systemen einschränkt.¹¹ Jedoch ist in dieser Arbeit genau diese manchmal nachteilige pH-Abhängigkeit von Interesse. Durch Protonierung des Chromophors verändern sich bei Fluorescein (wie auch bei vielen anderen Farbstoffen) die Fluoreszenzeigenschaften. Die daraus resultierenden Veränderungen im Anregungsspektrum können verwendet werden, um den pH-Wert zu detektieren. Abbildung 3.12 zeigt die verschiedenen Protonierungsgrade von Fluorescein. Die Anion- und Dianionform fluoreszieren selbst. Regt man die neutrale Form an, so kann der angeregte Zustand dissoziieren und somit auch zur Fluoreszenz beitragen. In [36] wurden die Absorptionseigenschaften von Fluorescein in Abhängigkeit des pH-Werts

¹⁰ Bei Transientenmessungen ist diese Asymmetrie deutlich erkennbar, wenn man mit Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 476\text{nm}$ arbeitet.

¹¹ Für andere Anwendungen muss einiger Aufwand getrieben werden, um dieses Problem zu lösen. Ein vergleichbarer Farbstoff ohne pH-Abhängigkeit (und geringerem Ausbleichen) ist kommerziell erhältlich, nämlich Alexa-488, [22]

analysiert. [27] beschreibt die dazu verwendete Methode der Auswertung. Diese Fluoresceinvariante wurde verwendet, um die Funktionstüchtigkeit des Versuchsaufbaus zu demonstrieren.

Membrangebundene Formen von Fluorescein

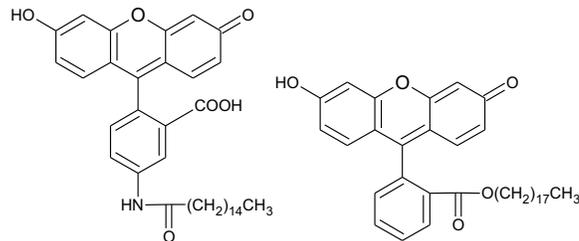


Abbildung 3.13: Links die Struktur von HAF, rechts die von FOE. FOE verfügt über keine Carboxylgruppe, was dazu führt, dass FOE über weniger Protonierungsgrade verfügt und dementsprechend keinen zweiten pK-Wert im relevanten Bereich hat.

Um die Zellmembran zu charakterisieren, wurde eine membrangebundene Fluorescein-Variante verwendet, nämlich 5-hexadecanoylamino fluorescein (HAF).

Für eine einfachere Auswertung wäre es wünschenswert, einen Farbstoff zu verwenden, der nicht wie HAF zwei pK-Werte besitzt. Der in Frage kommende Farbstoff Fluorescein-Octadecyl-Ester (FOE) konnte allerdings nicht verwendet werden, da er im Vergleich zu HAF extrem schnell ausbleicht. Dies ist alleine schon beim Blick durch ein Fluoreszenzmikroskop offensichtlich. Abbildung 3.13 zeigt die Strukturformeln beiden membrangebundenen Fluoresceinvarianten.

3.5 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden im wesentlichen Standard Zellkulturlinien untersucht. Diese zeichnen sich im Gegensatz zu Neuronen durch eine einfache Präparation aus.¹² Sie sind kommerziell erhältlich und müssen nur regelmäßig auf neue Petrischalen verteilt werden. Die Prozedur zur Präparation von Primärkulturen dauert mehrere Stunden, wobei man zusätzlich ein weitaus höheres Risiko von Fehlern hat. Darüberhinaus hat man im Gegensatz zu frisch präparierten Zellen den Vorteil, dass man vergleichbar gut definierte und reproduzierbare Bedingungen hat. Deshalb greift man immer wenn möglich auf Zellkulturlinien zurück. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedenen Linien verwendet, nämlich HEK293 und MDCK.

¹² [14] beschreibt die für ein Zellkulturlabor notwendigen Einrichtungen und die grundlegenden Vorgehensweisen des sterilen Arbeitens.

3.5.1 HEK293-Zellen

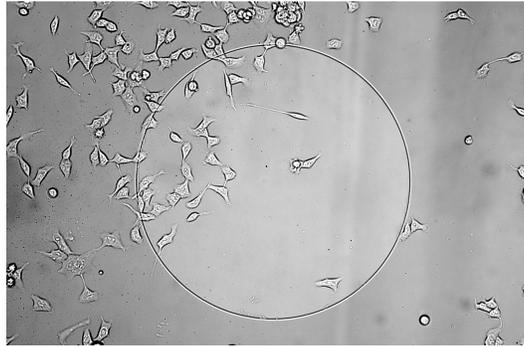


Abbildung 3.14: HEK293-Zellen auf fibronectinbeschichteten silanisierten Stimulations-Chips (Siliziumdioxid).

HEK293 (Human Embryonic Kidney) ist eine sehr weit verbreitete Zellkulturlinie. Es handelt sich dabei um menschliche embryonale Nierenzellen [21]. Für die Transienten-Messungen wurden zum Teil stabil transfizierte Zellen aus [38] verwendet. Diese exprimieren den Kv1.3-Kalium-Kanal. Auf Kunststoff gewachsen haben die Zellen ihre charakteristische spindelförmige Form. Jedoch ist auf fibronectinbeschichteten Chips die ausdifferenzierte Form zu beobachten (siehe Abbildung 3.14).

Die Zellen (DSMZ, Braunschweig) werden zwei mal wöchentlich passagiert. Dazu wird das Medium abgenommen. Die am Boden der Petrischale adhären Zellen werden mit 1ml frischem Medium abgespült und gleichmäßig auf vier frische Petrischalen (Falcon, 3001) verteilt. In jeder Schale sind ca. 2ml Medium. Bei dem Medium handelt es sich um DMEM (Gibco, 61965) mit 10% FKS (Gibco). Die Petrischalen sind von Haus aus geeignet für Zellkultur. Chips werden vor der Kultur silanisiert und beschichtet. Für die in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurde Fibronectin zur Beschichtung verwendet. Es wurde aber auch mit Collagen experimentiert.

3.5.2 MDCK-II-Zellen

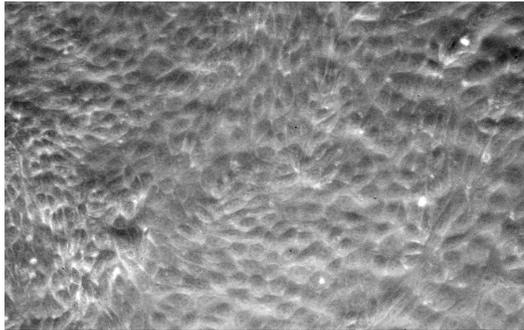


Abbildung 3.15: Geschlossener Zellrasen von MDCK-Zellen, gewachsen auf Kunststoff.

Die Morphologie von Madin-Darby Canine Kidney-Zellen ist typisch für polare Epithelzellen. Sie bilden einen geschlossenen Zellrasen (Plattenepithel). Zwischen benachbarten Zellen bilden sich die sogenannten Tight Junctions aus [2, 4], wodurch ein Austausch von Stoffen (Ionen, Proteine usw.) zwischen zwei Flüssigkeitsvolumina unterbunden wird. Diese Tight Junctions bestehen aus Ringen von Membranproteinen (im wesentlichen Occludin und Claudin). Diese Proteine sind nicht nur für eine Trennung der beiden Flüssigkeitsvolumina verantwortlich. Durch sie ist auch die apikale von der basolateralen Membran getrennt. Daher haben die apikale und die basolaterale Membran unterschiedliche Lipid und Proteinzusammensetzung.

Die Zellen (ECACC, Cambridge, UK) werden zwei mal wöchentlich passagiert. Nach einer Trypsinbehandlung werden die am Boden der Petrischale adhärenierten Zellen mit *1ml* frischem Medium ab gespült und gleichmäßig auf vier frische Petrischalen (Falcon, 3001) verteilt. In jeder Schale sind ca. *2ml* Medium. Bei dem Medium handelt es sich um EMEM (Gibco, 21090) mit 10% FKS (Gibco). Die Petrischalen sind von Haus aus geeignet für Zellkultur. Chips werden vor der Kultur silanisiert und beschichtet. In dieser Arbeit wurde Fibronectin zur Beschichtung verwendet.

3.5.3 Dissoziierte Rattenneuronen



Abbildung 3.16: Dissoziierte Rattenneuronen auf Stimulationschip nach sieben Tagen in Kultur. Der Stimulationsspot hat einen Durchmesser von $500\mu\text{m}$.

Für Neuronen stehen keine geeigneten Zellkulturlinien zur Verfügung. Deshalb ist man auf Primärkulturen angewiesen. Für die Kultur werden Nervenzellen aus dem Hippocampus von Ratten-Embryonen verwendet. 18 bis 19 Tage nach der Verpaarung wird das Muttertier durch Kohlendioxid betäubt und danach durch Genickbruch getötet. Die Hippocampi der Embryonen werden entnommen und enzymatisch aufgeschlossen (0,1% Papain in 0,1% BSA/PBS Lösung). Die Zellen werden mechanisch mit Hilfe einer $2,5\text{ml}$ -Pipette dissoziiert. Zur Reduzierung von Gliazellen wird präplattiert. Die in dieser Arbeit verwendete Kulturzeit beträgt 7 Tage. Eine längere Kulturzeit wäre wünschenswert, da sich viele typische Eigenschaften von Nervenzellen erst später ausbilden [28]. Jedoch bilden sich nach 14 Tagen zu viele Gliazellen aus, um die Experimente durchführen zu können. Zur Beschichtung der Chips wurde Poly-L-Lysin verwendet.

3.5.4 Schneckenneuronen

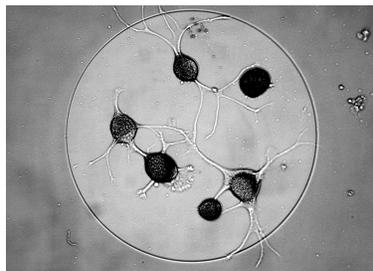


Abbildung 3.17: Schneckenneuronen auf Stimulationschip. Ein Vergleich mit Abbildung 3.16 zeigt sehr schön, dass die Neuronen wesentlich größer sind als die von Ratten.

Aufgrund ihrer Grösse besitzen Schneckenneuronen bessere Kopplungseigenschaften als die von Säugetieren. Verwendet wurden die Neuronen der Spitzhornschlammschnecke *Lymnaea stagnalis*. Diese Neuronen bilden im Gegensatz zu Blutegelneuronen auch *in vitro* Synapsen aus, weshalb sie ein sehr gutes System zur Untersuchung kleinen Netzwerken sind. [42] beschreibt im Detail die Präparation, wie sie für die gezeigten Messungen von Günther Zeck durchgeführt wurde.

3.6 Vorbereitung der Chips

Ein ganz wesentlicher Aspekt zur erfolgreichen Präparation ist die richtige Reinigung, die Oberflächenbehandlung und Sterilisierung des Substrats. Unsauberes Arbeiten oder schlechte Materialien können hier die Arbeit mehrerer Tage zunichte machen.

3.6.1 Reinigung

CARO

Diese Methode wurde teilweise für FLIC-Chips verwendet. In einem Becherglas wird 96% ige Schwefelsäure im Verhältnis 3:1 mit 31% igem Wasserstoffperoxid gemischt. Die Chips werden in einem Teflon-Chiphalter für 10-15min in das heftig reagierend und heisse Gemisch gestellt.¹³ Danach müssen die Chips kräftig mit Reinstwasser (Millipore) gespült werden.

Tickopur

Die Schalen mit den Stimulationschips werden mit heißer Tickopurlösung (Dr. H. Stamm GmbH, Tickopur R36) gefüllt (Konzentration gemäß Herstellerangaben). Mit einem weichen Wischtuch wird dann der Chip und die Schale gründlich gereinigt. Ein gefaltetes Wischtuch, das mit einer Tupferzange gehalten wird, hat sich hierfür besonders bewährt. Danach mit Reinstwasser (Millipore) spülen und mit Stickstoff trockenblasen.

Besonderheiten FLIC-Chips

Die Chips werden mit einer Kunststoffzange am Rand gehalten und in die heisse Tickopurlösung gehalten. Danach werden sie mit einem Wischtuch mechanisch gereinigt und nochmal mit der Zange in heisses Tickopur gehalten. Danach mit Reinstwasser spülen und vorsichtig trockenblasen. Mit der strukturierten Seite nach oben auf ein fusselfreies Wischtuch (Kimwipe) legen und von oben ganz leicht nochmals mit Stickstoff trockenblasen. Die Chips werden in Petrischalen (Falcon, 3001) gelegt.

¹³Geeignete Sicherheitsmassnahmen (Kittel, Schutzbrille und Handschuhe) sind selbstverständlich zu ergreifen!

3.6.2 Oberflächenbehandlung

Silanisierung

Um die Oberflächeneigenschaften der Chips für die Zellkultur zu verbessern, ist es vorteilhaft, diese zu silanisieren. Dazu werden die Chips für ca. 30min in eine mit HMDS-Dampf (1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazaan, Merk) gesättigte Stickstoff-Atmosphäre gebracht.

Sterilisierung

Vor der Beschichtung werden die Chips 15-30min unter eine UV-Lampe gelegt. FLIC-Chips müssen von beiden Seiten bestrahlt werden, da der gesamte Chip mit dem Kulturmedium in Kontakt kommt.

3.6.3 Beschichtung der Chips

Damit die Zellen adhären, muss die Oberfläche des Substrats geeignet sein. In Petrischalen ist der verwendete Kunststoff von Haus aus geeignet. Verwendet man jedoch andere Substrate, so müssen diese zuerst geeignet beschichtet werden. Dazu verwendet man häufig Proteine der extrazellulären Matrix oder Adhäsionsproteine [2, 4, 26].

Fibronectin

Adhäsionsproteine wie Fibronectin bilden im Gewebe die Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und den Integrinen, speziellen Membranproteinen. Für HEK293 und MDCK-Zellen wurde Fibronectin verwendet. Mit anderen Materialien wie Collagen (Protein der extrazellulären Matrix) wurde auch experimentiert, die Ergebnisse sind jedoch nicht gezeigt. Eine Stammlösung mit Fibronectin (Sigma, F-2006) wird angesetzt (1mg in 2ml in PBS). Diese wird aliquotiert und eingefroren. Zum Beschichten gibt man 2ml PBS in die Petrischale mit Chip und dazu 40 μ l der Fibronectin-Stammlösung. Über mehrere Stunden oder über Nacht wird die Lösung bei ca. 4°C auf den Chips belassen. Vor dem Aufbringen der Zellen werden die Chips noch drei mal mit PBS gespült.

Poly-L-lysin

Für Neuronen ergeben Beschichtungen mit Polylysin deutlich kleinere Zell-Substrat-Abstände als das sonst weit verbreitete Laminin. Da man insbesondere bei Transistormessungen an Rattenneuronen am Limit arbeitet, muss Poly-L-lysin verwendet werden. Zum Beschichten benötigt man eine Stammlösung mit 1mg Poly-L-lysin (Sigma, P1399) pro Milliliter Wasser (Aqua Ad, Braun)). Nach Sterilfiltrierung wird die

Lösung auf 0,1 mg pro Milliliter Wasser verdünnt und für 1-2 Stunden auf die Chips gegeben.

Kapitel 4

Bestimmung des spezifischen Spaltwiderstandes

Aufgrund der Komplexität der Adhäsionsregion und Aufgrund der kleinen Abstände ist es nicht selbstverständlich, dass der Elektrolyt im Spalt die selben Eigenschaften besitzt wie der des Bades. Für verschiedene Zell-Typen wurde sowohl der Zell-Substrat-Abstand d_J als auch der Flächenwiderstand r_J bestimmt. Mit Hilfe von

$$\rho_J = r_J d_J$$

kann man den spezifischen Widerstand im Spalt bestimmen. Somit lässt sich die Frage nach eventuellen Abweichungen des spezifischen Widerstands im Spalt und nach Möglichkeiten der gezielten Manipulation des Flächenwiderstands untersuchen.

4.1 Zell-Substrat-Abstand bei HEK293

Mit der in 3.1.1 beschriebenen FLIC-Mikroskopie wurde der Zell-Substrat-Abstand bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt ein Beispiel eines FLIC-Bildes und der dazugehörigen Auswertung. Sehr schön erkennbar sind die Rechtecke verschiedener Helligkeit. Auf den markierten Flächen wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität und ihre Standardabweichung bestimmt. Diese Daten wurden dann zum Fit des Abstands verwendet. Bei der Durchführung der Messungen ist immer darauf zu achten, dass man alle Zellen berücksichtigt. Wählt man nur Bilder mit hohem Kontrast aus, so macht man eine Selektion nach Wasserschichtdicken. Abstände von $50nm$ ergeben ein schachbrettartiges Muster, während andere Abstände wesentlich kontrastärmer sind.

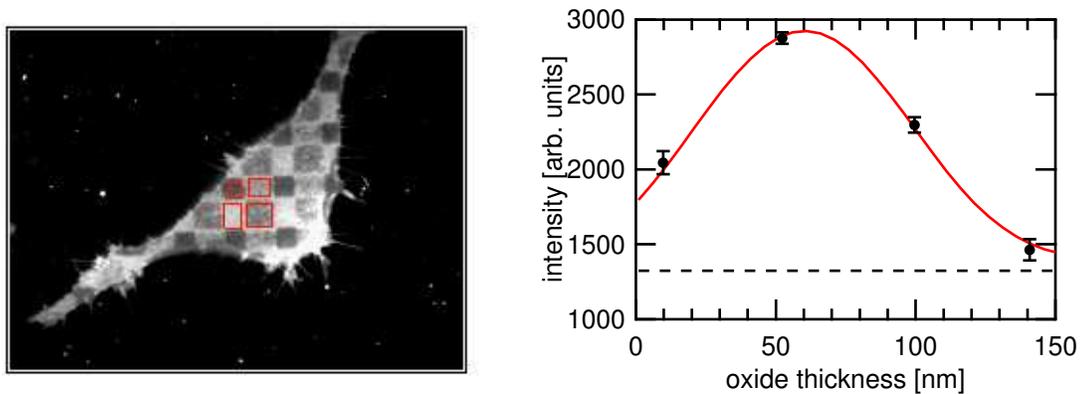


Abbildung 4.1: Links Beispiel eines FLIC-Bildes (HEK293), rechts die bestimmten Intensitätswerte und die angefittete Theoriekurve. Bei dieser Zelle ergab sich ein Zell-Substrat -Abstand von $57 \pm 2nm$.

4.1.1 Standardbedingungen

Zuerst wurden der Zell-Substratabstand für Standard-Bedingungen bestimmt. Das heisst, es wurde normale Extrazellulärlösung (wie in der Elektrophysiologie üblich) verwendet. Die Chips wurden genau so behandelt, wie für die Lock-In und Transientenmessungen, sie wurden also mit Tickopur gereinigt und mit Fibronectin beschichtet.

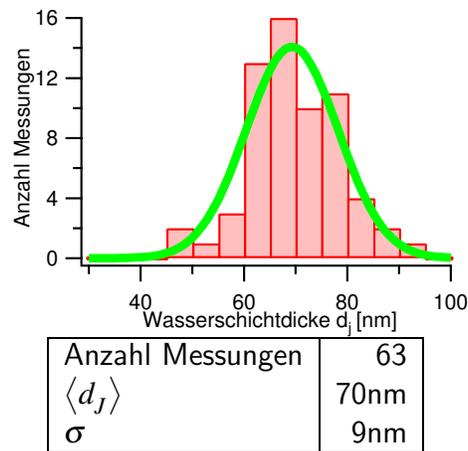


Abbildung 4.2: Histogramme der Spaltbreiten gemessen für Standard Extrazellulärlösung. Für diese Messreihe wurden Tickopurgereinigte Chips verwendet

Als Ergebnis aus 63 Messungen ergab sich ein durchschnittlicher Zell-Substrat-Abstand von $d_j = 70nm \pm 9$.

4.1.2 Einfluss der Extrazellulärlösung

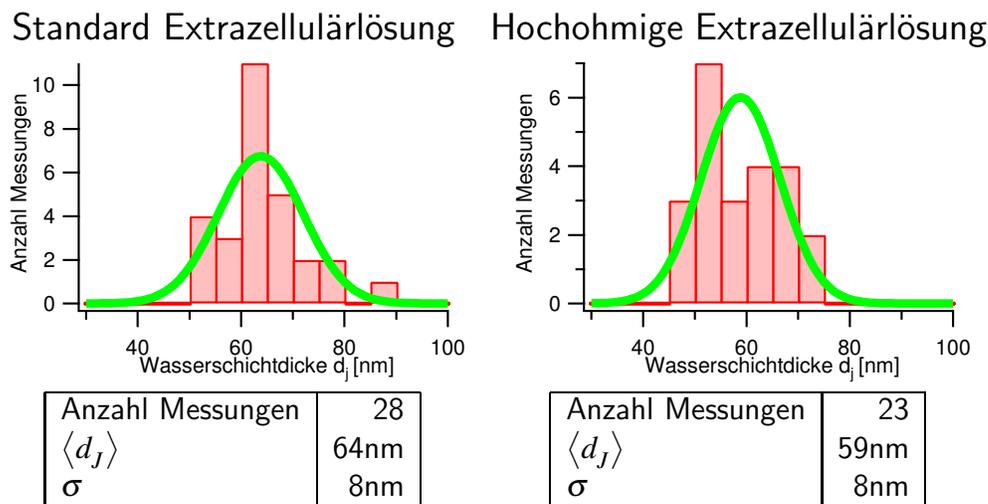


Abbildung 4.3: Histogramme der Spaltdicke für verschiedene Extrazellulärlösungen. Die Messungen wurden am selben Tag durchgeführt.

Eine Möglichkeit, auf den Flächenwiderstand Einfluss zu nehmen, besteht darin, eine hochohmige Extrazellulärlösung zu verwenden. Dazu wird das Natriumchlorid der Standardextrazellulärlösung weggelassen. Die Osmolarität wird durch Glucose ausgeglichen. Es wurde untersucht, ob diese Veränderung der Extrazellulärlösung Einfluss auf den Zell-Substrat-Abstand hat. Dazu wurden am selben Tag Messreihen mit unterschiedlichen Extrazellulärlösungen (Lösung A und F aus Tabelle 4.2) durchgeführt. Die Chips waren bereits mehrfach benutzt, silanisiert, fibronectinbeschichtet und Tickopurgereinigt. Abbildung 4.3 zeigt das Ergebnis dieser Messreihen. Der Unterschied zwischen den beiden mittleren Abständen liegt innerhalb der üblichen Schwankungen, so dass man davon ausgehen kann, dass die Veränderung der Extrazellulärlösung keinen Einfluss auf den Zell-Substrat-Abstand hat.

4.1.3 Abhängigkeit von der Vorgeschichte des Chips

Während der Durchführung der Experimente zu 4.1.2 fiel ein Effekt auf. Es wurden neue Chips frisch aus dem Reinraum verwendet. Diese wurden CARO-gereinigt, um die Photolackschicht abzunehmen, die vor dem Zersägen zum Schutz der empfindlichen Oberfläche aufgebracht wurde. Diese Chips wurden danach silanisiert, mit Fibronectin beschichtet und zur Kultur verwendet. Wie Abbildung 4.4 zeigt, ergab sich unabhängig von der Extrazellulärlösung ein geringerer Abstand von ca. 43nm. Dies ist signifikant geringer als die sonst üblichen 70nm. Nach mehrmaliger Verwendung der Chips stellten sich wieder die typischen Werte für d_J ein.

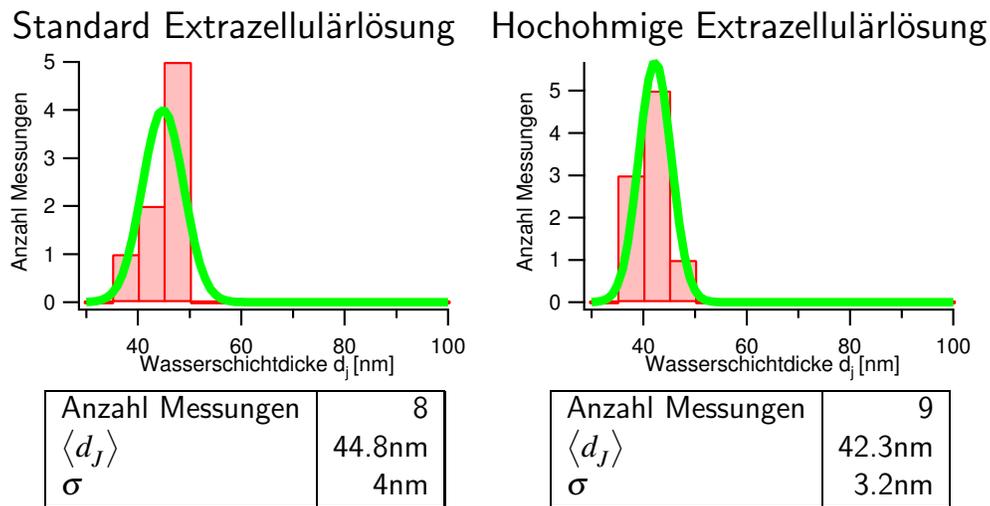


Abbildung 4.4: Besonderheit bei neuen Chips: Der Zell-Substratabstand ist deutlich kleiner als bei mehrfachverwendeten Chips.

Im Rahmen von [12] wurde nochmals reproduziert, dass der Zell-Substratabstand auf neuen CARO-gereinigten Chips kleiner ist als auf mehrfachverwendeten Chips. Die Zunahme der Schichtdicke nach mehrfacher Verwendung ist unabhängig von der Reinigungsmethode. Eine Erklärung für diesen Effekt ist nicht bekannt.

4.2 Schichtwiderstand bei HEK293

4.2.1 Beispielmessungen

Die in 3.2 beschriebene Methode wurde angewandt, um den Flächenwiderstand r_J zu bestimmen. Wichtig für eine erfolgreiche Messung ist die richtige Wahl der Messfrequenz. Überschlägt man $\nu = \frac{1}{4\tau}$ (siehe 3.2.6) so erhält man für typische Werte bei Standard-Extrazellulärlösung eine Messfrequenz von ca. 100kHz . Da τ proportional zu r_J ist muss man bei Erhöhung des Widerstands die Messfrequenz im gleichen Maß verringern.

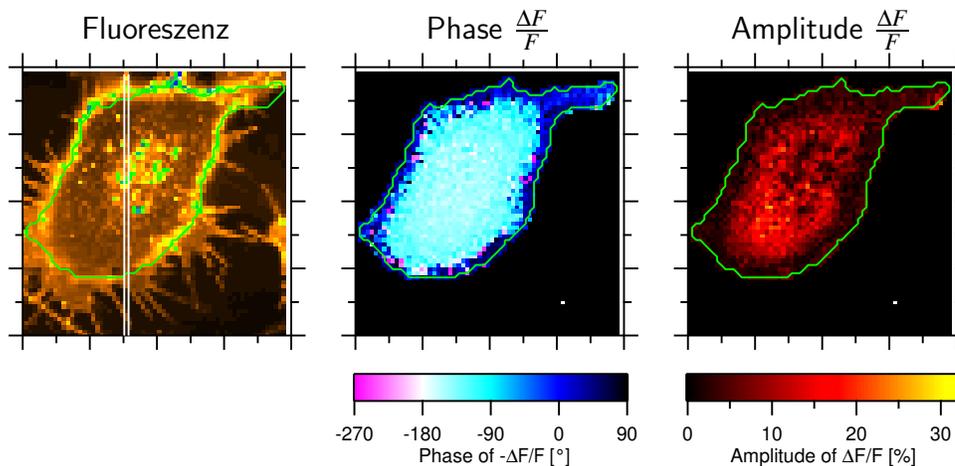


Abbildung 4.5: Beispiel einer Lock-In-Messung. Zu sehen ist das Fluoreszenzbild, die Phase und die Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung. ($\nu = 100\text{kHz}$, $c_{ox} = 0,22 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$, Bildbreite $40\mu\text{m}$)

Abbildung 4.5 zeigt ein Beispiel einer experimentell bestimmten Transferfunktion. Das Fluoreszenzbild zeigt die Adhäsionsmembran. Dieses Bild wird benutzt, um die Zellgeometrie zu bestimmen (grüne Linie). Wie man erkennen kann, ist in der Mitte der Zelle ein heller Fleck. Dieser ist auf eine unspezifische Anfärbung des Zellinneren zurückzuführen. Daneben befindet sich die Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung. Nahe am Rand erkennt man bei genauer Betrachtung das typische Minimum in der Amplitude. In der Mitte der Zelle erkennt man Störungen der Amplitude. Diese sind genau am Ort der unspezifischen Anfärbungen. Da die Anfärbung des Zellinneren nicht zum Signal beiträgt, ist dort die Amplitude geringer. Dies ist der Grund, weshalb die Amplitude nicht zur Auswertung benutzt wird. Betrachtet man nämlich die Phase, wird diese nicht durch die Probleme der unspezifischen Anfärbung beeinflusst. Das Phasenbild hat, wie in 2.1.6 besprochen, die typischen Merkmale. Nahe am Rand fällt die Phase sehr steil ab, um ca. 180° , um dann im zentralen Bereich die typische Form anzunehmen. Dieser zentrale Bereich wird dann benutzt, um die Theorie anzufitten.

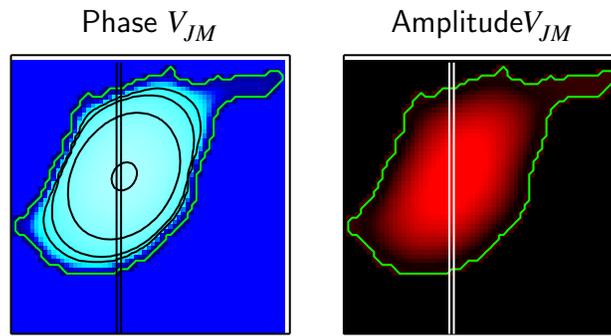


Abbildung 4.6: Numerische Lösung des Flächenkontaktmodells mit der aus dem Fluoreszenzbild bestimmten Zellgeometrie. Aus dem Fit ergab sich $r_J = 8 \pm 1 M\Omega$, $\beta_M = 0,5$ wurde angenommen

Abbildung 4.6 zeigt die Lösung des Flächenkontaktmodells, die sich nach dem Fit ergeben hat. Wie zu erwarten sind die Unterschiede zwischen Experiment und Theorie bei der Amplitude sehr gross, nicht jedoch bei der Phase. Die berechnete Phase hat genau die zuvor beschriebenen Merkmale. Um jedoch besser zwischen Theorie und Experiment vergleichen zu können, ist es geschickt, einen Schnitt (entlang der markierten Linie) zu betrachten.

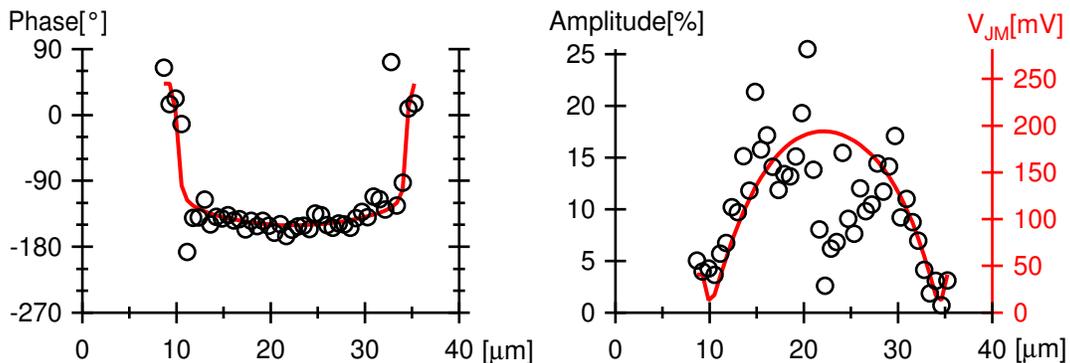


Abbildung 4.7: Profile von Phase und Amplitude. Sowohl die experimentellen Werte als auch die gefittete Theorie sind dargestellt.

Betrachtet man die Profile in Abbildung 4.7, so ist die experimentell bestimmte Amplitude relativ unbrauchbar, während die Phase ein Profil ergibt, das sehr gut mit der Theorie übereinstimmt. Betrachtet man Bereiche ausserhalb der unspezifischen Anfärbungen, kann man auch die Empfindlichkeit des Farbstoffs bestimmen. Im Fall dieser Zelle ergab sich eine Empfindlichkeit von $12 \frac{\%}{100mV}$

Abbildung 4.8 zeigt eine zweite Beispielmessung. Diese wurde mit hochohmiger

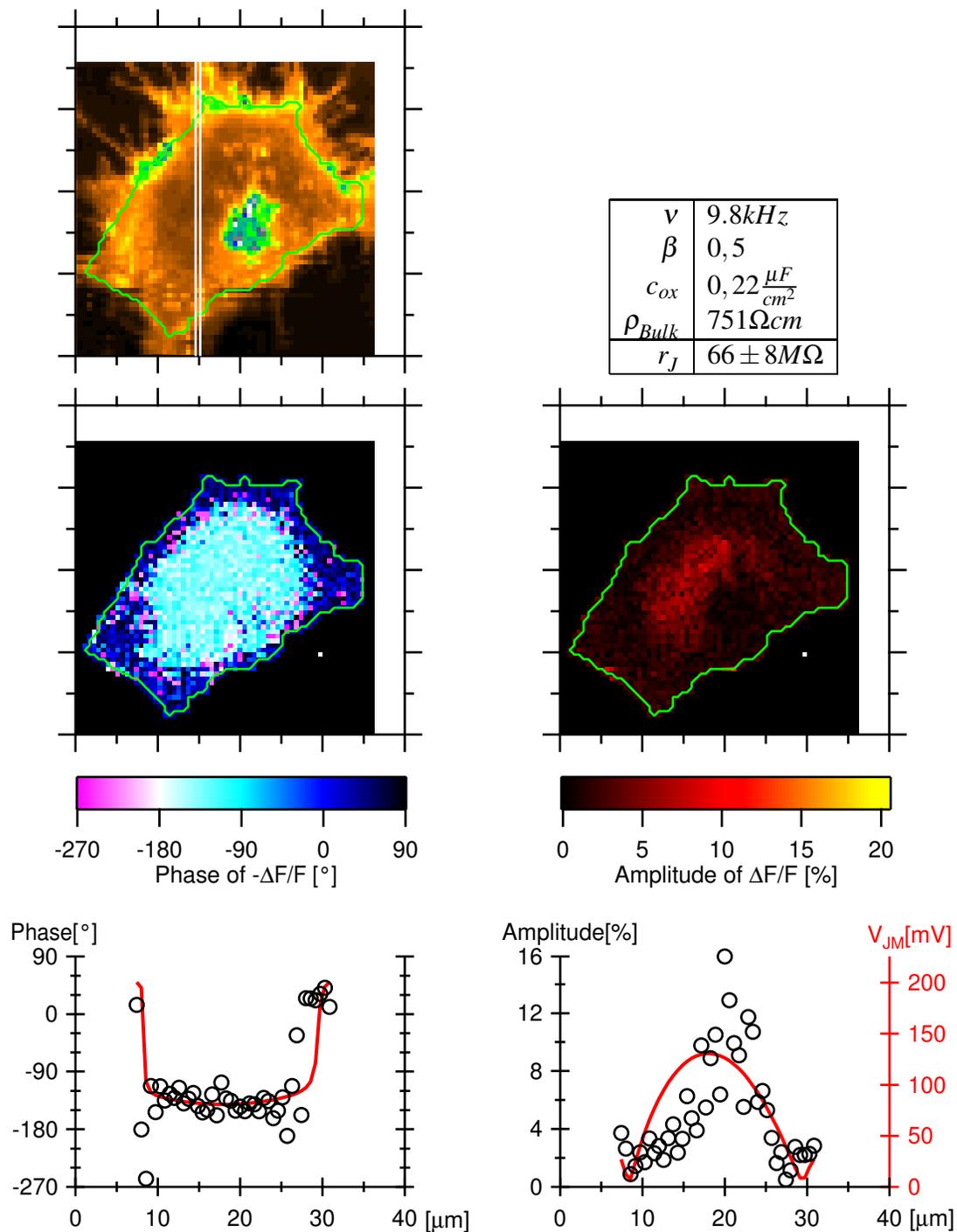


Abbildung 4.8: Beispiel einer Lock-In-Messung. Hier wurde hochohmige Extrazellulärlösung verwendet. Um den höheren Schichtwiderstand r_j der natriumfreien Extrazellulärlösung messen zu können, muss die Stimulationsfrequenz deutlich reduziert werden.

Extrazellulärlösung durchgeführt. Die Messfrequenz musste auf $9,8kHz$ ¹ erniedrigt werden, um in den optimalen Bereich zu gelangen. Im Phasenprofil dieser Messung erkennt man einen anderen typischen Effekt. Aufgrund der geringen Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung machen sich Schwankungen stärker in der Phase bemerkbar als in Bereichen hoher Amplitude. Nahe am Rand sind also Schwankungen der Phase ausgeprägter.

4.2.2 Experimentelle Bestimmung der Frequenzcharakteristik

Zum Test der Apparatur und um die Theorie genauer zu verifizieren wurden an einer Zelle Lock-In Messungen mit mehreren Stimulationsfrequenzen durchgeführt. Ziel ist es, die Frequenzcharakteristik des Flächenkontaktmodells experimentell zu bestimmen, vergleichbar zu Abbildung 2.3 im Theorieteil. Durch die Apparatur sind die möglichen Stimulationsfrequenzen limitiert. Für Standardlösung muss man bereits die maximale Frequenz verwenden. Deshalb wurde eine Lösung verwendet, deren spezifische Widerstand höher also die von Standard Extrazellulärlösung ist (Lösung C, vgl. Tabelle 4.2). Somit sinkt die optimale Frequenz.

Dazu wurde zuerst bei der optimalen Frequenz die gesamte Zelle gemessen, um daraus $r_j = 20M\Omega$ zu bestimmen (Abbildung 4.9). Danach wurde jeweils bei einer Frequenz ein horizontaler Streifen der Zelle gemessen. Es wurden immer benachbarte Streifen verwendet, um nicht immer den selben Bereich der Zelle auszubleichen bzw. phototoxisch zu belasten. Dies erklärt die unterschiedliche Breite der verschiedenen Profile. Die Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen die Ergebnisse für die verschiedenen Frequenzen und die Theoriekurve für $r_j = 20M\Omega$. Wie man sieht, beschreibt die Theoriekurve sehr gut die experimentell bestimmte Phase. Wie durch die Theorie beschrieben entwickelt sich die Phasenlage mit steigender Frequenz von -90° bis -180° . Die Amplitude zeichnet sich, wie üblich, durch starke Schwankungen aus. Jedoch ist trotz der üblichen Störungen die Hochpasscharakteristik zu erkennen. Mit steigender Frequenz nimmt die Amplitude deutlich zu. Diese Messung wurde durchgeführt, bevor der Lock-In-Verstärker zur Chipcharakterisierung in den Versuchsaufbau integriert wurde. Zur Chipcharakterisierung wurde hier eine Speicheroszilloskop verwendet. Dadurch waren Messfrequenzen grösser $102kHz$ möglich.²

¹Aus experimentellen Gründen wurde dieser etwas krumme Wert für die Stimulationsfrequenz gewählt. Die Anzahl von Samples pro Stimulationsperiode sollte einen Zweierpotenz sein, damit man zur Auswertung den Fast Fourier Algorithmus anwenden kann.

² der Lock-In-Verstärker hat den Vorteil, dass die Messung besser automatisierbar ist. Außerdem ist die Messgenauigkeit höher.

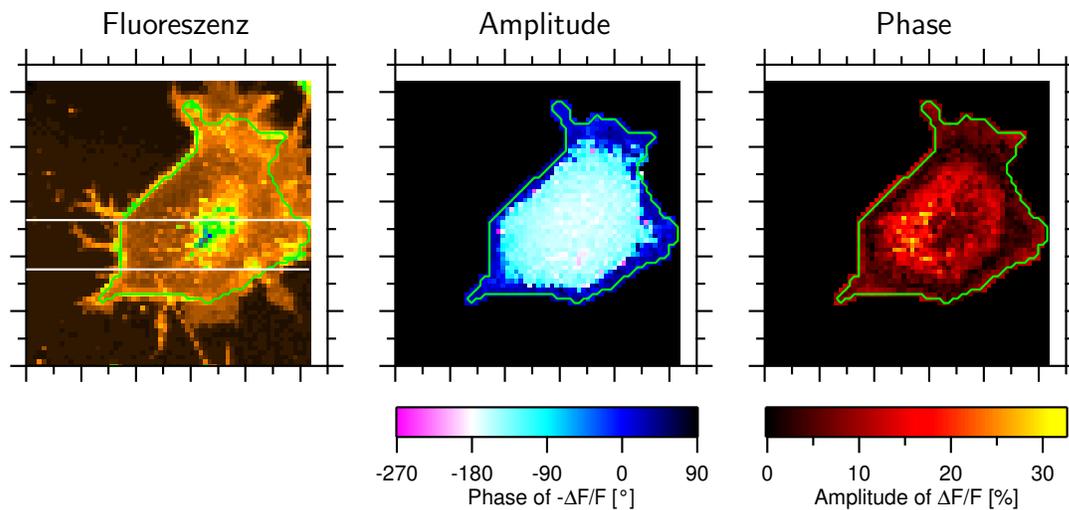


Abbildung 4.9: Anhand dieser Messung wurde $r_J = 20 \pm 3 M\Omega$ bestimmt ($\nu = 50 kHz$, $\beta_M = 0,5$, $c_S = 0,22 \frac{\mu F}{cm^2}$, $\rho_{Bulk} = 20 \Omega cm$). Für diesen r_J Wert wurde in den Abbildungen 4.10 und 4.11 die Theoriekurve berechnet. Die Profile in den Abbildungen 4.10 und 4.11 stammen aus dem markierten Bereich. (Von unten nach oben mit steigender Frequenz).

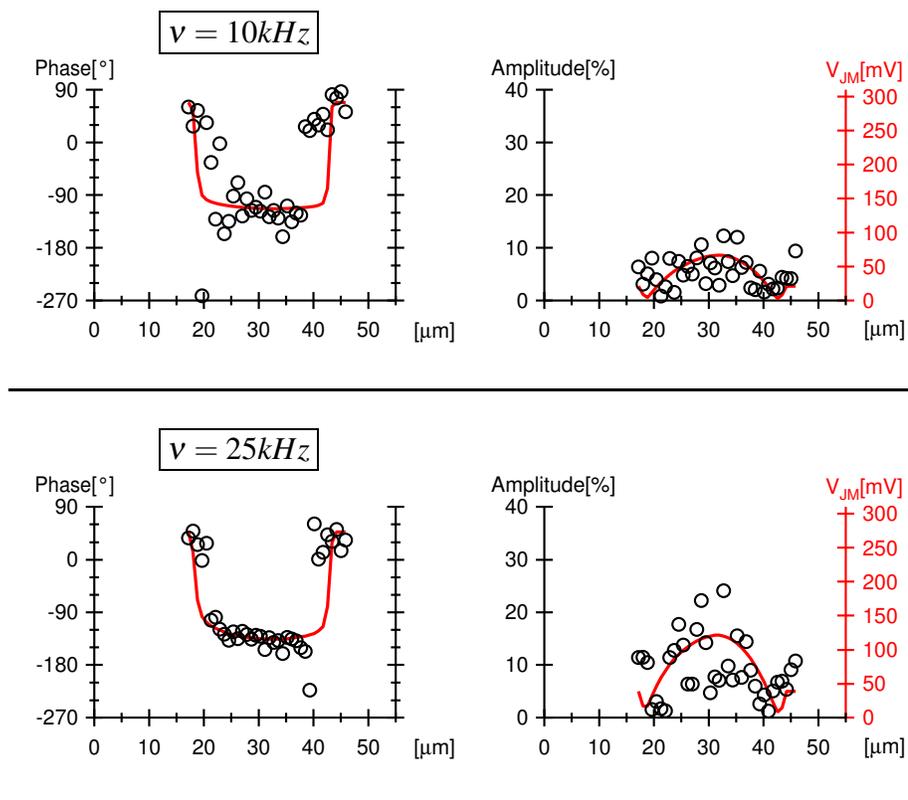


Abbildung 4.10: Phasen- und Amplitudenprofile für verschiedene Frequenzen entlang benachbarter Linien. Wird fortgesetzt in Abbildung 4.11

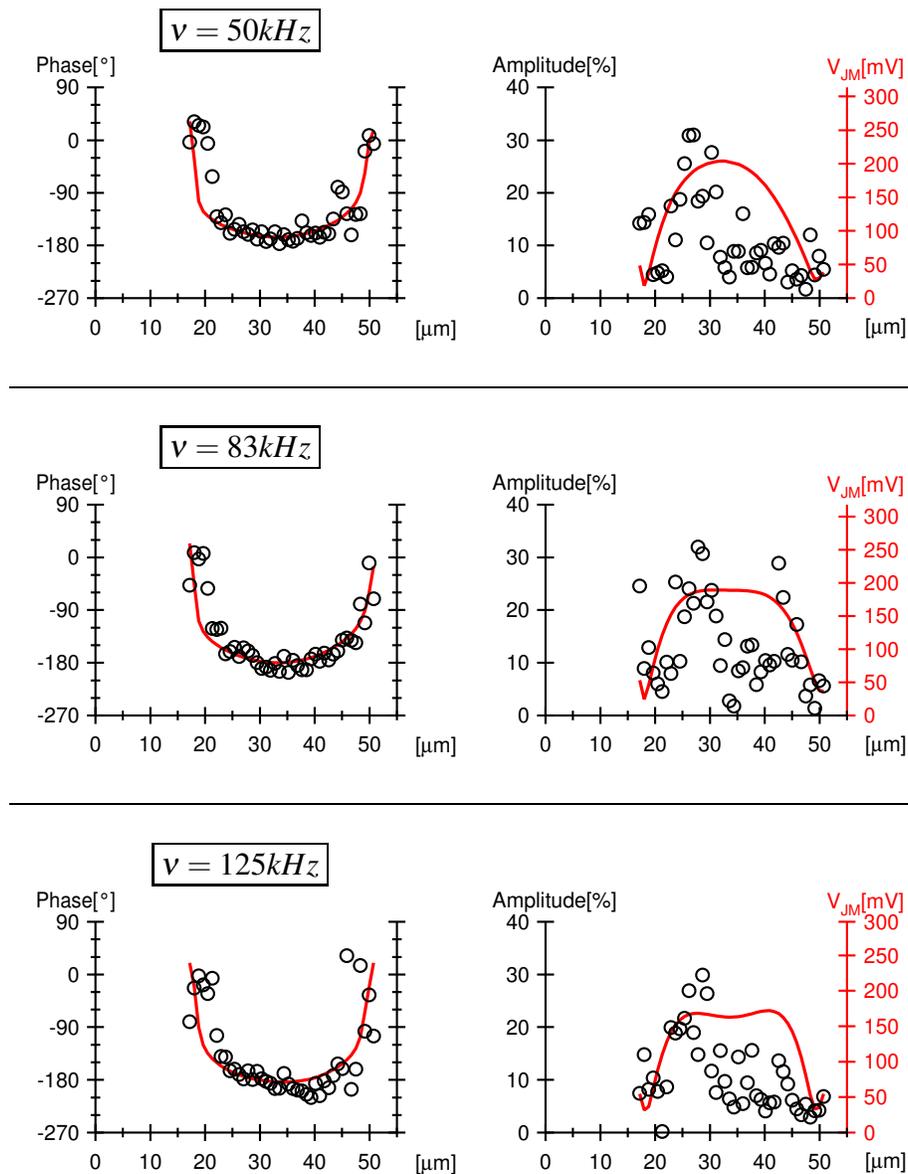


Abbildung 4.11: Fortsetzung von Abbildung 4.10 Phasen- und Amplitudenprofile für verschiedene Frequenzen entlang benachbarter Linien. Mit steigender Frequenz sinkt im zentralen Bereich der Adhäsionsfläche die Phase, während die Amplitude zunimmt.

4.2.3 Spaltwiderstand r_j für verschiedene Elektrolytlösungen

In diesem Abschnitt wird der Einfluss des Extrazellulärmediums auf den spezifischen Widerstand im Spalt untersucht. Dies kann man auf zweierlei Arten verwirklichen. Eine Möglichkeit besteht darin, an einer Einzelzelle den Schichtwiderstand vor und nach Austausch der Extrazellulärlösung zu messen. Die andere besteht darin, in Extrazellulärlösungen mit verschiedenen spezifischen Widerständen viele Zellen zu messen, um daraus eine Äquivalenzspaltdicke zu bestimmen. In beiden Fällen wurde der spezifische Widerstand des Elektrolyten durch die Natriumkonzentration verändert. Bei Weglassen von Natrium muss, um ein Platzen der Zelle zu verhindern, die Osmolarität mit Glucose ausgeglichen werden.

Austauschexperimente

Zuerst erfolgt eine Messung in Standard-Extrazellulärlösung, nach einem Lösungsaustausch eine Messung in natriumfreier hochohmiger Extrazellulärlösung. Zuletzt wurde die gesamte Zelle in Standardextrazellulärlösung gemessen, um festzustellen, ob der Vorgang reversibel ist. Es wurden die Lösungen A und F aus Tabelle 4.2 verwendet. Da Anine-5 phototoxisch ist, muss die Beleuchtungszeit stark verkürzt werden. Deshalb wurde bei den ersten beiden Schritten nur ein schmaler Streifen gemessen und erst bei dem abschließenden Schritt die gesamte Zelle. Vor jedem Schritt der Messung musste neu fokussiert werden, da sich durch die Brechungsindexänderung³ die Fokusebene verändert, was zu einer zusätzlichen phototoxischen Belastung der Zelle führt.

An sieben verschiedenen Zellen wurde das Experiment erfolgreich durchgeführt. Abbildung 4.12 zeigt exemplarisch eine Messung. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse

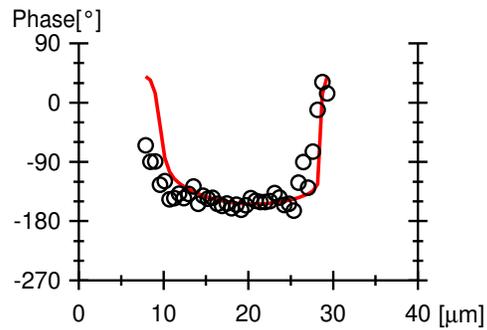
³Durch die hohe Glucosekonzentration ändert sich der Brechungsindex, wodurch sich die Fokusebene leicht verändert

Schritt	I	II	III	
spezifischer Widerstand $\rho_{Bulk} [\Omega cm]$	67,1	657	67,1	rel. Änderung 9,8
Schichtwiderstand $r_j [M\Omega]$				
Messung A	5,3	73	7,8	11
B	7,2	81	6,3	11
C	6,2	83	7,4	12
D	8,1	84	8,2	10
E	9,6	76	8,1	8,6
F	12	120	12	10
G	7,5	120	5,9	18

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Austauschexperimente.

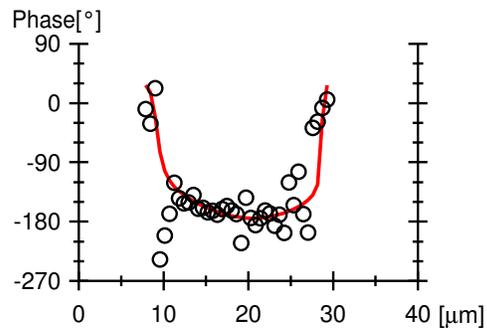
Schritt I Standard Extrazellulärlösung

$$\begin{aligned}\rho_{Bulk} &= 67,1 \Omega cm \\ r_j &= 11,5 \pm 1,4 M\Omega \\ \nu &= 100 kHz\end{aligned}$$



Schritt II Hochohmige Extrazellulärlösung

$$\begin{aligned}\rho_{Bulk} &= 657 \Omega cm \\ r_j &= 122 \pm 21 M\Omega \\ \nu &= 19.53 kHz\end{aligned}$$



Schritt III Standard Extrazellulärlösung

$$\begin{aligned}\rho_{Bulk} &= 67,1 \Omega cm \\ r_j &= 11,5 \pm 1,5 M\Omega \\ \nu &= 100 kHz\end{aligned}$$

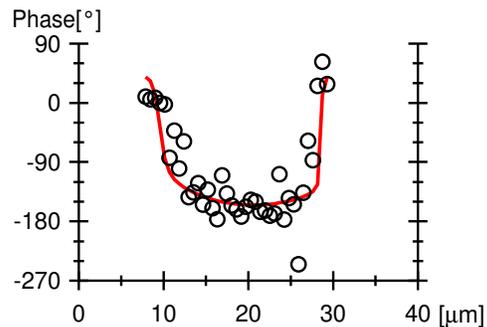
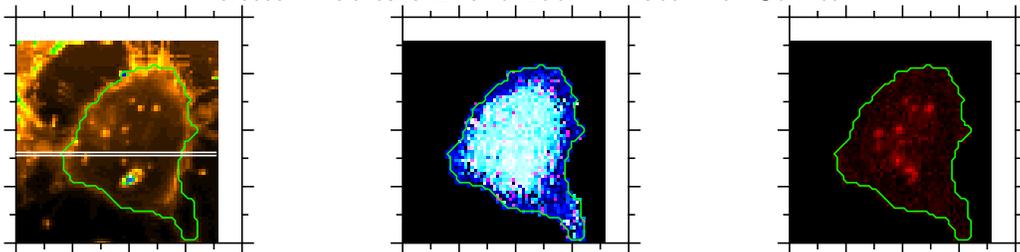


Abbildung 4.12: Phasenverläufe entlang einer Linie. Die drei Messungen wurden nacheinander an der selben Zelle durchgeführt. Dabei wurde die Extrazellulärlösung (ECM) ausgetauscht. Zuerst Standard, dann hochohmige ECM. Zum Schluss als Test nochmals Standard ECM. Der Schichtwiderstand r_j ändert sich reversibel und ist proportional zu ρ_{Bulk} . ($\beta_M = 0,5$, $c_{ox} = 0,22 \frac{\mu F}{cm^2}$). Die kleinen 2D-Graphen zeigen die kompletten ausgewerteten Fluoreszenz- und Lock-In-Daten von Schritt III.



zusammen. Wie man sieht, ist die Veränderung von r_j in den zu erwartenden Fehlergrenzen reversibel und proportional zu den Änderungen des spezifischen Elektrolytwiderstands.

Äquivalentspaltspaltdicke

Die zuvor gezeigten Messungen zeigen die Möglichkeit, auf den Spaltwiderstand Einfluss zu nehmen. Es stellt sich die Frage, wie genau der Flächenwiderstand vom spezifischen Elektrolytwiderstand abhängt. Um diese Abhängigkeit zu quantifizieren, wurde eine Messreihe durchgeführt, bei der für sechs Extrazellulärlösungen mit verschiedenen spezifischen Widerständen der Schichtwiderstand r_j im Spalt bestimmt wurde. (In Tabelle 4.2 sind die genauen Angaben über die Extrazellulärlösungen.) Abbildung 4.13 zeigt den Schichtwiderstand r_j aufgetragen gegen den spezifischen Elektrolytwiderstand ρ .

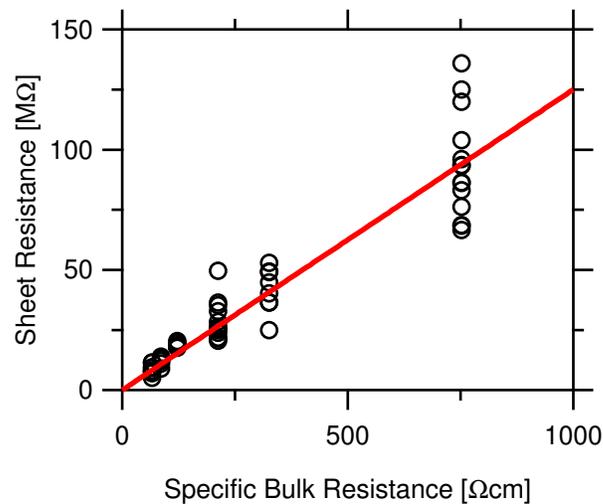


Abbildung 4.13: Der Schichtwiderstand r_j in Abhängigkeit des spezifischen Elektrolytwiderstands ρ . Jeder Kreis entspricht einer gemessenen Zelle. Insgesamt wurden 56 Einzelmessungen ausgewertet.

Man erkennt einen linearen Zusammenhang zwischen r_j und ρ . Für den zweidimensionalen Flächenwiderstand r_j und den spezifischen Elektrolytwiderstand ρ_j im Spalt gilt

$$r_j = \frac{\rho_j}{d_j} \quad (4.1)$$

Durch die Messpunkte aus Abbildung 4.13 wird eine Ausgleichsgerade gelegt. Aus der Steigung a dieser Geraden kann durch $d_{eq} = a^{-1}$ eine Äquivalentspaltdicke bestimmt werden. Diese gibt an, wie dick ein nur mit Extrazellulärflüssigkeit gefüllter Spalt wäre. Das Ergebnis von $d_{eq} = 80\text{nm}$ ist in guter Übereinstimmung mit der in 4.1

Substance [mM]	A	B	C	D	E	F
KCl	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
NaCl	135	101	72.5	34	16.9	0
CaCl ₂	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1	1	1	1	1	1
D-(+)-Glucose	10	67.5	125	183	210	240
Hepes	5	5	5	5	5	5
Properties						
specific Bulk resistance ρ [Ωcm]	66	86	122	213	325	751
pH	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3

Tabelle 4.2: Die verschiedenen verwendeten Extrazellulärlösungen. Lösung A ist die Standard Extrazellulärlösung. Bei Lösung F ist Natriumchlorid durch Glucose ersetzt. Alle anderen Lösungen wurden durch Mischen von A und F angesetzt.

bestimmten Schichtdicke von $d_j = 70nm$. Betrachtet man die üblichen Schwankungen von Messreihe zu Messreihe und die eventuellen Fehlerquellen, so kann man von einer guten Übereinstimmung sprechen. Eine zweite nicht gezeigte Messreihe ergab eine Äquivalenzspaltdicke von $d_{eq} = 70nm$

Spezifischer Elektrolytwiderstand im Spalt

In den beiden vorangegangenen Unterabschnitten konnte also gezeigt werden, dass man durch Veränderung des spezifischen Elektrolytwiderstandes direkt Einfluss auf den Widerstand des Spalts nehmen kann. Zusätzlich ergibt sich bei einem Vergleich zwischen der Äquivalenzspaltdicke und dem Zell-Substrat-Abstand, dass der spezifische Spaltwiderstand identisch ist mit dem des Elektrolyten. Dies beendet Spekulationen über eventuelle Abweichungen des spezifischen Widerstandes im Spalt.

4.3 Transienten

Mit Transientenmessungen wird überprüft, wie sich eine periodische Stimulation auf die Membranspannung V_{JM} auswirkt. Dazu misst man die Fluoreszenz über mehrere Perioden und berechnet die mittlere zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz während einer Stimulationsperiode, gemittelt über einen zentralen Bereich der Adhäsionsfläche. Man möchte dadurch die Voraussagen überprüfen, die mit Hilfe des Punktkontaktmodells erstellt wurden.

Für das kapazitive Öffnen von Ionenkanälen [38] ist es von großem Interesse, rechteckförmige Spannungen über die Membran zu erzeugen. Dies war die Motivation, mit den in 2.2.3 beschriebenen Pulsformen Transientenmessungen durchzuführen. Für diese Messung wurden Chips mit Stimulationssspots aus Titandioxid verwendet. Als

Extrazellulärlösung diente natriumfreie hochohmige Extrazellulärlösung (Siehe Tabelle 4.1). Beides dient dazu, die Zeitkonstante des Punktkontaktmodells zu verlängern. Überschlägt man die Zeitkonstante, so erhält man eine Größenordnung von $40\mu s$.⁴ Ist die Pulsdauer lang im Vergleich zu Zeitkonstante des Punktkontaktmodells und des Bad-Chip-Systems, so erreicht man teilweise schon durch eine dreieckförmige Stimulationsspannung eine ausreichend rechteckförmige Membranspannung. Abbildung 4.14 zeigt ein Beispiel. Man erkennt den langsamen Anstieg der Spannung an den Flanken. Die Anstiegszeit entspricht in ungefähr den abgeschätzten $40\mu s$. Die Pulsdauer ist deutlich länger als diese Anstiegszeit.

Möchte man diesen langsamen Anstieg vermeiden, so muss man zusätzlich einen Spannungssprung in der Stimulation einführen. Um dies zu erreichen, muss man V_R und V_T so wählen, dass

$$\frac{V_R}{V_T} = \frac{\tau_\beta}{T\theta(1-\theta)} \quad (4.2)$$

gilt. (Vergleiche Gleichungen (2.66) und (2.67)). Für die hier abgeschätzten Systemparameter ergibt sich $\frac{V_R}{V_T} = 0,16$.

Abbildung 4.15 zeigt ein Beispiel, in dem nicht nur eine dreieckige Stimulation verwendet wurde. Ein zusätzlicher Spannungssprung sorgt dafür, dass der Anstieg der Membranspannung an den Flanken steiler ist. Der Quotient $\frac{V_R}{V_T}$ hat allerdings den Wert 0,2. Da das Bad-Chip-System ein zusätzlicher Tiefpass ist, ist eine etwas höhere Wahl dieses Verhältnisses vorteilhaft, um eine bessere Annäherung an die Rechteckform zu erhalten.

In beiden Abbildungen zeigt sich das Problem der intrazellulären Anfärbung. Um das Ergebnis interpretieren zu können, muss man über den zentralen Bereich der Adhäsionsfläche mitteln, was dazu führt, dass die Fluoreszenz aufgrund der intrazellulären Anfärbung mit in die Mittelung einbezogen wird. Dies ändert nichts an der Form der Transienten, jedoch ist die Amplitude der relativen Fluoreszenzänderung stark verringert. Eine Bestimmung der Betrags von V_{JM} mit Hilfe der Farbstoffempfindlichkeit ist dadurch nicht möglich.

Kurze Pulse

Wenn man zu Pulslängen übergeht, deren Größenordnung sich der Zeitkonstante annähert, so machen sich die Anstiegszeiten aufgrund der Zell- und Chipdynamik deutlicher bemerkbar. Deshalb ist es nötig, die in 2.2.3 beschriebenen Pulsformen zu verwenden. Wie man in Abbildung 4.16 sieht, ist es mit einem reinen dreieckförmigen Stimulationspuls nicht möglich, die gewünschte Pulsform über die Zellmembran zu erreichen. Der kürzere Teil des Pulses dauert $40\mu s$, was in etwa der Zeitkonstante des Zell-Chip-Systems entspricht. Zusätzlich ist noch der Tiefpass des Bad-Chip-Systems vorhanden. So ist es nicht verwunderlich, dass keine vernünftige Stimulation

⁴ $\langle A_{JM} \rangle = 500\mu m^2$, $\langle r_j \rangle = 93M\Omega$ sind die experimentellen Mittelwerte für hochohmige Extrazellulärlösung. Außerdem wurde $c_s = 1 \frac{\mu F}{cm^2}$ und $\beta_M = 0,7$ angenommen.

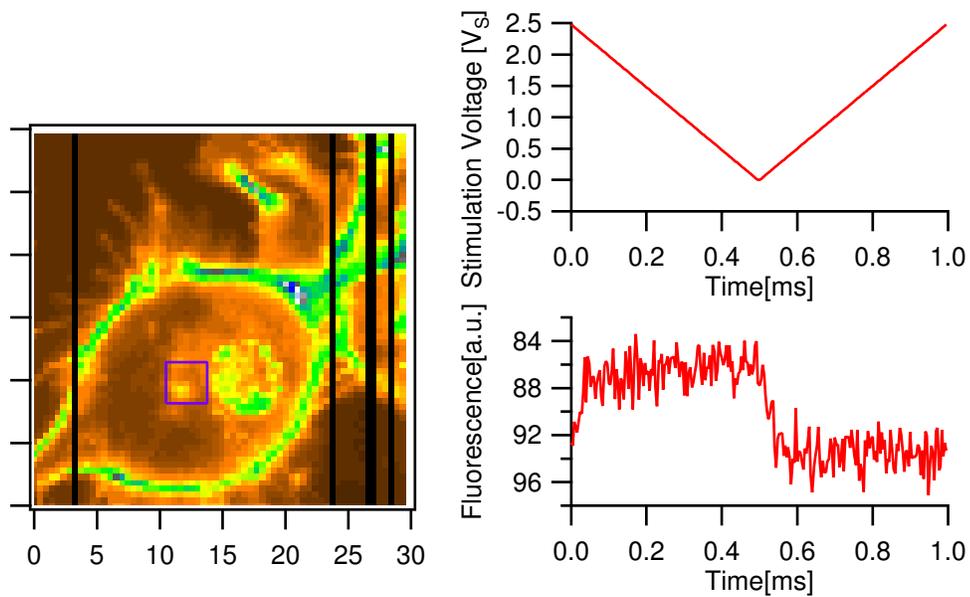


Abbildung 4.14: Beispiele einer Transiente im Fall dreieckförmiger Stimulationsspannung. Der Anstieg an den Flanken aufgrund der Zeitkonstante $\tau_{\beta} = 40\mu\text{s}$ ist aufgrund der langen Pulsdauer nicht sehr störend. (Das blaue Rechteck zeigt den ausgewerteten Bereich.) Da die Farbstoffempfindlichkeit negativ ist, wurde die Fluoreszenzskala invertiert dargestellt.

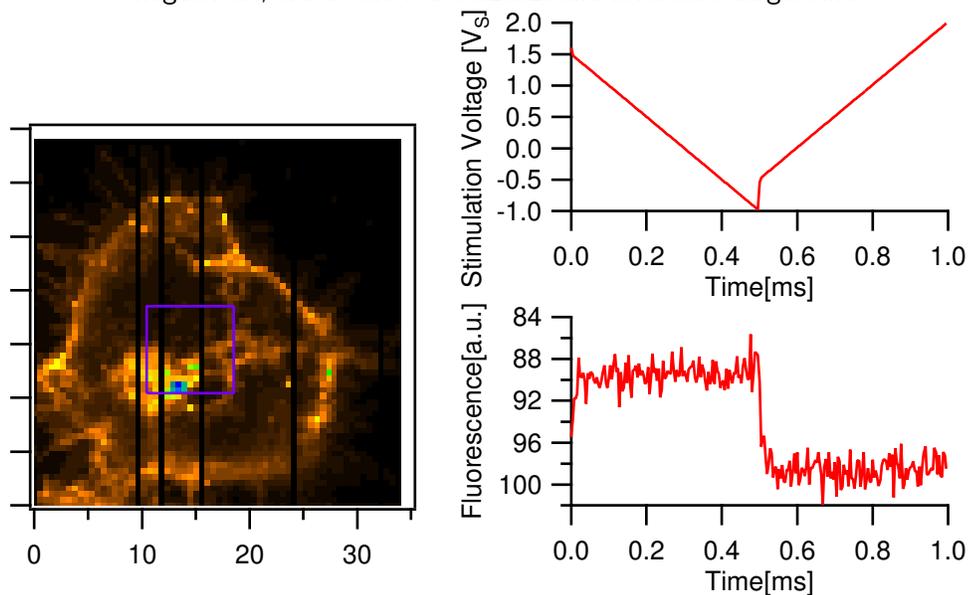


Abbildung 4.15: Zu der dreieckigen Stimulationsspannung wurde zusätzlich eine rechtecke addiert. Dadurch verkürzt sich die Anstiegszeit der Membranspannung. (Das blaue Rechteck zeigt den ausgewerteten Bereich.) Da die Farbstoffempfindlichkeit negativ ist, wurde die Fluoreszenzskala invertiert dargestellt.

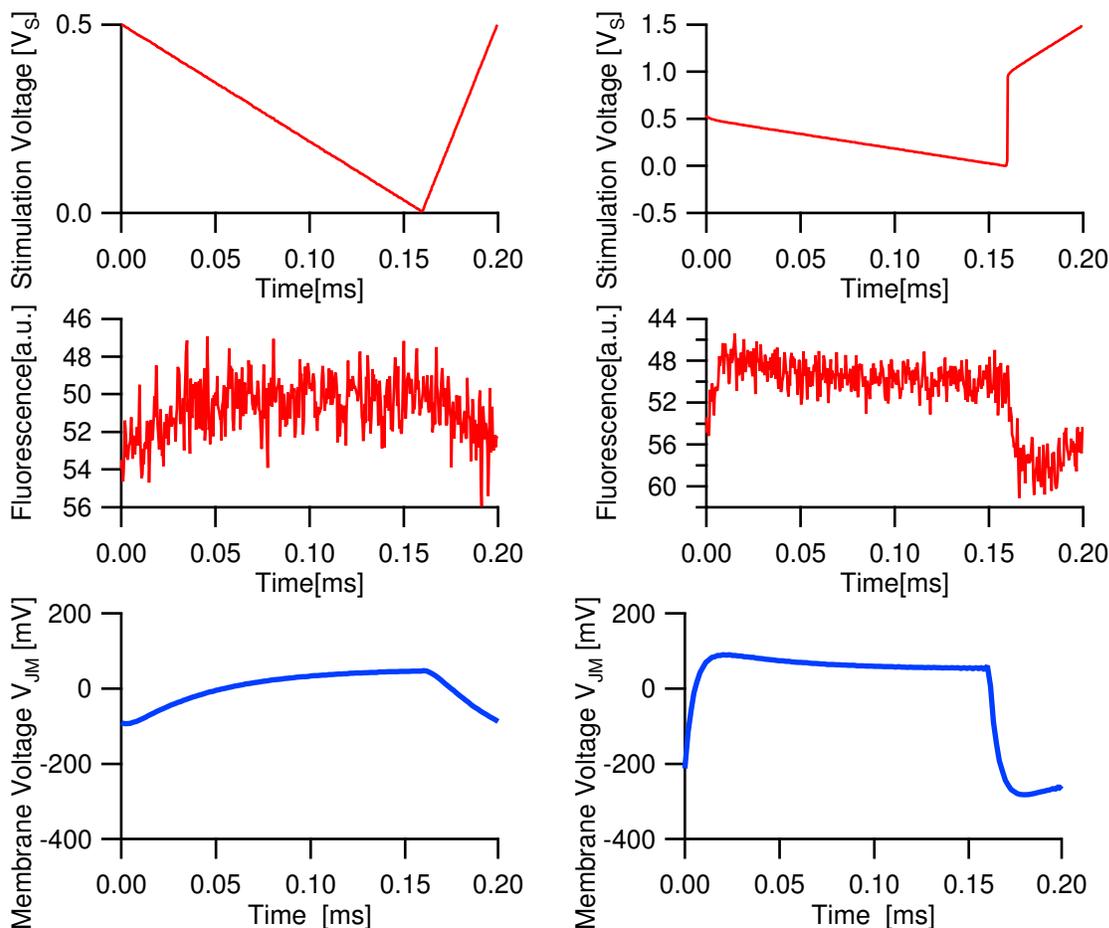


Abbildung 4.16: Zwei Transienten mit dem Tastverhältnis 80%, gemessen an der selben Zelle. Links eine Transiente für einen Dreieckspuls. Rechts für eine Kombination aus Dreiecks und Rechteckspuls. Für die berechnete Transiente wurden $\tau_{\beta} = 45\mu s$ und $\tau_{RC} = 5\mu s$ verwendet. Da die Farbstoffempfindlichkeit negativ ist, wurde die Fluoreszenzskala invertiert dargestellt.

möglich ist. Addiert man jedoch zum Dreieckspuls einen Rechteckpuls, so erhält man die gewünschte Pulsform. Die Abbildung 4.17 zeigt zwei Beispiele für Transientenmessungen, gemessen an der selben Zelle. Man erkennt den Effekt, den man durch Variation des Spannungssprungs erhält. Für die erste Messung war das Verhältnis zwischen V_R und V_T geeignet gewählt. In der zweiten gezeigten Messung war der Sprung größer. So nähert sich die Membranspannung von großen Spannungsbeträgen dem Grenzwert an. Zusätzlich sind noch zwei mit dem Punktkontaktmodell berechnete Transienten zu sehen. Diese wurden für einen leicht angepassten Werte von τ_{β} berechnet. Sehr schön zu sehen ist der Einfluss von V_R auf das Aussehen der Transiente. Für die Anwendung relevant ist die Verwendung eines anderen Tastverhältnisses. Die Abbildungen 4.16 (rechts) und 4.18 zeigen zwei Beispiele. Ein Vergleich mit den berechneten Spannungstransienten zeigt in beiden Fällen, dass die erwarteten Puls-

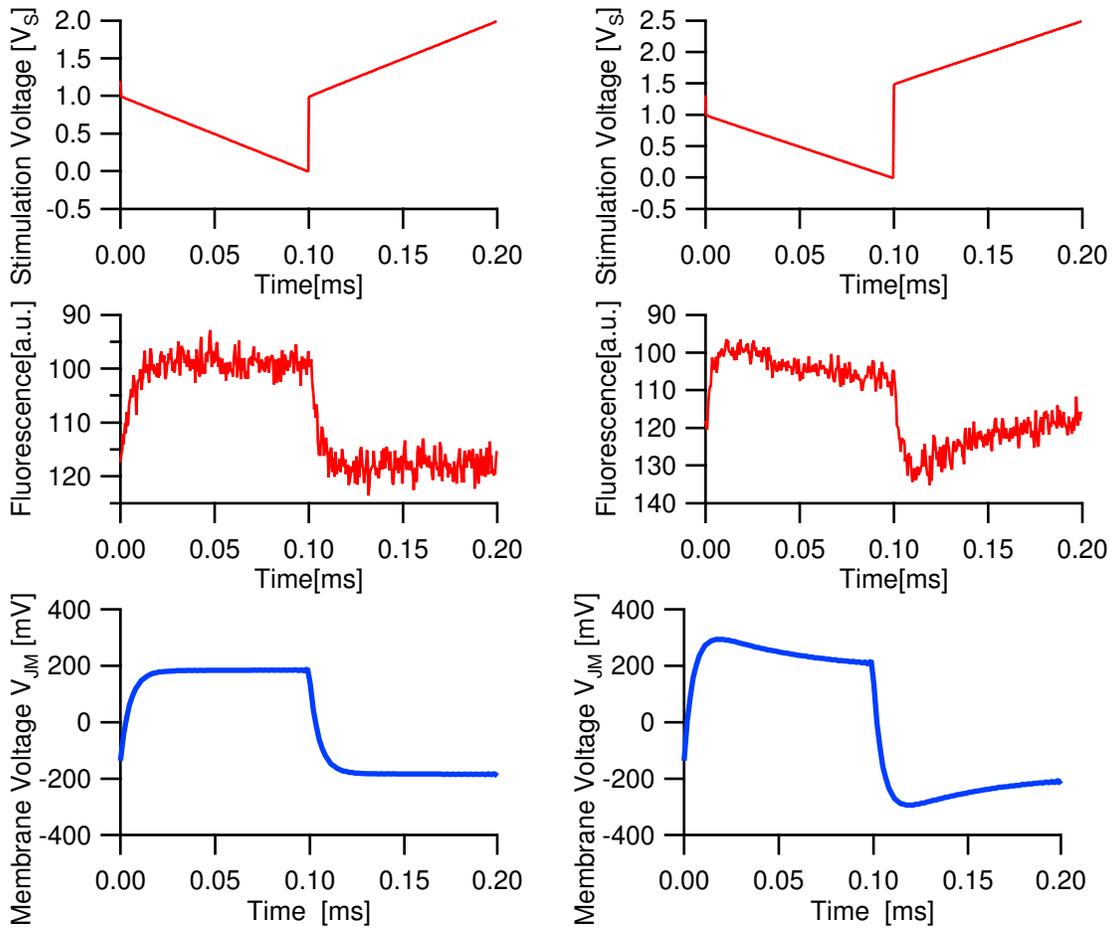


Abbildung 4.17: Zwei Messungen die an der selben Zelle mit verschiedenen hohen Spannungssprüngen. Oben der Stimulationspuls, in der Mitte die Transiente der Fluoreszenz und unten die berechnete Spannungstransiente für $\tau_{\beta} = 50\mu s$ und $\tau_{RC} = 5\mu s$. Da die Farbstoffempfindlichkeit negativ ist, wurde die Fluoreszenzskala invertiert dargestellt.

formen erzeugt werden konnten.

Mit Hilfe dieser Transientenmessungen konnte also gezeigt werden, dass es durch kapazitive Stimulation möglich ist, Spannungspulse der gewünschten Form über die Adhäsionsmembran einer Zelle zu erzeugen.

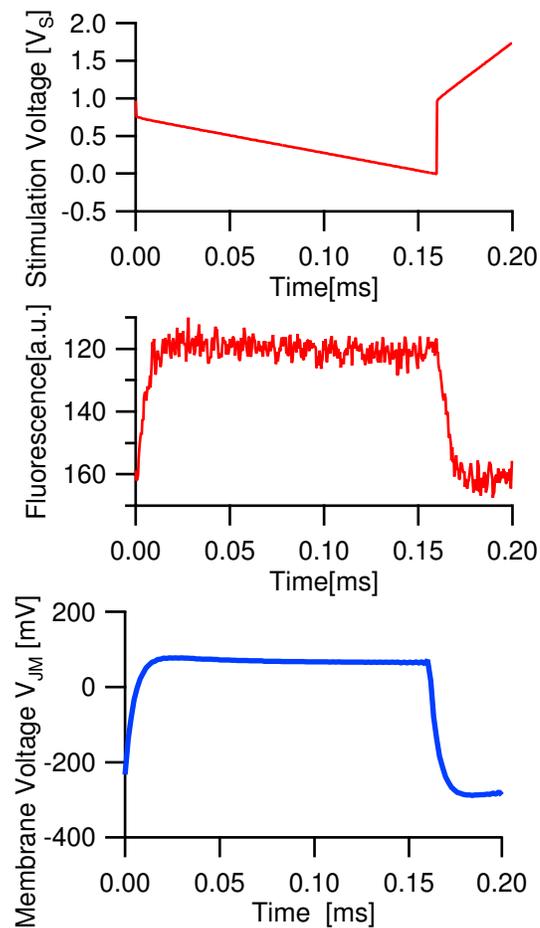


Abbildung 4.18: Transiente für Tastverhältnis 80%. Oben der Stimulationspuls, in der Mitte die Transiente der Fluoreszenz unten die berechnete Spannungstransiente für $\tau_\beta = 40\mu s$ und $\tau_{RC} = 5\mu s$. Da die Farbstoffempfindlichkeit negativ ist, wurde die Fluoreszenzskala invertiert dargestellt.

4.4 MDCK-Zellen

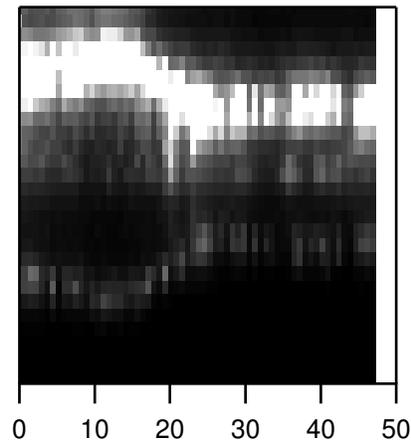


Abbildung 4.19: Konfokalaufnahme einer senkrechten Ebene bei geschlossenen MDCK-Zellrasen auf Silizium-Chip. Man erkennt die obere Membran und deren Spiegelbild. Die untere Membran ist nicht angefärbt, da die Apikale und die Basolaterale durch die Tight Junctions getrennt ist. (der Maßstab in z-Richtung weicht von dem in y-Richtung ab.) Die Höhe der Zellen beträgt mehrere μm .

Wegen der von ihnen ausgebildeten Tight Junctions sind MDCK-Zellen interessant. Durch die daraus resultierende grosse Fläche eines Zellverbandes sollte eine gute Kopplung zwischen Zellen und Chips möglich sein. Gerade diese Tight Junctions machen die Anwendung von Membranmarkern schwierig. Bei einem geschlossenen Zellrasen ist es nicht möglich, die untere Membran anzufärben. Durch die Diffusionsbarriere der Tight Junction kann der Farbstoff nicht von der oberen zur unteren Membran gelangen. Abbildung 4.19 zeigt eine Konfokalaufnahme. Daher muss man dazu übergehen, einzelne Zellen oder kleinere Zellgruppen zu untersuchen, so dass der Farbstoff die untere Membran über Diffusion durch den Spalt erreichen kann. Da gerade die Tight Junctions den MDCK-Zellen ihre interessantesten Eigenschaften verleihen, sind Messungen an einzelnen Zellen uninteressant.

4.4.1 Zell-Substrat-Abstand

Die hier vorgestellten FLIC-Messungen wurden an Gruppen von Zellen durchgeführt. Es ergab sich ein durchschnittliches d_j von $91 nm$. Dies ist ein überraschend hoher Abstand im Vergleich zu HEK293-Zellen.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die geringe Höhe der Zellen das Messergebnis verfälscht hat. Das Höhenprofil der oberen Membran ist nicht moduliert durch die

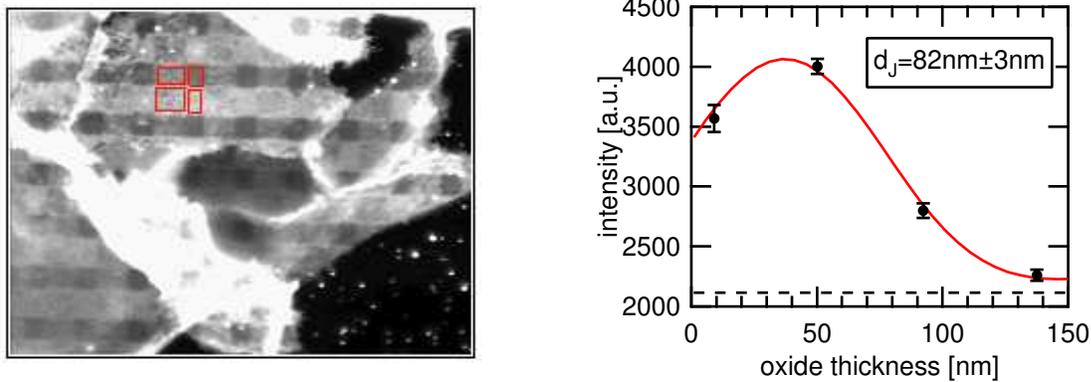


Abbildung 4.20: Fluoreszenzbild einer Gruppe von Zellen.

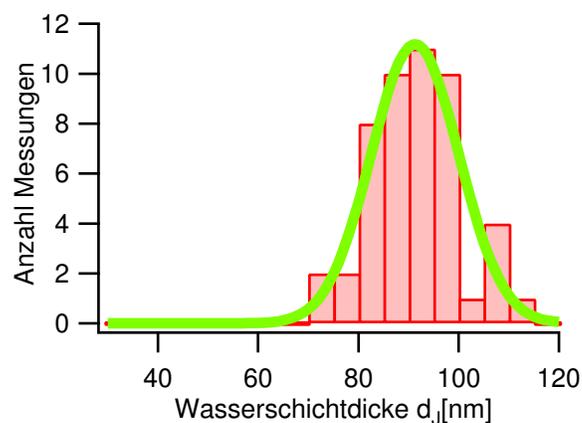


Abbildung 4.21: Das zur Messreihe gehörige Histogramm. Bei 49 ausgewerteten Zellen ergab sich ein durchschnittlicher Abstand von $\langle d_j \rangle = 91 \pm 9 \text{ nm}$

Struktur des Chips, die maximalen Höhenunterschiede auf dem Chip sind 150 nm . Die Zellen sind jedoch mehrere μm hoch. Der Abstand der oberen Membran zum spiegelnden Silizium-Siliziumoxidübergang ist nicht korreliert mit der Chipstruktur. Somit ist die Fluoreszenz der oberen Membran unabhängig von der Chipstruktur und trägt somit nur zu einem konstanten Fluoreszenzhintergrund bei, auch wenn die nicht komplett außerhalb der Objektebene des Mikroskops ist.

4.4.2 Schichtwiderstand

Wie zuvor beschrieben können nur Gruppen von Zellen betrachtet werden. Zusätzlich tritt bei der Durchführung von Lock-In Messungen ein weiteres Problem auf. Die Fokussierung auf die Adhäsionsmembran erweist sich als schwierig. (Aufgrund des Rechteckmusters tritt dieses Problem nicht bei FLIC-Messungen auf.) Wegen der

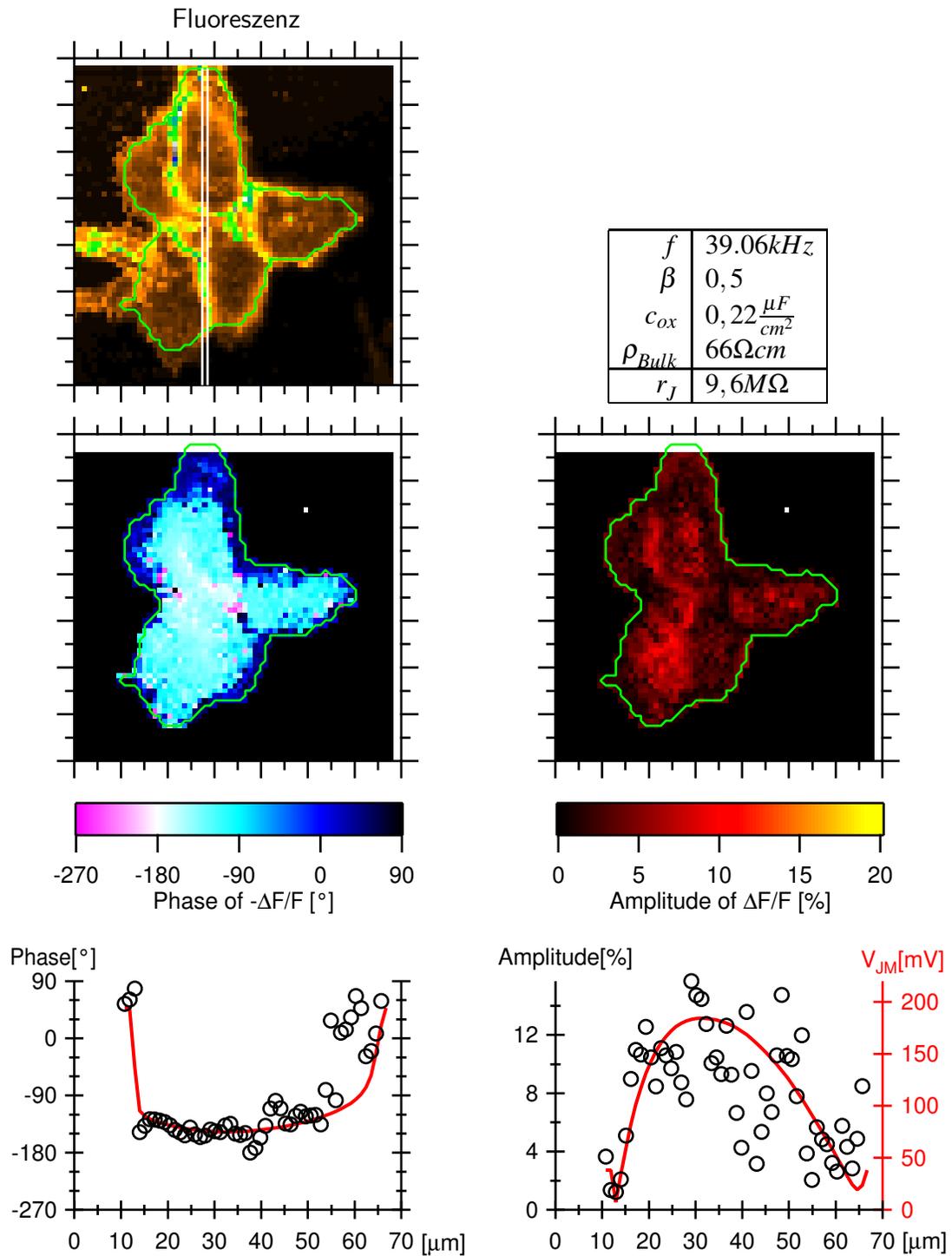


Abbildung 4.22: Beispiel einer Lock-In Messung an einer Gruppe von MDCK-Zellen.

Tight-Junctions ist die untere Membran teilweise nur schwach angefärbt, was die Problematik mit der oberen Membran noch verschärft.

Abbildung 4.22 zeigt ein Beispiel einer Lock-In-Messung. Man sieht im Phasenbild eine Störung am Ort des Zusammentreffens mehrerer Zellen. Diese ist zurückzuführen auf den Abdichtwiderstand nach oben. Bei einem Zellverband ist es nicht klar, wie der Widerstand nach oben im Flächenkontaktmodell mitberücksichtigt werden kann. Jedoch geht man davon aus, dass bei Tight-Junctions der Widerstand nach oben sehr gross ist, und somit das Ergebnis nur schwach beeinflusst wird. Bestimmt man den Flächenwiderstand r_J , so liegt dieser in der zu erwartenden Grössenordnung, wenn man annimmt, dass die spezifische Elektrolytwiderstand innerhalb und außerhalb des Spalts identisch ist. Messungen an drei Gruppen ergab folgende Ergebnisse für $r_J = 9,6M\Omega$ (Siehe Abbildung 4.22), $7,76M\Omega$ und $6,85M\Omega$. Nimmt man eine Spaltdicke von $d_J = 91nm$ (Siehe Abbildung 4.4) an so erhält man im Mittel einen spezifischen Spaltwiderstand von $\rho_J = 73\Omega cm$. Für die verwendete Extrazellulärlösung wurde ein spezifischer Widerstand von $73,4\Omega cm$ gemessen. Der spezifische Elektrolytwiderstand innerhalb und außerhalb des Spalts ist also identisch.

In [18, 19] wird eine Methode und ein dazugehöriges theoretisches Modell vorgestellt, mit dem man die Eigenschaften eines geschlossenen Zellrasens messen kann. Dabei sind Zellen über eine kleine Metallelektrode gewachsen. Zwischen einer grossen Elektrode und der überwachsenen kleinen Metallelektrode werden sinusförmige Wechselfspannungen verschiedener Frequenzen angelegt. Dabei wird das Impedanzspektrum des Systems bestimmt. An das Impedanzspektrum kann man die Theorie anfitzen um den Abdichtwiderstand R_B und $\alpha := a_J\sqrt{r_J}$ zu bestimmen.

Wendet man diese Methode auf einen geschlossenen Zellrasen von Epithelzellen an, so erhält man Abweichungen zu den in dieser Arbeit gefundenen Werten für den Flächenwiderstand r_J . In [33] wurde an MDCK-Zellen (Typ II) $\alpha = 20\sqrt{\Omega cm}$ bestimmt, in [41] wurde an Epithelzellen aus dem Adergeflecht (Plexus choroideus) des Schweins $\alpha = 23,5\sqrt{\Omega cm}$ bestimmt. Bei einem angenommenen Zellradius von $a_J = 12\mu m$ entspricht dies einem Flächenwiderstand von etwa $r_J = 280M\Omega$ bzw. $r_J = 380M\Omega$. Für diesen signifikanten Unterschied gibt es zwei mögliche Erklärungen. Einerseits kann es sein, dass sich durch einen komplett geschlossenen Zellrasen der Flächenwiderstand r_J ändert. Andererseits kann es sein, dass das in [33] und [41] angewandte theoretische Modell für die erhaltenen Parameter nicht geeignet ist. Problematisch ist dieses Modell vor allem aufgrund seiner stark idealisierten Annahmen über die Zellgeometrie. Ausserdem wurden die Eigenschaften der oberen Membran nur in vereinfachter Form berücksichtigt.

Eine Möglichkeit, die Frage nach einem veränderten Flächenwiderstand zu untersuchen, wäre die Anwendung eines Feldeffekttransistors. Die Signale eines Feldeffekttransistors sind abhängig von der Ionenkonzentration [11]. Zuerst betrachtet man einen mit Epithelzellen zugewachsenen Transistor. Danach entfernt man die Zellen oder man zerstört die Tight-Junctions. Eine Veränderung der Ionenkonzentration auf der Gateoberfläche würde das Transistorsignal dann verändern.

4.5 Rattenneuronen

Für die Anwendung eines Neurochips für neurobiologische Fragestellungen sind die Nervenzellen von Säugetieren sehr interessant. Man möchte mit einem System arbeiten, das möglichst nah an menschlichen Zellen ist. Aufgrund der geringen Grösse der Neuronen stellt sich die Zell-Chip-Kopplung bei Ratten-Neuronen als schwierig dar. In diesem Abschnitt werden die für die Zell-Chip-Kopplung relevanten Parameter des Spalts untersucht.

4.5.1 Zell-Substratabstand

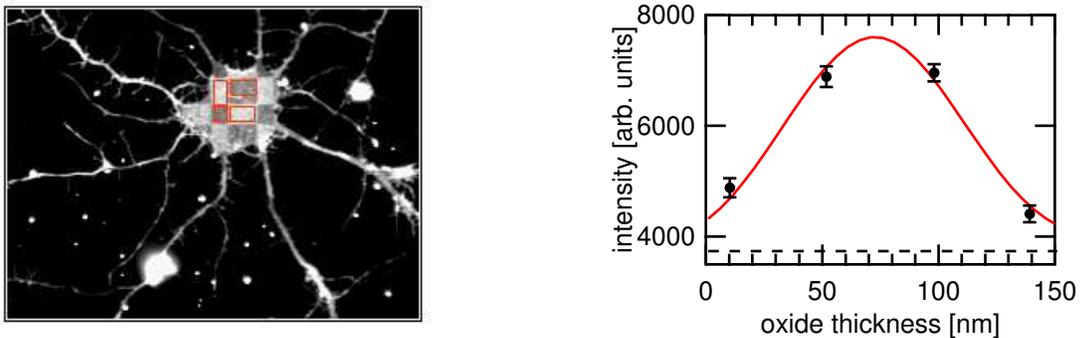


Abbildung 4.23: Eine FLIC-Messung an einem Ratten-Neuron ($d_j = 42.7 \pm 4nm$)

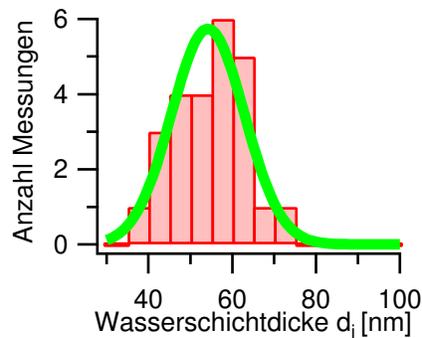


Abbildung 4.24: Histogramm einer Messreihe nach sieben Tagen in Kultur ($\langle d_j \rangle = 55 \pm 8nm$, $N = 25$)

Wie in 3.1.1 beschrieben wurde d_j bei Ratten-Neuronen auf Poly-L-Lysin gemessen. Durch die grosse Zahl von anderen Objekten, wie z.B. Glia und Dendriten gestaltet sich die Suche geeigneter Zellen auch deutlich schwieriger als bei HEK293-Zellen. Bei insgesamt acht auswertbaren Messungen ergab sich nach ca. 14-tägiger Kultur ein durchschnittlicher Zell-Substratabstand von $d_j = 46,2 \pm 4,6nm$.

Nach siebentägiger Kulturzeit sind Probleme durch Glia und übermäßig viele Neuriten noch nicht relevant. In einer Messreihe nach sieben Tagen Kulturdauer ergab sich ein durchschnittlicher Zell-Substratabstand von $d_J = 55 \pm 8nm$. Abbildungen 4.23 und 4.24 zeigt eine Beispielmessung und das zur Messreihe gehörige Histogramm.

4.5.2 Schichtwiderstand

Aufgrund der zuvor genannten Probleme mit Glia wurden die Zellen nur für sieben Tage in Kultur gehalten. Dies ist die kürzeste sinnvolle Kulturzeit, da sich die relevanten Zelleigenschaften erst nach einigen Tagen ausbilden. Neurite sind nicht so stark ausgeprägt und Glia ist kaum vorhanden. Die Abbildungen 4.26 und 4.27 zeigen zwei Beispiele guter Messungen. Für diese Messungen musste aufgrund der geringen Größe der Zellen die höchste mögliche Stimulationsfrequenz von 100kHz gewählt werden.⁵ Als Substrat diente Siliziumdioxid, welches mit Poly-L-lysin beschichtet wurde. Abbildung 4.25 zeigt die kumulierte Häufigkeitsverteilung, die sich aus 14 Messungen ergeben hat.⁶ Die Messreihe ergab $r_J = 12 \pm 2M\Omega$.

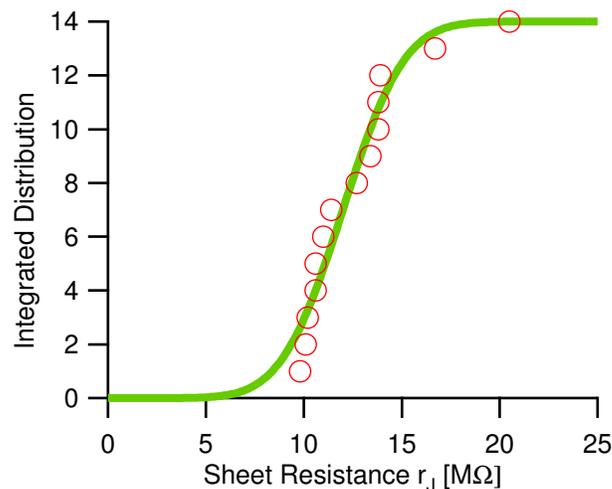


Abbildung 4.25: Kumulierte Häufigkeitsverteilung des Schichtwiderstands r_J . Der Fit der Fehlerfunktion (grün) ergab $r_J = 12 \pm 2,5M\Omega$.

Mit den aus FLIC-Messungen bekannten Zell-Substratabstand von $55nm$ ergibt sich ein spezifischer Spaltwiderstand von $66\Omega cm$. Für die verwendete Extrazellulärlösung wurde $\rho = 68\Omega cm$ bestimmt. Im Rahmen der Messgenauigkeit und der üblichen Schwankungen hat man also eine gute Übereinstimmung der Werte. Ähnlich

⁵Der Lock-In Verstärker zur Chipcharakterisierung kann maximal 102kHz verarbeiten.

⁶ Aufgrund der geringen Anzahl von Messungen war es nicht möglich, ein aussagekräftiges Histogramm zu zeichnen. Deshalb wurde für die Darstellung eine kumulierte Häufigkeitsverteilung ([15]) gewählt.

wie bei HEK293-Zellen konnte also gezeigt werden, dass bei einzeln liegenden Neuronen der Spaltelektrolyt den selben spezifischen Widerstand hat wie die umgebende Extrazellulärlösung.

Für eine längere Kulturdauer, wie es physiologisch wünschenswert wäre, kann die Methode leider aufgrund der oben genannten Probleme nicht angewandt werden. Bei einer hohen Dichte von Gliazellen ist es auch nicht möglich, den Neuron-Chip-Kontakt mit Hilfe des Flächenkontaktmodells zu beschreiben.

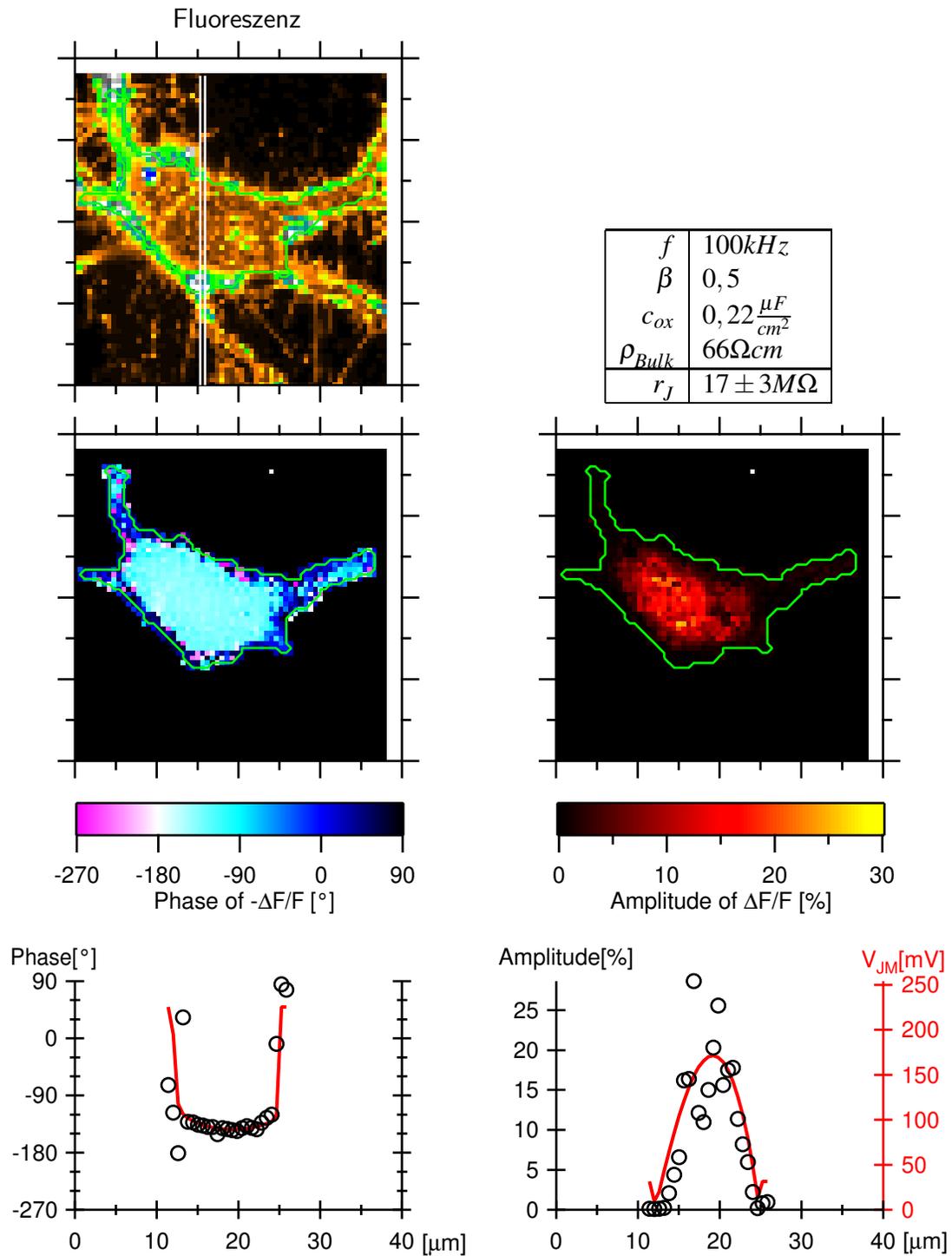


Abbildung 4.26: Beispiel einer Widerstandsmessung an einem Rattenneuron

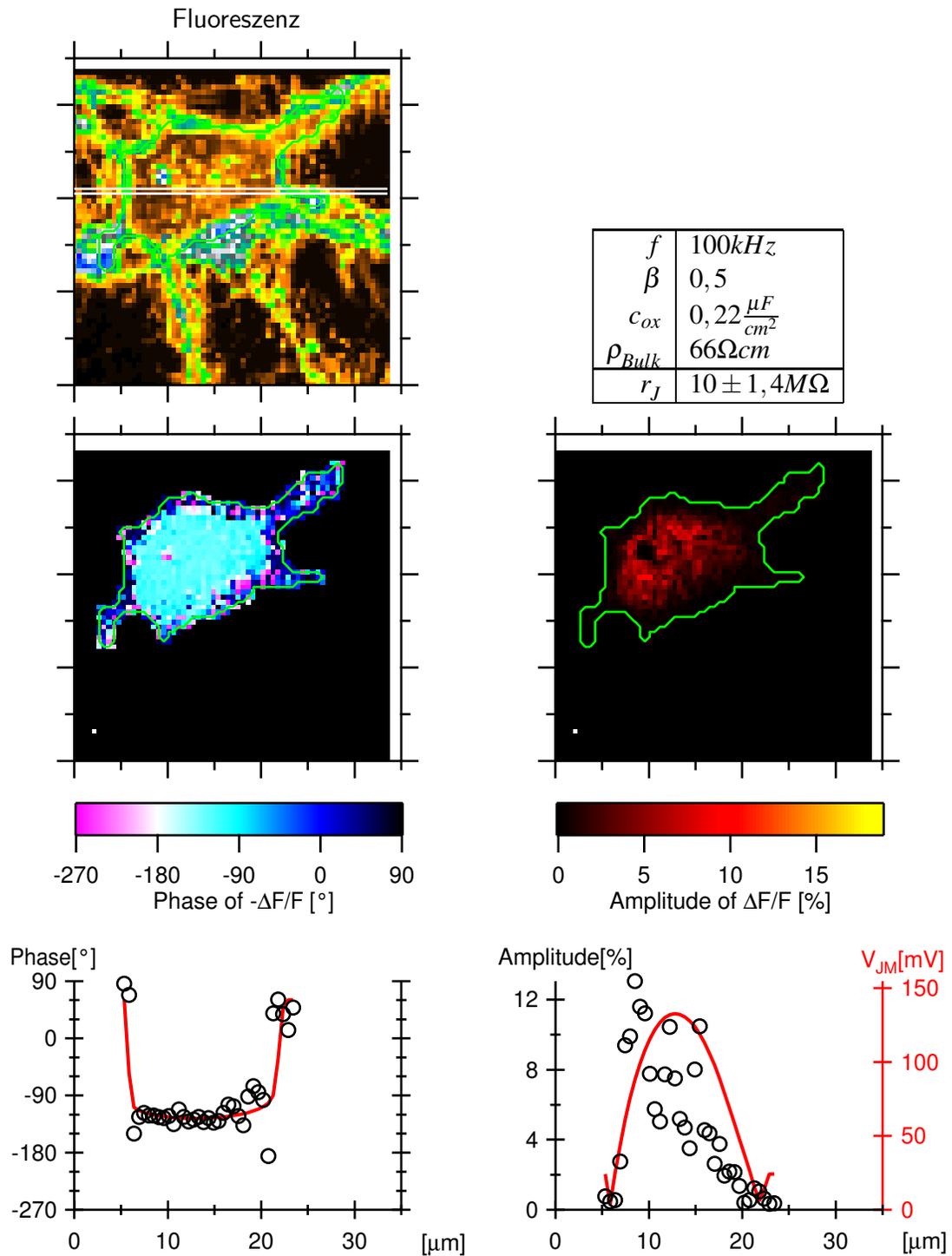


Abbildung 4.27: Beispiel einer Widerstandsmessung an einem Rattenneuron.

4.6 Schneckenneuronen

Neuronen von Schnecken sind deutlich größer als die von Säugetieren. Durch die daraus resultierenden besseren Kopplungseigenschaften sind sie ein gut geeignetes biologisches System für die Anwendung eines Neurochips. Für solche Anwendungen ist der Flächenwiderstand von entscheidender Wichtigkeit. Zusammen mit Günther Zeck wurden für [43] Messungen des Schichtwiderstands an Schneckenneuronen durchgeführt. Problematisch bei diesen Messungen war vor allem die Anfärbung der Membran. Innerhalb von ca. 15min wurde der Farbstoff in das Zellinnere aufgenommen, was die relative Fluoreszenzänderung stark herabsetzte. Man ist also zu zügigem Arbeiten gezwungen. Zeitraubende Probleme, wie beispielsweise das Fokussieren auf die untere Membran, die geeignete Wahl der Messparameter können daher den Versuch einer Messung zunichte machen.

Die Messfrequenz muss aufgrund der Grösse der Zellen stark reduziert werden. Dadurch spielen Fehler bei Chip- und Photomultipliertkorrektur eine geringere Rolle. Es wurden zwei erfolgreiche Messungen zur Bestimmung von r_J durchgeführt, die in den Abbildungen 4.28 und 4.29 dargestellt sind. Aufgrund der genannten Probleme wurden nur wenige Messungen durchgeführt, was zur Folge hat, dass die Parameter nicht immer optimal gewählt wurden. Bei der in Abbildung 4.28 dargestellten Messung ist beispielsweise die Frequenz etwas zu hoch gewählt, was zu einer etwas niedrigen Phase (außerhalb des optimalen Bereichs) führt. Bei der Auswertung der Messungen ist zu beachten, dass die Membrankapazität von Schneckenneuronen um einen Faktor vier höher ist als bei typischen Säugetierzellen.

In FLIC-Messungen ([44, 42]) wurde ein Zell-Substrat-Abstand von $d_J = 51nm$ auf Poly-L-lysin bestimmt. Für den Fall, dass die spezifische Leitfähigkeit innerhalb des Spalts gleich der des Extrazellulärmediums ist, ergibt sich mit $\rho = 134\Omega cm$ ein r_J von $26M\Omega$. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den hier bestimmten Werten des Flächenwiderstand von $r_J = 25,5M\Omega$.

Wie auch bei den anderen Zell-Arten ist auch hier der spezifische Widerstand des Spaltelektrolyten identisch mit dem der Extrazellulärlösung.

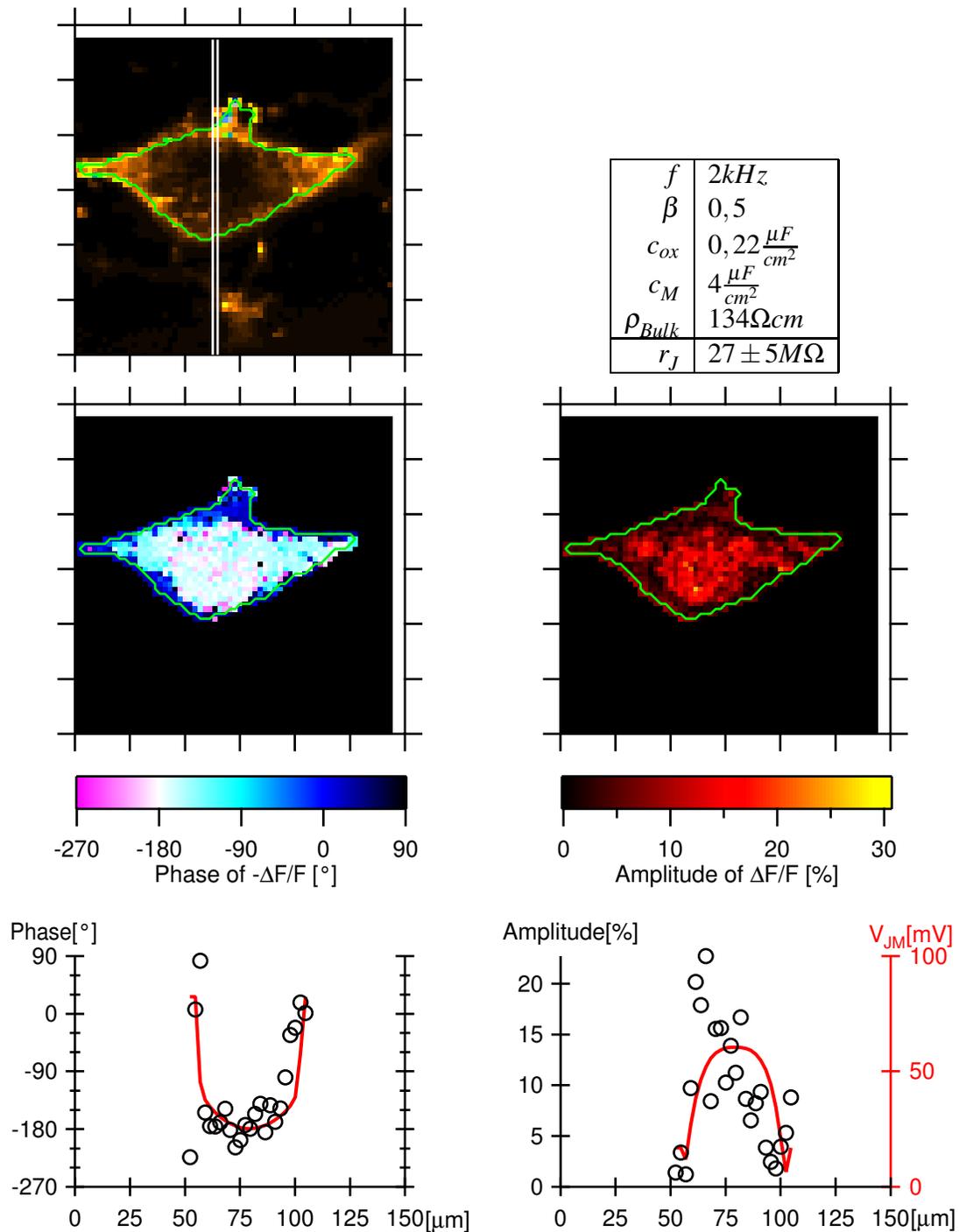


Abbildung 4.28: Lock-In Messungen an Schneckenneuronen. Die im Vergleich zu HEK293-Zellen schlechten Amplituden sind zurückzuführen auf eine starke Anfärbung des Zellinneren, was zu einer Reduzierung der relativen Fluoreszenzänderung führt.

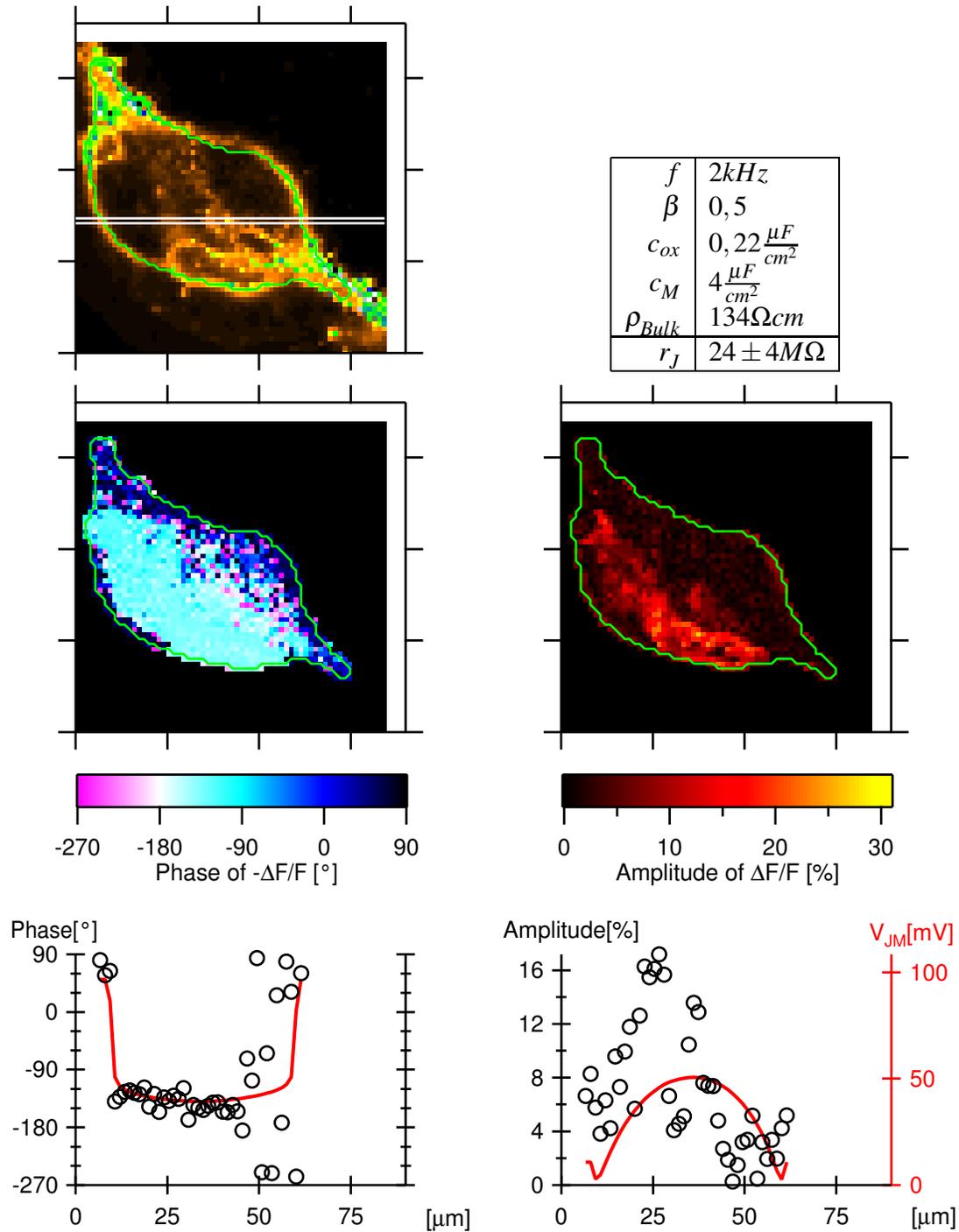


Abbildung 4.29: Lock-In Messungen an Schneckenneuronen. Die im Vergleich zu HEK293-Zellen schlechten Amplituden sind zurückzuführen auf eine starke Anfärbung des Zellinneren, was zu einer Reduzierung der relativen Fluoreszenzänderung führt.

Kapitel 5

Ergebnisse - pH-Imaging

Zur Anwendung ionensensitiver Farbstoffe wurde eine neue Methode entwickelt. Diese kombiniert die Lock-In-Methode mit der Konfokalmikroskopie. Diese hat den Vorteil, dass man reproduzierbar die Fluoreszenzanregung messen kann. Bevor man einen entsprechenden natriumsensitiven Farbstoff synthetisiert, wurde die Methode an dem pH-abhängigen Farbstoff Fluorescein getestet. Die Vorgehensweise mit einem noch zu synthetisierenden membrangebundenen Natrium-Green wäre ganz ähnlich der hier beschriebenen. Durch die Verschiebung der scheinbaren Gleichgewichtskonstante kann man rückschließen auf eine systematische Veränderung der Ionenkonzentration im Spalt.

5.1 Charakterisierung der verwendeten Farbstoffe

In der praktischen Anwendung wird meist an einem Referenzsystem eine Kalibrierkurve aufgenommen, die zur Auswertung der eigentlichen Messung verwendet wird. Eine genaue Bestimmung der Farbstoffeigenschaften war nötig, um eine Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen. Mit Hilfe eines Fluorimeters (SLM Aminco 8100) wurden für geeignete pH-Werte die Anregungsspektren der verwendeten Farbstoffe aufgenommen. Die detektierte Fluoreszenz hängt stark von der spektralen Charakteristik der Lampe und des Anregungsmonochromators ab. Deshalb wird zusätzlich die Fluoreszenzintensität eines Referenzfarbstoffes mitdetektiert. Aufgrund einer extrem hohen Konzentration des Referenzfarbstoffes ist die Fluoreszenzintensität des Referenzfarbstoffes fast direkt proportional zu Anregungsintensität, unabhängig von der Anregungswellenlänge. Auf diese Art und Weise werden Artefakte durch den Anregungsmonochromator und Schwankungen der Lampenintensität korrigiert. Es lässt sich eine Genauigkeit von ca. $\pm 5\%$ über das Anregungsspektrum erreichen [30].¹ Die-

¹ In diesem Buch kann man grundlegendes über Fluoreszenzspektroskopie nachlesen. Falls man jedoch vor hat quantitative Emissionsspektren aufzunehmen, sollte man unbedingt auch in [39] nachlesen. In [30] fehlt im Abschnitt über Instrumente eine wichtige Information über Polarisierungseffekte und den sogenannten "Magic Angle".

se Messungen dienen dazu, die scheinbaren pK-Werte der Indikatoren zu bestimmen.

5.1.1 Wasserlösliches Fluorescein

Fluorescein in der wasserlöslichen Form ist in der Literatur sehr gut charakterisiert [27, 36]. Deshalb bietet es sich an, bei den Referenzmessungen diesen Farbstoff zu verwenden. Für geeignet gewählte pH-Werte wurden Anregungsspektren einer $1\mu\text{M}$ Farbstofflösung (Fluorescein Natriumsalz, Fluka, 46970) in einem Puffer² gemessen. Die bestimmten pK-Werte stimmen gut mit den Werten aus der Literatur überein.

5.1.2 HAF in neutralen Micellen

Abbildung 5.2 zeigt Titrationskurven und Anregungsspektren für HAF in Micellen aus Triton-X100 (Carl Roth). Wie zu erwarten erhält man für einen in eine Micelle eingebauten Farbstoff eine Verschiebung des scheinbaren pK-Werts. In [16] wurde dieser Effekt mit verschiedenen Coumarin-Indikatoren genau untersucht. Diese Verschiebung ist auf die niedrigere Dielektrizitätskonstante der Micellen im Vergleich zu Wasser zurückzuführen. Auffällig ist, dass die zwei scheinbaren pK-Werte unterschiedlich weit verschoben werden. Vermutlich ist dies auf den Ort der zu protonierenden Gruppe zurückzuführen. Die für den höheren pK-Wert verantwortliche Gruppe liegt außen und ist somit teilweise von Wasser umgeben. Die andere Gruppe liegt zentraler und ist nicht von Wasser umgeben. Somit macht sich der Effekt durch die niedrigere Dielektrizitätskonstante der Micelle stärker bemerkbar.

5.1.3 HAF in geladenen Micellen

Abbildung 5.3 zeigt die Titrationskurven für HAF in SDS (Sodium Dodecyl Sulfat, Carl Roth). Zusätzlich zu der Verschiebung des scheinbaren pK-Werts durch die Dielektrizitätskonstante macht sich die Ladung der Micellen bemerkbar. pK_{a2} ist stark in Richtung höherer Werte verschoben. Überraschenderweise ist pK_{a1} nur geringfügig gegenüber dem in neutralen Micellen verschoben.

5.2 Test der Apparatur

Zum Test der Funktionstüchtigkeit der Apparatur wurden die selben Lösungen wie in den Referenzmessungen (Fluorescein in Wasser und HAF in neutralen Micellen) verwendet, um Titrationskurven aufzunehmen. Dazu wurden ca. 4ml der Lösung in eine Petrischale gegeben. Für jeden pH-Wert wurde die Anregung gemessen. Die Abbildungen 5.4 und 5.5 zeigen die Titrationskurven, die mit Hilfe der in 3.3.2 beschriebenen Apparatur aufgenommen wurden. Wie man erkennen kann, sind diese denen aus den

² Puffer enthält 20mM TRIS und Zitronensäure, Dadurch ist eine Pufferung über einen großen pH-Bereich möglich. Der pH wurde mit NaOH eingestellt.

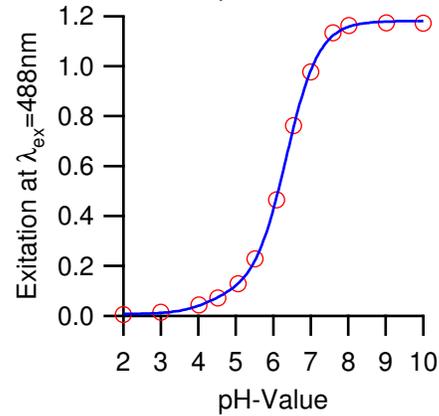
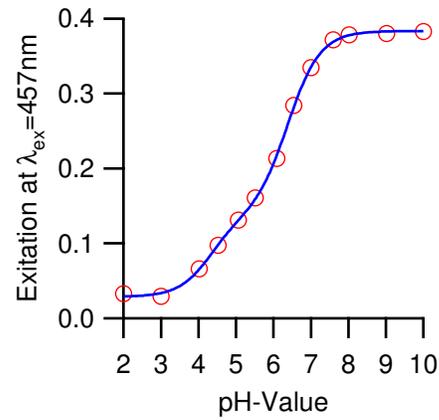
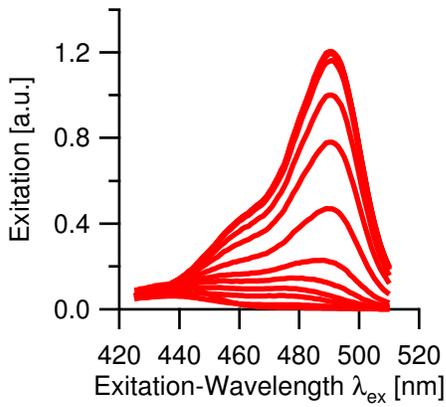


Abbildung 5.1: Links oben die Anregungsspektren von Fluorescein in Wasser für verschiedene pH-Werte, rechts oben die Titrationskurve für Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 457nm$ und rechts unten für $\lambda_{ex} = 488nm$. Das etwas untypische Aussehen der Titrationskurve liegt an den sehr nahe beieinander liegenden pK -Werten des Farbstoffs. $pK_{a1} = 4.27 \pm 0.10$ und $pK_{a2} = 6.35 \pm 0.01$

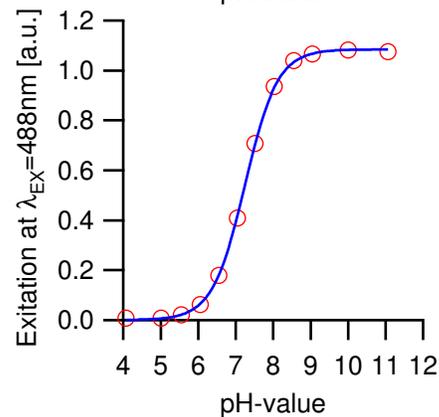
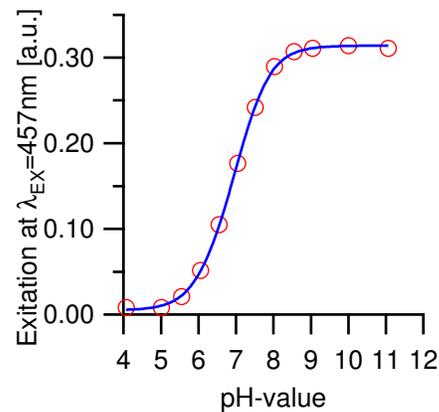
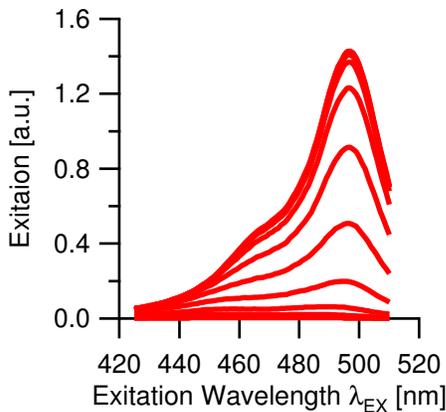
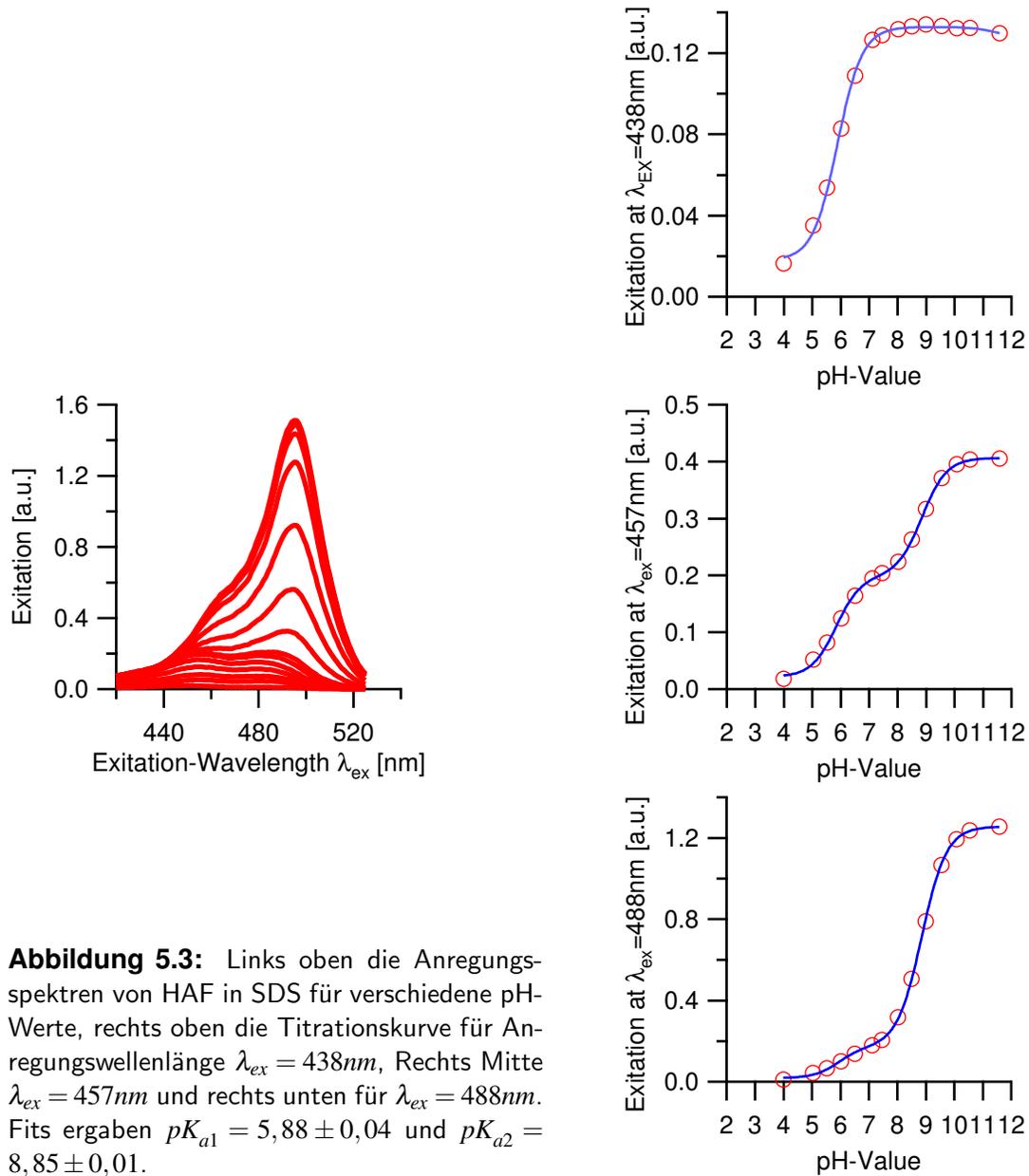


Abbildung 5.2: Links oben die Anregungsspektren von HAF in Triton-X100 für verschiedene pH-Werte, rechts oben die Titrationskurve für Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 457nm$ und rechts unten für $\lambda_{ex} = 488nm$). Nur bei der Titrationskurve für $\lambda_{ex} = 457nm$ macht sich der zweite pK -Wert noch bemerkbar. Fits ergaben $pK_{a1} = 6,4 \pm 0,09$ und $pK_{a2} = 7.29 \pm 0,02$



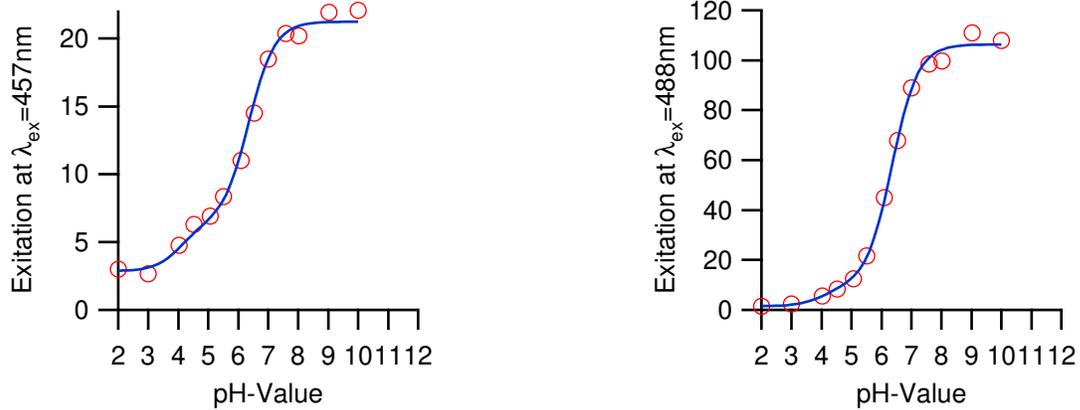


Abbildung 5.4: Titrationskurven von Fluorescein aufgenommen mit der in 3.3.2 beschriebenen Apparatur. Der Fit der pK-Werte ergab $pK_{a1} = 4,09 \pm 0,49$ und $pK_{a2} = 6,35 \pm 0,10$

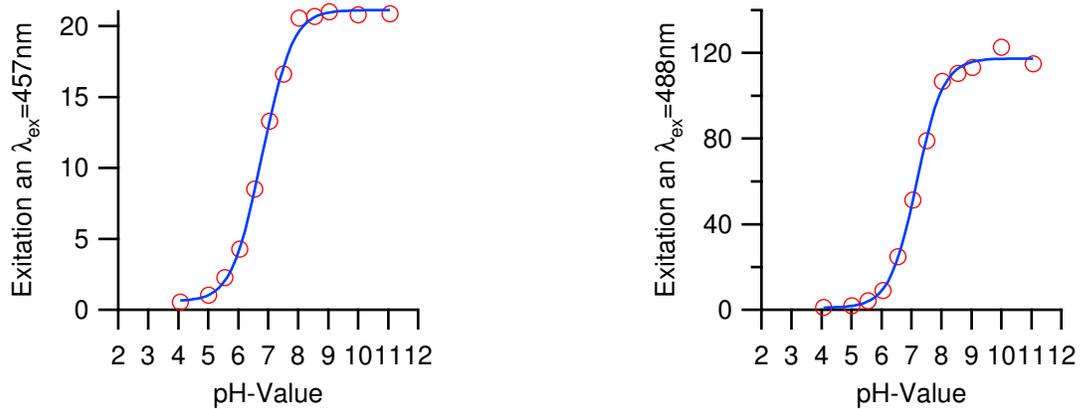


Abbildung 5.5: Titrationskurven von HAF in neutralen Micellen (Triton-X) aufgenommen mit der in 3.3.2 beschriebenen Apparatur. Der Fit der pK-Werte ergab $pK_{a1} = 6,38 \pm 0,64$ und $pK_{a2} = 7,26 \pm 0,15$

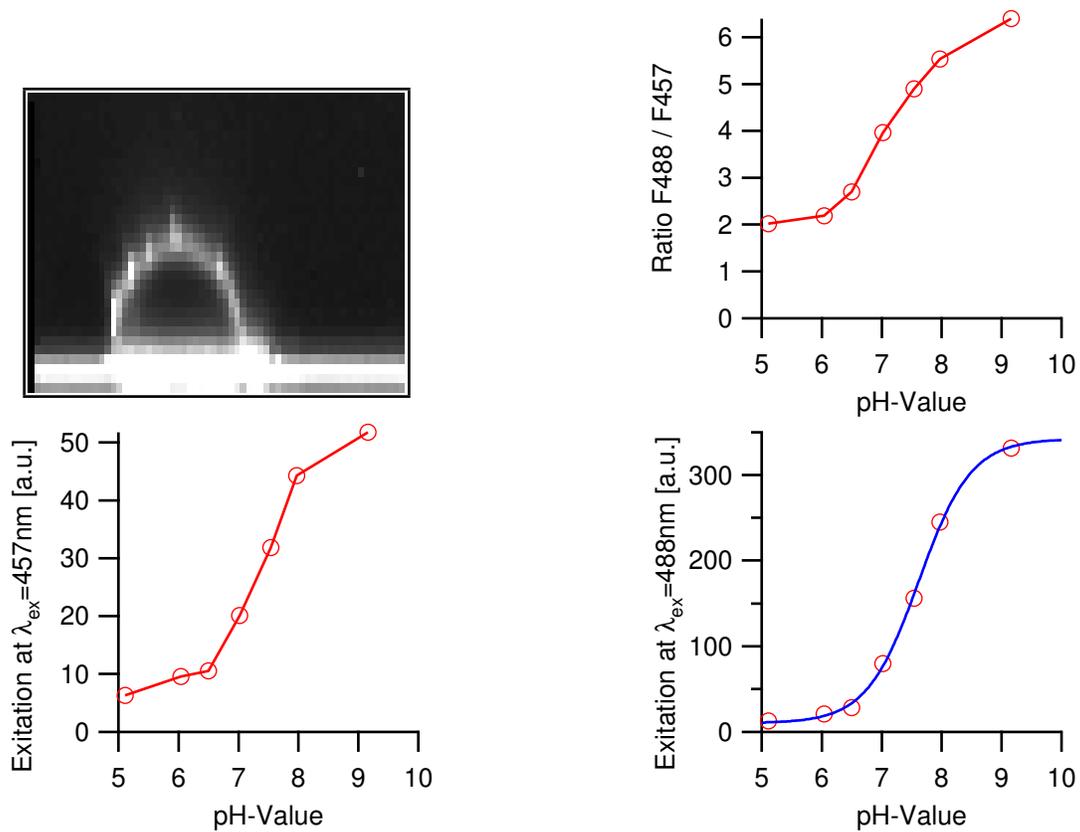


Abbildung 5.6: Exemplarisch eine Titrationskurven und Schnittbild an einer HEK293-Zelle. Es wurde nur die Fluoreszenz der oberen Membran ausgewertet. Zur Bestimmung des pK_a -Werts wurde nur die Titrationskurve für $\lambda_{ex} = 488$ verwendet. (Für $\lambda_{ex} = 457$ macht sich der zweite pK -Wert störend bemerkbar.) Es ergab sich ein $pK_{a2} = 7,6$. pK_{a1} konnte nicht bestimmt werden. Man erkennt auch das Problem der Substratanfärbung, weshalb man keine Titrationskurve für die eigentlich interessantere untere Membran aufnehmen kann.

Fluorimetermessungen sehr ähnlich. Fittet man die Titrationskurven, so erhält man in beiden Fällen im Rahmen der Messgenauigkeit die selben pK_a Werte.

5.3 Scheinbarer pK -Wert von HAF in der Membran von HEK-293

Bestimmung des pK -Werts

Betrachtet man die Anregungsspektren von HAF in Micellen in Abbildung 5.2, so erkennt man, dass kein isosbestischer Punkt existiert. Insbesondere nicht für $\lambda_{ex} = 457\text{nm}$ (siehe Abbildung 5.6), obwohl [17] dies nahelegte. Ohne einen isosbestischen

Punkt ist die Bestimmung des pK -Werts aus dem Verhältnis zweier Fluoreszenzintensitäten unmöglich. In [17] ist dies jedoch nicht von Interesse, da das System durch eine Referenzmessung kalibriert wurde.

Ein weiteres Problem stellt sich dadurch, dass man mit Zellen auf Chips arbeitet, mit denen man speziell den Zell-Chip-Kontakt untersuchen will. In der FLIC-Mikroskopie (Siehe 3.1.1) wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Fluoreszenzeigenschaften stark von dem Abstand zwischen Silizium und Chromophor abhängen. Die untere Membran ist nahe am Silizium. Dadurch wird die Anregungswahrscheinlichkeit des Chromophors stark abhängig von der Anregungswellenlänge. Bei Anwendung einer ratiometrischen Methode ergäbe sich eine Veränderung des Quotienten um einen konstanten Faktor bereits ohne eine Veränderung des lokalen pH -Werts.

Die vorherigen Referenzmessungen zeigten, dass die Titrationskurve für $\lambda_{EX} = 488nm$ nur kaum durch den niedrigen pK -Wert beeinflusst wird. Durch Anwendung der Referenzphotodiode ist die Anregung absolut messbar (wenn auch in willkürlichen Einheiten). Durch das vergleichsweise geringe Ausbleichen des Farbstoffs HAF kann man auch mit einer einzigen Anregungswellenlänge arbeiten. Man nimmt eine Titrationskurve auf.³

Für fünf HEK-Zellen wurden erfolgreich Titrationskurven aufgenommen. Dazu wurde für jeden pH -Wert ein Schnitt aufgenommen und die Fluoreszenz der oberen Membran ausgewertet. Leider konnte die Fluoreszenz der unteren Membran nicht ausgewertet werden, da die Substratanfärbung zu stark ist. Bei insgesamt fünf ausgewerteten Titrationskurven ergab sich durchschnittlich $pK_{a2} = 7,43 \pm 0,14$. Der Wert von pK_{a1} konnte nicht bestimmt werden, da im Bereich niedriger pH -Werte nur wenige Messpunkte sind, außerdem ist dort die Fluoreszenz gering und dementsprechend der Wert sehr unsicher.

Problem der Substratanfärbung

Wie in den Abbildungen 5.6 zu sehen ist, ist das Substrat stark angefärbt. Bei Aufnahme eines Bildes ist es daher nicht möglich, zu unterscheiden, ob die detektierte Fluoreszenz von der unteren Membran stammt oder von dem angefärbten Substrat. Wegen der pK -Wert-Unterschiede zwischen membran- und nicht membranengebundenem Farbstoff ist daher keine Aussage über die untere Membran möglich. Zur Verbesserung der Anfärbung bestünde die Möglichkeit mit einem Fluorescein-gelabelten Lipid zu arbeiten. Man müsste dazu allerdings zu ausgefeilteren Anfärbemethoden übergehen, wie z.B. zu Transportvesikeln. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass es durch die beschriebene Methode möglich ist, zuverlässig Gleichgewichtskonstanten von in der Zellmembran gebundenen Indikatorfarbstoffen zu bestimmen.

³ Wollte man ein membrangebundenes Sodium-Green verwenden, so müsste man ebenfalls mit nur einer Wellenlänge arbeiten, da Sodium Green nicht für ratiometrische Messmethoden geeignet ist.

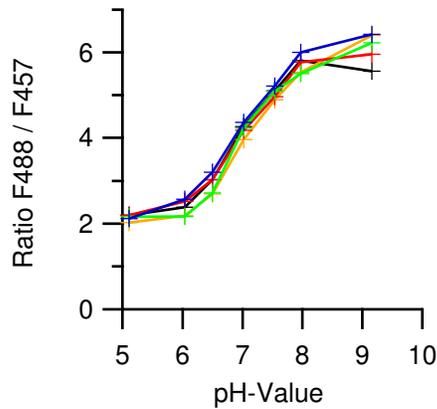


Abbildung 5.7: Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten für die in 5.3 beschriebene Messreihe

5.4 Anwendungsmöglichkeit ratiometrischer Messverfahren

Man betrachtet das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei $\lambda_{ex} = 488nm$ und $\lambda_{ex} = 457nm$. Es zeigt sich, dass dies trotz unterschiedlicher Anfärbung für verschiedene Zellen ein gut reproduzierbarer Wert ist. Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis für die in 5.3 beschriebene Messreihe. Die Methode misst die Anregung des Farbstoffs. Schwankungen der Linienintensität relativ zueinander werden dabei korrigiert.

Aufgrund der Reproduzierbarkeit (,die man durch permanentes Messen des Referenzsignals noch verbessern könnte,) bietet diese ratiometrische Methode interessante Möglichkeiten in der Anwendung. Durch die Lock-In Methode wird die Anregung sehr präzise gemessen, unerwünschte Effekte wie Hintergrundlicht werden gefiltert. Dadurch, dass man beide Anregungswellenlängen gleichzeitig misst, hat man keine Artefakte durch Effekte, die auf der Zeitskala des Wellenlängenwechsels geschehen. Durch gleichzeitiges Messen mit beiden Anregungswellenlängen kann man auch schneller messen. Dies verringert zwar nicht das Ausbleichen des Farbstoffs, jedoch ist eine kürzere Messzeit oft wünschenswert.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Spezifischer Spaltwiderstand

Das Flächenkontaktmodell wurde ausführlich analysiert und weiterentwickelt, besonders im Hinblick auf die richtige Randbedingung. Dadurch war eine Vereinfachung und Verkürzung des Lösungsweges möglich. Das Messsystem wurde genau analysiert. Durch Modifikationen konnten einige Quellen elektrischer Störungen eliminiert werden. Durch eine Synchronisation von Stimulation und Detektion wurde die Zuverlässigkeit des Systems weiter verbessert. Dies macht sich besonders bei Transientenmessungen bemerkbar. Die Verwendung des empfindlicheren Farbstoffs Annine-5 führte auch zu einer Verbesserung der Messergebnisse. Verwendung von Annine-6 und könnte aufgrund der höheren Empfindlichkeit zu einer weiteren Verbesserung führen.

Für HEK293-Zellen und Rattenneuronen konnten zuverlässige Werte sowohl für den Zell-Substratabstand als auch für den Spaltwiderstand bestimmt werden. Bei MDCK-Zellen war eine zuverlässige Bestimmung des Zell-Substratabstandes möglich, der Flächenwiderstand konnte für kleine Gruppen von Zellen abgeschätzt werden. Für Schneckenneuronen konnte ebenfalls der Flächenwiderstand bestimmt werden. Bei allen untersuchten Zellarten hat sich herausgestellt, dass entgegen früheren Vermutungen der spezifische Widerstand des Spaltelektrolyten nicht von dem der Extrazellulärlösung abweicht. Speziell wurde festgestellt, dass es durch Veränderung der Ionenkonzentration im Elektrolyten möglich ist, gezielt die Spalteigenschaften zu optimieren. Dies hat sich insbesondere schon in [38] und [11] als hilfreich und wichtig erwiesen.

6.2 Ionenkonzentration

Zur weiteren Charakterisierung der Adhäsionsregion ist es wünschenswert, die verschiedenen Ionenkonzentration im Spalt zu kennen. Eine Möglichkeit, diese zu messen, bieten spezifisch ionensensitive Farbstoffe. Dafür wurde ein neuartiges Verfahren der Konfokalmikroskopie entwickelt, um die Fluoreszenzanregung eines Indikatorfarb-

stoffs präzise zu messen. Es handelt sich ebenfalls um eine Lock-In-Methode, nur wird hier die Intensität des Anregungslichts moduliert.

Als Besonderheit bietet die Methode die Möglichkeit ratiometrischer Messungen. Regt man gleichzeitig mit zwei Anregungswellenlängen an, welche mit unterschiedlichen Frequenzen moduliert werden, so kann man nach Fouriertransformation der Fluoreszenztransiente die Fluoreszenz bei beiden Anregungswellenlängen bestimmen.

Getestet wurde das Verfahren an HEK293-Zellen, deren Membran mit dem pH-Indikator HAF angefärbt wurde. Dabei wurden an Einzelzellen Titrationskurven aufgenommen und daraus der pK-Wert des membrangebundenen Farbstoffs bestimmt. Diese Möglichkeit, Gleichgewichtskonstanten von Indikatorfarbstoffen zu bestimmen ist die Voraussetzung, um einen noch zu synthetisierenden natriumsensitiven membrangebundenen Farbstoff anwenden zu können.

Der pH-Indikator HAF ist auch als ratiometrischer Farbstoff anwendbar. Die Messungen an Membranen von HEK293-Zellen zeigten auch eine sehr gute Reproduzierbarkeit des Quotienten aus der Anregung bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Diese Methode würde sich daher auch für verschiedene praktische Anwendungen ratiometrischer Fluoreszenzfarbstoffe anbieten.

Anhang A

Flächenkontaktmodell für runde Zelle

Für die analytische Lösung des Flächenkontaktmodells muss man Gleichung (2.28) lösen:

$$\partial_a^2 u + \frac{\partial_a u}{a} - \gamma^2 u = -\gamma^2$$

Homogener Anteil

Man beginnt damit, die homogene Gleichung zu lösen:

$$\partial_a^2 u + \frac{\partial_a u}{a} - \gamma^2 u = 0 \quad (\text{A.1})$$

Dies ist eine modifizierte Besselsche Differentialgleichung nullter Ordnung. Nach [1] besitzt sie zwei linear unabhängige Lösungen, die Besselfunktion I und K nullter Ordnung

$$I_0(\gamma a) = \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{1}{(k!)^2} \left(\frac{\gamma a}{2}\right)^{2k} \quad (\text{A.2})$$

K_0 ist für $a = 0$ divergent und somit als Lösung ausgeschlossen.

Randbedingung

Die Lösung von (2.28) ist die Summe aus einer speziellen Lösung der inhomogenen Gleichung

$$u_{\text{speziell}} = 1 \quad (\text{A.3})$$

und der Lösung der homogenen Gleichung $u = I_0(\gamma a)$. Als Randbedingung muss $u(a_J) = 0$ erfüllt sein. Dies ist der Fall für:

$$u = 1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \quad (\text{A.4})$$

Mittelwert $\langle u \rangle$

Um V_J bzw. V_{JM} berechnen zu können, muss der Mittelwert $\langle u \rangle$ bekannt sein. Es gilt:

$$\langle I_0 \rangle = \frac{\int_0^{a_J} da (2\pi a I_0(\gamma a))}{a_J \pi} \quad (\text{A.5})$$

Besselfunktionen erfüllen folgende Eigenschaft ([1]):

$$\frac{d}{dx} I_n = -\frac{n}{x} I_n + I_{n-1} \quad (\text{A.6})$$

Speziell gilt also für $n = 1$

$$x dI_1 + I_1 dx = x I_0 dx \quad (\text{A.7})$$

$$d(x I_1) = x I_0 dx \quad (\text{A.8})$$

$$x I_1 + c = \int dx (x I_0) \quad (\text{A.9})$$

Wendet man dies auf (A.5) an, so erhält man:

$$\langle I_0 \rangle = \frac{2I_1(\gamma a_J)}{\gamma a_J} \quad (\text{A.10})$$

Diese Relation gilt auch für J_0 , da Gleichung (A.6) auch für J gilt. Für $\langle U \rangle$ ergibt sich: ¹

$$\langle u \rangle = 1 - \frac{2I_1(\gamma a_J)}{\gamma a_J I_0(\gamma a_J)} = \frac{\gamma a_J I_0(\gamma a_J) - 2I_1(\gamma a_J)}{\gamma a_J I_0(\gamma a_J)} = \frac{I_2(\gamma a_J)}{I_0(\gamma a_J)} \quad (\text{A.12})$$

Lösung für V_J

$$V_J = \frac{c_S V_C}{\underbrace{c_S + c_M - \tilde{c}_M \beta_M \langle u \rangle}_{=\gamma_J^\beta}} \left(1 - \frac{I_0(\gamma a)}{I_0(\gamma a_J)} \right) \quad (\text{A.13})$$

$$= \frac{c_S (I_0(\gamma a_J) - I_0(\gamma a))}{(c_S + c_M) I_0(\gamma a_J) - \tilde{c}_M \beta_M I_2(\gamma a_J)} V_C \quad (\text{A.14})$$

¹ Für Besselfunktionen gilt ([1])

$$I_{n-1}(x) - I_{n+1}(x) = \frac{2n I_n(x)}{x} \quad (\text{A.11})$$

Lösung für V_{JM}

$$V_{JM} = V_M - V_J \quad (\text{A.15})$$

$$= \frac{c_S \left(-I_0(\gamma a_J) + \frac{\beta_M}{1+\beta_M} I_2(\gamma a_J) + I_0(\gamma a) \right)}{(c_S + c_M) I_0(\gamma a_J) - \tilde{c}_M \beta_M I_2(\gamma a_J)} V_C \quad (\text{A.16})$$

Anhang B

Stimulation Stufenförmiger Pulse

Abbildung B.1 zeigt die Pulsform, mit der man eine rechteckförmige Membranspannung stimulieren kann. Es handelt sich dabei um einen Dreieckspuls, addiert mit einem Rechteckpuls. Beide Pulse haben das selbe Tastverhältnis.

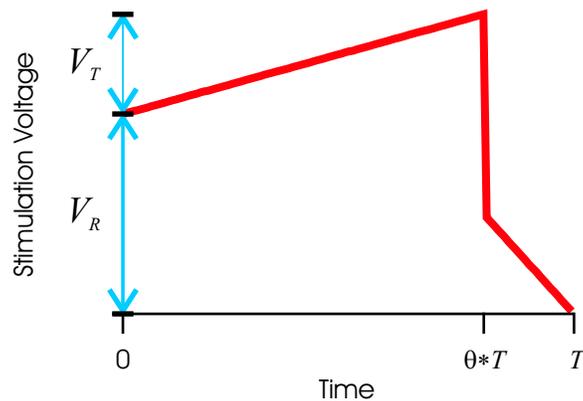


Abbildung B.1: Beispiel für einen Stimulationsspannungspuls. V_R ist die Größe des Spannungssprungs, V_T die Höhe der Dreieckfunktion.

Stufenförmige Stimulationsspannung

Um für den allgemeinen Fall die genaue Pulsform berechnen zu können, muss man zuerst das Verhalten der Membranspannung bei einem Sprung der Stimulationsspannung kennen.

$$V_S = \begin{cases} V_S^0 & \text{für } t < 0 \\ V_S^0 + \Delta V_S & \text{für } t \geq 0 \end{cases} \quad (\text{B.1})$$

Integriert man Gleichung (2.57), so erhält man

$$\tau_\beta \Delta V_{JM} + \int_{-\delta}^{+\delta} dt (V_{JM}) = - \frac{c_S}{(1 + \beta)(c_S + \tilde{c}_M)} \tau_\beta \Delta V_S \quad (\text{B.2})$$

Betrachtet man den Grenzwert $\delta \rightarrow 0$, so verschwindet das Integral und man erhält einen Sprung der Membranspannung V_{JM} von

$$\Delta V_{JM} = -\frac{c_S}{(1+\beta)(c_S + \tilde{c}_M)} \Delta V_S \quad (\text{B.3})$$

Kombination aus Dreieck- und Rechteckspannung

Um die gewünschte Pulsform über die Zellmembran zu erreichen, verwendet man zur Stimulation folgende Funktion:

$$V_S = V_T * \text{TRI}(t; \theta) + V_R * \text{RECT}(t; \theta) \quad (\text{B.4})$$

Dabei wurden die Funktionen

$$\text{TRI}(t; \theta) = \begin{cases} \frac{t}{\theta * T} & \text{für } 0 < t \leq \theta * T \\ \frac{T-t}{(1-\theta)*T} & \text{für } \theta * T < t \end{cases} \quad (\text{B.5})$$

$$\text{RECT}(t; \theta) = \begin{cases} 1 & \text{für } 0 < t \leq \theta * T \\ 0 & \text{für } \theta * T < t \end{cases} \quad (\text{B.6})$$

definiert. Der Parameter θ beschreibt das Tastverhältnis (Duty Cycle). Die Werte V_{12} müssen folgendermaßen gewählt werden

- Betrachtet man den ersten Teil des zusammengesetzten Pulses, so hat man während des ersten Teils des Pulses eine Stimulation mit konstanter Steigung. V_T wird so gewählt, dass der Grenzwert für $t \rightarrow \infty$ gleich der gewünschten Plateauspannung

$$V_{JM}^A = -\frac{c_S}{(1+\beta)(c_S + \tilde{c}_M)} \frac{V_T \tau_\beta}{\theta * T} \quad (\text{B.7})$$

ist (siehe Gleichung (2.63)). Wenn man nach V_T auflöst:

$$V_T = \frac{(1+\beta)(c_S + \tilde{c}_M)}{c_S} V_{JM}^A \frac{\theta * T}{\tau_\beta} \quad (\text{B.8})$$

Die Spannung

$$V_{JM}^B = \frac{c_S}{(1+\beta)(c_S + \tilde{c}_M)} \frac{V_T \tau_\beta}{(1-\theta) * T} \quad (\text{B.9})$$

in der zweiten Hälfte des Pulses ist dann bereits bestimmt durch das Tastverhältnis θ

- V_R wird so gewählt, dass ein Spannungssprung der Größe $\Delta V_{JM} = V_{JM}^A - V_{JM}^B$ entsteht.

$$\frac{c_S}{(1+\beta)(c_S+\tilde{c}_M)}V_R = \frac{c_S\tau_\beta}{(1+\beta)(c_S+\tilde{c}_M)}\left(\frac{V_T}{\theta * T} + \frac{V_T}{(1-\theta) * T}\right) \quad (\text{B.10})$$

$$V_R = \tau_\beta\left(\frac{V_T}{\theta * T} + \frac{V_T}{(1-\theta) * T}\right) \quad (\text{B.11})$$

$$V_R = \frac{V_T}{1-\theta} \frac{\tau_\beta}{\theta * T} \quad (\text{B.12})$$

$$V_R = \frac{(1+\beta)(c_S+\tilde{c}_M)}{c_S} \frac{V_{JM}^A}{1-\theta} \quad (\text{B.13})$$

V_R und V_T sind also so gewählt, dass die durch die Rechteckfunktion erzeugten Spannungssprünge genau so gross sind wie der Unterschied zwischen den beiden Grenzwerten bei dreiecksförmiger Stimulation.

Anhang C

Anfärbemethoden

Aufgrund der Besonderheiten der verschiedenen Farbstoffe, haben sich für die verschiedenen Farbstoffe unterschiedliche Anfärbemethoden bewährt.

Annine-5

Durch Protonierung wird der Farbstoff Annine-V wasserlöslich. Dies wird zur Anfärbung ausgenutzt [28]. Annine-5 wird in 0,1mM Salzsäure gelöst (Endkonzentration 5mM). 10 μ l dieser Stammlösung werden direkt in das Zellkulturmedium gegeben. Nach 10 Minuten wird das Medium durch Extrazellulärflüssigkeit ausgetauscht.

DiIC₁₈(3)

Eine 5mM Farbstoffstammlösung DiIC₁₈(3) (Molecular Probes, D-282) in Ethanol wird benötigt. Vor der Anfärbung wurden 5 μ l der 5mM Stammlösung in 2ml Extrazellulärlösung gegeben. Nach gründlichem Spülen der Zellen mit Extrazellulärlösung werden die Zellen in der gefärbten Extrazellulärlösung für 10 Minuten inkubiert. Nach einem weitem Wechsel des Extrazellulärmediums beginnt die Messung.

HAF und FOE

(Molecular Probes, H-110 und F-3875) Diese beiden Stoffe sind in Wasser extrem schlecht löslich, sodass sie in wässrige Lösung sofort ausfallen. Anfärbung mit Stammlösungen in Ethanol oder DMSO führen zu einer starken Substratanfärbung und schwacher Membrananfärbung. Verwendet man einen wasserlöslichen Stoff, der den Farbstoff bindet, so kann man über diesen Stoff den Farbstoff zur Membran bringen und die Anfärbung ermöglichen. Typische Stoffe hierfür sind FKS, BSA oder Pluronic F-127. 20% Pluronic in DMSO (Molecular Probes, P-3000) wurde verwendet, um eine Stammlösung des Farbstoffes herzustellen.

Anhang D

Titrationen für mehrere Protonierungsgrade

Man betrachtet ein System mit zwei Gleichgewichtskonstanten K_1 und K_2 . $[B_0]$ bezeichnet die neutrale $[B_{12}]$ die einfach bzw. zweifach deprotonierte Form des Indikatorfarbstoffs.

$$K_1 = \frac{[H^+][B_1]}{[B_0]} \quad (\text{D.1})$$

$$K_2 = \frac{[H^+][B_2]}{[B_1]} \quad (\text{D.2})$$

$$[I] = [B_0] + [B_1] + [B_2] \quad (\text{D.3})$$

Dies ist ein inhomogenes lineares Gleichungssystem. mit folgenden Lösungen

$$x_0 = \frac{[B_0]}{[I]} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + [H^+]K_1 + K_1K_2} \quad (\text{D.4})$$

$$x_1 = \frac{[B_1]}{[I]} = \frac{[H^+]K_1}{[H^+]^2 + [H^+]K_1 + K_1K_2} \quad (\text{D.5})$$

$$x_2 = \frac{[B_2]}{[I]} = \frac{K_1K_2}{[H^+]^2 + [H^+]K_1 + K_1K_2} \quad (\text{D.6})$$

Verwendete Abkürzungen

AOM	Akustooptischer Modulator
BSA	Albumin Bovine Serum
CCD	Charge Coupeld Device
DMEM	Dubelco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EMEM	Enhanced Modified Eagle Medium
FKS	Fötales Kälber Serum
FLIC	Fluorescence Interference Contrast
FOE	5-hexadecanoylamino fluorescein
HAF	Fluorescein-Octadecyl-Ester
HEK	Human Embryonic Kidney
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
LED	Light Emitting Diode
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMT	Photomultiplier
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SOR	Successive Overrelaxation

Literaturverzeichnis

- [1] M. Abramowitz, I. Stegun, M. Danos, and J. Rafelski. *Pocketbook of Mathematical Functions*. Harri Deutsch, Thun, Frankfurt am Main, 1984.
- [2] B. Alberts, D. Bray, and J. Lewis. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002.
- [3] R. Barlow. *Statistics*. Wiley, 1989.
- [4] M. Beckerle. *Cell Adhesion*. Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [5] T. Birkenmaier. *Dünne Schichten mit hoher DK zur Optimierung von Neurochips*. Diplomarbeit, TU-München, 2001.
- [6] D. Braun. *Capacitive stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes*. Dissertation, TU-München, 2000.
- [7] D. Braun and P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Appl. Phys. A*, 65:341–348, 1997.
- [8] D. Braun and P. Fromherz. Fluorescence interferometry of neuronal cell adhesion on microstructured silicon. *Phys. Rev. Lett.*, 81:5241–5244, 1998.
- [9] D. Braun and P. Fromherz. Fast voltage transients in capacitive silicon-to-cell stimulation detected with a luminescent molecular electronic probe. *Phys. Rev. Lett.*, 86:2905–2908, 2001.
- [10] D. Braun and P. Fromherz. Imaging neuronal seal resistance on silicon chip using fluorescent voltage-sensitive dye. *PNAS*, Submitted, 2003.
- [11] M. Brittinger and P. Fromherz. Fast and slow transistor records of recombinant voltagegated k^+ channels. *Biophys. J., Abstracts 47th Annual Meeting*, 84:219a, 2003.
- [12] L. Bruns. *Protokoll zum Arbeitsgruppenpraktikum im Rahmen des "Münchener Jahrs" für Tübinger BiochemikerINNEN*. 2003.
- [13] J. Crank. *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, Oxford, 2nd edition, 1975.

- [14] J. Davis. *Basic Cell Culture*. Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [15] L. Fahrmeir, R. Künstler, I. Pigeot, and G. Titz. *Statistik*. Springer, Berlin, 2001.
- [16] M. Fernandez and P. Fromherz. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles. *J. Phys. Chem.*, 81:1755–1761, 1977.
- [17] A. Genz, W. von Engelhardt, and R. Busche. Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig. *J. Physiol.*, 517:507–519, 1999.
- [18] I. Giaever and C. Keese. Micromotion of mammalian-cells measured electrically. *PNAS*, 88:7896–7900, 1991.
- [19] I. Giaever and C. Keese. Micromotion of mammalian-cells measured electrically (proc natl acad sci usa, vol 88, pg 7896, 1991). *PNAS*, 90:1634–1634, 1993.
- [20] J. Goodman. *Introduction To Fourieroptics*. Mc Graw Hill, New York, 1996.
- [21] F. Graham, J. Smiley, W. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36:59–74, 1977.
- [22] R. Haugland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, 9th edition, 2002.
- [23] G. Hübener, A. Lambacher, and P. Fromherz. Anellated hemicyanine dyes with large symmetrical solvatochromism of absorption and fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, 107:7896–7902, 2003.
- [24] V. Kiessling. *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazelluläre angelegten Wechsellspannungen*. Dissertation, TU-München, 1999.
- [25] A. Korpel. *Acousto-Optics*. Marcel Dekker, 1996.
- [26] T. Kreis and R. Vale. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [27] M. Kubista, J. Nygren, A. Elbergali, and R. Sjöback. Making reference samples redundant. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29:1–28, 1999.
- [28] B. Kuhn. *Messungen von Aktionspotentialen in Dendriten von kultivierten und gentechnisch veränderten Hippocampusneuronen mit spannungssensitiven Farbstoffen*. Dissertation, TU-München, 2001.

- [29] B. Kuhn and P. Fromherz. Anellated hemicyanine dyes in a neuron membrane: Molecular stark effect and optical voltage recording. *J. Phys. Chem. B*, 107:7903–7913, 2003.
- [30] J. Lakowicz. *Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2nd edition, 1999.
- [31] A. Lambacher and P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Appl. Phys. A*, 63:207–216, 1996.
- [32] A. Lambacher and P. Fromherz. Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes. *J. Opt. Soc. Am. B*, 19:1435–1453, 2002.
- [33] C. Lo, C. Keese, and I. Giaever. Impedance analysis of mdck cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophys. J.*, 69:2800–2807, 1995.
- [34] W. Press. *Numerical Recipes In C*. Cambridge, Cambridge, 2nd edition, 1992.
- [35] I. Schön. . Diplomarbeit, TU-München, 2003.
- [36] R. Sjöback, J. Nygren, and M. Kubista. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectroc. Acta Pt. A.*, 51:L7–L21, 1995.
- [37] B. Straub, E. Meyer, and P. Fromherz. Recombinant maxi-k channels on transistor, a prototype of iono- electronic interfacing. *Nat. Biotechnol.*, 19:121–124, 2001.
- [38] M. Ulbrich. *Kapazitives Öffnen von Ionenkanälen in Zellmembranen auf Siliziumchips*. Dissertation, TU-München, 2003.
- [39] B. Valeur. *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [40] F. Wallrapp. *Halbleiter mit Hoch-DK-Beschichtung zur Stimulation von Nervenzellen*. Diplomarbeit, TU-München, 2001.
- [41] J. Wegener, A. Hakvoort, and H. Galla. Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by camp-dependent pathways in vitro. *Brain Research*, 853:115–124, 2000.
- [42] G. Zeck. *Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz*. Dissertation, TU-München, 2002.
- [43] G. Zeck and P. Fromherz. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *PNAS*, 98:10457–10462, 2001.

- [44] G. Zeck and P. Fromherz. Repulsion and attraction by extracellular matrix protein in cell adhesion studied with nerve cells and lipid vesicles on silicon chips. *Langmuir*, 19:1580–1585, 2003.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- Prof. Dr. Peter Fromherz, für die interessante Themenstellung und die gute Betreuung.
- Der gesamten Abteilung Membran- und Neurophysik, für das gute Arbeitsklima und die unkomplizierte Zusammenarbeit.
- Dr. Gerd Hübener, Sonja Golla und Steffi Stumhofer für die Versorgung mit Farbstoff.
- Doris Eckerlein für die Präparation der Rattenneuronen.
- Michaela Morawetz für die Messung der Referenzspektren aus Kapitel 5
- Frank Wallrapp für die TiO_2 -Chips.
- Matthias Brittinger und Franz Gleixner für das kritische Korrekturlesen der Arbeit.
- Matthias Brittinger für konsequentes Kaffeetrinken.
- Meinen Eltern für die großzügige Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.
- Meinen Freunden die regelmässig für die notwendige Ablenkung gesorgt haben.

