



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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



NICHTSTATIONÄRES RAUSCHEN IM ZELL-TRANSISTOR-KONTAKT
DURCH QUANTISIERTE IONENSTRÖME

Christoph Becker-Freyseng

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

Doktors der Naturwissenschaften

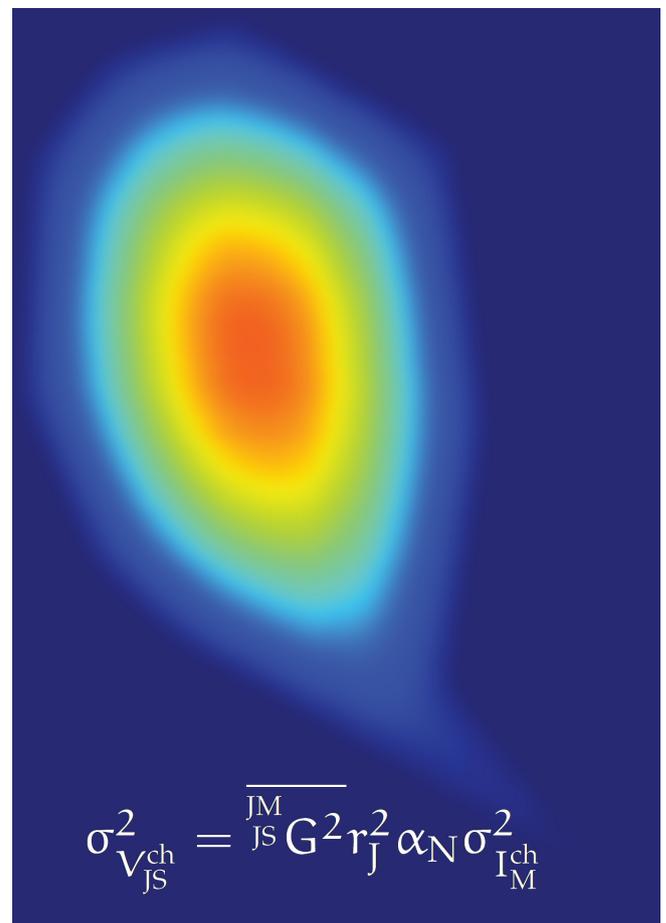
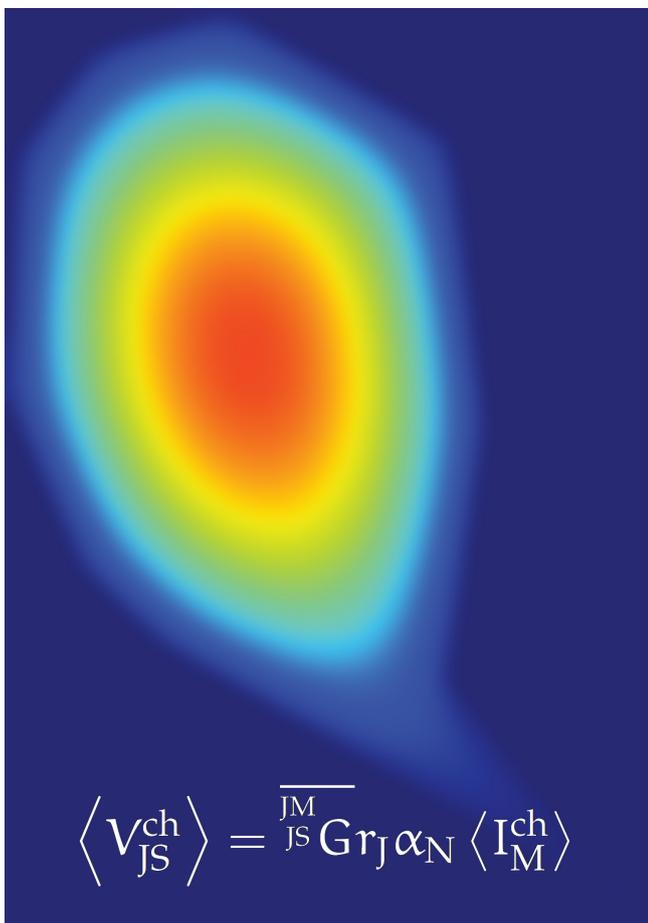
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der
Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Friedrich Simmel

Die Dissertation wurde am 23. April 2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 13. Juli 2012 angenommen.

NICHTSTATIONÄRES RAUSCHEN IM ZELL-TRANSISTOR-KONTAKT DURCH QUANTISIERTE IONENSTRÖME



Christoph Becker-Freyseng

ZUSAMMENFASSUNG

Über Analyse des nichtstationären Rauschens wird die quantisierte Antwort von Electrolyte-Oxide-Semiconductor Feldeffekttransistoren auf Ströme von Ionenkanälen nachgewiesen. Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V wird in tsA201 Zellen stabil exprimiert. Diese adhäreren auf Chips mit rauscharmen EOSFETs, die TiO_2 als Gateoxid aufweisen. Mittels whole-cell Voltage Clamp werden die Zellen depolarisiert und der Transmembranstrom sowie die Gatespannung simultan aufgezeichnet. Die Analyse des nichtstationären Rauschens liefert, beim als Referenz verwendeten Patch-Clamp, die Einzelkanaleigenschaften der Ionenkanäle und damit die Quantisierung des Membranstroms. Durch Modellierung des Zell-Chip-Kontakts als zweidimensionaler Kern-Mantel-Leiter wird das Rauschen der Gatespannung auf den quantisierten Membranstrom zurückgeführt. Die Ortsabhängigkeit der resultierenden Spannungsquanten ist über die Greensche Funktion des Zell-Chip-Kontakts gegeben.

ABSTRACT

By nonstationary noise analysis the quantized response of electrolyte-oxide-semiconductor field-effect transistors to currents of ion channels is revealed. The voltage gated potassium channel Shaker B $\Delta 6-46$ T449V is stably overexpressed in tsA201 cells. They adhere on chips with low-noise EOSFETs and a TiO_2 gate oxide. Using whole-cell voltage clamp the cells are depolarized and the transmembrane current as well as the gate voltage are simultaneously recorded. Applying nonstationary noise analysis to the patch-clamp recording, which is used as a reference, the single channel properties and with it the quantization of the membrane current is revealed. By modeling the cell-chip junction as a core-coat conductor the noise of the gate voltage can be attributed to the quantized membrane current. The local dependence of the resulting voltage quanta is given by the Green's function of the cell-chip junction.

PUBLICATION

The following publication was based on the work for this thesis:

BECKER-FREYSENG, C. ; FROMHERZ P.: Quantised transistor response to ion channels revealed by nonstationary noise analysis.
EPL (Europhysics Letters) 96 (2011), 38005

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | EINFÜHRUNG | 1 |
| 2 | THEORIE | 7 |
| 2.1 | Nichtstationäres Rauschen durch Ionenkanäle . . . | 7 |
| 2.1.1 | Kaliumkanal | 7 |
| 2.1.2 | Kinetisches Modell | 7 |
| 2.1.3 | Nichtstationäres Rauschen | 10 |
| 2.2 | Zell-Chip-Kontakt | 15 |
| 2.2.1 | Flächenkontaktmodell | 15 |
| 2.2.2 | Greensche Funktion | 17 |
| 2.2.3 | Thermisches Rauschen | 19 |
| 2.2.4 | Wechselspannung | 20 |
| 2.2.5 | Ionenkanalstrom | 21 |
| 2.2.6 | Konforme Abbildung und Schwarz-Christoffel- Transformation | 22 |
| 2.3 | Nichtstationäres Rauschen im Zell-Chip-Kontakt . | 24 |
| 2.3.1 | Erwartungswert und Varianz von V_J^{ch} | 25 |
| 2.3.2 | Apparente Kanäle | 26 |
| 2.3.3 | Rückschluss auf zugrundeliegende Ionen- kanäle | 26 |
| 2.3.4 | Punktkontaktmodell | 27 |
| 2.3.5 | Flächenkontaktmodell mit kreisförmiger Ad- häsionsfläche | 28 |
| 2.3.6 | Flächenkontaktmodell mit Polygon | 28 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 3.1 | EOSFETs und Chips | 33 |
| 3.1.1 | Funktionsweise und Aufbau | 33 |
| 3.1.2 | Titandioxid-Beschichtung | 35 |
| 3.1.3 | Kennlinie | 35 |
| 3.1.4 | Arbeitspunkt und Kalibrierung | 36 |
| 3.2 | Ionenkanal und Zellen | 38 |
| 3.2.1 | Ionenkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V | 38 |
| 3.2.2 | tsA201 Zellen und stabile Zelllinie | 39 |
| 3.2.3 | Zellkultur | 39 |
| 3.2.4 | Zellkultur auf Chips | 40 |
| 3.3 | Patch-Clamp Technik | 41 |
| 3.3.1 | Prinzip | 41 |
| 3.3.2 | whole-cell Voltage Clamp | 43 |
| 3.4 | Apparatur | 45 |
| 3.4.1 | Aufbau | 45 |
| 3.4.2 | Steuerung und Datenerfassung | 46 |
| 3.4.3 | FET-Verstärker | 48 |
| 3.4.4 | Messung mit dem EOSFET | 49 |
| 3.5 | Durchführung | 50 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.5.1 | Ablauf | 50 |
| 3.5.2 | Auswertungsgrundlagen | 51 |
| 3.5.3 | Struktur der Messprotokolle | 52 |
| 3.5.4 | Stationäres, thermisches Rauschen | 53 |
| 3.5.5 | Protokoll zum nichtstationären Rauschen | 54 |
| 3.6 | Varianzanalyse des nichtstationären Rauschens | 55 |
| 4 | CHARAKTERISIERUNG DER KOPPLUNG UND IONEN- KANÄLE | 63 |
| 4.1 | Tail-Current-Messung für Umkehrpotential | 63 |
| 4.2 | Stationäre Offenwahrscheinlichkeit | 64 |
| 4.2.1 | Modell | 65 |
| 4.2.2 | Doppel-Puls Protokoll | 66 |
| 4.2.3 | Resultat | 67 |
| 4.3 | Ionenkanalexpression | 68 |
| 4.4 | Zell-Chip-Kopplung bei Wechselspannung | 70 |
| 5 | ERGEBNIS UND DISKUSSION | 75 |
| 5.1 | Messung zum nichtstationären Rauschen | 75 |
| 5.1.1 | Pipettenstrom und Transistorsignal | 75 |
| 5.1.2 | Isochronen | 77 |
| 5.1.3 | Paarweiser Schätzer für Varianz | 78 |
| 5.1.4 | Wahl der Tiefpass-Filter | 79 |
| 5.2 | Kopplungsparameter aus DIC-Aufnahme der Zelle | 80 |
| 5.2.1 | Parameter beim Punktkontaktmodell | 80 |
| 5.2.2 | Näherung als Kreis im Flächenkontaktmodell | 80 |
| 5.2.3 | Näherung als Polygon im Flächenkontaktmodell | 81 |
| 5.3 | Linearität bei Mittelwert und Varianz | 81 |
| 5.3.1 | Ensemble-Mittel von Pipetten- und FET-Signal | 81 |
| 5.3.2 | Ensemble-Varianz von Pipetten- und FET-Signal | 84 |
| 5.3.3 | Schichtwiderstand r_j und Kanalzahlverhältnis α_N | 85 |
| 5.4 | Varianzanalyse des nichtstationären Rauschens | 86 |
| 5.4.1 | Ensemble-Varianz bei Pipettenmessung | 87 |
| 5.4.2 | Ensemble-Varianz bei FET-Messung | 89 |
| 5.4.3 | Kanaleigenschaften, Schichtwiderstand und Kanalzahlverhältnis | 89 |
| 5.5 | Vergleichende Auswertung weiterer Messungen | 91 |
| 5.5.1 | Überblick & Auswahlkriterien | 91 |
| 5.5.2 | Varianzanalyse von FET- und Pipettenmessung | 91 |
| 5.5.3 | Einzelkanalleitfähigkeit | 93 |
| 5.5.4 | Stationäre Offenwahrscheinlichkeit | 94 |
| 5.6 | Schichtwiderstand über thermisches Rauschen | 96 |
| 6 | FAZIT | 99 |

| | |
|---|------------|
| ANHANG | 103 |
| A SYSTEM, PROTOKOLLE UND BERECHNUNGEN | 105 |
| A.1 Transistoren | 105 |
| A.1.1 Fertigstellung der Chips | 105 |
| A.1.2 Titandioxid-Beschichtung | 105 |
| A.1.3 Transistorrauschen | 106 |
| A.2 Zellen und Molekularbiologie | 108 |
| A.2.1 HEK293 tsA201 Zellen | 108 |
| A.2.2 Ionenkanal Shaker B Δ 6-46 T449V | 109 |
| A.2.3 Ursprungsplasmid Shaker B Δ 6-46 T449V | 112 |
| A.2.4 Vektor pcDNA3.1/Hygro ⁽⁺⁾ | 112 |
| A.2.5 Plasmid, Transfektion und stabile Zelllinie | 112 |
| A.3 Patch-Clamp Protokoll | 113 |
| A.4 Berechnungen zur Greenschen Funktion | 117 |
| A.4.1 Mittelung über Kreisfläche | 117 |
| A.4.2 Forminvarianz | 118 |
| B VERWENDETE MATERIALIEN | 121 |
| B.1 Geräte | 121 |
| B.2 Software | 122 |
| B.3 Lösungen | 122 |
| B.4 Chemikalien | 124 |
| B.5 Verbrauchsmaterial | 125 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 127 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|----------------|--|----|
| Abbildung 1.1 | Patch-Clamp Technik | 2 |
| Abbildung 1.2 | Signal eines einzelnen Shaker B Kanals . . | 2 |
| Abbildung 1.3 | Grundgedanke der Zell-Chip-Kopplung . | 3 |
| Abbildung 1.4 | Rauschen durch Gabe von Acetylcholin auf eine motorische Endplatte | 4 |
| Abbildung 2.1 | Aufbau des Kv1.2-Kanals | 8 |
| Abbildung 2.2 | Übergangsschema 3+2' | 9 |
| Abbildung 2.3 | Simulierter Verlauf des Zustands einzel- ner Kanäle und Gesamtzahl offener Kanäle | 11 |
| Abbildung 2.4 | Von den Signalen einzelner Iterationen zu Ensemble-Mittelwert und -Varianz . . . | 13 |
| Abbildung 2.5 | Ensemble-Varianz aufgetragen gegen die Ensemble-Mittelwerte | 14 |
| Abbildung 2.6 | Schematische Darstellung des Flächen- kontaktmodells mit Ersatzschaltbild . . . | 15 |
| Abbildung 2.7 | Schematische Darstellung des Punktkon- taktmodells mit Ersatzschaltbild | 27 |
| Abbildung 2.8 | Ortsabhängigkeit der über einen Kreis gemittelten Greenschen Funktion | 29 |
| Abbildung 2.9 | Mittelung der Greenschen Funktion über Kreis und Polygon | 30 |
| Abbildung 2.10 | Ortsabhängigkeit von apparenter zur realen Kanalzahl bzw. von apparenter Kanal- Spaltspannung zum Einzelkanalstrom . . | 31 |
| Abbildung 3.1 | Querschnittszeichnung eines bc EOSFETs . . | 33 |
| Abbildung 3.2 | Chip mit Kulturkammer und Nahaufnahme | 34 |
| Abbildung 3.3 | Kennlinie eines bc EOSFETs | 36 |
| Abbildung 3.4 | Drainleitwert und Steilheit am Arbeits- punkt | 37 |
| Abbildung 3.5 | Abhängigkeit von V_{fn} vom Arbeitspunkt | 38 |
| Abbildung 3.6 | Zelle, Pipette und Elektroden | 42 |
| Abbildung 3.7 | Cell-attached Konfiguration | 42 |
| Abbildung 3.8 | Ersatzschaltbild der durch Patch-Clamp Technik kontaktierten Zelle | 43 |
| Abbildung 3.9 | Foto des Messaufbaus | 46 |
| Abbildung 3.10 | Schematische Darstellung des Messauf- baus | 47 |
| Abbildung 3.11 | Messen der Spaltspannung V_j mit EOSFET | 49 |
| Abbildung 3.12 | Struktur der Messprotokolle | 52 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Abbildung 4.1 | Umkehrpotential aus Tail-Currents mit gleicher Konditionierung gegen Transmembranspannung | 65 |
| Abbildung 4.2 | Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der Transmembranspannung . . . | 67 |
| Abbildung 4.3 | Kaliumkanalexpression der stabilen Zelllinie | 69 |
| Abbildung 4.4 | Impedanz des Systems aus Zelle und Pipette sowie Abhängigkeit des FET-Signals vom kapazitiven Membranstrom | 72 |
| Abbildung 4.5 | Vergleich von $\hat{V}_{FET}^{ch} / \hat{I}_M^{ch}$ mit $ V_{FET}^{vac} / I_M^{ac} $. | 73 |
| Abbildung 5.1 | Mikroaufnahme der verwendeten Zelle . . | 75 |
| Abbildung 5.2 | Pipettenstrom und Transistorsignal bei 3 verschiedenen Depolarisationen | 76 |
| Abbildung 5.3 | Isochronen zur Veranschaulichung des Run-Downs | 77 |
| Abbildung 5.4 | Effekt der Tiefpass-Filterung auf die Varianz | 79 |
| Abbildung 5.5 | Mikroaufnahme einer Zelle zur Messung mit EOSFET und Greensche Funktion . . . | 82 |
| Abbildung 5.6 | Mittelwerte sowie Varianzen von Pipetten- und Transistor-Signal | 83 |
| Abbildung 5.7 | Betrachtung der funktionalen Abhängigkeit von Varianz und Mittelwert | 88 |
| Abbildung 5.8 | Illustration zur Anzahl der ausgewählten Zellen | 91 |
| Abbildung 5.9 | Vergleich des aus FET- und Pipettenmessung errechneten Membranstroms bei restlos geöffneten Ionenkanälen | 92 |
| Abbildung 5.10 | Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit . | 93 |
| Abbildung 5.11 | Offenwahrscheinlichkeiten aus der Varianzanalyse | 94 |
| Abbildung 5.12 | Spektrale Leistungsdichte mit adhärierter Zelle und Referenzspektrum | 96 |
| Abbildung 5.13 | Vergleich des Schichtwiderstands | 97 |
| Abbildung A.1 | Spektrale Leistungsdichte eines EOSFETs . | 106 |
| Abbildung A.2 | Schematische Struktur des Shaker-Genlocus und der daraus resultierenden Ionenkanäle. | 110 |
| Abbildung A.3 | Plasmid | 112 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|---|
| AD/DA | Analog zu Digital / Digital zu Analog |
| bc EOSFET | buried channel EOSFET |
| ddH ₂ O | Reinstwasser (doppelt destilliertes Wasser) |
| DIC | Differential Interference Contrast |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose |
| DNA | Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| ECACC | European Collection of Cell Cultures (siehe http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure |
| EOSFET | Electrolyte-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor |
| ECM | extrazelluläre Lösung (engl. extracellular medium) |
| FET | Field-Effect Transistor |
| FFT | schnelle Fourier-Transformation (engl. fast Fourier transform) |
| FLIC-Mikroskopie | Fluoreszenzinterferenzkontrast-Mikroskopie (engl. Fluorescence interference contrast) |
| FKS | fötales Kälberserum |
| HeBS | HEPES buffered saline |
| HEK293 | Human Embryonic Kidney 293 cells (menschliche embryonale Nierenzellen) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| i.i.d. | independent and identically distributed |
| ICM | intrazelluläre Lösung (engl. intracellular medium) |
| LJP | Liquid Junction Potential |

| | |
|-----------|---|
| MCS | Multiple Cloning Site (auch Polylinker) |
| MOSFET | Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor |
| D-PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RTP | rapid thermal processing |
| TE-Puffer | TRIS und EDTA Puffer |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| (v/v) | Volumen zu Volumen |

Biohybride Sensoren aus Halbleiterchips und biologischen Zellen eröffnen völlig neue Möglichkeiten beim Neuro-Interfacing und Wirkstoffscreening. Ein Electrolyte-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor (EOSFET) ermöglicht die Kopplung von Zellen mit Halbleitersensoren und hat sich zur Detektion der extrazellulären Signale von biologischen Systemen bewährt. Dort sind Ionenkanäle mit ihrem gesteuerten und selektiven Transport von Ionen durch die Zellmembran die elementaren Schalteinheiten. Aus ihren Einzelkanalströmen setzen sich die komplexen elektrischen Signale im Organismus und Denkvorgänge im Gehirn zusammen. Die quantisierte Antwort von EOSFETs auf die Ströme von Ionenkanälen wird in der vorliegenden Doktorarbeit nachgewiesen, wobei die hierzu verwendeten, rauscharmen EOSFETs die infolge des endlichen Schichtwiderstands gegebene thermodynamische Grenze für extrazelluläre Messungen erreichen. Das Gesamttransistorsignal sowie seine Varianz kann über die Modellierung des Zell-Chip-Kontakts auf den quantisierten Membranstrom zurückgeführt werden. Damit ist erstmals das Studium des Kopplungsmechanismus der Zell-Transistor-Kopplung mittels der quantisierten Ströme von Ionenkanälen möglich.

Im Folgenden werden die Ionenkanäle, der Zell-Chip-Kontakt und das Rauschen durch Ionenkanäle grundlegend eingeführt und ein Überblick der vorliegenden Arbeit gegeben.

IONENKANÄLE

Im Rahmen der quantitativen Beschreibung des Aktionspotentials im Riesenaxon des Tintenfisches [HH52] wurden „active patches“ postuliert, welche den transmembranspannungsabhängigen Transport von Natrium- und Kaliumionen ermöglichen. Mit weiteren Untersuchungen [FK51, HK55] galten dafür Poren in der Zellmembran als wahrscheinlich.

Diese porenbildenden Transmembranproteine werden als Ionenkanäle bezeichnet. Sie ermöglichen einen gesteuerten und selektiven Transport von Ionen durch die Zellmembran. So sind Ionenkanäle meist nur für eine bestimmte Ionensorte durchlässig. Und diese Durchlässigkeit ist wiederum von der Transmembranspannung, einem Liganden oder mechanischem Reiz abhängig.

Die Messung der Signale einzelner Ionenkanäle gelang schließlich durch die Patch-Clamp Technik [NS76]. Bei dieser bildet die Patch-Pipette zusammen mit der Zellmembran einen Giga-seal aus und isoliert so den kleinen, in der Pipettenöffnung enthaltenen Membranausschnitt von seiner Umgebung durch einen Widerstand im Gigaohm-Bereich. Enthält dieser sog. Patch (engl. Stelle, Flicker) wie in [Abbildung 1.1a](#) skizziert einen Ionenkanal, so kann dessen Einzelkanalstrom gemessen werden.

Die soeben beschriebene Anordnung wird als cell-attached Konfiguration bezeichnet. Ausgehend von dieser kann die inside-out Konfiguration erreicht

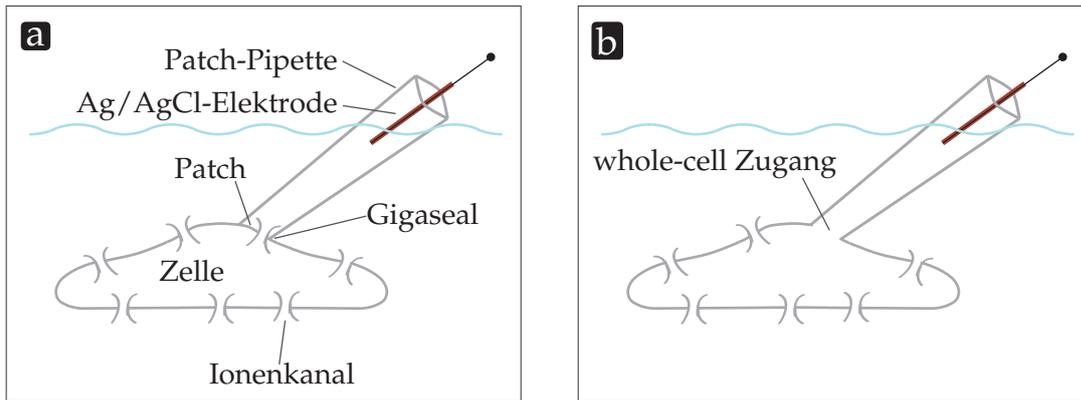


Abbildung 1.1: Patch-Clamp Technik. (a) Messen von Einzelkanalströmen mit der Patch-Clamp Technik in der cell-attached Konfiguration. Zwischen Zellmembran und Patch-Pipette formt sich ein Gigaseal aus. Der Elektrolyt in der Pipette wird über die Ag/AgCl-Elektrode elektrisch kontaktiert. (b) Nach Durchbrechen des Membranausschnitts im Kontaktbereich liegt die whole-cell Konfiguration vor. In dieser ist das Zellinnere elektrisch kontaktiert.

werden, indem die Pipette von der Zelle weg gezogen wird und der Membranausschnitt an der Öffnung der Pipette verbleibt. Soll anstatt eines Einzelkanalstroms der Gesamtstrom durch die Zellmembran gemessen werden, so kann die in [Abbildung 1.1b](#) gezeigte whole-cell Konfiguration verwendet werden. Die Patch-Clamp Technik ist heute mit einer Vielzahl an Erweiterungen [[HMN⁺81](#), [HM88](#)] eine Standardmethode der Elektrophysiologie.

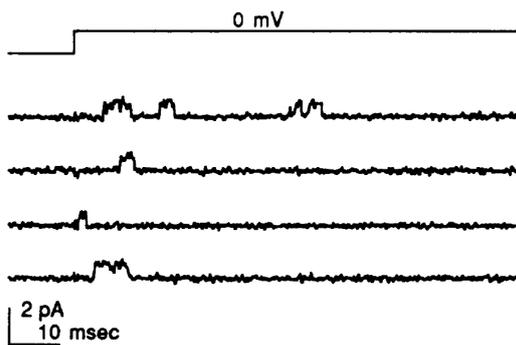


Abbildung 1.2 – (Kalium-) Ionenstrom eines einzelnen Shaker B Kaliumkanals gemessen mit der Patch-Clamp-Technik in der inside-out Konfiguration. Aus [[ZHA89](#)].

[Abbildung 1.2](#) zeigt den Ionenstrom eines einzelnen Ionenkanals. Dazu wurde die Pipettenspannung von -120 mV

auf 0 mV mit einem Spannungssprung geändert. In den 4 Messschrieben ist zu erkennen, dass zunächst bei -120 mV kein Strom fließt und sich anschließend bei 0 mV einzelne Stromsignale immer gleicher Größe zeigen. Dies ist ein typisches Merkmal von Ionenkanälen: sie besitzen bezüglich ihrer Leitfähigkeit (meist nur) 2 Zustände; die zentrale Pore ist entweder offen oder geschlossen. Der dabei fließende Strom wird als Einzelkanalstrom bezeichnet.

ZELL-CHIP-KONTAKT

Mit einem Electrolyte-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor (EOSFET) [[FOVW91](#), [WF97](#)] können die sich aus Einzelkanalströmen zusammensetzenden, elektrischen Signale einer Zelle als extrazelluläre Spannung und damit nicht-invasiv gemessen werden. Dazu ist, wie in [Abbildung 1.3](#) dargestellt, die zu untersuchende Zelle auf einem EOSFET-Chip adhärirt und von Elektrolyt/Messlösung umgeben. Zwischen Chip und Zelle befindet sich ein etwa 50 nm breiter Spalt. Der EOSFET ist wie ein gewöhnlicher Feldeffekt-

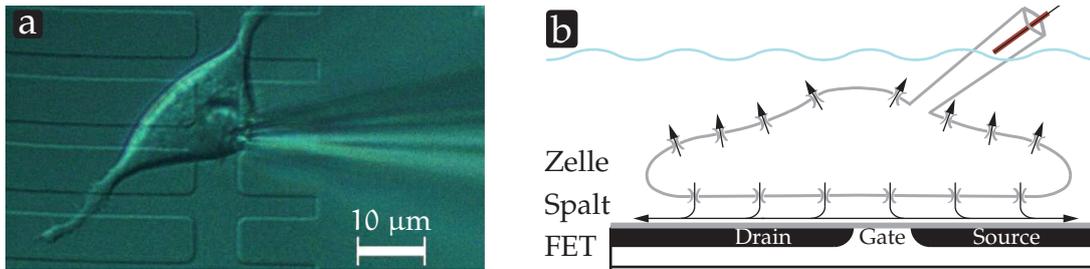


Abbildung 1.3: Grundgedanke der Zell-Chip-Kopplung mit einem EOSFET. (a) DIC-Aufnahme einer auf einem EOSFET-Chip adhärenierten HEK293-Zelle. Die Zelle ist außerdem mit einer Patch-Pipette über die whole-cell Konfiguration kontaktiert. (b) Die Querschnittszeichnung skizziert eine auf dem Chip adhärenierte Zelle mit Ionenkanälen. Bei Aktivierung der Ionenkanäle verursacht der Ionenstrom im Elektrolyt des Spalts über dessen endlichen Widerstand eine Spannung. Diese extrazelluläre Spannung vermittelt die Kopplung und kann im Bereich der sensitiven Fläche des Transistors, der Gatefläche, detektiert werden.

transistor spannungsgesteuert, d. h. der Strom zwischen dem Source- und Drain-Anschluss wird über die Spannung am Gate gesteuert. Dieses ist jedoch bei einem EOSFET kein Metallgate sondern der Elektrolyt über der sensitiven Fläche des Transistors. Ein Ionenstrom im Elektrolyt des Spalts zwischen Chip und Zelle verursacht über den endlichen Schichtwiderstand eine extrazelluläre Spannung, die mit dem EOSFET detektiert werden kann [Fro03]. Dabei sind Elektrolyt und Halbleiter durch eine chemisch inerte Oxidschicht voneinander getrennt und so der Sensor vor Korrosion sowie die Zelle vor ansonsten auftretenden Korrosionsprodukten geschützt.

EINZELKANALSTRÖME IM ZELL-CHIP-KONTAKT

Die Idee, die quantisierten Ströme von einzelnen Ionenkanälen (siehe [Abbildung 1.2](#)) direkt zum Studium der Zell-Transistor-Kopplung zu verwenden, erscheint sehr reizvoll. Dies ist jedoch auf-

grund des benötigten Signal-zu-Rausch Verhältnisses nicht möglich. Einerseits ist das Signal, welches vom Ionenstrom durch einen einzelnen Ionenkanal im EOSFET hervorgerufen wird, sehr klein und andererseits ist das Rauschen des Systems noch zu groß. Während Verbesserungen im Chip-Design denkbar sind, zeigt sich im thermischen Rauschen des Schichtwiderstands eine systembedingte Grenze [VF06] bei dem hier behandelten Kopplungsmechanismus.

RAUSCHEN DURCH IONENKANÄLE

Noch vor Erfindung der Patch-Clamp-Technik wurde bei Gabe von Acetylcholin auf motorische Endplatten¹ neben der erwarteten Depolarisation auch eine Zunahme im Rauschen des Membranpotentials beobachtet [KM70]. Dieses tritt auf (siehe [Abbildung 1.4](#)), da sich die messbare, makroskopische Depolarisation aus einer Vielzahl von statistisch unabhängigen, elementaren Strompulsen zusammensetzt, die den Acetylcholinrezeptoren zugeordnet werden kön-

¹ Die Endplatte einer Muskelzelle bildet zusammen mit dem Axonende eine chemische Synapse. Kommt am Axonende ein Aktionspotential an, so wird der Neurotransmitter Acetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dieser bindet an die Acetylcholin-Rezeptoren der Endplatte, welche die Zelle daraufhin durch Kationeneinstrom depolarisieren.

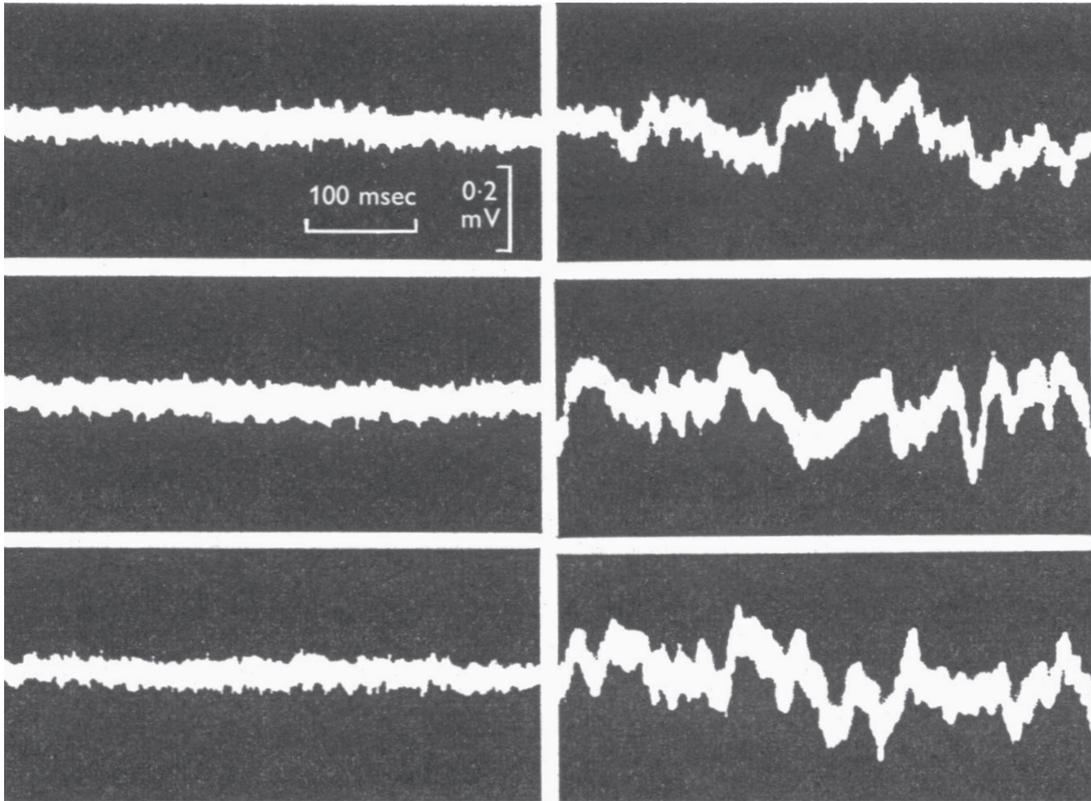


Abbildung 1.4: Rauschen durch Gabe von Acetylcholin auf eine motorische Endplatte. Auf der linken Seite sind zugehörige Kontrollmessungen aufgeführt, deren Rauschen dem Hintergrundrauschen der Messanordnung entspricht. Auf der rechten Seite ist ein deutlich erhöhtes Rauschen erkennbar, das durch Gabe von Acetylcholin ausgelöst wurde. (Die hierbei zugleich stattfindende Depolarisation von etwa 10 mV wurde zur besseren Darstellung unterdrückt.)
Aus [KM72]

nen. Demnach folgt die Membranspannung keinem „glatten“ Verlauf sondern ist überlagert von winzigen Schwankungen/Depolarisationen, die dem Auftreten der einzelnen Strompulse entsprechen und deren Größe auf $0,4 \mu\text{V}$ geschätzt werden konnten [KM72]. Im Rauschen des makroskopischen Signals treten folglich die mikroskopischen Eigenschaften der Ionenkanäle in Erscheinung.

Beim EOSFET eröffnet damit die Analyse des Rauschens der Ionenkanäle im Spalt eine Möglichkeit zum Studium des Kopplungsmechanismus über die quantisierten Ströme der Ionenkanäle. Also stellt sich für diese Doktorarbeit die zentrale Frage:

Wie überträgt sich das ionenkanalverursachte Rauschen des Membranstroms auf das EOSFET-Signal und welche Rückschlüsse sind vom Transistorsignal aus auf die Zell-Chip-Kopplung möglich?

Das mit dem EOSFET messbare Signal einer Zelle setzt sich aus den über den Spalt eingekoppelten Einzelkanalströmen der Ionenkanäle zusammen. Dieses Ionenkanal-Ensemble folgt dabei statistischen Gesetzmäßigkeiten, die sich aus den Einzelkanaleigenschaften ergeben und sich zusammen mit den Eigenschaften des Spalts bzw. der Kopplung in der vom Chip gemessenen Spannung widerspiegeln.

Zur Untersuchung des EOSFET-Signals und seiner Rauscheigenschaften wurden Zellen mit einem spannungsabhängigen Kaliumkanal transfiziert und auf Chips gegeben. [Abbildung 1.3](#) zeigt eine solche adhärierte Zelle, die mit einer Patch-Pipette über die whole-cell Konfiguration kontaktiert wurde. Über den Patch-Clamp (siehe [Abschnitt 3.3](#)) konnten die Ionenkanäle gesteuert und simultan der Transmembranstrom gemessen werden. Dies ermöglichte das Rauschen sowohl des EOSFET-Signals als auch des Transmembranstroms zu analysieren und beide miteinander zu vergleichen.

ÜBERBLICK

Der Messung, Modellierung und Analyse des Rauschens durch Ströme einzelner Ionenkanäle im Zell-Chip-Kontakt

und dem sich daraus ergebenden EOSFET-Signal widmet sich die vorliegende Doktorarbeit:

Nichtstationäres Rauschen im Zell-Transistor-Kontakt durch quantisierte Ionenströme.

Auf diese Einführung folgt im 2. Kapitel die Behandlung der theoretischen Grundlagen. Im Kapitel „Material und Methoden“ werden die verwendeten Chips und Zellen vorgestellt, die Messapparatur erläutert und die Messmethoden sowie die Auswertung im Einzelnen erklärt. Daraufhin werden im 4. Kapitel die Ionenkanäle und die Zell-Transistor-Kopplung charakterisiert. Das 5. Kapitel führt schließlich die Messungen auf, wertet diese gemäß der dargelegten Theorie aus und diskutiert die erhaltenen Ergebnisse. Abschließend werden im „Fazit“ die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

In diesem Kapitel wird zunächst der Aufbau, die Funktionsweise und die Modellierung der Ionenkanäle beschrieben. Darauf aufbauend wird das nichtstationäre Rauschen der Signale von Ionenkanälen hergeleitet und mit Simulationen veranschaulicht. Die Theorie der Zell-Chip-Kopplung wird dargelegt und abschließend die Behandlung des nichtstationären Rauschens auf die extrazellulären Spannungssignale im Spalt übertragen.

2.1 NICHTSTATIONÄRES RAUSCHEN DURCH IONENKANÄLE

2.1.1 Kaliumkanal

Für das erstmalige Studium der Zell-Transistor-Kopplung über die quantisierten Ströme von Ionenkanälen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der kaliumselektive Ionenkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V (siehe [Abschnitt 3.2.1](#) und [Abschnitt A.2.2](#)) verwendet. Die Molekularstruktur des eng verwandten Kaliumkanals Kv1.2 ist in [Abbildung 2.1](#) veranschaulicht. Der Kanal besteht aus 4 identischen Untereinheiten, die sich kontrolliert über die T1-Domänen [[LJJ92](#), [SCBP93](#)] zu einem Tetramer agglomerieren [[Mac91](#)]. Während jede Untereinheit einen Spannungssensor besitzt, formen dabei die porenbildenden Domänen eine gemeinsame, zentrale Pore.

Diese Pore wird durch die 4 Spannungssensoren gesteuert und ist mit der Offenwahrscheinlichkeit $p(t)$ geöffnet. Dann strömen durch sie die (Kalium-) Ionen entlang des jeweiligen von der Transmembranspannung V_M abhängigen elektrochemischen Gradienten. Der Ionenstrom wird als Einzelkanalstrom i_{ch} bezeichnet. Die Membranspannung, bei welcher kein Netto-Ionenstrom vorliegt, wird als Umkehrpotential bezeichnet. Mit dem Umkehrpotential V_0^K und der Einzelkanalleitfähigkeit γ_{ch} des verwendeten Kaliumkanals folgt der ohmsche Zusammenhang

$$i_{ch} = \gamma_{ch} \cdot (V_M - V_0^K) \quad (2.1)$$

zwischen Einzelkanalstrom und Transmembranspannung [[AS96](#)].

2.1.2 Kinetisches Modell

Für die Beschreibung des Gatingverhaltens und damit dem zeitlichen Verlauf sowie dem stationären Wert der Offenwahrschein-

Bei $V_M = V_0^K$ kehrt sich das Vorzeichen des Stroms i_{ch} um.

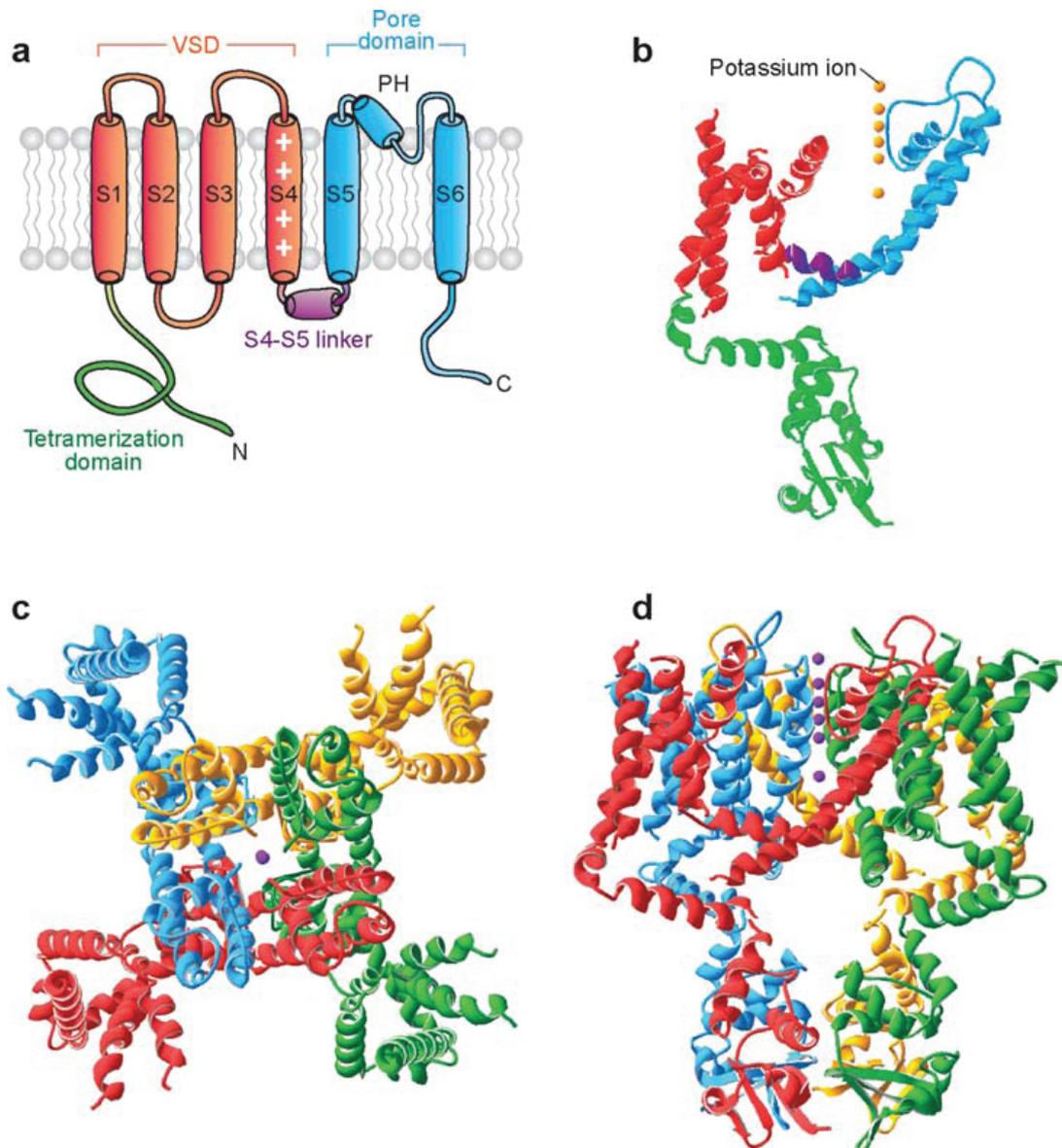


Abbildung 2.1: Der tetramere Aufbau des Kv1.2-Kanals. In (a) ist die Molekülstruktur einer der 4 identischen Untereinheiten skizziert. Zylinder stellen dabei helikale Strukturen dar. Am N-Terminus sitzt die für die Bildung des Tetramers entscheidende T₁-Domäne (in grün). Die Segmente S₁-S₄ des Spannungssensors sind rot eingefärbt und über den S₄-S₅ Linker ist die porenbildende Domäne (blau) verbunden. (b) zeigt die dreidimensionale Molekülstruktur der Untereinheit mit gleicher Farbgebung und Kaliumionen in Gelb. Die 4 Untereinheiten des Kv1.2-Tetramers sind in der Ansicht von oben (c) und von der Seite (d) je in einer anderen Farbe dargestellt. Durch die so gebildete Pore können Kaliumionen (violett) fließen. Aus [TPI06] mit den Koordinaten von [LCM05].

lichkeit haben sich Markov-Modelle (z. B. gegenüber Fraktal-Modellen) bewährt [SBK+89, NR07a, NR07b]. Bei einer Markov-Kette hat das System eine Anzahl diskreter Zustände. Die Übergangsrate von einem Zustand in einen anderen hängt dabei nur von den beiden Zuständen und ggf. weiteren Parametern, nicht aber von der Zeit oder den vorangegangenen Zuständen ab. Auf molekularer Ebene liegt dieser Beschreibung zugrunde, dass der Ionenkanal nur eine endliche Anzahl von Zuständen einnehmen kann. Dabei ist allerdings zunächst nicht garantiert, dass den verschiedenen Zuständen auch tatsächlich entsprechende Konformationen (und Konformationsänderungen) zugrunde liegen. Es stellt vielmehr eine Aufgabe bei der Modellierung dar, bei gleichzeitig minimaler Komplexität [Kee08, Kee09] die einzelnen Zustände, Übergänge und Parameter auch auf molekularer Ebene identifizierbar und damit eindeutig zu machen [FGMM10].

Der abstrakten Beschreibung des Gatingverhaltens durch Hodgkin und Huxley [HH52] wird durch die Markov-Ketten eine mechanistische Deutung gegeben.

Im Folgenden wird das in **Abbildung 2.2** gezeigte Übergangsschema 3+2' aus [SS98] für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Shaker 29-4 (und der Mutation V2) behandelt. Dieser Kaliumkanal ist eng verwandt mit dem hier eingesetzten Shaker B. In Anlehnung an den physischen tetrameren Aufbau wird auch im kinetischen Modell von 4 Untereinheiten ausgegangen, die zusammen den gemeinsamen offenen Zustand kontrollieren.

Die Benennung 3+2' weist auf den angenommenen Mechanismus hin: Jede der 4 Untereinheiten besitzt die Zustände S_0, S_1, S_2 und S_3 und kann diese weitgehend unabhängig voneinander einnehmen. Entsprechend sind die 3 möglichen Übergänge für jede der 4 Untereinheiten im Schema durch Klammern abgegrenzt. Be-

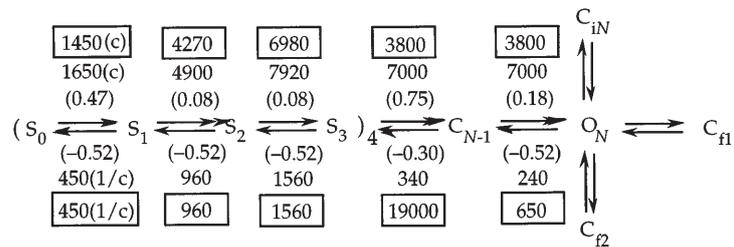


Abbildung 2.2 – Übergangsschema 3+2' für die Kaliumkanäle Shaker 29-4 (und V2). Aus [SS98].

finden sich alle Untereinheiten jeweils im Zustand S_3 so kann über 2 weitere, kollektive Übergänge zunächst C_{N-1} und schließlich mit O_N der offene Zustand erreicht werden. Außerdem besitzt der Kanal die inaktivierten/geschlossenen Zustände C_{iN}, C_{f1} und C_{f2} . (Diese liegen allerdings nicht im Aktivierungspfad mit dem sich [SS98] primär befasst; vervollständigen ' aber das Modell.)

Damit ergeben sich $n = \binom{4+4-1}{4} + 5 = 40$ verschiedene Zustände für das Modell. Die Besetzungswahrscheinlichkeiten lassen sich als Vektor $\mathbf{s}(t)$ mit $\sum_i s_i = 1$ darstellen. Fasst man entsprechend die von der Membranspannung V_M abhängigen

Übergangsraten in einer 40×40 -Matrix $\mathbf{K}(V_M)$ zusammen, so wird $\mathbf{s}(t)$ über die Mastergleichung

$$\dot{\mathbf{s}} = \mathbf{K}(V_M) \cdot \mathbf{s} \quad (2.2)$$

und die Anfangsbedingungen bestimmt. Die Offenwahrscheinlichkeit ist somit bei insgesamt einem offenen Zustand über

$$p(t) = s_{\text{offen}}(t) \quad (2.3)$$

gegeben.

Für die einzelnen spannungsabhängigen Vorwärts- und Rückwärtsraten ($i \neq j$) folgt mit der Teilladung q_{ij}

$$k_{ij}(V_M) = k_{ij}(0) \cdot e^{q_{ij}V_M/k_B T} \quad (2.4)$$

und die Diagonalelemente werden so gewählt, dass sich jede Reihe zu 0 summiert (Erhaltung der Wahrscheinlichkeit). Die Spannungsabhängigkeit beschreibt dabei der Term $e^{q_{ij}V_M/k_B T}$ über die Teilladungen q_{ij} . Diese sind in [Abbildung 2.2](#) als Vielfaches der Elementarladung e_0 angegeben und durch Klammern gekennzeichnet. Die dort aufgeführten Übergangsraten $k_{ij}(0)$ bei $V_M = 0$ mV haben die Einheit s^{-1} . Zur Unterscheidung zwischen Shaker 29-4 und V2 sind die Raten von V2 zusätzlich umrahmt. Beim Übergang $S_0 \rightleftharpoons S_1$ besteht zudem zwischen den Untereinheiten eine positive Kooperativität $c = 1,3$. Zur Modellierung wird die Vorwärtsrate mit dem Faktor c^n und die Rückwärtsrate mit c^{-n} multipliziert. Dabei ist n die Anzahl der Untereinheiten, die sich nicht mehr im Zustand S_0 befinden.

2.1.3 Nichtstationäres Rauschen

Im Folgenden wird das nichtstationäre Rauschen des Membranstroms erläutert und auf die Eigenschaften der Ionenkanäle zurückgeführt [[Sig81](#)].

Zur Vereinfachung wird hier $I_M = I_M^{ch}$ gesetzt, d. h. andere Anteile des Membranstroms unterdrückt.

Der makroskopische Transmembranstrom I_M einer Zelle setzt sich aus den Einzelkanalströmen zusammen. Die Ionenkanäle sollen dabei als unabhängig und identisch verteilt – independent and identically distributed (i.i.d.) – angenommen werden. Betrachtet man für diese Doktorarbeit eine Zelle mit nur einer relevanten Ionenkanalorte, so ergibt sich der Gesamtstrom aus dem Einzelkanalstrom multipliziert mit der Anzahl offener Kanäle.

Zur Veranschaulichung zeigt [Abbildung 2.3](#) eine Simulationen mit 20 Ionenkanälen nach dem Modell des vorangegangenen [Abschnitt 2.1.2](#). Ausgehend vom stationären Zustand bei einem Haltepotential von -80 mV öffnen sich bei $t = 0$ ms die Kanäle durch einen Spannungssprung auf -20 mV; in der Summe tritt hervor, dass sich die Ionenkanäle nach anfänglicher Verzögerung öffnen und ein Gleichgewicht mit etwa 75 % geöffneten Kanälen erreicht wird.

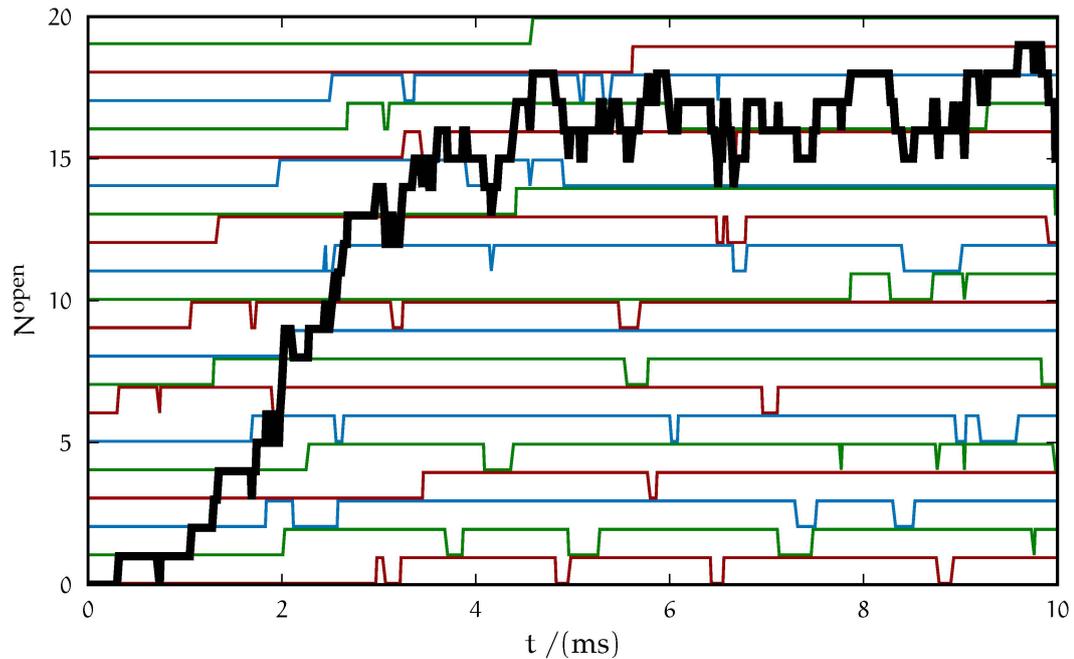


Abbildung 2.3: Das Öffnen und Schließen der einzelnen Ionenkanäle führt in Summe zum makroskopischen Signal. Der (simulierte) Verlauf des Zustands der einzelnen Kanäle ist farbig dargestellt, wobei das jeweils obere Niveau für den geöffneten und das untere für den geschlossenen Zustand steht. Der schwarze Verlauf zeigt die Anzahl der insgesamt offenen Ionenkanäle.

Die stochastische Natur der einzelnen Ionenkanäle überträgt sich auf den Zeitverlauf der Zahl geöffneter Kanäle und damit auf den Transmembranstrom. Führt man obige Simulation mehrfach durch, so ergeben sich demnach Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitverläufen des Membranstroms $I_M(t)$. Offensichtlich gilt dies ebenso für reale Messungen. Bei jeder einzelnen Iteration l der Messung/Simulation werden die gleichen Bedingungen vorgegeben und das System (Zelle, Ionenkanäle, ...) befindet sich makroskopisch wieder im Ausgangszustand; dennoch weichen die Realisierungen des Membranstroms $I_{M,l}(t)$ aufgrund ihrer stochastischen Natur voneinander ab. Dass sich das System von Iteration zu Iteration makroskopisch nicht ändert (siehe [Abschnitt 5.1](#)), ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Abhandlung.

Wir betrachten also ein **Ensemble** von Transmembranströmen $I_{M,l}(t)$, bei dem der zeitliche Verlauf der Offenwahrscheinlichkeit $p(t)$ der Ionenkanäle, ihr Einzelkanalstrom und ihre Gesamtzahl für jede Iteration l gleich bleiben. Der Ionenstrom durch einen einzelnen Kanal wird als stochastischer Prozess

$$I_1^{\text{ch}}(t) = \begin{cases} i_{\text{ch}} & \text{Kanal offen} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.5)$$

Befände sich das System zu Beginn eines Iterationsschrittes nicht mehr im ursprünglichen, makroskopischen Ausgangszustand, so wäre zumindest ein Teil der Abweichung nicht durch stochastischen Schwankungen verursacht.

beschrieben. Für den Erwartungswert folgt mit [Abschnitt 2.1.2](#)

$$\langle I_1^{\text{ch}}(t) \rangle = s_{\text{offen}} \cdot i_{\text{ch}} + \sum_{i \neq \text{offen}} s_i \cdot 0 = p(t) \cdot i_{\text{ch}} \quad (2.6)$$

und für die Varianz

$$\begin{aligned} \sigma_{I_1^{\text{ch}}}^2(t) &= \left\langle \left(I_1^{\text{ch}}(t) - \langle I_1^{\text{ch}}(t) \rangle \right)^2 \right\rangle \\ &= s_{\text{offen}} \cdot (i_{\text{ch}} - s_{\text{offen}} i_{\text{ch}})^2 + \sum_{i \neq \text{offen}} s_i \cdot (0 - s_{\text{offen}} i_{\text{ch}})^2 \\ &= s_{\text{offen}} i_{\text{ch}}^2 \cdot (1 - s_{\text{offen}})^2 + (s_{\text{offen}} i_{\text{ch}})^2 \cdot (1 - s_{\text{offen}}) \\ &= p(t) \cdot (1 - p(t)) \cdot i_{\text{ch}}^2 \quad . \end{aligned} \quad (2.7)$$

Bei N_M unabhängigen und identisch verteilten Ionenkanälen ergibt sich

$$\begin{aligned} \langle I_M(t) \rangle &= N_M \cdot p(t) \cdot i_{\text{ch}} \\ \sigma_{I_M}^2(t) &= N_M \cdot p(t) \cdot (1 - p(t)) \cdot i_{\text{ch}}^2 \end{aligned} \quad (2.8)$$

für **Ensemble-Erwartungswert** und **-Varianz** des Transmembranstroms. Drückt man die Varianz durch den Erwartungswert aus

$$\begin{aligned} \sigma_{I_M}^2(t) &= N_M p(t) i_{\text{ch}} \cdot i_{\text{ch}} - N_M p^2(t) i_{\text{ch}}^2 \\ &= \langle I_M(t) \rangle \cdot i_{\text{ch}} - \langle I_M(t) \rangle^2 / N_M \end{aligned}$$

so folgt

$$\sigma_{I_M}^2(\langle I_M(t) \rangle) = \langle I_M \rangle \cdot i_{\text{ch}} - \langle I_M \rangle^2 / N_M \quad (2.9)$$

als funktionaler Zusammenhang zwischen beiden. Die Varianz in Abhängigkeit vom Erwartungswert beschreibt also eine Parabel mit den Parametern i_{ch} und N_M . Dies kann für alle Transmembranströme hergeleitet werden, die aus N_M i.i.d. Ionenkanälen mit genau einem leitenden Zustand resultieren [[Sig80](#), [AGL02](#)] (oder mehreren leitenden Zuständen mit gleichem Einzelkanalstrom). Die Ströme folgen dabei einer Binomialverteilung, sodass sich [Gleichung 2.8](#) und [Gleichung 2.9](#) ergibt.

Der Zusammenhang zwischen Erwartungswert und Varianz tritt auch bei den geschätzten Größen realer Messungen in Erscheinung. Dazu sind in [Abbildung 2.4a](#) 10 Iterationen einer Simulation mit 100 Ionenkanälen und einem Einzelkanalstrom $i_{\text{ch}} = 0,78 \text{ pS}$ dargestellt (Ausgangszustand, Spannungssprung etc. wie in der vorherigen Simulation). Die Werte der Zeitverläufe von $I_{M,l}(t)$ je zum gleichen relativen Zeitpunkt t_0 können in der Isochrone $I_M|_{t_0}(l) \mapsto I_{M,l}(t_0)$ zusammengefasst werden. Das Vorgehen und eine Auswahl von Isochronen demonstriert [Abbildung 2.4b](#). Es ist zu erkennen, dass wie erwartet, die Werte innerhalb einer Isochrone voneinander abweichen. Außerdem ist

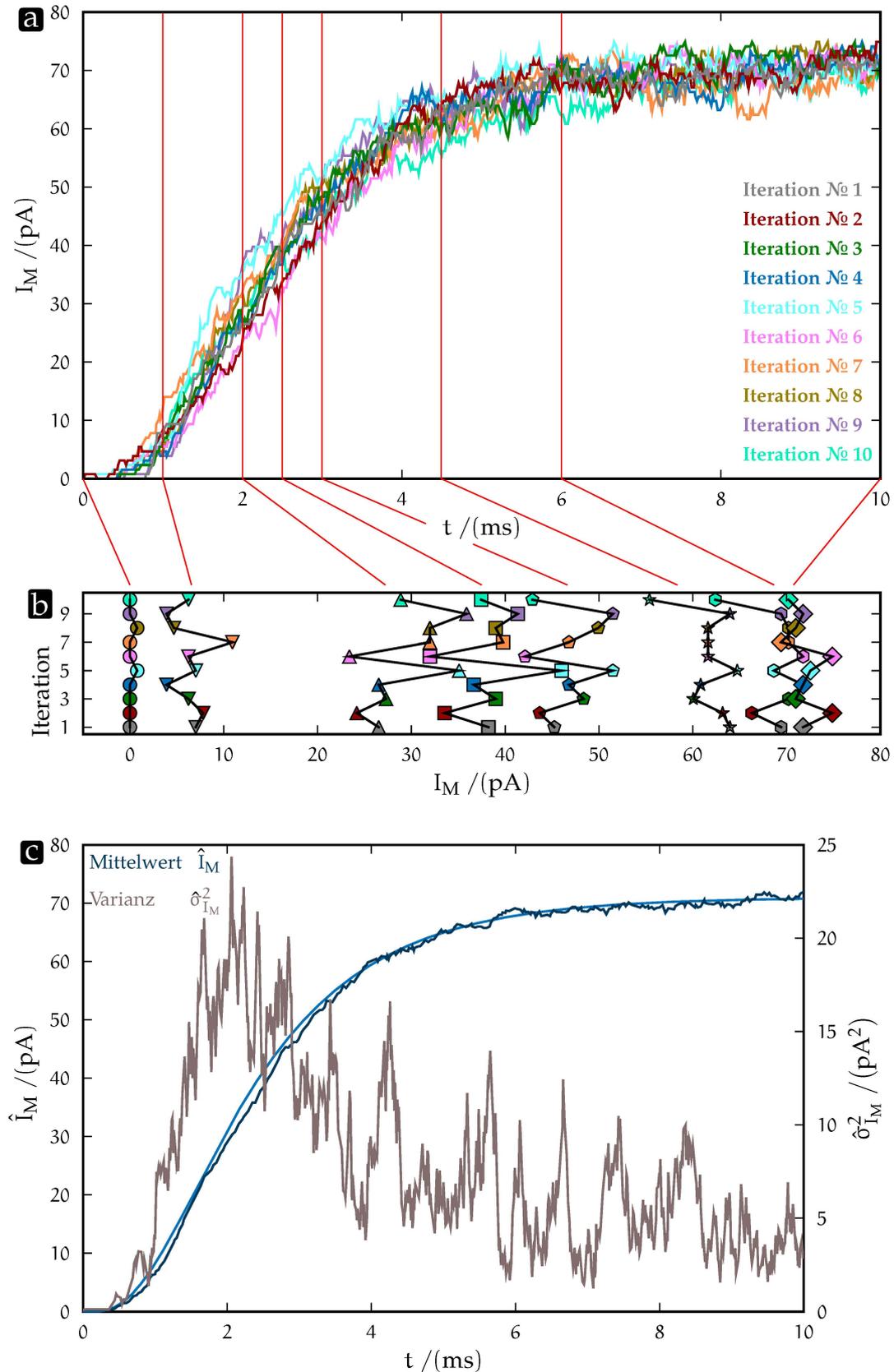


Abbildung 2.4: Von den Signalen einzelner Iterationen zu Ensemble-Mittelwert und -Varianz. (a) zeigt den jeweiligen Membranstrom der 10 Iterationen einer Simulation mit 100 Ionenkanälen. In (b) sind die Isochronen zu ausgewählten Zeitpunkten (rote Markierungen) dargestellt. Zu jeder Isochrone kann der Mittelwert und die Varianz berechnet werden. Daraus folgt bei Berechnung für alle Zeitpunkte der in (c) zusammengestellte Verlauf von Ensemble-Mittelwert und -Varianz. Der Mittelwert ist mit dem Erwartungswert gemäß der Lösung von Gleichung 2.2 unterlegt.

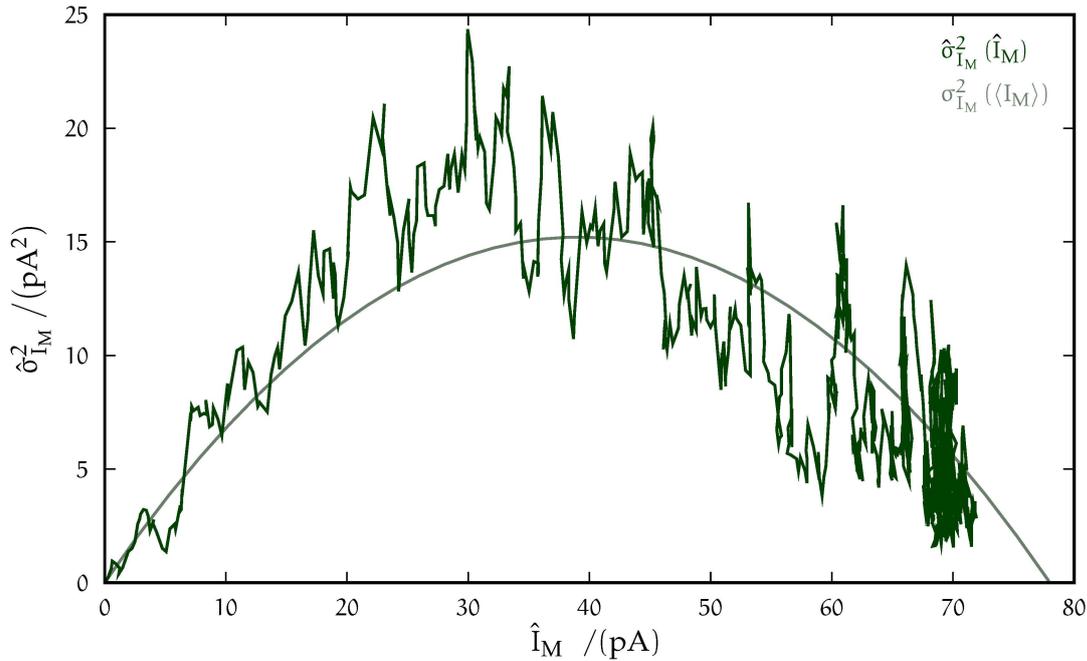


Abbildung 2.5: Aufgrund des funktionalen Zusammenhangs $\sigma_{I_M}^2(\langle I_M(t) \rangle) = \langle I_M \rangle \cdot i_{ch} - \langle I_M \rangle^2 / N_M$ zwischen Varianz und Erwartungswert beschreibt auch die Schätzung der Varianz aufgetragen gegen den Mittelwert annähernd eine Parabel.

diese Abweichung entsprechend den verschiedenen Offenwahrscheinlichkeiten bei den Isochronen unterschiedlich stark ausgeprägt. Berechnet man zu jedem Zeitpunkt aus der jeweiligen Isochrone den Mittelwert, so erhält man für ein Ensemble aus L Iterationen mit

$$\hat{I}_M(t) = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_{M,l}(t)$$

den Ensemble-Mittelwert des Transmembranstroms. Die Ensemble-Varianz wird mit

$$\hat{\sigma}_{I_M}^2(t) = \frac{1}{L-1} \sum_{l=1}^L (I_{M,l}(t) - \hat{I}_M(t))^2$$

geschätzt. [Abbildung 2.4c](#) zeigt beide in Abhängigkeit von der Zeit. In [Abbildung 2.5](#) ist die Schätzung der Varianz gegen den errechneten Mittelwert aufgetragen, sowie die Parabel von Varianz und Erwartungswert für die der Simulation zugrunde liegenden Parameter i_{ch} und N_M eingezeichnet.

Umgekehrt können der Mittelwert und die Varianz einer Messreihe aufgetragen werden und so über einen Fit nach [Gleichung 2.9](#) die beiden Parameter bestimmt werden. Damit erhält man aus der Analyse der Varianz, d. h. einer Analyse des nichtstationären Rauschens, Einzelkanaleigenschaften. Zusätzlich kann man den

zeitlichen Verlauf der Offenwahrscheinlichkeit aus dem Ensemble-Mittelwert $\hat{I}_M(t)$ über

$$\hat{p}(t) = \frac{\hat{I}_M(t)}{i_{ch} N_M} \tag{2.10}$$

schätzen.

Führt man eine derartige Messung und Analyse für mehrere Membranspannungen V_M durch, so erhält man i_{ch} und $p(t)$ in Abhängigkeit von diesen Spannungen. Aus einem Fit von i_{ch} gegen V_M folgen damit über Gleichung 2.1 die Einzelkanalleitfähigkeit γ_{ch} und das Umkehrpotential V_0^K .

2.2 ZELL-CHIP-KONTAKT

Als Ausgangsbasis wird der Zell-Chip-Kontakt im Flächenkontaktmodell beschrieben und die aufgestellten Differentialgleichungen gelöst. Darauf aufbauend werden die Zusammenhänge für das thermische Rauschen, die Wechselfspannungsanregung und das durch Ionenkanäle verursachte Signal hergeleitet.

2.2.1 Flächenkontaktmodell

In Abbildung 2.6 ist eine auf dem Chip adhärerte Zelle mit Membranfläche A_M skizziert und das zugehörige Ersatzschaltbild eingezeichnet. Im hier gezeigten Fall wird nur eine relevante Ionensorte¹, Kaliumionen, mit Umkehrpotential V_0^K betrachtet und die Membranleckleitfähigkeit vernachlässigt. Über Patch-Clamp (siehe Abschnitt 3.3) wird die Transmembranspannung V_M vor-

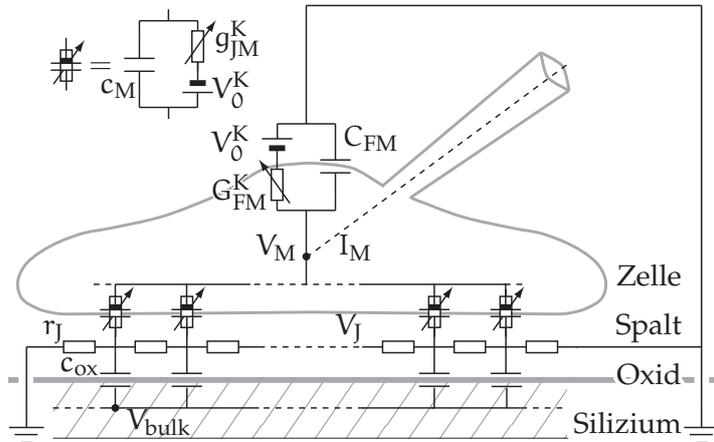


Abbildung 2.6 – Schematische Darstellung des Flächenkontaktmodells mit Ersatzschaltbild.

gegeben und der Gesamtstrom I_M gemessen. Dieser setzt sich aus dem Strom über die freie I_{FM} und über die adhärerte Membran I_{JM} zusammen. Desweiteren kann man die kapazitiven Anteile I_M^{ac} und die über Ionenkanäle I_M^{ch} unterscheiden; also $I_M = I_M^{ac} + I_M^{ch} = I_{FM}^{ac} + I_{FM}^{ch} + I_{JM}^{ac} + I_{JM}^{ch}$.

Der sog. Spalt (engl. junction), also der Elektrolyt zwischen Chip und adhärierter Membran A_{JM} , wird in [WF97] als zweisei-

¹ Für die Betrachtung weiterer Ionensorten muss entsprechend summiert werden.

mensionaler Kern-Mantel-Leiter beschrieben. Hierbei wird die Höhe d_j des Spalts im Vergleich zur Adhäsionsfläche als sehr klein angenommen und somit über $r_j = 1/(\sigma_{EJ}d_j)$ der Schichtwiderstand mit der spezifischen Leitfähigkeit σ_{EJ} des Elektrolyts im Spalt definiert. Des Weiteren bezeichnet c_M die spezifische Kapazität der Zellmembran und c_{ox} die der isolierenden Oxidschicht des Chips. Die Spannung im Spalt wird durch kapazitive Ströme ([Abschnitt 2.2.4](#)), Ionenströme ([Abschnitt 2.2.5](#)) oder Spannungsfluktuationen ([Abschnitt 2.2.3](#)) hervorgerufen und mit V_j symbolisiert. Die Bulk-Spannung wird als konstant angenommen $\partial_t V_{Bulk} \stackrel{!}{=} 0$ und kann daher vernachlässigt werden.

Die Kaliumionen-Stromdichte durch die adhärierte Membran ist über

$$j_{JM}^K(\mathbf{x}, t, V_M, V_j) = (V_M - V_0^K - V_j) \cdot g_{JM}^K(\mathbf{x}, t, V_M, V_j)$$

definiert. Dabei repräsentiert die spezifische Kaliumleitfähigkeit g_{JM}^K die Kaliumkanäle als flächenspezifische Größe, die ebenfalls i. A. von Ort, Zeit, Membranspannung und V_j abhängt. Die Dichte der kapazitiven Ströme über die freie bzw. adhärierte Membran ist mit $c_M \partial_t V_M$ bzw. $c_M \partial_t (V_M - V_j)$ gegeben. Eingesetzt in die zweidimensionale Kabelgleichung gilt

$$\nabla \left(r_j^{-1} \nabla V_j(\mathbf{x}, t) \right) = j_{JM}^K(\mathbf{x}, t, V_M, V_j) + c_M \partial_t V_M - c_M \partial_t V_j - c_{ox} \partial_t V_j \quad (2.11)$$

für die Spannung im Spalt V_j .

Diese wird für einfache Geometrien und homogene Quellstromdichten in [\[WF97\]](#) analytisch gelöst. Ansonsten bietet sich gemäß [\[Zei09\]](#) an, die V_j nach den Eigenvektoren dieser Helmholtz-Gleichung zu entwickeln. Damit lassen sich formal Lösungen schreiben, die dann für die jeweilige Geometrie der Zelle über Bestimmung der Eigenwerte berechnet werden. Dabei setzt sich V_j aus einer Reihe von Termen mit verschiedenen Zeitkonstanten bezüglich der Relaxation des Systems zusammen, wobei die Größte die Dynamik des Systems bestimmt und ein Abfallen der spektralen Leistungsdichte ab den korrespondierenden Frequenzen [\[Zei09\]](#) verursacht.

Wie in [Abschnitt 5.6](#) ausgeführt liegen diese Frequenzen für das hier betrachtete System oberhalb 10 kHz und damit außerhalb der für die Ionenkanäle relevanten Frequenzen. Also ist die Zeitableitung nach der Spaltspannung vernachlässigbar. Zudem nehmen wir bei den verwendeten HEK293 Zellen ein konstantes r_j an. Auch ein Einfluss der extrazellulären Spannung im Spalt auf den Ionenkanal wird ausgeschlossen, da zum einen $V_j \ll V_M - V_0$ gilt und zum anderen die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit nach [Abschnitt 4.2](#) klein ist d. h. $p(V_M - V_j) \approx p(V_M)$.

Führt man schließlich noch die Randbedingung

$$V_j(\mathbf{x}, t) = 0 \quad \forall \mathbf{x} \in \partial A_{JM}$$

für das auf 0 gesetzte Badpotential ein (siehe [Abschnitt 3.3](#)), so vereinfacht sich [Gleichung 2.11](#) zur zweidimensionalen Poisson-Gleichung

$$\nabla^2 V_j(\mathbf{x}, t) = -r_j(\mathbf{x}, t, V_M) \tag{2.12}$$

mit der von V_j unabhängigen skalaren Quellstromdichte

$$j(\mathbf{x}, t, V_M) = c_M \cdot \partial_t V_M + (V_M - V_0^K) \cdot g_{JM}^K(\mathbf{x}, t, V_M) \quad .$$

2.2.2 Greensche Funktion

Mit der Greenschen Funktion, welche

$$\begin{aligned} \nabla^2 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= -\delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_G) & \forall \mathbf{x}, \mathbf{x}_G \in A_{JM} \\ G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= 0 & \forall \mathbf{x} \in \partial A_{JM} \end{aligned} \tag{2.13}$$

erfüllt, ist

$$V_j(\mathbf{x}, t) = r_j \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_G G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) \cdot j(\mathbf{x}_G, t, V_M) \tag{2.14}$$

die allgemeine Lösung der zweidimensionalen Poisson-[Gleichung 2.12](#). Also ist das Ermitteln von V_j auf das Finden einer für das Gebiet A_{JM} passenden Greenschen Funktion mit anschließender Integration über das Produkt aus dieser und dem Quellterm reduziert. Zudem ist das Zeitverhalten von V_j offensichtlich direkt über die Inhomogenität bestimmt.

Für das Signal durch Wechselspannung ([Abschnitt 2.2.4](#)) und durch Ionenkanäle ([Abschnitt 2.2.5](#)) zeigt sich, dass die relevanten Quellterme ortsunabhängig und auf die Adhäsionsfläche A_{JM} normiert sind. Somit muss lediglich über die Greensche Funktion integriert werden. Zusammen mit der Division durch A_{JM} aufgrund der Normierung kann dies als Mittelung von G aufgefasst werden. Und so wird für die Mittelung der Greenschen Funktion über die Adhäsionsfläche A_{JM} die Kurzschreibweise

$$\overline{{}^JM}G(\mathbf{x}) = \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_G G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) / A_{JM}$$

eingeführt. Zudem tritt beim nichtstationären Rauschen in [Abschnitt 2.3](#) die quadrierte Greensche Funktion G^2 auf, deren Mittelung entsprechend als

$$\overline{{}^JM}G^2(\mathbf{x}) = \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_G G^2(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) / A_{JM}$$

Durch Vernachlässigung möglicher Relaxationen im Spalt hat die Spannungsantwort, bei Änderung der Quellstromdichte, keine Zeitabhängigkeit.

abgekürzt wird.

Die Messung von V_j erfolgt über einen endlichen Bereich² $A_{jS} \subseteq A_{jM}$, was einer zusätzlichen Mittelung über A_{jS} entspricht:

$$\begin{aligned}\overline{G}_{jS}^M &= \iint_{A_{jS}} d\mathbf{x} \overline{G}^M(\mathbf{x}) / A_{jS} \\ \overline{G}_{jS}^M{}^2 &= \iint_{A_{jS}} d\mathbf{x} \overline{G}^M{}^2(\mathbf{x}) / A_{jS} \quad .\end{aligned}$$

Im folgenden [Abschnitt 2.2.3](#) zum thermischen Rauschen wird die Greensche Funktion G zweifach über einen Bereich A_{jS} gemittelt und dies als

$$\overline{G}_{jS} = \frac{\iint_{A_{jS}} d\mathbf{x} \iint_{A_{jS}} d\mathbf{x}_G G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G)}{A_{jS}^2}$$

geschrieben.

Da sich die adhärierte Fläche einer Zelle als Kreis nähern lässt, soll abschließend die Greensche Funktion auf einer Kreisfläche A_{aj} [[Hab04](#), S.432]

$$G_{aj}(\alpha, \theta, \alpha_G, \theta_G) = -\frac{1}{4\pi} \ln \left(\alpha_j^2 \frac{\alpha^2 + \alpha_G^2 - 2\alpha\alpha_G \cos(\theta - \theta_G)}{\alpha^2 \alpha_G^2 + \alpha_j^4 - 2\alpha_j^2 \alpha \alpha_G \cos(\theta - \theta_G)} \right) \quad (2.15)$$

mit Radius α_j , den Abständen vom Mittelpunkt $0 \leq \alpha, \alpha_G \leq \alpha_j$ und den zugehörigen Winkeln $0 \leq \theta, \theta_G \leq 2\pi$ aufgeführt werden. Für diese wird in [Abschnitt A.4.1](#) die Mittelung über die gesamte Kreisfläche

$$\overline{G}_{aj}(\alpha) = \frac{1}{4\pi} \left(1 - \frac{\alpha^2}{\alpha_j^2} \right) \quad (2.16)$$

und die zweifache Mittelung über eine zentrische Kreisfläche A_{ac} mit Radius $\alpha_c \leq \alpha_j$

$$\overline{G}_{aj}^{ac} = \frac{1}{8\pi} - \frac{\ln(\alpha_c / \alpha_j)}{2\pi} \quad (2.17)$$

analytisch berechnet. Außerdem folgt im Zentrum direkt durch Einsetzen

$$\overline{G}_{aj}^2(0) = \frac{1}{8\pi^2 \alpha_j^2} \int_0^{\alpha_j} \alpha_G d\alpha_G \left(\ln \frac{\alpha_G^2}{\alpha_j^2} \right)^2 = \frac{1}{8\pi^2} \quad (2.18)$$

für die Mittelung der quadrierten Greenschen Funktion.

Für allgemeine Geometrien wird die Greensche Funktion in [Abschnitt 2.2.6](#) über konforme Abbildungen bestimmt.

² Gemäß [Abschnitt 3.4.4](#) über die sensitive Fläche des EOSFET.

2.2.3 Thermisches Rauschen

Das thermische bzw. Johnson-Nyquist-Rauschen [Joh28, Nyq28b] des Zell-Chip-Kontakts ist mit der endlichen Impedanz bzw. dem Widerstand des Spalts verbunden. Über das Fluktuations-Dissipations-Theorem [CW51, CG52] folgt aus der Impedanz des Systems die spektrale Leistungsdichte.

Zur Berechnung folgen wir dem Ansatz aus [Zei09] unter Vernachlässigung der Zeitabhängigkeit, sodass das hier eingeführte Vorgehen mit der Greenschen Funktion der zweidimensionalen Poisson-Gleichung beibehalten werden kann, und betrachten die Strominjektion

$$j^{\text{nyq}}(\mathbf{x}, t) = \begin{cases} j^{\text{nyq}}(t) & \forall \mathbf{x} \in A_{\text{JS}} \subseteq A_{\text{JM}} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

in einen Bereich A_{JS} des zweidimensionalen Spalts. Durch diesen fließt somit insgesamt ein Strom $I_{\text{JS}}(t) = \iint_{A_{\text{JM}}} d\mathbf{x} j^{\text{nyq}}(\mathbf{x}, t) = \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} j^{\text{nyq}}(t) = j^{\text{nyq}}(t) \cdot A_{\text{JS}}$. Mit dieser Quellstromdichte wird [Gleichung 2.12](#) zu

$$\nabla^2 V_{\text{J}}(\mathbf{x}, t) = -r_{\text{J}} j^{\text{nyq}}(\mathbf{x}, t)$$

bei gleichbleibender Randbedingung. Also folgt aus [Gleichung 2.14](#)

$$\begin{aligned} V_{\text{J}}^{\text{nyq}}(\mathbf{x}, t) &= r_{\text{J}} \iint_{A_{\text{JM}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}}) j^{\text{nyq}}(\mathbf{x}_{\text{G}}, t) \\ &= r_{\text{J}} j^{\text{nyq}}(t) \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}}) \end{aligned}$$

und die Strominjektion bewirkt eine mittlere Spannung $V_{\text{JS}}(t) = \frac{1}{A_{\text{JS}}} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} V_{\text{J}}^{\text{nyq}}(\mathbf{x}, t) = \frac{r_{\text{J}} j^{\text{nyq}}(t)}{A_{\text{JS}}} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}})$ im Bereich A_{JS} .

Demnach ist die Impedanz für den betrachteten Bereich

$$Z_{\text{JS}}(t) = \frac{V_{\text{JS}}(t)}{I_{\text{JS}}(t)} = \frac{r_{\text{J}}}{A_{\text{JS}}^2} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}})$$

und die spektrale Leistungsdichte folgt

$$S_{\text{JS}}(\omega) = 4k_{\text{B}} \text{Tr}_{\text{J}} \frac{\iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}})}{A_{\text{JS}}^2} \quad (2.19)$$

über das Fluktuations-Dissipations-Theorem. Da [Gleichung 2.12](#) gerade durch Vernachlässigen möglicher Relaxationen im Spalt und damit der Zeitabhängigkeit der Spannungsantwort auf eine Änderung der Quellstromdichte gewonnen wurde, ist die hier

hergeleitete Impedanz und spektrale Leistungsdichte nicht zeit- bzw. frequenzabhängig.

Mit der in [Abschnitt 2.2.2](#) eingeführten Kurzschreibweise ist die spektrale Leistungsdichte dann

$$S_{JS} = 4k_B T r_J \overline{J^S G} \quad . \quad (2.20)$$

Diese berechnet sich im radialsymmetrischen Fall für eine kreisförmige Adhäsionsfläche A_{aJ} mit Radius a_J und einer darin (zentrisch) liegenden Kreisfläche A_{aC} mit Radius a_C über [Gleichung 2.17](#) zu

$$S_{aC} = \frac{4k_B T r_J}{2\pi} \left(\frac{1}{4} + \ln \frac{a_J}{a_C} \right)$$

und entspricht dem in [\[Zei09\]](#) aufgeklärten Wert an der Frequenz 0, der die Herleitung aus [\[VF06\]](#) für das Rauschen des Kreisrings $A_{aJ} \setminus A_{aC}$ durch den Rauschanteil $k_B T r_J / 2\pi$ des Mittelungsbereich A_{aC} selbst vervollständigt.

2.2.4 Wechselfspannung

Zur Bestimmung der passiven Spalteigenschaften wurde wie in [Abschnitt 4.4](#) beschrieben eine Wechselfspannungsmessung durchgeführt. Hierzu wird die Transmembranspannung V_M um einen Wert moduliert, bei dem die Ionenkanäle geschlossen sind, und die Spannungsantwort aufgrund der in den Spalt injizierten, kapazitiven Ströme analysiert.

Der kapazitive Strom durch A_{JM} ist im Frequenzraum über

$$I_{JM}^{ac}(\omega) = \iint_{A_{JM}} dx c_M \cdot i\omega \cdot V_M(\omega) = i\omega \cdot V_M(\omega) \cdot c_M A_{JM}$$

gegeben. Mit dem Flächenverhältnis

$$\alpha_J = \frac{A_{JM}}{A_M} \quad (2.21)$$

von Adhäsions- zu Gesamtmembran gilt $I_{JM}^{ac} = \alpha_J \cdot I_M^{ac}$.

Damit liefert die Fouriertransformation von [Gleichung 2.14](#) bei geschlossenen Ionenkanälen

$$\begin{aligned} V_J^{ac}(\mathbf{x}, \omega) &= r_J \cdot \iint_{A_{JM}} dx_G G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) \cdot c_M \cdot i\omega \cdot V_M(\omega) \\ &= r_J \cdot \iint_{A_{JM}} dx_G G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) \cdot \frac{I_{JM}^{ac}(\omega)}{A_{JM}} \\ &= r_J \overline{J^M G}(\mathbf{x}) \cdot I_{JM}^{ac}(\omega) \\ &= r_J \overline{J^M G}(\mathbf{x}) \cdot \alpha_J I_M^{ac}(\omega) \end{aligned}$$

für die Spannung im Spalt durch den kapazitiven Transmembranstrom I_M^{ac} . Im Ergebnis ist das mittlere, in einem endlichen Bereich A_{JS} messbare Signal über

$$V_{\text{JS}}^{\text{ac}}(\omega) = r_{\text{J}} \cdot \alpha_{\text{J}} I_M^{\text{ac}}(\omega) \cdot \iint_{A_{\text{JS}}} d\mathbf{x} \overline{G}(\mathbf{x}) / A_{\text{JS}} = r_{\text{J}} \overline{G}^{\text{JM}} \cdot \alpha_{\text{J}} I_M^{\text{ac}}(\omega) \quad (2.22)$$

bestimmt.

Die Ortsabhängigkeit (vor der Mittelung) von $V_{\text{J}}^{\text{ac}}(\mathbf{x}, \omega)$ ist im Fall einer kreisförmigen Adhäsionsfläche über [Gleichung 2.16](#) gegeben und folgt einer Parabel mit dem Maximum $1/4\pi$ im Zentrum und dem Wert 0 am Kreisrand.

2.2.5 Ionenkanalstrom

Sowohl das mit dem EOSFET messbare Signal der Ionenkanäle als auch die Varianz zwischen mehreren Signalen resultiert aus den Ionenkanalströmen.

[Abschnitt 2.1.3](#) folgend wird der Ionenstrom durch einen einzelnen Kanal als stochastischer Prozess $I_1^{\text{ch}}(t)$ gemäß [Gleichung 2.5](#) beschrieben. Liegt dieser an der Position \mathbf{x}_0 in der adhärrierten Membran so ist

$$J_{\mathbf{x}_0}^1(\mathbf{x}, t) = \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_0) \cdot I_1^{\text{ch}}(t)$$

seine Quellstromdichte. In [Gleichung 2.14](#) eingesetzt ergibt sich

$$\begin{aligned} V_{\text{J}}^1(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) &= r_{\text{J}} \cdot \iint_{A_{\text{JM}}} d\mathbf{x}_{\text{G}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_{\text{G}}) \cdot \delta(\mathbf{x}_{\text{G}} - \mathbf{x}_0) \cdot I_1^{\text{ch}}(t) \\ &= r_{\text{J}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot I_1^{\text{ch}}(t) \end{aligned}$$

für die durch einen Ionenkanal im Spalt verursachte Spannung V_{J}^1 . Dies liefert zusammen mit [Gleichung 2.6](#)

$$\begin{aligned} \langle V_{\text{J}}^1(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) \rangle &= r_{\text{J}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot \langle I_1^{\text{ch}}(t) \rangle \\ &= r_{\text{J}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot p(t) i_{\text{ch}} \end{aligned}$$

für den Erwartungswert und mit [Gleichung 2.7](#)

$$\begin{aligned} \sigma_{V_{\text{J}}^1}^2(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) &= \left\langle \left(V_{\text{J}}^1(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) - \langle V_{\text{J}}^1(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) \rangle \right)^2 \right\rangle \\ &= \left\langle \left(r_{\text{J}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot I_1^{\text{ch}}(t) - r_{\text{J}} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot \langle I_1^{\text{ch}}(t) \rangle \right)^2 \right\rangle \\ &= r_{\text{J}}^2 G^2(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) \cdot \sigma_{I_1^{\text{ch}}}^2(t) \end{aligned}$$

für die Varianz. Die Ortsabhängigkeit des Spannungsquantums eines Ionenkanal entspricht also der Greenschen Funktion.

Analog zu [Gleichung 2.21](#) definiert man

$$\alpha_N = \frac{N_{JM}}{N_M} \quad (2.23)$$

für das Verhältnis der Kaliumkanalzahlen von adhärerter zu gesamtter Membran. Nach [Abschnitt 2.1.3](#) gilt dann

$$\begin{aligned} I_{JM}^{\text{ch}}(t) &= \alpha_N \cdot I_M^{\text{ch}}(t) \\ \sigma_{I_{JM}^{\text{ch}}}^2(t) &= \alpha_N \cdot \sigma_{I_M^{\text{ch}}}^2(t) \end{aligned}$$

für den Membranstrom und dessen Varianz. Sind die Ionenkanäle homogen über die gesamte Membran verteilt, so ist $\alpha_N = \alpha_J$.

Für voneinander unabhängige und (zumindest innerhalb der Adhäsionsmembran) homogen verteilte Ionenkanäle (die Dichteverteilung ist also $\frac{N_{JM}}{A_{JM}} = \text{const.}$) folgt mit

$$\begin{aligned} \langle V_J^{\text{ch}}(\mathbf{x}, t) \rangle &= \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_0 \frac{N_{JM}}{A_{JM}} \cdot \langle V_J^1(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) \rangle \\ &= r_J \cdot N_{JM} p(t) i_{\text{ch}} \cdot \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_0 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) / A_{JM} \\ &= r_J \overline{JM}G(\mathbf{x}) \cdot \langle I_{JM}^{\text{ch}}(t) \rangle \end{aligned}$$

das Ensemble-Mittel der durch Ionenkanäle hervorgerufenen, extrazellulären Spannung im Spalt. Offensichtlich hat diese die gleiche über $\overline{JM}G(\mathbf{x})$ bestimmte Ortsabhängigkeit wie die Spannung im Spalt durch einen kapazitiven Transmembranstrom aus [Abschnitt 2.2.4](#). Und das über einen endlichen Bereich A_{JS} mittlere Ensemble-Signal ist

$$\begin{aligned} \langle V_{JS}^{\text{ch}}(t) \rangle &= r_J \cdot \langle I_{JM}^{\text{ch}}(t) \rangle \cdot \iint_{A_{JS}} d\mathbf{x} \overline{JM}G(\mathbf{x}) / A_{JS} \\ &= r_J \overline{JS}G \cdot \alpha_N \langle I_M^{\text{ch}}(t) \rangle \end{aligned} \quad (2.24)$$

2.2.6 Konforme Abbildung und Schwarz-Christoffel-Transformation

Zur Lösung von [Gleichung 2.12](#) muss die Greensche Funktion für die jeweilige Adhäsionsfläche der Zelle gefunden werden, welche [Gleichung 2.13](#) erfüllt. Diese ist bekannt für einfache Geometrien wie einer Kreisfläche (siehe [Gleichung 2.15](#)) oder der oberen Halbebene $W_{\perp} = \left\{ w = (x, y)^T \mid u \in \mathbb{R} \wedge v \in \mathbb{R}_{\geq 0} \right\}$ mit

$$\begin{aligned} \nabla^2 G(\mathbf{w}, \mathbf{w}_G) &= -\delta(\mathbf{w} - \mathbf{w}_G) & \forall \mathbf{w}, \mathbf{w}_G \in W_{\perp} \\ G(\mathbf{w}, \mathbf{w}_G) &= 0 & \forall \mathbf{w} \in \partial W_{\perp} \end{aligned}$$

und

$$G_{\perp}(u, v, u_G, v_G) = -\frac{1}{4\pi} \cdot \ln \frac{(u - u_G)^2 + (v - v_G)^2}{(u - u_G)^2 + (v + v_G)^2} \quad (2.25)$$

Für allgemeine Geometrien kann die Greensche Funktion anhand konformer Transformationen berechnet werden, bei der die (Adhäsions-) Fläche in eine andere Fläche mit bekannter Greenscher Funktion transformiert wird. Also wird, wie oftmals in der Physik, die zweidimensionale Poisson-Gleichung mittels einer konformen Abbildung gelöst [Str10, Mos03, SJG09, BSMM00].

Dazu wird die zweidimensionale Ebene mit der Adhäsionsfläche A_{JM} als komplexe Ebene aufgefasst und die Koordinate $\mathbf{x} = \begin{pmatrix} x & y \end{pmatrix}^T$ als $z = x + iy$ mit $x, y \in \mathbb{R}$ geschrieben. Die konforme Abbildung ist dann eine Abbildung der z -Ebene in eine weitere komplexe Zahlenebene $w = u + iv$ mittels einer analytischen Funktion $w = f(z) = u(x, y) + iv(x, y)$ in allen Punkten für die $f'(z) \neq 0$ gilt. Dabei kann $f(z)$ so gewählt werden, dass die Adhäsionsfläche in der z -Ebene A_{JM} auf eine Fläche in der w -Ebene W_{G^*} abgebildet wird, für welche die Greensche Funktion bekannt ist. Hierfür bietet sich im Rahmen dieser Doktorarbeit (aus numerischen Gründen) die obere Halbebene W_{\perp} mit der Greenschen Funktion G_{\perp} aus Gleichung 2.25 an.

Die gesuchte Greensche Funktion für A_{JM} ist nun über

$$\begin{aligned} G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= G(x, y, x_G, y_G) \\ &= G_{\perp}(u(x, y), v(x, y), u(x_G, y_G), v(x_G, y_G)) \end{aligned} \quad (2.26)$$

gegeben (siehe Abschnitt A.4.2) und das Lösen von Gleichung 2.12 über

$$\begin{aligned} V_J(\mathbf{x}, t) &= r_J \iint_{A_{JM}} dx_G dy_G G(x, y, x_G, y_G) \cdot j(x_G, y_G, t, V_M) \\ &= r_J \iint_{A_{JM}} dx_G dy_G \\ &\quad G_{\perp}(u(x, y), v(x, y), u(x_G, y_G), v(x_G, y_G)) \\ &\quad \cdot j(x_G, y_G, t, V_M) \end{aligned}$$

auf das Finden einer konformen Abbildung reduziert.

Die Schwarz-Christoffel-Transformation bildet das Innere eines Polygons auf die obere Halbebene³ konform ab [BSMM00]. Damit kann durch Näherung der Zelladhäsionsfläche A_{JM} als Polygon die gesuchte Greensche Funktion gefunden werden.

³ Da konforme Abbildungen miteinander verkettet werden können, existieren auch Umsetzungen mit Abbildungen auf weitere „einfache“ Geometrien wie den Einheitskreis.

Dazu wurde zunächst aus einer DIC-Aufnahme der jeweiligen Zelle manuell die Adhäsionsfläche bestimmt. Von dieser berechnete ein Programm den Umriss als eine Kette von Punkten auf dem diskreten Raster des Bitmaps. Nach Vereinfachung dieser Punktkette [Sar93] suchte ein weiterer Algorithmus [RR95] ein Polygon mit einerseits einer möglichst geringen Anzahl von Ecken und andererseits guter Übereinstimmung mit der ursprünglichen Form von A_{JM} . Für dieses Polygon wurden mit der SC Toolbox [Dri96] die Parameter der nun konkreten Schwarz-Christoffel-Transformation bestimmt und die Abbildung $f(z) = u(x, y) + iv(x, y)$ berechnet. Darüber lieferte die (numerische) Integration über die Fläche der adhärenierten Membran mit

$$\overline{{}^{\text{JM}}G}(\mathbf{x}) = \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_G G_{\perp}(u(x, y), v(x, y), u(x_G, y_G), v(x_G, y_G)) / A_{JM}$$

$$\overline{{}^{\text{JM}}G^2}(\mathbf{x}) = \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_G G_{\perp}^2(u(x, y), v(x, y), u(x_G, y_G), v(x_G, y_G)) / A_{JM}$$

die gesuchten Skalierungsfaktoren der Kopplung und zweifache Mittelung über den Bereich $A_{JS} \subseteq A_{JM}$

$$\overline{{}^{\text{JS}}G} = \iint_{A_{JS}} d\mathbf{x} \iint_{A_{JS}} d\mathbf{x}_G G_{\perp}(u(x, y), v(x, y), u(x_G, y_G), v(x_G, y_G)) / A_{JS}^2$$

die für das thermische Rauschen maßgebliche Größe. Die weitere Mittelung ($\overline{{}^{\text{JM}}G}$ und $\overline{{}^{\text{JM}}G^2}$) der gemittelten Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten über A_{JS} wurde ebenfalls numerisch durchgeführt.

2.3 NICHTSTATIONÄRES RAUSCHEN IM ZELL-CHIP-KONTAKT

Im Folgenden wird eine der [Gleichung 2.9](#) entsprechende Beziehung für die extrazelluläre Spannung im Spalt V_j hergeleitet und von dieser auf die Eigenschaften der Ionenkanäle geschlossen. Dabei wird die Auswirkung verschiedener Modellierungen der Zell-Transistor-Kopplung studiert.

2.3.1 Erwartungswert und Varianz von V_J^{ch}

Für die Ensemble-Varianz der im Spalt durch Ionenkanäle hervorgerufenen, extrazellulären Spannungen folgt (analog zum Ensemble-Mittelwert aus [Abschnitt 2.2.5](#))

$$\begin{aligned}\sigma_{V_J^{ch}}^2(\mathbf{x}, t) &= \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_0 \frac{N_{JM}}{A_{JM}} \cdot \sigma_{V_J^1}^2(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0, t) \\ &= r_J^2 \cdot N_{JM} \sigma_{I_1^{ch}}^2(t) \cdot \iint_{A_{JM}} d\mathbf{x}_0 G^2(\mathbf{x}, \mathbf{x}_0) / A_{JM} \\ &= r_J^2 \overline{G^2}(\mathbf{x}) \cdot \sigma_{I_{JM}^{ch}}^2(t)\end{aligned}$$

mit voneinander unabhängigen und im Adhäsionsbereich homogen verteilten Ionenkanälen. Betrachtet man dabei einen endlichen Bereich A_{JS} so erhält man

$$\begin{aligned}\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(t) &= r_J^2 \cdot \sigma_{I_{JM}^{ch}}^2(t) \cdot \iint_{A_{JS}} d\mathbf{x} \overline{G^2}(\mathbf{x}) / A_{JS} \quad (2.27) \\ &= r_J^2 \overline{G^2} \cdot \alpha_N \sigma_{I_M^{ch}}^2(t)\end{aligned}$$

für die über diesen gemittelte Varianz.

Setzen wir jetzt [Gleichung 2.24](#) und [Gleichung 2.27](#) in [Gleichung 2.9](#) ein so folgt

$$\begin{aligned}\frac{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(t)}{r_J^2 \overline{G^2} \alpha_N} &= i_{ch} \cdot \frac{\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle}{r_J \overline{G} \alpha_N} - \frac{\left(\frac{\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle}{r_J \overline{G} \alpha_N} \right)^2}{N_M} \\ \sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(t) &= i_{ch} \cdot \underbrace{\frac{r_J^2 \overline{G^2} \alpha_N}{r_J \overline{G} \alpha_N}}_v \cdot \langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle - \underbrace{\frac{r_J^2 \overline{G^2} \alpha_N}{N_M \cdot \left(r_J \overline{G} \alpha_N \right)^2}}_{1/N_v} \cdot \langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle^2\end{aligned}$$

also

$$\begin{aligned}\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(\langle V_{JS}^{ch} \rangle) &= \langle V_{JS}^{ch} \rangle \cdot v - \langle V_{JS}^{ch} \rangle^2 / N_v \quad (2.28) \\ v &= i_{ch} r_J \cdot \overline{G^2} / \overline{G} \\ N_v &= \alpha_N N_M \cdot \overline{G}^2 / \overline{G^2}\end{aligned}$$

und damit der gesuchte Zusammenhang zwischen Ensemble-Mittelwert und -Varianz für die Spannung im Spalt.

2.3.2 Apparente Kanäle

Beim Zusammenhang von Mittelwert und Varianz ist zu beachten, dass N_v nur scheinbar eine Teilchenzahl ist. Tatsächlich ist es lediglich ein Parameter für den Zusammenhang zwischen $\langle V_{JS}^{ch} \rangle$ und $\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2$, der proportional zur Anzahl der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran und zu α_N ist. Der weitere Parameter v ist proportional zu i_{ch} und zum Schichtwiderstand r_J . Außerdem geht in N_v und v die Geometrie des Zell-Chip-Kontakts über die Kopplungsparameter d. h. über die Mittelung der Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten ein. Demnach sind nicht die tatsächlichen Ionenkanäle der Adhäsionsmembran sondern nur apparente d. h. formale Kanäle und deren Eigenschaften (Anzahl der apparenten Kanäle N_v und apparente Kanal-Spaltspannung v) direkt detektierbar.

2.3.3 Rückschluss auf zugrundeliegende Ionenkanäle

Bei bekannten Kopplungsparametern kann auf die realen Ionenkanäle geschlossen werden. Setzt man die apparenten Kanaleigenschaften mit den realen, zugrundeliegenden Einzelkanaleigenschaften ins Verhältnis, so folgt über [Gleichung 2.24](#) und [Gleichung 2.27](#):

$$\begin{aligned} \frac{v}{i_{ch}} &= r_J \overline{J_S^{JM}} G^2 / \overline{J_S^{JM}} G = \frac{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2 / \sigma_{I_M^{ch}}^2}{\langle V_{JS}^{ch} \rangle / \langle I_M^{ch} \rangle} \quad (2.29) \\ \frac{N_v}{N_M} &= \alpha_N \overline{J_S^{JM}}^{-2} / \overline{J_S^{JM}} G^2 = \frac{(\langle V_{JS}^{ch} \rangle / \langle I_M^{ch} \rangle)^2}{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2 / \sigma_{I_M^{ch}}^2} \end{aligned}$$

Formuliert man in Analogie zu [Gleichung 2.8](#) eine Offenwahrscheinlichkeit für die apparenten Kanäle, so erhält man

$$\begin{aligned} p^v(t) &= \frac{\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle}{v N_v} \\ &= \frac{\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle}{i_{ch} \frac{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(t) / \sigma_{I_M^{ch}}^2(t)}{\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle / \langle I_M^{ch}(t) \rangle} \cdot N_M \frac{(\langle V_{JS}^{ch}(t) \rangle / \langle I_M^{ch}(t) \rangle)^2}{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2(t) / \sigma_{I_M^{ch}}^2(t)}} \\ &= \frac{\langle I_M^{ch}(t) \rangle}{i_{ch} N_M} \\ &= p(t) \end{aligned}$$

Die Offenwahrscheinlichkeit der apparenten Kanäle ist also identisch mit der Offenwahrscheinlichkeit der realen Ionenkanäle.

2.3.4 Punktkontaktmodell

Das Punktkontaktmodell [FMW93] liefert eine vereinfachte Beschreibung der Zell-Chip-Kopplung. Bei diesem gehen die flächen-spezifischen Größen des Flächenkontaktmodells in integrierte Größen über, sodass keine Ortsabhängigkeit mehr auftritt und die partielle Differentialgleichung 2.11 einer einfachen Differentialgleichung entspricht.

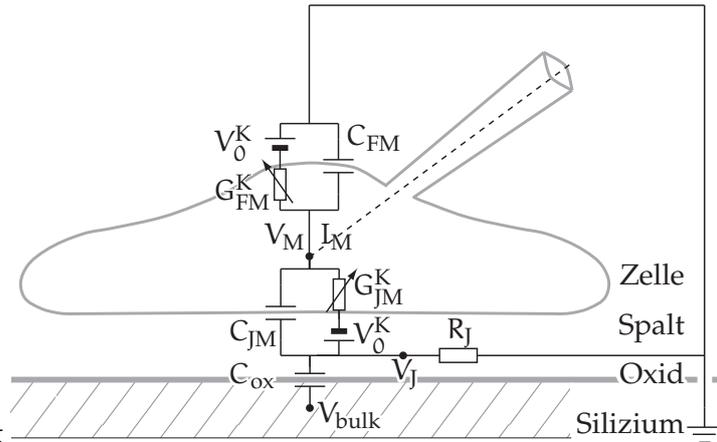


Abbildung 2.7 – Schematische Darstellung des Punktkontaktmodells mit Ersatzschaltbild.

In **Abbildung 2.7** ist eine auf dem Chip adhäririerte Zelle skizziert deren Membranfläche A_M sich in die freie Membran A_{FM} und die adhäririerte Membran A_{JM} unterteilt. Entsprechend setzt sich der Membranstrom aus den Anteilen über die freie und adhäririerte Membran zusammen $I_M = I_{FM} + I_{JM}$. Die Transmembranspannung wird mit V_M bezeichnet, die Spannung im Spalt mit V_J , das Umkehrpotential für Kaliumionen mit V_0^K und die konstante Bulk-Spannung mit V_{Bulk} . Im Ersatzschaltbild stellt $C_{JM} = c_M A_{JM}$ die Kapazität der adhäririerten Membran und $C_{ox} = c_{ox} A_{JM}$ die Kapazität der Oxidschicht des Chips dar. Schließlich ist die Kaliumleitfähigkeit durch $G_{JM}^K = g_{JM}^K A_{JM}$ gegeben und für die freie Membran gilt analog $G_{FM}^K = g_{FM}^K A_{FM}$ sowie $C_{FM} = c_M A_{FM}$. Aus den Kirchhoffschen Regeln folgt

$$V_J / R_J = (V_M - V_0^K - V_J) \cdot G_{JM}^K (V_M, V_J) + C_{JM} \partial_t V_M - C_{JM} \partial_t V_J - C_{ox} \partial_t V_J$$

für die Strombilanz im Spalt und damit das Gegenstück mit konzentrierten Elementen zur **Gleichung 2.11**. Die gleichen Vereinfachungen wie in **Abschnitt 2.2.1** (vernachlässigbare Spaltzeitkonstante, kein Einfluss von V_J auf die Ionenkanäle und deren Ströme) liefern mit $(V_M - V_0^K) \cdot G_{JM}^K (V_M) = I_{JM}^{ch} = \alpha_N I_M^{ch}$ die durch Ionenkanäle hervorgerufene, extrazelluläre Spannung im Spalt

$$V_J^{ch}(t) = R_J \cdot \alpha_N I_M^{ch}(t) \quad .$$

Der Vergleich mit **Gleichung 2.24** zeigt, dass $R_J = r_{JJS} \overline{G_{PCM}^{JM}}$ entspricht. Da das Punktkontaktmodell zu einem einfachen Widerstand vereinfacht wurde, gilt

$$\sigma_{V_{JJS}^{ch}}^2(t) = R_J^2 \cdot \alpha_N \sigma_{I_M^{ch}}^2(t)$$

für die Ensemble-Varianz der im Spalt durch Ionenkanäle hervorgerufenen, extrazellulären Spannungen und aus dem Vergleich mit [Gleichung 2.27](#) folgt $R_J^2 = r_J^{2JM} G_{PCM}^2$.

Also ist

$$\overline{r_J^{2JM} G_{PCM}^2} = \overline{r_J^{2JM} G_{PCM}^2}^2$$

und die apparenten Kanäle würden gemäß [Gleichung 2.29](#) den realen Ionenkanälen in der adhären Membran gleichgesetzt. Im Unterschied zum im Anschluss behandelten Flächenkontaktmodell ist das Verhältnis ihrer Anzahlen unabhängig zum Ort der Detektion und es gilt $N_v = \alpha_N^{PCM} N_M$. Bei der analytischen Lösung des Flächenkontaktmodells für eine Kreisfläche und Detektion im Zentrum (s. u. und [Abschnitt 2.2.2](#)) gilt hingegen $N_v = \frac{\alpha_N}{2} N_M$. Also ist das Verhältnis der Kanalzahl der adhären zur gesamten Membran beim Punktkontaktmodell um den Faktor 2 kleiner. Dies führt zu mit den Messungen unvereinbar kleinen Adhäsionsflächen in [Abschnitt 5.3](#). Also kann das Punktkontaktmodell aufgrund der Vernachlässigung der räumlichen Ausdehnung das nichtstationäre Rauschen im Spalt durch Ionenkanäle nicht korrekt beschreiben.

2.3.5 Flächenkontaktmodell mit kreisförmiger Adhäsionsfläche

Die Greensche Funktion für das Flächenkontaktmodell ist bei einer als Kreis genäherten Zelle bekannt und kann analytisch gemittelt werden (siehe [Abschnitt 2.2.2](#)).

[Abbildung 2.8](#) veranschaulicht die Mittelung der Greenschen Funktion sowie ihrer Quadrierten und die auftretenden Proportionalitätsfaktoren (noch vor Mittelung über eine Detektionsfläche A_{JS}) für eine kreisförmige Adhäsionsfläche mit Radius a_J (siehe auch [Abschnitt 2.2.2](#)): bei Detektion im Zentrum $a = 0$ sind die Verhältnisse $v/i_{ch} = r_J/2\pi$ sowie $N_v/N_M = \alpha_N/2$ und bei Detektion am Rand $a \rightarrow a_J$ streben beide gegen 0. Also sind die auftretenden Verhältnisse vom Ort der Detektion abhängig und bei einer gleichbleibenden Anzahl $\alpha_N N_M$ von Ionenkanälen in der adhären Membran wird eine vom Detektionsort abhängige Anzahl apparter Kanäle N_v gemessen.

2.3.6 Flächenkontaktmodell mit Polygon

Bei Näherung der adhären Membran als Polygon kann die Greensche Funktion G und ihre Quadrierte G^2 gemäß [Abschnitt 2.2.6](#) integriert bzw. gemittelt werden. Diese so berechneten ortsabhängigen $\overline{MG}(x)$ und $\overline{MG^2}(x)$ sind für eine exemplarische Adhäsionsfläche A_{JM} in [Abbildung 2.9c&d](#) visualisiert. Zum Vergleich zeigen [a&b](#) die Mittelung der Greenschen Funkti-

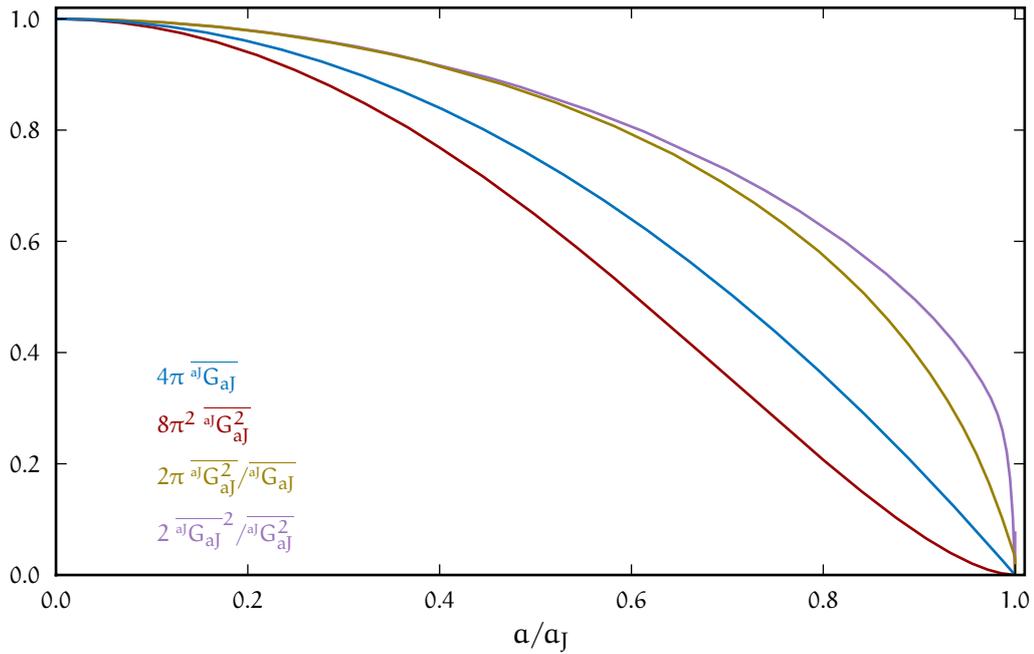


Abbildung 2.8: Ortsabhängigkeit der über einen Kreis gemittelten Greenschen Funktion $\overline{a_J G_{aJ}}$ sowie ihrer Quadrierten $\overline{a_J G_{aJ}^2}$ und weiterer daraus abgeleiteter Größen, welche die Verhältnisse von apparerter zur realen Kanalzahl bzw. von apparerter Kanal-Spaltspannung zum Einzelkanalstrom beschreiben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Kurven durch ihren Maximalwert dividiert.

on $\overline{a_J G_{aJ}}(\mathbf{x})$ und ihrer Quadrierten $\overline{a_J G_{aJ}^2}(\mathbf{x})$ für die Näherung von A_{JM} durch eine Kreisfläche. Die Näherung als Kreis kann hier die längliche Form der Zelle nicht erfassen und es treten 2 Effekte auf, die umso stärker ausgeprägt sind je stärker die Form vom Kreis abweicht. Zum einen hat im Zentrum $\overline{a_J G_{aJ}}$ immer ihren Maximalwert $1/4\pi$ und $\overline{a_J G_{aJ}^2}$ den Wert $1/8\pi^2$ während die Maximalwerte von $\overline{a_J G_{aJ}}$ und $\overline{a_J G_{aJ}^2}$ geringer sind. Zum zweiten ist die genäherte Kreisfläche kleiner als die Polygonfläche. Die Wahl einer größeren Kreisfläche würde zwar einen größeren Bereich der Adhäsionsfläche erfassen, jedoch die Überhöhung im Zentrum noch stärker gewichten.

Kreisposition und Radius minimieren $(\overline{a_J G_{aJ}} - \overline{a_J G_{aJ}})^2$ auf A_{JM} .

Mit der eingezeichneten, quadratischen Detektionsfläche ergeben sich beim Kreis die Verhältnisse $v/i_{ch} = r_J \cdot 0,14$ sowie $N_v/N_M = \alpha_N \cdot 0,43$ und beim Polygon die Verhältnisse $v/i_{ch} = r_J \cdot 0,14$ sowie $N_v/N_M = \alpha_N \cdot 0,29$. Demnach liefern beide Näherungen bei gemessenen i_{ch} und v gleiche Werte für den Schichtwiderstand r_J , aber die Näherung als Polygon postuliert ein größeres Verhältnis der Kanalzahl der adhärirten zur gesamten Membran α_N .

Die Ortsabhängigkeit von v/i_{ch} und N_v/N_M für die beiden Näherungen (als Kreis bzw. Polygon) verdeutlicht [Abbildung 2.10](#). Die dargestellten Werte entsprechen der in [Abbildung 2.9](#) ein-

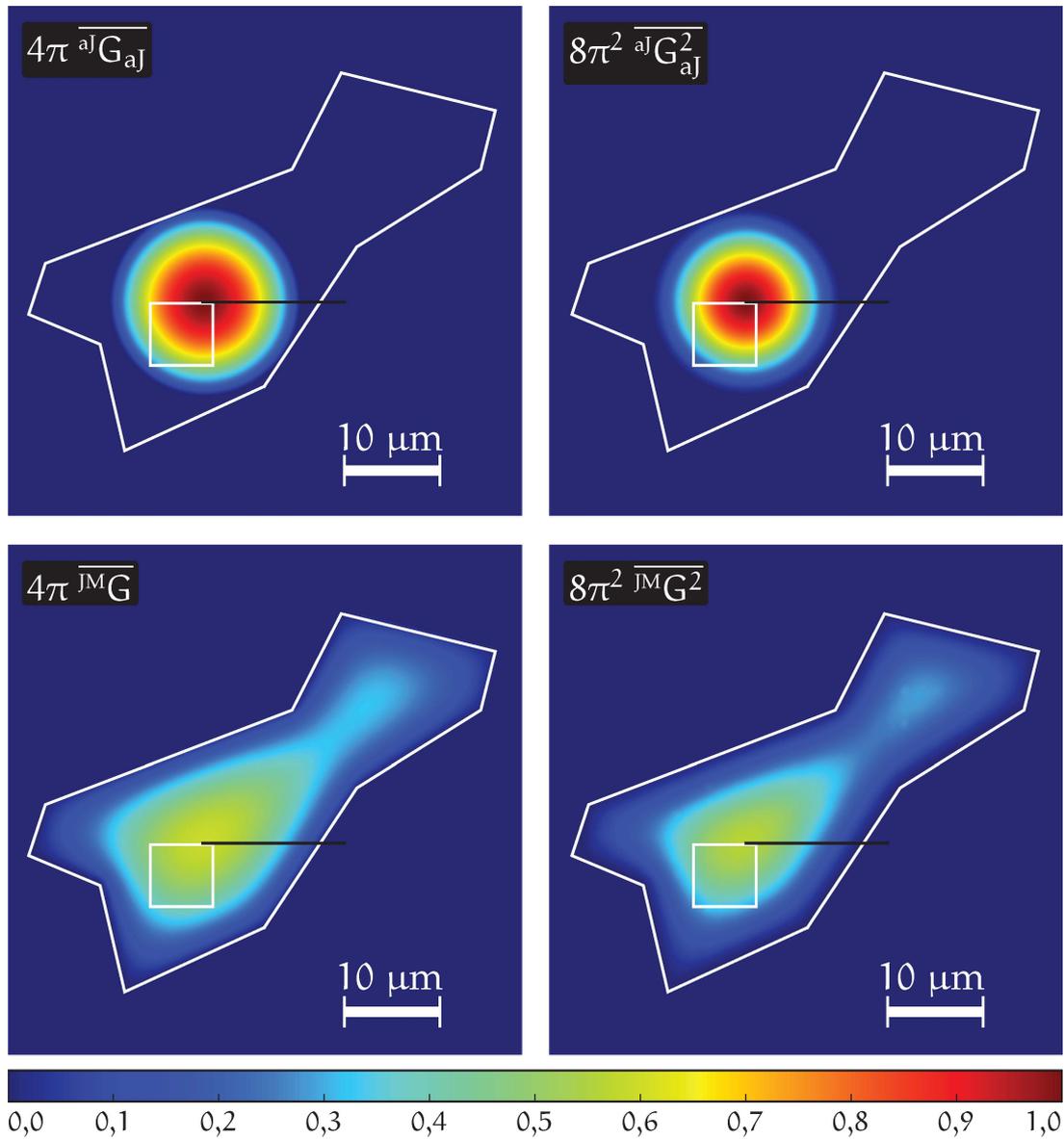


Abbildung 2.9: Mittelung der jeweiligen Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten über Kreis und Polygon. Die Greensche Funktion auf einem Polygon und ihre Quadrierte wurden über dieses gemittelt und die sich ergebenden, ortsabhängigen Werte farbcodiert dargestellt, $\overline{\mathcal{J}^M G}(\mathbf{x})$ und $\overline{\mathcal{J}^M G^2}(\mathbf{x})$. Ebenso wurden die Greensche Funktion auf einem Kreis und ihre Quadrierte, $\overline{\mathcal{J}^M G}(\mathbf{x})$ und $\overline{\mathcal{J}^M G^2}(\mathbf{x})$, über einen Kreis gemittelt, der so gewählt wurde, dass $(\overline{\mathcal{J}^M G} - \overline{\mathcal{J}^M G_{aj}})^2$ auf der Polygonfläche minimal ist. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Werte auf den Maximalwert von $\overline{\mathcal{J}^M G_{aj}}$ bzw. $\overline{\mathcal{J}^M G_{aj}^2}$ normiert.

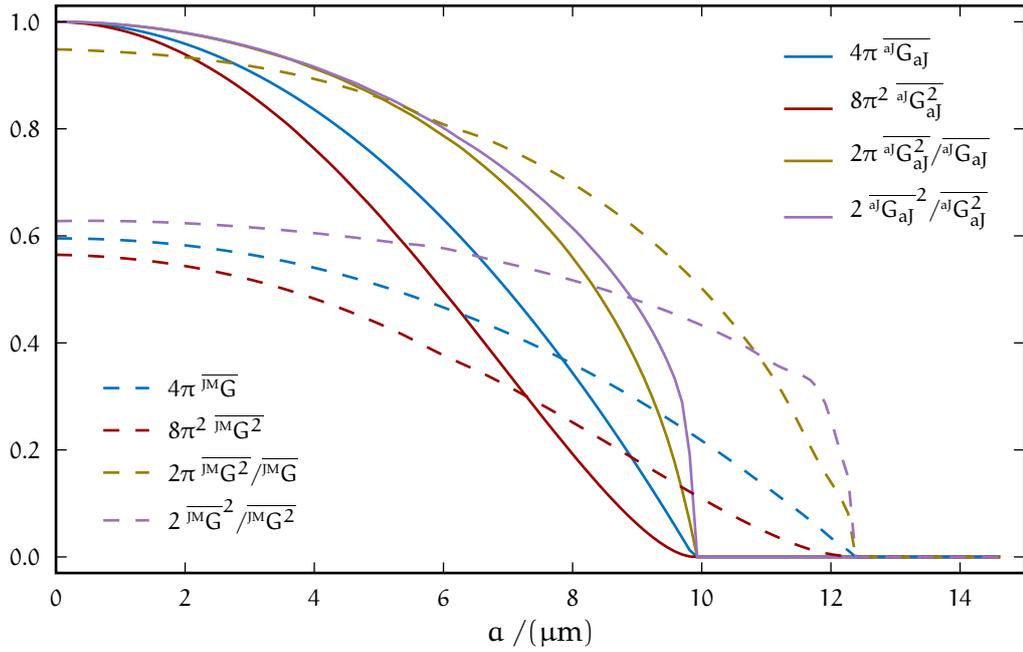


Abbildung 2.10: Ortsabhängigkeit der Verhältnisse von apparterer zur realen Kanalzahl bzw. von apparterer Kanal-Spaltspannung zum Einzelkanalstrom zum Einzelkanalstrom für eine als Polygon ($\overline{J^M G^2} / \overline{J^M G^2}$ bzw. $\overline{J^M G^2} / \overline{J^M G}$) oder als Kreis ($\overline{a^J G_{aj}^2} / \overline{a^J G_{aj}^2}$ bzw. $\overline{a^J G_{aj}^2} / \overline{a^J G_{aj}}$) genäherte Zelle. Dabei ist a der Abstand vom Kreismittelpunkt entlang der horizontalen Linie aus [Abbildung 2.9](#). Zusätzlich sind die zugehörigen, gemittelten Greenschen Funktionen und ihre Quadrierten dargestellt.

gezeichneten, vom Kreismittelpunkt ausgehenden, horizontalen Linie. Wie oben diskutiert decken $\overline{J^M G}$ sowie $\overline{J^M G^2}$ eine größere Fläche (bzw. hier Strecke) als $\overline{a^J G_{aj}}$ sowie $\overline{a^J G_{aj}^2}$ ab und nehmen dabei kleinere Werte an. So ist v/i_{ch} im Zentrum von vergleichbarer Größe, nimmt jedoch beim Kreis zum Rand hin deutlich schneller ab. Bei N_v/N_M sind die Unterschiede über den gesamten Bereich größer, wodurch auch die über die Näherungen berechneten α_N stärker voneinander abweichen.

Da die Näherung der Zelle als Polygon deren Geometrie genauer modelliert und bei Näherung als Kreis Abweichungen auftreten, wird in der vorliegenden Arbeit die Adhäsionsfläche der Zelle A_{JM} als Polygon beschrieben.

Dieses Kapitel beinhaltet die verwendeten Chips und Zellen, erläutert die Patch-Clamp Technik, stellt die Apparatur vor und schließt mit der Schilderung des Messablaufs, den Auswertungsmethoden sowie der Varianzanalyse ab.

3.1 EOSFETS UND CHIPS

Als Spannungssonde für die Spaltspannung V_j im Adhäsionsbereich von Zelle und Chip dienen EOSFETs. Die in der vorliegenden Dissertation eingesetzten, besonders rauscharmen buried channel EOSFETs (bc EOSFETs) wurden in [Voe06] hergestellt und charakterisiert.

Hier wird zunächst der Aufbau und die Funktionsweise skizziert. Daraufhin wird auf die Modifikation der Chips mittels einer TiO_2 -Beschichtung eingegangen, welche die vorliegenden Messungen erst möglich machte. Schließlich werden die so modifizierten Chips charakterisiert und die Wahl des Arbeitspunkts begründet.

3.1.1 Funktionsweise und Aufbau

Abbildung 3.1 skizziert den Aufbau eines p-Kanal EOSFETs. Im Unterschied zu MOSFETs ist das Gate nicht metallisiert sondern von einem Elektrolyt bedeckt. Dabei ist der gesamte Chip durch eine Oxidschicht vom Elektrolyt isoliert [FOVW91, WF97, Fro03]. Auf dem retrograd n-dotierten Silizium-Substrat (Bulk) befinden sich die stark p-dotierten Bereiche für Source und Drain. Zwischen diesen liegt der schwächer p-dotierte Kanal. Der EOSFET besitzt einen Source-, Drain- und Bulkanschluss, um die zugehörige Spannung V_s , V_d und V_b bzw. die Spannungen $V_{ds} = V_d - V_s$ und $V_{bs} = V_b - V_s$ direkt

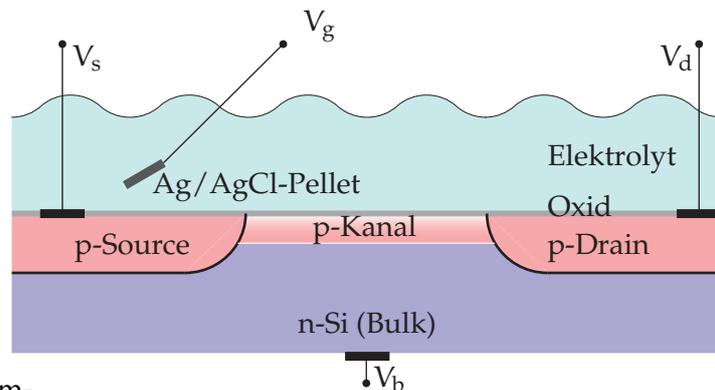


Abbildung 3.1 – Querschnittszeichnung eines bc EOSFETs. Der Chip wird von einem Elektrolyt bedeckt und der Strom durch den Kanal zwischen Source und Drain über das lokale Potential am Gate gesteuert.

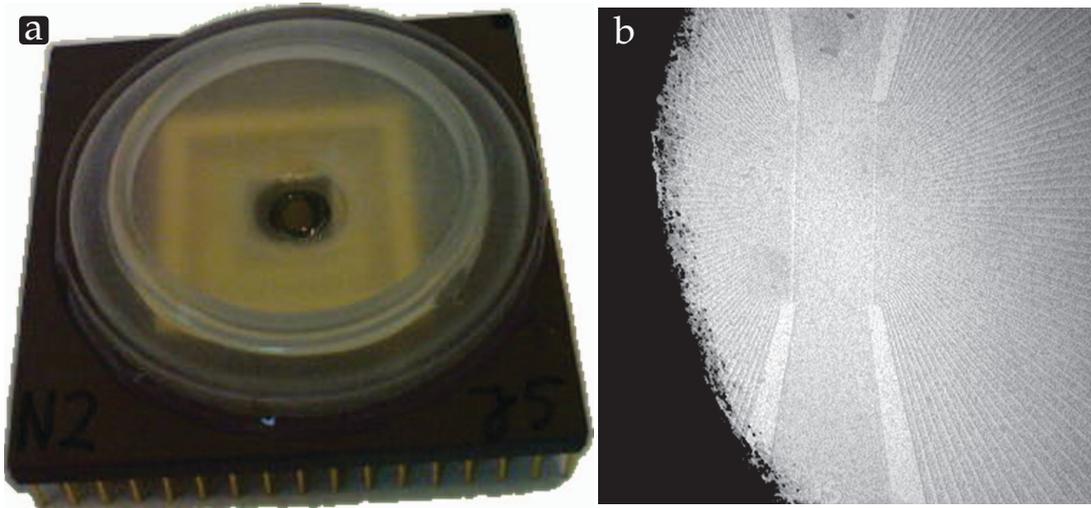


Abbildung 3.2: (a) Fertiggerüsteter Chip mit Keramikpackage und Kulturkammer für bis zu 2,5 mL Lösung. (b) Nahaufnahme eines Chips. Vom großen, mittigen Bereich, der gemeinsamen Sourcezuleitung, zweigen nach links und rechts die einzelnen Drainzuleitungen ab. Die beiden Spalten dazwischen sind die einzelnen Gates. Am linken Rand ist die Verklebung mit der Kulturkammer zu erkennen.

vorzugeben. Der Gateanschluss ist nicht wie beim Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor (MOSFET) metallisch ausgeführt [Pie90], sondern erfolgt über den Elektrolyt und eine Silber/Silberchlorid-Elektrode, über welche dann $V_{gs} = V_g - V_s$ kontrolliert werden kann. Durch das lokale Potential am Gate wird die Ladungsträgerdichte im Kanal und somit dessen Widerstand bzw. der Drainstrom I_d zwischen Source und Drain moduliert.

Eine Besonderheit der verwendeten bc EOSFETs ist, dass sich das Maximum der Ladungsträgerdichte am gewählten Arbeitspunkt nicht an der Silizium-Siliziumdioxid-Grenzfläche sondern etwas weiter (20 nm) unterhalb befindet – der Kanal ist vergraben (engl. buried) [WG99]. Da der Ladungstransport somit von den Störstellen an der Grenzschicht entfernt stattfindet, sind die bc EOSFETs besonders rauscharm [HSW76, Wat85, CM87].

Der gesamte Chip besteht, wie in [Abbildung 3.2](#) gezeigt, aus 128 einzelnen Transistoren, die in 2 Spalten (links und rechts mit je 64 EOSFETs) aufgeteilt sind und eine gezeichnete Gategröße ($W \times L$) von $6 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ bzw. effektiv, aufgrund von isotroper Ätzung sowie Streuung bei der Implantation, $6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$ haben [Voe06]. Zwischen beiden Spalten befindet sich die gemeinsame Sourcezuleitung (common source) und nach außen verlaufen die einzelnen Drainzuleitungen.

Dieser Chip wurde, wie in [Abschnitt A.1.1](#) beschrieben, auf ein Keramikpackage geklebt und mit einer Kulturkammer versehen.

3.1.2 Titandioxid-Beschichtung

EOSFETs mit SiO₂-Oberfläche zeigen ein langsames, chemisches Signal bei Änderung der Kaliumkonzentration [BF05]. Dieses kann durch ein spezielles Reinigungsprotokoll [PF09] beseitigt werden, welches jedoch aufwändig war und zudem nicht immer zu einem „schnellen“ Signal führte.

Eine weitere Möglichkeit ist das Verwenden einer hochohmigen Elektrolytlösung [Bri04], wodurch zudem V_J aufgrund des größeren Schichtwiderstand erhöht wird. Neben der Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses werden dann jedoch auch die Ionenkanäle im Spalt beeinflusst, sodass die Näherung aus Abschnitt 2.2.1 zu hinterfragen ist und sich die theoretische Behandlung erschwert.

Andererseits konnte aus Vorexperimenten und den Erfahrung von Kollegen, die mit einem CMOS-Neurochip [EJH⁺03] arbeiten [Zei09], darauf geschlossen werden, dass eine TiO₂-Beschichtung ebenfalls die langsame, chemische Signalkomponente verhindert. Daher wurde diese Option verfolgt, deren einzelnen Prozessierungsschritte in Abschnitt A.1.2 aufgeführt sind.

Letztlich konnten spätere Messungen in Abschnitt 4.4 die Annahme des schnellen Signals bestätigen.

3.1.3 Kennlinie

Die Kennlinie eines EOSFETs gibt die Abhängigkeit des Drainstroms I_d von Parametern an. Für diese Arbeit wird I_d in Abhängigkeit von der Drain-Source- und Gate-Source-Spannung vereinfacht durch

$$I_d(V_{ds}, V_{gs}) = \underbrace{\mu c_{ox} \frac{W}{L}}_K \cdot \begin{cases} 0 & \text{Sperrbereich: } V_{gs} \leq V_t \\ (V_{gs} - V_t) \cdot V_{ds} - V_{ds}^2/2 & \text{Triodenbereich: } V_{gs} > V_t, V_{ds} < V_{gs} - V_t \\ (V_{gs} - V_t)^2/2 & \text{Sättigungsbereich: } V_{gs} > V_t, V_{ds} \geq V_{gs} - V_t \end{cases}$$

modelliert [WG99]. Der Verstärkungsfaktor K fasst dabei die Beweglichkeit der Ladungsträger μ , die spezifische Kapazität des Gateoxids c_{ox} und die Kanalgeometrie d. h. dessen Breite W und Länge L zusammen. Als weiterer Parameter tritt die Schwellenspannung V_t auf. Zusammen mit der Gate-Source-Spannung V_{gs} bedingt diese die Anreicherung (oder Abreicherung) von Ladungsträgern im Kanal. Ist V_{gs} kleiner als V_t so kann kein Strom

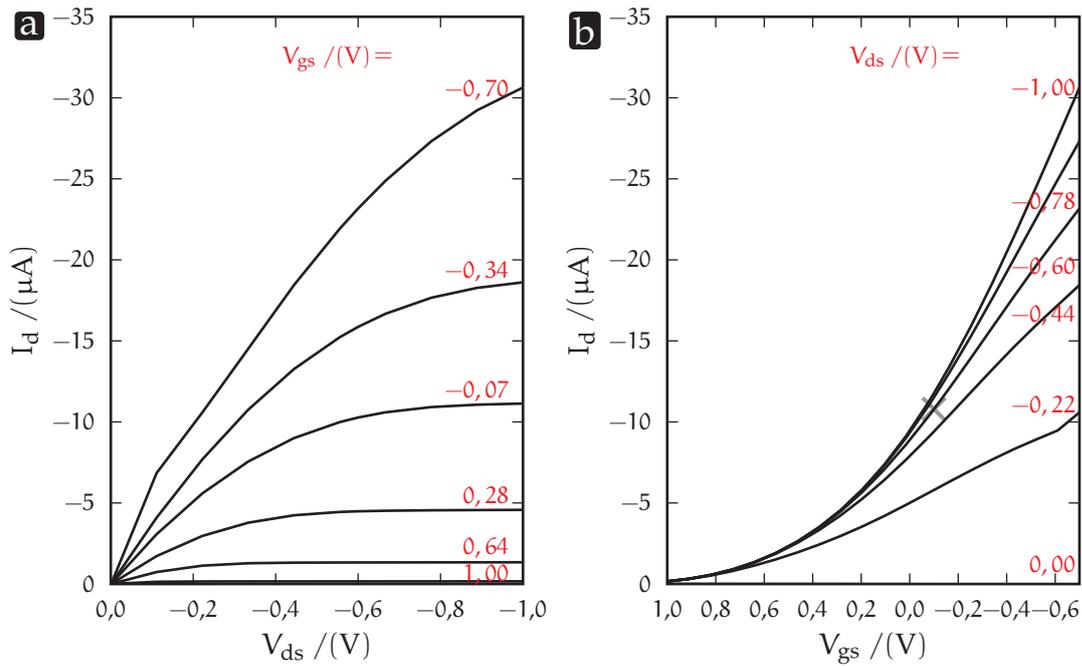


Abbildung 3.3: Kennlinie eines p-Kanal bc EOsFETs. Für die Messung von $I_d(V_{ds}, V_{gs})$ wurde V_{ds} in 9 Schritten von $-1,0\text{ V}$ bis $0,0\text{ V}$ und V_{gs} in 19 Schritten von $-0,7\text{ V}$ bis $1,0\text{ V}$ variiert und zusätzlich $V_{ds} = -0,6\text{ V}$ bzw. $V_{gs} = -0,1\text{ V}$ verwendet. In (a) ist die Abhängigkeit des Drainstroms von V_{ds} für ausgewählte Werte von V_{gs} dargestellt. Entsprechend zeigt (b) den Zusammenhang von I_d mit V_{gs} .

durch den Kanal fließen – der Transistor befindet sich im Sperrbereich. Gilt $V_{gs} > V_t$ so kann Strom fließen und dieser wird nun im Triodenbereich mit $V_{ds} < V_{gs} - V_t$ zusätzlich durch die Drain-Source-Spannung V_{ds} beeinflusst. Wird V_{ds} jedoch erhöht, so gelangt man bei $V_{ds} \geq V_{gs} - V_t$ in den Sättigungsbereich, in welchem der Drainstrom I_d wiederum nur von V_{gs} (und V_t) quadratisch abhängt.

Abbildung 3.3 zeigt das gemessene Kennlinienfeld eines exemplarischen bc EOsFETs (mit $V_{bs} = 0$ und ohne Lichteinstrahlung, wie in dieser gesamten Arbeit). Als Elektrolyt wurde ECM verwendet und dieser mit einer Ag/AgCl-Elektrode kontaktiert. Sowohl der Übergang vom Trioden- zum Sättigungsbereich als auch das Sperren sind zu erkennen.

3.1.4 Arbeitspunkt und Kalibrierung

In dieser Arbeit (und in vielen weiteren MOSFET-Anwendungen) ist das Kleinsignalverhalten wichtig. Dieses beschreibt die Änderung des Drainstroms I_d in Abhängigkeit einer kleinen Änderung von Drain-Source-Spannung V_{ds} oder Gate-Source-Spannung V_{gs} . Den Ausgangszustand stellt dabei der Arbeitspunkt dar d. h. der Punkt auf dem Kennlinienfeld $I_{d,0} = I_d(V_{ds,0}, V_{gs,0})$, um den herum die kleine Änderung von V_{ds} oder V_{gs} stattfindet.

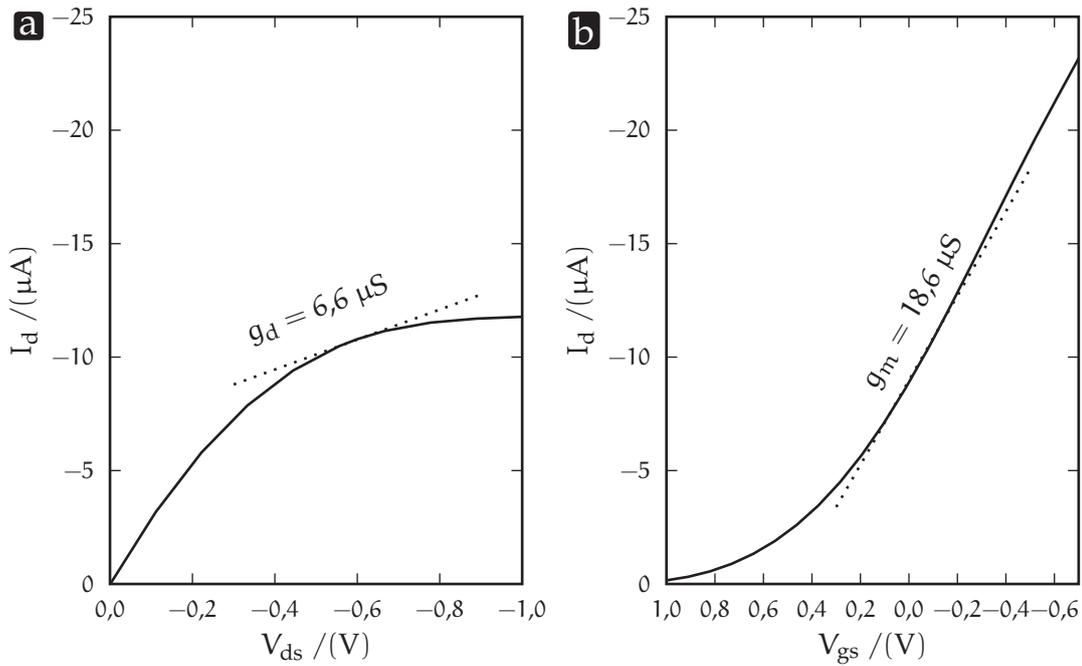


Abbildung 3.4: Drainleitwert (a) und Steilheit (b) am Arbeitspunkt ($V_{gs} = -0,1 \text{ V}$, $V_{ds} = -0,6 \text{ V}$) als linearer Fit an die Kennlinie bei fester Gate-Source- bzw. Drain-Source-Spannung.

Wie aus [Abbildung 3.4](#) ersichtlich ist, kann das lokale Verhalten von $I_d(V_{ds}, V_{gs})$ in linearer Näherung beschrieben werden. Dazu führt man die partiellen Ableitungen Drainleitwert

$$g_d = \left. \frac{\partial I_d}{\partial V_{ds}} \right|_{V_{gs}}$$

und Steilheit

$$g_m = \left. \frac{\partial I_d}{\partial V_{gs}} \right|_{V_{ds}}$$

ein. Somit gilt

$$I_d = I_{d,0} + g_d \cdot \Delta V_{ds} + g_m \cdot \Delta V_{gs} + \mathcal{O}^2 \quad (3.1)$$

für das Kleinsignalverhalten des Drainstroms. Umgekehrt kann folglich aus einer Änderung des Drainstroms auf eine Änderung von V_{ds} oder V_{gs} geschlossen werden.

Für diese Doktorarbeit hat sich der Arbeitspunkt

$$V_{ds} = -0,6 \text{ V}$$

$$V_{gs} = -0,1 \text{ V}$$

bewährt. Zunächst liegt er in der Nähe der Sättigung und somit ist der Drainstrom unempfindlicher gegen Schwankungen der Drain-Source-Spannung. Aber vor allem ist dort das in [Abschnitt A.1.3](#) erläuterte, niederfrequente Rauschen aus [Abbildung 3.5](#) und somit die Störung für die Messung i. A. am geringsten.

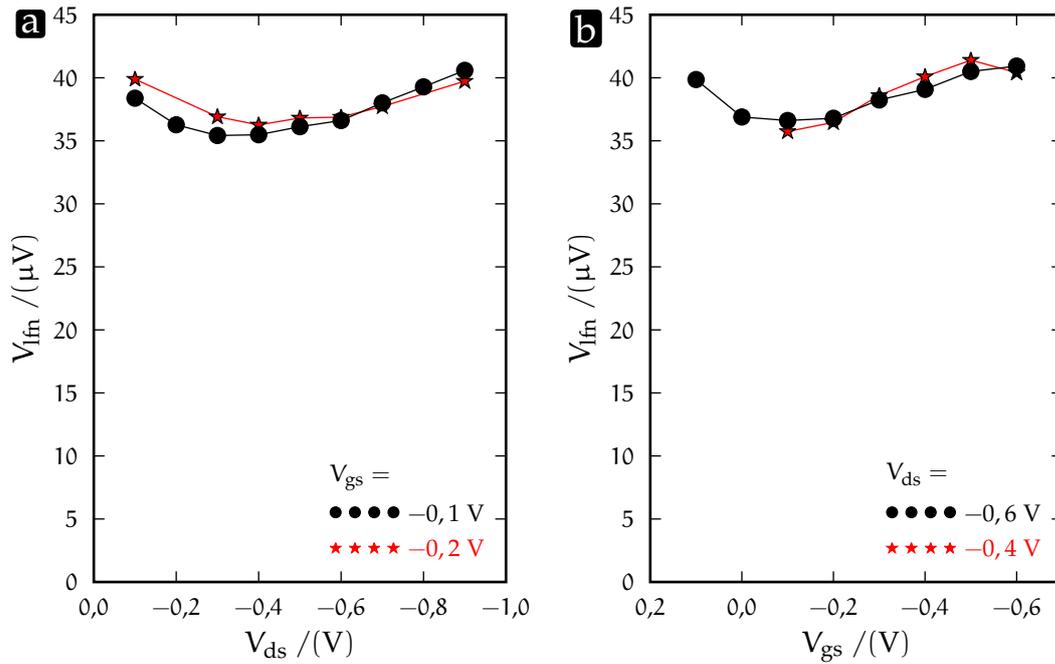


Abbildung 3.5: Abhängigkeit des niederfrequenten Rauschens V_{Ifn} von (a) der Drain-Source-Spannung und (b) der Gate-Source-Spannung. In beiden Fällen ist ein Minimum erkennbar und für V_{gs} ist dies auf den Betrieb als buried channel EOSFET zu erklären.

3.2 IONENKANAL UND ZELLEN

Im Folgenden wird der verwendete Ionenkanal sowie die mit diesem transfizierte, stabile Zelllinie beleuchtet und im Anschluss die Zellkultur in Kulturschälchen sowie auf Chips beschrieben.

3.2.1 Ionenkanal Shaker B $\Delta 6-46 T_{449V}$

Zur Detektion des Transistorsignals von Ionenkanälen über nicht-stationäres Rauschen wurde eine Variante des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Shaker B (siehe [Abschnitt A.2.2](#)) ausgewählt. Dieser ist ausführlich untersucht, gut über whole-cell Voltage Clamp (siehe [Abschnitt 3.3](#)) steuerbar, hat ein bekanntes (Signal-) Verhalten und konnte zudem in den verwendeten Zellen ausreichend exprimiert werden. Seine Einzelkanalleitfähigkeit γ_{ch} beträgt etwa 13 pS [[ITL⁺88](#), [MY90](#), [HM93](#), [SVSH03](#)], womit sich im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Einzelkanalstrom von 1 pA ergibt; und entsprechend eine apparente Kanal-Spaltspannung von 1 μV zu erwarten ist. Folglich verdeckt das niederfrequente Rauschen $V_{Ifn} \approx 40 \mu V$ das Signal eines einzelnen Ionenkanals, das erst über die Rauschanalyse aufgelöst werden kann.

Bei dem hier verwendeten Shaker B $\Delta 6-46 T_{449V}$ wurde außerdem, wie in [Abschnitt A.2.2](#) beschrieben, sowohl die schnelle N-Typ Inaktivierung durch die Deletion der Aminosäuren 6-46,

als auch die langsame C-Typ Inaktivierung durch die Punktmutation von Threonin zu Valin an der Stelle 449 entfernt [LHHA93]. Somit ändern sich, wie in [Abschnitt 2.1.3](#) gefordert, seine statistischen Eigenschaften nicht und er zeigt ein günstiges Signalverhalten für die Analyse des nichtstationären Rauschens [SVSH03].

3.2.2 *tsA201 Zellen und stabile Zelllinie*

Die verwendeten *tsA201* Zellen (siehe [Abschnitt A.2.1](#)) wurden aus Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) Zellen gewonnen und ermöglichen eine erhöhte Expression von rekombinanten Proteinen [CHS⁺87, CV92, See95]. Aufgrund der einfachen Handhabung, dem adhären Wuchs und der geringen Anzahl endogener Ionenkanäle [ZZXJ98, YK98, JSCW02, ASF04] sind HEK293 Zellen [SE62, ZH67] für die vorliegende Arbeit gut geeignet. Ihre spezifische Membrankapazität wurde in [GSC00] zu $1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bestimmt.

Die in [Abschnitt A.2.5](#) dargelegte, stabile Transfektion der *tsA201* Zellen mit dem Ionenkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V erfolgte über Calcium-Phosphat-Präzipitation [Mö3]. Die *tsA201* Zellen bewirkten dabei eine ausreichende Expression des Kaliumkanals, die bei whole-cell Voltage Clamp Messungen mit Depolarisation auf 40 mV einem mittleren Transmembranstrom von 8 nA entsprach (siehe [Abschnitt 4.3](#)). Über die Auswahl eines geeigneten Klons konnte schließlich eine stabile Zelllinie für die weiteren Messungen etabliert werden.

3.2.3 *Zellkultur*

Alle für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Als Nährmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose (DMEM) mit 2 mM L-Glutamin und 10 %_(v/v) fötalem Kälberserum (FKS) verwendet – ohne Zusatz von Antibiotika für die ursprünglichen *tsA201* Zellen. Für die stabile Zelllinie des ausgewählten Klons mit Kaliumkanal wurden zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks und damit der Expression dem Nährmedium 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin B zugegeben.

Die Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen von 70 % bis 80 % Konfluenz wurden die Zellen in neue Kulturschalen passagiert. Hierzu wurde das alte Nährmedium abpipettiert, einmal mit calcium- & magnesiumfreiem Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) gespült und dann 2 mL davon für 4 min hinzugegeben. Anschließend konnten die HEK293 *tsA201* Zellen mit einer Pipette leicht in Suspension gebracht werden. Nach dem Abzentrifugieren (2 min bei 1800 rpm d. h. 264 g_n) wurde das Pellet nun mit DMEM resus-

pendiert und die Zellen im Verhältnis von 1:4 bis 1:8 auf die neuen Kulturschalen aufgeteilt. Somit konnte flexibel auf variierendes Wachstum oder Bedarf an Zellen reagiert werden. Bei der stabilen Zelllinie wurde zusätzlich im Verhältnis 1:10 sowie 1:20 gesplittet und so ein zu dichtes Zusammenwachsen vermieden, sodass sich diese, wie für die spätere Kultivierung der Zellen auf Chips erforderlich, gut vereinzeln ließen.

3.2.4 Zellkultur auf Chips

Die Reinigung der Chips sowie die Kultivierung der Zellen darauf, hat Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften, die Adhäsion und die Patchbarkeit der Zellen. Diese für die Messung wichtigen Schritte werden im Folgenden erläutert.

Reinigung

Zu Beginn wurde das restliche Wasser, mit dem die Kulturkammern zur Lagerung befüllt waren, entfernt; und nun jeweils etwa 3 mL, 80 °C heiße 5 % Tickopur R36 Lösung in die Kulturkammern der Chips gegeben. Nach kurzem Anwärmen der Chips wurde diese nochmals abgeschüttet, wieder aufgefüllt und so eine definierte Reinigungslösung sichergestellt. Darauf konnten Verschmutzungen wie z. B. Zellreste von vorangegangenen Messungen mechanisch durch Reiben der Chip- und Kulturkammeroberfläche mit Reinraum-Stäbchen beseitigt werden. Anschließend wurden die Chips mit Reinstwasser abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Nach weiterer 3-maliger Wiederholung dieses Arbeitsschritts spülten so insgesamt etwa 1 L Reinstwasser über jeden Chip. Diese scheinbar enorme Wassermenge im Vergleich zur Größe der Kammer war notwendig, da sich bei Verringerung dieser eine schlechtere Adhäsion und Patchbarkeit der Zellen zeigte.

Beschichtung

Die Sterilisation erfolgte mit 70 % Ethanol für 20 Minuten. Ein längeres Einwirken zum Verhindern von Bakterienwachstum war aufgrund der kurzen Kulturdauer nicht erforderlich. Daraufhin wurde das Ethanol abgesaugt und 4 mal mit je 2 mL (und 37 °C warmen) D-PBS gespült. Abschließend wurden je 1,5 mL D-PBS zusammen mit 12 µg/mL Fibronektin in die Kulturkammern gegeben und die Chips in 100 mm-Kulturschalen für 2 Stunden in den Inkubator (bei 37 °C und 5 % CO₂) gestellt.

Aufbringen der Zellen

Von den vor 1 bis 3 Tagen passagierten, stabil transfizierten Zellen wurde ein Schälchen gewählt, in welchem die Zelldichte noch so gering war, dass die Zellen in eng benachbarten „Sternchen“ wuchsen und an keiner Stelle ein größerer „Rasen“ vorhanden war. Das Schälchen wurde 2 mal mit 2 mL calcium- & magnesiumfreien D-PBS und 2 mal mit C5789 gewaschen. Daraufhin wurde 1 mL C5789 in das Zellkulturschälchen gegeben und dieses für 15 min zurück in den Inkubator gestellt.

Inzwischen erfolgte die Vorbereitung der beschichteten Chips durch Abpipettieren der Fibronectinlösung, 1-maligem Spülen mit 2 mL D-PBS, 2-maligen Spülen mit je 2 mL FKS- & antibiotikafreier Nährlösung und Lagerung der final mit 0,5 mL Nährlösung bedeckten Chips im Inkubator.

Nach Ablauf der 15 Minuten wurden die Zellen mit dem im Schälchen vorhandenen C5789 in Suspension gebracht bis diese einen leicht silbrigen Glanz hatte. Daraufhin wurde 1 mL Nährlösung zugegeben, nochmals mit der Pipette die Suspension durchmischt und im Mikroskop kontrolliert ob sich alle Zellen voneinander gelöst hatten (und ggf. nochmals vereinzelt).

Von der Suspension wurde 1 mL in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen gegeben und (in Abhängigkeit der Zelldichte im Ausgangsschälchen) mit weiteren 8 mL bis 14 mL Nährlösung verdünnt. Durch Pipettieren von je 1,5 mL auf die Chips ergab sich damit ein Aufteilungsverhältnis von 1:12 bis 1:20.

Nach mindestens 90 Minuten im Inkubator waren die Zellen ausreichend adhäriert und die Messungen konnten innerhalb der nächsten 10 Stunden durchgeführt werden.

3.3 PATCH-CLAMP TECHNIK

Mit der Patch-Clamp Technik [NS76, HMN+81, HM88, Sig86, SN95, BBW95] wird in der vorliegenden Doktorarbeit die Membranspannung der Zelle vorgegeben und (simultan zur FET-Messung) der dabei fließende Membranstrom gemessen. Hier wird zunächst das Prinzip erläutert und darauf die theoretische Beschreibung dargelegt. Für Details der experimentellen Umsetzung wird auf [Abschnitt A.3](#) verwiesen.

3.3.1 *Prinzip*

Die zu untersuchende Zelle befindet sich in einer mit extrazellulärer Lösung (ECM) gefüllten Mess- bzw. Kulturkammer. Dort hinein taucht die Bad-Elektrode und gibt so ein definiertes Potential vor. Zudem wird eine Glaspipette mit intrazellulärer Lösung (ICM) befüllt und in einem Elektrodenhalter befestigt.

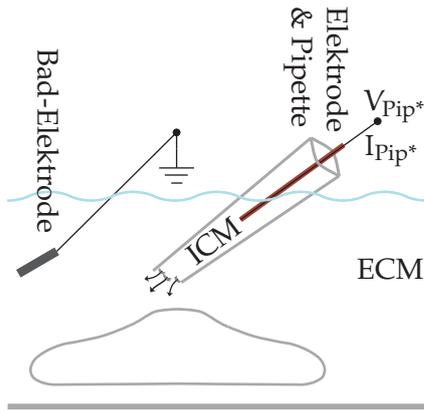


Abbildung 3.6 – Zelle, Pipette und Elektroden

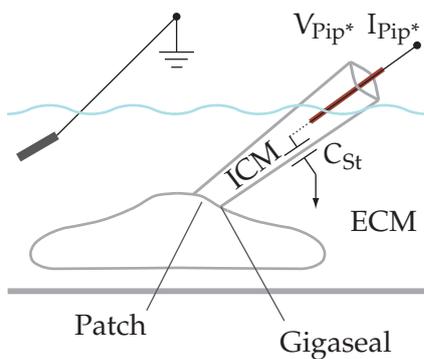


Abbildung 3.7 – Cell-attached Konfiguration

Dieser kontaktiert zum einen elektrisch die Pipette bzw. ICM und ermöglicht zum anderen eine Regulation des Innendrucks der Pipette. Mit leicht erhöhtem Innendruck der Patch-Pipette d.h. ausströmender Lösung wird diese nahe an die Zelle herangefahren.

Nach Ablassen des Pipettendrucks und meist leichtem Saugen bildet sich der sog. Gigaseal. Dabei versiegeln sich Glaspipette und Zellmembran derart, dass sowohl der Widerstand zwischen Inneren und Äußerem der Pipette nun im Gigaohm-Bereich liegt als auch die mechanische Stabilität sehr hoch ist. Der zugrundeliegende Mechanismus und die Reaktionen der Zelle sind noch nicht vollständig geklärt; es existieren jedoch zahlreiche Modelle [MC90, OW94b, OW94a, RSS91, SS90].

Die damit erreichte cell-attached Konfiguration bildet den Ausgangspunkt für weitere Konfigurationen. So ist der Patch im Inneren der Pipette nun von der Umgebung durch den Gigaseal isoliert und es können (bei vorhandenen Ionenkanälen und geeignetem Messaufbau) Einzelkanalströme gemessen werden. Außerdem kann die Streukapazität C_{St} bestimmt und abgeglichen werden.

Für diese Arbeit war jedoch die whole-cell Konfiguration – also ein (elektrischer) Zugang zur gesamten Zelle – erforderlich. Für den Durchbruch in das Zellinnere wird der Membranausschnitt in der Patch-Pipette meist durch Saugen zerrissen. Dann sind Zellinneres und Pipette direkt miteinander verbunden. Dadurch kann zum einen der gewünschten Ionenstrom für den elektrische Kontakt fließen aber auch sämtliche weiteren Bestandteile der Zelle, die durch die Pipettenöffnung passen.

Durch den elektrischen Kontakt sind zwei Arten der Messung möglich:

CURRENT-CLAMP man gibt einen gewünschten Pipettenstrom I_{Pip} vor und misst die dazu nötige Spannung V_{Pip}

VOLTAGE-CLAMP man gibt eine gewünschte Pipettenspannung V_{Pip} vor und misst den dazu nötigen Strom I_{Pip}

In der vorliegenden Arbeit ist letzteres die bessere Option.

3.3.2 whole-cell Voltage Clamp

In dieser Arbeit wurde die gesamte Zelle mit einer einzelnen Elektrode kontaktiert und so eine fixe Spannung vorgegeben – ein Single-Electrode-Voltage-Clamp in whole-cell Konfiguration oder kurz whole-cell Voltage Clamp.

Das grundlegende Ersatzschaltbild zeigt [Abbildung 3.8](#). Vereinfachend ist der Übergang vom Bad-Potential der ECM über die Bad-Elektrode auf Masse unterdrückt; ebenso die Streukapazität, da diese vollständig abgeglichen sein soll. Anstatt der tatsächlich an der Pipette anliegenden Spannung V_{Pip^*} und dem zugehörigen Strom I_{Pip^*} werden hier die Größen V_{Pip° und I_{Pip° verwendet wie sie nach dem Abgleich der Streukapazität effektiv auftreten. Im Ersatzschaltbild stellt sich die Zelle zum einen als Kapazität C_M dar und zum anderen über die Ionenkanäle und die Leckleitfähigkeit G_M^0 der Zellmembran als veränderlicher Widerstand. Dabei können alle Ionenkanäle einer Sorte s als eine Leitfähigkeit G_M^s in Serie mit einer (Umkehr-) Spannung V_0^s gemäß [Abschnitt 2.1](#) und [Abschnitt 2.2.1](#) aufgefasst werden.

An die Elektrode der Glaspipette wird die Spannung V_{Pip° angelegt und der dazu erforderliche Strom I_{Pip° gemessen. Über den Zugangswiderstand R_A der Pipette lädt sich die HEK293 Zelle um, wobei diese in guter Näherung als ein einziges Kompartiment mit überall gleicher Transmembranspannung V_M betrachtet wird. Daraus folgt mit dem kapazitiven Strom $C_M \dot{V}_M$, dem Membranleckstrom $G_M^0 V_M$ und der Summe über die Ströme aller Ionenkanalsorten für den Membranstrom $I_M = C_M \dot{V}_M + G_M^0 V_M + \sum_s G_M^s \cdot (V_M - V_0^s)$. Da nach [Abschnitt 3.2](#) die hier eingesetzten tsA201 Zellen nur wenige endogene Ionenkanäle haben und für die Leckleitfähigkeit G_M^0 gegenüber dem Leckwiderstand R_L des Seals $G_M^0 \ll R_L^{-1}$ gilt, werden nur die rekombinanten Kaliumkanäle für das Weitere betrachtet und außerdem $G_M^0 = 0S$ gesetzt. Also ist $I_M^{ch} = G_M^K \cdot (V_M - V_0^K) = \sum_{n=1}^{N_M} i_{ch}$ der Kaliumstrom durch die Zellmembran bzw. durch die endogenen N_M Kaliumkanäle mit Einzelkanalströmen i_{ch} und es gilt $I_M \approx C_M \dot{V}_M + I_M^{ch}$ im Rahmen dieser Doktorarbeit.

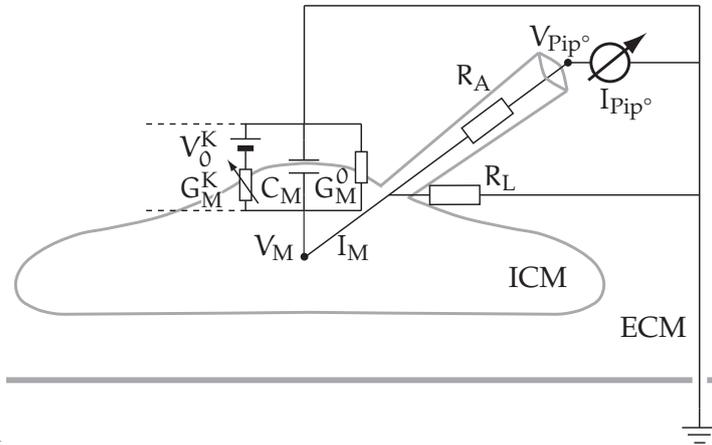


Abbildung 3.8 – Ersatzschaltbild der durch Patch-Clamp Technik kontaktierten Zelle

Es zeigt sich, dass der whole-cell Voltage Clamp grundsätzlich fehlerbehaftet ist. Denn für die messbaren Signale der Ionenkanäle stellt C_M zusammen mit dem Zugangswiderstand R_A einen RC-Tiefpass mit Grenzfrequenz $1/(2\pi R_A C_M)$ dar und entsprechend verzögert das RC-Glied das schnelle Umladen der Zelle. Zudem fällt die Transmembranspannung auf $V_M = V_{\text{Pip}^\circ} - I_{\text{Pip}^\circ} R_A$ ab und es gilt $I_M = I_{\text{Pip}^\circ} - V_M/R_L$ für die Beziehung zwischen gemessenem Strom I_{Pip° und Transmembranstrom I_M . Demzufolge wird die Zelle nicht auf V_{Pip° geklemmt und der gemessene Pipettenstrom I_{Pip° entspricht nicht dem Transmembranstrom I_M .

Bei geschlossenen Kanälen treten nur passive Eigenschaften des Systems zutage und aus obigen Betrachtungen folgt mit $I_M = i\omega C_M V_M$

$$\begin{aligned} Z_{\text{Pip}^\circ}(\omega) &= \frac{V_{\text{Pip}^\circ}}{I_{\text{Pip}^\circ}} \\ &= R_A + \frac{R_L}{1 + i\omega R_L C_M} \\ |Z_{\text{Pip}^\circ}(\omega)| &= \sqrt{R_A^2 + \frac{R_L^2 + 2R_A R_L}{1 + \omega^2 R_L^2 C_M^2}} \end{aligned} \quad (3.2)$$

für die Impedanz. Umgekehrt kann aus der Impedanz auf die passiven Eigenschaften der Zelle geschlossen werden (siehe auch [Abschnitt 4.4](#)).

Bei bekannten passiven Eigenschaften lassen sich o. g. Fehler korrigieren. Zunächst kann mittels Kapazitätskompensation der kapazitive Strom über einen weiteren, nicht zum Messkreis gehörenden Schaltkreis eingespeist werden und damit sowohl dieser entlastet als auch die kapazitiven Transienten aus der Messung entfernt werden. Über „Supercharging“ kann so außerdem das Umladen der Zelle beschleunigt werden [AC87]. Zudem kann über eine positive Feedback-Schleife V_{Pip° proportional zu I_{Pip° erhöht werden und der Spannungsabfall über den Zugangswiderstand R_A teilweise kompensiert werden [SN95, 120ff] – die Serienwiderstandskompensation. Diese Korrekturmechanismen können intern im Patch-Clamp-Verstärker durchgeführt werden, der einerseits aus der gewünschten, extern angelegten Pipettenspannung V_{Pip} ein internes V_{Pip° berechnet und andererseits aus dem intern gemessenen I_{Pip° den korrigierten Pipettenstrom I_{Pip} ermittelt und ausgibt.

Da das System bei zu hohem Feedback instabil wird und zu oszillieren beginnt, ist diese Kompensation nicht vollständig d. h. der erwartete Spannungsabfall kann nicht zu 100 % korrigiert werden. Im Falle eines gegenüber der Zeitkonstante $R_A C_M$ stationären Pipettenstroms gilt

$$V_M \approx V_{\text{Pip}} - (1 - c) \cdot R_A I_{\text{Pip}} \quad (3.3)$$

In [SSC99] wird die Verwendung eines Schätzers für den Membranzustand diskutiert, um diese Einschränkungen zu umgehen.

bei Korrektur des Zugangswiderstands um den Faktor $c < 1$.

p/4-Protokoll

Auch mit den genannten Korrekturmechanismen bleiben bei einem Spannungssprung kapazitive Transienten meist bestehen und zudem ist im Pipettenstrom der Leckstrom noch enthalten.

Beides lässt sich beseitigen, indem man die passive Antwort des Systems auf einen entsprechend skalierten Spannungspuls bestimmt und diese vom eigentlichen Signal abzieht [AB77]. Dabei muss darauf geachtet werden, dass es sich tatsächlich um die rein-passive Antwort handelt und keine Ionenkanäle aktiviert werden. Beim $p/4$ -Protokoll verwendet man daher 4 auf je $-\frac{1}{4}$ skalierte Pulse, sodass deren Addition genau die passive Antwort des eigentlichen Spannungspulses ist.

Das Spannungsklemmen von V_M wird durch dieses Vorgehen jedoch nicht verbessert, sodass nur eine gute Kompensation sicherstellt, dass V_M weitgehend V_{Pip} entspricht. Zudem verschlechtert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor $\sqrt{1 + N/m}$ bei m zusätzlichen Pulsen mit einer jeweiligen Höhe von einem N -tel der Messamplitude [SN95, 76ff]. Allerdings kann mit dieser Korrektur gut von I_{Pip} auf den Strom durch die Ionenkanäle – hier also die rekombinanten Kaliumkanäle – I_M^{ch} geschlossen werden.

3.4 APPARATUR

In diesem Abschnitt wird die Apparatur als Ganzes vorgestellt. Dazu wird zunächst der physische Aufbau und dann die Steuerung sowie Datenerfassung veranschaulicht. Zuletzt wird auf die Einzelheiten der Messung von extrazellulären Strömen mit dem EOSFET eingegangen.

In der Summe ermöglichte dieser Messaufbau das Bestimmen der FET-Kennlinien, Aufnahmen der Zellen mittels Digital-Kamera und Differential Interference Contrast (DIC), das Durchführen der Patch-Clamp Technik mit diversen Protokollen für die whole-cell Konfiguration bei simultaner Messung mit dem EOSFET und schließlich Rausch-, Wechselspannungs- und Varianzmessungen.

3.4.1 *Aufbau*

Zum Überblick zeigt [Abbildung 3.9](#) ein Foto des Messaufbaus. Dort ist rechts der Computer zu erkennen. Weiter mittig befindet sich der Patch-Clamp-Verstärker und darauf die externe, batteriebetriebene AD/DA-Wandlerkarte, welche per USB mit dem Computer verbunden ist. So wurden Störsignale durch den Computer, die bei internen Wandlerkarten auftreten können, und

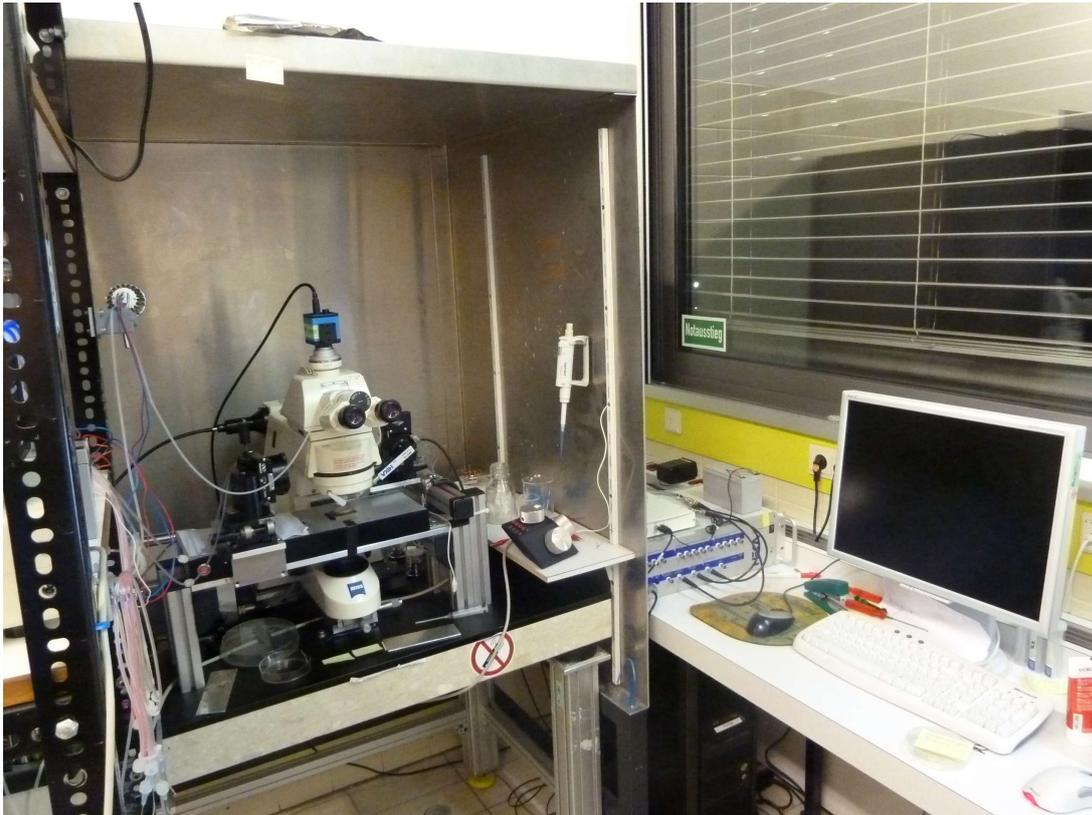


Abbildung 3.9: Foto des Messaufbaus

Die Headstage stellt die erste Verstärkungs- und Regelungsstufe der kleinen Zell-Signale (Nano-Ampere-Bereich) dar.

Masseschleifen an dieser Stelle vermieden. Im Metallkasten auf der linken Seite ist ein schwingungsgedämpfter Tisch mit Marmorplatte frei stehend aufgebaut und auf diesem das Mikroskop mit Kamera montiert. Mittig unterhalb des Objektivs sitzt der Chip mit Kulturkammer auf dem zugehörigen FET-Verstärker. In die Kulturkammer hinein ragt die in der Headstage mit dem Elektrodenhalter eingespannte Glaspipette. Der hinter der Headstage angebrachte Mikromanipulator ermöglicht eine submikrometergenaue Positionierung der Pipette. Über einen am Elektrodenhalter angebrachten Schlauch kann der Innendruck der Patch-Pipette reguliert werden.

3.4.2 Steuerung und Datenerfassung

Schematisch ist der Messaufbau in [Abbildung 3.10](#) dargestellt. Ein handelsüblicher PC dient sowohl als Steuerzentrale als auch zur Datenerfassung. So wurde eine große Flexibilität durch Software-Implementation ermöglicht und einzelne Messvorgänge konnten weitgehend automatisiert werden. Die Steuerung und Konfiguration des FET-Verstärkers und des Patch-Clamp-Verstärkers erfolgt über USB bzw. Glasfaserkabel. Die analogen Ausgangssignale des FET-Verstärkers und der Pipettenstrom I_{Pip} werden mit

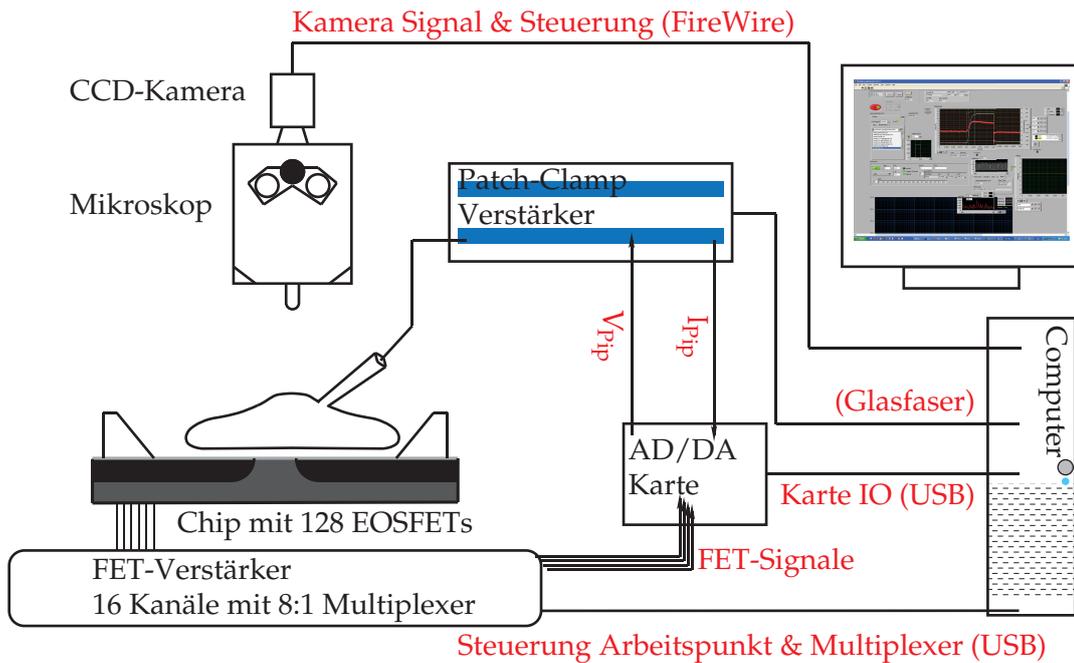


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Messaufbaus

einer NI USB-6259 AD/DA-Karte digitalisiert. Zudem liefert diese die gewünschte Pipettenspannung V_{Pip} an den Patch-Clamp-Verstärker.

Die Ansteuerung erfolgte dabei über ein selbst entwickeltes Messprogramm bzw. bei der Digital-Kamera über eine Hersteller-Software. Lediglich Mikroskop, Mikroskoplicht, Mikromanipulator und die Druckregulation der Pipette mussten manuell bedient werden.

Die Funktionen der selbst programmierten LabVIEW-Software untergliederten sich in 4 Bereiche: 1. Konfiguration der Geräte, 2. synchrone Ein- und Ausgabe über die AD/DA-Wandlerkarte, 3. Darstellung von Messprotokollen, Daten sowie Geräte-Parametern und 4. Speichern derselben.

Beim FET-Verstärker (siehe [Abschnitt 3.4.3](#)) wurde zur Konfiguration der EOSFET kalibriert (siehe [Abschnitt 3.4.4](#)) und ein Modus für das Ausgangssignal gewählt. Beim Patch-Clamp-Verstärker konnten neben der Wahl der (Tiefpass-) Filter für Ein- und Ausgangssignal (20 μ s und 10 kHz Bessel) 1. der Offset-Abgleich 2. der Abgleich der Streukapazität und Pipettenparameter in der cell-attached Konfiguration 3. der Abgleich der Zell-Parameter in der whole-cell Konfiguration und 4. das Einstellen der Kompensationsmechanismen durchgeführt werden. Der Nutzbereich der Wandlerkarte von ± 10 V bei 16 bit-Auflösung wurde durch entsprechende Wahl von Verstärkungsfaktoren bei Ein- und Ausgangssignalen weitgehend ausgereizt. Die Samplingrate von 400 kHz wurde nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem [[Nyq28a](#),

Der eigentliche Messprozess lief komplett computergesteuert ab.

[Sha49] gewählt, um Aliasing-Effekte zu vermeiden. Die Signale des Patch-Clamp-Verstärkers waren bereits entsprechend tiefpassgefiltert und der FET-Verstärker hatte eine Bandbreite von etwa 100 kHz [Voe06].

Das Kernstück der Software war das Ausführen der diversen (Mess-) Protokolle aus [Abschnitt 3.5](#) mittels synchroner Ein- und Ausgabe über die AD/DA-Wandlerkarte. Synchrones Double-Buffering und Triggern der Aufzeichnung der Signale von FET- und Patch-Clamp-Verstärker auf die Ausgabe der Pipettenspannung stellte sicher, dass zwischen Ein- und Ausgabe kein zeitlicher Versatz oder Unterbrechungen auftraten.

Zwischen den Einzelschritten der Messprotokolle – also den einzelnen „Pulsen“ bzw. Iterationen – oder in Pausen innerhalb einer „kombinierten“ Iteration wurden die Geräte-Parameter erfasst. Zudem wurden nach jedem Puls die gemessenen Signale ($I_{\text{Pip}}(t)$ und $V_{\text{FET}}(t)$) grafisch dargestellt. Als weitere, sehr wichtige Kontrolle diente das über einen passenden Zeitraum des jeweiligen Pulses gemittelte Verhältnis von $I_{\text{Pip}}/V_{\text{Pip}}$. Aus dem zeitlichen Verlauf konnte so auf die Stabilität der whole-cell Konfiguration oder aber auf die Veränderung des Systems geschlossen werden (siehe u. a. [Abschnitt 3.5.5](#) und [Abschnitt A.3](#)).

Sämtliche Messdaten und Parameter wurden kontinuierlich auf Festplatte gespeichert, sodass später die Messung vollständig nachvollzogen werden konnte.

3.4.3 FET-Verstärker

Der FET-Verstärker ermöglichte das gleichzeitige Erfassen von bis zu 16 Transistoren d. h. je 8 auf der linken und rechten Seite. Für den 1. Kanal wählte dazu ein 8:1-Multiplexer eine Drainzuleitung der Transistoren 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57 aus. Entsprechend konnte für die weiteren Kanäle 2-8 der linken Seite jeweils einer der Transistoren $k + 8 \cdot m$ mit der Kanalnummer k und $m = 0 \dots 7$ ausgewählt werden. Diese Beschaltung ermöglichte an benachbarten EOSFETs gleichzeitig zu messen. Die Kanäle 9-16 auf der rechten Seite folgten ebenfalls diesem Multiplexing – offensichtlich mit $(k - 8) + 8 \cdot m$.

Jeweils ein rauscharmer Strom-Spannungs-Wandler mit 100 k Ω Feedback-Widerstand übersetzte die so ausgewählten 16 Drainströme in ein Spannungssignal und hielt die Drainspannung V_d auf dem über einen D/A-Wandler eingestellten Wert. Für das Ausgangssignal bot der FET-Verstärker folgende Modi an: zum einen den „id-Modus“, der das Signal direkt auf den Ausgangskanal legte; und zum anderen die Modi „100x“, „1000x“ und „1000x-10kHz“, bei welchen das Signal mit einer Grenzfrequenz von etwa 0,5 Hz hochpassgefiltert und dann 100-fach oder 1000-fach verstärkt (und ggf. noch mit 10 kHz tiefpassgefiltert) wurde.

Ungefiltert erreichte der FET-Verstärker eine Bandbreite von etwa 100 kHz [Voe06].

Die Werte der Sourcespannung V_s , der Bulkspannung V_b sowie der linken und rechten Drainspannungen $V_{d,l}$ und $V_{d,r}$ (diese waren prinzipiell einzeln ansteuerbar) konnten über D/A-Wandler eingestellt werden. Dabei ermöglichte einerseits der „fast-Modus“ das schnelle Setzen/Ändern von Spannungen und andererseits der „slow-Modus“ über ein zusätzliches RC-Glied die Stabilisierung der Spannungen und somit eine höhere Rauscharmut.

Sowohl das Multiplexing als auch die Ansteuerung der D/A-Wandler erfolgte über USB.

3.4.4 Messung mit dem EOSFET

Während in [Abschnitt 2.2.1](#) bereits die Theorie zum Flächenkontaktmodell des Zell-Chip-Kontakts ausgeführt wurde, soll nun erläutert werden wie über einen EOSFET die Spaltspannung V_j gemessen werden kann. Das Messprinzip ist in [Abbildung 3.11](#) dargestellt. Die kapazitiven Ströme und die aus den Kaliumkanälen ausströmenden Ionen verursachen gemäß [Gleichung 2.14](#) eine Spannung V_j im Spalt, welche der EOSFET detektiert. Dabei wird das Gate als eine überall gleich-sensitive Fläche A_{FET} angenommen und somit effektiv der räumliche Mittelwert

Zur Erläuterung werden zunächst nur die rekombinanten Kaliumkanäle betrachtet.

$$V_{FET} = \iint_{A_{FET}} dx V_j(\mathbf{x}) / A_{FET} \tag{3.4}$$

von V_j bestimmt.

Dies entspricht der in [Abschnitt 2.2.2](#) angesprochenen 2. Mittelung der Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten über eine Fläche A_{JS} . Also wurden $\overline{I_{FET}^{JM}}$, $\overline{I_{FET}^{JM}G^2}$ und $\overline{I_{FET}^{FET}G}$ wie in [Abschnitt 2.2.6](#) beschrieben mit einer Mittelung von $\overline{I_{FET}^{JM}G(\mathbf{x})}$, $\overline{I_{FET}^{JM}G^2(\mathbf{x})}$ und $\overline{I_{FET}^{FET}G(\mathbf{x})}$ über A_{FET} berechnet.

Im Experiment wurde dazu zunächst ein Transistor ausgewählt, der sich möglichst mittig unter der Zelle befand, bzw. umgekehrt Zellen ausgewählt, unter denen sich entsprechend ein Transistor befand. Anschließend musste

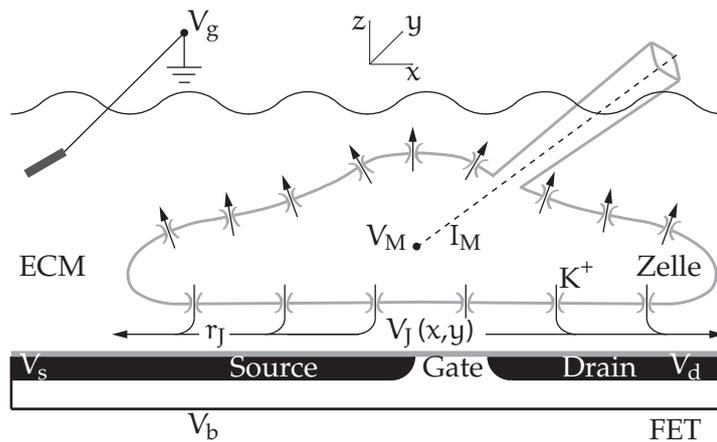


Abbildung 3.11 – Messen der Spaltspannung V_j mit EOSFET

Die Kalibrierung war für die Elektro-physiologie/den Patch-Clamp-Verstärker unproblematisch und konnte somit später erneut durchgeführt werden, da zwar V_d und V_s (und V_b) aber nicht V_g variiert wurde.

Hier hat g_d nur zur Kontrolle gedient.

dieser kalibriert werden, um vom an sich gemessenen Drainstrom I_d auf die Spaltspannung schließen zu können. Wichtig hierbei war, dass $V_j = 0$ galt d.h. die Ionenkanäle geschlossen waren, um die Kalibrierung nicht zu verfälschen. Ein Öffnen der Kaliumkanäle verhinderte dabei entweder das Ruhepotential der Zelle oder im Falle der whole-cell Konfiguration das Haltepotential von -60 mV.

Nach Schalten des FET-Verstärkers in den „fast id-Modus“ wurden der Drainleitwert g_d und die Steilheit g_m durch Variation von V_{ds} und V_{gs} um den Arbeitspunkt $(V_{ds,0}, V_{gs,0})$ bestimmt. Dazu wurde der resultierende Drainstrom in 10 Schritten von je 6 mV um $V_{ds,0}$ bzw. $V_{gs,0}$ abgerastert und ein linearer Fit gegen die angelegte Spannung lieferte $g_d|_{V_{ds,0}, V_{gs,0}}$ bzw. $g_m|_{V_{ds,0}, V_{gs,0}}$.

An die Stelle von V_{gs} in [Gleichung 3.1](#) tritt nun $V_{gs} + V_{FET}$ und für konstantes V_{ds} und V_{gs} folgt

$$I_d (V_{ds,0}, V_{gs,0} + V_{FET}) = I_{d,0} + g_m \cdot V_{FET} + \mathcal{O}^2$$

und damit

$$V_{FET} = \frac{I_d - I_{d,0}}{g_m} \quad (3.5)$$

Da $I_{d,0}$ wesentlich größer als $\Delta I_d = g_m \cdot V_{FET}$ war, bot sich für die Zellsignal-Messungen in dieser Arbeit der „slow 1000x-Modus“ an. Durch den Hochpass galt dann $V_{FET} = I_d/g_m$ und somit ließ sich das Nutzsignal robuster übertragen und die Auflösung der AD/DA-Karte besser ausreizen.

3.5 DURCHFÜHRUNG

Nach der Erläuterung der Apparatur in [Abschnitt 3.4](#) soll im Folgenden der Ablauf und die Auswertung der Experimente dargestellt werden. Darauf wird der allgemeine Aufbau eines Messprotokolls erklärt und schließlich die Protokolle für thermisches Rauschen und für nichtstationäres Rauschen erörtert. Weitere Protokolle zur Charakterisierung der Kopplung und Ionenkanäle sind in [Kapitel 4](#) gegeben.

3.5.1 Ablauf

Alle Messungen fanden bei Raumluft und -temperatur statt. Durch die Abwärme des FET-Verstärkers hatten Chip, Medium und Zellen eine Temperatur von etwa 27°C d.h. 300 K. Da Licht Ladungsträger im Halbleiter generiert und somit Störungen verursacht, wurden sämtliche Messungen im Dunkeln und insbesondere ohne Mikroskoplicht durchgeführt. Der allgemeine Ablauf einer Messung strukturierte sich wie folgt:

- Entnahme des Chips aus dem Brutschrank
- Zweimaliges vorsichtiges Spülen mit ECM (Zimmertemperatur), um das Nährmedium vollständig zu entfernen, und anschließendes Geben von 1,5 mL ECM in die Kulturkammer des Chips
- Befestigung des Chip in der Messvorsichtung und Kontaktieren des Bades mit Ag/AgCl-Pellet
- Auswahl eines Gates mit dem Mikroskop auf dem sich (möglichst zentrisch) eine Zelle befindet
- DIC-Aufnahme der auf dem Chip adhärenen Zelle
- Setzen des Arbeitspunkt und Kalibrieren des Messprogramms ([Abschnitt 3.4.4](#))
- ggf. Messung zum thermischen Rauschen ([Abschnitt 3.5.4](#))
- Patchen der Zelle und Abgleich der Zellparameter ([Abschnitt A.3](#))
- Durchführen von Messungen bis der Patch instabil wird
- DIC-Aufnahme der gepatchten Zelle
- mechanisches Entfernen der Zelle
- Referenzmessung zum thermischen Rauschen

Bei den Messungen wurde meist mit dem nichtstationären Rauschen, dem Kern dieser Arbeit, für 3 Depolarisationshöhen begonnen ([Abschnitt 3.5.5](#)). Daneben konnte auch das Tail-Current-Protokoll zur Bestimmung des Umkehrpotentials ([Abschnitt 4.1](#)) verwendet werden, wobei das nichtstationäre Rauschen dann lediglich für eine Depolarisationshöhe vorlag. Desweiteren wurden Messungen zum thermischen Rauschen ([Abschnitt 3.5.4](#)) und Wechselspannungsmessungen ([Abschnitt 4.4](#)) durchgeführt. Für die stationäre Offenwahrscheinlichkeit ([Abschnitt 4.2](#)) und die Ionenkanalexpression ([Abschnitt 4.3](#)) waren keine Chips nötig, sodass zusätzlich auch direkt in Kulturschalen bei ansonsten gleichen Bedingungen gemessen werden konnte.

Nach Messung/Versuch an der ersten ausgewählten Zelle wurde mit weiteren Zellen auf dem gleichen Chip fortgefahren. Wobei die nutzbare Messzeit auf eine Stunde pro Chip begrenzt war, da die Patchbarkeit der Zellen nachließ.

3.5.2 Auswertungsgrundlagen

Während das Messprogramm mit LabVIEW entwickelt wurde, bot sich die Programmiersprache Python für die auf die Messung folgende Auswertung an. So liefert SciPy [[JOP⁺01](#)], eine

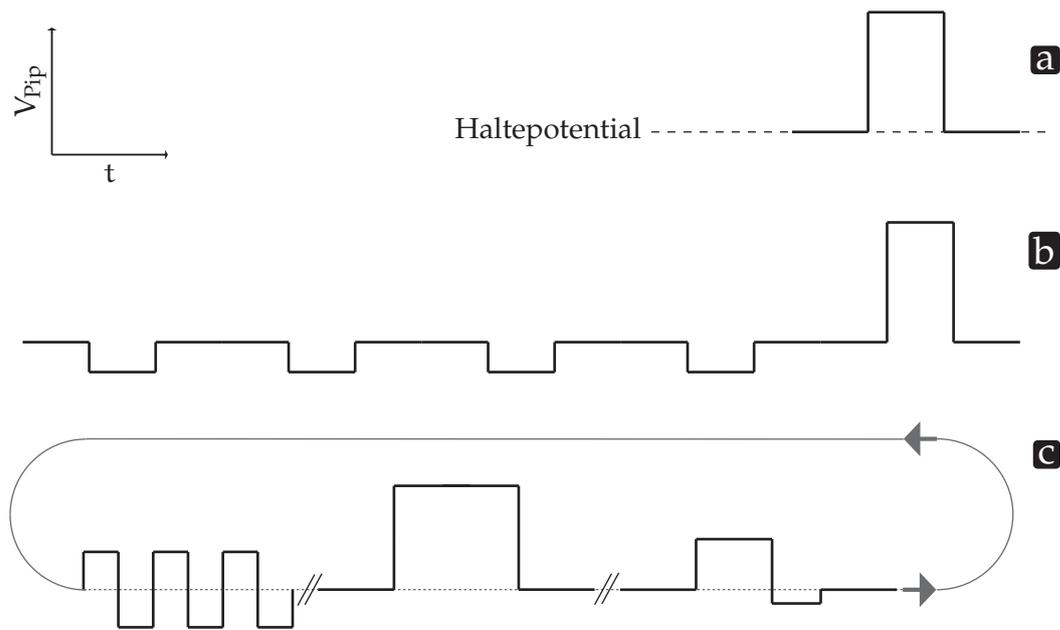


Abbildung 3.12: Struktur der Messprotokolle. In (a) ist ein einzelner Puls d. h. einen Spannungssprung dargestellt. Dieser ist in (b) um das p/4-Protokoll erweitert. Aus einer Vielzahl solcher Pulse wird ein Messprotokoll (c) zusammengesetzt und ggf. mehrfach iteriert.

Lediglich Teile der Messdatenkonvertierung mussten noch in LabVIEW implementiert werden.

auf Python basierende numerische Bibliothek, eine Vielzahl von Algorithmen und effiziente Handhabung großer Datenmengen in Array-Strukturen. Das quelloffene Computeralgebrasystem SAGE [S⁺09] bringt noch weitere Bibliotheken und Programme ein und vereinigt diese in einer gemeinsamen, python-basierten Benutzerschnittstelle.

Entsprechend wurde zur Auswertung auf diese bewährten Bibliotheken und Funktionen zurückgegriffen u. a. für die schnelle Fourier-Transformation (FFT), das Filtern von Signalen, das Erstellen von Plots mit Matplotlib [Hun07] und für das Fitten von funktionalen Zusammenhänge der Messwerte mit dem in SciPy implementierten Levenberg-Marquardt-Algorithmus oder mit ODRPACK [BBS87, BDBS89, BFS⁺90, BBR92].

3.5.3 Struktur der Messprotokolle

Die Messprotokolle für die verschiedenen Messvorgänge bestanden im Allgemeinen aus einer Serie von Pulsen d. h. Vorgaben für den zeitlichen Verlauf der Pipettenspannung.

Im einfachsten Fall war ein solcher Verlauf ein Spannungssprung vom Haltepotential auf eine andere Spannung und nach einer definierten Zeitspanne wieder zurück auf das Haltepotential wie der in [Abbildung 3.12a](#) dargestellte depolarisierende Puls. Das Haltepotential wurde dabei separat im Messprogramm ein-

gestellt d. h. der Verlauf der Spannung wurde durch das Messprotokoll nur relativ zum Haltepotential vorgegeben. Wobei nach einem Puls das zuletzt durch diesen angelegte Potential beibehalten wurde.

Die Erweiterung dieses Pulses um das p/4-Protokoll zeigt [Abbildung 3.12b](#). Hierbei wurden aus dem ursprünglichen Puls 4 weitere auf $-\frac{1}{4}$ skalierte Vorpulse generiert. Dabei sorgte die Invertierung dafür, dass die Vorpulse einer Hyperpolarisation entsprachen und somit die Kaliumkanäle geschlossen blieben. Diese Funktionalität hat das Messprogramm allgemein zur Verfügung gestellt und folglich konnte jedes Messprotokoll bei Bedarf um das p/4-Protokoll erweitert werden. Während die Darstellung dann im Messprogramm mit ausgewertetem p/4-Protokoll statt fand, wurden die Rohdaten gespeichert, sodass später das p/4-Protokoll bedarfsgerecht eingesetzt werden konnte (vgl. [Abschnitt 3.6](#)). Folglich hatte der Einsatz des p/4-Protokolls lediglich eine Verlängerung der Messzeit für jeden einzelnen Puls zur Folge.

In [Abbildung 3.12c](#) ist ein aus verschiedenen Einzelpulsen zusammengesetztes (fiktives) Messprotokoll dargestellt. Eine Iteration fasste dabei die verschiedenen Pulse mit definierter Pause dazwischen zusammen. Das gesamte Messprotokoll war dann eine fixe oder unendliche (d. h. manueller Abbruch) Anzahl von Iterationen mit Zwischenpausen.

3.5.4 Stationäres, thermisches Rauschen

Protokoll

Da das System zur Messung des thermischen Rauschens stationär und damit ohne Störung/Einfluss sein muss, diente als Puls das 1097 ms lange Halten der Pipettenspannung auf dem konstanten Haltepotential mit 100 ms Pause zwischen den Pulsen bzw. Iterationen.

Falls bei dieser Messung eine whole-cell Konfiguration vorlag, hielt ein Haltepotential von -60 mV oder -80 mV die Kaliumkanäle im geschlossenen Zustand. Andernfalls diente das Protokoll lediglich der Steuerung von Datenerfassung und -aufzeichnung.

Es wurden zwischen 23 und 42 Iterationen durchgeführt abhängig davon ob eine möglichst gute Schätzung des Rauschens oder aber eine schnelle Durchführung z. B. aufgrund mangelnder Stabilität des Patches notwendig war.

Auswertung

Die FET-Signale V_{FET} wurden fourier-transformiert und davon die Betragsquadrate über die einzelnen Iterationen gemittelt. Da-

bei vermied ein Hamming-Fenster den unerwünschten Leck-Effekt in den so errechneten spektralen Leistungsdichten.

Nach Entfernen von eingestrahltten Störungen an vereinzeltten Frequenzen konnte aus der Differenz zwischen dem Spektrum der Referenzmessung $S_{\text{FET}}^{\text{Ref}}$ und dem der Messung $S_{\text{FET}}^{\text{cell}}$ vor Entfernen der Zelle das thermische Rauschen des Schichtwiderstands im Zell-Chip-Kontakt bestimmt werden. Da es über die Messdauer zu einem Drift des Field-Effect Transistor (FET) kam und der verursachte systematische Fehler nicht bekannt war, musste hierbei die Referenzmessung passend skaliert werden und es wurde auf eine Analyse des statistischen Fehlers verzichtet.

Gemäß [Gleichung 2.20](#) gilt mit der über den FET vorgegebenen Fläche und im für die dort gemachten Näherungen gültigen Frequenzbereich der Zusammenhang

$$S_{\text{FET}}^{\text{cell}} - S_{\text{FET}}^{\text{Ref}} = 4k_{\text{B}}\text{Tr}_{\text{FET}}^{\text{FET}}G \quad . \quad (3.6)$$

Schließlich folgte r_j aus dem Wert für $\overline{\text{FET}}_{\text{FET}}G$ nach [Abschnitt 2.2.6](#) und dem Fit über den Frequenzbereich bis 10 kHz (wobei auch niedrige Frequenzen aufgrund des dort dominanten $1/f$ -Rauschens ausgeblendet wurden).

3.5.5 Protokoll zum nichtstationären Rauschen

Eine Iteration bestand aus 3 Pulsen mit je 30 ms Dauer. Von einem Haltepotential bei -60 mV aus (10 ms) depolarisierte ein Spannungssprung auf -20 mV, 0 mV oder $+20$ mV die Zelle für 10 ms und daraufhin wurde für weitere 10 ms wieder auf das Haltepotential zurückgekehrt. Des Weiteren wurde jeder Puls um das p/4-Protokoll erweitert. Zudem betrug die Pause zwischen den Pulsen (und jeder Iteration) 100 ms, sodass sich effektiv ein Abstand von 240 ms zwischen den Depolarisationen befand. Dies bewährte sich als guter Kompromiss zwischen erwünschter, möglichst kurzer Messdauer und ausreichender Pause, um einer akkumulierenden Inaktivierung vorzubeugen.

Insgesamt wurden 256 Iterationen durchgeführt, um einerseits eine gute Schätzung der Varianz zu ermöglichen und andererseits Veränderungen des Systems (aus Zelle, whole-cell Konfiguration und Zell-Chip-Kontakt) klein zu halten. Mögliche Veränderungen wirkten sich auf das Verhältnis von $I_{\text{Pip}}/V_{\text{Pip}}$ (siehe [Abschnitt 3.4.2](#)) beim jeweiligen Puls aus. Verschlechterte sich beispielsweise der Zugang zur Zelle, so brach das Verhältnis $I_{\text{Pip}}/V_{\text{Pip}}$ ein. In diesem Fall wurde die Messung vorzeitig abgebrochen.

*Also erhöhter R_A
und
Spannungsabfall
und damit
Verfälschung der
Messung durch zu
geringes und
zeitliche verzögertes
 V_M .*

3.6 VARIANZANALYSE DES NICHTSTATIONÄREN RAUSCHENS

Die Varianzanalyse liefert aktive Eigenschaften der Zelle sowie deren Ionenkanäle (Abschnitt 2.1) und ermöglicht beim EOSFET die Bestimmung von Spalteigenschaften sowie den Nachweis der Signale einzelner Ionenkanäle (Abschnitt 2.3). Dazu wurden die Signalverläufe von Pipette und FET für die 3 verschiedenen Depolarisationspulse $d = -20 \text{ mV}, 0 \text{ mV}, +20 \text{ mV}$ aus Abschnitt 3.5.5 bzw. dem Konditionierungspuls $d = +40 \text{ mV}$ aus Abschnitt 4.1 ausgewertet. Das Vorgehen und die Fehlerabschätzung folgt [SH97] und wurde um die gleichzeitige Analyse verschiedener Depolarisationen und die FET-Messung erweitert.

Zunächst entfernte ein Butterworth-Filter 2. Ordnung die höherfrequenten Signalanteile, welche nicht für die Ionenkanäle relevant waren. Die Eckfrequenzen bestimmten sich aus der Kanaldynamik der jeweiligen Depolarisation zu 2 kHz, 8 kHz und 10 kHz für $-20 \text{ mV}, 0 \text{ mV}$ und $+20 \text{ mV}$ sowie $+40 \text{ mV}$. Anschließend wurde ein passender Zeitabschnitt t_1^d bis t_2^d der gemessenen Signale ausgewählt. Dabei wurde der Zeitpunkt t_1^d auf kurz nach der Depolarisation festgelegt, sodass einerseits mögliche Störungen und kapazitiven Transienten durch den Spannungssprung abgeklungen und andererseits die Ionenkanäle noch geschlossen waren. Die Wahl von t_2^d stellte sicher, dass sowohl die Ionenkanäle ihre maximale Offenwahrscheinlichkeit erreicht hatten als auch das FET-Signal nur ausschließlich durch die elektrische Kopplung bestimmt war d.h. Effekte durch die sich ändernden Ionenkonzentrationen im Spalt [BF05] vernachlässigt werden konnten. Unter Anwendung der $p/4$ -Vorpulse zur Korrektur von kapazitiven Transienten und des Leckstroms wurden aus den Signalverläufen I_{Pip} und V_{FET} der $L = 256$ bzw. 255 Iterationen zunächst I_M^{ch} sowie $V_{\text{FET}}^{\text{ch}}$ und damit die Ensemble-Mittelwerte

$$\hat{I}_M^{\text{ch},d}(t) = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L I_{M,l}^{\text{ch},d}(t)$$

$$\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d}(t) = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L V_{\text{FET},l}^{\text{ch},d}(t)$$

im Zeitintervall $[t_1^d, t_2^d]$ berechnet. Um Effekte durch Drift, Run-Down und Inaktivierung zu vermeiden, erfolgte die Berechnung

der Ensemble-Varianz $\hat{\sigma}^2(t) = \hat{\sigma}^2(t, t)$ und Ensemble-Autokovarianz

$$\begin{aligned}\hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2(t_c, t) &= \frac{1}{2 \cdot (L-1)} \sum_{l=1}^{L-1} \left(I_{\text{Pip},l}^d(t_c) - I_{\text{Pip},l+1}^d(t_c) \right) \\ &\quad \cdot \left(I_{\text{Pip},l}^d(t) - I_{\text{Pip},l+1}^d(t) \right) \\ \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(t_c, t) &= \frac{1}{2 \cdot (L-1)} \sum_{l=1}^{L-1} \left(V_{\text{FET},l}^d(t_c) - V_{\text{FET},l+1}^d(t_c) \right) \\ &\quad \cdot \left(V_{\text{FET},l}^d(t) - V_{\text{FET},l+1}^d(t) \right)\end{aligned}$$

mit einem paarweisen Schätzer [Sig81], wodurch zudem auf die $p/4$ -Korrektur verzichtet und damit eine störende Erhöhung des Hintergrundrauschens vermieden werden konnte.

Da Mittelwert und Autokovarianz mit einer endlichen Anzahl von Iterationen geschätzt wurden, weichen diese vom wahren Erwartungswert ab. Diese Abweichung wurde über die quadrierten Standardfehler d. h. den Varianzen von Mittelwert und Autokovarianz gemäß

$$\begin{aligned}\text{Var} \left(\hat{I}_M^{\text{ch},d}(t) \right) &\cong \frac{1}{L} \hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2(t) \\ \text{Var} \left(\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d}(t) \right) &\cong \frac{1}{L} \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(t) \\ \text{Var} \left(\hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2(t_c, t) \right) &\cong \frac{3}{L} \hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^4(t_c, t) \\ \text{Var} \left(\hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(t_c, t) \right) &\cong \frac{3}{L} \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^4(t_c, t)\end{aligned} \tag{3.7}$$

selbst geschätzt, wobei fortan die Fehler der Mittelwerte gegenüber denen der (Ko-) Varianzen als vernachlässigbar galten.

Für die weitere Analyse mit Fehlerabschätzung war ein Binning der Daten erforderlich, das die Datenpunkte weitgehend dekorrelierte, zudem deren Anzahl und Streuung verringerte und so die Numerik verbesserte. Dazu wurde die Korrelationszeit der ursprünglichen Datenpunkte/Signale betrachtet [HC92]. Unter Annahme einer exponentiellen Abnahme der Korrelation wurde $ae^{-(t-t_c)/t_{\text{cor}}}$ für jeden Zeitpunkt t_c an $\hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2(t_c, t)$ für $t \geq t_c$ gefittet. Daraufhin legten sich die Zeitintervalle der einzelnen Bins $b_1^d \dots b_N^d$ so fest, dass zum einen deren Länge nicht die jeweilige (minimale) Korrelationszeit t_c überschritt und sich zum anderen der Pipettenmittelwert um nicht mehr als $1/10$ seines maximalen Wertes änderte. Diese Einteilung wurde für den FET übernommen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, und stellt den einzigen Einfluss der Pipettenauswertung auf die FET-Auswertung dar. Die Ensemble-Mittelwerte und -Varianzen

über den jeweiligen Bin wurden zeit-gemittelt und entsprechend gebinnte Fehler-Kovarianz-Matrizen $\hat{\Omega}_{\text{Pip}}^d$ und $\hat{\Omega}_{\text{FET}}^d$ über

$$\hat{\Omega}_{\text{Pip},kl}^d = \frac{1}{N_k^d N_l^d} \sum_{m=1}^{N_k^d} \sum_{n=1}^{N_l^d} \text{Var} \left(\hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2 (t_m, t_n) \right)$$

$$\hat{\Omega}_{\text{FET},kl}^d = \frac{1}{N_k^d N_l^d} \sum_{m=1}^{N_k^d} \sum_{n=1}^{N_l^d} \text{Var} \left(\hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2 (t_m, t_n) \right)$$

mit N_k^d bzw. N_l^d Datenpunkten in den Bins b_k^d bzw. b_l^d berechnet. Dabei schätzen die Diagonalelemente die quadrierten Standardfehler der gebinnten Varianzen.

Die so erhaltenen Fehler-Kovarianz-Matrizen fanden für den nun folgenden Varianz-Fit Verwendung.

Da bei der realen Messungen neben dem Rauschen durch die Aktivität der Ionenkanäle noch weitere Rauschquellen auftraten, wurde ein zusätzlicher Parameter $\hat{\sigma}_{\text{bg}}^2$ für die Varianz dieses Hintergrunds eingeführt, welcher als unabhängig vom Signal der Ionenkanäle und zeitlich gleichbleibend angenommen wurde. Die so erweiterten parabelförmigen Abhängigkeiten der Varianz vom Mittelwert nach [Gleichung 2.9](#) und [Gleichung 2.28](#)

$$\hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2 \left(\langle \hat{I}_M^{\text{ch},d} \rangle \right) = \hat{\sigma}_{\text{bg,Pip},d}^2 + i_{\text{ch}}^d \cdot \hat{I}_M^{\text{ch},d} - \frac{\left(\hat{I}_M^{\text{ch},d} \right)^2}{N_M}$$

$$\hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2 \left(\langle \hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d} \rangle \right) = \hat{\sigma}_{\text{bg,FET},d}^2 + v^d \cdot \hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d} - \frac{\left(\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d} \right)^2}{N_v}$$

können als multiple, lineare Regression

$$y_{\text{Pip}}^d = \beta_{0,\text{Pip}}^d + \beta_{1,\text{Pip}}^d x_{1,\text{Pip}}^d + \beta_{2,\text{Pip}}^d x_{2,\text{Pip}}^d + \epsilon$$

$$y_{\text{FET}}^d = \beta_{0,\text{FET}}^d + \beta_{1,\text{FET}}^d x_{1,\text{FET}}^d + \beta_{2,\text{FET}}^d x_{2,\text{FET}}^d + \epsilon$$

aufgefasst werden. Für N Mittelwert- und Varianz-Bins $b_1^d \dots b_N^d$ der Depolarisation d stellt sich diese in Matrix-Schreibweise mit dem Response-Vektor

$$\mathbf{y}_{\text{Pip}}^d = \begin{pmatrix} \hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2 (b_1^d) \\ \hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2 (b_2^d) \\ \vdots \\ \hat{\sigma}_{\text{Pip},d}^2 (b_N^d) \end{pmatrix},$$

dem Regressionskoeffizientenvektor

$$\boldsymbol{\beta}_{\text{Pip}}^d = \begin{pmatrix} \sigma_{\text{bg,Pip},d}^2 \\ i_{\text{ch}}^d \\ -1/N_M \end{pmatrix},$$

der Störgröße als Zufallsvektor ϵ und der Datenmatrix

$$\mathbf{X}_{\text{Pip},d} = \begin{pmatrix} 1 & \hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d}(b_1^d) & (\hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d})^2(b_1^d) \\ 1 & \hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d}(b_2^d) & (\hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d})^2(b_2^d) \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d}(b_N^d) & (\hat{\Gamma}_M^{\text{ch},d})^2(b_N^d) \end{pmatrix}$$

als

$$\mathbf{y}_{\text{Pip}}^d = \mathbf{X}_{\text{Pip},d} \boldsymbol{\beta}_{\text{Pip}}^d + \epsilon$$

für die Pipette dar; und analog für den FET mit:

$$\mathbf{y}_{\text{FET}}^d = \begin{pmatrix} \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(b_1^d) \\ \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(b_2^d) \\ \vdots \\ \hat{\sigma}_{\text{FET},d}^2(b_N^d) \end{pmatrix}, \quad \boldsymbol{\beta}_{\text{FET}}^d = \begin{pmatrix} \sigma_{\text{bg,FET},d}^2 \\ v^d \\ -1/N_v \end{pmatrix},$$

$$\mathbf{X}_{\text{FET},d} = \begin{pmatrix} 1 & \hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d}(b_1^d) & (\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d})^2(b_1^d) \\ 1 & \hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d}(b_2^d) & (\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d})^2(b_2^d) \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d}(b_N^d) & (\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d})^2(b_N^d) \end{pmatrix},$$

$$\mathbf{y}_{\text{FET}}^d = \mathbf{X}_{\text{FET},d} \boldsymbol{\beta}_{\text{FET}}^d + \epsilon.$$

Für unkorrelierte Bins liefert das Ordinary-Least-Squares Verfahren die gesuchten Regressionskoeffizienten

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{b}}_{\text{Pip}}^d &= \left(\mathbf{X}_{\text{Pip},d}^T \mathbf{X}_{\text{Pip},d} \right)^{-1} \mathbf{X}_{\text{Pip},d}^T \mathbf{y}_{\text{Pip}}^d, \\ \hat{\mathbf{b}}_{\text{FET}}^d &= \left(\mathbf{X}_{\text{FET},d}^T \mathbf{X}_{\text{FET},d} \right)^{-1} \mathbf{X}_{\text{FET},d}^T \mathbf{y}_{\text{FET}}^d. \end{aligned}$$

Da die Bins jedoch (trotz des o. g. Verfahrens weiterhin leicht) korreliert waren, würden so die verschiedenen Bins gleich und damit falsch gewichtet. Dies korrigiert das Generalized-Least-Squares Verfahren über die Gewichtung mittels der Fehler-Kovarianz-Matrix. Weil die geschätzte Fehler-Kovarianz-Matrix von der tatsächlichen abweicht, wird diese über den Zusammenhang der Varianzen und ihrer quadrierten Standardfehler $\text{Var}(\hat{\sigma}_i^2) \cong \frac{3}{L} \hat{\sigma}_i^4$ (Gleichung 3.7) gemäß [JF80, SH97] folgendermaßen zeilen- und spaltenweise reskaliert und damit ein systematischer Fehler vermieden: über das Ordinary-Least-Squares Verfahren lassen sich zunächst die Werte für die Varianzen $\tilde{\sigma}_i^2$ berechnen und mit

$$\tilde{\Omega}_{ij} = \hat{\Omega}_{ij} \cdot \frac{3}{L} \tilde{\sigma}_i^2 \tilde{\sigma}_j^2 / \sqrt{\hat{\Omega}_{ii} \hat{\Omega}_{jj}}$$

entsprechen die Diagonalelemente $\tilde{\Omega}_{ii}$ dann exakt den quadrierten Standardfehlern.

Mit dem Estimated-Generalized-Least-Squares Verfahren und den mittels Schätzung skalierten Fehler-Kovarianz-Matrizen $\tilde{\Omega}_{\text{Pip}}^d$ und $\tilde{\Omega}_{\text{FET}}^d$ konnten nun sowohl die Parameter-Kovarianzmatrizen

$$\begin{aligned}\Xi_{\text{Pip}}^d &= \left(\mathbf{X}_{\text{Pip},d}^T \left(\tilde{\Omega}_{\text{Pip}}^d \right)^{-1} \mathbf{X}_{\text{Pip},d} \right)^{-1} \\ \Xi_{\text{FET}}^d &= \left(\mathbf{X}_{\text{FET},d}^T \left(\tilde{\Omega}_{\text{FET}}^d \right)^{-1} \mathbf{X}_{\text{FET},d} \right)^{-1}\end{aligned}\quad (3.8)$$

als auch die Parameter selbst

$$\begin{aligned}\mathbf{b}_{\text{Pip}}^d &= \Xi_{\text{Pip}}^d \mathbf{X}_{\text{Pip},d}^T \left(\tilde{\Omega}_{\text{Pip}}^d \right)^{-1} \mathbf{y}_{\text{Pip}}^d \\ \mathbf{b}_{\text{FET}}^d &= \Xi_{\text{FET}}^d \mathbf{X}_{\text{FET},d}^T \left(\tilde{\Omega}_{\text{FET}}^d \right)^{-1} \mathbf{y}_{\text{FET}}^d\end{aligned}\quad (3.9)$$

berechnet werden. Damit folgten die Einzelkanaleigenschaften und deren Fehler

$$\begin{aligned}\sigma_{\text{bg,Pip},d}^2 &= \mathbf{b}_{\text{Pip},1}^d & \text{Var} \left(\sigma_{\text{bg,Pip},d}^2 \right) &= \Xi_{\text{Pip},11}^d \\ i_{\text{ch}}^d &= \mathbf{b}_{\text{Pip},2}^d & \text{Var} \left(i_{\text{ch}}^d \right) &= \Xi_{\text{Pip},22}^d \\ N_M &= -1 / \mathbf{b}_{\text{Pip},3}^d & \text{Var} \left(N_M \right) &= N_M^4 \Xi_{\text{Pip},33}^d\end{aligned}$$

und über [Gleichung 2.10](#) mit dem Maximalwert $\max \left(\hat{i}_M^{\text{ch},d} \right)$ der gebinnten Kaliumstrom-Ensemble-Mittelwerte

$$\begin{aligned}p_{\text{max,Pip}}^d &= \max \left(\hat{i}_M^{\text{ch},d} \right) / i_{\text{ch}}^d N_M \\ \text{Var} \left(p_{\text{max,Pip}}^d \right) &= \left(p_{\text{max,Pip}}^d \right)^2 \cdot \left(\frac{\text{Var} \left(i_{\text{ch}}^d \right)}{\left(i_{\text{ch}}^d \right)^2} + \frac{\text{Var} \left(N_M \right)}{N_M^2} - \frac{2 \Xi_{\text{Pip},23}^d N_M}{i_{\text{ch}}^d} \right)\end{aligned}\quad (3.10)$$

die maximale Offenwahrscheinlichkeit. Für die apparenten Kanäle beim EOSFET ergab sich

$$\begin{aligned}\sigma_{\text{bg,FET},d}^2 &= \mathbf{b}_{\text{FET},1}^d & \text{Var} \left(\sigma_{\text{bg,FET},d}^2 \right) &= \Xi_{\text{FET},11}^d \\ v^d &= \mathbf{b}_{\text{FET},2}^d & \text{Var} \left(v^d \right) &= \Xi_{\text{FET},22}^d \\ N_v &= -1 / \mathbf{b}_{\text{FET},3}^d & \text{Var} \left(N_v \right) &= N_v^4 \Xi_{\text{FET},33}^d\end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned}p_{\text{max,FET}}^d &= \max \left(\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch},d} \right) / v^d N_v \\ \text{Var} \left(p_{\text{max,FET}}^d \right) &= \left(p_{\text{max,FET}}^d \right)^2 \cdot \left(\frac{\text{Var} \left(v^d \right)}{\left(v^d \right)^2} + \frac{\text{Var} \left(N_v \right)}{N_v^2} - \frac{2 \Xi_{\text{FET},23}^d N_v}{v^d} \right)\end{aligned}\quad (3.11)$$

Hingegen waren die Varianzen des Hintergrundrauschens vor allem aufgrund verschiedener Filterfrequenzen ungleich.

in gleicher Weise.

Offensichtlich ist die Zahl der Kaliumkanäle in der Membran N_M für alle Depolarisationen gleich und ebenso die apparente Kanalzahl beim FET N_V . Dies soll nun zur Verbesserung der Parameterschätzung durch einen gleichzeitigen Fit der verschiedenen Depolarisationen genutzt werden.

Dazu wurde für n Depolarisationen der Response-Vektor zu

$$\mathbf{y}_{\text{Pip}} = \left(\hat{\sigma}_{\text{Pip},1}^2 (b_1^1) \cdots \hat{\sigma}_{\text{Pip},1}^2 (b_N^1), \hat{\sigma}_{\text{Pip},2}^2 (b_1^2) \cdots \hat{\sigma}_{\text{Pip},2}^2 (b_N^2) \cdots \cdots \hat{\sigma}_{\text{Pip},n}^2 (b_1^n) \cdots \hat{\sigma}_{\text{Pip},n}^2 (b_N^n) \right)^T ,$$

die Parameter zu

$$\boldsymbol{\beta}_{\text{Pip}} = \left(\sigma_{\text{bg,Pip},1}^2, i_{\text{ch}}^1, \sigma_{\text{bg,Pip},2}^2, i_{\text{ch}}^2 \cdots \sigma_{\text{bg,Pip},n}^2, i_{\text{ch}}^n, -1 / N_M \right)^T ,$$

und die Datenmatrix zu

$$\mathbf{X}_{\text{Pip}} = \begin{pmatrix} 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},1} (b_1^1) & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 0 & 0 & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},1} \right)^2 (b_1^1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},1} (b_N^1) & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 0 & 0 & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},1} \right)^2 (b_N^1) \\ 0 & 0 & 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},2} (b_1^2) & 0 & \cdots & 0 & 0 & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},2} \right)^2 (b_1^2) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},2} (b_N^2) & 0 & \cdots & 0 & 0 & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},2} \right)^2 (b_N^2) \\ \vdots & \vdots & 0 & 0 & \ddots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},n} (b_1^n) & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},n} \right)^2 (b_1^n) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cdots & \cdots & 1 & \hat{I}_M^{\text{ch},n} (b_N^n) & \left(\hat{I}_M^{\text{ch},n} \right)^2 (b_N^n) \end{pmatrix}$$

erweitert. Und die Fehler-Kovarianz-Matrizen fassten sich als Blockmatrix

$$\hat{\Omega}_{\text{Pip}} = \begin{pmatrix} \hat{\Omega}_{\text{Pip}}^1 & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ 0 & \hat{\Omega}_{\text{Pip}}^2 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & 0 & \ddots & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \cdots & \hat{\Omega}_{\text{Pip}}^n \end{pmatrix}$$

zusammen. Entsprechend ergaben sich für die FET-Messung \mathbf{y}_{FET} , $\boldsymbol{\beta}_{\text{FET}}$, \mathbf{X}_{FET} und $\hat{\boldsymbol{\Omega}}_{\text{FET}}$. Abschließend konnten

$$\mathbf{y}_{\text{Pip}} = \mathbf{X}_{\text{Pip}}\boldsymbol{\beta}_{\text{Pip}} + \boldsymbol{\epsilon}$$

und

$$\mathbf{y}_{\text{FET}} = \mathbf{X}_{\text{FET}}\boldsymbol{\beta}_{\text{FET}} + \boldsymbol{\epsilon}$$

ebenso, wie oben bereits für eine Depolarisation ausgeführt, gelöst und auf die Einzelkanaleigenschaften sowie die Ionenkanal-Signale beim EOSFET geschlossen werden.

CHARAKTERISIERUNG DER KOPPLUNG UND IONENKANÄLE

Dieses Kapitel bestimmt das Umkehrpotential, die stationäre Offenwahrscheinlichkeit und die Expression der Ionenkanäle. Außerdem werden die passiven Eigenschaften der Zell-Chip-Kopplung mit denen für aktivierte Ionenkanäle verglichen.

4.1 TAIL-CURRENT-MESSUNG FÜR UMKEHRPOTENTIAL

Protokoll

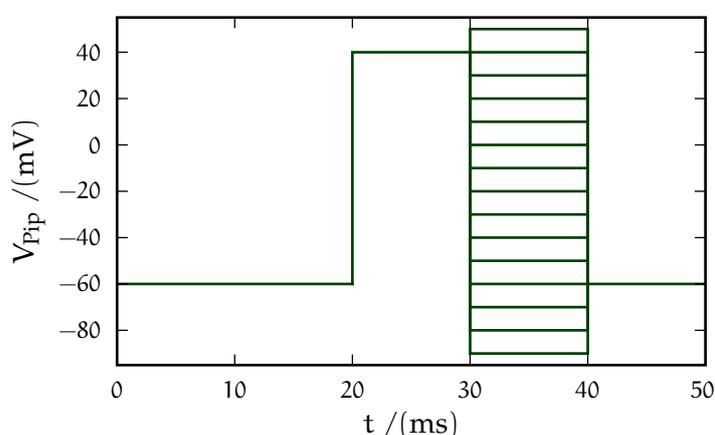
Zur Bestimmung des Umkehrpotentials wurde ein Doppel-Puls Protokoll eingesetzt. Dabei folgten dem vorausgehenden Konditionierungspuls direkt Testpulse verschiedener Spannungen. Eine Iteration bestand aus 15 Doppel-Pulsen von je 50 ms Dauer mit einem Haltepotential bei -60 mV. Nach 20 ms erfolgte die Konditionierung durch Depolarisation auf $+40$ mV

für 10 ms. Darauf wurde jeweils einer der 15 Testpulse mit -90 mV, -80 mV, ..., $+50$ mV über 10 ms angelegt. Schließlich erfolgte die Rückkehr auf das Haltepotential. Das p/4-Protokoll erweiterte alle Doppel-Pulse, die zudem eine 100 ms lange Pause trennte. Somit lagen 330 ms zwischen Ende des vorherigen Testpulses und Beginn des neuen Konditionierungspulses.

Eine 17-fache Iteration ermöglichte ein verbessertes Signal-zu-Rausch Verhältnis und zudem konnten die dann insgesamt 255 Konditionierungspulse für eine Analyse des nichtstationären Rauschens [Abschnitt 3.6](#) eingesetzt werden. Auch hier wurde die Qualität des Messvorgangs, [Abschnitt 3.5.5](#) entsprechend, durch Überwachung von $I_{\text{Pip}}/V_{\text{Pip}}$ sicher gestellt.

Auswertung

Die Korrektur mittels der p/4-Vorpulse entfernte kapazitive Transienten und den Leckstrom von den gemessenen Pipettenströ-



men I_{pip} . Die so erhaltenen $I_{M,l}^{\text{ch,d}}$ der 15 Doppel-Pulse mit Testpulsen auf $d = -90 \text{ mV}, -80 \text{ mV}, \dots, +50 \text{ mV}$ wurden über alle 17 Iterationen gemittelt:

$$\hat{I}_M^{\text{ch,d}}(t) = \frac{1}{17} \sum_{l=1}^{17} I_{M,l}^{\text{ch,d}}(t) \quad .$$

Die sich an den Konditionierungspuls anschließenden Ströme der Testpulse, werden dabei als Tail-Currents bezeichnet, da sie gewöhnlich mit abnehmender Konditionierung ebenfalls abklingen. Aus diesen 15 Tail-Currents lieferte nun die zeitliche Mittelung über ein Zeitintervall $[t_1, t_2]$ direkt am Beginn des jeweiligen Testpulses die benötigten I_{tail}^d . Durch Wahl des Zeitintervalls direkt nach Ende des Konditionierungspulses waren die Ionenkanäle noch (nahezu) vollständig konditioniert und folglich immer in (durchschnittlich) gleicher Anzahl geöffnet.

Abschließend bestimmte sich mit dem Zugangswiderstand R_A , dessen Korrektur um den Faktor c und der an die Pipette angelegten Spannung V_{Pip}^d über [Gleichung 3.3](#) die beim Testpuls d anliegende Transmembranspannung $V_M^d \approx V_{\text{Pip}}^d - (1 - c) \cdot R_A I_{\text{tail}}^d$. Somit konnte der Zusammenhang [\[BBW95\]](#)

$$I_{\text{tail}}^d = G_M^{\text{tail}} \cdot (V_M^d - V_0^K) \quad (4.1)$$

gefittet und das Umkehrpotential V_0^K der in dieser Doktorarbeit verwendeten Kaliumkanäle Shaker B ermittelt werden.

Resultat

In [Abbildung 4.1](#) sind die Tail-Currents einer exemplarischen Messung in Abhängigkeit zur Transmembranspannung bei den Testpulsen dargestellt. Es zeigt sich der nach [Gleichung 4.1](#) erwartete lineare Zusammenhang mit einer Steigung $G_M^{\text{tail}} = 162 \text{ nS}$ und einem Umkehrpotential $V_0^K = -58,5 \text{ mV}$. Außerdem deutet sich an den Enden das Verlassen des linearen Bereichs an.

Die Mittelung über 11 Messungen ergab ein Umkehrpotential

$$V_0^K = (-59,9 \pm 2,7) \text{ mV} \quad .$$

Die Abweichung vom Nernst-Potential $E_0^K \approx -85 \text{ mV}$ für Kaliumionen bei den hier verwendeten ICM und ECM kann durch Anreicherung von Kaliumionen im extrazellulären Raum erklärt werden [\[ZHDA94\]](#).

4.2 STATIONÄRE OFFENWAHRSCHEINLICHKEIT

Zur eingehenden Charakterisierung des eingesetzten Ionenkanals Shaker B $\Delta 6-46 \text{ T449V}$ wurde dessen quasi-stationäre Offenwahrscheinlichkeit bestimmt und mit Literaturwerten verglichen.

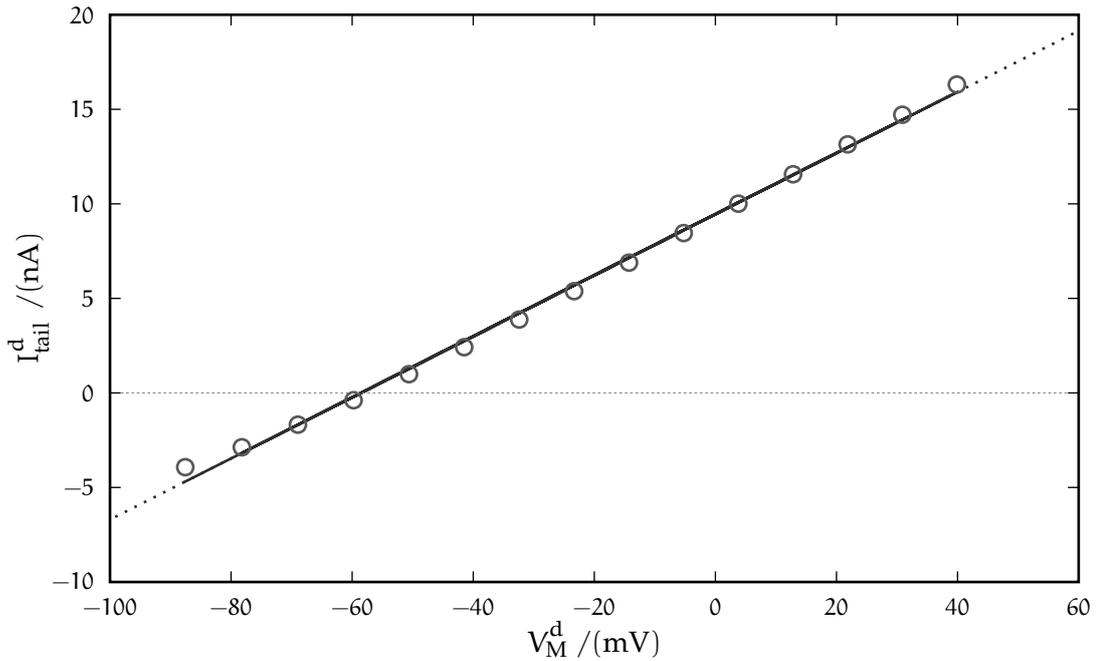


Abbildung 4.1: Tail-Currents I_{tail}^d in Abhängigkeit der jeweils angelegten Transmembranspannung V_M^d bei gleichbleibendem, vorangegangenen Konditionierungspuls. Der Nulldurchgang des linearen Fits entspricht einem Umkehrpotential $V_0^K = -58,5$ mV bei dieser Messung.

4.2.1 Modell

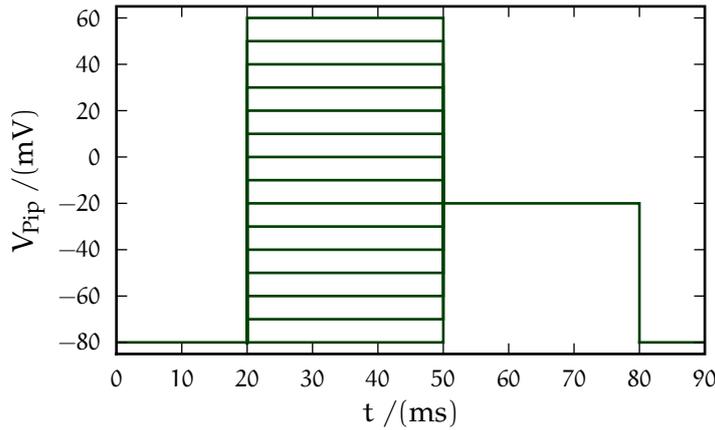
Bei Anlegen einer Membranspannung V_M öffnen sich die Kanäle bis ihre für diese Membranspannung maximale Offenwahrscheinlichkeit $p_{\text{max}}(V_M)$ erreicht wird und sie quasi-stationär sind. Dabei öffnen sich (unabhängig vom gewählten V_M) niemals alle Ionenkanäle, sodass eine absolut-maximale Wahrscheinlichkeit p_{max}^0 existiert, welche nie von der Offenwahrscheinlichkeit überschritten wird d.h. $p_{\text{max}}(V_M) \leq p_{\text{max}}^0 \forall V_M$. Der hier verwendete Kaliumkanal wird mit 4 unabhängigen Untereinheiten [HH52] modelliert. Die quasi-stationäre Offenwahrscheinlichkeit kann dann mit der Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und der Ladung pro Untereinheit q als 4. Potenz einer Boltzmann-Funktion

$$p_{\text{max}}(V_M) = p_{\text{max}}^0 \cdot \left(\frac{1}{1 - e^{-(V_M - V_{1/2})q/k_B T}} \right)^4 \quad (4.2)$$

beschrieben und mit Literaturwerten [ZHDA94] verglichen werden. Wobei zu beachten ist, dass $V_{1/2}$ und q stark vom verwendeten Modell abhängen [IS99].

4.2.2 Doppel-Puls Protokoll

Die spannungsabhängige maximale Offenwahrscheinlichkeit wurde über ein Doppel-Puls Protokoll bestimmt, bei dem ein vorausgehender Konditionierungspuls $V_{\text{Pip}}^{\text{cond}}$ die Kanäle öffnet bis diese ihre jeweils maximale Offenwahrscheinlichkeit $p_{\text{max}}(V_{\text{M}}^{\text{cond}})$ für die angelegte, konditionierende Membranspannung $V_{\text{M}}^{\text{cond}}$ erreichen und mit dem direkt darauf folgenden Testpuls die zuvor „eingestellte“ Offenwahrscheinlichkeit gemessen werden kann.



Dazu erfolgte nach 20 ms bei -80 mV (Haltepotential) über 30 ms die Konditionierung durch Depolarisation auf -80 mV, -70 mV, ..., $+60$ mV. Daran schloss der 30 ms lange Testpuls mit -20 mV an. Zuletzt wurde für 10 ms auf das Haltepotential -80 mV zurückgekehrt. Das p/4-Protokoll erweiterte alle Doppel-Pulse, die zudem eine 100 ms lange Pause trennte.

Somit lagen 490 ms zwischen Ende des vorherigen Testpulses und Beginn des neuen Konditionierungspulses. Infolgedessen und durch Ausführen von lediglich 3 Iterationen konnte ein die Messung verfälschender Run-Down weitgehend vermieden werden.

Auswertung

Wie in der Auswertung von [Abschnitt 4.1](#) wurden die zeitlich und über die Iterationen gemittelten Tail-Currents $I_{\text{tail}}(V_{\text{Pip}}^{\text{cond}})$ berechnet, wobei sie sich diesmal aufgrund der 15 verschiedenen Konditionierungspulse $V_{\text{Pip}}^{\text{cond}} = -80$ mV, -70 mV, ..., $+60$ mV voneinander unterschieden. Die bei der Konditionierung anliegende Transmembranspannung $V_{\text{M}}^{\text{cond}}$ wurde über [Gleichung 3.3](#) aus den nominellen Depolarisationshöhen $V_{\text{Pip}}^{\text{cond}}$ errechnet.

Die absolut-maximale Offenwahrscheinlichkeit p_{max}^0 bedingt einen maximalen Tail-Current $I_{\text{tail}}^{\text{max}}$ und man kann die relative Offenwahrscheinlichkeit

$$\tilde{p}^{\text{cond}}(V_{\text{M}}^{\text{cond}}) = \frac{p_{\text{max}}(V_{\text{M}}^{\text{cond}})}{p_{\text{max}}^0} = \frac{I_{\text{tail}}(V_{\text{M}}^{\text{cond}})}{I_{\text{tail}}^{\text{max}}}$$

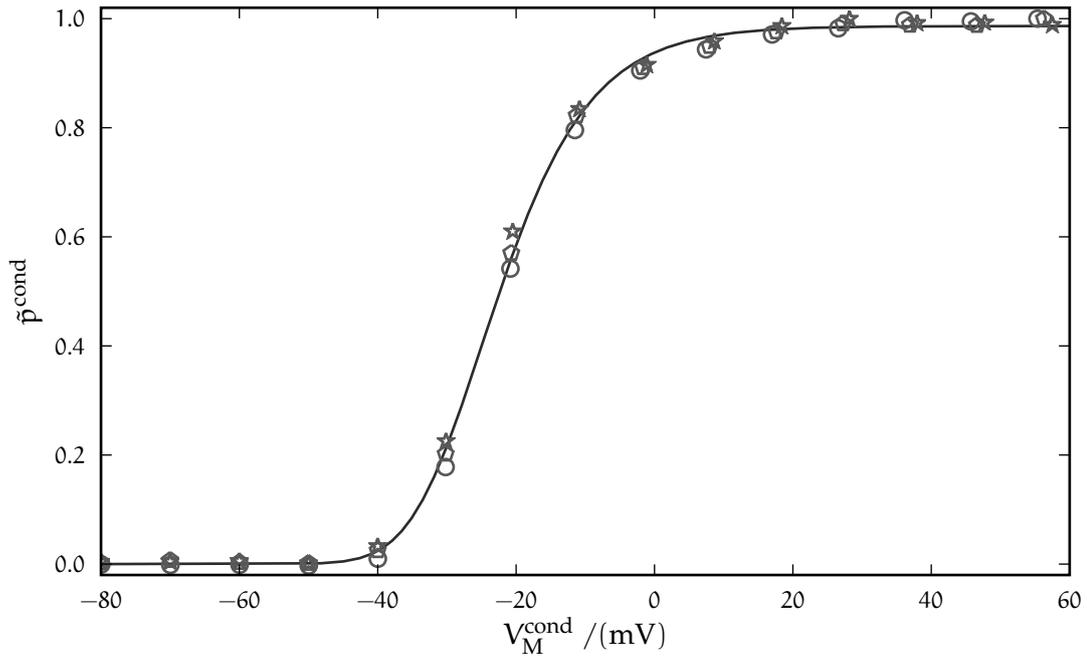


Abbildung 4.2: Abhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit \tilde{p}^{cond} von der Transmembranspannung beim Konditionierungspuls V_M^{cond} für 3 Zellen. Der Zusammenhang wurde mit der 4. Potenz einer Boltzmann-Funktion (Gleichung 4.3) für alle 3 Messungen gemeinsam durch $V_{1/2} = -36,5 \text{ mV}$ und $q = 2,99 e_0$ gefittet.

definieren. Mit Gleichung 4.2 lieferte folglich der Fit von

$$I_{\text{tail}}(V_M^{\text{cond}}) = \tilde{p}^{\text{cond}} I_{\text{tail}}^{\text{max}} = \left(\frac{1}{1 - e^{-(V_M^{\text{cond}} - V_{1/2})q/k_B T}} \right)^4 \cdot I_{\text{tail}}^{\text{max}} \quad (4.3)$$

die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und die Ladung pro Untereinheit q sowie den maximalen Tail-Current $I_{\text{tail}}^{\text{max}}$, wodurch die **relative** Offenwahrscheinlichkeit $\tilde{p}^{\text{cond}}(V_M^{\text{cond}})$ beschrieben werden kann. Da jedoch p_{max}^0 unbekannt bleibt, kann so die absolute Wahrscheinlichkeit nicht bestimmt werden; dies erfolgt in Abschnitt 5.5.4 über die Analyse des nichtstationären Rauschens.

4.2.3 Resultat

Zur relativen (maximalen/stationären) Offenwahrscheinlichkeit wurden Messungen an 3 Zellen durchgeführt und mit einem gemeinsamen Fit nach Gleichung 4.3 ausgewertet.

Abbildung 4.2 zeigt die so ermittelten Offenwahrscheinlichkeiten \tilde{p}^{cond} aufgetragen gegen die beim Konditionierungspuls an-

liegenden Membranspannungen V_M^{cond} . Der ebenfalls dargestellte Fit lieferte die Spannung der halbmaximalen Aktivierung

$$V_{1/2} = -36,5 \text{ mV}$$

und die Ladung pro Untereinheit

$$q = 2,99 e_0 \quad .$$

Dabei entspricht q weitgehend dem Wert $2,88 e_0$ aus [IS99] während $V_{1/2}$ stärker von $-27,5 \text{ mV}$ abweicht, aber noch über $V_{1/2} = -54 \text{ mV}$ aus [ZHDA94] bleibt. Allerdings wurden dort die Werte aus einem anderen System und ohne entfernter C-Typ Inaktivierung gewonnen, sodass speziell die abweichende Spannung durch andere Ionenkonzentrationen und u. a. eine lokal verschiedene Potentialverteilung sowie dem Liquid Junction Potential (LJP) erklärt werden kann. Die Charakterisierung dient hier jedoch primär dem Vergleich mit Ergebnissen aus [Abschnitt 5.5.4](#), wo gleiche Bedingungen vorliegen.

4.3 IONENKANALEXPRESSION

Wie in [Abschnitt A.2.5](#) angemerkt, war die Expression des Kaliumkanals für die Selektion eines geeigneten Klons maßgeblich.

Protokoll und Auswertung

Der whole-cell Patch-Clamp erfasste den Transmembranstrom bei Depolarisation durch Anlegen einer Pipettenspannung von $+40 \text{ mV}$ mit abgeglichenen Zell-Parametern, aber ohne Serienwiderstandskompensation. Nach Korrektur von verbliebenen, kapazitiven Transienten und Leckstrom über das p/4-Protokoll wurden die maximalen Ströme I_M^{mess} visuell bestimmt. Diese mussten aufgrund der nicht-aktivierten Serienwiderstandskompensation noch um die reduzierte Membranspannung korrigiert werden. Da gemäß des vorangegangenen [Abschnitt 4.2](#) die Ionenkanäle im relevanten Membranspannungsbereich (auch unter Berücksichtigung des Spannungsabfalls) weitgehend die maximale Offenwahrscheinlichkeit erreicht hatten, war es für die Charakterisierung der Ionenkanalexpression hinreichend, lediglich das verringerte elektrochemische Potential aufgrund des Spannungsabfalls über die Pipette zu berücksichtigen. Mit einem Umkehrpotential $V_0^K \approx -60 \text{ mV}$ und dem jeweiligen Zugangswiderstand R_A ergab sich der maximale Membranstrom

$$I_M^{\text{max}} = I_M^{\text{mess}} \cdot (40 \text{ mV} - V_0^K) / (40 \text{ mV} - R_A I_M^{\text{mess}} - V_0^K)$$

bei nomineller Depolarisation auf $+40 \text{ mV}$ als Maß für die Expression der Kaliumkanäle.

Diese notwendige Korrektur wurde im Ausgleich für eine einfachere und schnellere Messung hingenommen.

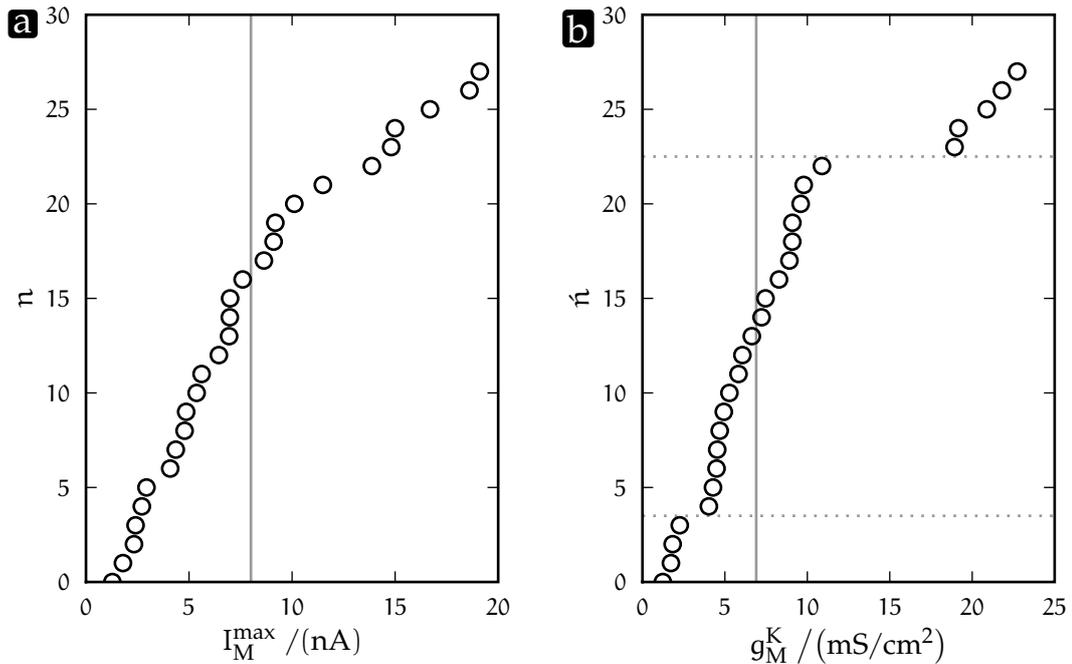


Abbildung 4.3: Vergleich der Expression des Kaliumkanals Shaker B $\Delta 6-46$ T449V für Zellen der stabilen, monoklonalen Zelllinie. (a) zeigt die nach ihrer Größe geordneten maximalen Transmembran-Kaliumströme bei Anlegen einer Pipetenspannung von +40 mV – jedoch ohne sichtbarer Häufung um den Mittelwert $\hat{I}_M^{\max} = (8,0 \pm 5,1)$ nA. Bei den in (b) größengestaffelten flächenspezifischen Kaliumleitfähigkeiten ist eine Gruppierung erkennbar. Nach Wahl des mit gestrichelten Linien abgegrenzten Bereichs ergibt sich ein Mittelwert $\hat{g}_M^K = (6,9 \pm 2,1)$ mS/cm². Daraus lässt sich eine Dichte von etwa 5 Kaliumkanälen pro Quadratmikrometer abschätzen.

Um die unterschiedliche Größe der Zellen zu berücksichtigen, wurde außerdem die flächenspezifische Kaliumleitfähigkeit g_M^K unter Annahme einer homogenen Kanalverteilung berechnet. Dazu folgte aus der über den Abgleich bekannten Zellkapazität C_M und der spezifischen Membrankapazität $c_M = 1,1$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [GSC00] die Fläche der Zellmembran und somit

$$g_M^K = \frac{I_M^{\text{mess}}}{(40 \text{ mV} - R_A I_M^{\text{mess}} - V_0^K)} \cdot \frac{c_M}{C_M} .$$

Resultat

In [Abbildung 4.3a](#) sind die Transmembranströme aus 28 Messungen nach ihrer Größe geordnet aufgetragen. Es lässt sich jedoch keine klare Gruppierung oder Häufung erkennen; vielmehr sind die Werte (bis auf einige Ausreißer zu größeren Strömen) weitgehend gleichmäßig um den Mittelwert

$$\hat{I}_M^{\max} = (8,0 \pm 5,1) \text{ nA}$$

verteilt.

Median der
Abgleich-Parameter:
 $\hat{R}_A = 4,5 \text{ M}\Omega$ und
 $\hat{C}_M = 11,5 \text{ pF}$.

Für die flächenspezifischen Kaliumleitfähigkeit zeigt sich in [Abbildung 4.3b](#) eine Gruppierung in 3 Bereiche. Für Messungen nach [Abschnitt 3.5](#) relevant war der mittlere Bereich, da einerseits Zellen mit zu geringer Kanalexpression kein ausreichendes Signal im EOSFET hervorriefen und andererseits jene mit zu großer Expression nicht mehr der Kopplung nach [Gleichung 2.12](#) genügten. Auch bei der mittleren Gruppe zeigt sich keine Häufung um den Mittelwert

$$\hat{g}_M^K = (6,9 \pm 2,1) \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2} \quad ,$$

wobei die Standardabweichung allerdings kleiner ausfällt. Abschließend ergibt sich mit einer nach [Abschnitt 3.2.1](#) angenommenen Einzelkanalleitfähigkeit $\gamma_{\text{ch}} = 13 \text{ pS}$ eine mittlere Kanalichte von etwa 5 Kanälen pro Quadratmikrometer.

4.4 ZELL-CHIP-KOPPLUNG BEI WECHSELSPANNUNG

Die passiven Eigenschaften sowohl von Zelle und Chip, die Spalteigenschaften, als auch von Zelle und Pipette können aus der Wechselspannungsmessung bei geschlossenen Ionenkanälen bestimmt werden. Die so erhaltenen Spalteigenschaften können mit der Kopplung für einen Ionenstrom d. h. dem Verhältnis von FET- zu Pipettensignal bei aktiven Kanälen verglichen werden. So kann überprüft werden ob eine Anreicherung von Kaliumkanälen in der adhären Membran vorliegt, wie sie bei anderen Kaliumkanälen beobachtet [\[SMF01\]](#) wurde, oder ein chemisches Signal durch Änderung der (Kalium-) Ionenkonzentration [\[BF05\]](#).

Zunächst sollen die Betrachtungen von [Abschnitt 2.2.4](#) und [Abschnitt 3.3.2](#) zusammengefasst und erweitert werden. Bei geschlossenen Kanälen gilt gemäß [Gleichung 3.2](#)

$$\left| Z_{\text{Pip}}^{\text{ac}}(\omega) \right| = \left| \frac{V_{\text{Pip}}(\omega)}{I_{\text{Pip}}^{\text{ac}}(\omega)} \right| = \sqrt{R_A^2 + \frac{R_L^2 + 2R_A R_L}{1 + \omega^2 R_L^2 C_M^2}} \quad (4.4)$$

für die Impedanz des Systems aus Zelle und Pipette mit, wie für diese Messung erforderlich, deaktivierten Korrekturmechanismen des Patch-Clamp-Verstärkers (also $V_{\text{Pip}} = V_{\text{Pip}^\circ}$ und $I_{\text{Pip}} = I_{\text{Pip}^\circ}$). Zudem ist der Transmembranstrom $I_M^{\text{ac}} = i\omega C_M V_M$ rein kapazitiv und andererseits über $I_M^{\text{ac}} = I_{\text{Pip}}^{\text{ac}} - V_M/R_L$ gegeben. Zunächst folgt $I_M^{\text{ac}} = I_{\text{Pip}}^{\text{ac}} - I_M^{\text{ac}}/(i\omega R_L C_M)$ und damit

$$|I_M^{\text{ac}}(\omega)| = \left| I_{\text{Pip}}^{\text{ac}}(\omega) \right| \sqrt{\frac{\omega^2 R_L^2 C_M^2}{1 + \omega^2 R_L^2 C_M^2}} \quad (4.5)$$

für den Betrag des Transmembranstroms. Schließlich ergibt sich nach [Gleichung 2.22](#) mit $\overline{r_{\text{FET}}^{\text{JM}} G}$ über [Abschnitt 2.2.6](#) für die mit dem EOSFET detektierbare Spannung

$$|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}(\omega)| = \overline{r_{\text{FET}}^{\text{JM}} G} \cdot \alpha_J |I_{\text{M}}^{\text{ac}}(\omega)| \quad . \quad (4.6)$$

Protokoll

Für die Wechselspannungsmessung wurden 5 Iterationen ohne p/4-Protokoll durchgeführt. Jede einzelne Iteration bestand dabei aus 7 Rechtecksignalen von je 500 ms Dauer sowie einer Amplitude über ± 10 mV und Grundfrequenzen von 4, 6, 16, 66, 126, 242 und 510 Hz mit einer Zwischenpause von 100 ms. Da hiermit u. a. die passiven Eigenschaften der Zelle bestimmt werden sollten, wurden die Korrekturmechanismen des Patch-Clamp-Verstärkers entsprechend deaktiviert.

Auswertung

In der Auswertung wurden zunächst die Fourier-Transformierten für die einzelnen Rechteck-Signale von Pipette und FET berechnet. Die anschließende Mittelung des Betrags über die jeweiligen Iterationen lieferte $|I_{\text{Pip}}^{\text{ac}}(\omega)|$ und $|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}(\omega)|$. Aus diesen wurden die Werte bei den Grundfrequenzen und den Harmonischen der bekannten Anregung $V_{\text{Pip}}(\omega)$ extrahiert. Daraus bestimmte die Parameterschätzung über den Betrag der Impedanz gemäß [Gleichung 4.4](#) den Leckwiderstand R_L , den Zugangswiderstand R_A und die Zellkapazität C_M . Schließlich konnte $|I_{\text{M}}^{\text{ac}}|$ über [Gleichung 4.5](#) ausgerechnet werden und nach [Gleichung 4.6](#) der Zusammenhang mit $|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}|$ gefittet werden.

Für die Auswertung des zum Vergleich benötigten Verhältnis $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}} / \hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}}$ von FET-Signal zu ionischen Membranstrom aus dem Protokoll in [Abschnitt 3.5.5](#) wird auf [Abschnitt 5.3](#) verwiesen.

Resultat

Zunächst wird eine Wechselspannungsmessung exemplarisch erläutert. Im Anschluss werden die Ergebnisse aus 4 Messungen verglichen. Für diese musste die Gesamtmessdauer kurz gehalten werden, da sich Zelle, Patch und Adhäsion über eine längere Messdauer zu sehr verändern; weshalb lediglich wenige Iterationen des Protokolls von [Abschnitt 3.5.5](#) und dann die Wechselspannungsmessung durchgeführt wurden.

Aus der Wechselspannungsmessung wurde zunächst die Impedanz des Systems aus Zelle und Pipette berechnet. Der anschließende Fit von [Gleichung 4.4](#) durch die Zellkapazität $C_M =$

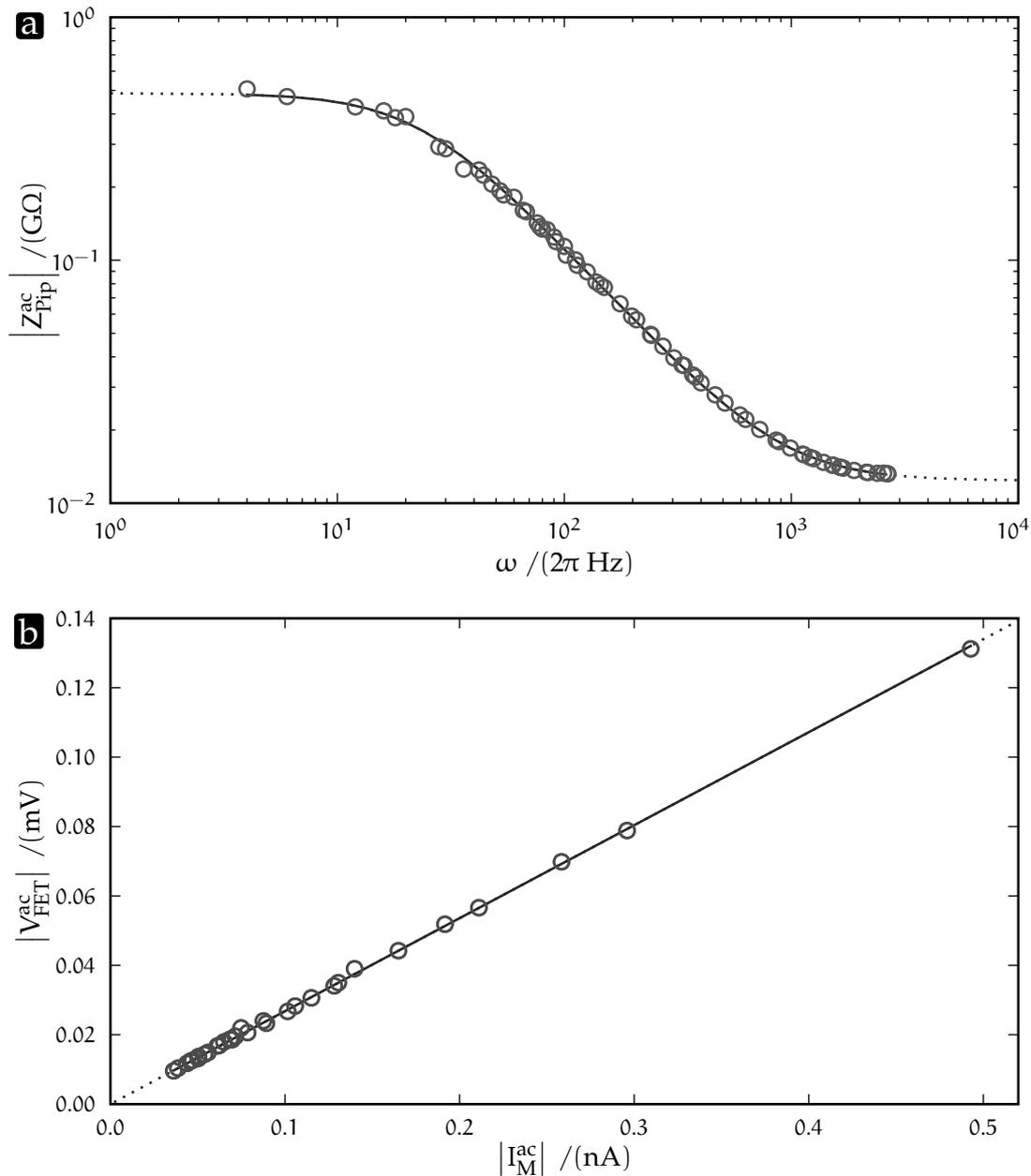


Abbildung 4.4: Impedanz des Systems aus Zelle und Pipette sowie Abhängigkeit des FET-Signals vom kapazitiven Transmembranstrom bestimmt über die Wechselspannungsmessung mit Rechteck-Pulsen. Der Verlauf der Impedanz ist in (a) gut durch die zahlreichen Messwerte durch Rechteckanregung erfasst und durch Gleichung 4.4 mit den Parametern $C_M = 14,4 \text{ pF}$, $R_A = 12,4 \text{ M}\Omega$ sowie $R_L = 0,47 \text{ G}\Omega$ beschrieben. Gegen den daraus berechneten Membranstrom $|I_M^{ac}|$ ist in (b) das zugleich gemessene FET-Signal aufgetragen. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit mit $|V_{FET}^{ac}| / |I_M^{ac}| \approx 0,3 \text{ M}\Omega$.

14,4 pF, den Zugangswiderstand $R_A = 12,4 \text{ M}\Omega$ und den Leckwiderstand $R_L = 0,47 \text{ G}\Omega$ ist in [Abbildung 4.4a](#) zusammen mit den Impedanzwerten aus der Messung abgebildet. Durch die Rechteckpulse wird ein weiterer Frequenzbereich abgedeckt und die Werte können gut durch den Fit modelliert werden. [Abbildung 4.4b](#) demonstriert die lineare Abhängigkeit des (Betrags des fouriertransformierten) FET-Signals $|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}(\omega)|$ vom (kapazitiven) Transmembranstrom $|I_{\text{M}}^{\text{ac}}(\omega)|$, der sich über [Gleichung 4.5](#) mittels der bekannten Zellparameter aus dem Pipettenstrom berechnet. Diese Abhängigkeit entsprach gemäß [Gleichung 4.6](#) einer Steigung

$$|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}|/|I_{\text{M}}^{\text{ac}}| = \alpha_j \overline{r_j^{\text{JM}}}_{\text{FET}} G = 0,27 \text{ M}\Omega$$

mit dem Flächenverhältnis α_j , dem Schichtwiderstand r_j und der über Adhäsions- und Detektionsfläche gemittelten Greenschen Funktion $\overline{r_j^{\text{JM}}}_{\text{FET}} G$.

In [Abbildung 4.5](#) sind die Werte für 4 derartige Wechselspannungsmessungen gegen die bei der gleichen Zelle gemessenen Verhältnisse $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}}/\hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}}$ von FET-Signal zu ionischen Membranstrom aufgetragen. Dabei weichen die Punkte kaum von der eingezeichneten Geraden mit Steigung 1 ab.

Die [Gleichung 4.6](#) für kapazitive Ströme und die [Gleichung 2.24](#) für Ionenkanalströme unterscheiden sich im Falle der rein elektrischen Kopplung lediglich um den Skalierungsfaktor Flächenverhältnis α_j bzw. α_N für das Verhältnis der Kaliumkanalzahl der adhärenierten zur gesamten Membran. Daraus folgt mit den kaum voneinander abweichenden Messwerten, dass hier tatsächlich die rein elektrische Kopplung vorliegt und die Kanäle homogen über die gesamte Zellmembran verteilt sind.

Die Abwesenheit der An- oder Abreicherung von Kanälen in der adhärenierten Membran (d.h. $\alpha_N = \alpha_j$) wurde ebenfalls in

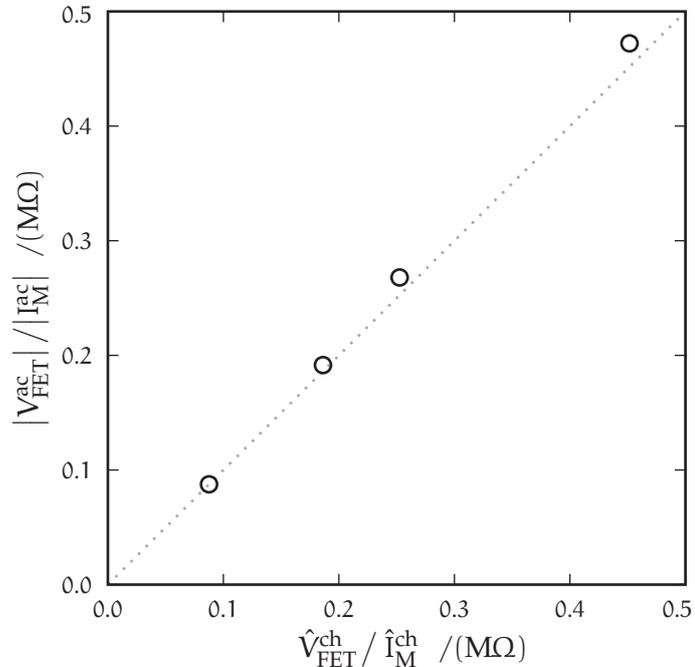


Abbildung 4.5 – Vergleich der ionenvermittelten Kopplung $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}}/\hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}}$ mit der kapazitiven Kopplung $|V_{\text{FET}}^{\text{ac}}|/|I_{\text{M}}^{\text{ac}}|$ an 4 Zellen.

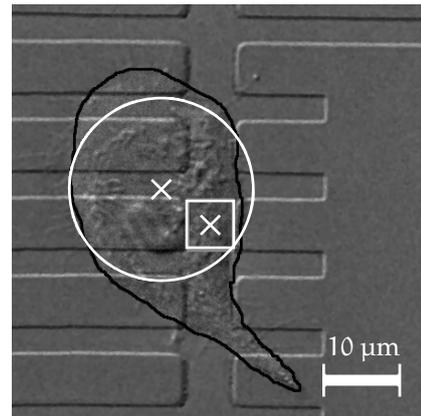
[Bri04] für ein ähnliches System mit verwandten Kaliumkanälen, aber auch in [SF06] für Natriumkanäle, festgestellt.

Die rein elektrische Kopplung ist wichtige Voraussetzung für die theoretische Beschreibung des nichtstationären Rauschens im Zell-Chip-Kontakt nach [Abschnitt 2.3](#).

Zu Beginn wird die Messung und Analyse des nichtstationären Rauschens anhand eines Experiments erläutert. Anschließend werden die so erhaltenen Kopplungsparameter diskutiert sowie die über Pipette und EOSFET ermittelten Einzelkanaleigenschaften einander gegenübergestellt. Dabei folgt die Auswertung dem in [Abschnitt 3.6](#) dokumentierten Vorgehen. Darauf werden weitere Messungen ausgewertet und die Auswahlkriterien für diese erläutert. Aus den Messungen ergeben sich die den Zellen gemeinsamen Einzelkanaleigenschaften sowie der jeweilige Schichtwiderstand, der zusätzlich über das thermische Rauschen bestimmt wird, und der Vergleich mit Literaturwerten ermöglicht die Überprüfung des Modells der Zell-Transistor-Kopplung.

5.1 MESSUNG ZUM NICHTSTATIONÄREN RAUSCHEN

Die im Folgenden behandelte Messung wurde an der in [Abbildung 5.1](#) gezeigten Zelle durchgeführt. Mit der DIC-Aufnahme ist die Größe, Form und Lage der Zelle auf dem Chip erfasst. Aus den möglichen, von der Zelle bedeckten, Gates wurde das Zentrischste gewählt. Außerdem ist die Näherung der Adhäsionsfläche als Kreis (siehe [Abschnitt 5.2.2](#)) eingezeichnet und dessen Mittelpunkt sowie der des Gates mit einem Kreuz markiert.



5.1.1 Pipettenstrom und Transistorsignal

Die in [Abschnitt 3.5.5](#) beschriebenen Depolarisationspulse für das nichtstationäre Rauschen sind in [Abbildung 5.2c](#) nochmals illustriert und [\(a\)](#) zeigt exemplarisch die daraus resultierenden, tiefpass-gefilterten Pipettenströme I_{pip} der ersten und der letzten Iteration von 256. Bei den Spannungssprüngen sind kleine, kapazitive Transienten sichtbar, die trotz Abgleich der Zellparameter (siehe [Abschnitt 3.3.2](#)) nicht völlig aufgehoben wurden. Kurz nach Einsetzen der Depolarisation wuchs durch die sich öffnenden Kaliumkanäle der Strom an, wobei sich die Anstiegszeit bei stärkerer Depolarisation verkürzte d. h. die Ionenkanäle sich schneller öffneten. Anschließend verbleibt der Pipettenstrom bis zum Ende der Depolarisation auf einem weit-

Abbildung 5.1 – Mikroaufnahme der zur Messung mit dem EOSFET verwendeten Zelle. Die Zelle ist schwarz umrandet und das gewählte Gate mit einem weißen Quadrat gekennzeichnet.

Die Abhängigkeit der Kanaldynamik von der Depolarisationshöhe war maßgeblich für die Wahl der Tiefpass-Filter.

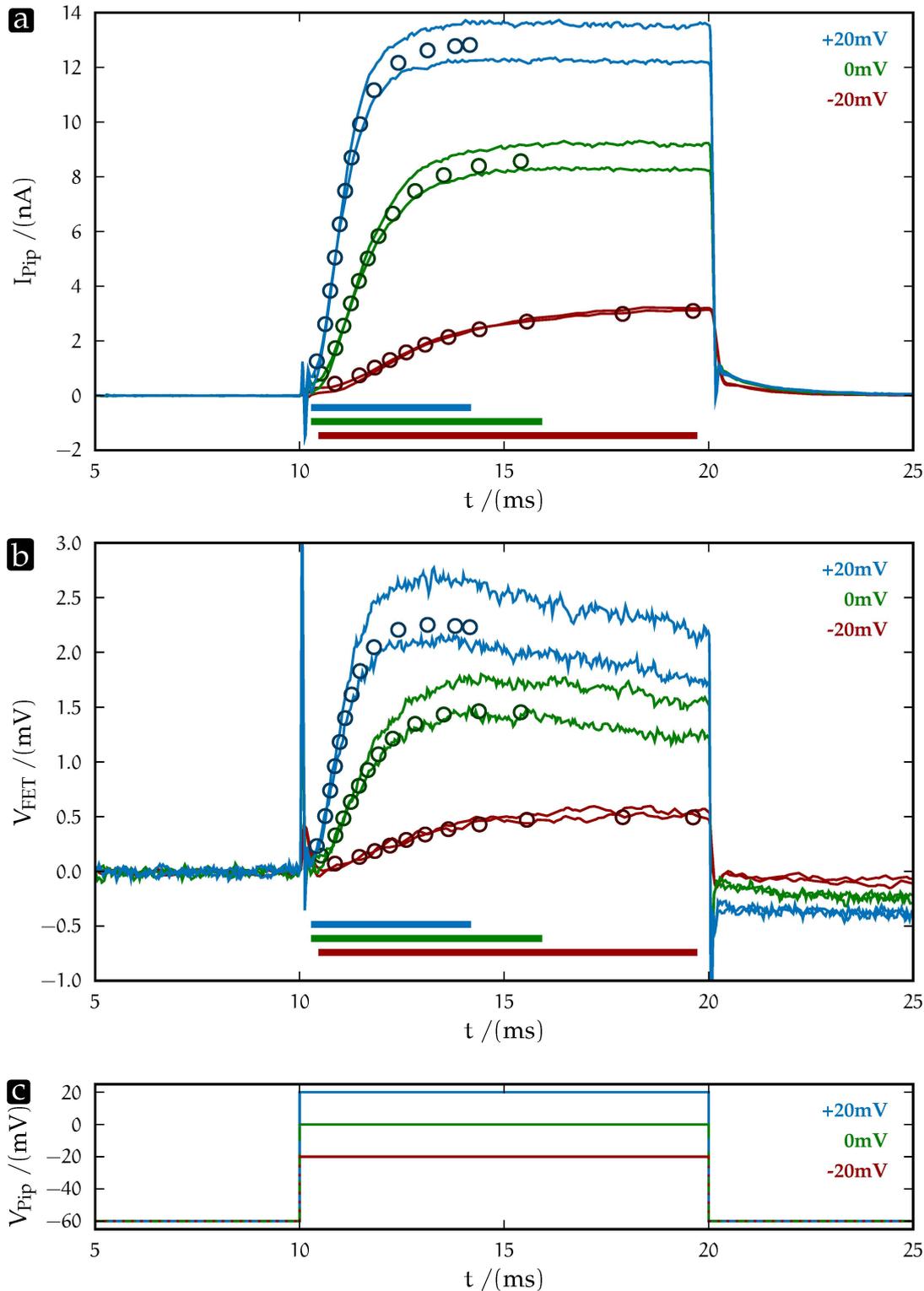


Abbildung 5.2: Pipettenstrom und Transistorsignal bei den 3 in (c) gezeigten Depolarisationshöhen des Messprotokolls für nichtstationäres Rauschen. Der Pipettenstrom I_{Pip} ist in (a) gegen die Zeit t für die jeweils erste und letzte von insgesamt 256 Iterationen jeder der 3 Depolarisationen aufgetragen. Mit einsetzender Depolarisation bei $t = 10$ ms steigt I_{Pip} auf einen von der Stärke der Depolarisation abhängigen, stationären Wert an und fällt erst bei der Repolarisation ($t = 20$ ms) wieder ab. Beim Transistorsignal V_{FET} in (b) sind zusätzlich kapazitive Transienten und ein Einbrechen des Signals zu erkennen. Die Auswertung wird daher in (a) und (b) auf die durch horizontale Balken markierten Zeitbereiche beschränkt, die zudem in die durch Kreise illustrierten (zeitlichen) Bins aufgeteilt sind.

gehend stationären Niveau. Außerdem nimmt vom ersten zum letzten Signal der Gesamtstrom ab, worauf später noch eingegangen wird.

In [Abbildung 5.2b](#) sind die entsprechenden FET-Signale V_{FET} aufgetragen. Hier zeigen sich die kapazitiven Transienten, die bei I_{Pip} durch den Patch-Clamp-Verstärker verborgen und hier durch dessen „Supercharging“ zusätzlich erhöht wurden. Auch beginnt das Signal nach kurzer Zeit wieder einzubrechen, da sich gemäß dem Elektrodifusionsmodell [BF05] Kaliumionen extrazellulär im Spalt anreicherten und sich so das elektrochemische Potential verringerte.

Folglich wurde, wie in [Abschnitt 3.6](#) beschrieben, der Zeitbereich für die Auswertung so gewählt, dass einerseits zu Beginn t_1 die kapazitiven Transienten abgeklungen aber die Ionenkanäle noch geschlossen waren und andererseits am Ende t_2 die Effekte der Elektrodifusion keine maßgebliche Rolle spielten. Diese in [Abbildung 5.2a&b](#) mit horizontalen Balken gekennzeichneten Zeitbereiche unterteilten sich darauf in einzelne Bins, deren jeweilige zeitliche Position dort ebenfalls ersichtlich ist.

Alle Iterationen wurden auf mögliche Störungen kontrolliert und ggf. vor der weiteren Auswertung entfernt. Die Störungsfreiheit der vorliegende Messung zeigt sich auch in den nun betrachteten Isochronen.

5.1.2 Isochronen

Die bereits erwähnte Abnahme des Gesamtstroms über die Iterationen, der sog. Run-Down¹, ist in [Abbildung 5.3](#) nochmals

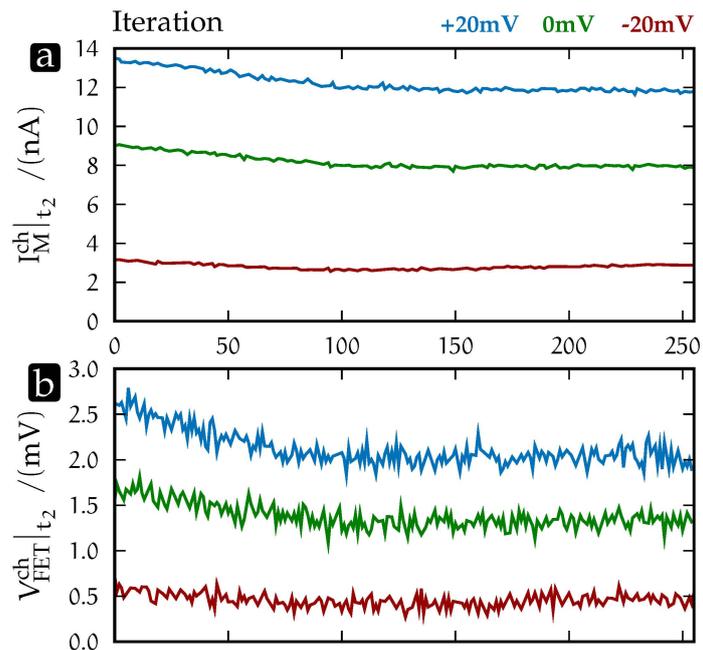


Abbildung 5.3 – Isochronen zur Veranschaulichung des Run-Downs. Für die 3 Depolarisationen d sind in (a) die Werte des Membranstroms $I_M^{\text{ch}} | t_2$ zum Zeitpunkt t_2^d über alle 256 Iterationen aufgetragen; ebenso $V_{\text{FET}}^{\text{ch}} | t_2$ für den FET in (b). Dabei nehmen die Werte über die Iterationen ab d.h. auch die Signale werden sich im Laufe der Iterationen verringern – der sog. Run-Down. Insbesondere wurde t_2^d jeweils in den stationären, maximalen Bereich der Signale gelegt, sodass dieser Verlauf repräsentativ für das Gesamtsignal ist.

¹ Run-Down spiegelt allgemein die Erfahrung wieder, dass der gemessene Pipettenstrom über die Dauer einer Messung mit vielen Durchgängen in seiner

veranschaulicht. Die Isochronen des Zeitpunkts t_2 fallen zu Beginn leicht ab und stabilisieren sich dann auf einem Level. Der Verlauf ist dabei weitgehend gleichmäßig – nahezu der Idealfall. Außerdem ist der hier gezeigte $p/4$ -korrigierte Verlauf bei Pipette und EOSFET nahezu gleich, sodass insbesondere das Verhältnis $V_{\text{FET}}^{\text{ch}}|_{t_2} / I_{\text{M}}^{\text{ch}}|_{t_2}$ konstant bleibt und sich folglich die Zell-Chip-Kopplung nicht änderte.

5.1.3 Paarweiser Schätzer für Varianz

Offensichtlich blieb trotz Entfernen der schnellen und langsamen Inaktivierung gemäß [Abschnitt 3.2.1](#) ein kleiner Run-Down bestehen. Da aus den einzelnen Isochronen gerade die Varianz für die Analyse des nichtstationären Rauschens gewonnen wird, ist es entscheidend, dass ein möglicher Drift um den Mittelwert, der nicht aus den statistischen Eigenschaften der Ionenkanäle herrührt und quadratisch in die Varianz eingeht, bei der Auswertung entsprechend beseitigt wird. Dies erfolgt in [Abschnitt 3.6](#) mit einem paarweisen Schätzer für die Varianz. Bei diesem wird die Varianz aus den paarweisen Differenzen der aufeinander folgenden Iterationen berechnet. Nimmt man die einzelnen Iterationen als voneinander unabhängig an², so addieren sich die Varianzen der einzelnen Signale und man erhält aus der Varianz der paarweisen Differenzen bei Division durch 2 wieder die Varianz der ursprünglichen Signale. Liegt hingegen ein Drift vor, so geht dieser nicht mehr quadratisch bezüglich der gesamten Messdauer bzw. Iterationen ein, sondern nur noch bezüglich des Unterschieds durch Drift von jeweils aufeinander folgenden Iterationen. Bei einem solchen Iterationspaar ist dann (bei den für die Auswertung „zugelassenen“ Drift-Ausmaßen) die Varianz, die durch Aktivität der Ionenkanäle verursacht wird, wesentlich größer als der verbliebene Anteil durch Drift von einer zur nächsten Iteration.

Amplitude abnimmt. Ursachen hierfür sind u.a. ein „Herauswaschen“ von wichtigen Komponenten aus Zelle durch den Patch, Veränderung des Patches bzw. des Zugangswiderstands R_A und Inaktivierung/Zerstörung von Ionenkanälen. (In ähnlicher Weise kann die Amplitude auch zunehmen – Run-Up.) Ein Teil dieser Effekte z. B. eine Inaktivierungsart des $Kv1.3$ Kanals [[MGKL93](#)] können durch die Perforated-Patch-Clamp Technik vermieden werden [[RF91](#), [SHM⁺01](#), [RCGW91](#), [YC93](#)]. Allerdings konnte auch mit spezifischen Protokollen [[FP98](#)] kein für diese Arbeit ausreichend geringer R_A erzielt werden.

² Dies ist die Voraussetzung der in [Abschnitt 2.1.3](#) eingeführten Analyse des nichtstationären Rauschens; jedoch offensichtlich bei einem vorhandenen Drift (zunächst und ohne Korrektur) nicht erfüllt, da die langsamen Zeitkonstanten des Drifts die Iterationen miteinander verknüpfen.

5.1.4 Wahl der Tiefpass-Filter

Eine durch die Filterung verringerte Varianz bedeutet, dass nicht mehr alle Ionenkanalsignale erfasst werden; also Ereignisse von kurzer Offen- oder Geschlossen-Dauer übersehen werden. Folglich würde die Varianzanalyse verfälscht und im Allgemeinen der Einzelkanalstrom unterschätzt und die maximale Offenwahrscheinlichkeit überschätzt [AGL02]. Daher wurden die Grenzfrequenzen der Tiefpass-Filter so gewählt, dass sich einerseits die Varianz nicht verringert und andererseits im speziellen bei den FET-Signalen ein ausreichendes Signal-zu-Rauschverhältnis vorliegt. Die optimalen Grenzfrequenzen hängen dabei von der Kanaldynamik und damit von der Depolarisationshöhe ab.

Den Effekt verschiedener Grenzfrequenzen f_c auf die Varianz des Pipettensignals nach Filterung zeigt [Abbildung 5.4](#). Dazu wurden die Pipettensignale mit einem Butterworth-Filter 2. Ordnung bei verschiedenen Eckfrequenzen f_c tiefpass-gefiltert und, wie oben erläutert, die Ensemble-Varianz für den Zeitbereich t_1 bis t_2 geschätzt. Zusätzlich wurde zur Abschätzung des Hintergrunds die Ensemble-Varianz für einen Zeitbereich vor Beginn der Depolarisation berechnet. Da hier der zeitliche Verlauf der Ensemble-Varianz nicht relevant ist, wurde auf das Binning aus [Abschnitt 3.6](#) verzichtet und der jeweilige zeitliche Mittelwert $\tilde{\sigma}_{\text{Pip}}^2$ und $\tilde{\sigma}_{\text{Pip,BG}}^2$ berechnet. Schließlich ergab sich die aufgetragene (zeitlich-) mittlere, durch Ionenkanäle verursachte, Varianz $\tilde{\sigma}_{\text{Pip,ch}}^2 = \tilde{\sigma}_{\text{Pip}}^2 - \tilde{\sigma}_{\text{Pip,BG}}^2$ in Abhängigkeit von f_c .

Als optimale Grenzfrequenzen ergaben sich für diese Messung 2 kHz, 8 kHz und 10 kHz bei -20 mV, 0 mV und $+20$ mV. Die Wahl verschiedener Eckfrequenzen bedeutet allerdings auch, dass der Hintergrund $\tilde{\sigma}_{\text{Pip,BG}}^2$ für jede Depolarisationshöhe unabhängig voneinander geschätzt werden muss (siehe auch [Abschnitt 5.3.2](#)).

ABSCHLIESSEND konnten von jeder der 3 Depolarisationshöhen alle 256 Iterationen für die weitere Auswertung verwendet

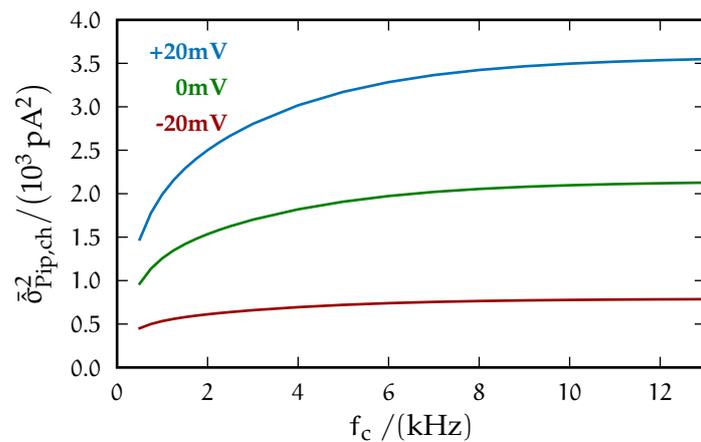


Abbildung 5.4 – Effekt der Grenzfrequenz f_c des Tiefpass-Filters auf den geschätzten Wert der mittleren durch Ionenkanäle verursachten Varianz. Bei zu tief gewählter Grenzfrequenz werden nicht mehr alle Ionenkanalsignale erfasst und die Schätzung der Varianz verfälscht.

werden, da alle Pipetten- und FET-Signale störungsfrei waren und das System über die Messdauer stabil blieb.

5.2 KOPPLUNGSPARAMETER AUS DIC-AUFNAHME DER ZELLE

Wie in [Abschnitt 2.3](#) ausgeführt, kann die Geometrie der Zelle auf mehrere Arten genähert werden, woraus sich verschiedene Kopplungsparameter ergeben. Diese werden zur Interpretation der mit dem EOSFET gemessenen apparenten Kanaleigenschaften verwendet, sodass aus den Modellen unterschiedliche Eigenschaften und Anzahlen der realen Ionenkanäle in der adhärerten Membran folgen, die im nachfolgenden [Abschnitt 5.3](#) mit der Pipettenmessung verglichen werden können.

5.2.1 Parameter beim Punktkontaktmodell

Für das Punktkontaktmodell kann $\overline{G_{\text{PCM}}^{\text{JM}}}$ nicht direkt berechnet werden. Allerdings kann über das Flächenkontaktmodell ein damit konsistenter Wert bzgl. der Ensemble-Mittel von Pipetten- und FET-Signal gefunden werden. Für das Weitere genügt aber bereits der Zusammenhang

$$\overline{G_{\text{PCM}}^{\text{JM}}} = \overline{G_{\text{PCM}}^{\text{JM}}}^2$$

aus [Abschnitt 2.3.4](#).

5.2.2 Näherung als Kreis im Flächenkontaktmodell

Wie bereits in [Abbildung 5.1](#) dargestellt, wurde die Zelle als Kreis mit Radius $a_j = 12 \mu\text{m}$ genähert und das Zentrum des zur Messung verwendeten Gates lag $a = 8 \mu\text{m}$ von der Kreismitte entfernt. Geht man von einer Detektion beim Mittelpunkt des Gates aus, so erhält man gemäß [Gleichung 2.16](#) und [Gleichung 2.18](#) dort

$$\begin{aligned} \overline{G_{\text{aj}}^{12\mu\text{m}}}(8\mu\text{m}) &\approx 0,044 \\ \overline{G_{\text{aj}}^2}^{12\mu\text{m}}(8\mu\text{m}) &\approx 0,0052 \end{aligned}$$

für die über den Kreis gemittelte Greensche Funktion und ihre Quadrierte ($\overline{G_{\text{aj}}}^{\text{aj}}(a)$ und $\overline{G_{\text{aj}}^2}^{\text{aj}}(a)$). Für eine Detektion in der Kreismitte erhält man

$$\begin{aligned} \overline{G_{\text{aj}}}(0) &= \frac{1}{4\pi} \approx 0,080 \\ \overline{G_{\text{aj}}^2}(0) &= \frac{1}{8\pi^2} \approx 0,013 \end{aligned} .$$

5.2.3 Näherung als Polygon im Flächenkontaktmodell

Für die Beschreibung der Zell-Chip-Kopplung im Flächenkontaktmodell nähert das in [Abbildung 5.5a](#) eingezeichnete Polygon die Zelladhäsionsfläche, sodass mittels der Schwarz-Christoffel-Abbildung gemäß [Abschnitt 2.2.6](#) die Greensche Funktion G und ihre Quadrierte G^2 über die Polygonfläche integriert bzw. gemittelt werden konnten. Diese so berechneten ortsabhängigen $\overline{G}^{\text{JM}}(\mathbf{x})$ und $\overline{G^2}^{\text{JM}}(\mathbf{x})$ sind in [Abbildung 5.5b&c](#) visualisiert. Die Detektion mit dem EOSFET nach [Abschnitt 3.4.4](#) bedingt eine weitere Mittelung über die Gatefläche A_{FET} und es folgt mit [Gleichung 2.24](#) und [Gleichung 2.27](#):

$$\begin{aligned}\overline{G}^{\text{JM}}_{\text{FET}} &\approx 0,035 \\ \overline{G^2}^{\text{JM}}_{\text{FET}} &\approx 0,0041\end{aligned} .$$

Wenn nicht anders angemerkt, wird diese Näherung für die Auswertung verwendet.

5.3 LINEARITÄT BEI MITTELWERT UND VARIANZ

Für die in [Abschnitt 4.4](#) bestätigte rein elektrische Kopplung mit homogen verteilten Ionenkanälen folgt in [Abschnitt 2.2.5](#) ein linearer Zusammenhang zwischen durch (Kalium-) Kanäle hervorgerufenen Transmembranströmen und den extrazellulären Spannungen im Spalt:

$$\langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle = \overline{G}^{\text{JM}}_{\text{JS}} r_{\text{J}} \alpha_{\text{N}} \langle I_{\text{M}}^{\text{ch}} \rangle \quad (\text{Gleichung 2.24});$$

in [Abschnitt 2.3](#) folgt ein linearer Zusammenhang für die zugehörigen Ensemble-Varianzen:

$$\sigma_{V_{\text{JS}}^{\text{ch}}}^2 = \overline{G^2}^{\text{JM}}_{\text{JS}} r_{\text{J}}^2 \alpha_{\text{N}}^2 \sigma_{I_{\text{M}}^{\text{ch}}}^2 \quad (\text{Gleichung 2.27}).$$

Unter Einbeziehung der Zellgeometrie können daraus der Schichtwiderstand und das Kanalzahlverhältnis berechnet werden.

5.3.1 Ensemble-Mittel von Pipetten- und FET-Signal

Der Pipettenstrom I_{pip} kann bei Korrektur des Leckstroms und der kapazitiven Transienten über die p/4-Vorpulse mit dem Transmembranstrom der Kaliumkanäle I_{M}^{ch} identifiziert werden. Aus I_{M}^{ch} und dem ebenso erhaltenen $V_{\text{FET}}^{\text{ch}}$ werden die Ensemble-Mittelwerte $\hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch,d}}(t)$ und $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch,d}}(t)$ geschätzt (für die jeweilige Depolarisation d). Die daraufhin mit identischen Zeitintervallen gebinneten Werte sind in [Abbildung 5.6a](#) gegeneinander aufgetragen. Offensichtlich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Kaliumstrom durch die Zellmembran und der mit dem EOSFET gemessenen Spannung. Die kleine Abnahme von

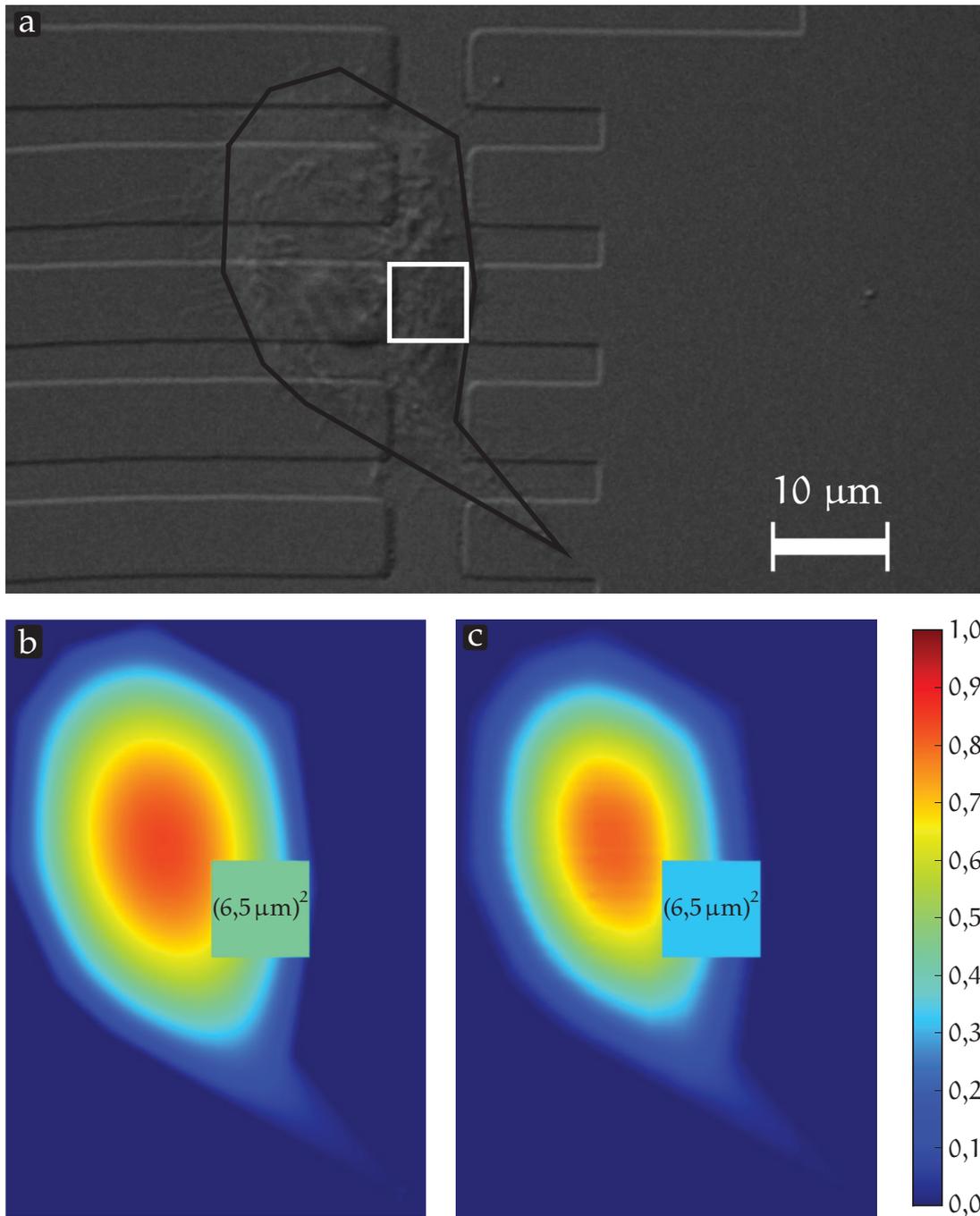


Abbildung 5.5: Mikroaufnahme der verwendeten, auf dem EOSFET adhärenen Zelle und numerische Lösung der Greenschen Funktionen zum Zell-Chip-Kontakt. In (a) ist eine DIC-Aufnahme der Zelle zu sehen. Vom Chip zeigen sich 5 Gates, deren Drain-Zuleitungen sich links befinden, während die rechte (unstrukturierte) Fläche die gemeinsamen Sourcezuleitung darstellt. Das zur Messung verwendete Gate ist durch ein weißes Quadrat markiert und die Zelladhäsionsfläche mit dem schwarzen Polygon angenähert. Die ortsabhängigen Werte der über die Polygonfläche gemittelten Greenschen Funktion bzw. ihrer Quadrierten sind in (b) bzw. (c) farbcodiert und zur besseren Veranschaulichung mit 4π bzw. $8\pi^2$ multipliziert. Die zusätzliche Mittelung über die Gatefläche liefert schließlich die in den Quadraten visualisierten, konstanten $4\pi \overline{J_M}_{FETG} \approx 0,44$ bzw. $8\pi^2 \overline{J_M}_{FETG}^2 \approx 0,32$.

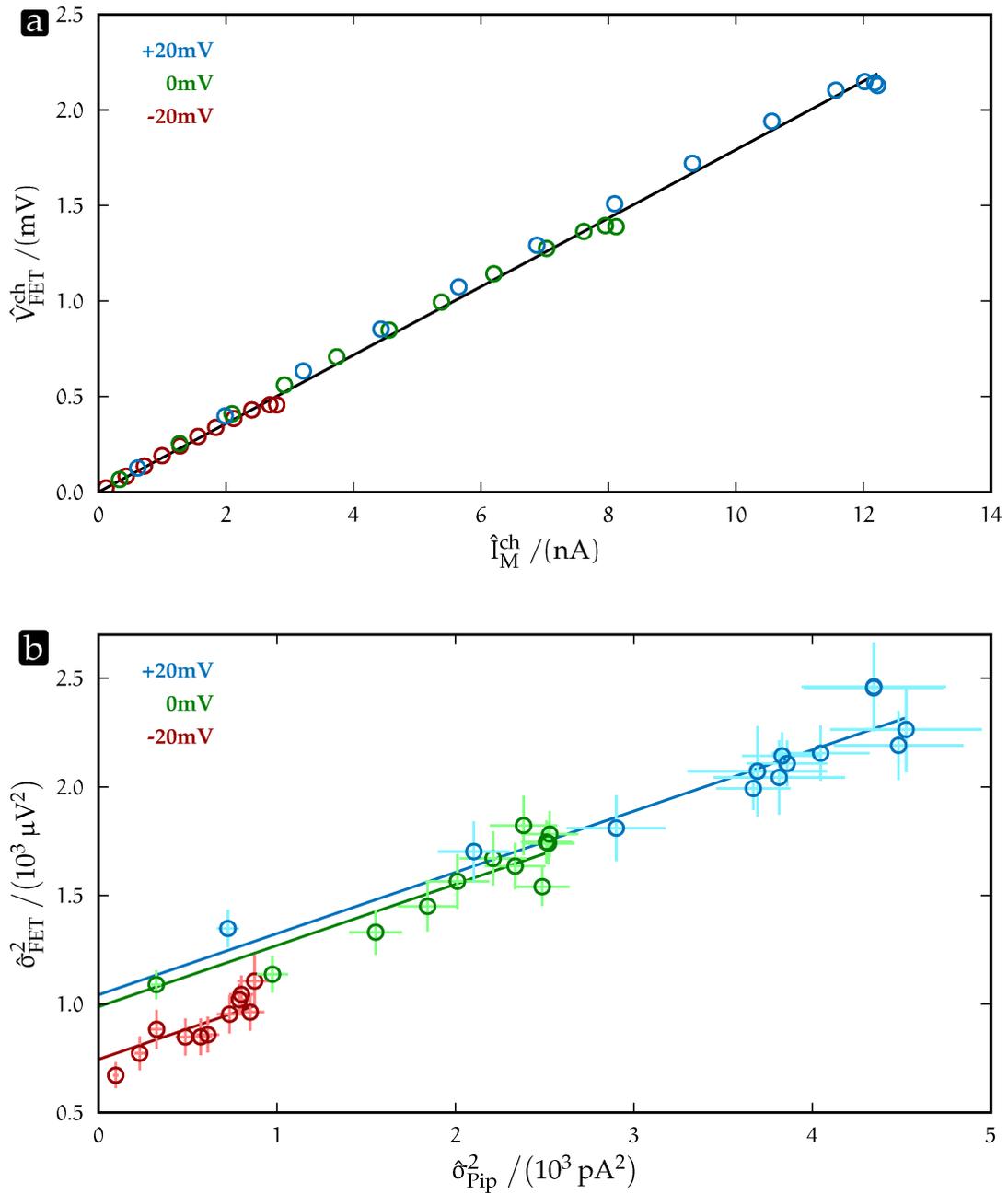


Abbildung 5.6: Ensemble-Mittelwerte sowie -Varianzen von Pipetten- und Transistor-Signal. In (a) sind für die Depolarisationen **+20mV**, **0mV** und **-20mV** die gebinnnten Mittelwerte für den Transistor $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}}$ gegen die gebinnnten Mittelwerte für die Pipette (genauer: des Kaliumionen-Transmembranstroms) $\hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}}$ aufgetragen. Ein linearer Fit ergibt die Steigung $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}} / \hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}} = (0,179 \pm 0,001) \text{M}\Omega$. In (b) sind die Varianzen von EOSFET und Pipette, δ_{FET}^2 und δ_{Pip}^2 , gegeneinander aufgetragen und zusätzlich die Standardfehler der jeweiligen Bins eingezeichnet. Ein gewichteter Fit der gemeinsamen Steigung liefert $\Delta\delta_{\text{FET}}^2 / \Delta\delta_{\text{Pip}}^2 = (0,282 \pm 0,018) \text{M}\Omega^2$, wobei sich der verbleibende konstante Anteil für die einzelnen Depolarisationen unterscheidet.

$\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch,d}}$ bei den jeweils größten (und damit im Zeitverlauf spätesten) Werten von $\hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch,d}}$ wird durch Anreicherung von Kaliumionen im Spalt verursacht. Ein gemeinsamer Fit für alle Depolarisationshöhen $+20\text{mV}$, 0mV und -20mV liefert

$$\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}} / \hat{I}_{\text{M}}^{\text{ch}} = (0,179 \pm 0,001) \text{M}\Omega \quad ,$$

wobei der Standardfehler der jeweiligen Bins über die Ensemble-Varianzen (s. u. und [Gleichung 3.7](#)) bestimmt wurde.

Diesen linearen Zusammenhang mit dem Membranstrom beschreibt [Gleichung 2.24](#) für die extrazelluläre Spannung, die im Spalt durch den (Kalium-) Ioneneinstrom über die adhärrierte Membran hervorgerufen wird. Somit folgt im Ensemble-Mittel

$$\langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle / \langle I_{\text{M}}^{\text{ch}} \rangle = \overline{\text{JM}}_{\text{JS}} G r_{\text{J}} \alpha_{\text{N}} \approx 0,18 \text{M}\Omega$$

für die effektive, mit der sensitiven Fläche A_{JS} detektierbare Spaltspannung d. h. für die Zell-Chip-Kopplung. Überdies ist die Kanaldynamik in der adhärrierten und der gesamten/freien Membran gleich.

5.3.2 Ensemble-Varianz von Pipetten- und FET-Signal

[Abbildung 5.6b](#) vergleicht die gebinnten Ensemble-Varianzen $\hat{\sigma}_{\text{Pip,d}}^2$ und $\hat{\sigma}_{\text{FET,d}}^2$ von Pipetten- und Transistor-Signal (I_{Pip} und V_{FET}). Auch hier hängen die Werte linear voneinander ab, wobei zusätzlich eine additive Konstante $\sigma_{\text{bg,d}}^2$ auftritt, welche die Varianz des Hintergrunds zusammenfasst und für jede Depolarisation d verschieden ist. Aus einem Fit mit gemeinsamer Steigung folgt:

$$\begin{aligned} \Delta \hat{\sigma}_{\text{FET}}^2 / \Delta \hat{\sigma}_{\text{Pip}}^2 &= (0,282 \pm 0,018) \text{M}\Omega^2 \\ \hat{\sigma}_{\text{bg,(+20mV)}}^2 &= (1042 \pm 69) \mu\text{V}^2 \\ \hat{\sigma}_{\text{bg,(0mV)}}^2 &= (988 \pm 43) \mu\text{V}^2 \\ \hat{\sigma}_{\text{bg,(-20mV)}}^2 &= (745 \pm 34) \mu\text{V}^2 \quad . \end{aligned}$$

Der lineare Zusammenhang entspricht der Modellierung nach [Abschnitt 2.3](#). Aus der gemeinsamen Steigung des Fits der Varianzen ergibt sich mit [Gleichung 2.27](#) für die über die sensitive Fläche A_{JS} ermittelte und durch Kanalaktivität verursachte Varianz

$$\sigma_{V_{\text{JS}}^{\text{ch}}}^2 / \sigma_{I_{\text{M}}^{\text{ch}}}^2 = \overline{\text{JM}}_{\text{JS}} G^2 r_{\text{J}}^2 \alpha_{\text{N}} \approx 0,28 \text{M}\Omega^2 \quad .$$

In die daneben auftretenden Varianzanteile $\hat{\sigma}_{\text{bg,d}}^2$ geht sowohl das Hintergrundrauschen der FET-Messung also das der Pipettenmessung ein, wobei der Anteil des EOSFETs überwiegt und die positiven Werte der $\hat{\sigma}_{\text{bg,d}}^2$ bedingt. Beim FET setzt sich dieses aus

dem, mit dem endlichen Widerstand des Zell-Chip-Kontakts verknüpften, thermischen Rauschen des Spalts (siehe [Abschnitt 2.2.3](#)) und dem $1/f$ -Rauschen sowie dem thermischen Kanalrauschen des FETs selbst (siehe [Abschnitt A.1.3](#)) zusammen. Bei der Pipette kommt zum Hintergrundrauschen der Apparatur³ noch das Rauschen bzw. die Schwankungen des Leckstroms hinzu. Diese sind von der Depolarisationshöhe bzw. der Transmembran-spannung abhängig, weshalb (zumindest für die Pipettenmessung unabhängig von der Filterung) kein gemeinsamer Wert für die Hintergrundvarianz angenommen und so dessen Schätzung beim Fit verbessert werden konnte. Außerdem muss der Patch stabil sein, damit die Schwankungen des Leckstrom, welcher aufgrund der aktivierten Kompensation des Patch-Clamp-Verstärkers auch vom Transmembranstrom abhängt, die Messung der durch Ionenkanäle verursachte Varianz nicht verfälscht. Der größte Unterschied zwischen den $\hat{\sigma}_{bg,d}^2$ der verschiedenen Depolarisationshöhen wird aber durch die optimiert eingesetzten Filterfrequenzen verursacht.

5.3.3 Schichtwiderstand r_J und Kanalzahlverhältnis α_N

Aus den Steigungen für Mittelwert und Varianz können der Schichtwiderstand r_J und das Verhältnis der Anzahl der Ionenkanäle α_N über

$$r_J = \frac{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2 / \sigma_{I_M^{ch}}^2 \cdot \overline{G_{JS}^{JM}}}{\langle V_{JS}^{ch} \rangle / \langle I_M^{ch} \rangle \cdot \overline{G_{JS}^{JM} G^2}}$$

und

$$\alpha_N = \frac{\left(\langle V_{JS}^{ch} \rangle / \langle I_M^{ch} \rangle \right)^2 \cdot \overline{G_{JS}^{JM} G^2}}{\sigma_{V_{JS}^{ch}}^2 / \sigma_{I_M^{ch}}^2 \cdot \overline{G_{JS}^{JM} G^2}^2}$$

bestimmt werden. Da gemäß [Abschnitt 4.4](#) die Ionenkanäle homogen über die Zellmembran verteilt sind, ist das Kanalzahlverhältnis und das Flächenverhältnis gleich $\alpha_N = \alpha_J$. Durch Einsetzen der Werte der gemittelten Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten für die einzelnen Modelle aus [Abschnitt 5.2](#) können diese miteinander verglichen werden.

BEIM PUNKTKONTAKTMODELL ist $\overline{G_{JS}^{JM}}$ nicht bekannt sondern nur $\overline{G_{JS}^{JM} G^2} = \overline{G_{JS}^{JM} G_{PCM}^2}$, sodass sich lediglich $\alpha_J = 0,11 \pm 0,01$ ergibt. Demnach wären nur 11% der Zellmembran adhärirt,

³ Hier bedingt das System aus endlichem Zugangswiderstand der Pipette und der Kapazität der Zelle zusätzlich einen Rauschanteil.

was der Mikroaufnahme der Zelle ([Abbildung 5.1](#)) und den weiteren Auswertungen widerspricht. Also bestätigt sich, wie in [Abschnitt 2.3.4](#) erörtert, dass das Punktkontaktmodell das nichtstationäre Rauschen im Spalt durch Ionenkanäle nicht korrekt beschreiben kann.

FÜR DIE ALS KREIS genäherte Zelle im Flächenkontaktmodell folgt bei Detektion in der Kreismitte $r_j = (9,9 \pm 0,6) \text{ M}\Omega$ sowie $\alpha_j = 0,23 \pm 0,01$ und bei Detektion im Mittelpunkt des Gates $r_j = (13,3 \pm 0,9) \text{ M}\Omega$ sowie $\alpha_j = 0,31 \pm 0,02$.

BEIM FLÄCHENKONTAKTMODELL MIT POLYGON erhält man den Schichtwiderstand $r_j = (13,4 \pm 0,9) \text{ M}\Omega$ und das Flächenverhältnis $\alpha_j = 0,38 \pm 0,02$.

WIE IN [ABSCHNITT 2.3.6](#) beschrieben zeigen sich bei den verschiedenen Näherungen im Rahmen des Flächenkontaktmodells die Unterschiede vor allem bei den Kanalzahlverhältnissen. Auch der Ort der Detektion(sfläche) hat einen großen Einfluss auf die berechneten Werte und muss berücksichtigt werden. Für das Weitere wird die Näherung der Adhäsionsfläche als Polygon im Flächenkontaktmodell eingesetzt.

5.4 VARIANZANALYSE DES NICHTSTATIONÄREN RAUSCHENS

Nach [Abschnitt 2.1.3](#) kann man die Anzahl der Ionenkanäle und deren Einzelkanaleigenschaften durch die Varianzanalyse des Ionenkanalverursachten Membranstroms bestimmen. Dabei beschreibt eine Parabel mit den Parametern Einzelkanalstrom i_{ch} und Kanalzahl N_M die Abhängigkeit der Ensemble-Varianz $\sigma_{I_M}^2$ vom Ensemble-Erwartungswert I_M^{ch} :

$$\sigma_{I_M}^2 (\langle I_M^{\text{ch}} \rangle) = \langle I_M^{\text{ch}} \rangle \cdot i_{\text{ch}} - \langle I_M^{\text{ch}} \rangle^2 / N_M \quad (\text{Gleichung 2.9}).$$

Für die konkrete Auswertung wurden, wie in [Abschnitt 3.6](#) erläutert, die zusätzlichen Varianzen für den Hintergrund der Pipettenmessung berücksichtigt und die Standardfehler der geschätzten Parameter bestimmt.

Bei der im vorangegangenen [Abschnitt 5.3](#) bestätigten Linearität zwischen Pipetten- und FET-Mittelwerten sowie zwischen den zugehörigen Varianzen kann die Varianzanalyse gemäß [Abschnitt 2.3](#) auch auf die FET-Messung angewandt werden. Hier sind die apparente Kanal-Spaltspannung v und die Zahl der apparenten Kanäle N_v die Parameter für den Zusammenhang zwischen Ensemble-Mittelwert $\langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle$ und -Varianz $\sigma_{V_{\text{JS}}^{\text{ch}}}^2$ der Ionenkanalverursachten Spannung im Spalt:

$$\sigma_{V_{\text{JS}}^{\text{ch}}}^2 (\langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle) = \langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle \cdot v - \langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle^2 / N_v \quad (\text{Gleichung 2.28}).$$

Über die bekannte Zellgeometrie kann auf den Schichtwiderstand und das Kanalzahlverhältnis geschlossen werden.

5.4.1 Ensemble-Varianz bei Pipettenmessung

Für die unterschiedlichen Depolarisationshöhen sind in [Abbildung 5.7a](#) die gebinnten Ensemble-Varianzen $\hat{\sigma}_{\text{PIP},d}^2$ für die Pipette gegen die zugehörigen Ensemble-Mittelwerte $\hat{I}_M^{\text{ch},d}$ aufgetragen. Diese liegen im Rahmen der Messgenauigkeit auf den eingezeichneten Parabeln, deren Parameter über [Gleichung 3.8](#) & [Gleichung 3.9](#) bestimmt wurden. Es ergaben sich die gemeinsame Kaliumkanalzahl

$$N_M = 15762 \pm 1686$$

sowie die Einzelkanalströme und Hintergrundvarianzen:

| d | $i_{\text{CH}} / \text{pA}$ | $\sigma_{\text{BG,PIP}}^2 / \text{pA}^2$ |
|-------|-----------------------------|--|
| +20mV | $1,07 \pm 0,08$ | 93 ± 113 |
| 0mV | $0,80 \pm 0,05$ | 67 ± 36 |
| -20mV | $0,48 \pm 0,03$ | 40 ± 12 |

Auch die Standardfehler der Parameter, insbesondere für N_M und i_{ch} , zeigen die gute Übereinstimmung der aus der Messung geschätzten Varianzen mit dem Verlauf aus [Gleichung 2.9](#) (bei Berücksichtigung des zusätzlichen Hintergrunds). Also können die Parameter mit den Einzelkanaleigenschaften identifiziert werden.

Aufgrund des unvollständig kompensierten ($\approx 80\%$) Zugangswiderstands $R_A \approx 3 \text{ M}\Omega$ verbleibt ein Spannungsabfall und die nominale Depolarisationshöhe wird nicht erreicht. Da sich der reale Einzelkanalstrom proportional zum Pipettenstrom verringert, tritt bei der Varianz ein zum Pipettenstrom quadratischer Fehler-Term auf, der sich folglich auf die Schätzung der Kanalzahl N_M aber nicht auf die Schätzung des Einzelkanalstroms i_{ch} auswirkt [[HC92](#)]. Also lieferte gemäß [Gleichung 2.1](#) ein linearer Fit der Einzelkanalströme gegen die mit V_M gleichgesetzte, nominale Depolarisationshöhe die Einzelkanalleitfähigkeit

$$\gamma_{\text{ch}} = (13,1 \pm 0,4) \text{ pS}$$

mit dem Umkehrpotential $V_0^K = -59,9 \text{ mV}$ aus [Abschnitt 4.1](#). Diese stimmt gut mit dem Literaturwerten von etwa 13 pS [[ITL+88](#), [MY90](#), [HM93](#), [SVSH03](#)] überein.

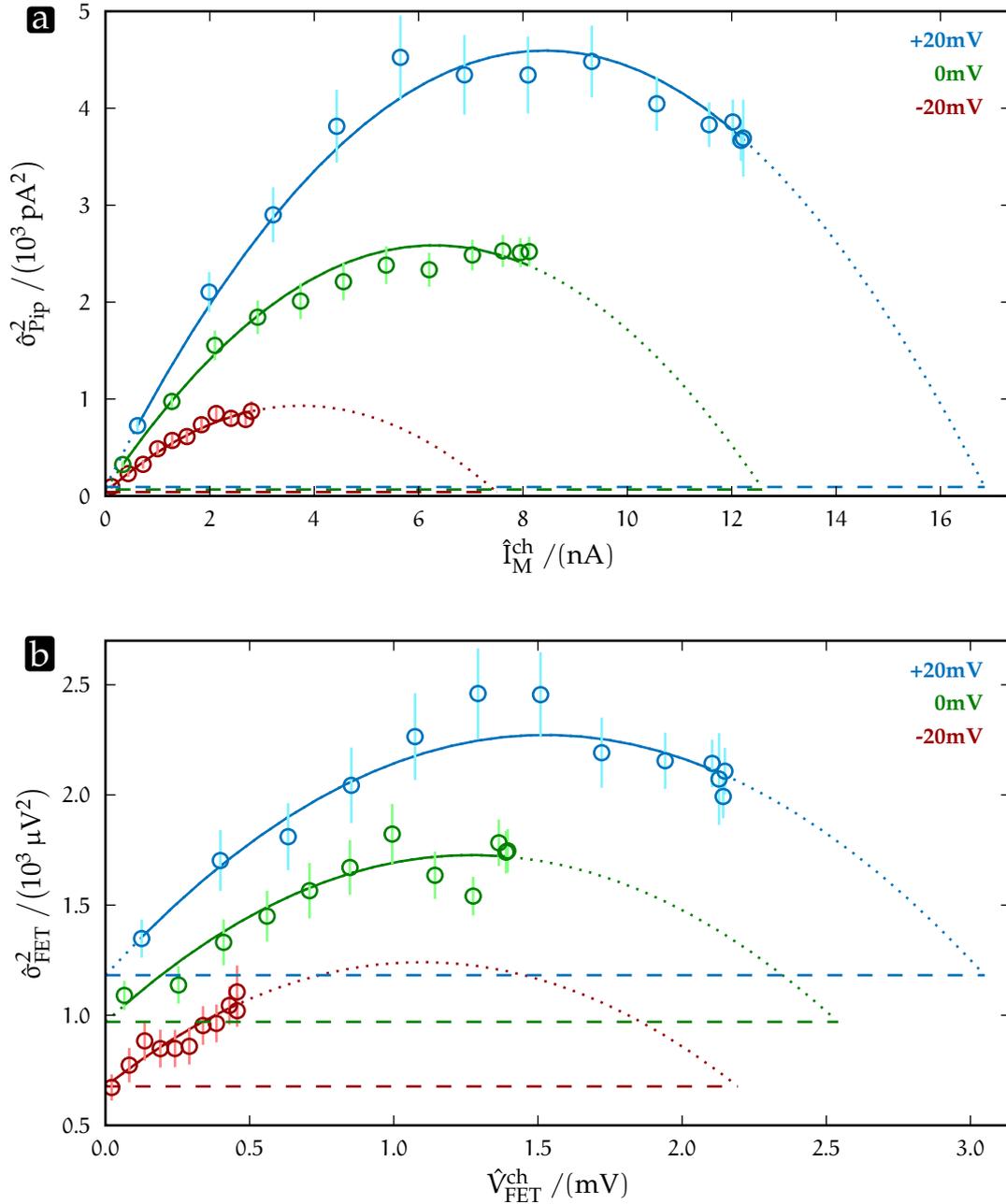


Abbildung 5.7: Betrachtung der funktionalen Abhängigkeit von Varianz und Mittelwert. Für die Pipettenmessung zeigt (a) die gebinnte Varianz $\hat{\sigma}_{\text{Pip}}^2$ in Abhängigkeit der zugehörigen Mittelwertbins \hat{I}_M^{ch} . Die erwartete parabolische Beziehung geht klar aus den Daten der 3 verschiedenen Depolarisationen hervor, sodass sich der aufgetragene Fit innerhalb der abgebildeten Standardfehler bewegt. Die vom Fit gelieferten Hintergrundvarianzen sind durch gestrichelte, horizontale Linien angedeutet. Auch bei den in (b) gegen die FET-Mittelwerte $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch}}$ aufgetragenen Varianzbins $\hat{\sigma}_{\text{FET}}^2$ können die 3 Parabeln verträglich mit den Standardfehlern gefittet werden. Hierbei fallen die ausgerechneten Hintergrundvarianzen größer aus (und damit augenscheinlich ihre relativen Unterschiede).

5.4.2 Ensemble-Varianz bei FET-Messung

Auch die in [Abbildung 5.7b](#) gegen die gebinneten Ensemble-Mittelwerte $\hat{V}_{\text{FET}}^{\text{ch,d}}$ aufgetragenen Ensemble-Varianzen $\hat{\sigma}_{\text{FET,d}}^2$ für die EOSFET-Messung beschreiben Parabeln, wobei hier der Hintergrund stärker hervortritt. Motiviert durch die Ergebnisse aus [Abschnitt 5.3](#) wurde wie oben für die Pipette vorgegangen und [Gleichung 3.8](#) & [Gleichung 3.9](#) lieferten als Parameter die Eigenschaften der apparenten Kanäle. Demnach erhalten wir für die Zahl der apparenten Kanäle

$$N_v = 2132 \pm 723$$

und für die apparente Kanal-Spaltspannung:

| d | v / μV | $\sigma_{\text{BG,FET}}^2 / \mu\text{V}^2$ |
|-------|-------------------|--|
| +20mV | 1,43 \pm 0,37 | 1182 \pm 161 |
| 0mV | 1,19 \pm 0,25 | 970 \pm 107 |
| -20mV | 1,03 \pm 0,23 | 677 \pm 71 |

Die Messwerte liegen im Rahmen des Messfehlers auf den gefitteten Parabeln und bestätigen zusammen mit den geringen Standardfehlern der Fit-Parameter die theoretischen Betrachtungen aus [Abschnitt 2.3](#), die den Zusammenhang von $\sigma_{V_{\text{JS}}^{\text{ch}}}^2$ mit $\langle V_{\text{JS}}^{\text{ch}} \rangle$ gemäß [Gleichung 2.28](#) als Parabel beschreiben. Der Vergleich von apparenter Kanal-Spaltspannung und Hintergrundrauschen belegt, dass die Transistorsignale einzelner Ionenkanäle von diesem verdeckt werden und erst durch die Analyse des nichtstationären Rauschens zum Vorschein kommen.

5.4.3 Kanaleigenschaften, Schichtwiderstand und Kanalzahlverhältnis

Nach Überprüfung des Zusammenhangs von Ensemble-Mittelwerten und -Varianzen für Pipetten- und FET-Signale, kann über [Gleichung 2.29](#) aus den linearen Fits von [Abschnitt 5.3](#) das Verhältnis von apparenter Kanalzahl zur Anzahl der Ionenkanäle in der Zellmembran $N_v/N_M = 0,114 \pm 0,007$ und das Verhältnis apparenter Kanal-Spaltspannung zum Einzelkanalstrom $v/i_{\text{ch}} = (1,57 \pm 0,10) \text{ M}\Omega$ berechnet werden. Die Einzelkanaleigenschaften selbst, erhält man jedoch nur aus der Varianzanalyse. Andererseits kann man die Verhältnisse auch über die Varianzanalyse bestimmen: $N_v/N_M = 0,135 \pm 0,048$ sowie bei +20mV $v/i_{\text{ch}} = (1,34 \pm 0,36) \text{ M}\Omega$, bei 0mV $v/i_{\text{ch}} = (1,49 \pm 0,33) \text{ M}\Omega$ und bei -20mV $v/i_{\text{ch}} = (2,16 \pm 0,49) \text{ M}\Omega$. Die Werte stimmen im Rahmen der Fehler überein, wobei auffällt, dass den Werten der

Varianzanalyse ein größerer Fehler innewohnt und insbesondere bei -20mV stärkere Abweichungen auftreten. Dies lässt sich mit dem hier schlechteren Signal-zu-Rauschverhältnis bei der FET-Messung begründen.

Bei homogen über
die Zellmembran
verteilten
Ionenkanälen gilt
 $\alpha_N = \alpha_J$.

Schließlich folgten mit $\overline{\frac{J_M}{\text{FET}G}} \approx 0,035$ sowie $\overline{\frac{J_M}{\text{FET}G^2}} \approx 0,0041$ auch über die Varianzanalyse die beiden entscheidenden Parameter der Zell-Transistor-Kopplung: der Schichtwiderstand $r_J = (13,0 \pm 1,6) \text{M}\Omega$ und das Flächenverhältnis $\alpha_J = 0,45 \pm 0,16$. Diese stimmen im Rahmen der Fehler mit denen aus [Abschnitt 5.3](#) überein. Allerdings erscheint das $\alpha_J \approx 0,38$ aus [Abschnitt 5.3](#) für die Näherung der Adhäsionsfläche als Polygon realistischer, da das Flächenverhältnis aus der Varianzanalyse bedeutet, dass 45 % der gesamten Zellmembran adhäriert sind — die Zelle also extrem flach ist.

Der Zell-Chip-Abstand d_J ist über $d_J = 1/(\sigma_{EJ}r_J)$ mit dem Schichtwiderstand und der spezifischen Leitfähigkeit σ_{EJ} des Elektrolyts im Spalt verknüpft. Geht man davon aus, dass diese mit der spezifischen Leitfähigkeit $\sigma_E = 14,9 \text{mS/cm}$ des Bad-Elektrolyts übereinstimmt $\sigma_{EJ} \equiv \sigma_E$, so entspricht der hier bestimmte Schichtwiderstand einem Zell-Chip-Abstand $d_J \approx 50 \text{nm}$ in guter Übereinstimmung mit bekannten Werten für HEK293 Zellen auf SiO_2 bzw. TiO_2 Oberflächen [[Wie09](#), [GF06](#)].

5.5 VERGLEICHENDE AUSWERTUNG WEITERER MESSUNGEN

Im Folgenden werden die Ergebnisse weiterer Messungen, die wie die vorangegangene ausgewertet wurden, miteinander und mit den Eigenschaften der Theorie zum nichtstationären Rauschen im Zell-Chip-Kontakt ([Abschnitt 2.3](#)) verglichen.

5.5.1 Überblick & Auswahlkriterien

Nach zahlreichen Vorversuchen konnten schließlich Messungen an etwa 100 Chips durchgeführt werden, wobei durchschnittlich eine Zelle pro Chip mindestens ein Gate vollständig bedeckte, ein „gesundes“ Aussehen hatte (d. h. nach Erfahrungen aus den Vorversuchen einen guten Patch versprach) und nicht direkt an weitere Zellen angrenzte. Von diesen hatten 40 Zellen nach erfolgreichen Patchen mit niedrigem Zugangswiderstand und geringem Leckstrom ein brauchbares Pipetten- und FET-Signal.

Darauf konnten die in [Abschnitt 3.5](#) beschriebenen Messprotokolle durchgeführt werden. Dabei waren Signal, Kopplung und Patch von 19 Messungen hinreichend stabil für die weitere Analyse. Über die konventionelle Varianzanalyse der Pipettenmessung stellte sich heraus, dass lediglich 5 Zellen eine ausreichende Langzeitstabilität hatten. Hier konnte das nichtstationäre Rauschen wie im obigen Beispiel bzw. analog im Falle des Tail-Current-Protokolls (für die Depolarisation +40mV; siehe [Abschnitt 4.1](#)) analysiert werden.

Daraus ergaben sich für Pipette und EOSFET je eine gemeinsame Kanalzahl N_M bzw. N_v und 3 Einzelkanalströme i_{ch} bzw. 3 apparente Kanal-Spaltspannungen v für das Protokoll mit 3 Depolarisationen oder eine Kanalzahl und ein Einzelkanalstrom bzw. eine Kanal-Spaltspannung für das Tail-Current-Protokoll.

5.5.2 Varianzanalyse von FET- und Pipettenmessung

Die Varianzanalyse liefert bei der Pipettenmessung die Anzahl der Ionenkanäle N_M sowie den Einzelkanalstrom i_{ch} und bei der FET-Messung die apparente Kanalzahl N_v und die apparente Kanal-Spaltspannung v . Zum Vergleich der Messungen wurde aus diesen der Membranstrom $I_{hyp}^{ch} = i_{ch}N_M$ bei hypothetisch restlos geöffneten Ionenkanälen berechnet. Entsprechend wurde die hypothetische Spaltspannung $V_{hyp}^{ch} = vN_v$ ermittelt und aufgrund der unterschiedlichen Kopplungsstärke bei den einzelnen

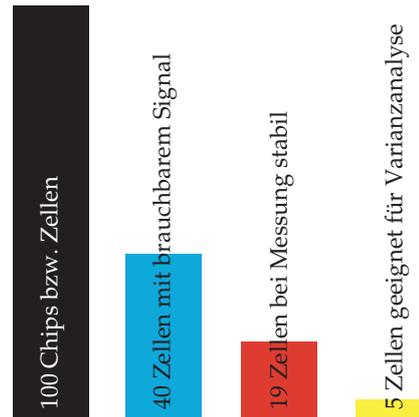


Abbildung 5.8 – Illustration zur Anzahl der ausgewählten Zellen nach den einzelnen Auswahlritten.

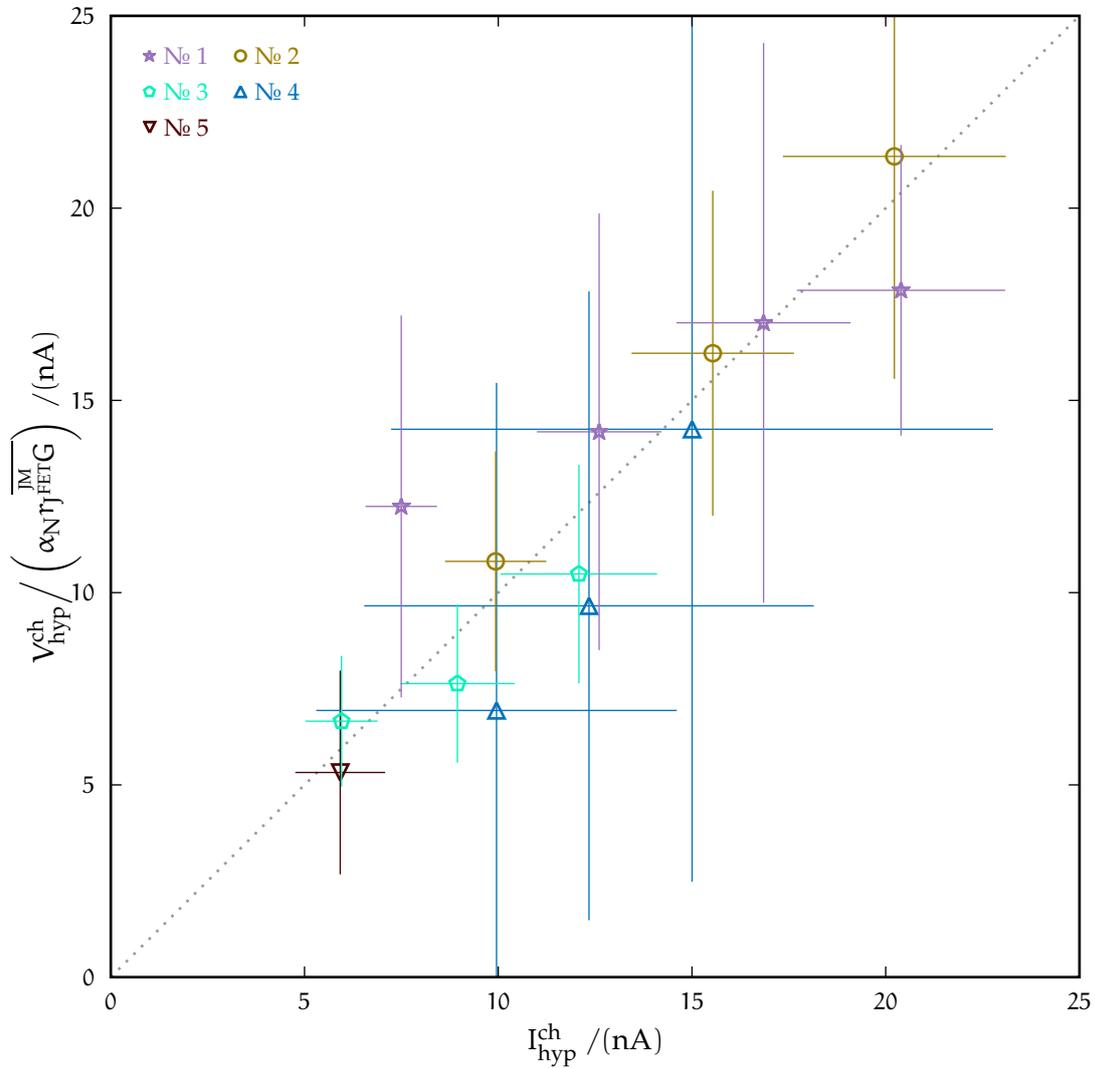


Abbildung 5.9: Vergleich des aus FET- und Pipettenmessung errechneten, hypothetischen Transmembranstroms bei restlos geöffneten Ionenkanälen für 5 Zellen und verschiedene Membranspannungen. Die mit dem EOSFET detektierbaren Spaltspannungen bei restlos geöffneten Kanälen $V_{\text{hyp}}^{\text{ch}} = vN_v$ beschreiben nach Division durch $\alpha_{\text{N}} r_{\text{J}}^{\text{JM}} \text{FET} G$ die entsprechenden Membranströme. Die so errechneten Werte sind gegen die direkt aus den Pipettenmessungen stammenden Werte d.h. $I_{\text{hyp}}^{\text{ch}} = i_{\text{ch}} N_M$ aufgetragen und liegen im Rahmen der Messgenauigkeit auf der eingezeichneten Gerade mit Steigung 1.

Messungen noch um $\alpha_N \overline{r_{\text{FET}}^{\text{JM}}} G = \langle V_{\text{FET}}^{\text{ch}} \rangle / \langle I_{\text{M}}^{\text{ch}} \rangle$ skaliert. [Abbildung 5.9](#) zeigt, dass die Werte im Rahmen der Messgenauigkeit auf einer Geraden mit Steigung 1 liegen. Somit liefert die Analyse des nichtstationären Rauschens beim EOSFET ein konsistentes Ergebnis mit der Varianzanalyse der Pipettenmessung.

5.5.3 Einzelkanalleitfähigkeit

Auch die Einzelkanalleitfähigkeit kann bei Skalierung um $\overline{r_{\text{FET}}^{\text{JM}}} G^2 / \overline{r_{\text{FET}}^{\text{JM}}} G$ gemäß [Gleichung 2.29](#) über die apparenten Kanal-Spaltspannungen aus der FET-Messung bestimmt werden. In [Abbildung 5.10](#) sind sowohl die Einzelkanalströme der Pipettenmessung als auch die skalierten apparenten Kanal-Spaltspannungen für die 5 untersuchten Zellen gegen das jeweilige Transmembranpotential aufgetragen. Im Unterschied zur Berechnung der Einzelkanalleitfähigkeit des vorangegangenen [Abschnitt 5.4](#) aus einer einzelnen Messung wurde hier auch das Umkehrpotential als freier Parameter gefittet. Damit ergab sich für die Pipette eine Einzelkanalleitfähigkeit

$$\gamma_{\text{ch}} = (10,1 \pm 1,4) \text{ pS}$$

mit einem Umkehrpotential

$$V_0^K = (-62 \pm 10) \text{ mV}$$

und für den EOSFET eine Einzelkanalleitfähigkeit

$$\gamma_{\text{ch}} = (9,6 \pm 2,0) \text{ pS}$$

mit einem Umkehrpotential

$$V_0^K = (-59,6 \pm 11,7) \text{ mV} .$$

Beide Einzelkanalleitfähigkeiten stimmen gut miteinander überein und sind nur etwas geringer als die Literaturwerte $\gamma_{\text{ch}} \approx 13 \text{ pS}$ [[ITL+88](#), [MY90](#), [HM93](#), [SVSH03](#)]. Das Umkehrpotential $(-59,9 \pm 2,7) \text{ mV}$ aus [Abschnitt 4.1](#) und die beiden hier ermittelten gleichen sich ebenfalls im Rahmen der Messgenauigkeit.

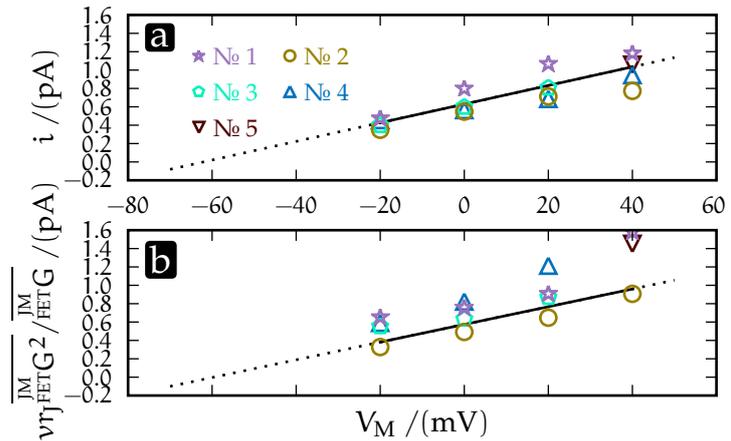


Abbildung 5.10 – Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit. (a) Einzelkanalströme i_{ch} aus der Pipettenmessung gegen die beim Depolarisationspuls angelegte Membranspannung V_M . (b) Die in Einzelkanalströme umgerechneten apparenten Kanal-Spaltspannungen sind gegen V_M aufgetragen.

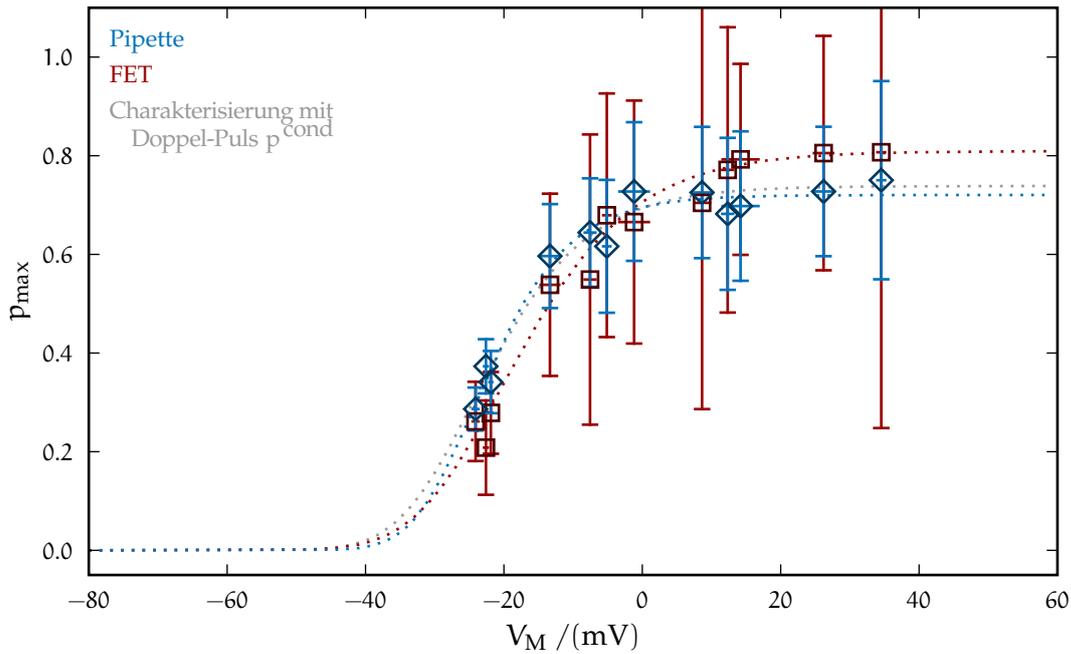


Abbildung 5.11: Die absolute Offenwahrscheinlichkeit aus der nichtstationären Varianzanalyse bei Pipette und EOSFET ist gegen die beim Depolarisationspuls der jeweiligen Messung angelegte Membranspannung V_M aufgetragen. Die Abhängigkeit von V_M kann mit der 4. Potenz einer Boltzmann-Funktion (Gleichung 4.2) beschrieben werden und ein Fit lieferte für die Pipette die absolute, maximale Offenwahrscheinlichkeit $p_{\max}^0 = 0,72 \pm 0,02$, die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2} = (-34 \pm 2)$ mV sowie die Ladung pro Untereinheit $q = 3,4 \pm 0,5 e_0$; für den FET folgten: $p_{\max}^0 = 0,81 \pm 0,02$, $V_{1/2} = (-35 \pm 2)$ mV sowie $q = 2,5 \pm 0,3 e_0$. Zum Vergleich ist die jetzt auch zu einer absoluten Wahrscheinlichkeit skalierte Offenwahrscheinlichkeit $p^{\text{cond}}(V_M^{\text{cond}})$ aus Abschnitt 4.2, der Charakterisierung über ein Doppel-Puls Protokoll, in grau wiedergegeben.

5.5.4 Stationäre Offenwahrscheinlichkeit

In [Abbildung 5.11](#) sind die maximalen, quasi-stationären Offenwahrscheinlichkeiten bei den jeweiligen Transmembranspannungen der einzelnen Messungen für Pipette und EOSFET zusammengefasst. Dabei berechneten sich die Offenwahrscheinlichkeiten gemäß [Gleichung 3.10](#) & [Gleichung 3.11](#) von [Abschnitt 3.6](#) über Division des jeweils für die Depolarisation maximalen Stroms (bzw. Spannung) durch den hypothetisch maximalen Strom $I_{\text{hyp}}^{\text{ch}} = i_{\text{ch}} N_M$ (bzw. Spannung $V_{\text{hyp}}^{\text{ch}} = v N_V$) bei restlos geöffneten Ionenkanälen und die Transmembranspannungen V_M über [Gleichung 3.3](#) aus den nominellen Depolarisationshöhen +20mV, 0mV, -20mV sowie +40mV.

Bereits [Abschnitt 4.2](#) charakterisierte die Abhängigkeit der relativen, maximalen Offenwahrscheinlichkeit von der Membranspannung und beschrieb diese durch die 4. Potenz einer

Boltzmann-Funktion

$$p_{\max}(V_M) = p_{\max}^0 \cdot \left(\frac{1}{1 - e^{-(V_M - V_{1/2})q/k_B T}} \right)^4 \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

mit der absolut-maximalen Offenwahrscheinlichkeit p_{\max}^0 , der Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ und der Ladung pro Untereinheit q . Ein Fit der maximalen Offenwahrscheinlichkeiten aus [Abbildung 5.11](#) ergab folgende Parameter:

| | p_{\max}^0 | $V_{1/2} / \text{mV}$ | q / e_0 |
|-----|-----------------|-----------------------|----------------|
| Pip | $0,72 \pm 0,02$ | -34 ± 2 | $-3,4 \pm 0,5$ |
| FET | $0,81 \pm 0,02$ | -35 ± 2 | $-2,5 \pm 0,3$ |

Die Spannungen der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ stimmen gut miteinander sowie mit $V_{1/2} = -36,5 \text{ mV}$ aus [Abschnitt 4.2](#) überein und liegen im Rahmen der Literaturwerte $-27,5 \text{ mV}$ bzw. -54 mV [[IS99](#), [ZHDA94](#)]. Der Literaturwert für die Ladung pro Untereinheit $q = 2,88 e_0$ und der in [Abschnitt 4.2](#) bestimmte Wert $q = 2,99 e_0$ liegen zwischen denen der FET- und Pipettenmessung.

Die absoluten, maximalen Offenwahrscheinlichkeiten weichen allerdings stärker voneinander ab, als von den errechneten Fehlergrenzen zu erwarten wäre. Dabei entspricht p_{\max}^0 für den FET im Rahmen der Messgenauigkeit dem Literaturwert $p_{\max}^0 = 0,79$ [[IS99](#)], während p_{\max}^0 für die Pipette zu klein ist. Dies kann durch eine zusätzlich auftretende Varianz aufgrund eines veränderlichen Leckstroms erklärt werden. Damit nimmt die Varianz bei Erreichen des stationären Transmembranstroms, d. h. der jeweils stationären Offenwahrscheinlichkeit, nicht in dem Maße ab, wie es zu erwarten wäre, sobald über 50 % der Ionenkanäle geöffnet sind. Also wird beim Fit die maximale Offenwahrscheinlichkeit sowie die Einzelkanalleitfähigkeit unterschätzt und die Kanalzahl überschätzt. Andererseits tritt beim EOSFET offensichtlich kein Leckstrom und somit auch nicht diese Fehlerquelle auf.

Die Offenwahrscheinlichkeiten für Pipette und EOSFET berechnen sich nach [Gleichung 3.10](#) und [Gleichung 3.11](#) direkt und unabhängig voneinander aus der Varianzanalyse des nichtstationären Rauschens ([Abschnitt 3.6](#) und [Abschnitt 5.4](#)); außerdem ist keine Skalierung o. ä. erforderlich. Somit belegt [Abbildung 5.11](#), dass 1. sich die Einzelkanalströme gemäß [Abschnitt 2.2.5](#) in den Spalt übertragen, 2. mit dem EOSFET die elektrischen Signale einzelner Ionenkanäle detektiert werden, 3. mit der theoretischen Beschreibung aus [Abschnitt 2.3](#) die statistische Verteilung der Signale zunächst als Binomialverteilung interpretiert werden kann, 4. daraus auf die Statistik der Einzelkanalströme geschlossen werden kann, 5. diese als auch die davon abgeleiteten Einzelkanaleigenschaften mit der als Referenz verwendeten Pipettenmes-

sung übereinstimmen und 6. die in beiden Fällen so ermittelten Werte den Literaturwerten entsprechen.

5.6 SCHICHTWIDERSTAND ÜBER THERMISCHES RAUSCHEN

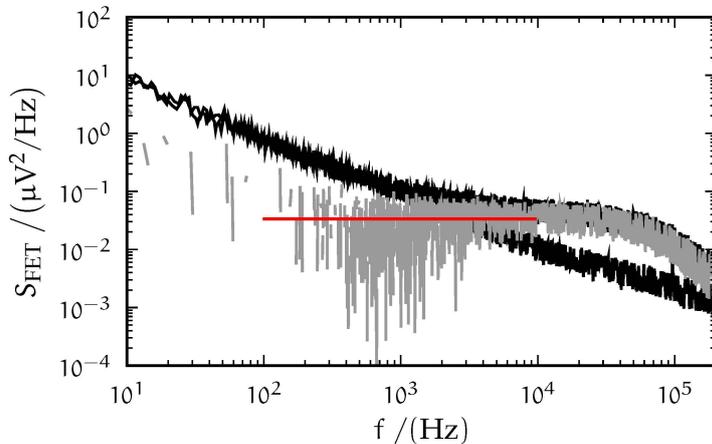


Abbildung 5.12 – Spektrale Leistungsdichten mit adhärirter Zelle und Referenz nach Entfernen der Zelle. Die Differenz (in grau) stellt das thermische Rauschen des Spalts dar. In rot ist der gefittete Mittelwert eingezeichnet aus dem sich der Schichtwiderstand r_j ergibt.

Abschließend soll der Schichtwiderstand r_j über das stationäre, thermische Rauschen bestimmt und mit dem Wert aus der Varianzanalyse des nichtstationären Rauschens verglichen werden.

Abbildung 5.12 stellt dazu exemplarisch die spektralen Leistungsdichten einer Messung mit einer auf dem Gate adhärirten Zelle und einer späteren Referenzmessung nach Entfernen der Zelle dar (siehe Abschnitt 3.5.4). Die Differenz der beiden Spektren resultiert aus den in

Abchnitt 2.2 beschriebenen Spalteigenschaften der Zelle-Transistor-Kopplung und es lassen sich drei Bereiche unterscheiden:

1. Niedrige Frequenzen (bis 100 Hz):
Hier ist das in Abschnitt A.1.3 erläuterte $1/f$ -Rauschen des EOSFET dominant. Unterschiede zwischen den Spektren mit und ohne Zelle resultieren primär aus der Varianz des Schätzers und dem Drift des EOSFET.
2. Mittlere Frequenzen (100 Hz bis 10 000 Hz):
Die adhärirte Zelle verursacht aufgrund des endlichen Widerstands vom Spalt einen konstanten Beitrag zum Rauschen.
3. Hohe Frequenzen (über 10 000 Hz):
Es ist weiterhin ein Beitrag zum Rauschen durch die Zelle erkennbar. Dieser ist jedoch nicht mehr konstant, sondern hat grob Lorentzform [VF06] und spiegelt die nun bedeutsamen Relaxationszeitkonstanten des Systems wider. Überdies kommen bei noch höheren Frequenzen weitere Effekte wie die begrenzte Bandbreite des FET-Verstärkers und das thermische Kanalrauschen zum Tragen.

Für die hier durchgeführten Messungen am Ionenkanal Shaker B oder Wechselspannungsmessungen war nur der Bereich unter 10 kHz relevant, in welchem sich noch kein Einfluss der Relaxationszeitkonstanten zeigte und folglich die in [Abschnitt 2.2](#) gemachten Näherungen Gültigkeit haben. Demnach konnte der Schichtwiderstand bei dieser Zelle über [Gleichung 3.6](#) aus der Differenz der Spektren und dem bekannten Wert für $\overline{\frac{FET}{FET}G} = 0,125$ berechnet werden: $r_j^{\text{therm}} = 16,2 \text{ M}\Omega$.

Entsprechend wurde für die Zellen des vorangegangenen [Abschnitt 5.5](#) vorgegangen und so für jede der 5 Zellen das r_j^{therm} aus dem thermischen Rauschen ermittelt.

Andererseits lässt sich der Schichtwiderstand laut [Gleichung 2.29](#) auch aus den Fits der Ensemble-Mittelwerte und -Varianzen als

$$r_j^{\text{var}} = \frac{\overline{\frac{JM}{FET}G}}{\overline{\frac{JM}{FET}G^2}} \cdot \frac{\Delta\hat{\sigma}_{FET}^2 / \Delta\hat{\sigma}_{Pip}^2}{\hat{V}_{FET}^{\text{ch}} / \hat{I}_M^{\text{ch}}}$$

ermitteln und es muss

$$r_j^{\text{var}} \stackrel{!}{=} r_j^{\text{therm}}$$

gelten. In [Abbildung 5.13](#) ist daher r_j aus dem thermischen Rauschen gegen das aus der Varianzanalyse aufgetragen und die ebenfalls eingezeichnete Gerade mit Steigung 1 veranschaulicht, dass sich die Werte weitgehend entsprechen.

Somit sind die Werte aus der Analyse des nichtstationären Rauschens konsistent mit denen aus dem stationären, thermischen Rauschen. Betrachtet man zudem den Zell-Chip-Abstand d_j , der sich über $d_j = 1 / (\sigma_{EJ} r_j)$ ergibt, wobei die spezifische Leitfähigkeit σ_{EJ} des Elektrolyts im Spalt mit der des Bad-Elektrolyts $\sigma_E = 14,9 \text{ mS/cm}$ als gleich angenommen wird $\sigma_{EJ} \equiv \sigma_E$, so erhält man einen durchschnittlichen Abstand von $\hat{d}_j \approx 45 \text{ nm}$. Dieser stimmt gut mit bekannten Werten für HEK293 Zellen auf SiO_2 bzw. TiO_2 Oberflächen [[Wie09](#), [GF06](#)] überein. Die Analyse des nichtstationären Rauschens liefert also aus der Statistik des durch Ionenkanäle verursachten EOSFET-Signals den Schichtwiderstand r_j und erlaubt damit das Studium des zugrundeliegenden Kopplungsmechanismus.

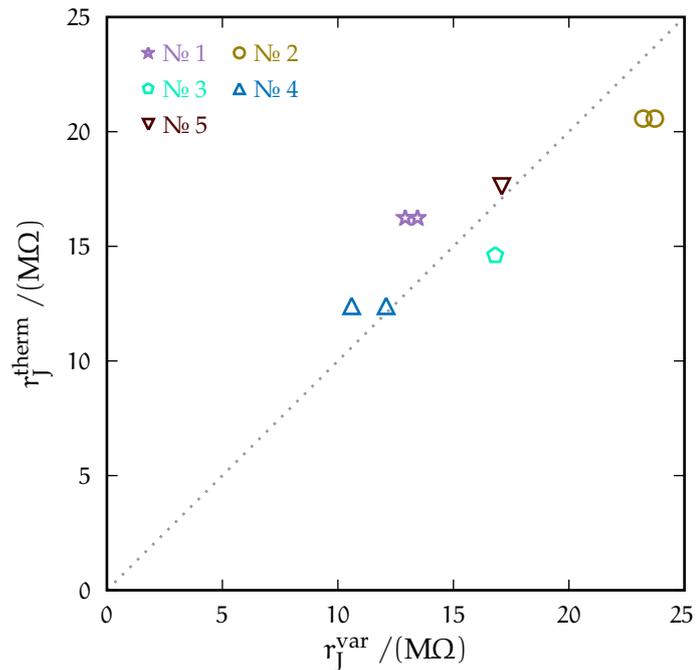


Abbildung 5.13 – Vergleich des Schichtwiderstands aus den Messungen zur Varianz durch Ionenkanäle mit den über das thermische Rauschen bestimmten Werten der 5 ausgewerteten Zellen.

In dieser Doktorarbeit wird das nichtstationäre Rauschen im Zell-Chip-Kontakt, das aus den statistischen Eigenschaften von Ionenkanälen und ihren Einzelkanalströmen resultiert, theoretisch und experimentell untersucht.

Eine Zelle, die auf einem EOSFET-Chip adhärert ist, verursacht bei Aktivierung ihrer Ionenkanäle einen Ionenstrom im Elektrolyt des Spalts und über dessen endlichen Widerstand eine extrazelluläre Spannung. Diese vermittelt die Zell-Chip-Kopplung und kann im Bereich der sensitiven Fläche des Transistors, der Gatefläche, detektiert werden.

Diese Kopplung wird durch das Flächenkontaktmodell d.h. als zweidimensionaler Kern-Mantel-Leiter beschrieben. Da die Dynamik von Ionenkanälen wesentlich langsamer als die größte Relaxationszeitkonstante des Spalts ist, vereinfacht sich das Modell zur zeitunabhängigen, zweidimensionalen Poisson-Gleichung. Sie legt das Spannungsprofil im Spalt fest – bei einer gegebenen Stromdichte durch die Adhäsionsfläche der Zelle. Ihre Lösung wird in dieser Arbeit mittels Greenscher Funktionen und konformen Abbildungen für beliebige Adhäsionsflächen ermittelt. Hierbei setzt sich die Stromdichte aus kapazitiven Strömen sowie dem Gesamtstrom durch die Ionenkanäle zusammen und kann bei einer homogenen Zellmembran und Ionenkanalverteilung als räumlich konstant angenommen werden.

Der Strom eines einzelnen Ionenkanals hat (bei definierter Membranspannung) immer gleiche Größe – der Ionen-

kanal ist entweder geschlossen oder geöffnet mit einer zeitabhängigen Offenerwahrscheinlichkeit und einer Einzelkanalleitfähigkeit, die für die jeweilige Kanalsorte spezifisch ist. Die Signale der einzelnen Ionenkanäle sind dabei unabhängig und identisch verteilt – i.i.d.. Daher folgen bei nur einer aktiven Ionenkanalsorte die Realisierungen des resultierenden Gesamtstromverlaufs einer Binomialverteilung. Zwischen Mittelwert und Varianz besteht ein funktionaler Zusammenhang. Aus diesem ergeben sich Einzelkanalstrom und Kanalzahl über die Analyse des nichtstationären Rauschens.

Wie übersetzt sich dies in das Transistorsignal? Ein Ionenkanal in der adhärerten Membran kann als Punktstromquelle beschrieben werden. Damit ist sein Beitrag zum Spannungsprofil im Spalt über die Greensche Funktion gegeben; und über ihre Quadrierte sein Beitrag zur Varianz. Entsprechend folgt das gesamte Spannungsprofil und die gesamte Varianz aus der Summe der einzelnen Signale d.h. der Mittelung über die Adhäsionsfläche mit gegebener Kanaldichte. Gleichzeitig ist der Transmembranstrom die Summe der Ströme der einzelnen Ionenkanäle. Daraus ergeben sich lineare Zusammenhänge einerseits zwischen den Mittelwerten von Membranstrom und Transistorsignal, sowie andererseits zwischen den Varianzen von Membranstrom und Transistorsignal. Aus beiden zusammen lässt sich dann ein funktionaler Zusammenhang zwischen Mittelwert und Varianz des Transistorsignals

ableiten, der formal dem des Membranstroms gleicht. Allerdings ergeben sich über jenen zunächst nicht der Einzelkanalstrom und die Kanalzahl der Ionenkanäle in der adhären Membran, sondern die Eigenschaften von apparenten Kanälen: die apparente Kanal-Spaltspannung und die Zahl der apparenten Kanäle. Mit einer bekannten Zellgeometrie und damit gegebenen Werten für die Mittelung der Greenschen Funktion und ihrer Quadrierten können diese jedoch umgerechnet und so auf den Einzelkanalstrom sowie die Anzahl der realen Ionenkanäle geschlossen werden. Umgekehrt können die so erhaltenen Einzelkanaleigenschaften mit den Referenz-Werten aus dem Membranstrom verglichen und so der Kopplungsmechanismus des Zell-Transistor-Kontakts studiert werden.

Als Ionenkanal wird der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V eingesetzt und in HEK293 tsA201 Zellen stabil exprimiert. Die EOSFET-Chips sind mit 11 nm TiO_2 beschichtet, um eine langsame, chemische Signalkomponente zu verhindern, die sich bei der ursprünglichen SiO_2 -Oberfläche für Kaliumströme zeigte.

Um den funktionalen Zusammenhang zwischen Mittelwert und Varianz im Experiment zu erfassen, werden Messungen bei verschiedenen Offenwahrscheinlichkeiten der Ionenkanäle und damit Mittelwerten des Membranstroms und des Transistorsignals benötigt. Für die hier eingesetzten, spannungsgesteuerten Kanäle bietet sich an, die Transmembranspannung mittels whole-cell Voltage Clamp vorzugeben und ausgehend von einem Haltepotential die Zelle durch einen Spannungssprung zu depolarisieren. Dabei öffnen sich die Ionenkanäle, sodass die Offenwahrscheinlichkeit von „geschlossen“ (also Null) hin zu ihrem stationären

Wert für die jeweilige Depolarisationshöhe variiert. Dieses Vorgehen wird mehrfach wiederholt und so Membranströme sowie Transistorsignale für aufeinanderfolgende, makroskopisch gleiche Iterationen gewonnen. Daraus lassen sich für jeden (relativen) Zeitpunkt die Ensemble-Mittelwerte und -Varianzen berechnen und durch Analyse des nichtstationären (Ensemble-) Rauschens die Einzelkanaleigenschaften bestimmen.

Zum Vergleich der Eigenschaften des theoretischen Modells mit den von Membranstrom und Transistorsignal erhaltenen Mittelwerten sowie Varianzen und den daraus errechneten Größen, werden die Ionenkanäle und die Zell-Chip-Kopplung zunächst mit Standard-Methoden charakterisiert.

Die Übereinstimmung der in der Theorie hergeleiteten, linearen Zusammenhänge zwischen den Mittelwerten von Membranstrom und Transistorsignal, sowie zwischen den zugehörigen Varianzen, wird an einer exemplarischen Messung gezeigt. Aufbauend darauf liefert die Analyse des nichtstationären Rauschens beim Membranstrom Einzelkanaleigenschaften, die mit den Literaturwerten übereinstimmen und die Quantisierung des Membranstroms determinieren. Beim Transistorsignal folgt der von der Theorie beschriebene funktionale Zusammenhang mit den Parametern Kanal-Spaltspannung sowie Zahl der apparenten Kanäle und damit der Nachweis der quantisierten Antwort von EOSFETs auf die Ströme von Ionenkanälen. Aus dem Einzelkanalstrom und der apparenten Kanal-Spaltspannung folgt, dass die mit dem EOSFET detektierten Transistorsignale einzelner Ionenkanäle kleiner als das Hintergrundrauschen sind.

Die Auswertung weiterer Messungen bekräftigt die an der exemplarischen

Messung betrachtete Übereinstimmung mit der Theorie. Hierbei wird die Einzelkanalleitfähigkeit sowohl über den Membranstrom, als auch über das Transistorsignal ermittelt und beide Werte sind miteinander sowie mit dem Literaturwert konsistent. Desweiteren werden die stationären Offenwahrscheinlichkeiten bei verschiedenen Depolarisationshöhen über die Analyse des nichtstationären Rauschen berechnet. Wiederrum sind diese untereinander und zusätzlich mit der Charakterisierung über eine Standard-Methode konsistent. Abschließend werden die Schichtwiderstände einerseits aus der hier dargelegten Varianzanalyse des nichtstationären Rauschens und andererseits aus dem thermischen Rauschen bestimmt. Die Werte aus Varianzanalyse und thermischen Rauschen entsprechen sich weitgehend und liefern einen Zell-Chip-Abstand, der im Rahmen der mittels FLIC-Mikroskopie gemessenen Werte für vergleichbare Systeme liegt.

ZUSAMMENFASSEND übertragen sich die Einzelkanalströme gemäß der dargelegten Theorie in den Spalt und

werden mit dem EOSFET als quantisierte Antwort detektiert. Dabei sind die einzelnen Spannungsquanten jedoch durch das Hintergrundrauschen verdeckt. Die Analyse des nichtstationären Rauschens im Zell-Chip-Kontakt weist diese nach und ermöglicht damit erstmals das Studium des Kopplungsmechanismus mittels der quantisierten Ströme von Ionenkanälen.

WEITERFÜHREND folgen aus dem Membranstrom die Einzelkanaleigenschaften der gesamten Zellmembran und aus dem Transistorsignal die der Ionenkanäle in der adhärirten Membran. Diese können durch die Analyse des nichtstationären Rauschens miteinander verglichen und so mögliche Unterschiede zwischen freier und adhärirter Membran aufgedeckt werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit bietet die Detektion der Transistorsignale an mehreren Orten, um die Ortsabhängigkeit der Spannungsquanten bzw. der apparenten Kanal-Spaltspannung und damit die Zell-Transistor-Kopplung zu studieren.

ANHANG

A.1 TRANSISTOREN

A.1.1 *Fertigstellung der Chips*

Die Schritte 34 bis 36 aus [Voe06] (Sägen, Kleben und Bonden) vollendeten die Prozessierung des Wafers. Dazu zerteilte die Wafersäge den mit Fotolack geschützten Wafer in einzelne Chips. Ein Bad in Aceton, Isopropanol und schließlich Reinstwasser (ddH_2O) entfernte Lack und verbliebenen Sägestaub von den Chips. Nach dem Trocknen der Chips mit N_2 wurden diese mit Wachs in Keramikpackages geklebt. Daraufhin wurden die Bondpads mit den Kontakten der Packages über einen Aluminiumbonddraht verbunden. Anschließend wurde für die Zellkultur eine Plexiglaskammer mit Silikonkleber einerseits auf den Chip und andererseits auf dem Keramikpackage befestigt. Eine asymmetrische Positionierung der chipseitigen Öffnung der Kulturkammer stellte dabei sicher, dass auf den Gates adhärierte Zellen bei Patch-Clamp-Messungen gut mit den Glas-Pipetten erreicht werden konnten. Zuletzt wurden die Chips mit dem Wafernamen und ihrer jeweiligen Kennung auf dem Wafer beschriftet. Nach 2 Tagen bei 40°C in einem Trockenofen dampften aus dem Kleber keine für die Zellen schädlichen Gase mehr aus.

A.1.2 *Titandioxid-Beschichtung*

Für die Titandioxid-Beschichtung wurde die Wafer-Prozessierung ab Schritt 29 in [Voe06], dem Aufbringen der Fotolack-Maske für die Bondpads, angepasst. Bei der Entwicklung der Chips wurde bereits eine mögliche Beschichtung vorgesehen, sodass noch ein N-Wafer mit p-Kanal EOSFETs zur Verfügung stand. Diesen schützte nach Schritt 28, dem Aufwachsen des Gate-Oxids (6 nm, HTO, dry oxidation), eine zusätzlich aufgebrachte Lackschicht während der mehrjährigen Lagerung. (Daneben gab es noch einen P-Wafer mit n-Kanal EOSFETs, welche jedoch ein höheres gate-bezogenes Rauschen haben. Er wurde für Testzwecke ebenfalls prozessiert.)

Die Lackschicht wurde mit Caroscher Säure entfernt und der Wafer damit zugleich von Verunreinigungen gereinigt. Durch ASM Microchemistry Ltd. (Helsinki, Finnland) wurde eine 11 nm starke TiO_2 -Schicht in einem flow-type atomic-layer-deposition Reactor [Sun89, LR02] auf den Wafer abgeschieden. Daraufhin

wurde o. g. Schritt 29 durchgeführt. Das Freilegen der Bondflächen (Schritt 30) musste jedoch wieder abgewandelt werden, da sich TiO_2 nicht gut mit Flusssäure ätzen lässt. Dies konnte stattdessen mittels Plasmaätzen erreicht werden, wobei eine zur Sicherheit vor zu tiefem Ätzen verbliebene SiO_2 -Schicht noch mit Flusssäure entfernt wurde. Das Metallisieren der Kontaktbereiche (Schritt 31) und der Lift-Off des Metalls (Schritt 32) konnten ohne Modifikation erfolgen.

Da ein Tempern mit Wasserstoff Probleme bei EOSFETs mit TiO_2 -Beschichtung verursacht, wurde Schritt 33 folgendermaßen im RTP-Ofen (rapid thermal processing) verwirklicht: unter einer Atmosphäre von 90 % N_2 und 10 % O_2 wurde anfangs eine Temperatur von 400 °C eingestellt; dann erfolgte innerhalb von 30 s ein Ramp-Up auf 470 °C; diese Temperatur wurde für weitere 240 s gehalten; abschließend kühlte der Wafer in 100 % O_2 ab.

A.1.3 Transistorrauschen

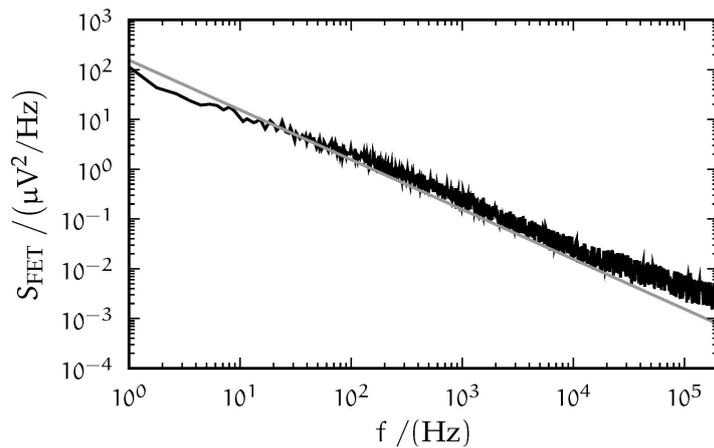


Abbildung A.1 – Geschätzte spektrale Leistungsdichte aus der Messung an einem ECM-bedeckten EOSFET mit 42 Iteration für je 1 Sekunde Aufnahmezeit. Ein Fit für das $1/f$ -Rauschen ergibt eine Rauschleistungsdichte von $0,155 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ bei 1 kHz.

bei niedrigen Frequenzen dominant und charakteristisch für einen MOSFET (oder EOSFET). Für den zugrunde liegenden Mechanismus haben sich 2 Modelle etabliert: nach [Hoo94] ist die Fluktuation der Ladungsträgerbeweglichkeit ursächlich; nach [McW57] ist die Fluktuation der Ladungsträgeranzahl ursächlich. Allerdings konnte sich keines dieser Modelle oder ein Alternatives (z. B. in Form einer Kombination beider [SBF94]) durchsetzen.

Im folgenden werden einzelne Anteile des sich aus vielen Arten zusammensetzenden Gesamttrauschens [JJ65] kurz diskutiert und abschließend die Wahl des Arbeitspunktes begründet (die einzige Einflussmöglichkeit auf das Transistorrauschen im Rahmen dieser Promotion).

$1/f$ -Rauschen

Das nach seiner Frequenzabhängigkeit benannte $1/f$ -Rauschen ist insbesondere

Im McWhorter-Modell bewirken Einfangzentren im kanalnahen Oxid die Fluktuation der Ladungsträgeranzahl. Aus diesem anschaulichen Modell lässt sich die empirische Formel [JBN98]

$$S_{\text{FET},1/f}(f) = \frac{q^2 k_B T \lambda_t N(E_f)}{c_{\text{ox}}^2 W L} \cdot \frac{1}{f}$$

herleiten mit der Ladung q eines Ladungsträgers, der thermischen Aktivierungsenergie $k_B T$, der mittleren Tunnellänge λ_t zwischen den Leitungsbändern von Silizium & Oxid, der Anzahl $N(E_f)$ an Einfangzentren im Oxid mit Fermienergie E_f , der spezifischen Kapazität des Gateoxids c_{ox} und der Breite W & Länge L des Kanals.

Thermisches Kanalrauschen

Aus dem endlichen Widerstand des Kanals resultiert ein thermisches Rauschen [Joh28, Nyq28b]. Allerdings kann der rauschwirksame Widerstand nicht einfach mit $1/g_d$ identifiziert werden, da der Drainleitwert von V_{ds} und V_{gs} abhängt. In [CD98] sind dazu verschiedene Modelle – auch in Abhängigkeit vom Arbeitsbereich – dargestellt. Für einen MOSFET mit „langem Kanal“ gilt

$$S_{\text{I,FET,th}}(f) = \begin{cases} 4k_B T \cdot g_d|_{V_{\text{ds}}=0} & \text{Triodenbereich} \\ \frac{2}{3} \cdot 4k_B T \cdot g_d|_{V_{\text{ds}}=0} & \text{Sättigungsbereich} \end{cases}$$

für das Stromrauschen [Fox93, CD98]. Zum hier relevanten gatebezogenen Spannungsrauschen des Kanals gelangt man über die Steilheit am Arbeitspunkt $g_m = K \cdot V_{\text{ds}}$ bzw. $g_m = K \cdot (V_{\text{gs}} - V_t)$. Man erhält

$$S_{\text{FET,th}}(f) = \frac{S_{\text{I,FET,th}}(f)}{g_m^2} = \frac{4k_B T}{K} \cdot \begin{cases} \frac{(V_{\text{gs}} - V_t)}{V_{\text{ds}}^2} & \text{Triodenbereich} \\ \frac{2}{3 \cdot (V_{\text{gs}} - V_t)} & \text{Sättigungsbereich} \end{cases}$$

mit dem stromlosen Drainleitwert $g_d|_{V_{\text{ds}}=0} = K \cdot (V_{\text{gs}} - V_t)$, der thermischen Aktivierungsenergie $k_B T$ und dem Verstärkungsfaktor $K = \mu c_{\text{ox}} W/L$, der die Beweglichkeit der Ladungsträger μ , die spezifische Kapazität des Gateoxids c_{ox} und die Kanalgeometrie d. h. dessen Breite W und Länge L zusammenfasst.

Verstärker-Rauschen

Das Rauschen des Verstärkers (und der weiteren Komponenten des Setups) ist geringer als das Rauschen eines an den Strom-Spannungs-Wandlers angeschlossenen Eingangswiderstands, der einen typischen Wert für den inversen Drainleitwert am Arbeitspunkt der bc EOsFETs hat. Somit kann dieses vernachlässigt werden. [Voe06]

Betrachtung des gesamten Rauschspektrums

Die in [Abbildung A.1](#) dargestellte Schätzung der spektralen Leistungsdichte stammt aus der Messung eines repräsentativen bc EOSFETs, den die mittels Ag/AgCl-Elektrode kontaktierte ECM bedeckte.

Bis etwa 10 kHz ist im Wesentlichen das $1/f$ -Rauschen zu erkennen und ein $1/f$ -Fit über diesen Bereich liefert eine Rauschleistungsdichte von $0,155 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ bei 1 kHz. Bei höheren Frequenzen tritt auch der Beitrag des thermischen Kanalrauschens zum Vorschein. Das Verstärker-Rauschen ist nicht zu erkennen.

Im Vergleich mit den Spektren aus [[Voe06](#), , [Abbildung 4.8](#)] zeigt sich ein qualitativ ähnlicher Verlauf. Allerdings ist das $1/f$ -Rauschen gegenüber den dortigen bc EOSFETs etwa vierfach erhöht – bei 1 kHz hatten diese eine Rauschleistungsdichte von $\approx 0,04 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$. Jedoch trat das erhöhte Rauschen auch bei ursprünglichen bc EOSFETs ohne TiO_2 -Beschichtung auf, sodass es eine andere Ursache haben muss, die nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Wahl des Arbeitspunktes

Für die Wahl des Arbeitspunktes soll das erreichbare Signal-zu-Rausch-Verhältnis betrachtet werden. Die relevanten Signale liegen im Frequenzbereich von 2 Hz bis 2000 Hz, sodass für das Rauschen die Größe $V_{\text{1fn}} = \int_{2\text{Hz}}^{2\text{kHz}} df S_{\text{FET},1/f}(f)$ eingeführt wird [[Voe06](#)].

In [Abbildung 3.5](#) auf Seite [38](#) ist V_{1fn} für verschiedene Werte von V_{ds} und V_{gs} bei einem exemplarischen, mit ECM bedeckten bc EOSFET dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Rauschen je nach Arbeitspunkt variiert. Auf Basis mehrerer solcher Messungen wurde ein Arbeitspunkt mit $V_{\text{ds}} = -0,6\text{V}$ und $V_{\text{gs}} = -0,1\text{V}$ (siehe auch [Abschnitt 3.1.4](#)) gewählt, bei dem V_{1fn} meist möglichst minimal war. Da V_{1fn} ein gate-bezogenes Spannungsrauschen ist, erhält man dort auch das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

A.2 ZELLEN UND MOLEKULARBIOLOGIE

A.2.1 HEK293 tsA201 Zellen

Die tsA201 Zellen stammen von der European Collection of Cell Cultures (ECACC), № 96121229, und wurden über Sigma-Aldrich, № 96121229, bestellt.

Details

Die verwendeten HEK293 tsA201 Zellen exprimieren das große SV 40 T Antigen stabil [CBGH94]. Daraus resultiert gegenüber gewöhnlicher HEK293 Zellen eine erhöhte Expression von rekombinanten Proteinen [CHS⁺87, CV92, See95]. Die ursprünglichen HEK293 Zellen wurden aus Zellen einer embryonalen Niere durch Transformation (siehe auch [SE62, ZH67]) mit Scherungsfragmenten des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen [GSRN77]. Nach neueren Erkenntnissen ist dabei jedoch nicht gesichert, dass es sich tatsächlich um Nierenzellen handelt, da diese Zelllinie viele Eigenschaften von Nervenzellen in einem frühen Stadium der Differentiation hat [SMAG02]. Einen Überblick der Anwendungen und Eigenschaften von HEK293 Zellen, die sich seit vielen Jahren als Standard-Zelllinie bewährt haben, gibt [TS05].

HEK293T und tsA201 stammen von der 293tsA1609neo Zelllinie [VBM⁺07]. Für diese wurden HEK293 Zellen mit der Mutante tsA1609 des SV 40 T Antigens stabil transfiziert [RCT85, DTH⁺87].

A.2.2 *Ionenkanal Shaker B Δ 6-46 T449V*

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Shaker B ist der prototypische Ionenkanal aus Familie der Shaker-Kaliumkanäle [AS96] und folglich detailliert erforscht [ZHA89, PPSB92, TPI06, CB99] (und bzgl. Einzelkanalleitfähigkeit [ITL⁺88, MY90, HM93, SVSH03]). Er wurde aus der DNA einer Mutante der Fliege *Drosophila melanogaster* isoliert, bei der die Gliedmaße unter Betäubung mit Äther zittern (engl. „shake“) und sich zudem bei elektrophysiologischen Messungen auffällig verbreiterte Aktionspotentiale zeigen [Sa183, PST⁺87, TPS⁺87]. Über die Suche nach homologen DNA-Sequenzen u. a. beim Krallenfrosch, Ratte, Maus und Mensch wurden schließlich viele weitere derartige Kaliumkanäle entdeckt und der Familie der Shaker-Kanäle zugeordnet. Die Namensgebung war dabei vom jeweiligen Labor abhängig, sodass sich bisher kein einheitliches Benennungsschema durchsetzen konnte. Ein mögliches Schema für die Shaker-Kanäle der *Drosophila melanogaster* ist in [Abbildung A.2B](#) dargestellt. Dieses wurde aus einem Review-Artikel [Pon92] zur Familie der Shaker-Kaliumkanäle entnommen, wo auch ein Schema für die homologen Säugetier-Kanäle aufgeführt wird. Eine weitere Nomenklatur stammt von [IR90]. Der hier verwendete Shaker B hat noch die weiteren Namen: Sh B, Shaker 4-4, Shaker H4 und Shaker A2 oder Sh A2. Die beiden letzten folgen dabei dem Schema nach [Pon92] und Shaker 4-4 dem nach [IR90].

Sowohl [Pon92] als auch [IR90] nutzen bei der Nomenklatur, dass die Shaker-Kanäle ihre Vielfalt über Alternative Splicing erreichen. Die Aminosäuresequenz der (4 identischen) Untereinheiten besteht dabei aus einer zentralen Kernregion, die am N-Terminus von 5 und am C-Terminus von 2 alternative Enden

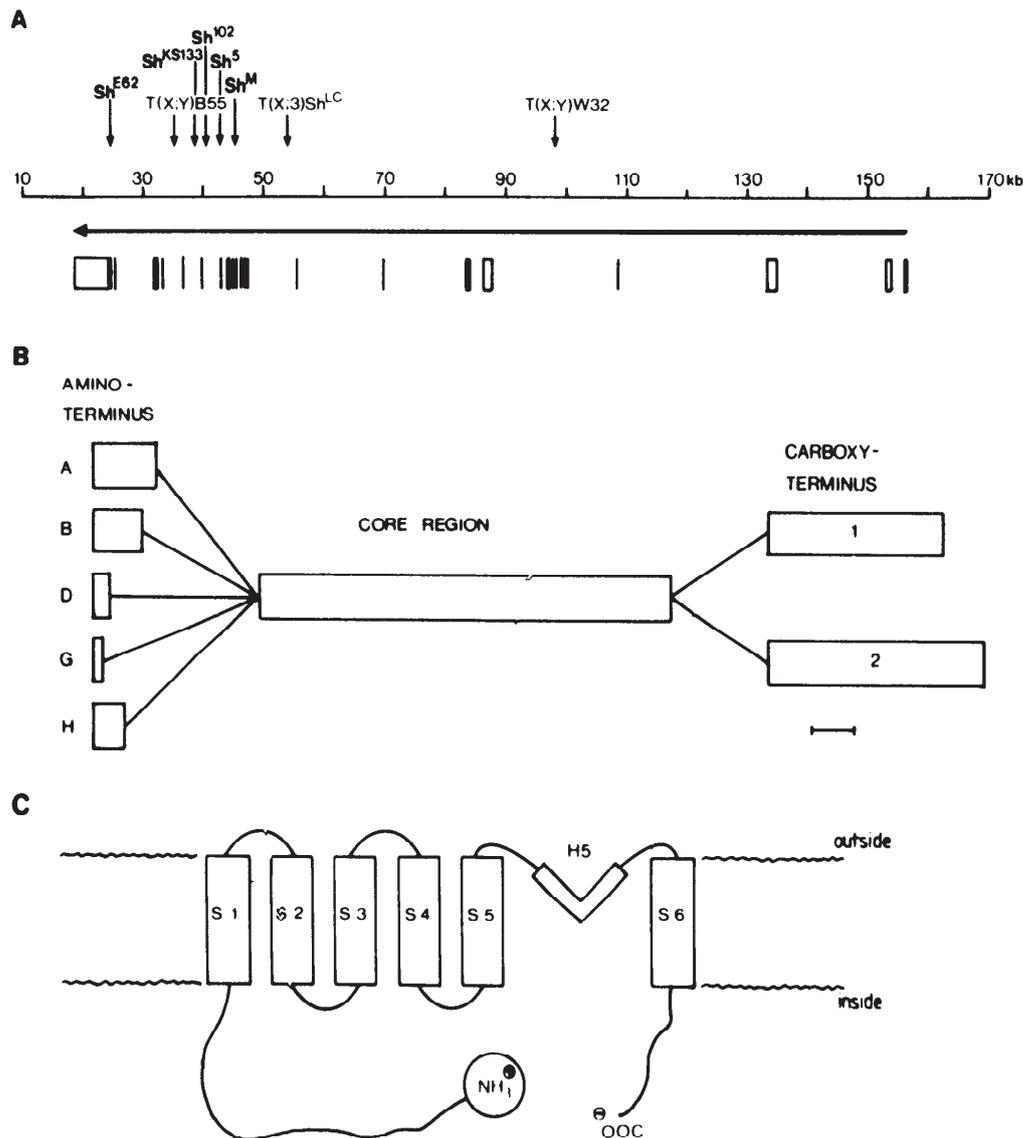


Abbildung A.2: Schematische Struktur des Shaker-Genlocus und der daraus resultierenden Ionenkanaluntereinheiten. (A) Shaker-Genkarte. (B) Allgemeiner Aufbau der Aminosäuresequenz einer Shaker-Kanal Untereinheit. Durch Alternative Splicing gibt es am N-Terminus 5 und am C-Terminus 2 alternative Enden, die die zentrale Kernregion umgeben. Die einzelnen Varianten können somit nach der jeweiligen Kombination benannt werden. So bezeichnet z.B. Sh A2 den Kanal, bei dem die Aminosäuresequenz der 4 gleichen Untereinheiten den N-Terminus A und den C-Terminus 2 haben. (C) Schematischer Aufbau einer Untereinheit (vergleiche [Abbildung 2.1](#)). Dabei entspricht die zentrale Kernregion den hydrophoben Segmenten S1, S2, S3, S4, S5 und H5; der N-Terminus dem sich im Zytoplasma befindlichen Bereich mit einem symbolisierten Ball; der C-Terminus dem hydrophoben S6 und dem restlichen COOH-Terminus. Aus [Pon92].

umgeben wird. Das Shaker-Gen codiert damit 10 verschiedene Ionenkanäle.

DIE 2 INAKTIVIERUNGSMECHANISMEN können nun mit der Aminosäuresequenz in Verbindung gebracht werden. Dazu zeigt [Abbildung A.2C](#) den Aufbau einer Kanaluntereinheit (siehe auch [Abbildung 2.1](#) auf Seite 8). Bei elektrophysiologischen Messungen zur Inaktivierung fällt auf, dass der Ionenstrom bei Depolarisation auf 2 Arten abnimmt. Zum einen tritt eine schnelle Inaktivierung auf, bei der der Kaliumstrom innerhalb weniger Millisekunden stark abnimmt. Nach kurzer Repolarisation kann jedoch wieder ein ähnliches Signal bei erneuter Depolarisation gemessen werden. Zum anderen kommt es zu einer langsamen Inaktivierung. Durch diese bricht der Ionenstrom zwar nicht schnell sondern mit einer größeren Zeitkonstante ein, jedoch wird dieser Effekt auch nicht durch eine kurze Repolarisation wieder aufgehoben.

In [\[IR90\]](#) hat sich zudem herausgestellt, dass die schnelle Inaktivierung durch die alternativen N-Termini beeinflusst wird, während die langsame bei den 2 alternativen C-Termini verschieden ist.

Der für die schnelle Inaktivierung bei Natriumkanälen bekannte Mechanismus [\[AB77\]](#) konnte auf die Shaker-Kanäle übertragen werden [\[HZA90, ZHA90\]](#). In diesem „ball and chain Modell“ bewegt sich der in [Abbildung A.2C](#) dargestellte Ball am N-Terminus an einer Aminosäure-Kette zur Porenöffnung im Zellinneren und blockiert so den Ionenstrom. Dieser Ball kann enzymatisch (mit Pronase) oder gentechnisch entfernt werden und das Ausbleiben der schnellen N-Typ Inaktivierung bestätigt das vorgeschlagene Modell.

Erst nach Entfernen dieser N-Typ Inaktivierung wird die langsame Inaktivierung deutlich, die auf einem anderen Mechanismus basieren muss [\[HZA91\]](#), da hier Mutationen in der C-terminalen Region Einfluss haben. Diese C-Typ Inaktivierung rührt von einer kollektiven Änderung der äußeren Porenöffnung her und beeinflusst zudem die Ionenselektivität im inaktivierten Zustand [\[BY95, SSH96, SKRH97\]](#).

Beim hier verwendeten Kanal Shaker B wurde die schnelle N-Typ Inaktivierung durch die Deletion der Aminosäuren 6-46 und die langsame C-Typ Inaktivierung durch die Punktmutation von Threonin zu Valin an der Stelle 449 entfernt [\[LHHA93\]](#). Der so erhaltene Kaliumkanal Shaker B $\Delta 6-46$ T449V hat folglich ein für diese Arbeit günstiges Signalverhalten.

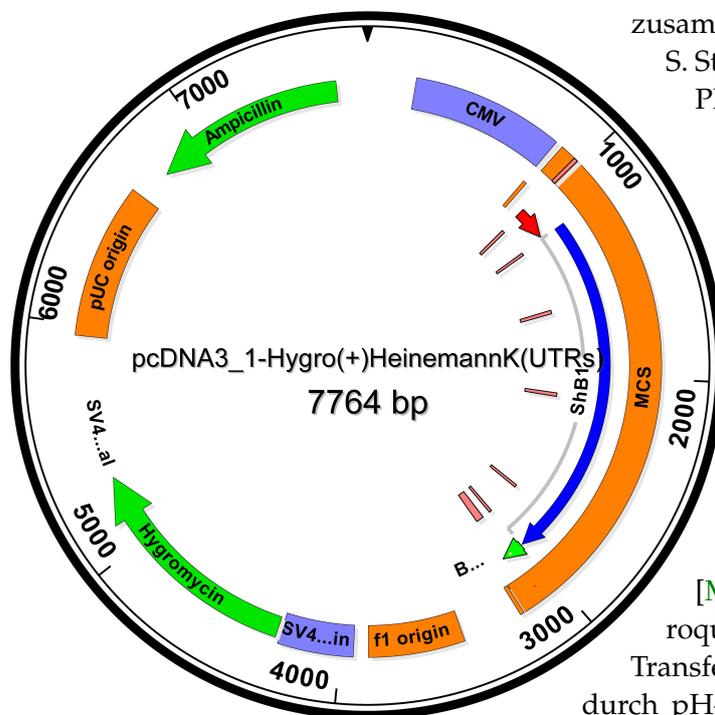
A.2.3 Ursprungsplasmid Shaker B $\Delta 6-46$ T449V

Das Plasmid mit der DNA-Sequenz für den Shaker B $\Delta 6-46$ T449V Kanal stellte uns S.H. Heinemann zur Verfügung.

A.2.4 Vektor pcDNA3.1/Hygro⁽⁺⁾

Der Vektor pcDNA3.1/Hygro⁽⁺⁾ besitzt für die Selektion transfizierter Zellen eine Hygromycin B Resistenz (und eine Ampicillin-Resistenz für transformierte Bakterien). Er wurde über Invitrogen und No. V870-20 bestellt.

A.2.5 Plasmid, Transfektion und stabile Zelllinie



Unter Leitung von K. Scheidt wurden zusammen mit M. Morawetz und S. Stumhofer die Zellen mit dem Plasmid transfiziert. Dazu wurde das Gen mittels PCR aus dem Ursprungsplasmid amplifiziert, aufgereinigt und so das Insert nach Restriktion über Ligation in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pcDNA3.1/Hygro⁽⁺⁾ umkloniert.

Die Transfektion der tsA201 Zellen erfolgte mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation [Mö3]. Das zugesetzte Chloroquin erhöht die Effizienz der Transfektion, indem es die DNA u. a.

durch pH-vermittelte Hemmung der lysosomalen Nukleasen schützt [LM83, CO87].

Abbildung A.3 – Plasmid

Das von [Sch09] weitgehend übernommene Protokoll für 10 Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser und je 2 mL Nährmedium bestand dabei im Einzelnen aus:

- 24 bis 48 Stunden vor der Transfektion Zellen so splitten, dass bei der Transfektion 40 % bis 60 % Konfluenz erreicht wird und sich die Zellen somit im Wachstum befinden.
- 1 Stunde vor der Transfektion nochmals auf je 2 mL frisches Nährmedium wechseln und Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.

- Direkt vor der Transfektion 2 μL Chloroquin-Stammlösung entsprechend einer Endkonzentration von 25 μM in jedes Schälchen geben und die Zellen für weitere 5 Minuten in den Inkubator stellen.
- Derweil den Transfektionsansatz bereiten:
 - 25 μg DNA (ggf. bei Co-Transfektion vorab aus einzelnen Plasmidlösungen zusammengesetzt) mit 100 μL CaCl_2 -Lösung mischen
 - mit TE-Puffer auf 1 mL auffüllen und mischen
 - 1 mL HeBS (2x) zugeben, mischen und vortexen
 - für 1 Minute ruhen lassen
- Jetzt je 200 μL der Mischung in die Schälchen geben.
- Nach 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 das Medium wechseln.

Am nächsten Tag erfolgte die limitierende Verdünnung, wobei das Nährmedium 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin B zur Selektion enthielt.

Nach 6 bis 8 Wochen waren einzelne durch die limitierende Verdünnung isolierte Klone hochgewachsen und bereit für das Screening. Dabei wurden die Klone nach HEK293-typischen Phänotyp & Wachstum und einem mittleren Transmembranstrom von 8 nA bei Depolarisation auf 40 mV mit whole-cell Patch-Clamp Messungen (siehe [Abschnitt 4.3](#)) ausgewählt. Neben dem Einfrieren passender Klone in ausreichender Anzahl wurde auf eine über mehrere Wochen stabile Kanalexpression und gute Patchbarkeit auf Chips getestet. Hierauf basierte schließlich die Wahl eines Klons für die weiteren Messungen.

A.3 PATCH-CLAMP PROTOKOLL

Das Herstellen eines stabilen whole-cell Voltage Clamps war ein entscheidender Aspekt des gesamten experimentellen Ablaufs aus [Abschnitt 3.5](#). Der Messaufbau dazu ist in [Abschnitt 3.4](#) dargestellt und das ECM-Bad wurde mit einem Ag/AgCl-Pellet wie in [Abschnitt 3.1.1](#) beschrieben elektrisch kontaktiert.

Zunächst wurden die Patch-Pipetten mit einem Puller aus dickwandigen Borosilikat-Glaskapillaren gezogen. Die Parameter für das dreistufige Erhitzen und Ziehen mit abschließendem Feuerpolieren wurden vom Gerätehersteller empfohlen und weiter optimiert, sodass typische Pipettenwiderstände bei 2 M Ω lagen und eine gute Sealbildung ermöglichten. Auf eine Beschichtung der Glaspipetten mit hydrophoben Substanzen (z. B. Sylgard) konnte verzichtet werden, da die Rauschanteile der Pipette (u. a.

Die Form, Beschaffenheit und Sauberkeit der Pipettenspitze sind für einen guten Seal ausschlaggebend.

durch den Flüssigkeitsfilm an der Pipettenaußenseite) für whole-cell Voltage Clamp gegenüber dem Rauschen durch R_A mit C_M vernachlässigt werden können [BBW95]. Zudem betrug C_{St} , die Kapazität der dickwandigen Pipetten zusammen mit weiteren Streukapazitäten der Apparatur, lediglich etwa 6 pF und konnte so problemlos mit dem Patch-Clamp-Verstärker kompensiert werden.

Da die verwendeten Patch-Pipetten nicht backfilling-geeignet waren, wurde zunächst die Spitze der Pipette mit ICM befüllt. Dazu wurde diese in ein kleines Gefäß mit ICM eingetaucht und mittels hinten angebrachten Schlauch und Spritze etwa 10 Sekunden ein Unterdruck erzeugt. Anschließend befüllte eine haarfeine Kanüle die Pipette auf einen ICM-Flüssigkeitsstand von 1,5 cm.

Die Pipette wurde nun im Elektrodenhalter befestigt und eine Ag/AgCl-Elektrode stellte den elektrischen Kontakt her. Über einen Schlauch (luftgefüllt) wurde der Druck eines U-Rohrs mit 5 cm hoher Wassersäule angelegt und so mögliche Verunreinigungen der Pipettenspitze beim weiteren Vorgehen verhindert. Nach Deaktivieren der o. g. Korrekturmechanismen d. h. $V_{Pip^*} = V_{Pip^0} = V_{Pip}$ und $I_{Pip^*} = I_{Pip^0} = I_{Pip}$ wurde die Pipette in die ECM eingetaucht (siehe [Abbildung 3.6](#)).

Die verschiedenen Ionenkonzentrationen von ECM im Bad und ICM in der Pipette verursachen zusammen mit den Elektroden ein Offsetpotential. Folglich floss im angewählten Voltage-Clamp-Modus zunächst ein Pipettenstrom I_{Pip}^0 bzw. $I_{Pip^*}^0$ und die Pipettenspannung $V_{Pip^*}^0$ gegenüber dem Bad war ungleich 0. Die Auto-Korrektur-Funktion („Auto-Zero“) eliminierte diesen, sodass $I_{Pip} = 0 \Leftrightarrow V_{Pip} = 0$ galt. Dabei ist zu beachten, dass diese Korrektur nicht vollständig bzw. fehlerfrei ist. An der Pipettenöffnung entsteht zwischen ICM und ECM aufgrund der verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeiten und Konzentrationen der Ionen ein Übergangspotential, das LJP. Nachdem die Zelle schließlich kontaktiert ist (whole-cell Voltage Clamp, [Abschnitt 3.3.2](#)), entsteht jedoch ein anderes LJP zwischen Zellplasma und ICM. Wobei die Zelle wiederum ausgewaschen wird, sodass lediglich eine Abschätzung der Effekte [BL91] möglich ist. Für diese Doktorarbeit wurde als Anhaltspunkt direkt das LJP von ICM zu ECM mit 4 mV bestimmt, indem eine ICM-befüllte Glaspipette in ein Bad getaucht und der Elektrolyt im Bad von ECM auf ICM (und zurück) gewechselt wurde. Durch die Verwendung einer kommerziellen Salzbrücke zur elektrischen Kontaktierung des Bades, konnte eine Verfälschung der Messung aufgrund des Potentials an der Badelektrode ausgeschlossen werden. Um die weitere Darstellung nicht zu verkomplizieren, wird diese unvollständige aber vor allem kleine Korrektur jedoch unterdrückt.

Nach dem Eintauchen der Patch-Pipette und Auto-Korrektur, wurde ein sich wiederholender, 10 mV großer Testpuls an die Pipette angelegt. So konnte der Pipettenwiderstand $V_{\text{Pip}}/I_{\text{Pip}}$ für das weitere Vorgehen laufend kontrolliert werden.

Nun wurde die Pipette in die Nähe der Zelle gebracht und erneut ein Offsetabgleich durchgeführt. Unter Beobachtung von $V_{\text{Pip}}/I_{\text{Pip}}$ und der Zelle wurde dann die Pipette von oben sehr dicht an die Zelle heran gefahren. Die richtige Position war erreicht, sobald zum einen die durch den Überdruck aus der Pipette ausströmende ICM eine leichte Delle der im DIC sichtbaren Zellmembran verursachte und sich zum anderen $V_{\text{Pip}}/I_{\text{Pip}}$ durch die Nähe von Pipettenöffnung zu Zellmembran leicht erhöhte (je nach Gegebenheiten etwa 10%). Dann wurde der Druck abgelassen und auf einen weiteren Schlauch mit Mundstück über ein 2-Wege-Ventil umgeschaltet. Meist bildete sich spontan ein Gigaseal aus und somit stieg $V_{\text{Pip}}/I_{\text{Pip}}$ auf über $3\text{G}\Omega$. Ansonsten wurde versucht durch leichten Unterdruck (d.h. Saugen am Mundstück des nun mit der Pipette verbundenen Schlauchs) unter Kontrolle des Widerstands einen Gigaseal zu erreichen. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Fortführung der Messung nur bei weitgehend problemloser Sealbildung Sinn hatte. Andernfalls war der whole-cell Voltage Clamp letztlich nicht stabil genug für die Varianzmessung.

In der somit erreichten cell-attached Konfiguration (siehe [Abbildung 3.7](#)) wurde C_{St} über Kompensationsmechanismen des Patch-Clamp-Verstärkers abgeglichen und konnte so fortan ignoriert werden. Das daraufhin angelegte Haltepotential $V_{\text{Pip}} = -60\text{ mV}$ stellte sicher, dass die Zelle beim folgenden Durchbruch nicht depolarisiert wurde und die Kaliumkanäle geschlossen blieben.

Der Durchbruch des Membranausschnitts in der Pipettenöffnung und somit der Übergang zum whole-cell Voltage Clamp aus [Abbildung 3.8](#) wurde erzielt durch wiederholte zunächst schwache und dann stärker werdende Unterdruckpulse. Dazu wurde am Mundstück gesaugt und dieses dann ruckartig aus dem Mund herausgezogen. Besonders das dabei erzeugte, charakteristische „Plopp-Geräusch“ war eine wichtige Kontrolle für das richtige Vorgehen. So konnte nach ausreichend gesammelter Erfahrung ein guter Durchbruch erreicht werden. Dabei kam es vor allem darauf an, dass der Patch stabil d. h. dauerhaft der Zugangswiderstand R_A gering und der Leckwiderstand R_L hoch war.

Nach dem Durchbruch wird die Zelle ausgewaschen und geht zugrunde. Die Geschwindigkeit mit der einzelne Komponenten und Ionen aus der Zelle hinaus bzw. die ICM in die Zelle hinein diffundieren hängt von ihrer Größe, dem Zugangswiderstand R_A und der Zellgröße ab [[PN88](#)]. Bei den hier verwendeten Zel-

len befand sich dieser Prozess nach einigen Minuten im Gleichgewicht und ermöglichte somit stabile Messbedingungen.

Allerdings konnte bereits nach dem Durchbruch das Signal der Zelle d. h. der Transmembranstrom getestet werden. Bei Anlegen einer Pipettenspannung von $V_{\text{Pip}} = 40 \text{ mV}$ wurde ein Strom von $I_{\text{Pip}} = 5 \text{ nA}$ bis 15 nA angestrebt. Bei brauchbarer Zell-Chip-Kopplung entsprach dies einem FET-Signal V_{FET} von 2 mV bis 4 mV . Ein zu geringes Signal macht Messungen aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses unmöglich, während ein zu großer Pipettenstrom aufgrund der in [Abschnitt 3.3.2](#) geschilderten Einschränkungen des whole-cell Voltage Clamp große Fehler in der Messung bedingt und auch die Spannung im Spalt V_j nicht mehr vernachlässigbar ist.

Sofern Signal und Kopplung brauchbar waren, wurde nun der Abgleich durchgeführt. Der verwendete EPC10 Patch-Clamp-Verstärker kann automatisch die Zellparameter bestimmen und es wurde daraufhin das Verschwinden der kapazitiven Transienten überprüft. Zuletzt wurde die Serienwiderstandskompensation auf 80% gestellt, die Zell-Parameter erneut abgeglichen und die Qualität und Stabilität des Abgleichs sowie der Kompensation mit einer erneuten Depolarisation auf 40 mV überprüft.

Anschließend konnte mit den weiteren Messungen begonnen werden. Zwischen den einzelnen Messvorgängen fand eine erneute Kontrolle und Korrektur des Abgleichs und der Kompensation statt, um gute Messbedingungen sicherzustellen oder andernfalls die Messungen verwerfen zu können.

A.4 BERECHNUNGEN ZUR GREENSCHEN FUNKTION

A.4.1 Mittelung über Kreisfläche

Die Greensche Funktion für eine Kreisfläche A_{aj} ist in [Gleichung 2.15](#) gegeben. Die Berechnung von $\overline{a^c G_{aj}}$ d. h. die Mittelung über eine zentrische Kreisfläche A_{aC} mit Radius $a_C \leq a_j$ kann folgendermaßen in 3 Teilrechnungen zerlegt werden:

$$\begin{aligned} \overline{a^c G_{aj}}(a, \theta) &= \frac{1}{\pi a_C^2} \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a_G da_G d\theta_G G_{aj}(a, \theta, a_G, \theta_G) \\ &= \underbrace{\frac{-1}{\pi a_C^2} \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a_G da_G d\theta_G \frac{1}{4\pi} \ln(a_j^2)}_{g_1} \\ &\quad - \underbrace{\frac{1}{\pi a_C^2} \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a_G da_G d\theta_G \frac{1}{4\pi} \ln(a^2 + a_G^2 - 2aa_G \cos(\theta - \theta_G))}_{g_2} \\ &\quad + \underbrace{\frac{1}{\pi a_C^2} \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a_G da_G d\theta_G \frac{1}{4\pi} \ln(a^2 a_G^2 + a_j^4 - 2a_j^2 a a_G \cos(\theta - \theta_G))}_{g_3} \end{aligned}$$

Dabei ist $g_1 = -\ln(a_j^2)/4\pi$. Für g_2 folgt mit $\theta' = \theta - \theta_G$

$$\begin{aligned} -\pi a_C^2 g_2 &= \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a_G da_G d\theta' \frac{1}{4\pi} \ln(a^2 + a_G^2 - 2aa_G \cos(\theta')) \\ &= \int_0^{a_C} \int_0^{\pi} a_G da_G d\theta' \frac{1}{2\pi} \ln(a^2 + a_G^2 - 2aa_G \cos(\theta')) \end{aligned}$$

aus Symmetriegründen. Wir beschränken uns auf den Fall $a \leq a_C$ und teilen die Integration über a_G in die Bereiche $a_G \leq a$ und $a_G \geq a$ auf, sodass sich nach Integration über $d\theta'$ mit [[BSMM00](#), Formel 21.42]

$$\begin{aligned} -\pi a_C^2 g_2 &= \int_0^a a_G da_G \ln(a) + \int_a^{a_C} a_G da_G \ln(a_G) \\ &= \frac{a^2 - a_C^2}{4} + \frac{a_C^2}{2} \ln a_C \end{aligned}$$

ergibt. Mit dem gleichen Vorgehen und aufgrund von $aa_G \leq a_J^2$ ist

$$\begin{aligned} \pi a_C^2 g_3 &= \int_0^{a_C} \int_0^\pi a_G da_G d\theta' \frac{1}{2\pi} \ln(a^2 a_G^2 + a_J^4 - 2a_J^2 a a_G \cos(\theta')) \\ &= \int_0^{a_C} a_G da_G \frac{2\pi}{2\pi} \ln(a_J^2) \\ &= \frac{a_C^2}{2} \ln a_J^2 \quad . \end{aligned}$$

Zusammenfassend erhält man somit

$$\begin{aligned} \overline{a^c G_{aJ}}(a) &= -\frac{\ln(a_J^2)}{4\pi} - \frac{a^2 - a_C^2}{4\pi a_C^2} - \frac{a_C^2}{2\pi a_C^2} \ln a_C + \frac{a_C^2}{2\pi a_C^2} \ln a_J^2 \\ &= \frac{1 - a^2/a_C^2 + \ln(a_J^2/a_C^2)}{4\pi} \end{aligned}$$

für die über eine Kreisfläche mit Radius a_C gemittelte Greensche Funktion G_{aJ} . Schließlich kann $\overline{a^c G_{aJ}}(a)$ ebenfalls über diesen Kreis gemittelt werden und es folgt

$$\begin{aligned} \overline{a^c G_{aJ}} &= \frac{1}{\pi a_C^2} \int_0^{a_C} \int_0^{2\pi} a da d\theta \frac{1 - a^2/a_C^2 + \ln(a_J^2/a_C^2)}{4\pi} \\ &= \frac{1}{2\pi a_C^2} \int_0^{a_C} a da (1 - a^2/a_C^2 - 2\ln(a_C/a_J)) \\ &= \frac{1}{8\pi} - \frac{\ln(a_C/a_J)}{2\pi} \quad . \end{aligned}$$

Bei Mittelung über die gesamte Kreisfläche ergibt sich $\overline{a^j G_{aJ}} = (1 - a^2/a_J^2)/4\pi$ und $\overline{a^j G_{aJ}} = 1/8\pi$.

A.4.2 Forminvarianz

Gegeben sei eine Fläche W_{G^*} in der w -Ebene und eine Greensche Funktion G^* , die

$$\begin{aligned} \nabla_w^2 G^*(\mathbf{w}, \mathbf{w}_G) &= -\delta(\mathbf{w} - \mathbf{w}_G) & \forall \mathbf{w}, \mathbf{w}_G \in W_{G^*} \\ G^*(\mathbf{w}, \mathbf{w}_G) &= 0 & \forall \mathbf{w} \in \partial W_{G^*} \end{aligned}$$

erfüllt.

Gesucht wird eine Greensche Funktion G , die

$$\begin{aligned} \nabla_x^2 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= -\delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_G) & \forall \mathbf{x}, \mathbf{x}_G \in A_{JM} \\ G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= 0 & \forall \mathbf{x} \in \partial A_{JM} \end{aligned}$$

mit der Fläche A_{JM} in der z -Ebene erfüllt.

Gemäß [Abschnitt 2.2.6](#) ist G mit der konformen Abbildung $w = f(z)$, welche A_{JM} in W_{G^*} sowie ∂A_{JM} in ∂W_{G^*} transformiert, über [Gleichung 2.26](#) gegeben und wir berechnen $\nabla_{\mathbf{x}}^2 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G)$. Für die zweifache Ableitung nach x folgt (mit unterdrücktem \mathbf{x}_G) über die Kettenregel

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2}{\partial x^2} G(\mathbf{x}) &= \frac{\partial^2}{\partial x^2} G^*(u(x, y), v(x, y)) \\ &= \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial G^*}{\partial u} \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial G^*}{\partial v} \frac{\partial v}{\partial x} \right) \\ &= \frac{\partial^2 G^*}{\partial u^2} \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \frac{\partial^2 G^*}{\partial v^2} \cdot \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right)^2 \\ &\quad + 2 \cdot \frac{\partial^2 G^*}{\partial u \partial v} \frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial x} \\ &\quad + \frac{\partial G^*}{\partial u} \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial G^*}{\partial v} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \end{aligned}$$

und Analoges für zweifache Ableitung nach y . Zusammen ergibt sich über die Cauchy-Riemannschen Differentialgleichungen

$$\begin{aligned} \nabla_{\mathbf{x}}^2 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) \\ &= \left(\frac{\partial^2 G^*}{\partial u^2} + \frac{\partial^2 G^*}{\partial v^2} \right) \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial y} - \frac{\partial v}{\partial x} \frac{\partial u}{\partial y} \right) \\ &= \begin{vmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} & \frac{\partial u}{\partial y} \\ \frac{\partial v}{\partial x} & \frac{\partial v}{\partial y} \end{vmatrix} \cdot \nabla_{\mathbf{w}}^2 G^*(\mathbf{w}, \mathbf{w}_G) \end{aligned}$$

und mit

$$\delta(\mathbf{w} - \mathbf{w}_G) = \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_G) \left/ \begin{vmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} & \frac{\partial u}{\partial y} \\ \frac{\partial v}{\partial x} & \frac{\partial v}{\partial y} \end{vmatrix} \right.$$

schließlich

$$\begin{aligned} \nabla_{\mathbf{x}}^2 G(\mathbf{x}, \mathbf{x}_G) &= - \begin{vmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} & \frac{\partial u}{\partial y} \\ \frac{\partial v}{\partial x} & \frac{\partial v}{\partial y} \end{vmatrix} \cdot \delta(\mathbf{w} - \mathbf{w}_G) \\ &= -\delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_G) \quad . \end{aligned}$$

Also ist die Gleichung für die Greensche Funktion forminvariant unter der konformen Transformation und die Greensche Funktion G kann über [Gleichung 2.26](#) aus G^* berechnet werden ■

B

VERWENDETE MATERIALIEN

B.1 GERÄTE

| GERÄT | BEZEICHNUNG | HERSTELLER |
|--------------------------|---------------------------|--|
| Bonder | K&S 4523D | Kulicke and Soffa Industries, Willow Grove |
| Computer | Athlon 64, 3.4GHz | |
| Computer | Core i7, 2.6GHz, 12GB RAM | |
| FireWire Farb-CCD-Kamera | DFK 31BF03 | The Imaging Source Europe GmbH, Bremen |
| Inkubator | HERAcell 150 | Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold |
| Leitfähigkeitsmessgerät | InoLab Cond Level 1 | WTW, Weilheim |
| Mask Aligner | MA 4 BSA | Karl Suss, Garching |
| Messkarte | NI USB-6259 | National Instruments |
| Mikromanipulator | MP-285 | Sutter Instruments |
| Mikroskop | Axioskop 2 FS plus | Zeiss |
| Objektiv | ACHROPLAN 40x/0,8 W | Zeiss |
| Osmometer | Osmomat 030 | Gonotec GmbH, Berlin |
| Patch-Clamp Verstärker | EPC10 | HEKA, Lambrecht |
| pH-Meter | Digital-pH-Meter 646 | Knick Messgeräte GmbH, Berlin |
| Pipettenpuller | DMZ-Universal | Zeitz Instruments, München |
| Plasmaätzenanlage | Plasmalab RIE 80+ | Oxford Instruments, Oxfordshire |
| Referenzelektrode | DRIREF-5SH | World Precision Instruments, Berlin |
| Reinstwasseranlage | Milli-Q | Millipore GmbH, Schwalbach |
| RTP-Ofen | STEAG AST100NT | Mattson, Freemont |
| Sputteranlage | LS 730 S | Von Ardenne, Dresden |
| Wafersäge | DAD 320 | Disco, Tokyo |

B.2 SOFTWARE

| BEZEICHNUNG | HERSTELLER |
|-------------------------|---|
| IC Capture | The Imaging Source Europe GmbH, Bremen |
| LabVIEW 7.1 – 2009 | National Instruments |
| MATLAB R2010a | MathWorks, Ismaning |
| Python 2.5 – 3.1 | http://www.python.org/ |
| SAGE 4.1 | http://www.sagemath.org/ |
| Windows Vista Business | Microsoft Corporation |
| Windows XP Professional | Microsoft Corporation |

B.3 LÖSUNGEN

CaCl₂-Lösung

| SUBSTANZ | MENGE |
|-------------------|-------|
| CaCl ₂ | 2,5 M |

gelöst in ddH₂O.

Chloroquin-Stammlösung

| SUBSTANZ | MENGE |
|------------|-------|
| Chloroquin | 25 mM |

gelöst in D-PBS.

extrazelluläre Lösung

| SUBSTANZ | MENGE |
|-------------------|--------|
| NaCl | 135 mM |
| KCl | 5 mM |
| CaCl ₂ | 1,8 mM |
| MgCl ₂ | 1 mM |
| HEPES | 5 mM |

gelöst in Aqua ad iniectabilia, pH = 7,4 mit NaOH & HCl und Osmolalität auf 320 mOsmol/kg mit D-Glucose; spezifische Leitfähigkeit: 14,9 mS/cm.

HeBS (2x)

| SUBSTANZ | MENGE |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 274 mM |
| HEPES | 40 mM |
| D-Glucose | 12 mM |
| KCl | 10 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,4 mM |

gelöst in ddH₂O und pH = 7,05 mit NaOH & HCl.

intrazelluläre Lösung

| SUBSTANZ | MENGE |
|----------|--------|
| KCl | 140 mM |
| HEPES | 5 mM |
| EGTA | 1 mM |

gelöst in Aqua ad iniectabilia, pH = 7,4 mit KOH & HCl und Osmolalität auf 330 mOsmol/kg mit D-Glucose; spezifische Leitfähigkeit: 17,8 mS/cm.

Nährmedium

DMEM – high glucose mit

| SUBSTANZ | MENGE |
|---------------------------|-----------------------|
| L-Glutamin | 2 mM |
| FKS ¹ | 10 % _(v/v) |
| Hygromycin B ² | 200 µg/mL |

¹ nicht bei Kultur auf Chips

² für die Selektion 400 µg/mL

² keines bei Kultur auf Chips oder nicht-transfizierten Zellen

TE-Puffer

| SUBSTANZ | MENGE |
|----------|--------|
| TRIS | 1,0 mM |
| EDTA | 0,1 mM |

gelöst in ddH₂O und pH = 7,6 mit HCl.

B.4 CHEMIKALIEN

| BEZEICHNUNG | QUELLE | N ^o |
|----------------------------------|------------------------|----------------|
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun AG, Melsungen | |
| C5789 Cell Dissociation Solution | Sigma-Aldrich | C5789 |
| CaCl ₂ | Sigma-Aldrich | C-7902 |
| Chloroquin | Sigma-Aldrich | C6628 |
| D-Glucose | Invitrogen | 15023-021 |
| Ethanol | Riedel-de Haen | 32205 |
| Fibronektin | Sigma-Aldrich | F-2006 |
| D-PBS | Invitrogen (Gibco) | 14040-091 |
| D-PBS (calcium- & magnesiumfrei) | Invitrogen (Gibco) | 14190-086 |
| DMEM – high glucose | Sigma-Aldrich | D6546 |
| EDTA | Sigma-Aldrich | E-5134 |
| FKS | Invitrogen (Gibco) | 100270-106 |
| HEPES | BIOMOL GmbH, Hamburg | 05288.1 |
| Hygromycin B | Invitrogen | 10687-010 |
| KCl | Sigma-Aldrich | P-4504 |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich | G3126 |
| Na ₂ HPO ₄ | Sigma-Aldrich | S-5136 |
| NaCl | Sigma-Aldrich | S-5886 |
| Tickopur R36 | Bandelin, Berlin | |
| TRIS | Carl ROTH, Karlsruhe | 4855.2 |

B.5 VERBRAUCHSMATERIAL

| BEZEICHNUNG | HERSTELLER/QUELLE | N ^o |
|----------------------------|---|-----------------|
| Ag/AgCl-Pellet | World Precision Instruments, Berlin | EP2 |
| Borosilikat-Glaskapillaren | Science Products, Hofheim | GB150-10 |
| Haarfeine Kanüle | World Precision Instruments, Berlin | MicroFil 34 |
| Reinraum-Stäbchen | CRTM CleanRoomProducts GmbH (Sanyo), Martinsried | HUBY-340 CA-003 |
| Silikonkleber | Wacker, Stuttgart | ELASTOSIL E43 |
| Zellkulturschalen 35 mm | Becton & Dickinson (Falcon) | 353001 |
| Zellkulturschalen 100 mm | Becton & Dickinson (Falcon) | 353003 |
| Zentrifugenröhrchen 15 mL | Becton & Dickinson (Falcon) | 352096 |

LITERATURVERZEICHNIS

- [AB77] ARMSTRONG, C. M. ; BEZANILLA, F.: Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *The Journal of General Physiology* 70.5 (1977), 567–590
- [AC87] ARMSTRONG, C. ; CHOW, R.: Supercharging: a method for improving patch-clamp performance. *Biophysical Journal* 52.1 (1987), 133–136
- [AGL02] ALVAREZ, O. ; GONZALEZ, C. ; LATORRE, R.: Counting Channels: a tutorial guide on Ion Channel Fluctuation Analysis. *Advan. Physiol. Edu.* 26.4 (2002), 327–341
- [AS96] AIDLEY, D. J. ; STANFIELD, P. R.: *Ion channels: molecules in action*. Cambridge Univ Pr, 1996
- [ASF04] AVILA, G. ; SANDOVAL, A. ; FELIX, R.: Intramembrane Charge Movement Associated with Endogenous K⁺ Channel Activity in HEK-293 Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 24.3 (2004), 317–330
- [BBRS92] BOGGS, P. T. ; BYRD, R. H. ; ROGERS, J. E. ; SCHNABEL, R. B.: User's Reference Guide for ODRPACK Version 2.01—Software for Weighted Orthogonal Distance Regression. *Center for Computing and Applied Mathematics, US Department of Commerce, Gaithersburg, MD* (1992)
- [BBS87] BOGGS, P. T. ; BYRD, R. H. ; SCHNABEL, R. B.: A Stable and Efficient Algorithm for Nonlinear Orthogonal Distance Regression. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing* 8.6 (1987), 1052–1078
- [BBW95] BOULTON, A. A. ; BAKER, G. B. ; WALZ, W.: *Patch-clamp applications and protocols*. Humana Pr Inc, 1995
- [BDBS89] BOGGS, P. T. ; DONALDSON, J. R. ; BYRD, R. h. ; SCHNABEL, R. B.: Algorithm 676: ODRPACK: software for weighted orthogonal distance regression. *ACM Transactions on Mathematical Software (TOMS)* 15 (1989), 348–364
- [BF05] BRITTINGER, M. ; FROMHERZ, P.: Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions. *Applied Physics A* 81.3 (2005), 439–447
- [BF11] BECKER-FREYSENG, C. ; FROMHERZ, P.: Quantised transistor response to ion channels revealed by nonstationary noise analysis. *EPL (Europhysics Letters)* 96 (2011), 38005
- [BFS⁺90] BROWN, P. J. ; FULLER, W. A. ; SOCIETY, A. M. ; STATISTICS, I. o. M. ; MATHEMATICS, S. f. I. ; APPLIED: *Statistical analysis of measurement error models and applications: proceedings of the AMS-IMS-SIAM joint summer research conference held June 10-16, 1989, with support from the National Science Foundation and the U.S. Army Research Office*. American Mathematical Soc., 1990

- [BL91] BARRY, P. H. ; LYNCH, J. W.: Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *Journal of Membrane Biology* 121.2 (1991), 101–117
- [Bri04] BRITTINGER, M.: *Elektrische und chemische Signalübertragung in Zell-Transistor-Chips mit Ionenkanälen*, Technische Universität München, Diss., Oktober 2004
- [BSMM00] BRONSTEIN, I. N. ; SEMENDJAJEW, K. A. ; MUSIOL, G. ; MÜHLIG, H.: *Taschenbuch der Mathematik*. 5., überarb. u. erw. Aufl. Harri Deutsch, 2000
- [BY95] BAUKROWITZ, T. ; YELLEN, G.: Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15.4 (1995), 951–960
- [CB99] CONLEY, E. C. ; BRAMMAR, W. J.: *The Ion Channel Factsbook: Voltage-gated channels*. Academic Press, 1999
- [CBGH94] CHAHINE, M. ; BENNETT, P. B. ; GEORGE, A. L. ; HORN, R.: Functional expression and properties of the human skeletal muscle sodium channel. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 427.1 (1994), 136–142
- [CD98] CHEN, C. H. ; DEEN, M. J.: High frequency noise of MOSFETs I Modeling. *Solid-State Electronics* 42.11 (1998), 2069–2081
- [CG52] CALLEN, H. B. ; GREENE, R. F.: On a Theorem of Irreversible Thermodynamics. *Physical Review* 86.5 (1952), 702–710
- [CHS⁺87] CLASSON, M. ; HENRIKSSON, M. ; SUMEGI, J. ; KLEIN, G. ; HAMMASKJOLD, M.: Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV40 DNA in human lymphoma cells. *Nature* 330.6145 (1987), 272–274
- [CM87] CARRUTHERS, C. ; MAVOR, J.: Low-noise operation of buried channel MOS transistors. *Electronics Letters* 23.22 (1987), 1173–1174
- [CO87] CHEN, C. ; OKAYAMA, H.: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7.8 (1987), 2745–2752
- [CV92] CHASSEVAL, R. d. ; VILLARTAY, J. de: High level transient gene expression in human lymphoid cells by SV40 large T antigen boost. *Nucleic Acids Research* 20.2 (1992), 245–250
- [CW51] CALLEN, H. B. ; WELTON, T. A.: Irreversibility and Generalized Noise. *Physical Review* 83.1 (1951), 34–40
- [Dri96] DRISCOLL, T. A.: Algorithm 756: a MATLAB toolbox for Schwarz-Christoffel mapping. *ACM Trans. Math. Softw.* 22.2 (1996), 168–186
- [DTH⁺87] DUBRIDGE, R. B. ; TANG, P. ; HSIA, H. C. ; LEONG, P. M. ; MILLER, J. H. ; CALOS, M. P.: Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7.1 (1987), 379–387

- [EJH⁺03] EVERSMAAN, B. ; JENKNER, M. ; HOFMANN, F. ; PAULUS, C. ; BREDERLOW, R. ; HOLZAPFL, B. ; FROMHERZ, P. ; MERZ, M. ; BRENNER, M. ; SCHREITER, M. ; GABL, R. ; PLEHNERT, K. ; STEINHAUSER, M. ; ECKSTEIN, G. ; SCHMITTLANDSIEDEL, D. ; THEWES, R.: A 128 × 128 CMOS biosensor array for extracellular recording of neural activity. *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 38.12 (2003), 2306–2317
- [FGMM10] FRANCIS, F. ; GARCIA, M. R. ; MASON, O. ; MIDDLETON, R. H.: A Mathematical Model for Voltage Gated Ion-channel Stationary Conductance. *Journal of Theoretical Biology* (2010)
- [FK51] FATT, P. ; KATZ, B.: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *The Journal of Physiology* 115.3 (1951), 320–370
- [FMW93] FROMHERZ, P. ; MÜLLER, C. O. ; WEIS, R.: Neuron transistor: Electrical transfer function measured by the patch-clamp technique. *Physical Review Letters* 71.24 (1993), 4079–4082
- [FOVW91] FROMHERZ, P. ; OFFENHAUSSER, A. ; VETTER, T. ; WEIS, J.: A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science* 252.5010 (1991), 1290–1293
- [Fox93] FOX, R. M.: Comments on circuit models for MOSFET thermal noise. *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 28.2 (1993), 184–185
- [FP98] FAN, J. ; PALADE, P.: Perforated Patch Recording with beta-escin. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 436.6 (1998), 1021–1023
- [Fro03] FROMHERZ, P.: Neuroelectronic interfacing: Semiconductor chips with ion channels, nerve cells, and brain. *Nanoelectronics and information technology* (2003), 781–810
- [GF06] GLEIXNER, R. ; FROMHERZ, P.: The Extracellular Electrical Resistivity in Cell Adhesion. *Biophysical Journal* 90.7 (2006), 2600–2611
- [GSC00] GENTET, L. J. ; STUART, G. J. ; CLEMENTS, J. D.: Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons. *Biophysical Journal* 79.1 (2000), 314–320
- [GSRN77] GRAHAM, F. L. ; SMILEY, J. ; RUSSELL, W. C. ; NAIRN, R.: Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36.1 (1977), 59–72
- [Hab04] HABERMAN, R.: *Applied Partial Differential Equations*. 4. Upper Saddle River, NJ : Pearson Education, 2004
- [HC92] HEINEMANN, S. ; CONTI, F.: Nonstationary noise analysis and application to patch clamp recordings. *Methods in Enzymology* 207 (1992), 131–148
- [HH52] HODGKIN, A. L. ; HUXLEY, A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117.4 (1952), 500–544

- [HK55] HODGKIN, A. L. ; KEYNES, R. D.: The potassium permeability of a giant nerve fibre. *The Journal of Physiology* 128.1 (1955), 61–88
- [HM88] HORN, R. ; MARTY, A.: Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *The Journal of General Physiology* 92.2 (1988), 145–159
- [HM93] HEGINBOTHAM, L. ; MACKINNON, R.: Conduction properties of the cloned Shaker K⁺ channel. *Biophysical Journal* 65.5 (1993), 2089–2096
- [HMN⁺81] HAMILL, O. P. ; MARTY, A. ; NEHER, E. ; SAKMANN, B. ; SIGWORTH, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 391.2 (1981), 85–100
- [Hoo94] HOOGE, F. N.: 1/f noise sources. *IEEE Transactions on Electron Devices* 41.11 (1994), 1926–1935
- [HSW76] HATERT, R. ; SINON, R. ; WIELE, F. Van d.: Experimental and theoretical study of buried channel MOS structures. *physica status solidi (a)* 36.1 (1976), 235–246
- [Hun07] HUNTER, J. D.: Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science and Engineering* 9.3 (2007), 90–95
- [HZA90] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. ; ALDRICH, R.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250.4980 (1990), 533–538
- [HZA91] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7.4 (1991), 547–56
- [IR90] IVERSON, L. ; RUDY, B.: The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the Shaker gene of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 10.9 (1990), 2903–2916
- [IS99] ISLAS, L. D. ; SIGWORTH, F. J.: Voltage Sensitivity and Gating Charge in Shaker and Shab Family Potassium Channels. *The Journal of General Physiology* 114.5 (1999), 723–742
- [ITL⁺88] IVERSON, L. E. ; TANOUYE, M. A. ; LESTER, H. A. ; DAVIDSON, N. ; RUDY, B.: A-type potassium channels expressed from Shaker locus cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.15 (1988), 5723–5727
- [JBN98] JAKOBSON, C. ; BLOOM, I. ; NEMIROVSKY, Y.: 1/f Noise in CMOS transistors for analog applications from subthreshold to saturation. *Solid-State Electronics* 42.10 (1998), 1807–1817
- [JF80] JOBSON, J. D. ; FULLER, W. A.: Least Squares Estimation when the Covariance Matrix and Parameter Vector are Functionally Related. *Journal of the American Statistical Association* 75.369 (1980), 176–181

- [JJ65] JORDAN, A. G. ; JORDAN, N. A.: Theory of noise in metal oxide semiconductor devices. *IEEE Transactions on Electron Devices* 12.3 (1965), 148–156
- [Joh28] JOHNSON, J. B.: Thermal Agitation of Electricity in Conductors. *Physical Review* 32.1 (1928), 97–109
- [JOP⁺01] JONES, E. ; OLIPHANT, T. ; PETERSON, P. et al.: *SciPy: Open source scientific tools for Python*. 2001 <http://www.scipy.org/>
- [JSCW02] JIANG, B. ; SUN, X. ; CAO, K. ; WANG, R.: Endogenous KV channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 238.1 (2002), 69–79
- [Kee08] KEENER, J. P.: Invariant manifold reductions for Markovian ion channel dynamics. *Journal of Mathematical Biology* 58.3 (2008), 447–457
- [Kee09] KEENER, J. P.: Exact reductions of Markovian dynamics for ion channels with a single permissive state. *Journal of Mathematical Biology* 60.4 (2009), 473–479
- [KM70] KATZ, B. ; MILEDI, R.: Membrane Noise produced by Acetylcholine. *Nature* 226.5249 (1970), 962–963
- [KM72] KATZ, B. ; MILEDI, R.: The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *The Journal of Physiology* 224.3 (1972), 665–699
- [LCM05] LONG, S. B. ; CAMPBELL, E. B. ; MACKINNON, R.: Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* 309.5736 (2005), 897–903
- [LHHA93] LÓPEZ-BARNEO, J. ; HOSHI, T. ; HEINEMANN, S. H. ; ALDRICH, R. W.: Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors & Channels* 1.1 (1993), 61–71
- [LJJ92] LI, M. ; JAN, Y. ; JAN, L.: Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257.5074 (1992), 1225–1230
- [LM83] LUTHMAN, H. ; MAGNUSSON, G.: High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Research* 11.5 (1983), 1295–1308
- [LR02] LESKELÄ, M. ; RITALA, M.: Atomic layer deposition (ALD): from precursors to thin film structures. *Thin Solid Films* 409.1 (2002), 138–146
- [Mö3] MÜLHARDT, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. A. Spektrum-Akademischer Vlg, 2003
- [Mac91] MACKINNON, R.: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350.6315 (1991), 232–235

- [MC90] MILTON, R. L. ; CALDWELL, J. H.: How do patch clamp seals form? A lipid bleb model. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 416.6 (1990), 758–765
- [McW57] MCWHORTER, A. L.: $1/f$ noise and germanium surface properties. In: KINGSTON, R. H. (Hrsg.): *Semiconductor Surface Physics*. Philadelphia : University of Pennsylvania Press, 1957, 207–228
- [MGKL93] MAROM, S. ; GOLDSTEIN, S. A. ; KUPPER, J. ; LEVITAN, I. B.: Mechanism and modulation of inactivation of the Kv3 potassium channel. *Receptors & Channels* 1.1 (1993), 81–88
- [Mos03] MOSIG, J. R.: Static Green's functions with conformal mapping and MATLAB. *IEEE Antennas and Propagation Magazine* 45.5 (2003), 123– 135
- [MY90] MACKINNON, R. ; YELLEN, G.: Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* 250.4978 (1990), 276–279
- [NR07a] NEKOUZADEH, A. ; RUDY, Y.: Statistical properties of ion channel records. Part I. Relationship to the Macroscopic Current. *Mathematical biosciences* 210.1 (2007), 291–314
- [NR07b] NEKOUZADEH, A. ; RUDY, Y.: Statistical properties of ion channel records. Part II: Estimation from the macroscopic current. *Mathematical Biosciences* 210.1 (2007), 315–334
- [NS76] NEHER, E. ; SAKMANN, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260.5554 (1976), 799–802
- [Nyq28a] NYQUIST, H.: Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *American Institute of Electrical Engineers, Transactions of the* 47.2 (1928), 617–644
- [Nyq28b] NYQUIST, H.: Thermal Agitation of Electric Charge in Conductors. *Physical Review* 32.1 (1928), 110–113
- [OW94a] OPSAHL, L. ; WEBB, W.: Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophysical Journal* 66.1 (1994), 75–79
- [OW94b] OPSAHL, L. ; WEBB, W.: Transduction of membrane tension by the ion channel alamethicin. *Biophysical Journal* 66.1 (1994), 71–74
- [PF09] PEITZ, I. ; FROMHERZ, P.: Electrical interfacing of neurotransmitter receptor and field effect transistor. *The European Physical Journal E* 30.2 (2009), 223–231
- [Pie90] PIERRET, R. F.: *Field Effect Devices*. 2nd ed. Prentice Hall, 1990
- [PN88] PUSCH, M. ; NEHER, E.: Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 411.2 (1988), 204–211
- [Pon92] PONGS, O.: Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiological reviews* 72.4 Suppl (1992), 69–88

- [PPSB92] PEROZO, E. ; PAPA ZIAN, D. ; STEFANI, E. ; BEZANILLA, F.: Gating currents in Shaker K⁺ channels. Implications for activation and inactivation models. *Biophysical Journal* 62.1 (1992), 160–171
- [PST⁺87] PAPA ZIAN, D. ; SCHWARZ, T. ; TEMPEL, B. ; JAN, Y. ; JAN, L.: Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 237.4816 (1987), 749–753
- [RCGW91] RAE, J. ; COOPER, K. ; GATES, P. ; WATSKY, M.: Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *Journal of Neuroscience Methods* 37.1 (1991), 15–26
- [RCT85] RIO, D. ; CLARK, S. ; TJIAN, R.: A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science* 227.4682 (1985), 23–28
- [RF91] RAE, J. ; FERNANDEZ, J.: Perforated Patch Recordings in Physiology. *News Physiol Sci* 6.6 (1991), 273–277
- [RR95] RAY, B. K. ; RAY, K. S.: A new split-and-merge technique for polygonal approximation of chain coded curves. *Pattern Recognition Letters* 16.2 (1995), 161–169
- [RSS91] RUKNUDIN, A. ; SONG, M. J. ; SACHS, F.: The Ultrastructure of Patch-Clamped Membranes: A Study Using High Voltage Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology* 112.1 (1991), 125–134
- [S⁺09] STEIN, W. et al.: *Sage Mathematics Software (Version 4.1)*. 2009 <http://www.sagemath.org>
- [Sal83] SALKOFF, L.: Genetic and Voltage-clamp Analysis of a *Drosophila* Potassium Channel. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 48 (1983), 221–231
- [Sar93] SARKAR, D.: A simple algorithm for detection of significant vertices for polygonal approximation of chain-coded curves. *Pattern Recognition Letters* 14.12 (1993), 959–964
- [SBF94] SCOFIELD, J. H. ; BORLAND, N. ; FLEETWOOD, D. M.: Reconciliation of different gate-voltage dependencies of 1/f noise in n-MOS and p-MOS transistors. *IEEE Transactions on Electron Devices* 41.11 (1994), 1946–1952
- [SBK⁺89] SANSOM, M. ; BALL, F. ; KERRY, C. ; MCGEE, R. ; RAMSEY, R. ; USHERWOOD, P.: Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating. A comparison with experimental data from two ion channels. *Biophysical Journal* 56.6 (1989), 1229–1243
- [SCBP93] SHEN, N. V. ; CHEN, X. ; BOYER, M. M. ; PFAFFINGER, P. J.: Deletion analysis of K⁺ channel assembly. *Neuron* 11.1 (1993), 67–76
- [Sch09] SCHEIDT, K.: *Kapazitive Aktivierung von Calciumkanälen mit Halbleiterchips*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2009

- [SE62] SHEIN, H. M. ; ENDERS, J. F.: Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48 (1962), 1164–1172
- [See95] SEED, B.: Developments in expression cloning. *Current Opinion in Biotechnology* 6.5 (1995), 567–573
- [SF06] SCHMIDTNER, M. ; FROMHERZ, P.: Functional Na⁺ Channels in Cell Adhesion probed by Transistor Recording. *Biophysical Journal* 90.1 (2006), 183–189
- [SH97] STEFFAN, R. ; HEINEMANN, S. H.: Error estimates for results of nonstationary noise analysis derived with linear least squares methods. *Journal of Neuroscience Methods* 78.1-2 (1997), 51–63
- [Sha49] SHANNON, C.: Communication in the Presence of Noise. *Proceedings of the IRE* 37.1 (1949), 10–21
- [SHM⁺01] STRAUSS, U. ; HERBRIK, M. ; MIX, E. ; SCHUBERT, R. ; ROLFS, A.: Whole-cell patch-clamp: true perforated or spontaneous conventional recordings? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 442.4 (2001), 634–638
- [Sig80] SIGWORTH, F. J.: The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *The Journal of Physiology* 307.1 (1980), 97–129
- [Sig81] SIGWORTH, F.: Interpreting power spectra from nonstationary membrane current fluctuations. *Biophysical Journal* 35.2 (1981), 289–300
- [Sig86] SIGWORTH, F. J.: The patch clamp is more useful than anyone had expected. *Federation Proceedings* 45.12 (1986), 2673–2677
- [SJG09] SHOU, Q. ; JIANG, Q. ; GUO, Q.: The closed-form solution for the 2D Poisson equation with a rectangular boundary. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical* 42.20 (2009), 205202
- [SKRH97] STARKUS, J. G. ; KUSCHEL, L. ; RAYNER, M. D. ; HEINEMANN, S. H.: Ion Conduction through C-Type Inactivated Shaker Channels. *The Journal of General Physiology* 110.5 (1997), 539–550
- [SMAG02] SHAW, G. ; MORSE, S. ; ARARAT, M. ; GRAHAM, F. L.: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal* 16.8 (2002), 869–871
- [SMF01] STRAUB, B. ; MEYER, E. ; FROMHERZ, P.: Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing. *Nature Biotechnology* 19.2 (2001), 121–124
- [SN95] SAKMANN, B. (Hrsg.) ; NEHER, E. (Hrsg.): *Single-Channel Recording*. New York : Plenum Press, 1995
- [SS90] SOKABE, M. ; SACHS, F.: The structure and dynamics of patch-clamped membranes: a study using differential interference contrast light microscopy. *The Journal of Cell Biology* 111.2 (1990), 599–606

- [SS98] SCHOPPA, N. E. ; SIGWORTH, F. J.: Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *The Journal of General Physiology* 111.2 (1998), 313–342
- [SSC99] SHERMAN, A. ; SHRIER, A. ; COOPER, E.: Series resistance compensation for whole-cell patch-clamp studies using a membrane state estimator. *Biophysical Journal* 77.5 (1999), 2590–2601
- [SSH96] SCHLIEF, T. ; SCHÖNHERR, R. ; HEINEMANN, S.: Modification of C-type inactivating Shaker potassium channels by chloramine-T. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 431.4 (1996), 483–493
- [Str10] STRANG, G.: *Wissenschaftliches Rechnen*. 1st Edition. Springer Berlin Heidelberg, 2010
- [Sun89] SUNTOLA, T.: Atomic layer epitaxy. *Materials Science Reports* 4.5 (1989), 261–312
- [SVSH03] STARKUS, J. ; VARGA, Z. ; SCHÖNHERR, R. ; HEINEMANN, S.: Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447.1 (2003), 44–54
- [TPI06] TOMBOLA, F. ; PATHAK, M. M. ; ISACOFF, E. Y.: How Does Voltage Open an Ion Channel? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22.1 (2006), 23–52
- [TPS⁺87] TEMPEL, B. ; PAPAZIAN, D. ; SCHWARZ, T. ; JAN, Y. ; JAN, L.: Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237.4816 (1987), 770–775
- [TS05] THOMAS, P. ; SMART, T. G.: HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51.3 (2005), 187–200
- [VBM⁺07] VENKATACHALAN, S. P. ; BUSHMAN, J. D. ; MERCADO, J. L. ; SANCAR, F. ; CHRISTOPHERSON, K. R. ; BOILEAU, A. J.: Optimized expression vector for ion channel studies in *Xenopus* oocytes and mammalian cells using alfalfa mosaic virus. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 454.1 (2007), 155–163
- [VF06] VOELKER, M. ; FROMHERZ, P.: Nyquist Noise of Cell Adhesion Detected in a Neuron-Silicon Transistor. *Physical Review Letters* 96.22 (2006), 228102
- [Voe06] VOELKER, M.: *Detektion von Aktionspotentialen einzelner Säugetierneurone mit rauscharmen Feldeffekttransistoren nahe der thermodynamischen Meßgrenze*, Technische Universität München, Dissertation, 2006
- [Wat85] WATANABE, T.: Low-noise operation in buried-channel MOSFET's. *Electron Device Letters, IEEE* 6.7 (1985), 317–319
- [WF97] WEIS, R. ; FROMHERZ, P.: Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E* 55.1 (1997), 877–889

- [WG99] WARNER, R. M. ; GRUNG, B. L.: *MOSFET Theory and Design*. New York : Oxford University Press, 1999
- [Wie09] WIEMHÖFER, M.: *Kapazitive Stimulation von Epithel- und Hirngewebe mit oxidierten Siliziumelektroden*, Diss., 2009
- [YC93] YAWO, H. ; CHUHMA, N.: An improved method for perforated patch recordings using nystatin-fluorescein mixture. *The Japanese Journal of Physiology* 43.2 (1993), 267–73
- [YK98] YU, S. P. ; KERCHNER, G. A.: Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Journal of Neuroscience Research* 52.5 (1998), 612–617
- [Zei09] ZEITLER, R. F.: *Detektion von Spannungsfluktuationen in der Adhäsionsregion von Zellen mit Feldeffekttransistoren*, Technische Universität München, Diss., 2009
- [ZH67] ZUR HAUSEN, H.: Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of Virology* 1.6 (1967), 1174–1185
- [ZHA89] ZAGOTTA, W. N. ; HOSHI, T. ; ALDRICH, R. W.: Gating of single Shaker potassium channels in *Drosophila* muscle and in *Xenopus* oocytes injected with Shaker mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86.18 (1989), 7243 –7247
- [ZHA90] ZAGOTTA, W. ; HOSHI, T. ; ALDRICH, R.: Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250.4980 (1990), 568 –571
- [ZHDA94] ZAGOTTA, W. N. ; HOSHI, T. ; DITTMAN, J. ; ALDRICH, R. W.: Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *The Journal of General Physiology* 103.2 (1994), 279 –319
- [ZZXJ98] ZHU, G. ; ZHANG, Y. ; XU, H. ; JIANG, C.: Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *Journal of Neuroscience Methods* 81 (1998), 73–83

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bedanken bei

PROF. DR. PETER FROMHERZ für die klare Themenstellung, seine ausdauernde Betreuung, die offene Tür und seine Diskussionsbereitschaft,

PROF. DR. STEFAN H. HEINEMANN für das Plasmid mit dem Shaker B Δ 6-46 T449V Kanal,

KERSTIN SCHEIDT für den unermüdlichen Einsatz und ihre fachkundige Hilfe bei Molekularbiologie, Zellkultur sowie Elektrophysiologie,

RALF ZEITLER für die anregenden Diskussionen, aufschlussreichen Erklärungen, das Korrekturlesen der Arbeit und sehr viel mehr,

ARMIN LAMBACHER für die Unterstützung im Reinraum und seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft,

FLORIAN FELDERER für die gute Zusammenarbeit und die fachkundigen Reinraumarbeiten,

MICHAELA MORAWETZ für ihre Hilfe bei der Molekularbiologie sowie der Zellkultur und die offenen Ohren in allen Belangen,

STEPHANIE STUMHOFER für ihre zuverlässige Unterstützung in der Molekularbiologie und der Zellkultur,

EVA TOIS für die TiO₂-Beschichtung der Chips,

MORITZ VÖLKER für das Überlassen von Setup und Chips sowie den sachdienlichen Hinweisen zur Weiterprozessierung dieser,

ALLEN MITGLIEDERN DER ABTEILUNG MEMBRAN- UND NEUROPHYSIK für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft,

MEINEN ELTERN für ihre langjährige Unterstützung in allen Belangen und den bedingungslosen Rückhalt,

MEINER GELIEBTEN FRAU, die mich all die Jahre begleitet hat und ohne deren unerschöpfliches Verständnis und Beistand diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.