

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

Elektrische Kopplung von Hirnschnitten mit Feldeffekttransistoren

Brigitte Besl

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 Stutzmann
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Paul Tavan
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 27.03.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 29.05.2001 angenommen.

Zusammenfassung

Die Klärung der Arbeitsweise des Gehirns führte und führt zum Großteil über Einzelzellstudien. Netzwerkeigenschaften des Nervensystems lassen sich jedoch auf der Ebene von Einzelzellen nur unzulänglich diskutieren [Lei 99]. Multi-Site-Recording-Experimente an Tausenden von Nervenzellen können dazu beitragen, Einblick in Netzwerkaktivitäten zu bekommen.

Für das Recording an Hirnschnitten wurden in dieser Arbeit Silizium-Chips mit p-Kanal-Feldeffekttransistoren eingesetzt. Die Kultivierung von Hippocampuschnitten der Ratte nach der Gähwiler-Methode wurde auf den Chips etabliert. Probleme der Stabilität des Siliziumdioxids unter Schnittkulturbedingungen wurden untersucht. Erfolgreich konnte ich elektrische Signale stimulierter Aktivität im Schnitt mit 16 Feldeffekttransistoren (FET) gleichzeitig messen. Verwendet wurden Chips mit einem 4 x 4 FET-Array ebenso wie Chips mit einem linearen Array aus 96 Feldeffekttransistoren.

Die Signalformen der gemessenen Feldpotenziale wurden mit den mit konventionellen Methoden gemessenen Signalen verglichen. Die Signalform auf dem Transistor ist identisch zur Signalform an einer extrazellulären Glaselektrode, jedoch ist die Amplitude des Signals auf dem Transistor etwa doppelt so groß wie die der Glaselektrodenmessung.

Bis zu 100 Ableitpunkte konnten mit einem in Kooperation mit der Firma Siemens entstandenen 2048-Sensoren-Chip ausgelesen werden. Dieser Chip mit einem 3,2 mm x 1,6 mm großem Sensorfeld eignet sich hervorragend für die Verfolgung der Signalausbreitung im Hippocampus, da er den kompletten Schnitt abdeckt. Damit wurden die Voraussetzungen für weitere Messungen mit hochintegrierten, industriell gefertigten Halbleiter-Chips gelegt, die ein dichtes Netz an Ableitpunkten bieten.

1	<i>Auf dem Weg zum Brain Chip</i>	1
2	<i>Hirnschnitte und Feldeffekttransistoren</i>	5
2.1	Der Hippocampus	5
2.2	Feldeffekttransistoren	7
2.3	Extrazelluläre Ableitungen im Nervengewebe	10
	Typische extrazelluläre Ableitungen in einem offenen Feld am Beispiel des Hippocampus	10
	Physikalische Herleitung: Potenziale in einem Volumenleiter	12
	Current Source-Density Analyse	13
3	<i>Methoden</i>	15
3.1	Design, Herstellung und Kennlinien der verwendeten Chips	15
3.1.1	<i>Eigenbau-Chip</i>	<i>15</i>
	Layout	15
	Herstellung	17
	Kennlinien des Eigenbau-Chips	18
3.1.2	<i>Cablos- und Adhesios-Chips</i>	<i>18</i>
	Layout	19
	Kennlinien von Cablos und Adhesios	20
3.1.3	<i>Siemens-Chip</i>	<i>21</i>
	Sensor-Kennlinie des Siemens-Chips	22
3.1.4	<i>Zellkulturkammer für die Kultivierung auf Siliziumchips</i>	<i>23</i>
3.2	Schnittkultur	24
	Präparation	26
	Vorbereitung/Reinigung der Chips	26
	Poly-L-Lysin Beschichtung	27
	Aufziehen der Schnitte	27
	Nissl-Färbung	28
3.3	Aufbau des Messplatzes	29
	Ableitkammer	30
	Stimulation	30
	Extrazelluläre Ableitung mit Glaselektrode	31
	Elektronik	31
	Messplatz für Siemens-Chip Messungen	32

4 *Ergebnisse* **35**

4.1 Probleme bei der Verbindung von Hirnschnittkulturen mit Siliziumdioxid **35**

4.1.1 *Stabilität des Siliziumdioxids* 35

Strukturelle Veränderungen 35

Veränderung der Kennlinien 37

4.1.2 *Visualisierung der Schnittkultur auf stark strukturierten Chips* 42

4.2 Messungen mit den unterschiedlichen Chiptypen **42**

4.2.1 *Eigenbau-Chip* 42

Konstanz der Amplitude 53

Amplitude bei unterschiedlichen Reizstärken 54

4.2.2 *Cablos-Chip* 55

Konstanz der Amplitude 63

Amplitude bei unterschiedlichen Reizstärken 64

4.2.3 *Adhesios-Chip* 65

Konstanz der Amplitude 71

Amplitude bei unterschiedlichen Reizstärken 71

4.2.4 *Messung mit Bicucullin* 72

4.2.5 *Siemens-Chip* 75

5 *Diskussion* **79**

5.1 Dendrosomatische Profile **79**

5.2 Signal/Rausch-Verhältnis **80**

5.3 Vergleich: Planare Metallelektroden – Feldeffekttransistoren **81**

5.4 Vergleich: Glasmikroelektrode – Feldeffekttransistor **82**

5.5 Eindimensionale Current Source-Density Analyse **88**

6 *Ausblick* **91**

Anhang **93**

Lösungen für Schnittkultur 93

Rezepte für Elektrophysiologie und Reizen 94

Tabelle der Geräte im Messaufbau 95

Tabellen für „Vergleich Glasmikroelektrode – Feldeffekttransistor“ 96

Literaturverzeichnis **99**

1 *Auf dem Weg zum Brain Chip*

Zwei bedeutende Forschungsgebiete des vergangenen Jahrhunderts, die Gehirnforschung und die Halbleiterforschung, wurden 2000 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die drei Mediziner Arvid Carlsson, Paul Greengard und Eric Kandel erhielten den Preis wegen ihrer Entdeckungen zur Signalübertragung im Nervensystem. Der Nobelpreis für Physik ging an Zhores Alferov, Herbert Kroemer und Jack Kilby, die mit ihrer Arbeit eine Basis für die Informationstechnologie gelegt haben, und speziell an die ersten beiden für die Entwicklung von Halbleiter-Heterostrukturen, und an letzteren für seinen Anteil an der Entwicklung des integrierten Schaltkreises.

Das Zusammenbringen dieser zwei Gebiete hat ein neues, interdisziplinäres Forschungsfeld hervorgebracht: die Entwicklung von Neuro-Chips, hybride Systeme aus Halbleiter-Chips auf der einen Seite sowie Biomembranen und Nervenzellen auf der anderen Seite. Neuro-Chips können bei der Untersuchung, wie sich Neuronen zu signalübertragenden Bahnen organisieren und wie einzelne Nervenzellen des Gehirns durch synaptische Übertragung miteinander kommunizieren, eingesetzt werden. Durch hochintegrierte Halbleiter-Chips steht ein dichtes Feld an Ableitpunkten zur Verfügung, über die die Aktivität von Nervenzellen verfolgt werden kann. Außerdem sind Neuro-Chips ein Schritt zu der Vision, einmal die Leistungen eines Computers direkt mit der Intelligenz des Menschen zu verbinden.

So wurde in den letzten Jahren die prinzipielle Verwendbarkeit von Silizium-Chips und Feldeffekttransistoren zum Nachweis neuronaler Aktivität in mehreren Arbeiten gezeigt. Diese Arbeiten beschränken sich auf Ableitungen einzelner, maximal zwei miteinander verbundenen Nervenzellen von Invertebraten ([Fro 91], [Jen 97], [Sch 98]) und Vertebraten ([Vas 98]). Ziel ist es dabei, ein einfaches, gut zu charakterisierendes Netzwerk aus dissoziierten Nervenzellen, die auf strukturierten Oberflächen wachsen, zu bekommen, und so die Arbeitsweise des Gehirns in einem bottom-up Versuch zu erforschen.

Dies ist jedoch oft schwieriger als zuerst angenommen. Nervenzellen brechen beim Wachsen entlang strukturierter Bahnen aus diesen aus, und sie suchen sich ihre synaptischen Partner lieber selber, als dass sie einer anderen Nervenzelle aufgezwungen werden.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, bietet sich der top-down Ansatz an, mit Gehirnschnitten als kleinen Netzwerkeinheiten zu arbeiten. 1966 präsentierten Yamamoto & McIlwain die Hirnschnitt- oder Slicetechnik ([Yam 66]). Sie wiesen nach, dass akute Hirnschnitte der adulten Ratte physiologische Eigenschaften zeigen, die Befunden in situ entsprechen.

Die Kultivierung von Gehirnschnitten auf Glassubstraten wurde später u. a. von Gähwiler ([Gah 81]) mit der roller-tube Technik eingeführt. Aufgrund der Tatsache, dass die Cytoarchitektur der Explantate erhalten bleibt wie in der in situ Situation, werden diese Explantate als organotypische Kulturen bezeichnet.

Um nun also Gehirnschnitte mit Silizium-Chips zu verbinden, und so das dichte Ableitfeld eines Halbleiter-Chips auszunützen, war die Fragestellung für diese Arbeit folgende: *Ist es möglich, die Technik der Roller-Gehirnschnittkulturen auf Silizium-Chips anzuwenden und dann die Nervenzellen der kultivierten Schnitte mit den Transistoren der Chips elektrisch zu koppeln?*

Kurzbeschreibung der folgenden Kapitel:

Organotypische Hippocampuskulturen auf Silizium-Chips

In *Kapitel 2* dieser Arbeit wird die Organisation des Hippocampus erläutert (2.1), anschließend wird die Funktionsweise von Elektrolyt-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistoren erklärt (2.2) und die typischen Signalformen extrazellulärer Ableitungen im Hippocampus, wie in der Literatur beschrieben, gezeigt (2.3).

In *Kapitel 3* (Methoden) werden Layout und Herstellung der verwendeten Silizium-Chips dargestellt (3.1) und die Etablierung der Schnittkultur beschrieben (3.2). Es folgt in Absatz 3.3 der Aufbau des Messplatzes.

Elektrische Kopplung der Hippocampuskulturen mit Feldeffekttransistoren

In *Kapitel 4* (Ergebnisse) wird auf die Schwierigkeiten bei der Verbindung von Silizium-Chips und Hirngewebe eingegangen (4.1). Schließlich werden die Ergebnisse der elektrischen Kopplung zwischen den Hippocampuskulturen und den unterschiedlichen Chiptypen vorgestellt (4.2). Die gemessenen Potenziale werden mit den bekannten Feldpotenzialen aus der Literatur verglichen. Außerdem werden die ersten Schritte zur Verbindung von Gehirnschnitten mit hochintegrierten Schaltungen durchgeführt. Die elektrische Kopplung von Hippocampuskulturen mit einem in moderner CMOS-Technologie gefertigten Chip wird gezeigt.

In *Kapitel 5* (Diskussion) werden einige Besonderheiten der Messungen, wie Feldpotenzial-Profile entlang der dendrosomatischen Achse im Hippocampus (5.1), das Rauschen der Transistoren (5.2), der Vergleich der Transistormessungen mit planaren Metallelektroden (5.3) und konventionellen Mikroelektrodenmessungen (5.4) und die eindimensionale Current Source-Density Analyse, angewandt auf die Geometrie „Schnitt auf festem Substrat“ (5.5), erörtert.

2 *Hirnschnitte und Feldeffekttransistoren*

2.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus gehört zum limbischen System des Gehirns, einem alten System, das bei primitiven Wirbeltieren die höchsten Hirnregionen darstellt. Bei Säugetieren hat sich hingegen die Großhirnrinde enorm vergrößert und den Hippocampus eingeschlossen; was die Größe betrifft, ist sie schließlich zur eindeutig dominierenden Struktur geworden.

Übereinstimmung herrscht heute darüber, dass der Hippocampus an komplexer Aktivität wie Gedächtnis und Lernen, aber auch an der Entstehung von pathophysiologischer Aktivität wie der Epilepsie beteiligt ist. Die Speicherung expliziter Gedächtnisinhalte ist bei Säugetieren mit Langzeitpotenzierung im Hippocampus verbunden.

Die Struktur des Hippocampus besitzt eine einfache Organisation und er ist das bevorzugte Modell zur Untersuchung morphologischer und physiologischer Plastizität.

In einem Schnitt bleiben die meisten morphologischen Gegebenheiten des Hippocampus erhalten. In Abbildung 2.1 ist ein Transversalschnitt durch den Hippocampus dargestellt.

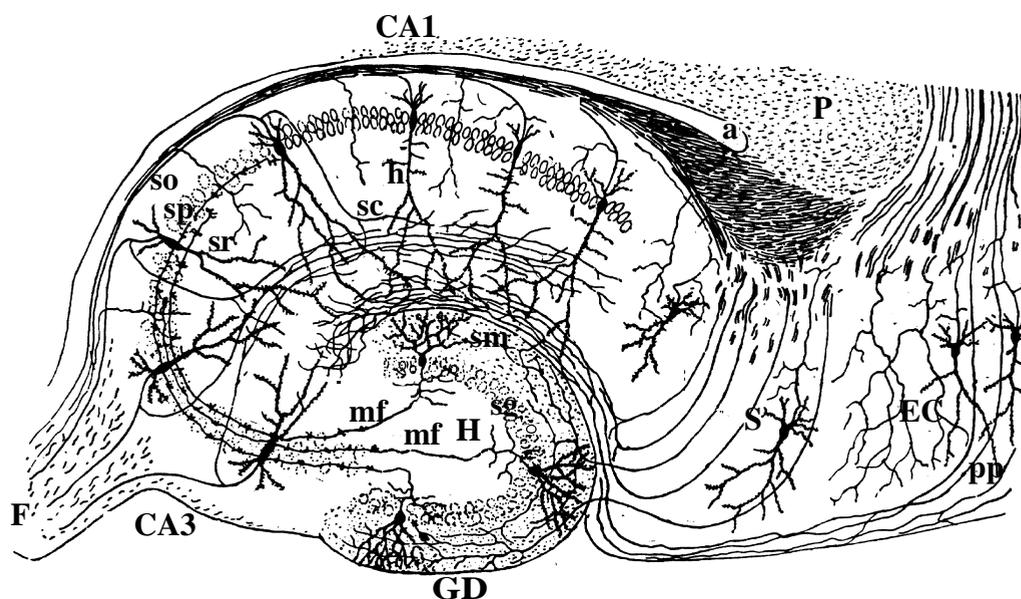


ABBILDUNG 2.1 Schematische Darstellung der wesentlichen Areale, Zelltypen, laminären Schichten und Faserprojektionen eines Hippocampuschnitts.

Areale: EC: Cortex enthorinalis, S: Subiculum, GD: Gyrus dentatus, H: Hilus; sowie der Hippocampus, bestehend aus Regio inferior (CA3) und Regio superior (CA1). F: Fornix, P: periventriculäre graue Substanz

Zelltypen: Körnerzellen im GD, Pyramidenzellen im Hippocampus (h: apikaler Dendrit einer Pyramidenzelle), Subiculum und entorhinalen Cortex; daneben gibt es in allen Arealen eine Vielzahl morphologisch unterschiedlich gestalteter Nicht-Pyramidenzellen.

Laminäre Schichten: Stratum granulosum (sg), Stratum moleculare (sm) – beide im GD; Stratum oriens (so), Stratum pyramidale (sp) und Stratum radiatum (sr) – alle im Hippocampus.

Faserprojektionen: Tractus perforans (pp), Moosfasern (mf), Schaffer Kollaterale (sc) und Alveus (a).

Aus [She 93]

Der Hippocampus ist in Lamellen organisiert, die transversal zu seiner longitudinalen Ausdehnung organisiert sind. Durch diese laminäre Ordnung lassen sich relativ leicht Schnitte präparieren, in denen die intrinsischen Faserprojektionen erhalten bleiben. Auch gewährleistet diese klare Trennung in Zellschichten definierte Untersuchungsbedingungen.

Der dominierende Zelltyp des Hippocampus sind die Pyramidenzellen. Aufgrund morphologischer Unterschiede der Pyramidenzellen wird der Hippocampus in die Regio superior (CA1) und Regio inferior (CA3) unterteilt. Die Zellkörper der Pyramidenzellen sind ausschließlich im Stratum pyramidale (sp), der Zellschicht des Hippocampus, lokalisiert, wobei die apikalen Dendriten in das Stratum radiatum (sr) ragen und die basalen Dendriten in das Stratum oriens (so). Ähnlich ist der Gyrus dentatus (GD) organisiert: Die Zellkörper der Körnerzellen, der dominierende Zelltyp des Dentatus, sind im Stratum granulosum (sg) lokalisiert; der monopolare Dendritenbaum der Zellen ragt in das Stratum moleculare (sm). Diese klare Trennung von Zellkörperschicht und dendritischen Schichten, in denen die Fasern terminieren, geben der Region ihr charakteristisches Aussehen. Neben den beiden erwähnten Zelltypen gibt es in beiden Arealen noch eine Vielzahl anderer Nervenzellen.

Der Hippocampus besitzt drei wichtige afferente Verbindungswege, die vom entorhinalen Cortex (EC) bis in die CA1-Region reichen. Im entorhinalen Cortex entspringt der Tractus perforans (pp), und seine Axone enden auf den Dendriten der Körnerzellen im Hilus (H) des Gyrus dentatus. Die Axone dieser Körnerzellen – die Moosfasern (mf) – bilden nun ihrerseits ein Faserbündel und laufen zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region des Hippocampus, wo sie auf dem proximalen Ansatz der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen Synapsen bilden. Die Axone der CA3-Pyramidenzellen wiederum entspringen am basalen Zellpol und verzweigen sich im Stratum oriens (so). Ein Teil der Kollateralen kreuzt die Zellschicht und läuft im Stratum radiatum (sr) als ein schmales Faserband, das als Schaffer-Kollaterale (sc) bezeichnet wird, zur CA1-Region, wo es auf den apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen Synapsen ausbildet. Die CA1-Pyramidenzellen bilden Kollaterale, die im Alveus (a) verlaufen und zur Fimbria (F) projizieren (ebenso die CA3-Pyramidenzellen), wo sie den Hippocampus verlassen. Außerdem verlaufen Kollaterale zurück zum Subiculum (S) und zum entorhinalen Cortex.

Die aus dem entorhinalen Cortex kommende neuronale Erregung durchläuft also einen kompletten „loop“ (EC-GD-CA3-CA1) und verläßt den Hippocampus. Dieser loop ist charakteristisch für den Hippocampus und wird in der Literatur als „trisinaptic pathway“ bezeichnet.

2.2 Feldeffekttransistoren

Zur Messung der evozierten Feldpotenziale in kultivierten Schnitten werden in dieser Arbeit p-Kanal-Anreicherungs-Feldeffekttransistoren verwendet. Im Unterschied zu den sogenannten MOS-FETs (Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect-Transistor), wo das Gateoxid metallisiert ist, erfolgt hier die Kontaktierung des Gates über das Elektrolytbad. Die Gateoberfläche selbst ist metallfrei. Man spricht deshalb auch von EOS-FETs (Electrolyte-Oxide-Semiconductor).

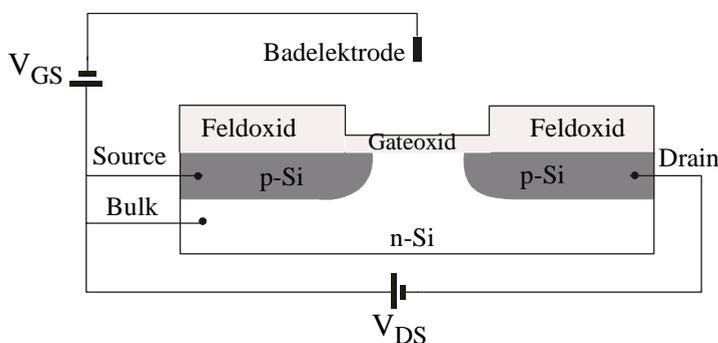


ABBILDUNG 2.2 pnp-Feldeffekttransistor
Zeichnung ist nicht skaliert.

In Abb 2.2 ist der prinzipielle Aufbau eines EOS-Feldeffekttransistors dargestellt. Drain und Source-Bahnen bestehen aus mit Bor dotiertem p-Silizium, während das

Substrat mit Phosphor n-dotiert ist. Gegenüber dem Bad ist der gesamte Chip mit Siliziumdioxid isoliert, im Gatebereich nur mit einer bis zu 10 nm dicken Schicht, im übrigen Bereich mit einem dickerem Feldoxid von bis zu einem Mikrometer. Der Abstand zwischen Source und Drain bestimmt die Kanallänge des FETs.

Die Beschaltung des EOS-FET-Arrays ist so ausgelegt, dass das Elektrolytbad auf Masse liegt. Als Badelektrode dient ein Ag/AgCl-Pellet. Das Sourcepotenzial ist positiv gegenüber dem Badpotenzial. Das Bulk-Substrat wird ebenfalls auf Sourcepotenzial gelegt. Das Drainpotenzial ist negativer als Source.

Wird nun eine negative Gate-Source Spannung V_{GS} angelegt, werden Elektronen aus dem Kanalbereich herausgedrängt und ab der Schwellspannung V_T wird der p-Kanal zwischen Source und Drain leitfähig. Beschreibt man das elektrische Verhalten des Feldeffekttransistors für den Fall $|V_{GS}| > |V_T|$, so ergeben sich zwei wichtige Bereiche.

- Im Bereich mit $|V_{DS}| \ll |V_{GS} - V_T|$ wächst der Strom I_D linear mit zunehmendem $|V_{GS}|$. Dieser Bereich wird der **Triodenbereich** genannt. Hier gilt ([Hor 96]):

$$I_D = \frac{b}{l} \mu_P \frac{\epsilon_0 \epsilon_{ox}}{d_{ox}} \left((V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right) \quad (\text{GL 2.1})$$

Man kann die Konstanten der Kanaldimensionen (Breite b , Länge l), die Dielektrizitätskonstanten für Vakuum und Oxid ($\epsilon_0, \epsilon_{ox}$) und die Beweglichkeit der Löcher μ_P in der Konstante β (Empfindlichkeit) zusammenfassen.

$$\beta = \frac{b}{l} \mu_P \frac{\epsilon_0 \epsilon_{ox}}{d_{ox}} \quad (\text{GL 2.2})$$

Für die Steilheit, das heißt für die Änderung im Drain-Source-Strom bei Variation der Gatespannung und konstanter Drain-Source-Spannung ergibt sich dann im Triodenbereich:

$$\left. \frac{\partial I_D}{\partial V_{GS}} \right|_{V_{DS}} = \beta V_{DS} \quad (\text{GL 2.3})$$

Ist die Steilheit bekannt, so lässt sich aus I_D die Spannung V_{GS} zurückrechnen.

- Im Bereich $|V_{DS}| \gg |V_{GS} - V_T|$ wird der Kanal abgeschnürt und man erhält eine Sättigung des Drain-Source-Stroms I_D . Es ergibt sich in diesem **Sättigungsbereich**:

$$I_D = \frac{1}{2} \beta (V_{GS} - V_T)^2 \quad (\text{GL 2.4})$$

Für die Steilheit folgt:

$$\left. \frac{\partial I_D}{\partial V_{GS}} \right|_{V_{DS}} = \beta (V_{GS} - V_T) \quad (\text{GL 2.5})$$

Für die Messungen werden zuerst die Kennlinien der Transistoren aufgenommen und die Steilheit am Arbeitspunkt (V_{GS} , V_{DS}) bestimmt, um so von Stromänderungen auf Potenzialänderungen am Gate schließen zu können (Kennlinienmessungen in Kapitel 3, Abb.3.3, Abb.3.6, Abb.3.7).

In Abb.2.3 ist die konkrete Messsituation dargestellt.

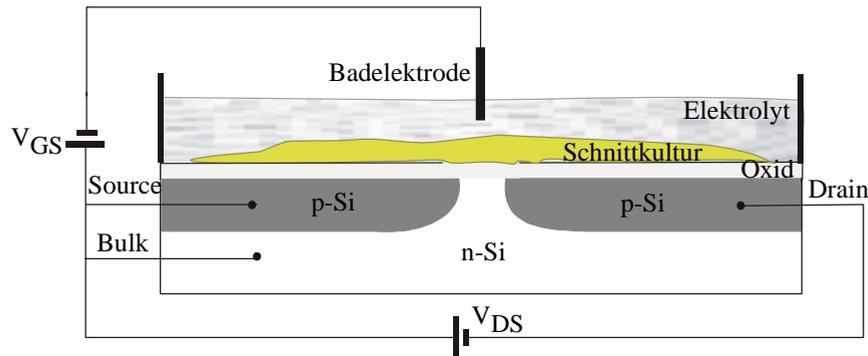


ABBILDUNG 2.3 Hirnschnittkultur auf Feldeffekttransistor

Die Zeichnung ist nicht skaliert. Die Stufe von Feldoxid zu Gateoxid ist hier nicht eingezeichnet, da sie nur 1 μm beträgt, während der Schnitt 50 μm –100 μm dick ist. Das Gate des Transistors (10 μm -Kanal zwischen Source und Drain) ist im Verhältnis zur Größe des Schnittes (etwa 1 mm x 2 mm) überdimensioniert gezeichnet.

Die Hippocampuschnitte (gelb dargestellt in Abb.2.3) wachsen während der Kultivierung auf dem Chip fest. Wird nun in der Messsituation durch extrazelluläre Strompulse synchrone Aktivität einzelner Nervenzellgruppen ausgelöst, entstehen extrazelluläre, lokale Feldpotenziale im Schnitt (Kap. 2.3). Die Gatespannung, die jetzt den Transistor steuert, setzt sich aus der Arbeitspunktspannung V_{GS} und dem lokalen Feldpotenzial V_{FP} über dem Gate zusammen. Da die Arbeitspunktspannung V_{GS} bekannt ist, können über gemessene Änderungen des Drain-Source-Stromes I_D Änderungen von V_{FP} bestimmt werden:

$$\Delta V_{FP} = \text{Steilheit}^{-1} * \Delta I_D$$

Der Feldeffekttransistor misst also lokale Potenzialänderungen an seinem Gate und dient so als Spannungssonde in einer Schnittkultur.

2.3 Extrazelluläre Ableitungen im Nervengewebe

Überblick über die Messsituation „evoked potentials“ im Hippocampus, Volume Conductor Theory

Bei der Aktivität von Nervenzellen fließt Ionenstrom vom Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum der Zelle oder in umgekehrter Richtung. Insgesamt muss wegen der Ladungserhaltung der Gesamtstrom durch eine Membran jedes beliebigen Neurons null ergeben. Aber der Strom kann an einem Punkt eintreten und an einem anderen austreten. In diesem Fall muß sich der Stromkreis über den Extrazellulärraum schließen. Dieser Stromfluß im Extrazellulärraum verursacht Potenzialdifferenzen, welche als Feldpotenziale gemessen werden können.

Typische extrazelluläre Ableitungen in einem offenen Feld am Beispiel des Hippocampus

Ströme im Extrazellulärraum kommen von zwei unterschiedlichen Quellen: synaptische Ströme und Aktionspotentialströme. Synaptische Ströme sind klein im Vergleich mit Aktionspotentialströmen, aber sie dauern einige Millisekunden und in Schichtstrukturen wie dem Hippocampus können sich die synaptischen Ströme von Tausenden von Neuronen aufsummieren und ein Feldpotential von einigen Millivolt aufbauen. Im Gegensatz dazu sind Ströme von Aktionspotentialen zwar sehr groß, aber nur sehr kurz und diphasisch. Deswegen ist es für Aktionspotenziale von benachbarten Zellen selten, daß sie so genau ausgerichtet sind, dass sie sich aufsummieren. Wenn sie nur um einen Bruchteil einer Millisekunde unausgerichtet sind, werden sie sich eher auslöschen. Deswegen kommen die meisten langsamen Feldpotenziale (mit Zeiten länger als eine Millisekunde) und ebenso Potenziale, die über große Flächen abgeleitet werden, hauptsächlich von synaptische Strömen.

Wie bereits erwähnt, sind die strukturierten und organisierten synaptischen Verschaltungen des Hippocampus ideal zum Studieren synaptischer Aktivität *in vivo* und *in vitro*. Elektrische Einzelpuls-Stimulation der Moosfasern oder der Schaffer Kollaterale rufen eine charakteristische Antwort in den entsprechenden Zielneuronen hervor. Diese Antworten lassen sich extrazellulär ableiten (typischerweise zwischen einer Glas- bzw. einer Metallelektrode und einer entfernten Referenz-/Badelektrode) und werden evozierte, extrazelluläre Feldpotenziale genannt. In Abbildung 2.4 ist eine solche Messsituation gezeigt. Es werden die Schaffer Kollaterale, die von den CA3-Pyramidenzellen zu den CA1-Zellen ziehen, gereizt, während in der CA1-Schicht zum einen im Stratum radiatum und zum anderen im Stratum pyramidale das Feldpotential abgeleitet wird.

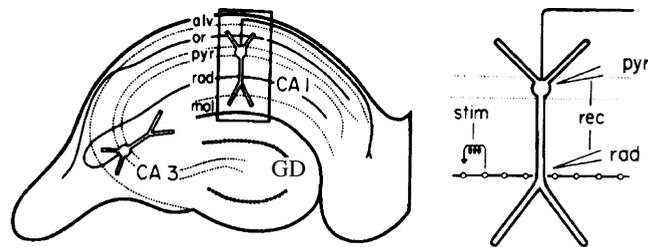


ABBILDUNG 2.4 Ableitsituation evozierter Feldpotenziale in CA1 nach Stimulation der Schaffer Kollaterale.

Links: Hippocampusschnitt (alv = alveus-, or = oriens-, pyr = pyramidal-, rad = radiatum-, mol = molecular Schicht) Rechts: Vergrößerte Sicht auf eine Pyramidenzelle aus [Joh 99]

Im Hippocampus sind die Pyramidenzellen und ihre Dendriten regelmäßig nebeneinander aufgereiht (siehe Abb.2.5), so dass die erzeugten elektrischen Felder Symmetrie entlang der septal-temporalen Dimension und entlang der Zellkörperschicht und Asymmetrie längs der Dendriten-Somata-Achse haben. Mit dieser Anordnung hat der Hippocampus eine sogenannte „Offenes Feld-Struktur“.

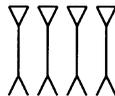


ABBILDUNG 2.5 „Offene Feld-Struktur“: Pyramidenzellen nebeneinander angeordnet

Die abgeleiteten evozierten Feldpotenziale haben eine für den Hippocampus typische Form (Abb.2.6). Während exzitatorischer synaptischer Aktivität fließt aktiver Ionenstrom an der Synapse in die Zelle und verursacht damit an den Dendriten eine Stromsenke. Eine Elektrode im Stratum radiatum misst deshalb ein langsames, negativ-gehendes pEPSP (population excitatory postsynaptic potential) (siehe *Abbildung 2.6 unten*). Diesem pEPSP geht ein kurzes negativ-gehendes Potenzial voraus (genannt fiber volley, siehe 2.6 Stratum radiatum), das durch den Schwung an Aktionspotentialen in den präsynaptischen Fasern (den Schaffer Kollateralen) entsteht. Der Stromfluss in die Synapsen während eines pEPSP verläßt als passiver Ionenstrom (kapazitiv und ohmsch) gleicher Amplitude die Zellen entlang der Dendriten und an den Somata. Dort tritt also eine Stromquelle auf. Eine Elektrode in der Zellkörperschicht (Stratum pyramidale) wird somit ein positiv-gehendes Potenzial messen (siehe *Abbildung 2.6 oben*). Wenn die Intensität des synaptischen Einstroms groß genug ist, wird im Soma ein AP (Aktionspotential) hervorgerufen, das zurück in die Dendriten laufen kann. An der Elektrode im Stratum pyramidale wird dieses AP als negativer (Stromsenke) pSpike (population Spike) gemessen. Im Stratum radiatum misst man den pSpike der Somata als positives Potenzial. ([She 98] S. 435)

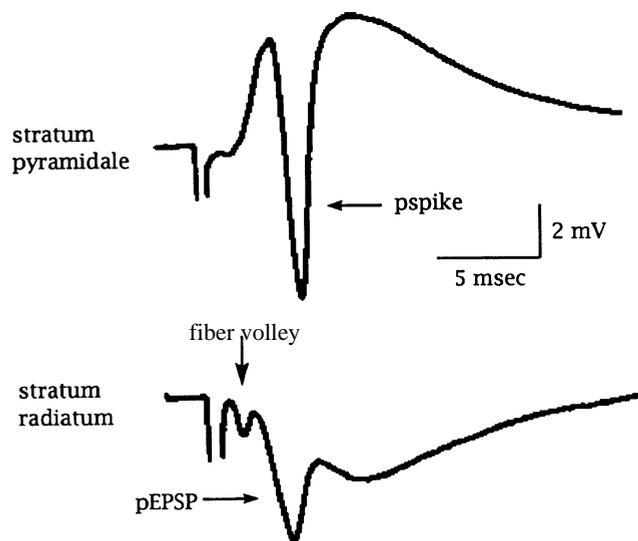


ABBILDUNG 2.6 Extrazelluläre Feldpotenziale, gemessen in Stratum pyramidale und Stratum radiatum in CA1 als Antwort auf eine Stimulation der Schaffer Kollaterale.
Weitere Erklärung siehe Text. aus [She 98], S. 436

Der Zeitverlauf des pEPSP ist ungefähr derselbe wie der des synaptischen Stromes. Da eine aktive Senke (oder Quelle) beschränkt ist auf ein sehr kleines Membranstück, wird die Strommenge, die genau durch diesen Spot zurückfließt, sehr klein sein. Also ist der Strom, der durch den extrazellulären Raum fließt, fast genauso groß, wie der Gesamtstrom durch den aktiven Spot, wo die Leitfähigkeitsänderung stattfand. Wenn der Zeitverlauf der Senke oder Quelle kurz ist im Vergleich zur Zeitkonstanten der Membran, dann fließt fast der gesamte Strom kapazitiv ab und wird hauptsächlich die Membrankapazität unweit von seinem Ursprung passieren. In erster Näherung wird das EPSP also verursacht durch das Aufladen der Membrankondensatoren, und das Membranpotenzial ist eine Konstante multipliziert mit dem Zeitintegral des Gesamtstromes. Andersherum, der gesamte extrazelluläre Strom und damit das Feldpotenzial in der Nähe der Senke oder Quelle ist ungefähr proportional zur ersten Ableitung nach der Zeit des intrazellulären Spannungssprungs (zeigt sich im Anstieg (slope) des pEPSP). [Hub 69]

Die theoretische Basis für die Herleitung der Feldpotenziale und die Beziehung zwischen Membranströmen und extrazellulären Feldpotenzialen ist die Volumenleiter-Theorie. Im folgenden wird diese Volumenleiter-Theorie und die Applikation der Current Source-Density Analyse kurz skizziert.

Physikalische Herleitung: Potenziale in einem Volumenleiter

Gesucht ist eine Beziehung zwischen den extrazellulären Feldpotenzialen und den Membranströmen oder eine Beziehung zwischen den Feldpotenzialen und dem Membranpotenzial. Folgende Annahmen werden gemacht, um zu einer solchen Beziehung zu kommen:

Der extrazelluläre Raum kann als unabhängig vom intrazellulären Raum angesehen werden, weil seine Grenzen, die Zellmembranen, hohe Widerstände haben, im Vergleich zum Widerstand des Extrazellulärtraumes. Aufgrund der Nervenaktivität fließen Ströme durch die Membranen ein und aus.

Diese Membranströme sind die Randwertbedingungen für die Beschreibung des Extrazellulärtraumes. Der Extrazellulärtraum wird als homogenes und isotropes Medium angenommen [Mit 85], was die Gültigkeit von Ohms Gesetz impliziert:

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad (\text{GL 2.6})$$

mit σ als Leitfähigkeitstensor, \mathbf{E} elektrisches Feld und \mathbf{J} die Stromdichte im extrazellulären Raum. Innerhalb des Frequenzbereiches von physiologischem Interesse (0-1 kHz) können kapazitive, induktive/magnetische und propagative Effekte der bioelektrischen Signale im Extrazellulärtraum vernachlässigt werden (siehe [Plo 69] S. 209). Das erlaubt die quasi-stationäre Beschreibung des elektrischen Feldes \mathbf{E} im Extrazellulärtraum. Somit gilt die Laplace-Gleichung

$$\Delta\phi = 0 \quad (\text{GL 2.7})$$

mit den Grenzbedingungen $\phi = 0$ für einen Punkt im Unendlichen und $\sigma \nabla\phi \cdot \mathbf{n} = J_m$ mit J_m der Transmembranstromdichte und \mathbf{n} die Normale zur Membran an aktiven Membranen.

Über die Lösung dieser Laplace Gleichung läßt sich, je nach konkreter Fragestellung, die gewünschte Beziehung des extrazellulären Feldpotenzials zu den individuellen Membranströmen oder Membranpotenzialen herleiten ([Hol 98], [Plo 69], [Stev 66]). Es ist aber für viele spezifische, biologische Probleme sehr schwierig, diese Theorie strikt anzuwenden. Dazu müsste nämlich die genaue Geometrie der aktiven Zellen in einem Volumenleiter bekannt sein, ebenso wie die Leitfähigkeiten (als Funktion der Zeit) jedes einzelnen Neurons genauso wie die Geometrie und Leitfähigkeit des Extrazellulärtraumes. Wegen dieser Schwierigkeiten werden oft Vereinfachungen gemacht und die Theorie mehr qualitativ zur Vorhersage der zu erwartenden extrazellulären Feldpotenziale angewendet.

Current Source-Density Analyse

Einen etwas anderen Gedanken geht die Current Source-Density Analyse. Hier wird, da Details über die individuellen mikroskopischen Membranströme sowieso nicht über die makroskopischen Feldpotenziale zu erhalten sind, eine Current Source-Density eingeführt. Darunter versteht man einen Volumenstrom I_m (Skalar der Dimension A/cm^3), der sich über die Volumenmittelung über die mikroskopischen Membranströme definiert. Wegen der Kontinuität von Strom ist der von der Membranstromdichte \mathbf{J}_m bestimmte Volumenstrom I_m äquivalent zur Divergenz der extrazellulären Stromdichte \mathbf{J}

$$\nabla \cdot \mathbf{J} = I_m \quad (\text{GL 2.8})$$

Wenn die Auswärtsströme in einem Volumenelement dominieren, resultiert eine Stromquelle ($I_m > 0$), wenn der innengerichtete Strom dominiert, eine Stromsenke ($I_m < 0$). Im Extrazellulärraum fließt der Strom von einer Quelle zur Senke.

Ohms Gesetz $\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E}$ und die Substitution des elektrischen Feldes \mathbf{E} mit dem Gradienten des Skalarpotenzials (ϕ) $\mathbf{E} = -\nabla \phi$ führt zu einer linearen Beziehung zwischen der Stromdichte und dem Gradienten des Feldpotenzials im Extrazellulärraum

$$\mathbf{J} = -\sigma \nabla \phi. \quad (\text{GL 2.9})$$

Durch Eliminierung von \mathbf{J} in den Gleichungen 2.8 und 2.9 erhält man die Poisson-Gleichung für kontinuierliche CSD-Verteilung I_m

$$\nabla \sigma \nabla \phi = -I_m \quad (\text{GL 2.10})$$

Dies ist die Poisson-Gleichung für die CSD I_m [Mit 85]. Sie ermöglicht die Bestimmung des extrazellulären Netto-Stromflusses in und aus dem aktiven neuronalen Gewebe als Funktion des Abstandes ([Joh 99]).

3 *Methoden*

Verwendete Chiptypen: Eigenbau-Chip, Cablos-Chip, Adhesios-Chip, Siemens-Chip; Schnittkulturtechnik; Aufbau des Messplatzes

3.1 Design, Herstellung und Kennlinien der verwendeten Chips

Insgesamt wurden vier verschiedene Chiptypen für die Messungen verwendet: Der Eigenbau-Chip, den ich selber entworfen und hergestellt habe; Chips der TU Berlin (Fachbereich Elektrotechnik), genannt Cablos und Adhesios, die bereits in früheren Arbeiten vorgestellt wurden ([Kie 99]); und ein 2048-Transistoren-Chip, der in Kooperation mit der Firma Siemens entwickelt worden war ([Bre 95], [Bre 00]).

3.1.1 Eigenbau-Chip

Dieser Chip wurde im abteilungseigenen Reinraum hergestellt. Die verwendeten Prozessschritte entsprechen der Standardtechnologie der ersten industriell gefertigten MOS-FETs (Standard-Silizium-Planartechnologie, [Wol 87]) und wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten eingeführt ([Ste 95], [Wei 92]). Deshalb sind im folgenden nur kurz die einzelnen Arbeitsschritte bis zum fertigen Mess-Chip aufgelistet.

Layout

Es entstand ein Chip mit 16 Transistoren und 16 Reizspots, die sich in einem Abstand von einem halben Zentimeter gegenüberstehen. Diese Anordnung der Detektions- und Reizstellen ist ungefähr auf die Dimensionen eines Hippocampusschnittes abgestimmt und es sollte von der Geometrie her möglich sein, auf der einen Seite den Gyrus dentatus über die Reizspots zu reizen und dann in CA3 abzuleiten, oder in CA3 zu reizen und in CA1 abzuleiten.

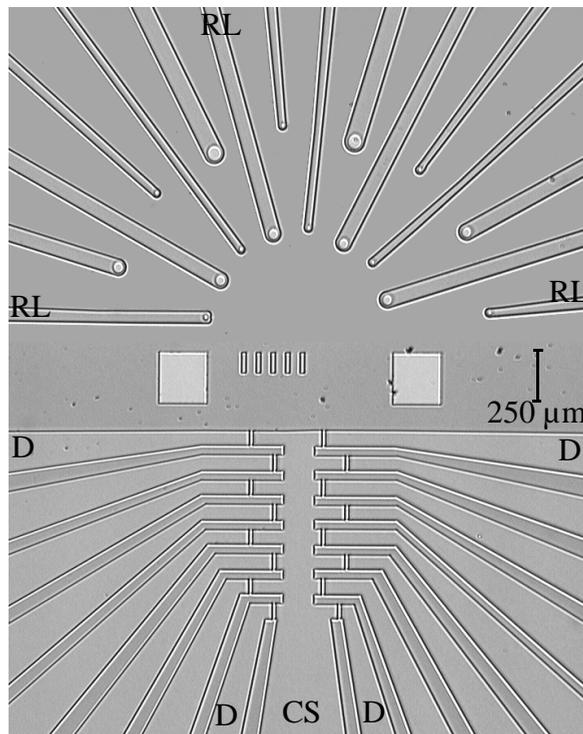


ABBILDUNG 3.1 „Aktive Chipfläche“ des Eigenbau-Chips (CS: Common Source, D: Drainzuleitung, RL: Reizspotzuleitung) Oben: 16 Reizspots Mitte: Teststrukturen Unten: 16 FETs

In Abbildung 3.1 ist ein Ausschnitt des Eigenbau-Chips zu sehen. Auf einer Fläche von 1,2 cm x 1,2 cm sind 16 FETs (untere Hälfte) und 16 Reizspots (obere Hälfte) untergebracht. Das Gate hat eine Kanallänge von 10 μm und eine Breite von 80 μm . Die Reizspots haben einen Durchmesser von 30 μm , 60 μm und 80 μm .

Für die einzelnen Herstellungsprozesse sind drei Maskentypen notwendig (Abbildung 3.2):

1. Dotiermaske: Sie dient der Strukturierung des Maskenoxids für die Dotierung der p-Gebiete und umfasst alle Zuleitungsbahnen (gemeinsame Sourcezuleitung, 16 Drainzuleitungen, 16 Reizspotzuleitungen).
2. Gate- und Reizspotmaske: Mit ihr werden die Gateoxidflächen, die Reizspots und die Kontaktfenster der Zuleitungsbahnen im Feldoxid geöffnet. Außerdem sind zwei Bulkkontakte vorgesehen.
3. Kontaktmaske: Nach der Gate-/Spotoxidation müssen die Bondflächen wieder freigeätzt werden.

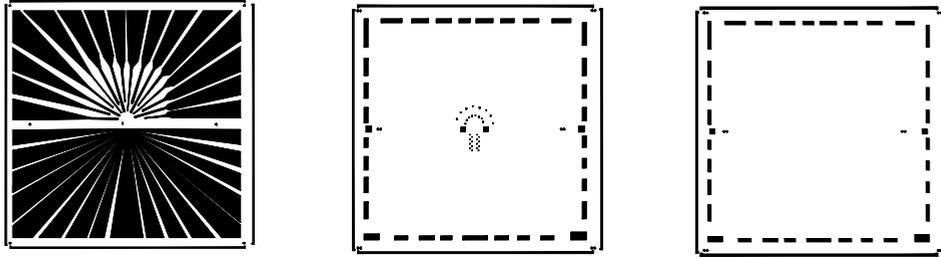


ABBILDUNG 3.2 Dotiermaske, Gate- und Reizspotmaske, Kontaktmaske

Auf allen Masken befinden sich zusätzlich Justiermarken für die genaue Positionierung bei den verschiedenen Lithografieschritten mit dem Maskaligner (Fotolithografie im Kontaktbelichtungsverfahren).

Die Maskenherstellung erfolgte bei der Firma ML&C Masken-Layout und Consulting. Die 10 cm x 10 cm Vorlagen (= 4 Zoll = Durchmesser der Wafer) wurden auf 5 Zoll Borosilikatscheiben als Chromschicht aufgebracht.

Herstellung

Als Substrat dienten einkristalline (100)-Wafer (\varnothing 100 mm, Dicke 435 μm) aus Phosphor n-dotiertem Silizium mit einem spezifischen Widerstand von 2–4 Ωcm .

Die einzelnen Prozessschritte sind:

- Maskenoxid aufwachsen (nasse thermische Oxidation bei 1000°C, 6 h)
- Strukturierung des Maskenoxids (erster Lithografieschritt, Dotiermaske)
- Bordotierung (Borglas-Transfer-Methode mit anschließender zweistündiger Diffusion bei 1100°C)
- Feldoxid (1 μm) aufwachsen (2 h Trockenoxidation, 8 h Na β oxidation, jeweils bei 1000°C)
- Feldoxid strukturieren (zweiter Lithografieschritt, Gate-/Spotmaske)
- Gate-/Spotoxid (12 nm) aufwachsen („rapid thermal oxidation“ im RTP-Ofen, Hochtemperaturplateau 30 s, 1000°C)
- Öffnen der Kontaktfenster (dritter Lithografieschritt, Kontaktmaske)
- Metallisierung der Kontakte mit Aluminium nach dem Lift-off-Verfahren, anschließend Legieren des Aluminiums bei 350°C – 450°C
- Schneiden des Wafers in die einzelnen Chipstücke von 1,2 cm x 1,2 cm
- Aufkleben der Chips auf die Kermiksocket, Kontaktierung über gebondete Aluminiumdrähte
- Aufkleben der Zellkulturkammer (siehe Kap. 3.1.4)

Kennlinien des Eigenbau-Chips

Zur Charakterisierung eines Transistors wird das Transferkennlinienfeld

$I_D = f(V_{GS}, V_{DS})$ mit der für die Verstärkung wichtigen Steilheit $\left. \frac{dI_D}{dV_{GS}} \right|_{V_{DS}}$ aufgenommen. In Abbildung 3.3 ist ein typisches Transferkennlinienfeld eines Eigenbau-Chips gezeigt.

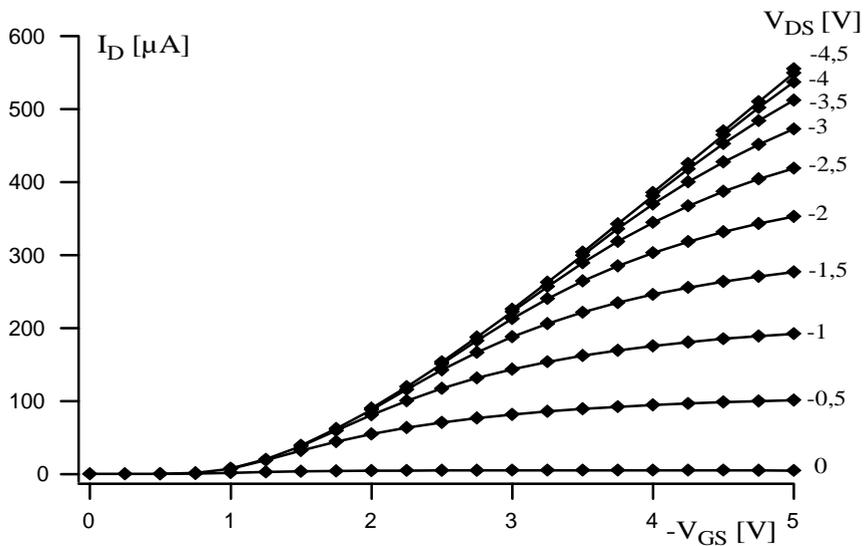


ABBILDUNG 3.3 Typisches Transferkennlinienfeld eines Eigenbau-Transistors.

Die Kennlinien werden von V_{GS} 0 V bis -5 V in $0,25$ V-Schritten gemessen. Die V_{DS} -Spannungen werden von 0 V bis $-4,5$ V in $0,5$ V-Schritten durchfahren, $|V_{DS}| \leq |V_{GS}|$.

Für die Messung muss ein Arbeitspunkt eingestellt werden, der ein Ausgleich zwischen hohem Rauschen und guten Steilheiten sein sollte. In den meisten Fällen war ein Arbeitspunkt von $V_{GS} = -4$ V und $V_{DS} = -3$ V mit einer Steilheit von $140 \mu A/V$ optimal. Vor jeder Messung werden die Kennlinienfelder der Transistoren gemessen und der Arbeitspunkt für jeden Chip individuell eingestellt.

3.1.2 Cablos- und Adhesios-Chips

Die Cablos- und Adhesios-Chips wurden von der Abteilung Mikromechanik der TU Berlin hergestellt (Silizium-Planar-Prozess). Für den Prozess waren sieben Maskierungsschritte notwendig, die in [Kie 99] ausführlich beschrieben sind. Als Ausgangsmaterial dienen n-dotierte Siliziumwafer mit einem Durchmesser von 100 mm, einer (100)-Oberfläche und einem Widerstand von $0,45-0,75 \Omega cm$. Die p-Zuleitungen (96 Drainzuleitungen, eine doppelt herausgeführte, gemeinsame Sourcezuleitung, zwei Reizspot-zuleitungen) werden mit einer Borimplantation eingebracht. Die Transistoren und ihre Zuleitungen werden durch lokal gewachsenes Oxid (LOCOS: LOCAL Oxidation of Silicon, [Wol 90]) voneinander getrennt. Das

Oxid isoliert die einzelnen Drain- und Sourcezuleitungen voneinander und verhindert, dass parasitäre Transistorkanäle entstehen. Es entsteht ein Fenster im Feldoxid, in dem alle 96 Transistoren in einem linearen Array eingebracht sind.

Layout

Die Größe der Chips beträgt $12 \times 12 \text{ mm}^2$.

Sowohl beim Cablos-Chip als auch beim Adhesios-Chip sind 96 Transistoren linear angeordnet. In Abbildung 3.4 sind die 96 fächerförmig angeordneten Drainzuleitungen und die gemeinsame Source zu sehen.

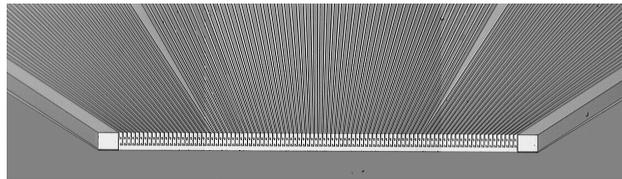


ABBILDUNG 3.4 Cablos-Chip, aktive Fläche (das lineare Array der Transistoren ist 2,1 mm lang)

Lediglich die Dimension und die Form des Gates ist unterschiedlich zwischen Cablos- und Adhesios-Chip. In Abbildung 3.5 ist links ein Schema des Cablos-Chips bzw. seines Gatebereiches zu sehen: unten die Sourcezuleitung, oben drei Drainzuleitungen. Rechts ist ein Schema des Gatebereiches der Adhesios-Chips.

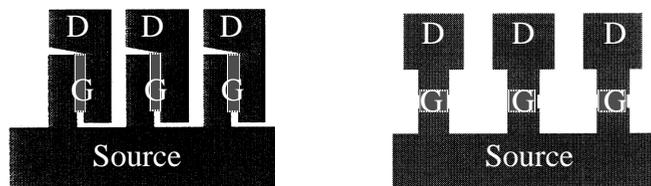


ABBILDUNG 3.5 Links: Gateschema von Cablos Rechts: Gateschema von Adhesios
(Jeweils drei Transistoren zu sehen: D: Drainzuleitung, G: Gate, Source: Common Source)

Der Abstand zwischen den einzelnen Transistoren bei *Cablos* beträgt $20 \mu\text{m}$ mit einer Gatefläche von $20 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ (Breite \times Länge). Daraus ergibt sich als Messintervall der Transistoren $22 \mu\text{m}$ und eine Länge der gesamten von Transistoren abgedeckten Fläche von 2,1 mm. Das Gateoxid ist 12 nm dick.

Bei *Adhesios* beträgt der Abstand der Transistoren $2,6 \mu\text{m}$ mit einer Gatefläche von $2 \mu\text{m} \times 1,8 \mu\text{m}$ (Breite \times Länge). Daraus ergibt sich als Messintervall der Transistoren $4,6 \mu\text{m}$ (*Adhesios* 1.0) und eine Länge der gesamten Transistorfläche von $437 \mu\text{m}$. Das Gateoxid ist 8 nm dick.

Auch die Cablos- und Adhesios-Chips wurden auf einen Keramiksockel geklebt und gebondet und in die Zellkulturkammer eingeklebt (Kap. 3.1.4).

Kennlinien von Cablos und Adhesios

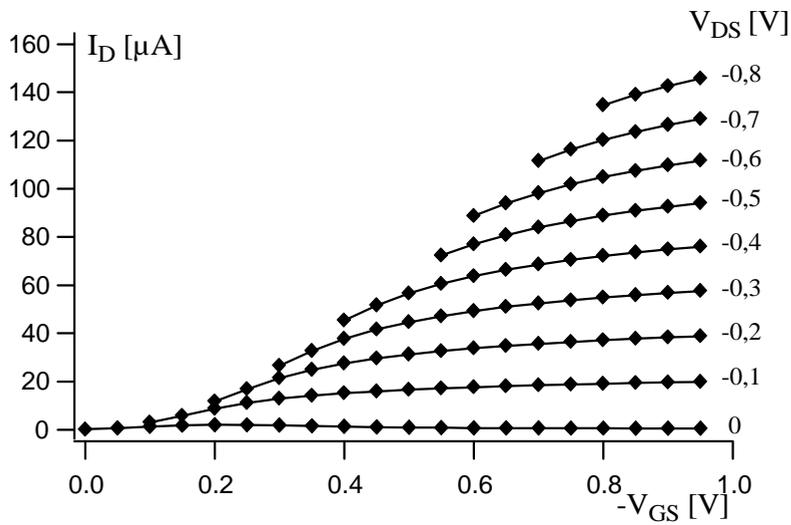


ABBILDUNG 3.6 Transferkennlinienfeld eines *Cablos*-Transistors.

Die Kennlinien werden von V_{GS} 0 V bis -1 V in 0,05 V-Schritten gemessen. Die V_{DS} -Spannungen werden von 0 V bis $-0,8$ V in 0,1 V-Schritten durchfahren, $|V_{DS}| \leq |V_{GS}|$.

Typischerweise verwendeter Arbeitspunkt bei den **Cablos-Chips** ist $V_{GS} = -0,6$ V und $V_{DS} = -0,5$ V mit einer Steilheit von $100 \mu A/V$.

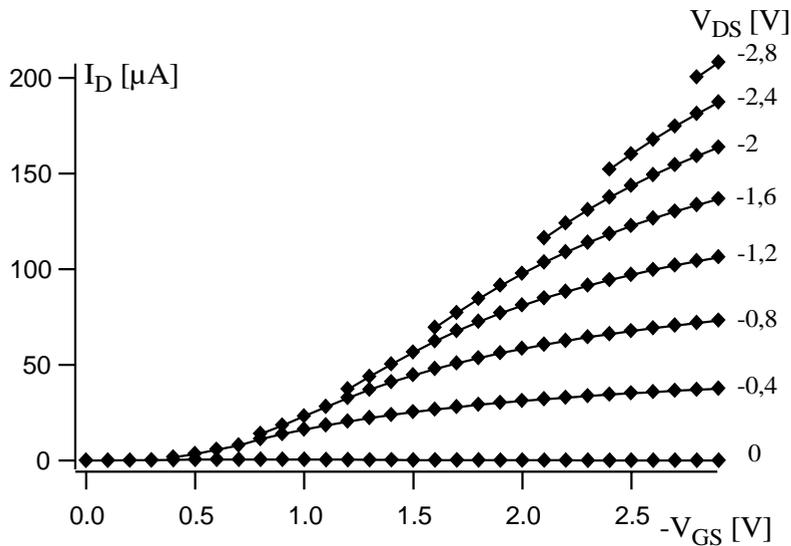


ABBILDUNG 3.7 Transferkennlinienfeld eines *Adhesios*-Transistors.

Die Kennlinien werden von V_{GS} 0 V bis -3 V in 0,1 V-Schritten gemessen. Die V_{DS} -Spannungen werden von 0 V bis $-2,8$ V in 0,4 V-Schritten durchfahren, $|V_{DS}| \leq |V_{GS}|$.

Typisch verwendeter Arbeitspunkt der **Adhesios-Chips** ist $V_{GS} = -1,8$ V und $V_{DS} = -1,6$ V mit einer Steilheit von $80 \mu A/V$.

3.1.3 Siemens-Chip

Dieser Chiptyp wurde von der Firma Siemens in Zusammenarbeit mit unserer Abteilung entwickelt. Die industriell gefertigten Halbleiter-Chips wurden in 0,5 μm -CMOS-Technologie hergestellt. Ausgangsmaterial sind p-dotierte Siliziumwafer der Dicke 700 μm (Entwicklung und Prozessschritte siehe [Bre 95] und [Bre 00]).

Wesentliche Eigenschaften des Chips sind:

- 1) Zu jedem Sensor-FET gehört eine eigene Verstärkerschaltung, die die Eingangsspannung des Sensor-FETs so verstärkt und wandelt, dass sie direkt von einer kommerziellen PC-AD-Wandlerkarte digitalisiert werden kann.
- 2) Der Chip besteht aus so vielen Sensoren, dass es nötig war, eine Multiplexerschaltung direkt auf dem Chip unterzubringen. Insgesamt sind 2048 Sensor-FETs in einem Array aus 32 Zeilen und 64 Spalten auf einer Fläche von 3,2 x 1,6 mm^2 angeordnet (Abb.3.8).
- 3) Aufgrund des verwendeten Standard-CMOS-Prozesses liegt das Polysiliziumgate des eigentlichen Sensor-FETs unter Passivierungs- und Leiterbahnebenen verborgen. Mit Hilfe von Wolframnägeln wird das Gate des eigentlichen Messtransistors an die Oberfläche geführt. Diese Metallnägeln liegen blank im Elektrolyten und eine lokale Spannungsänderung um die Wolframnägel wird detektiert. Jedes Gate wird mit 3 x 3 Nägeln an das Elektrolytbad geführt und hat dort eine Kontaktfläche von 5 x 5 μm^2 . Damit unterscheidet sich dieses System wesentlich von den bisher vorgestellten Transistortypen.

Der 2048-Sensoren-Chip stellt also eine komplexe Schaltung mit insgesamt über 10000 Transistoren dar. Da jeder Messtransistor in eine eigene Operationsverstärkerschaltung eingebettet ist, besitzt jede Sensorzelle eine Ausdehnung von 50 x 50 μm^2 , in der die 5 x 5 μm^2 Wolframnagelfläche enthalten ist. Dadurch entsteht ein Messraster von 50 μm .

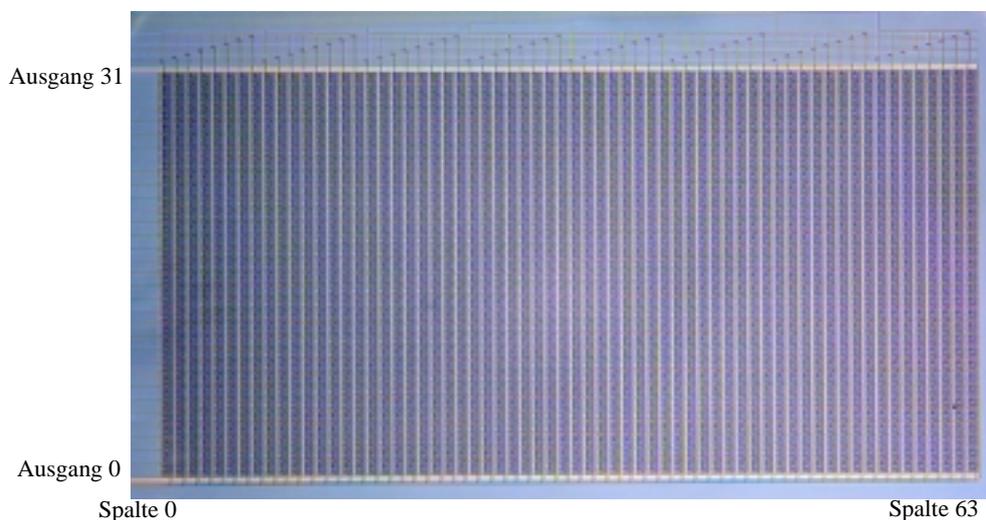


ABBILDUNG 3.8 64 x 32 Sensorarray des Siemens-Chip

Sensor-Kennlinie des Siemens-Chips

Die Sensorkennlinie ist definiert durch die Abbildung der Eingangsspannung auf das Ausgangssignal. Bild 3.9 zeigt die Kennlinie eines Einzelsensors.

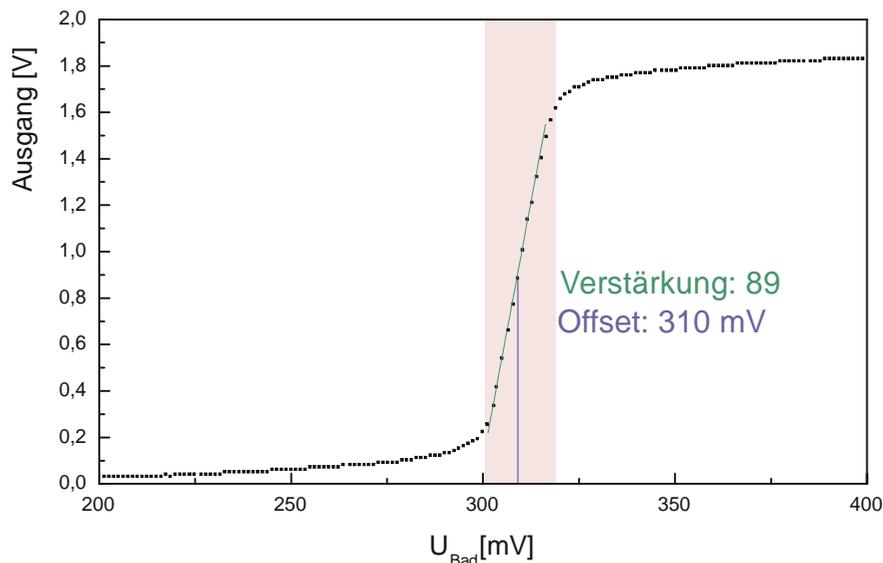


ABBILDUNG 3.9 Sensor-Kennlinie des Siemens-Chips.

Das 20 mV breite Messfenster ist rosa unterlegt.

aus [Bre 00]

Die Sensorkennlinie wird nach zwei Kriterien charakterisiert:

- Der Offset gibt den Punkt der Kennlinie mit der maximalen Steigung an. Eine Verschiebung dieser Einsatzspannung kann über eine Offsetspannung V_{ref} nur für alle 2048 Sensoren gleichzeitig durchgeführt werden.
- Die Steigung im linearen Bereich bestimmt die Gesamtverstärkung. Größere Verstärkung bedeutet zwar bessere Auflösung, zugleich wegen der Begrenzung der Ausgangsspannung aber auch eine Verkleinerung des dynamisch verstärkten Eingangsbereichs. Die Spannung V_{akt} stellt den Stromfluss durch die Verstärkerzelle ein, durch Variation kann die Steigung der Kennlinie verflacht werden.

Das Messfenster der Einzelkennlinie beträgt etwa 20 mV. Kopplungssignale können innerhalb des Messfensters nur dann bis zu einer Maximalamplitude von ca. 20 mV aufgelöst werden, wenn der Arbeitsbereich des Sensor-FETs optimal durch die Offsetkorrektur eingestellt wurde.

Aufgrund von Fertigungsschwankungen und Asymmetrien im Chipaufbau weichen jedoch die Kennlinien aller 2048 Sensoren im Array teils erheblich voneinander ab. Da es nur einen gemeinsamen Offset-Abgleich für alle Sensorzellen gleichzeitig gibt, versucht man für eine Gehirnschnitt-Silizium-Kopplung den Offsetwert zu finden, bei dem der Mittelwert der entsprechenden Ausgangswerte in der Mitte des AD-Wandlerfensters liegt.

3.1.4 Zellkulturkammer für die Kultivierung auf Siliziumchips

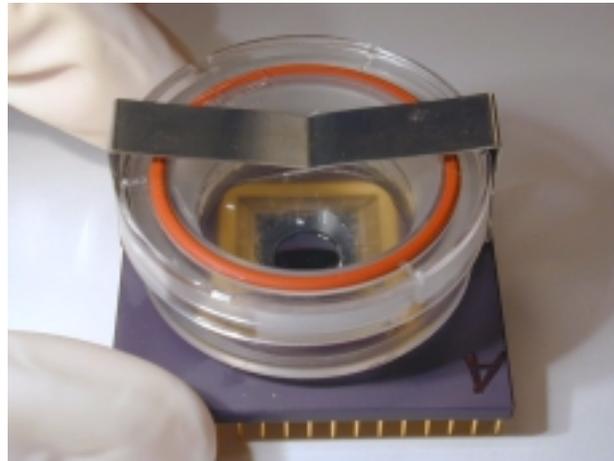


ABBILDUNG 3.10 Chip auf Keramiksockel mit Zellkulturkammer

In Abbildung 3.10 ist der auf einen Keramiksockel aufgeklebte Chip mit Zellkulturkammer zu sehen. Die Kontakte der Feldeffekttransistoren werden an die Goldkontakte des Sockels gebondet und mit einer Plexiglaswanne überklebt. Die Öffnung der Wanne zum Chip beträgt 8 mm. Der Schnitt wird zur Kultivierung auf diese Kreisfläche aufgesetzt. Der geschützte Raum zwischen Wanne und Keramiksockel wird mit Epon (Rezept [Kot 95], S.84) ausgefüllt, um die Bonddrähte zusätzlich zu schützen. Das Volumen der Kammer beträgt 8 ml, wie die sonst für die roller-tube Technik verwendeten Röhrchen. Die Kammern wurden in der abteilungseigenen Werkstatt hergestellt und können mit einem Falcon Deckel, einer Klammer und einem Gummiring luftdicht abgeschlossen werden.

3.2 Schnittkultur

Der Hippocampus ist eine Formation, die sich bananenförmig rostral von den septalen Nuclei bis nach kaudal zum temporalen Cortex erstreckt. Die Längsachse wird septotemporale Achse (S-T) genannt und die orthogonale Achse ist die transversale Achse (TRANS). Ein Slice wird senkrecht zur Längsachse des Hippocampus geschnitten und behält so einige seiner intrinsischen Verbindungen. [She 98]

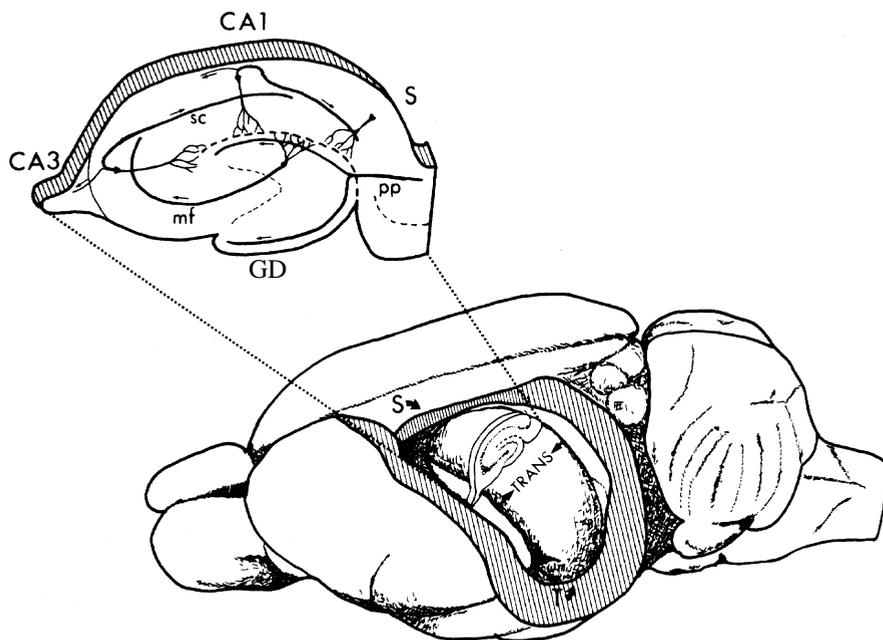


ABBILDUNG 3.11 Dreidimensionale Position der hippocampalen Formation im Rattenhirn (rostral befindet sich links, kaudal befindet sich rechts). GD: Gyrus dentatus, CA3, CA1: Felder des Hippocampus, S: Subiculum, pp: Tractus perforans, mf: Moosfasern, sc: Schaffer Kollaterale aus[She 98]

Schnittkulturen, die nach der Drehtechnik von Gähwiler angefertigt werden, behalten ihre Grundstruktur und ihre ursprünglichen Verbindungen bei (daher auch die Bezeichnung *organotypisch*). Sie flachen jedoch während der Kulturzeit auf einige wenige Layer, bis hin zu einem Monolayer, ab.

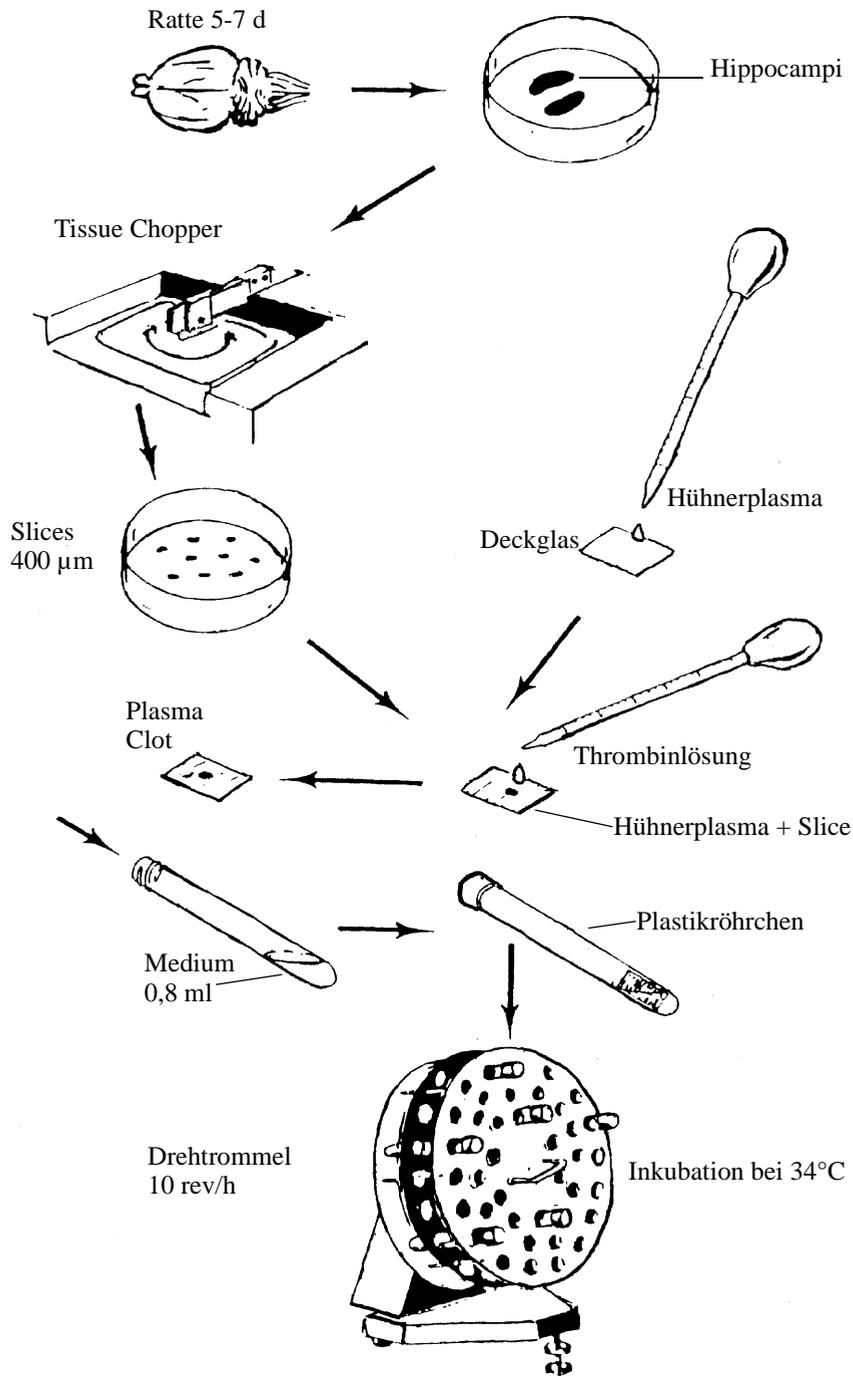


ABBILDUNG 3.12 Schema der Präparation und Kultivierung von Hirnschnitten nach der Gähwiler-Methode.

Bei dieser Technik werden die Schnitte in einer Roller-Einrichtung kultiviert, die um 5° geneigt ist und sich mit 10 Umdrehungen pro Stunde dreht. In diesem Schema wird die ursprüngliche Methode der Kultivierung auf Deckgläschen gezeigt. Für die Kultivierung auf Silizium-Chips sind einige Schritte des Schemas modifiziert worden. Zu diesen Änderungen siehe Text.
 modifiziert nach [Gah 84]

Präparation

In Abbildung 3.12 ist das Verfahren der Schnittpräparation und Kultivierung nach der Roller-Technik skizziert.

Das ursprüngliche Verfahren wurde in einigen Punkten modifiziert, um die Kultur auf die veränderte Oberfläche und Geometrie der Kultivationskammer anzupassen. Um steriles Arbeiten zu gewährleisten, werden alle Arbeitsschritte unter einer Laminar-Flow Box durchgeführt.

Fünf bis sieben Tage alte Ratten (Wistar-Stamm) werden dekapitiert. Das Schädeldach der Tiere wird geöffnet und weggeklappt, so dass das Gehirn der Ratten frei zugänglich ist. Mit einer Spatel werden beide Kortex-Hemisphären abgehoben und zum Waschen in 1 ml gekühlte Gey's Lösung übertragen. Die beiden Hippocampi werden vorsichtig vom Kortex getrennt und die Hirnhäute und Blutgefäße entfernt, damit das Hirngewebe beim Schneiden nicht gequetscht wird.

Die Hippocampi werden dann mit einem Tissue Chopper (McIlwain) in 400 µm dicke Schnitte in der transversalen Ebene geschnitten.

Danach werden die Hirnschnitte wieder in gekühlte Gey's-Lösung übertragen, wo sie unter einer Lupe vorsichtig mit einer Pinzette voneinander getrennt werden.

Die bisher beschriebenen Arbeitsschritte sollten sehr schnell durchgeführt werden, weil sonst die Gefahr von Sauerstoffmangel im Gewebe besteht. Gleichzeitig darf das Gewebe nicht verletzt werden. Zur Etablierung der Schnittkultur habe ich die Präparation am Anfang selbst durchgeführt. Später wurde dies für mich übernommen und ich habe dann nur noch die fertigen Schnitte auf die Chips aufgezogen, was im folgenden beschrieben wird.

Vorbereitung/Reinigung der Chips

Die Chips werden mit einer 1%-igen Lösung von BM-flüssig gereinigt und mit einem über eine Plastikspatel gestülpten Kimwipe abgewischt. Die Kammern müssen danach gründlich mit Millipore-Wasser gespült werden. Anschließend werden sie unter der Flowbox getrocknet und dann zum Sterilisieren eine halbe Stunde unter UV-Licht gelegt. Für die Abdichtung der Kammern werden jedesmal neue Falcon-Deckel verwendet. Die Gummiringe (Dichtungen, siehe auch Abbildung 3.10) werden autoklaviert.

Poly-L-Lysin Beschichtung

Da die meisten Kulturen nach den ersten Tagen einrissen (Abbildung 3.13), wurde eine Polylysinbeschichtung verwendet, die dies verhindert.

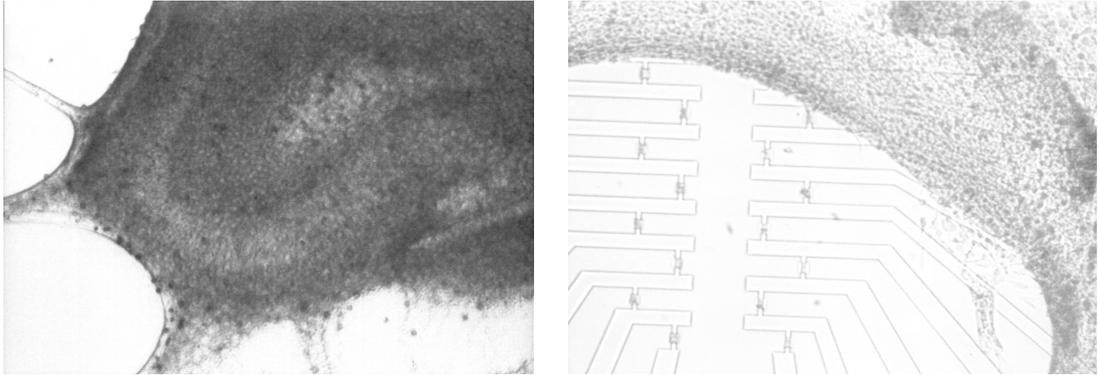


ABBILDUNG 3.13 Bild von eingerissenem Schnitt *Links:* nach 7 Tagen in Kultur: die Ränder beginnen einzureissen, der Schnitt wird nur noch von wenigen Fäden gehalten. *Rechts:* nach 10 Tagen in Kultur: der Schnitt ist komplett eingerissen und hat sich zusammengezogen

Nach der UV-Sterisation der Chips werden diese mit einem Tropfen Poly-L-Lysin (PLL) bedeckt und über Nacht zugedeckt stengelassen. Am nächsten Tag werden die Chips zweimal mit Millipore-Wasser gespült und unter der Flowbox getrocknet. Das Rezept für die PLL-Lösung ist im Anhang zu finden.

Aufziehen der Schnitte

Vor dem Aufziehen ruhen die Schnitte für ungefähr 30 Minuten bei 4°C in einer Petrischale mit Gey's Lösung. Dann werden die Schnitte unter einer Stereolupe einzeln mit einer Spatel aus der Gey's Lösung aufgenommen und auf den Chip übertragen, auf dem zuvor ein Tropfen (5 µl) Hühnerplasma pipettiert worden ist. Das Plasma wird zusammen mit einem Tropfen (5 µl) Thrombinlösung auf dem Chip verrührt (mit der Plastikpipette, mit der auch die Thrombinlösung hinzugegeben wird) und dabei der Schnitt über den Transistoren positioniert. Damit der Plasma Clot gut koagulieren kann, wird der Chip zugedeckt 10 bis 15 Minuten unter der Flowbox bei Raumtemperatur stengelassen. Dann erst wird 1 ml Medium hinzugegeben, die Kulturkammer verschlossen und in Diakästen eingestapelt. Diese Diakästen sind an die Drehtrommeln im Brutschrank montiert. Nach 3 Tagen in Kultur wird dem Kulturmedium für 24 h 10 µl Cytostatikallösung zugesetzt. Das Medium der Kulturen wird ein- bis zweimal wöchentlich gewechselt.

Bei den Präparationen trat das Problem auf, dass die Schnitte nicht auf dem Chip haften blieben, sondern bei der Mediumzugabe abgeschwemmt wurden. Erst mit einer dreifach höher konzentrierten Thrombinarbeitslösung wurden die Schnitte nicht mehr abgeschwemmt.

Die Schnitte werden bei 34°C in einem Roller-Brutschrank ohne CO₂/O₂-Kontrolle kultiviert. Die Drehprozedur fördert die Abflachung der Schnitte und ermöglicht abwechselnd eine gute Versorgung mit Sauerstoff bzw. Nährmedium.

Antibiotika werden nicht zugesetzt. Falls Kontaminationen auftreten (sehr selten, nur in schon oft verwendeten Kammern), wird für eine halbe Stunde die Innenkammer mit Barrycidal getränkt.

Experimente werden an 10 bis 20 Tage alten Kulturen durchgeführt.

Nissl-Färbung

Mit der Nissl-Färbung habe ich die histotypische Organisation der Hippocampuskulturen untersucht. Abb.3.14 zeigt unterschiedliche Kulturen nach Nissl-Färbung.

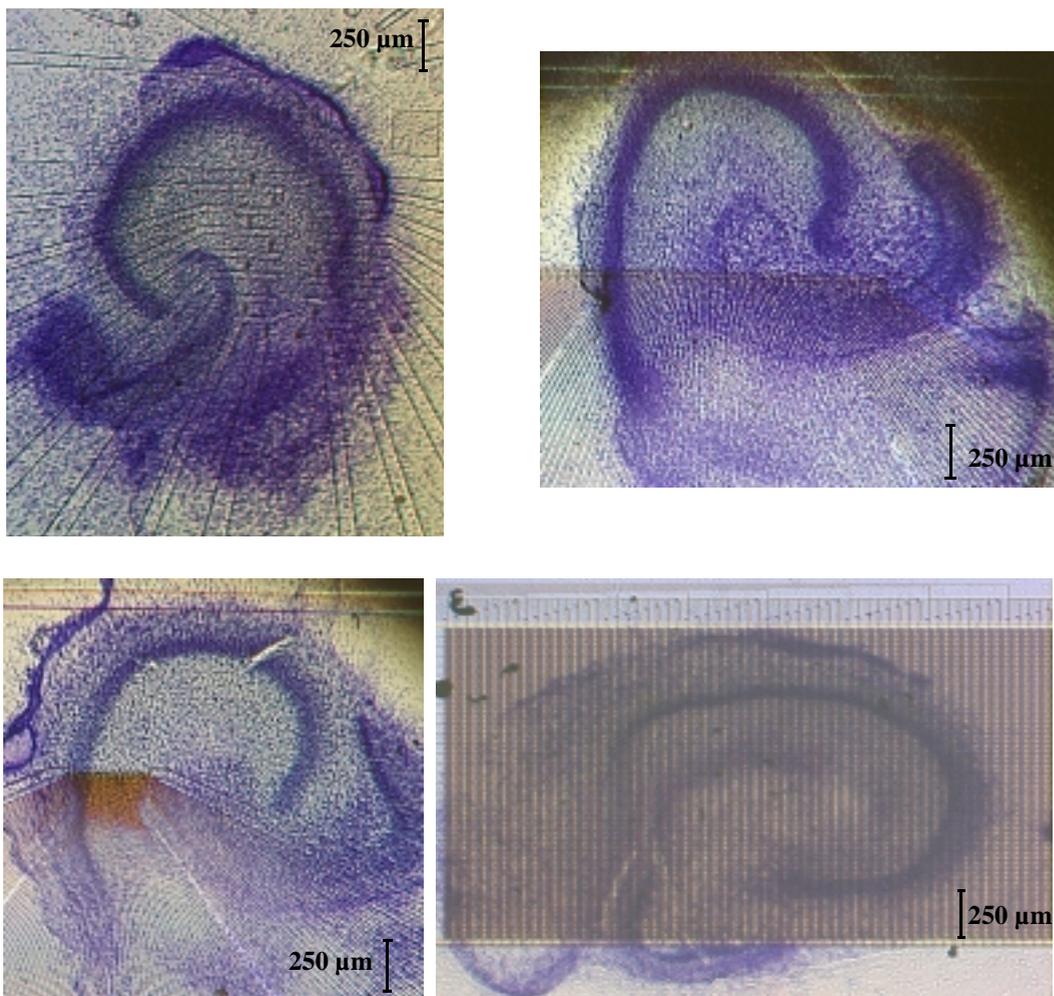


ABBILDUNG 3.14 Nissl-Färbung der Kulturen, gewachsen auf den vier unterschiedlichen Chiptypen. Links oben: Hippocampuskultur (13 days in vitro (div)) auf Eigenbau-Chip Rechts oben: Hippocampuskultur (17 div) auf Cablos-Chip Links unten: Hippocampuskultur (12 div) auf Adhesios-Chip Rechts unten: Hippocampuskultur (14 div) auf Siemens-Chip

Die Kulturen werden über Nacht in einer 4 %-igen, wässrigen Formaldehydlösung fixiert. Vor der Anfärbung werden sie für 10 min in Millipore-Wasser gespült. Die Vorgehensweise bei der Nissl-Färbung der Schnittkulturen wird im Anhang beschrieben.

3.3 Aufbau des Messplatzes

Um die elektrische Kopplung von Gehirnschnitten mit Feldeffekttransistoren zu realisieren, wurde die im folgenden beschriebene Messapparatur aufgebaut. Einzelkomponenten sind Reizpuls, Elektrophysiologie und Transistorsignale. Im Anhang sind alle Geräte aufgelistet.

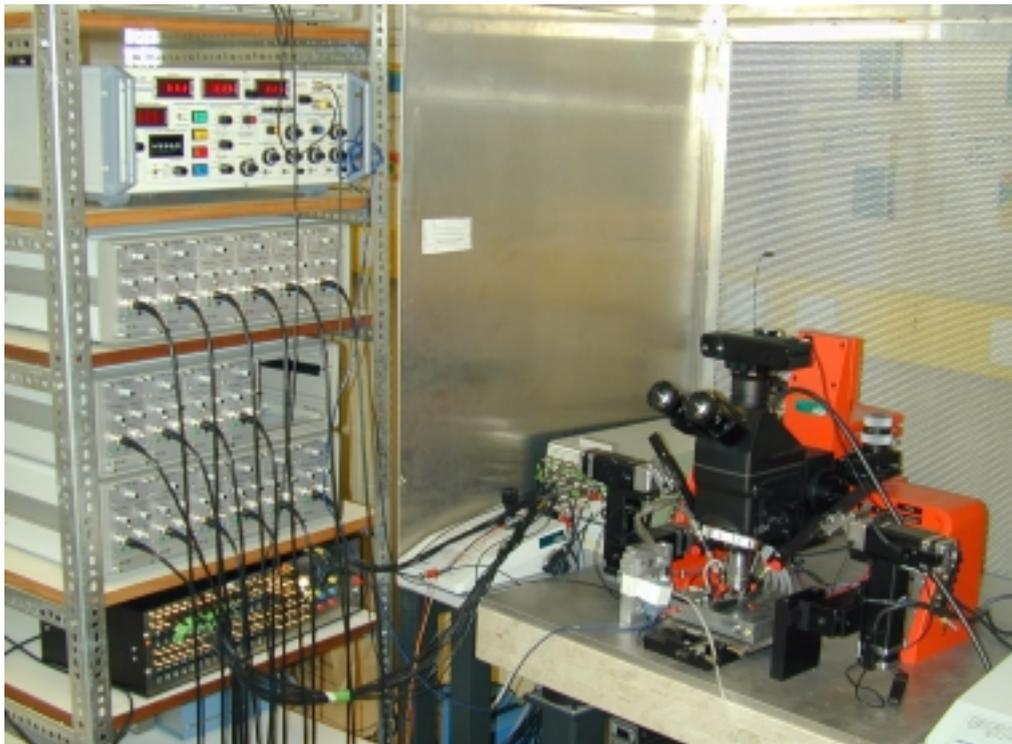


ABBILDUNG 3.15 Messplatz

Der Schnitt wird mit einem Auflichtmikroskop (FS-60FC, Mitutoyo, Kawasaki), das auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem Faradaykäfig steht, beobachtet. Um sowohl Platz für die Reizelektrode als auch für die Ableitelektrode zu haben, wird ein Long Distance Objektiv (10x Vergrößerung) verwendet. Beide Elektroden werden mithilfe je eines Mikromanipulators im Hippocampuschnitt positioniert. Mit einer Fotokamera kann die Messsituation dokumentiert werden. Zusätzlich habe ich zu jeder Messung eine Skizze des Schnittes relativ zu den Transistoren angefertigt.

Ableitkammer

Für die Messungen wurde eine Ableitkammer (14 cm x 12 cm x 3 cm großes Metallkästchen) gebaut, in der der Chip in einen ZIF-Sockel (Zero-Input-Force) eingesetzt wird, der den elektrischen Kontakt zum FET-Verstärker herstellt. Die Ableitkammer ist auf dem schwingungsgedämpften Tisch befestigt und das Mikroskop kann relativ zu ihr verschoben werden. Im Deckel des Kästchens befindet sich ein runder Ausschnitt als Zugang zur Zellkulturkammer. Die Zellkulturkammer mit Schnitt sitzt also vollständig in der Ableitkammer, die beheizt wird. So ist eine konstante Temperatur des Mediums während der Messung gewährleistet. Die Temperatur in der Ableitkammer wird mit einer Temperatursonde im ZIF-Sockel gemessen und beträgt während der Messung 32°C.

Über einen Zulaufschlauch wird die Schnittkultur während der Messung mit Medium (Messmedium, siehe Anhang) versorgt. Der Zulaufschlauch ist über eine Länge von 5 cm in Kontakt zur Metallfassung der Ableitkammer, damit das Medium bereits in angewärmten Zustand die Zellkulturkammer erreicht. Das Badmedium verläßt die Kammer wieder über einen Ablaufschlauch. Sowohl der Zulauf als auch der Ablauf des Mediums erfolgt über eine speziell abgeschliffene Kanüle (1 mm Innendurchmesser, mit Sylgard ummantelt). Die Kanüle für den Zulauf ragt ganz ins Messmedium. Die Ablaufkanüle ist angeschrägt und reicht mit ihrer Spitze unter einem Winkel von 45° auf die Wasseroberfläche. Diese Anordnung garantiert, dass immer in gleichen Teilen Medium und Luft abgesaugt wird, um einen ruhigen Flüssigkeitsspiegel in der Kammer zu halten. Für den Umlauf des Mediums dient eine peristaltische Pumpe (~30 ml/h).

Als indifferente Elektrode wird ein Ag/AgCl-Pellet verwendet. Das Mikroskop kann relativ zur Ableitkammer in der x-y Richtung verschoben werden.

Es wurden zwei Ableitkammern gebaut, eine für die Eigenbau-Chips und eine weitere für die Cablos- und Adhesios-Chips, bei der über einen Stecker 16 Transistoren der 96 ausgewählt werden konnten.

Stimulation

Zur Stimulation der Kulturen werden monopolare Wolframelektroden benutzt. Diese Elektroden werden durch elektrolytisches Ätzen (im Anhang beschrieben) aus Rohlingen hergestellt. Nach dem Ätzen werden sie zur Isolierung bis auf die Spitze (~1 µm) in Epon eingetaucht und im Ofen bei 70°C für 2 Stunden gehärtet. Angesteuert wird die Reizelektrode über einen Stimulus Isolator (präzise Stromquelle), an dem die Höhe der Strompulse einstellbar ist. Der Zeitpunkt der Strompulse wird über ein digitales Triggersignal vorgegeben.

Auf den Chips sind auch Reizspots vorhanden, die über den FET-Verstärker (siehe Elektronik) mit Spannungspulsen angesteuert werden. Es war nicht möglich, über einfache Spannungspulse (10 V) Aktivität in den Schnitten auszulösen.

Extrazelluläre Ableitung mit Glaselektrode

Um die Experimente mit den Feldeffekttransistoren mit konventionellen Methoden der extrazellulären Ableitung vergleichen zu können, wird eine Glaselektrode verwendet. Die Glaselektroden werden an einem horizontalen Elektrodenpuller (DMZ, Zeitz, Augsburg) gezogen. Es werden Borosilikatglaskapillaren mit Filament (GC-100-F10, Hilgenberg, Malsfeld) verwendet, die einen Außendurchmesser von 1 mm haben. Die Heizung und Zugkraft des Pullers sind so eingestellt, dass die Elektroden – mit 3 M NaCl gefüllt – einen Widerstand von 15–20 M Ω haben.

Mit einem Axoclamp 2B im Bridge Mode werden die abgeleiteten Potenziale (10x) verstärkt. Vor der eigentlichen Messung wird der Elektrodenwiderstand abgeglichen. Die abgeleiteten Signale werden in den PC eingegeben, zuvor jedoch mit einem Bandpassfilter (Besselcharakteristik, 80 dB/Dekade) mit den Grenzfrequenzen 1 Hz und 1 kHz gefiltert und nochmals 20x verstärkt.

Elektronik

In Abbildung 3.16 ist ein Schema des elektrischen Aufbaus dargestellt.

Für die Transistoransteuerung konnte auf den von Weis [Wei 92] vorgestellten 16-Kanal-Messverstärker zurückgegriffen werden. Darauf aufbauend wurde eine Anpassung an die neu formulierte Messaufgabe und die geänderten Komponenten durchgeführt. Über einen PC erfolgt die Steuerung der externen Geräte und die Datenaufnahme.

Der FET-Verstärker hat zunächst die Aufgabe, gefilterte Versorgungsspannungen für die Transistoren zu liefern. Diese Spannungen (V_{GS} , V_{DS} , V_{BS} , V_{Offall} , V_{Reiz}) werden mittels zweier DA-Wandler-Karten vom Computer vorgegeben (Hyper I/O und DAC 4).

Ferner bietet der FET-Verstärker die Möglichkeit, die Source-Drain-Ströme von 16 Transistoren zu messen, entweder mit 1-facher Verstärkung (Kennlinienmessung) oder mit 100-facher Verstärkung. Der Source-Drain-Strom (I_D) der Transistoren wird mit einem Strom-Spannungswandler verarbeitet und im Computer mit einem 12 Bit AD-Wandler (PCI-6071 E) aufgezeichnet. Als Samplingfrequenz wurde 5 kHz gewählt.

Die Messsignale werden gefiltert (Bandpassfilter, Grenzfrequenzen 1 Hz und 1 kHz, Besselcharakteristik, 80 dB/Dekade), um insbesondere die starke Drift des Drainstromes auszuschalten.

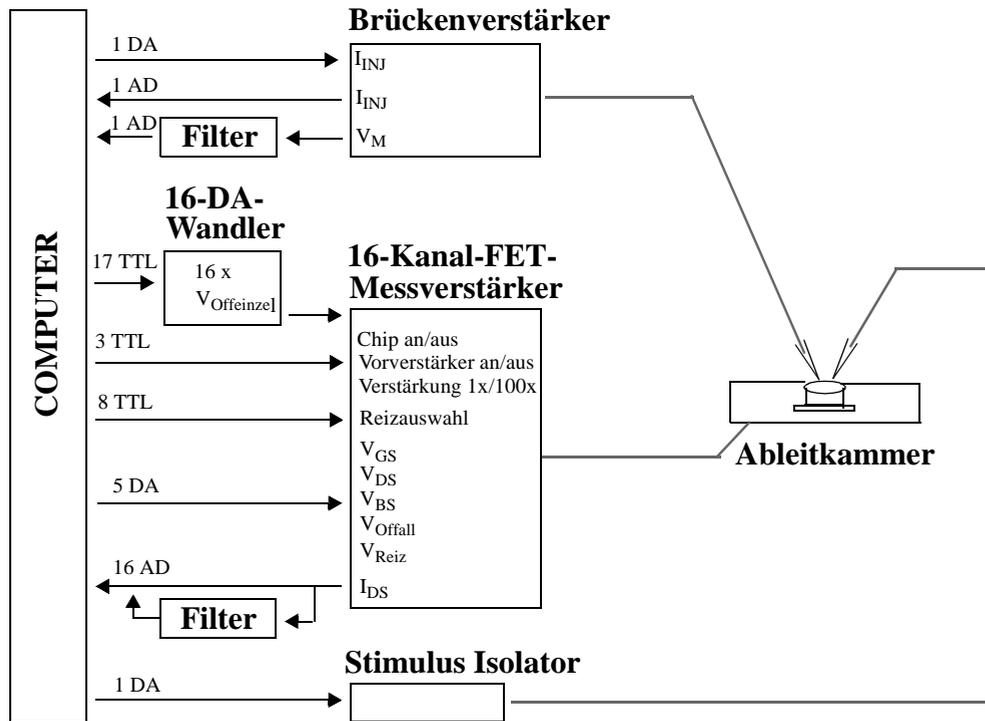


ABBILDUNG 3.16 Schema des elektrischen Aufbaus

Eine gemeinsame Kompensation des Arbeitspunktstromes der Transistoren erfolgt mittels V_{Offfall} . Die Stromkompensation jedes einzelnen Transistors (Feinabstimmung wegen unterschiedlicher Kennlinien) erfolgt über den 16-Kanal-DA-Wandler.

Als Messprogramm wurde ein in früheren Arbeiten ([Jen 99], [Str 00]) entwickeltes, in Labview geschriebenes Programm, verwendet. Dieses wurde auf die unterschiedlichen Messkarten und die veränderte Situation der extrazellulären Ableitung angepasst. Das Messprogramm zeichnet wie ein Oszilloskop die Daten aller Kanäle kontinuierlich auf und stellt sie in einem Zeitfenster vorbestimmter Länge (sweep von 100 ms, getriggert durch Reizpuls) nacheinander dar. Die Daten der Kanäle werden im Computer gespeichert.

Messplatz für Siemens-Chip Messungen

Chipansteuerung und Datenaufnahme werden von zwei Einsteckkarten übernommen, von denen die eine¹ ein 6-Bit breites TTL-Muster zur Auswahl der aktiven Spalte erzeugt und die andere² die Signale der 32 Zeilen digitalisiert. Der Abtasttakt dieser AD-Wandlernkarte wird ebenfalls von der TTL-Karte generiert, so dass beide Karten synchronisiert arbeiten. Reihenfolge und Anzahl der ausgelesenen Zeilen als auch der

1. National Instruments PCI-DIO-32HS

2. National Instruments PCI-6071E

aktivierten Spalten können frei programmiert werden, so dass beliebige, rechteckige Ausschnitte aus dem Sensorfeld zur Messung ausgewählt werden können¹.

Zum Auslesen des ausgewählten Messfeldes werden die Spalten nacheinander einzeln eingeschaltet. Nach dem Einschwingen einer Spalte, was im Regelfall ca. 50 μ s dauert, wird für jede Zeile des Messfeldes ein Abtastpunkt im zeitlichen Abstand von 2 μ s aufgenommen. [Bre 00]

1. Das entsprechende Programm wurde mit LabView 5.1 programmiert und lief verteilt auf mehrere Tasks unter Windows NT 4.0 auf einem Dual-Pentium III mit 750 MHz.

4 *Ergebnisse*

4.1 Probleme bei der Verbindung von Hirnschnittkulturen mit Siliziumdioxid

4.1.1 Stabilität des Siliziumdioxids

Strukturelle Veränderungen

Die Kultivierung von Nervenzellen auf Siliziumchips ist mit der Schwierigkeit verbunden, dass Halbleiter-Bauelemente normalerweise nicht mit Flüssigkeiten in Berührung gebracht werden können. Eine Zellkultur braucht aber ein Nährmedium, um leben zu können.

Die Hippocampusschnittkultur stellte sich als besonders aggressiv gegenüber dem Siliziumdioxid heraus. Die erste Charge an Chips, die ich angefertigt habe, war innerhalb weniger Wochen defekt.

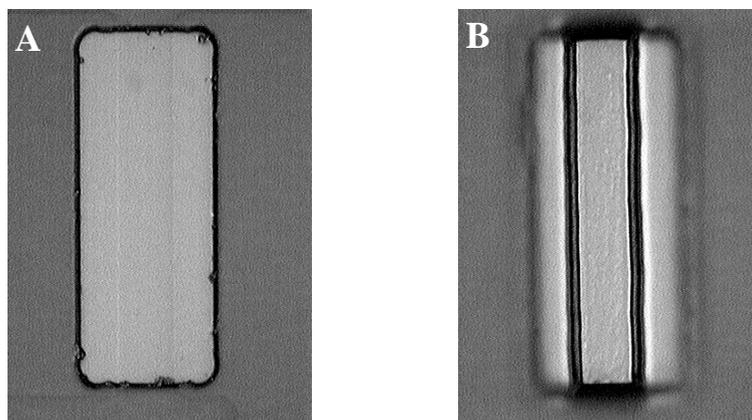


ABBILDUNG 4.1 Gateoxid vorher (A)/nachher (B) **A:** Beim Gate eines intakten Transistors sieht man nur leicht die dotierten Bereiche von Source und Drain (von links und rechts kommend) durchschimmern, der Gatekanal hebt sich leicht hervor. **B:** Dagegen ist bei den defekten Transistoren deutlich die Abbruchkante zwischen dem Kanal und den dotierten Zuleitungen zu sehen, und die Oberfläche ist rau.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, hatte sich die Struktur des Gates verändert. Bei neuen Chips (A) ist das Gate glatt und man sieht nur leicht die dotierten Bahnen von Source und Drain durchschimmern. Bei den defekten Transistoren fällt bei Betrachtung durch das Mikroskop auf, dass die Gatefläche rau ist, und es ist eine deutliche Abbruchkante zwischen den dotierten Bahnen und dem Bulk-Silizium zu sehen (B).

Beim Abrastern des kaputten Gates mit einem Profilometer stellte sich heraus, dass die Gatefläche anstatt 1 μm tief im Feldoxid 3 μm (dotierte Bereiche) bis 5 μm (Bulk-Silizium, Mitte des Gates) tief liegt. Das heißt, dass nicht nur das Gateoxid abgetragen war, sondern auch schon ein ungefähr 4 μm tiefes Loch in das Silizium „erodiert“ war.

Zur Etablierung der Schnittkultur verwendete ich dann vorerst nur Silizium-Chips ohne Transistoren, auf die eine homogene Oxidschicht aufgewachsen wurde. Auf diesen Chips war nach Kultivierung und anschließender Reinigung deutlich sichtbar, wo der Schnitt aufgesetzt war. Das Oxid hatte dort eine andere Farbe, das bedeutet, eine andere Dicke.



ABBILDUNG 4.2 Interferenzmikroskop-Aufnahme eines „homogenen“ Siliziumdioxid-Chips nach Schnittkultur Grün: Stelle, wo Schnitt kultiviert wurde Rot: Chip frei im Kulturmedium (siehe auch Text)

Abbildung 4.2 zeigt einen Ausschnitt einer Aufnahme mit dem Interferenzmikroskop. Was grün erscheint ist die Stelle, wo der Schnitt gewachsen war und setzt sich auf dem Chip zu einem Oval (Form des Schnittes) fort. Der rote Bereich wurde frei vom Kulturmedium umspült. Eine Messung der Oxiddicke mit dem Ellipsometer war nicht möglich, da der Winkel der Zellkulturkammer zu steil ist.

Veränderung der Kennlinien

Von der zweiten Charge Eigenbau-Chips wurden einige speziell dazu verwendet, zu sehen, wie sich die Kennlinien im Verlauf der Kultivierung verändern, und wie schnell ein Transistor im Durchschnitt zerstört wird.

Dazu wurden wiederholt die Kennlinien der Transistoren aufgenommen: 1) von zwei Chips, die nur mit Millipore-Wasser gefüllt bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, 2) von zwei Chips, die mit Nährmedium gefüllt im Brutschrank rotierten und 3) von zwei Chips die für die Schnittkultur verwendet wurden.

Die Kennlinien wurden von V_{GS} 0 V bis -5 V in $0,25$ V-Schritten durchgemessen. Die V_{DS} -Spannungen wurden von 0 V bis $-4,5$ V in $0,5$ Volt-Schritten durchfahren. Die Schwellspannung V_T wurde über die Beziehung $\sqrt{I_D} = \sqrt{\frac{\beta}{2}}(V_{GS} - V_T)$ im Sättigungsbereich ausgewertet, d.h. V_T aus dem x-Achsenabschnitt im Diagramm $\sqrt{I_D}(V_{GS})$. Die Steilheit wurde über linearen Fit um den Arbeitspunkt ($V_{GS} = -3,75$ V, $V_{DS} = -3$ V) bestimmt.

Um zu testen, ob das Nährmedium alleine der Grund für die defekten Transistoren sein kann, wurden zwei Chips mit Nährmedium gefüllt im Brutschrank bei 34°C einige Tage rotiert. Nach jeweils ein paar Tagen Rotation wurde der Chip aus dem Brutschrank genommen, durchgemessen (mit Messmedium), erneut gereinigt und UV-sterilisiert, um wieder für einige Tage im Brutschrank zu rotieren.

Als Referenz wurden zwei Chips in Millipore-Wasser bei Raumtemperatur gelagert und nur zum Messen der Kennlinien mit Messmedium aufgefüllt. Um auszuschließen, dass das Reinigen und Sterilisieren der Grund für die defekten Chips sein könnte, wurde auch einer der Millipore-Wasser-Chips jedesmal mit den Nährmedium-Brutschrank-Chips mitgereinigt und sterilisiert. Der andere wurde durchgehend in Millipore-Wasser gelagert.

In Abbildung 4.3 sind die Kennlinienscharen eines Transistors der Millipore-Chips gezeigt, aufgenommen an unterschiedlichen Tagen. Alle 32 Transistoren der 2 Chips verhielten sich wie der dargestellte. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, verändert sich die Steilheit kaum (anfangs $120 \mu\text{A/V}$, zum Schluss $100 \mu\text{A/V}$) und die Verschiebung von V_T erfolgt von anfangs $-0,6$ V auf $-1,1$ V nach 72 Tage in Millipore-Lagerung. Insgesamt sieht es so aus, als ob lediglich die Kennlinienscharen entlang der x-Achse verschoben werden und die Steilheitenveränderung nur aufgrund dieser Verschiebung zustande kommt (Arbeitspunkt bei Steilheitenbestimmung wird immer beibehalten).

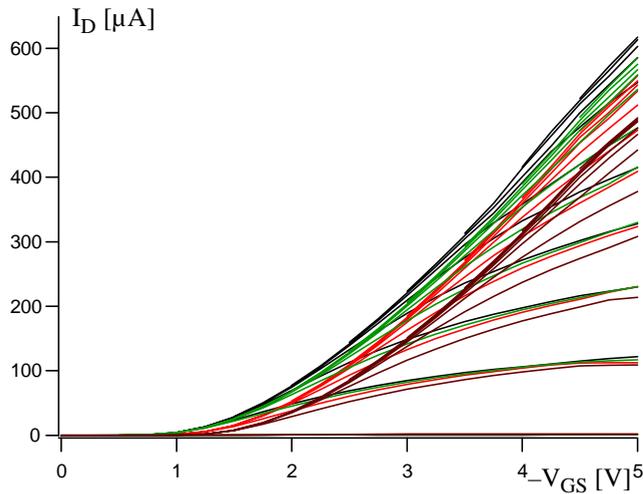


ABBILDUNG 4.3 Kennlinien von Transistor in Millipore-Wasser.
 Zu Beginn wurde die schwarze Kennlinienschar gemessen. Nach 21 Tagen im Brutschrank wurde die rote Kennlinienschar, nach weiteren 8 Tagen die grüne und nach insgesamt 71 Tagen im Brutschrank wurde die braune Kennlinienschar aufgenommen. Weiteres siehe Text.

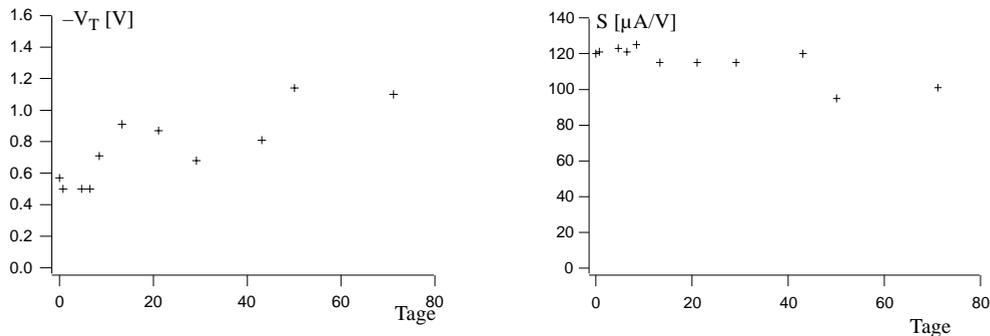


ABBILDUNG 4.4 Schwellspannung V_T und Steilheit S eines Transistors in Millipore-Wasser
Links ist die Schwellspannung V_T in Volt gegen die Tage in Millipore-Lagerung aufgetragen.
Rechts ist die Steilheit am Arbeitspunkt, $V_{GS} = -3,75$ V, $V_{DS} = -3$ V, in $\mu A/V$ gegen die Tage in Millipore-Lagerung aufgetragen.

In Abbildung 4.5 sind die Kennlinienscharen eines Transistors der Nährmedium-Chips gezeigt. Alle 32 Transistoren der beiden Chips verhielten sich wie der dargestellte. In Abbildung 4.6 sind wieder die berechneten Parameter V_T und S aufgetragen.

Auch nach 70 Tagen im Brutschrank tritt keine Verschlechterung der Kennlinien ein. Die Steilheit steigt von anfangs $120 \mu A/V$ auf $136 \mu A/V$ nach 70 Tagen in Betrieb. Die Schwellspannung verschiebt sich auch hier zu negativeren Werten, von anfangs $-0,6$ V zu $-1,6$ V. Dies ist insgesamt eine stärkere Verschiebung als bei den Millipore-Chips. Außerdem werden die Kennlinienscharen diesmal nicht nur entlang der V -Achse verschoben, sondern auch die Steilheit verändert sich. Diese Veränderung ist jedoch so klein, dass sie auch mit einer leicht veränderten Messsituation und nicht mit einer Bauteilveränderung erklärt werden könnte. Insgesamt sind bei beiden Chips die Transistoren auch nach 70 Tagen im Brutschrank voll funktionsfähig.

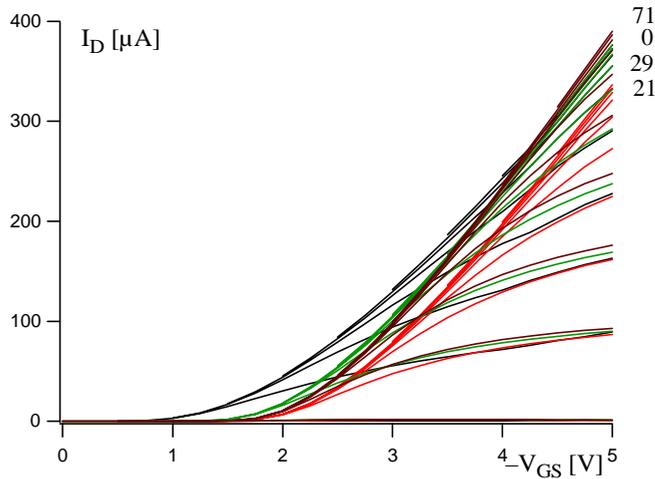


ABBILDUNG 4.5
Kennlinien von Transistor mit Zellkulturmedium, bei 34°C im Brutschrank.

Zu Beginn wurde die schwarze Kennlinienschar gemessen. Nach 21 Tagen im Brutschrank wurde die rote Kennlinienschar, nach weiteren 8 Tagen die grüne und nach insgesamt 71 Tagen im Brutschrank wurde die braune Kennlinienschar aufgenommen.

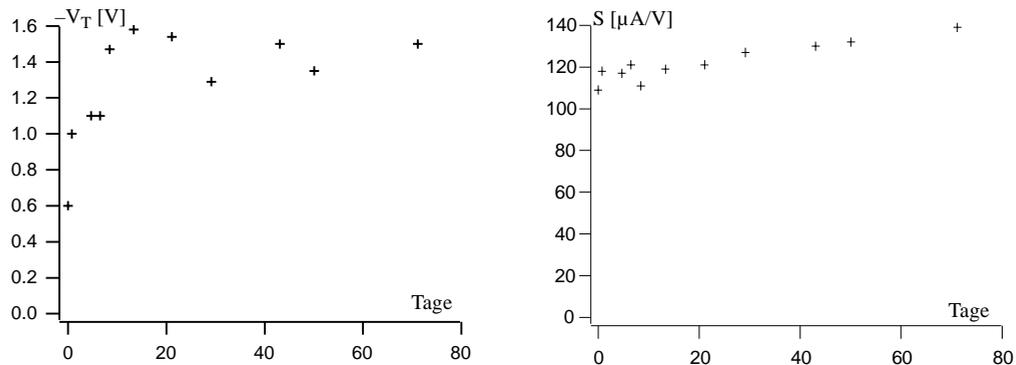


ABBILDUNG 4.6 Schwellspannung V_T und Steigung S eines Transistors mit Zellkulturmedium im Brutschrank

Links ist die Schwellspannung V_T in Volt gegen die Tage im Brutschrank aufgetragen.

Rechts ist die Steilheit in $\mu\text{A/V}$ gegen die Tage im Brutschrank aufgetragen.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass das Rotieren allein mit Nährmedium keinen großen Effekt auf die Qualität der Transistoren hat, habe ich zwei Chips für die Schnittkultur verwendet und jeweils nach 13 Tagen, nach 19 Tagen und nach 26 Tagen in Kultur die Kennlinien gemessen. Wie in Abbildung 4.7 und 4.8 zu sehen ist, ist der Effekt auf die Kennlinien deutlich.

Die Schwellspannung verschiebt sich von $-0,7\text{ V}$ auf $-1,5\text{ V}$ nach 26 Tagen in Kultur. Die Steilheit sinkt von anfangs $90\ \mu\text{A/V}$ bis zur letzten Messung auf $20\ \mu\text{A/V}$; das heißt, die Kennlinien sind nach 26 Tagen in Kultur zusammengebrochen. Nach einigen weiteren Tagen in Kultur waren überhaupt keine Kennlinien mehr messbar.

Alle Transistoren dieses Chips verhielten sich gleich, ebenso die des zweiten Chips.

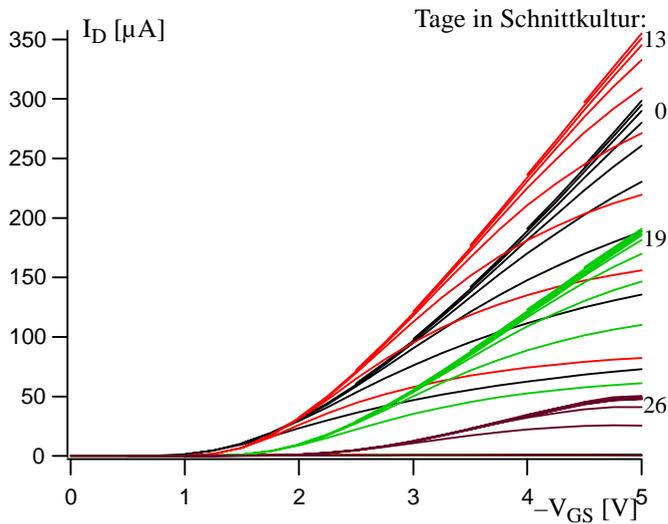


ABBILDUNG 4.7 Kennlinien im Verlauf der Schnittkultur.
 Vor der Kultur wurde die schwarze Kennlinienschar gemessen. Nach 13 Tagen in Kultur die rote, nach weiteren 6 Tagen die grüne und nach insgesamt 26 Tagen in Kultur waren die Kennlinien auf die braune Kennlinienschar zusammengesunken.

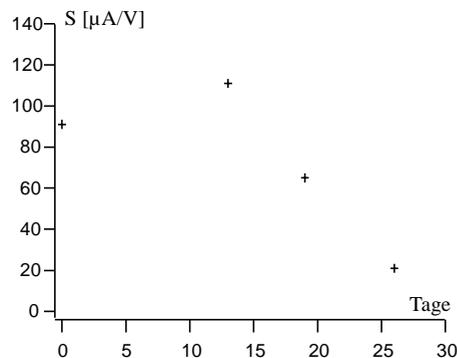
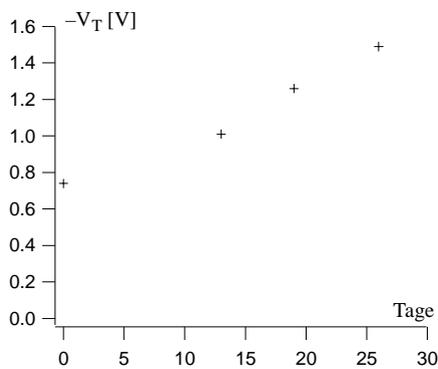


ABBILDUNG 4.8 Schwellspannung V_T und Steigung S eines Transistors, auf dem Hippocampusschnitte kultiviert wurden

Links ist die Schwellspannung V_T in Volt gegen die Tage in Schnittkultur aufgetragen.
Rechts ist die Steilheit in $\mu\text{A}/\text{V}$ am Arbeitspunkt $V_{GS} = -3,75 \text{ V}$, $V_{DS} = -3 \text{ V}$ gegen die Tage in Schnittkultur aufgetragen.

Ergebnis der Kennlinienmessungen:

- Es wird eine Verschiebung der Schwellspannung zu negativeren Werten bei allen Transistoren beobachtet.
- Erst die Schnittkultur bewirkt ein Zusammenbrechen der Transistorkennlinien.

Das Verschieben der Schwellspannung wird bereits in der Diplomarbeit von J. Weis beschrieben ([Wei 90] S.59: „Die Schwellspannung hat sich im Laufe der Zeit ins positive verschoben“). Allerdings beschreibt er eine Verschiebung zu weniger negativen Werten. Im Gegensatz dazu wird bei allen momentan in der Abteilung verwendeten Chips eine Verschiebung zu negativeren Werten festgestellt (mündliche Mitteilung), genau wie in dieser Arbeit.

Der Wert von V_T bestimmt sich über Prozessparameter während der Herstellung der Transistoren. Die Verschiebung von V_T nach Fertigstellung der Chips, also während

des Betriebs der Feldeffekttransistoren, wird mit beweglichen positiven Ionen erklärt. Während des Herstellungsprozesses der Transistoren können bewegliche positive Ionen wie Natrium- oder andere Alkalimetallionen in das Oxid eingebaut werden, die sich dann während des Betriebs des Transistors hin- und herbewegen und so später noch V_T verschieben können. Ob nach dem Herstellungsprozess, also z. B. während der Schnittkultur, Reinigung oder Messung, noch zusätzlich positive Ionen ins Oxid ein- oder auswandern können, ist unklar.

Was passiert beim Zusammenbrechen der Steilheit/der Kennlinien, also was passiert mit dem Drainstrom? Kann er irgendwann einfach über das Gate ins Bad abfließen? Nach der Definition der Steilheit (siehe GL 2.2 und GL 2.3) kann sich die Dicke des Oxids verändern. Wenn die Dicke zunimmt, wird der Strom geringer. Annehmen würde man aber eher eine Abtragung des Oxids (siehe Abb.4.1 und Profilometermessung Abb.4.2).

Weitere Größen, die in die Steilheit eingehen, sind die Permittivität des Oxids und die Beweglichkeit der Ladungsträger. Eine negative Veränderung der Beweglichkeit der Ladungsträger könnte durch ein Aufrauen des Oxids, und damit durch Streuprozesse an der Oberflächenrauigkeit, auftreten.

Was genau im Einzelnen bis zum Verschwinden des Gateoxids passiert, konnte nicht geklärt werden.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Kennlinien-Untersuchungen wurden an den Eigenbau-Chips vorgenommen. Die hierbei gefundenen Ergebnisse haben sich im weiteren Verlauf der Kultivierung von Hippocampuschnitten auf Chips bestätigt. Alle verwendeten Eigenbau-Chips waren nach spätestens drei- bis viermaliger Schnittkultur (also insgesamt ungefähr 30 Tage in Kultur) nicht mehr für Messungen verwendbar.

Eine weitere Veränderung fiel bei Messungen auf: Je länger die Chips in Kultur gewesen waren, um so stärker war ihr Rauschen und ebenso die Drift. Drift bedeutet, dass die einmal eingestellte Offsetspannung zur Kompensation des Drainstromes I_D am Arbeitspunkt nicht konstant blieb, sondern im Verlauf der Messung I_D am gegebenen Arbeitspunkt immer weniger wurde und somit ständig aus dem Messfenster wanderte. Die Offsetspannung musste immer wieder nachreguliert werden.

Die Cablos- und Adhesios-Chips wurden bisher maximal zweimal in Schnittkultur genommen und zeigten danach noch gute Kennlinien. Lediglich die Drift im Verlauf der Messung hatte bei zwei der Cablos-Chips zugenommen. Einer der Adhesios-Chips, der als einziger ein drittes Mal in Kultur kam, war danach defekt.

4.1.2 Visualisierung der Schnittkultur auf stark strukturierten Chips

Zellkulturen auf Silizium-Chips können nicht mit einem Durchlichtmikroskop betrachtet werden. Es muß ein Auflichtmikroskop verwendet werden, mit dem sich allerdings die Hippocampusschnitte nicht so gut auflösen lassen.

Bei den Eigenbau-Chips mit ihrer relativ glatten Oxidoberfläche sind die Schnittkulturen noch recht gut zu sehen, und es lassen sich sogar einzelne Nervenzellen erkennen. Je mehr Strukturen jedoch ein Chip hat, wie z. B. Cablos und Adhesios, desto schlechter ist der Schnitt zu sehen. Besonders schwierig ist es bei den Siemens-Chips, bei denen jeder Transistor noch umgeben ist von Verstärker-einheiten. Das typische Band des Schnittes ist nach einigen Tagen in Kultur kaum mehr zu erkennen, einzelne Nervenzellen sind nicht aufzulösen. Siehe auch die Bilder der Nissl-Färbung Abb.3.14: Der Schnitt auf dem Siemens-Chip ist am schlechtesten zu erkennen.

4.2 Messungen mit den unterschiedlichen Chiptypen

Im folgenden werden die Messungen, die ich mit den Eigenbau-Chips (Kap. 4.2.1), mit den Cablos-Chips (Kap. 4.2.2) und mit den Adhesios-Chips (Kap. 4.2.3) durchgeführt habe, dargestellt und die gemessenen Signalformen diskutiert. Anschließend wird eine Messung mit Bicucullin im Messmedium vorgestellt (Kap. 4.2.4), und zum Schluss eine Messung mit den Siemens-Chips (Kap. 4.2.5) gezeigt.

4.2.1 Eigenbau-Chip

Insgesamt wurden ca. 60 Eigenbau-Chips für die Schnittkultur verwendet.

Auf 20 Chips, mit denen Kopplungen durchgeführt wurden, wurden während eines Zeitraums von 5 Monaten insgesamt 60 Hippocampusschnitte kultiviert (pro Chip ungefähr 3 Kulturen), davon wurden 11 erfolgreich für Messungen verwendet. Gründe für die geringe Ausbeute sind: 1) Nur ungefähr 50 % der Schnittkulturen sind verwertbar, 2) davon ist bei einigen die relative Lage zu den Transistoren ungünstig und 3) die Transistoren sind nach der Kultur defekt (Hauptgrund).

In Abbildung 4.9 sind links die Dimensionen einer Hippocampuskultur und rechts das Layout der Eigenbau-Chips dargestellt, um ein Bild von dem Größenverhältnis „Schnitt zu Transistoren“ zu geben.

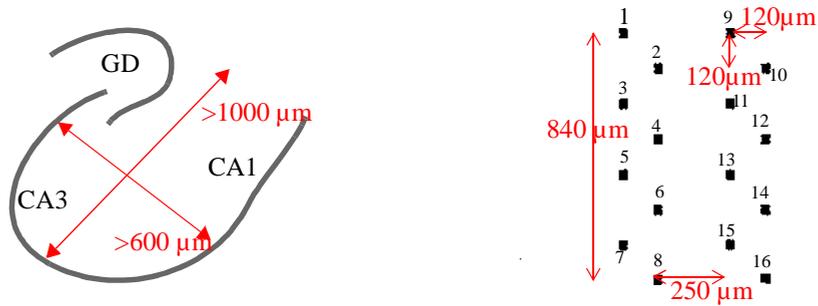


ABBILDUNG 4.9 Links: Gyrus dentatus und Hippocampus als Skizze. Die skizzierten Zellkörperbänder (graue Bögen) sind bei GD ungefähr 50 µm bis 100 µm dick, der CA-Bogen hingegen um die 100 µm bis 150 µm dick, wobei in CA3 das Stratum pyramidale breiter ist als in CA1.
Rechts: Nummerierung und Abstand der einzelnen Gates.

Abbildung 4.10 ist eine Aufnahme mit konfokalem Mikroskop nach Anfärbung des Schnittes mit BNBIQ (Anfärbung siehe [Braun 99], S.61). Der Hippocampuschnitt war 12 Tage in Kultur. Mit dem konfokalen Mikroskop wurde die Tiefe des Schnittes durchgeföhrt und eine Dicke des Schnittes von ~70 µm gemessen.

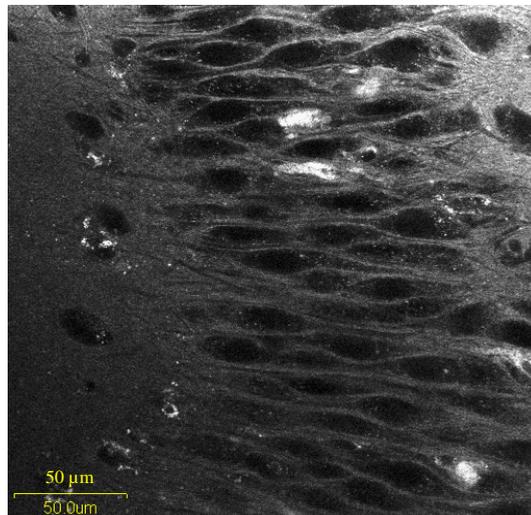


ABBILDUNG 4.10 Aufnahme der Zellkörperschicht in CA3 mit konfokalen Mikroskop

Es folgen insgesamt sechs Eigenbau-Chip-Messungen, die jeweils einen Sweep darstellen, der während einer mehrstündigen Messung aufgenommen wurde. Die in [Abb.4.11–Abb.4.16](#) aufgetragenen Potenziale sind bereits die über die Steilheit am Arbeitspunkt umgerechneten, direkt am Gate anliegenden Potenziale.

Die Messungen zeigen evozierte Feldpotenziale, d.h. es wird gereizt, um die Antwortaktivität der Nervenzellen abzuleiten. Dazu wird eine spitze, extrazelluläre Wolframelektrode verwendet, mit der ein 100 µs langer Strompuls unterschiedlicher Stärke angelegt wird.

Die ausgewählten Messungen sollen zeigen, dass hippocampale Feldpotenziale in einer Vielfalt von Formen und Größen vorkommen, auch wenn die beiden typischen, in [Abb.2.6](#) beschriebenen Signalformen, die am häufigsten gemessenen Feldpotenziale sind.

Die Zeit, mit der an einem Schnitt gemessen werden konnte, reichte von einer Stunde bis zu 7 Stunden (z. B. Eigenbaumessung Abb.4.15). Die Messungen wurden beendet, weil die Transistoren aus dem Verstärkerbereich gedriftet waren, und nicht, weil der Schnitt nicht mehr aktiv war.

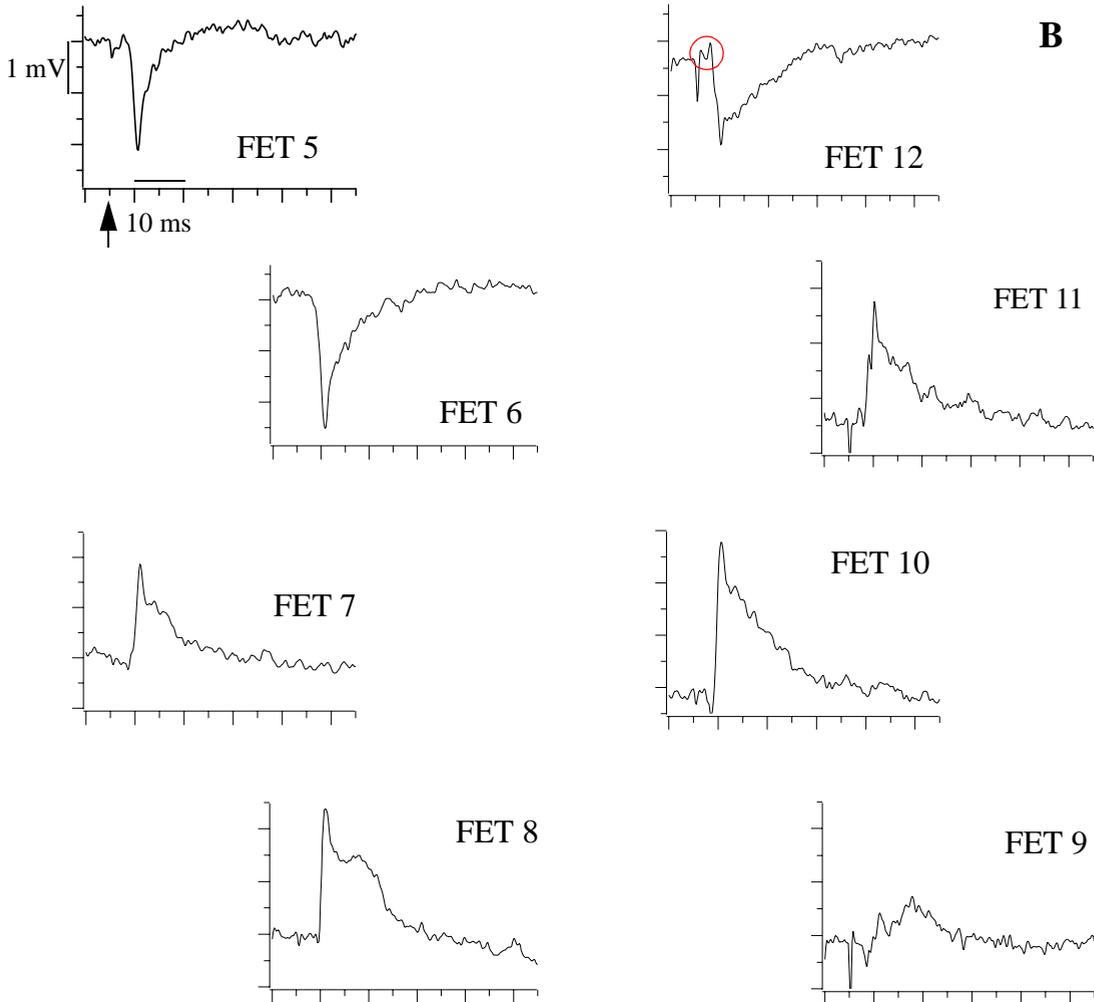


ABBILDUNG 4.11 Eigenbau-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampale Formation (Hippocampus und Gyrus dentatus) relativ zum Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte Feldpotenziale (FPs) gemessen an 9 unterschiedlichen Positionen entlang von CA3 in der Hippocampuskultur (18 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das gemessene Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 5, sind jeweils die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist in Graph FET 5 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug 40 μ A. Roter Kreis in FET 12: fiber volley

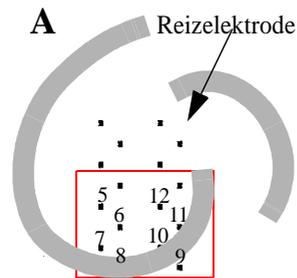


Abbildung 4.11 zeigt evozierte Feldpotenziale (FPs), wie sie nach Reizung der Moosfasern in der CA3-Region des Hippocampus abgeleitet werden. Die FPs im Str.

radiatum, FET 5, FET 6 und FET 12, zeigen die negative Potenzialform typisch für die Ableitung im Bereich der apikalen Dendriten (siehe Kap.2.3, Abb.2.6). Die FPs im Str. pyramidale sind dagegen positiv, wie auf FET 7, FET 8, FET 10 und FET 11. FET 9 sitzt im Übergang Str. pyramidale/Str. oriens und es wird nur noch ein schwaches, positiv gehendes FP gemessen. Alle hier gemessenen Signale können synaptischen Strömen zugeordnet werden und sind somit pEPSPs. Es tritt kein pSpike auf, der Reizpuls von $40 \mu\text{A}$, $100 \mu\text{s}$, ist zu schwach. Lediglich der fiber volley, gut zu sehen in FET 12 (rot eingekreist), ist Aktionspotenzialströmen zuzuordnen, und zwar dem Schwung an Aktionspotenzialen, die durch die Reizung in den Moosfasern ausgelöst werden und am Str. radiatum vorbeiziehen.

Die Breite der pEPSPs von Beginn bis Ende des Signals variiert und liegt ungefähr zwischen 10 ms (FET 5) und 25 ms (FET 13). Die Höhe der Amplituden ist ausgeglichen zwischen den negativen und positiven pEPSPs, wobei das größte positive Signal auf FET 10 mit 2,8 mV gemessen wird und das größte negative Amplitude auf FET 6 mit -2,5 mV.

Abbildung 4.12 zeigt ebenfalls eine Messung in der CA3-Region des Hippocampus nach Reizung der Körnerzellen im GD. Das Band des Str. pyramidale läuft entlang FET 11, FET 10, FET 9 und FET 8. Diese Transistoren messen das typische, positive pEPSP, wobei das Signal auf FET 9 mit 1,2 mV am größten ist.

FET 7, $120 \mu\text{m}$ oberhalb von FET 8 zeigt ein sehr kleines, fast verschwindendes negatives Potenzial. Diese Position ist nahe der Mitte der „Dipolachse“ der Stromsenken in den apikalen Dendriten und der Stromquellen in den Somata der Pyramidenzellen.

FET 5, FET 6, FET 12, FET 13 und FET 15 zeigen eindeutige negative pEPSPs und bezeichnen so das Band im Str. radiatum, wo der synaptische Einstrom in die Dendriten nach Reizung der Moosfasern stattfindet. Auf FET 5 und FET 12 ist der fiber volley zu sehen.

FET 4 und FET 14 zeigen Signale, die nicht gut in der Literatur zu Summenpotenzialen im Hippocampus beschrieben sind. Jedoch sehen diese beiden Signale wie die Form eines propagierenden Aktionspotenzials, extrazellulär abgeleitet, aus (siehe [Joh 99], S. 425 und [Sch 90] S. 40). Dass der Spike etwas breiter als für ein AP üblich ist, wird erklärt, dass hier ein Summenaktionspotenzial von vielen Moosfasern abgeleitet wird, die sich nicht ganz synchron überlagern.

FET 2 und FET 16 zeigen keine Signale, und FET 1 und FET 3 undefinierte Signale; die Positionen dieser Transistoren liegen in der Mitte des Schnittes und sollten nichts oder nur wenig von der Erregung der Pyramidenzellen durch die Moosfasern mitbekommen.

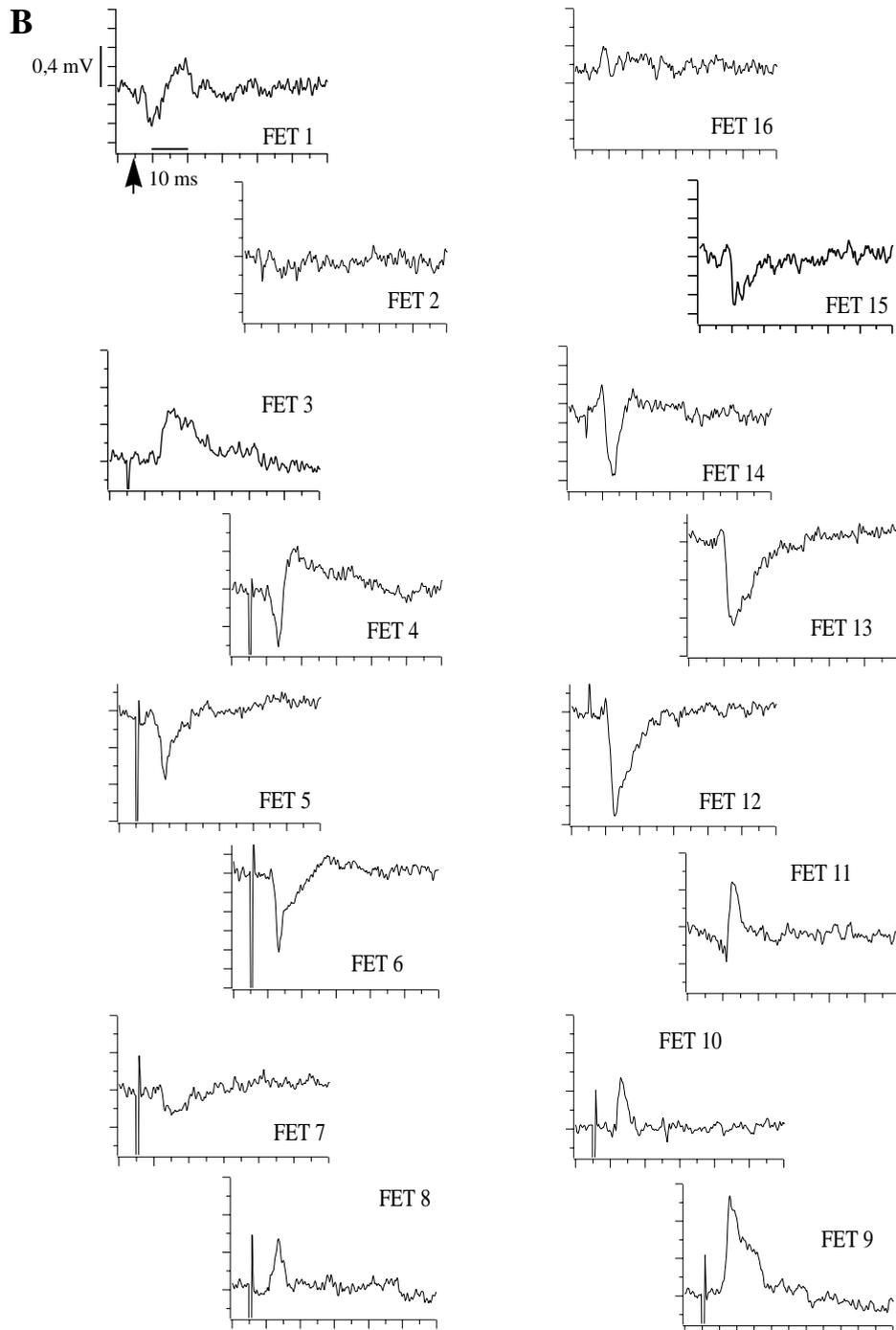
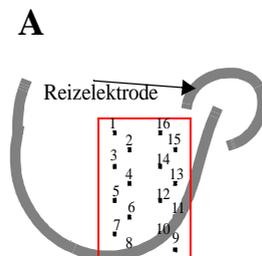


ABBILDUNG 4.12 Eigenbau-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 16 unterschiedlichen Positionen entlang von CA3 in der Hippocampuskultur (16 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$.



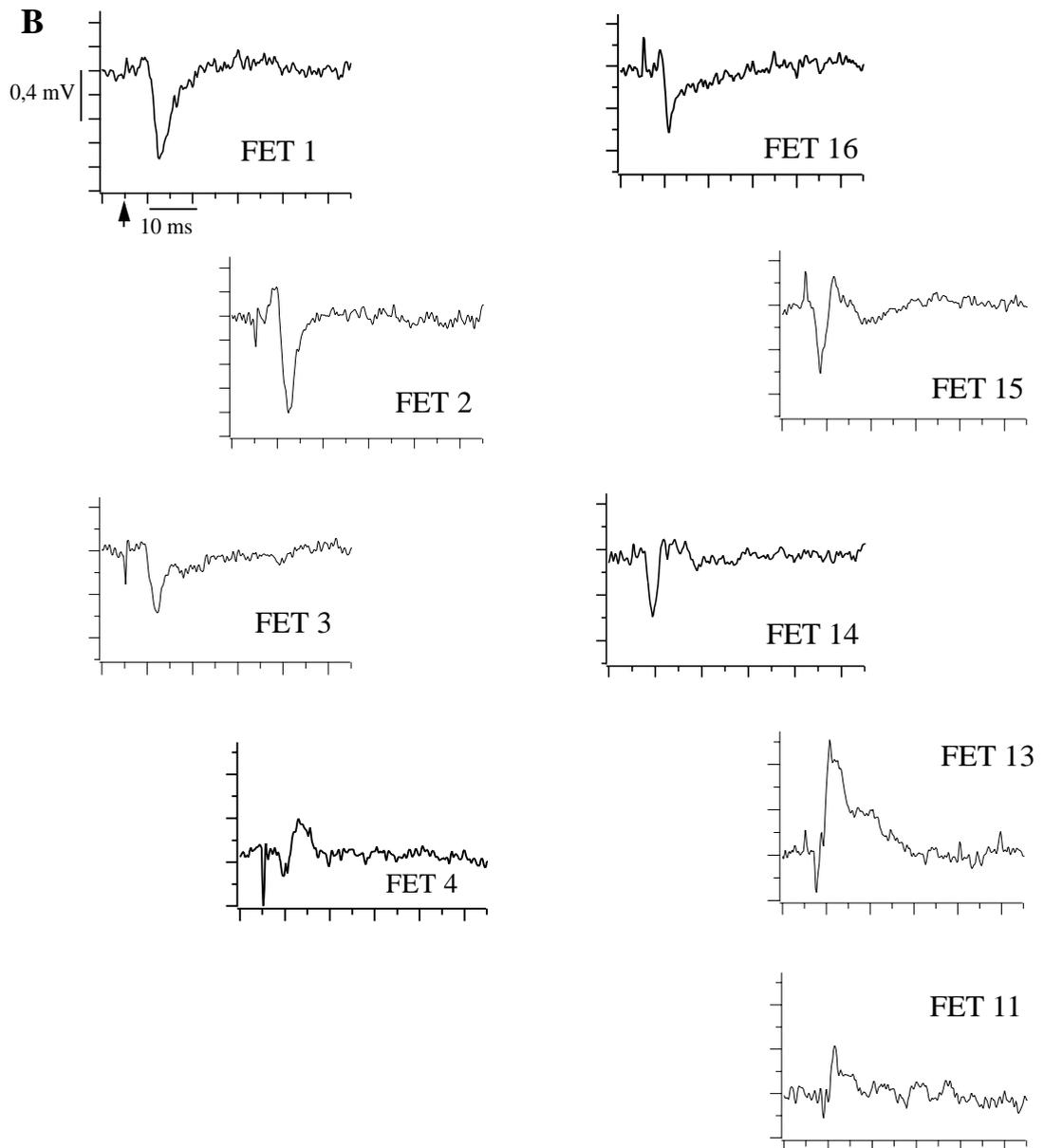
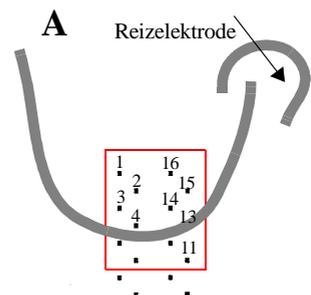


ABBILDUNG 4.13 Eigenbau-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampale Formation (Hippocampus und GD) relativ zum Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte Feldpotenziale gemessen an 9 unterschiedlichen Positionen in CA3 in der Hippocampuskultur (28 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$.



Bei der Messung [Abbildung 4.13](#) sind viele Signalformen zu sehen, die nicht eindeutig in der Literatur beschrieben sind.

Das Str. pyramidale zieht entlang FET 4, FET 13 und FET 11, wobei FET 4 zum Übergang Str. radiatum sitzt und FET 11 zum Übergang Str. oriens. FET 13 zeigt das positive pEPSP der Somata-Schicht, am Beginn dieses pEPSPs steht jedoch ein negativ gehender, kurzer Spike. Dieser Spike zu Beginn des pEPSPs und nicht in der Mitte, wie zumeist in der Literatur beschrieben, ist typisch für meine Transistormessungen, wie auch spätere Messungen, vor allem mit Cablos und Adhesios noch zeigen werden. In [Ple 93], [Nov 88], [Mul 93], [DiS 86], [And 77] und [And 71a] werden diese Spikes zu Beginn des Feldpotenzials auch mit der Theorie der pSpikes erklärt, d.h. dieser Spike ist Ausdruck für ein (Summen)-Aktionspotenzial, dass durch überschwellige Reizung in den Somata der Pyramidenzellen ausgelöst wird. Dort entsteht eine aktive Stromsenke, während der Stromeinfluss in der Pyramidenzellschicht durch Stromausfluss in den Axon- und proximalen Dendritenregionen kompensiert wird, und dort entstehen passive Stromquellen. Das folgende positive Potenzial entsteht durch Kaliumausstrom und wiederum Kompensation dieses Stroms in den angrenzenden Gebieten. Das Fortleiten des APs in die basalen Dendriten und Axone des Str. oriens und zurück in die Dendriten des Str. radiatum, hat ebenfalls Einfluss auf die Form des gemessenen Feldpotenzials und beeinflusst seine räumlich-zeitliche Ausdehnung. [Ple 93]

Eine andere Erklärung wäre so etwas wie ein fiber volley, d.h. während der Kultivierung wachsen die Moosfasern auch direkt ins Str. pyramidale und der Schwung der APs in ihnen, ausgelöst durch den extrazellulären Strompuls, wird auch im Str. pyramidale detektiert. Um das auszuschließen, müsste die Morphologie der Schnittkulturen eingehender untersucht werden. Dieser negative Spike zu Beginn ist auch auf FET 11 zu sehen.

FET 4 misst ein diphasisches Signal, bei dem der negative Anteil fast so groß und breit wie der positive Anteil ist. So ein Signal tritt immer wieder am Übergang Str. pyramidale/Str. radiatum auf.

FET 1, FET 2, FET 3 und FET 16 zeigen die negativen pEPSPs des Str. radiatum. FET 14 und FET 15 zeigen diphasische Signale, die sowohl den Übergangssignalen Str. Pyramidale/Str. radiatum als auch den extrazellulär abgeleiteten APs, wie bereits auf S. 45 für FET 4 und FET 14 von [Abb.4.12](#) beschrieben, zugeordnet werden können.

Die nächsten beiden Messungen, [Abbildung 4.14](#) und [Abbildung 4.15](#) sind in der CA1-Region des Hippocampus abgeleitet, nach Reizung der Schaffer Kollaterale in CA3. Bei beiden wurde ein 40 μ A, 100 μ s, Strompuls angelegt.

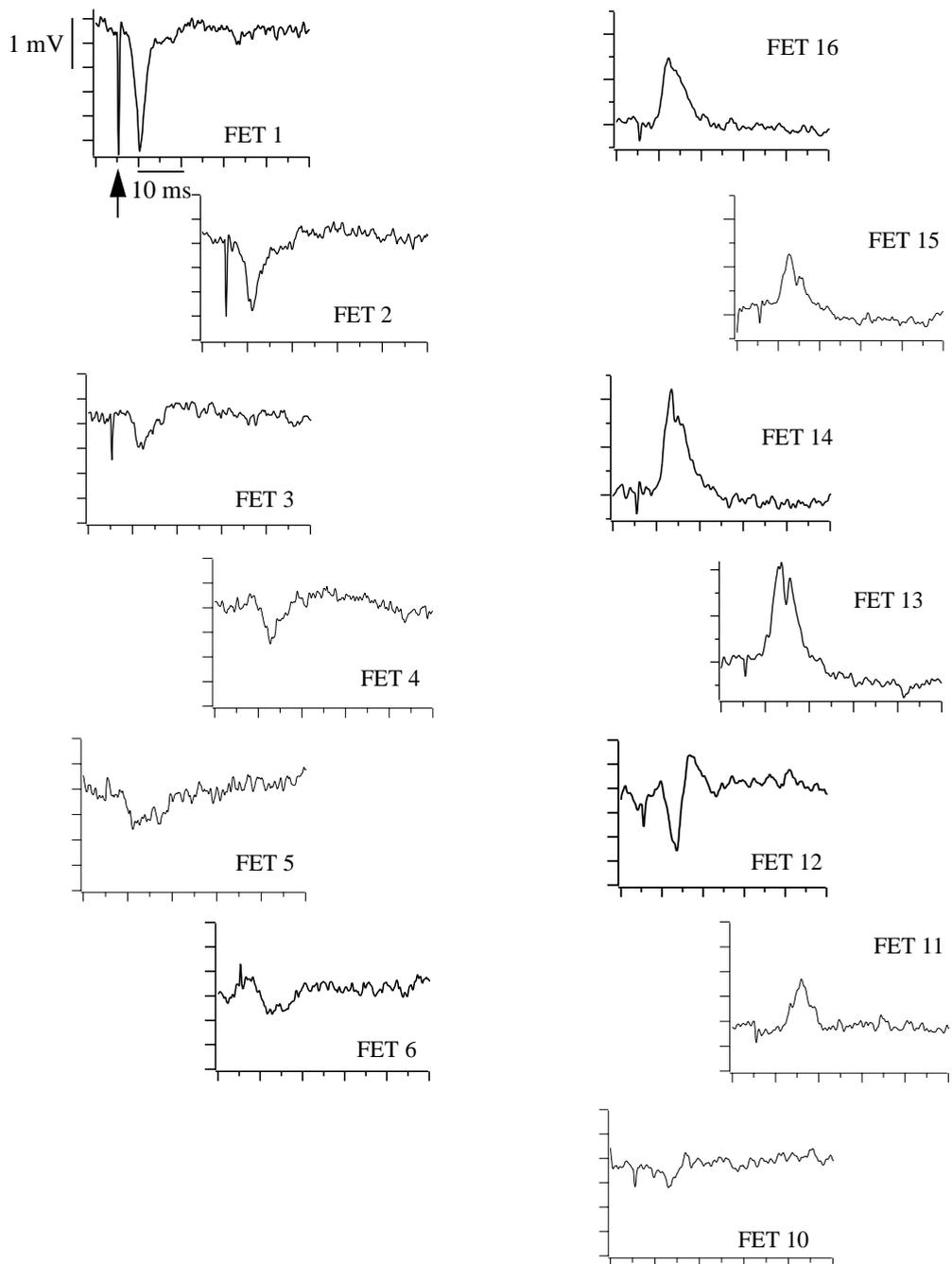
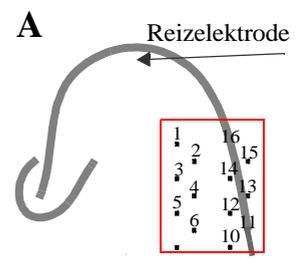


ABBILDUNG 4.14 Eigenbau-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und Gyrus dentatus relativ zum Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 13 unterschiedlichen Positionen in CA1 entlang der Hippocampuskultur (13 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$. Die Nissl-Färbung der Kultur ist in Abb.3.14 zu sehen.



Die linke Seite von Abb.4.14, FET 1, FET 2, FET 3, FET 4, FET 5 und FET 6 zeigen die negativen pEPSP des synaptischen Einstroms in die Dendriten (Stromsenke) entlang des Str. radiatum von CA1. FET 1 zeigt das größte Signal mit $-2,9$ mV. Die rechte Seite von Abb.4.14 zeigt die positiven Signale der Somata-Schicht: FET 16, FET 15, FET 14 (größte positive Amplitude von $2,2$ mV), FET 13 und FET 11. FET 12 und FET 10 zeigen die bereits besprochenen diphasischen Übergangssignale; wenn man die Nissl-Färbung dazu in Abb.3.14 ansieht, sieht man, dass diese beiden Transistoren genau am Rand des blau angefärbten Somata-Gebietes liegen.

Die Messung in Abb.4.15 zeigt einige bisher unbesprochene und auch in der Literatur wenig bekannte Signale. Das liegt daran, dass u.a. in der Mitte des Schnittes abgeleitet wird, wo die Schaffer Kollaterale vorbeiziehen, aber wenig synaptische Verbindungen auf andere Nervenzellen ausbilden. FET 16, FET 15, FET 14 und sehr schwach auch FET 13 zeigen Signale, die den „giant extracellular spikes“ ähneln, wie sie in [And 71] beschrieben werden. Auch [Nov 88] leitet so ein Signal ab und bezeichnet es als CAP (Compound Action Potential), das durch den Schwung an APs in den Schaffer Kollateralen zustande kommt und deswegen so groß abgeleitet wird, weil die Elektrode sehr nah an der Zelle sitzt.

Alle anderen Signalformen wurden bereits in früheren Messungen besprochen. Interessant bei dieser Messung ist noch, dass die negativen pEPSPs sehr viel kleinere Amplituden als das sehr große positive pEPSP, auf FET 1 mit 3 mV, haben. Die größte negative Amplitude ist auf FET 2 mit $-1,5$ mV. Auf FET 9 und FET 10 ist eine ebenfalls bisher nicht gemessene Signalform (rot eingekreist) zu sehen. Diese stellt ein negatives pEPSP dar, ausgelöst durch die Stromsenke an den apikalen Dendriten, in das ein positiv gemessener pSpike einwandert. Dieser pSpike im Str. radiatum entsteht durch Aktionspotenziale, die in den Somata der Pyramidenzellen ausgelöst werden.

In Messung Abb.4.16 (letzte dargestellte Eigenbau-Chip-Messung) wurden mit einem 60 μ A Strompuls die Körnerzellen im GD gereizt und sowohl im GD (FET 1, FET 2 und FET 3), in der CA3-Region des Hippocampus (FET 15 und FET 16), als auch in der CA1-Region (FET 7 und FET 8) abgeleitet. Hier ist also zu sehen, dass sich die Signale über die gesamte hippocampale Formation ausbreiten.

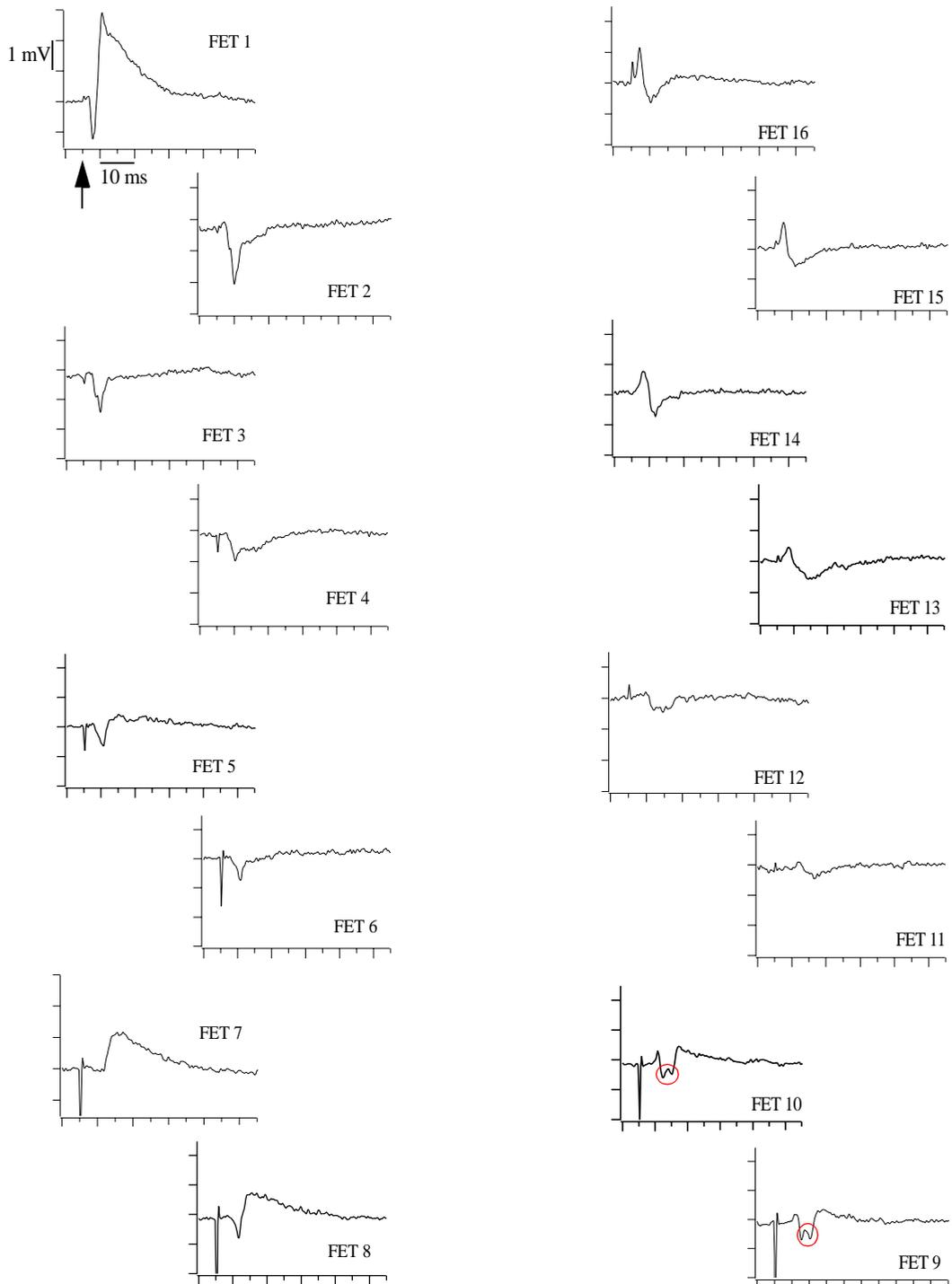
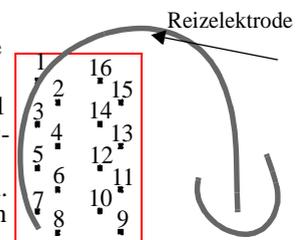


ABBILDUNG 4.15 Eigenbau-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 16 unterschiedlichen Positionen entlang CA1 in der Hippocampuskultur (15 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$. Rote Kreise: pSpikes



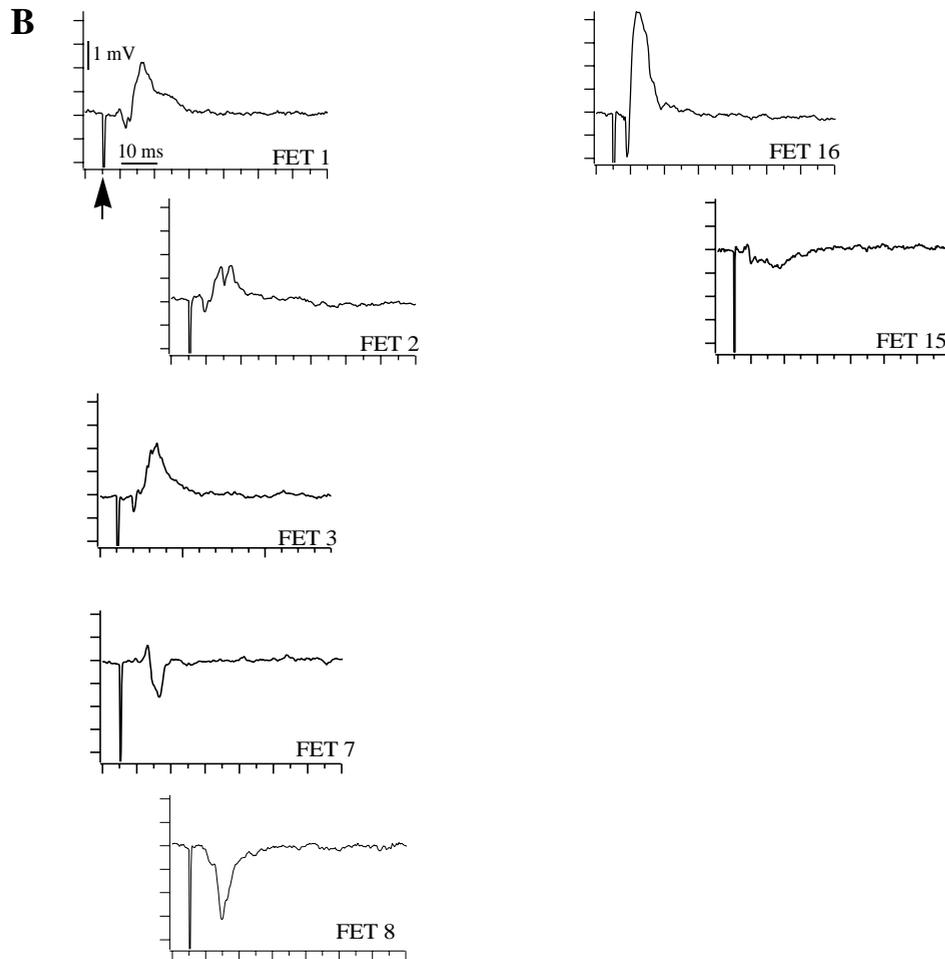
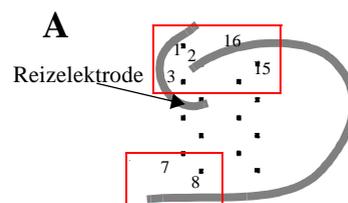


ABBILDUNG 4.16 A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und Gyrus dentatus relativ zu den 16 Feldeffekttransistoren, die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte Feldpotenziale gemessen an 7 unterschiedlichen Positionen sowohl in GD, CA3 und CA1 in der Hippocampuskultur (15 div). Die x-Achse ist die Zeitachse und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind jeweils die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $60 \mu\text{A}$.



Sowohl das typische positive (Str. pyramidale) als auch negative (Str. radiatum) pEPSP wurde in allen Messungen gefunden. Mit den Eigenbau-Chips konnten über den ganzen Schnitt verteilt Feldpotenziale abgeleitet werden, angefangen beim Gyrus dentatus, entlang des Hippocampus von CA3 bis zu CA1.

Es wird nun noch die zeitliche Konstanz der Feldpotenziale im Verlauf einer Messung und das Verhalten der Feldpotenziale bei unterschiedliche Reizstärken untersucht.

Konstanz der Amplitude

Es ist möglich, kultivierte Hirnschnitte über einen sehr langen Zeitraum in Messung zu halten.

Wie konstant ist eine Messung über einen längeren Zeitraum?

Es wurde für 2 h mit immer gleicher Reizstärke von $40 \mu\text{A}$ im GD gereizt und in CA3 die evozierten Feldpotenziale abgeleitet (siehe auch Messung Abb.4.12).

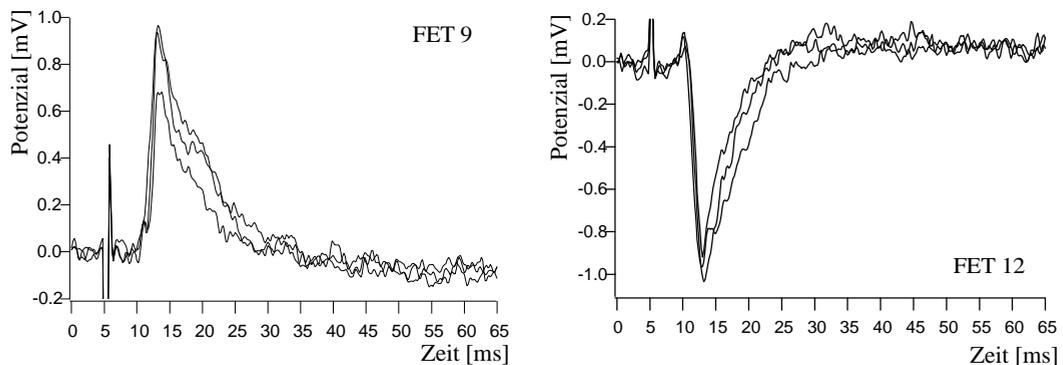


ABBILDUNG 4.17 pEPSP gemessen bei konstantem Reizpuls ($40 \mu\text{A}$ für $100 \mu\text{s}$, bei 5ms): FET9(links)undFET 12(rechts): Feldpotenzial zum Zeitpunkt 1 min, nach 1 h und nach 2 h

In Abbildung 4.17 sind zwei Transistoren herausgegriffen. Bei beiden Transistoren nimmt die Amplitude im Verlauf der zwei Stunden etwas ab. Die Amplitude an FET 9 sinkt um ungefähr $-0,29 \text{ mV}$ von $0,97 \text{ mV}$ auf $0,68 \text{ mV}$. An FET 12 sinkt sie um ungefähr $0,13 \text{ mV}$ von $-1,01 \text{ mV}$ auf $-0,88 \text{ mV}$.

In Abbildung 4.18 sind die gemessenen Amplituden auf den beiden Transistoren noch einmal im Verlauf der Messung aufgetragen.

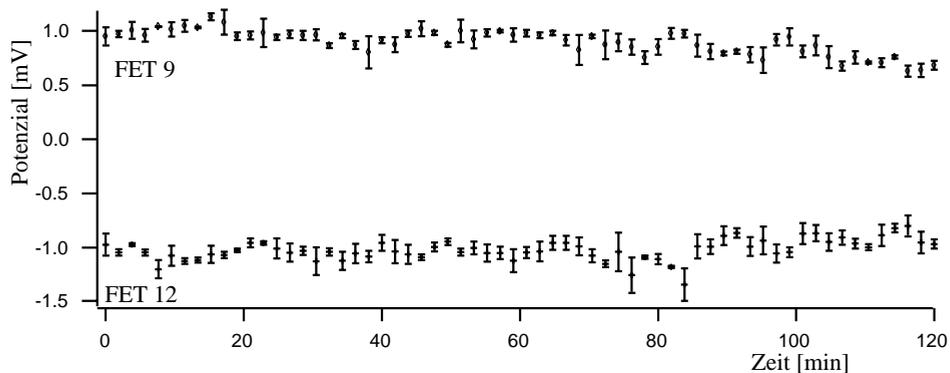


ABBILDUNG 4.18 Amplituden (gemittelt über je 3 Messungen im Abstand von 10s) im Verlauf einer 2h Messung
Reiz: $40 \mu\text{A}$ Oben: Amplituden von FET 9 Unten: Amplituden von FET 12

Insgesamt ist der Verlauf der Messung stabil, die Form und Höhe der abgeleiteten Feldpotenziale bleibt über 2h konstant. Die Messumgebung selber beeinflusst also die Aktivität im Schnitt nicht. Es können Experimente mit gezielten Manipulationen

(z. B. Zugabe pharmakologischer Substanzen oder Anlegen spezieller Reizprotokolle) an der Hippocampuskultur, und ihre Antwort darauf, durchgeführt werden.

Amplitude bei unterschiedlichen Reizstärken

Wie verhält sich ein pEPSP bei Anlegen unterschiedlicher Reizstärken?

In Abbildung 4.19 ist das pEPSP auf einem Transistor im Str. pyramidale von CA3 gezeigt, nach Reizung in GD mit unterschiedlichen Reizstärken, angefangen bei 20 μA bis zu 50 μA in 10 μA -Schritten. Bei Anlegen von 60 μA erhöht sich die Amplitude des pEPSP nicht. Es findet eine Sättigung statt.

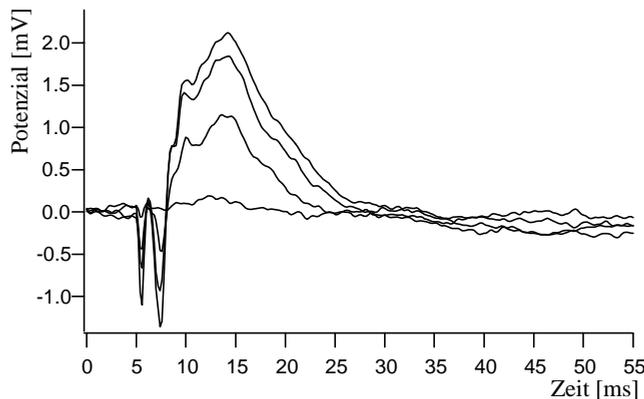


ABBILDUNG 4.19 pEPSP bei Reizstärken von 20 μA (niedrigste Kurve), 30 μA , 40 μA und 50 μA (höchste Kurve). Reiz bei 5 ms für 100 μs in GD, Messung in CA3 mit Transistor

In Abbildung 4.20 ist die Sättigung der Amplitude mit zunehmender Reizstärke zu sehen. Es ist die Amplitude des pEPSP gegen die zunehmende Reizstärke aufgetragen. Die Amplitude nimmt zuerst mit höheren Reizstärken zu, hat aber bei 50 μA mit einer Amplitude von 2,1 mV ihr Maximum erreicht und läuft in die Sättigung.

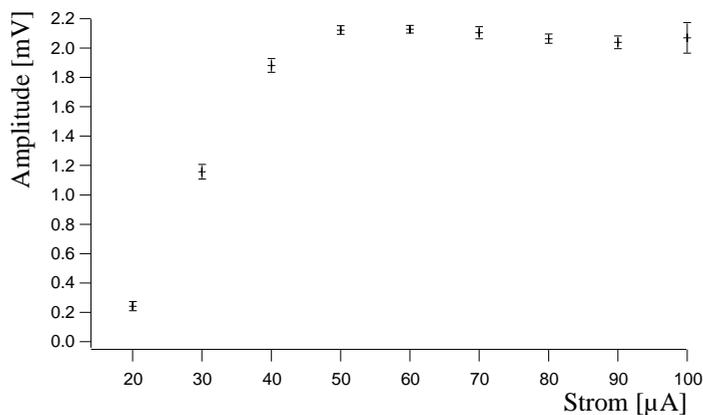


ABBILDUNG 4.20 pEPSP versus Reizstärke: Amplitude sättigt mit zunehmender Reizstärke und Dauer der Messung. (Reiz bei 5 ms für 100 μs in GD, Messung in CA3 auf FET 3)

Die Sättigung der Input-Output Kurve (Amplitude des pEPSP gegen Reizstärke) ist typisch ([Som 87], [Joh 99] S.447: „If one plots the amplitude (or slope) of the pEPSP

vs. stimulus intensity, one obtains a monotonic, roughly sigmoidal-shaped, curve“). Die Reizstärke bestimmt die Anzahl an Fasern, die stimuliert werden. Ab einer gewissen Reizstärke ist es nicht möglich, noch weitere Fasern zu stimulieren und die Amplitude des pEPSPs bleibt konstant.

Die Untersuchung von Input-Output Kurven in Hirnschnitten wird vielfach in der Untersuchung von Gehirnfunktionen und pathophysiologischen Studien verwendet.

4.2.2 Cablos-Chip

Die Cablos-Chips bieten ein lineares Transistorarray, mit dem die Feldpotenziale in einer Hippocampuskultur in regelmäßigen Abständen aufgenommen werden können. Der Abstand zwischen den einzelnen Transistoren des Cablos-Chips beträgt 22 μm . Das gesamte Transistor-Array ist 2,1 mm lang. Insbesondere bietet sich damit an, den Signalverlauf entlang der Pyramidenzellen, von den apikalen Dendriten im Stratum radiatum, über die Somata im Stratum pyramidale, bis hin zu den basalen Dendriten im Stratum oriens zu verfolgen.

Insgesamt wurden vier Cablos-Chips während eines Zeitraums von drei Monaten für die Schnittkultur und die Messungen verwendet. Jeder Chip wurde ungefähr zweimal in Kultur genommen. Alle vier Chips sind noch funktionsfähig.

Dargestellt sind im folgenden fünf Cablos-Chip-Messungen, und zwar jeweils ein Sweep einer mehrstündigen Messung. Die aufgetragenen Feldpotenziale sind bereits die über die Steilheit am Arbeitspunkt umgerechneten, direkt am Gate anliegenden Potenziale. Die Messungen zeigen evozierte Feldpotenziale, d.h. es wird gereizt, um die Antwortaktivität der Nervenzellen abzuleiten. Dazu wird eine spitze, extrazelluläre Wolframelektrode verwendet, mit der ein 100 μs langer Strompuls unterschiedlicher Stärke angelegt wird. Die ausgewählten Messungen sollen zeigen, wie sich die Form der Feldpotenziale entlang der Dendriten-Somata-Achse ändert.

Messungen konnten gleichzeitig nur an 16 Transistoren gemacht werden, weil der Verstärker nicht für mehr Kanäle vorgesehen ist. Die gemessenen Feldpotenziale sind aus Platzgründen nicht untereinander, sondern in zwei Reihen nebeneinander dargestellt.

Die Zeit, mit der an einem Schnitt gemessen werden konnte, reichte von einer Stunde bis zu 8 Stunden (z. B. Cablosmessung [Abb.4.23/4.24](#)). Auch hier mussten die Messungen wegen der Drift der Transistoren aus dem Verstärkerbereich beendet werden.

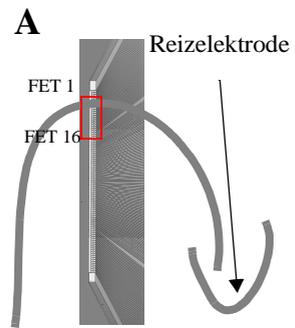
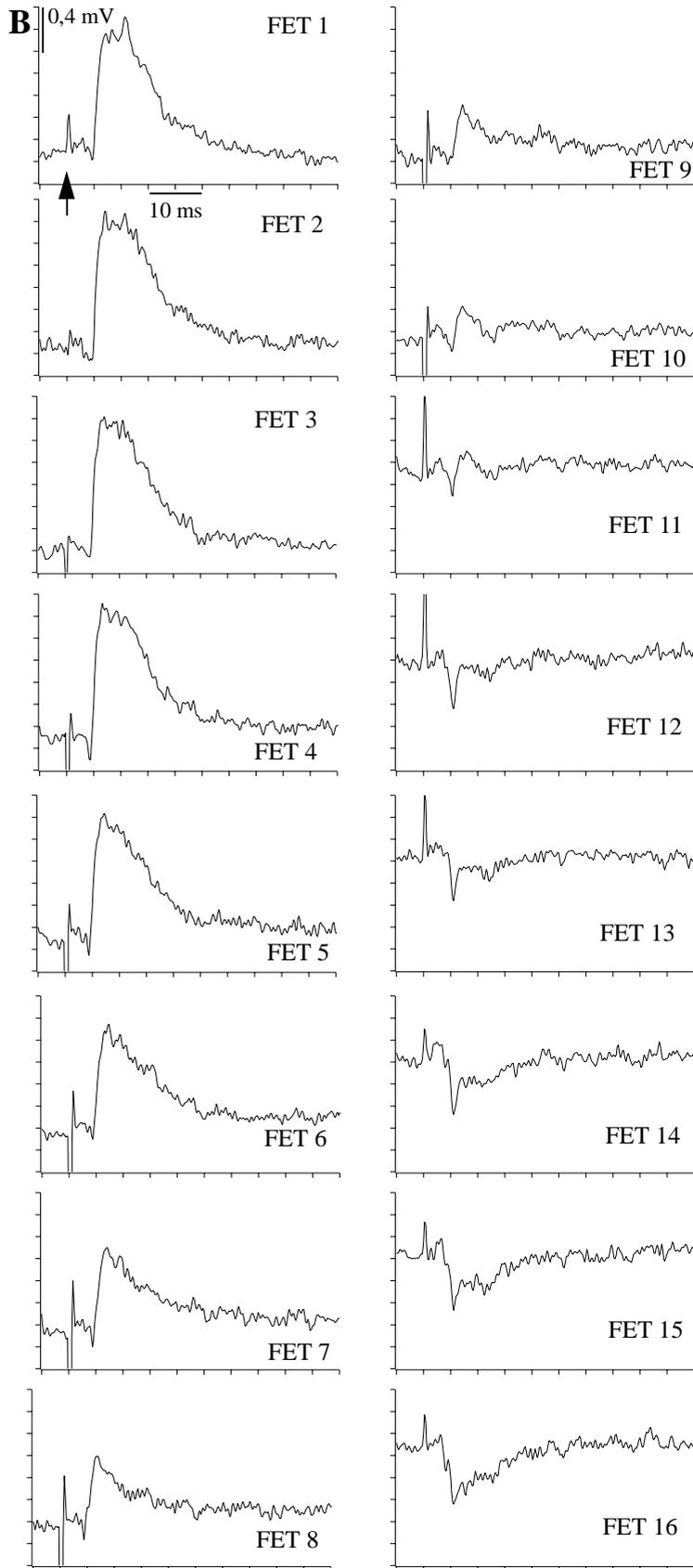


ABBILDUNG 4.21
Cablos-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: die hippocampale Formation relativ zum Cablos-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte Feldpotenziale gemessen an 16 Positionen in CA3 des Schnittes (16 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 1, sind die Skalierungsbalken für die Achsen eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 1 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $30 \mu\text{A}$.

Abbildung 4.21 zeigt eine Messung in CA3 (gesamte Länge des gemessenen Arrays: 330 μm) nach Stimulation der Moosfasern im GD.

FET 1 bis FET 9 (umspannen 176 μm) liegen in Str. pyramidale und am Rand von Str. radiatum; entlang dieser Achse nimmt das positive pEPSP hin zum Str. radiatum immer mehr an Amplitude ab, von anfangs 1,3 mV bis auf FET 9 0,4 mV.

FET 10 und FET 11 zeigen diphasische Übergangssignale, bis in FET 12 noch sehr klein und schmal, aber breiter werdend bis zu FET 16 ein negatives pEPSP, typisch für die Stromsenken im Str. radiatum, gemessen werden. Die Amplitude von $-0,4$ mV bleibt dabei erhalten, aber das gesamte FP nimmt an Breite zu, von wenigen Millisekunden bis zu 15 ms. Die Amplitude der negativen pEPSPs ist auffallend kleiner als die der pEPSPs im Str. pyramidale.

Die Messungen Abb.4.22 und 4.23 wurden an der selben Schnittkultur durchgeführt, aber in unterschiedlichen Regionen.

Abb.4.22 ist in CA3 gemessen und umfasst eine gemessene Länge von 330 μm , wobei der Bereich von Str. oriens (FET 4) bis zum Übergang Str. radiatum (\sim FET 12/ FET 13) eine Länge von 176 μm bis 200 μm umfasst.

FET 14 bis FET 17 zeigen Übergangssignale.

FET 18 und FET 19 messen kein Signal. Diese beiden FETs liegen in der Mitte der Dendriten-Somata-Achse. Hier verschwindet das Potenzial.

Auffallend bei den positiven pEPSPs (FET 4/FET 12) ist wieder der pSpikes zu Beginn des Feldpotenzials.

Abb.4.23 zeigt eine Messung, aufgenommen 1,5 h später als Abb.4.22, am selben Schnitt, allerdings in CA1 des Hippocampus und nicht in CA3. Die Position der Reizelektrode wurde nicht verändert, so dass weiterhin im GD gereizt wurde, bei beiden Messungen mit 60 μA , 100 μs .

Das in Abb.4.23 aufgenommene Profil der Feldpotenziale entlang der Dendriten-Somata-Achse zeigt sehr schön die negativen pEPSPs (FET 57 bis FET 67: 220 μm) gemessen in Str. radiatum, das Verschwinden des Feldpotenzials (FET 68 und FET 69), und die positiven pEPSPs im Str. pyramidale (FET 71 bis FET 76: 110 μm).

Auf FET 71 und FET 72 ist das Einwandern eines pSpikes zu beobachten.

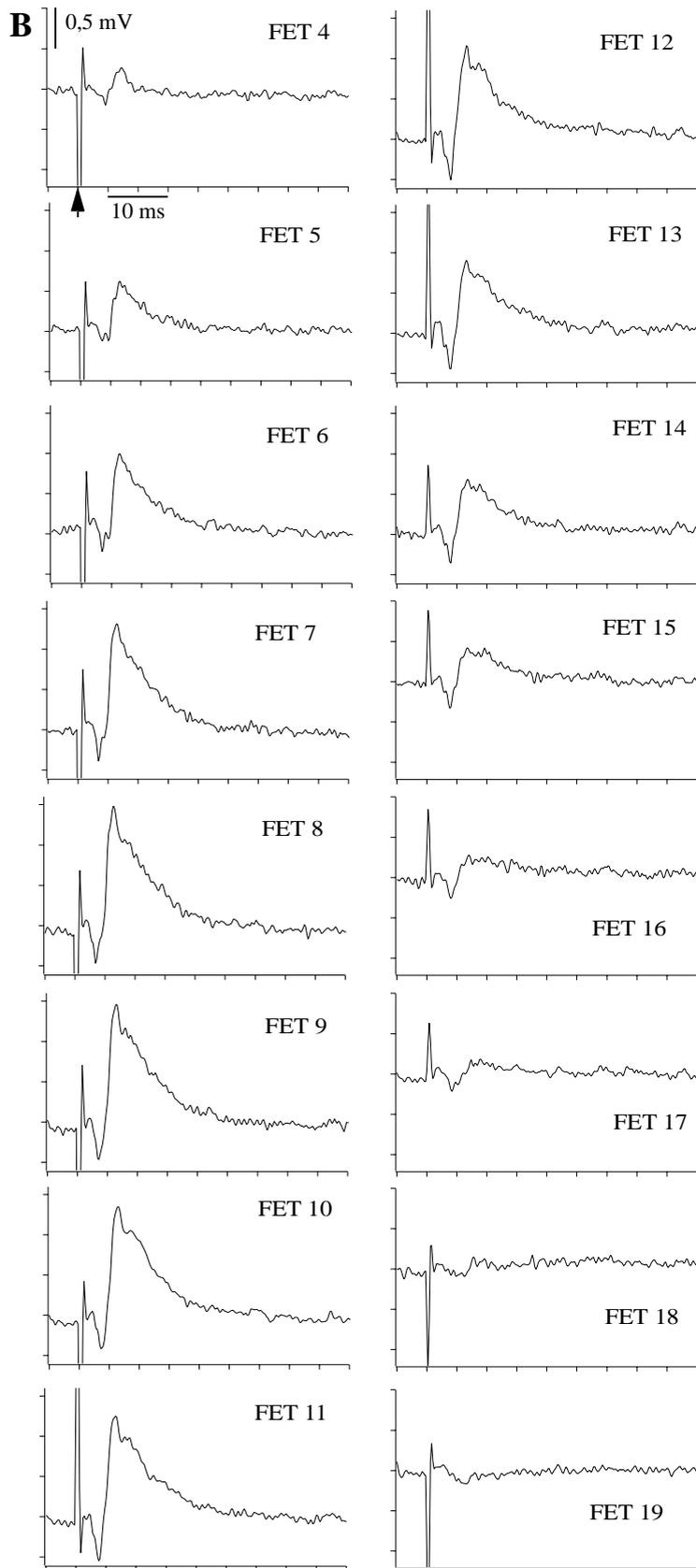


ABBILDUNG 4.22
Cablos-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Cablos-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 16 Positionen in CA3 der Schnitstelle (10 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 4, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 4 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $60 \mu\text{A}$.

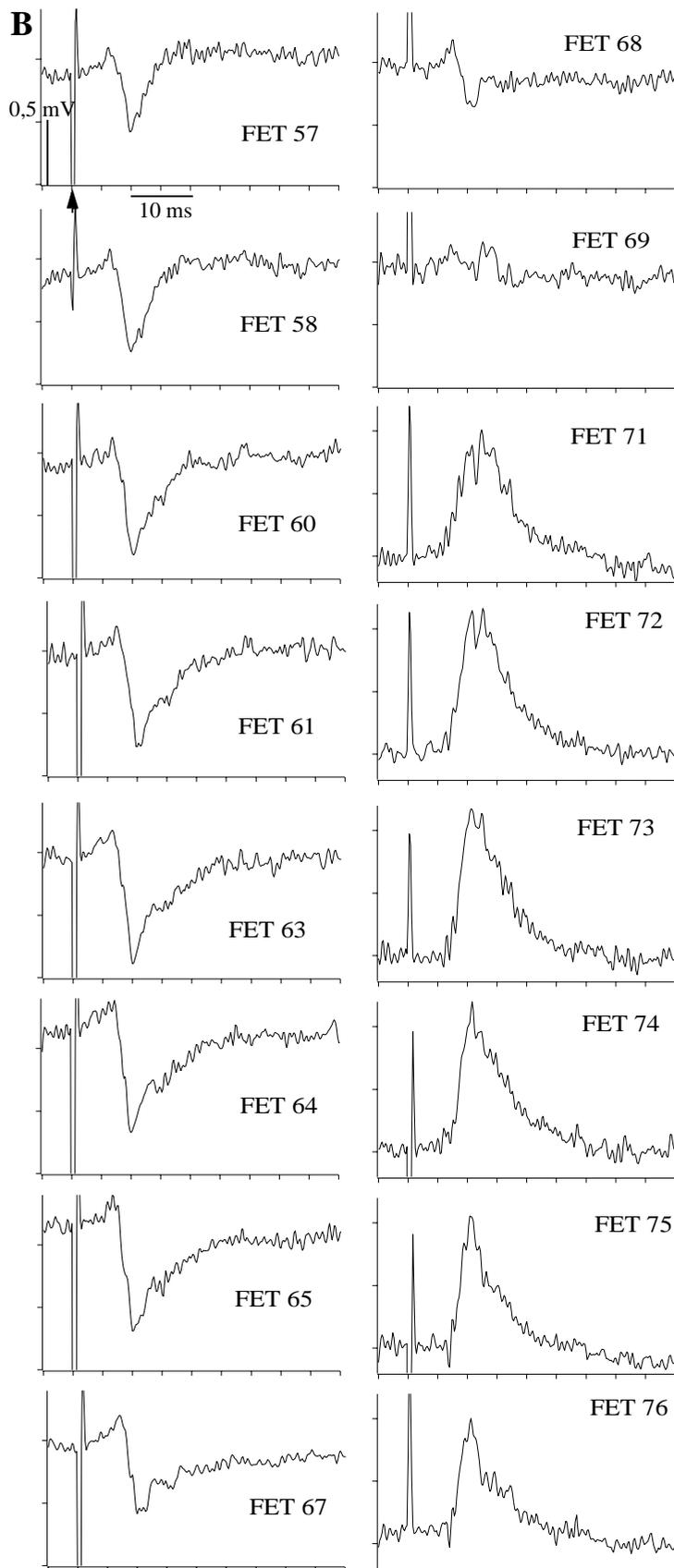


ABBILDUNG 4.23
Cablos-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Cablos-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 16 Positionen in CA1 des Schnittes (10 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 57, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 57 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $60 \mu\text{A}$. FET 59, FET 62, FET 66 und FET 70 waren defekt.

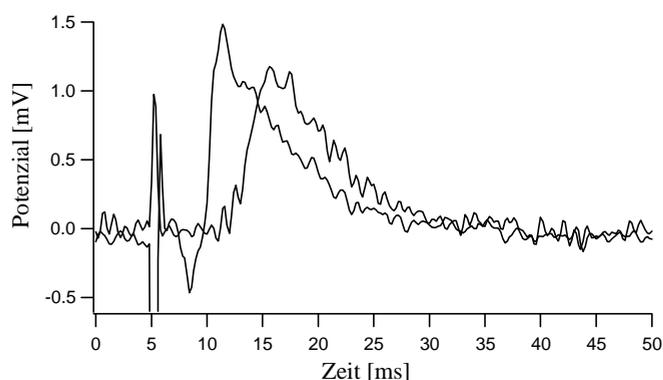


ABBILDUNG 4.24 FET 8 (CA3) und FET 73 (CA1) aus Messungen [Abb.4.22](#) und [Abb.4.23](#).
Der Reizartefakt ist bei 5 ms zu sehen.

[Abb.4.24](#) zeigt eine Gegenüberstellung von Graph FET 8 aus [Abb.4.22](#) und FET 73 aus [Abb.4.23](#). Es ist zu sehen, dass das Feldpotential in FET 73 mit einer Latenz zu FET 8 eintritt. Die Reizfortleitung bis CA1 dauert länger als bis CA3.

Die beiden letzten Messungen, [Abb.4.25](#) und [4.26](#), zeigen Profilmessungen in der CA1-Region des Hippocampus nach Reizung der Schaffer Kollaterale.

In [Abb.4.25](#) sind die gemessenen negativen Potenziale auf FET 60 (–1 mV) bis FET 64 (–1,2 mV) sehr viel kleiner als die positiven Amplituden auf FET 69 (2,3 mV) bis FET 75 (2,2 mV), mit der höchsten Amplitude auf FET 71 mit 3,7 mV. Die pEPSPs auf FET 74 und FET 75 haben eine etwas veränderte Form, die aussieht wie ein schnelles pEPSP, an das ein bauchiges pEPSP anschließt.

FET 66 bis FET 68 zeigen Übergangssignale.

[Abb.4.26](#) zeigt die einfachen, positiven (FET 8 bis FET 15: 154 μm) und negativen (FET 18 bis FET 23: 110 μm) pEPSPs, mit Übergangsformen auf FET 16 und FET 17.

Wie bei den vorgestellten Messungen zu sehen ist, eignen sich die Cablos-Chips mit ihrem Transistorabstand von 22 μm hervorragend für Profilmessungen entlang der unterschiedlichen Schichten der hippocampalen Formation. Es lässt sich so die Signalausbreitung von den Synapsen an den apikalen Dendriten bis hin zu den Somata der Pyramidenzellen verfolgen.

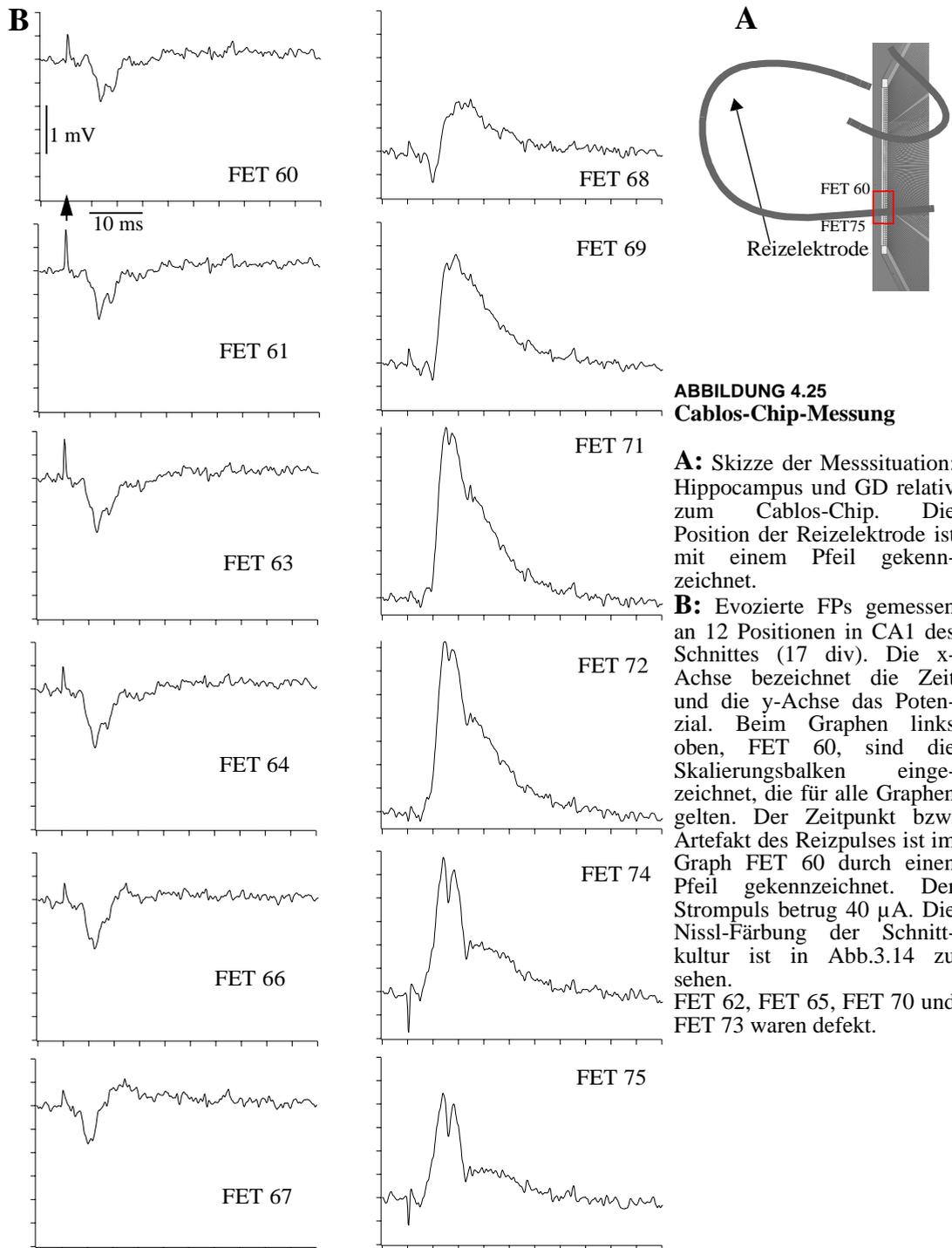


ABBILDUNG 4.25
Cablos-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Cablos-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 12 Positionen in CA1 des Schnittes (17 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 60, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 60 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$. Die Nissl-Färbung der Schnittkultur ist in Abb.3.14 zu sehen. FET 62, FET 65, FET 70 und FET 73 waren defekt.

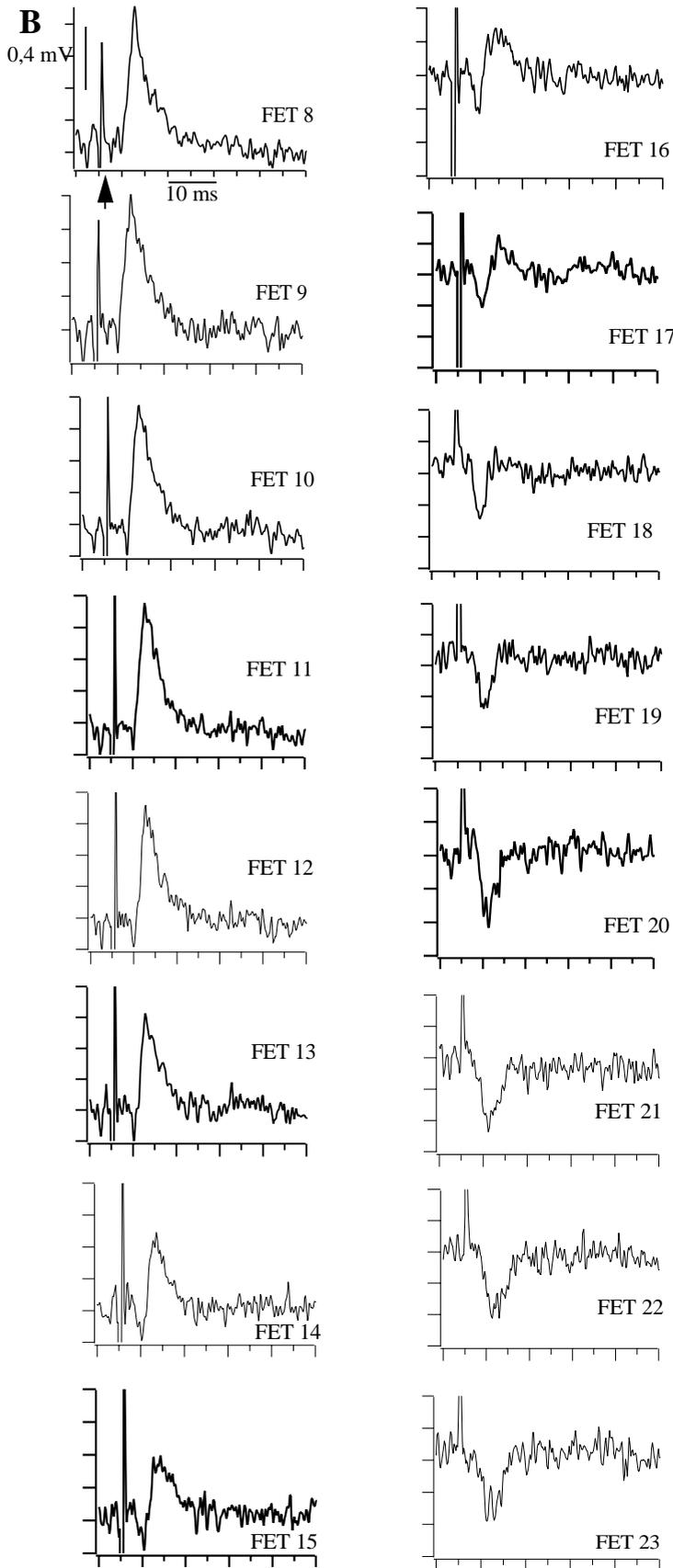


ABBILDUNG 4.26
Cablos-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Cablos-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte Feldpotenziale gemessen an 16 Positionen in CA1 des Schnittes (11 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 8, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 8 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug 100 μ A.

Konstanz der Amplitude

Auch für die Cablos-Chips wurde überprüft, ob sich die Amplitude im Verlauf einer Messung bei konstanter Reizstärke ändert. Über einen Zeitraum von 90 min wurde mit immer gleicher Reizstärke von $40 \mu\text{A}$ im GD gereizt und in CA1 die evozierten Feldpotenziale abgeleitet (siehe auch Messung in Abb.4.23).

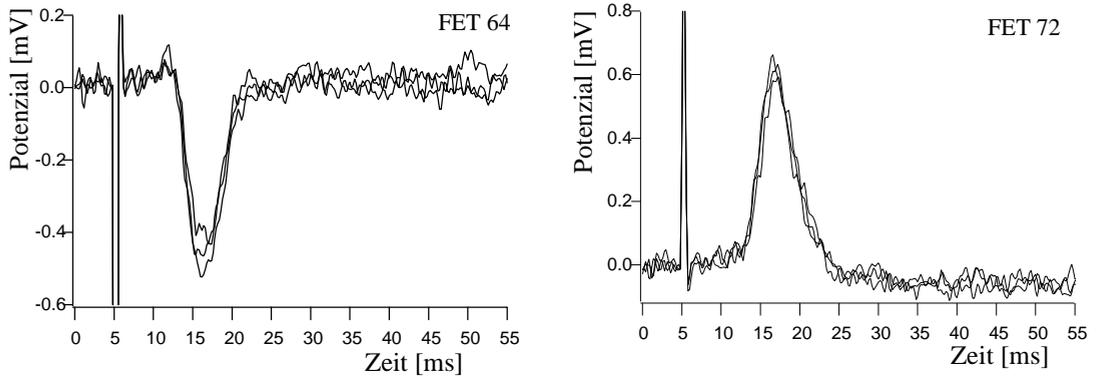


ABBILDUNG 4.27 pEPSPs auf Transistor nach Reizung mit $40 \mu\text{A}$ Strompuls in GD, Messung in CA1 (siehe auch Abb.4.23) in Str. radiatum (links, FET 64) und Str. pyramidale (rechts, FET72) FET 64 (links) und FET 72 (rechts) am Anfang der Messung, nach 45 min und nach 90 min (jeweils gemittelt über drei aufeinanderfolgende Messungen im Abstand von 10 s).

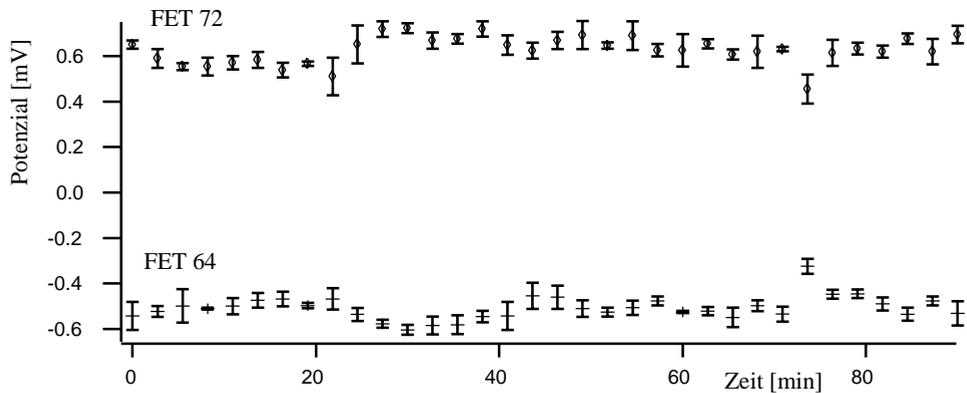


ABBILDUNG 4.28 Über drei nacheinanderfolgende Messungen gemittelte Amplituden der Feldpotenziale aufgetragen gegen den Zeitverlauf der Messung (90 min). Reizung in GD mit $40 \mu\text{A}$, Messung in CA1 auf FET 64 (unten) und FET 72 (oben).

Abbildung 4.27 zeigt zwei Transistoren aus dieser Messung. Die Amplitude des pEPSP nimmt im Verlauf der Messung nicht ab, wie auch in Abbildung 4.28 zu sehen ist. Hier sind die gemessenen Amplituden im Zeitverlauf der Messung aufgetragen.

Reizabhängigkeit der Amplitude

Wie bereits bei den Eigenbau-Messungen, stellte sich bei der Messung der Input (Reizstärke)-Output (Amplitude des pEPSP)-Kurve ab einer bestimmten Reizstärke eine Sättigung der Amplitude ein.

Abbildung 4.29 zeigt zwei FET-Signale, links gemessen im Stratum pyramidale und rechts im Stratum radiatum von CA1 (siehe auch Messung in Abb.4.26). Dargestellt ist die Amplitude des pEPSPs bei zunehmenden Reizstärken von 60 μA bis 140 μA .

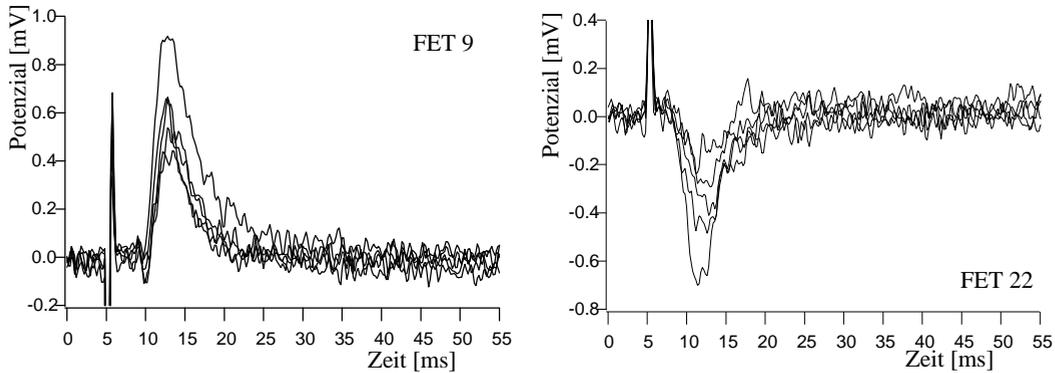


ABBILDUNG 4.29 Gemittelte (über drei nacheinanderfolgende Messungen) Feldpotenziale in CA1 (Reizelektrode in CA3) auf FET 9 (links) und FET 22 (rechts) bei 60 μA bis 140 μA (20 μA -Schritte).

Eine Sättigung der Amplituden tritt ab 140 μA ein. Dies ist in Abbildung 4.30 zu sehen, wo die Amplituden der pEPSPs gegen die Reizstärke aufgetragen sind.

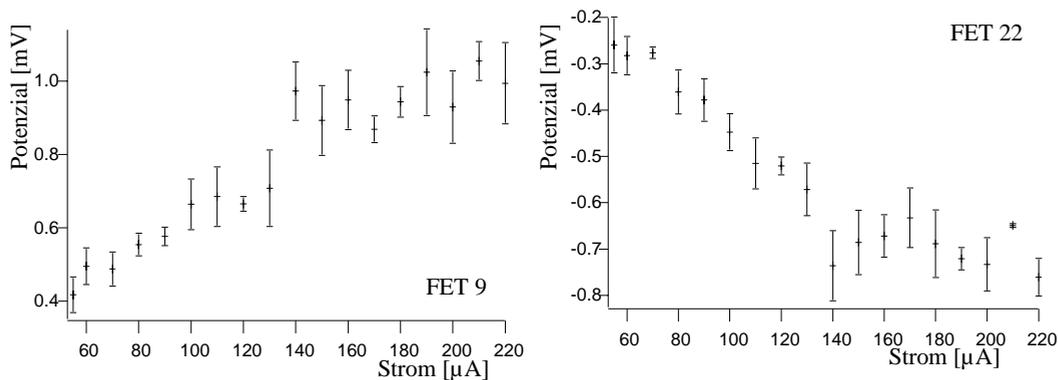


ABBILDUNG 4.30 Amplitudenmittelwerte drei aufeinanderfolgender Messungen (Abstand 10 s) bei unterschiedlichen Reizstärken auf FET 9 (links) und FET 22 (rechts).

Die Amplitude nimmt zuerst mit zunehmenden Reizstärken zu, auf FET 9 von 0,42 mV bei 50 μA bis 0,98 mV bei 140 μA und auf FET 22 von -0,26 mV bei 50 μA bis -0,75 mV bei 140 μA . Bei 140 μA ist jedoch bei beiden Feldpotentialen die maximale Amplitude erreicht.

4.2.3 Adhesios-Chip

Das lineare Array aus 96 Transistoren der Adhesios-Chips ist $437\ \mu\text{m}$ lang mit einem Messintervall von $4,6\ \mu\text{m}$. Bei der Präparation der Gehirnschnitte war es schwierig, den Schnitt auf dem kleinen Array zu plazieren.

In einem Zeitraum von fünf Monaten wurden vier Adhesios-Chips für die Kultivierung verwendet, wobei jeder Chip ungefähr zweimal in Kultur war. Einer dieser Chips war nach einem dritten Mal in Kultur kaputt.

Dargestellt sind im folgenden vier Adhesios-Chip-Messungen, und zwar jeweils ein Sweep einer mehrstündigen Messung. Die aufgetragenen Feldpotenziale sind bereits die über die Steilheit am Arbeitspunkt umgerechneten, direkt am Gate anliegenden Potenziale. Die Messungen zeigen evozierte Feldpotenziale, d.h. es wird gereizt, um die Antwortaktivität der Nervenzellen abzuleiten. Dazu wird eine spitze, extrazelluläre Wolframelektrode verwendet, mit der ein $100\ \mu\text{s}$ langer Strompuls unterschiedlicher Stärke angelegt wird.

Messungen konnten gleichzeitig mit 16 Transistoren durchgeführt werden. Die gemessenen Feldpotenziale sind aus Platzgründen nicht untereinander, sondern in zwei Reihen nebeneinander dargestellt.

Die Zeit, mit der an einem Schnitt gemessen werden konnte, reichte von einer Stunde (z. B. Messung [Abb.4.31](#)) bis zu 4 Stunden (z. B. Adhesios-Messung [Abb.4.34](#)).

Ableitungen an 16 nebeneinanderliegenden Transistoren bedeutet hier ein Messgebiet von $69\ \mu\text{m}$. Die einzelnen Schichtstrukturen des Hippocampus sind $100\ \mu\text{m}$ breit oder breiter (siehe [Abb.4.10](#)). Das heißt, eine Messung mit den Adhesios-Chips zeigt zumeist die gleiche Potenzialform auf allen FETS, da sich innerhalb eines Stratum die Feldpotenzialform nur wenig ändert.

Bei der Adhesios-Chip-Messung in [Abb.4.31](#) wird in Str. pyramidale der CA3-Region abgeleitet, nach Reizung der Moosfasern mit einem $80\ \mu\text{A}$ Strompuls. Form und Höhe des positiv gehenden pEPSPs ändert sich kaum über den Messbereich entlang der 16 FETs ($1\ \text{mV}$ bis $1,4\ \text{mV}$).

[Abb.4.32](#) zeigt ebenfalls positive pEPSPs, allerdings abgeleitet in der CA1-Region einer Hippocampuskultur nach Reizung der Schaffer Kollaterale. Das abgeleitete pEPSP enthält einen pSpike, der bei allen Transistoren am Beginn des pEPSPs gemessen wird. Dieses Feldpotenzial, pEPSP und pSpike, ist über $64,4\ \mu\text{m}$ ableitbar und ändert sich nicht in der Form und kaum in der Amplitudengröße. Im Gegensatz dazu steht die Messung in [DiS 87], S. 15, Fig. 3, der im Str. pyramidale mit einer Mikroelektrode im Abstand von $5\ \mu\text{m}$ ableitet und dabei eine Verschiebung des pSpikes relativ zum pEPSP feststellt.

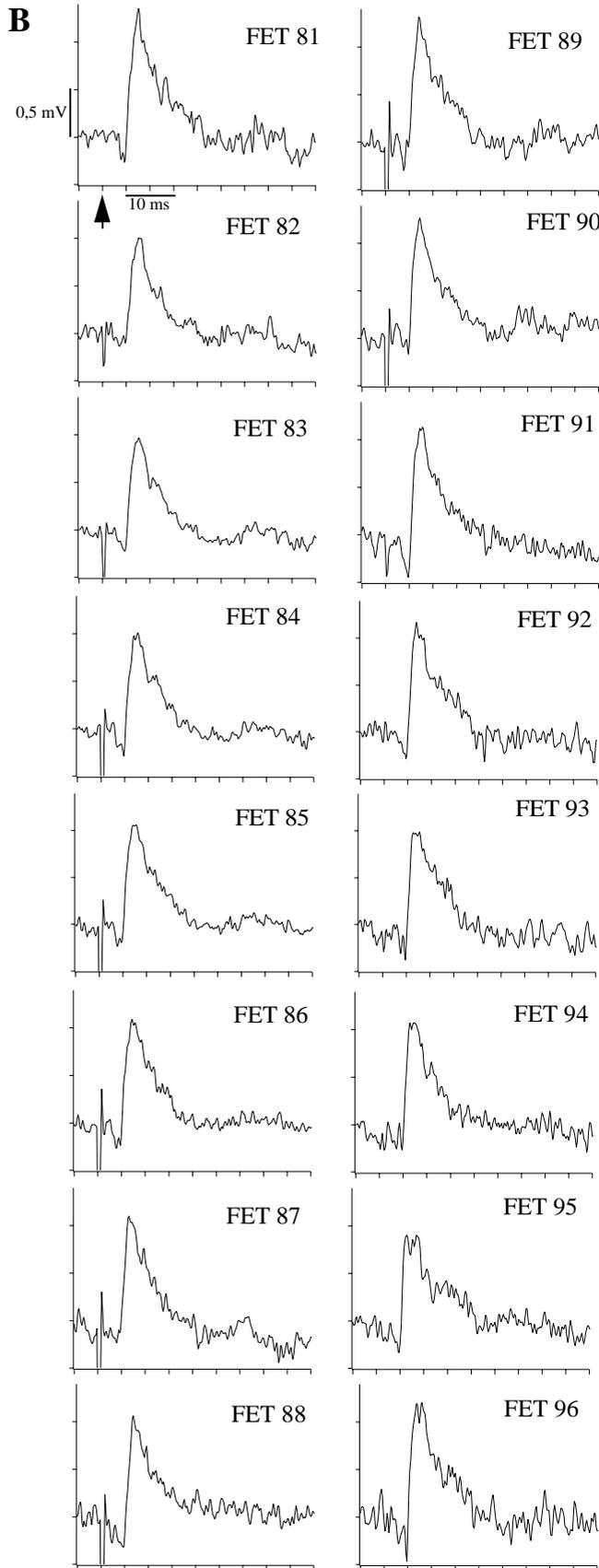


ABBILDUNG 4.31
Adhesios-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Adhesios-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 16 Positionen in CA3 des Schnittes (9 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 81, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 81 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug 80 μ A.

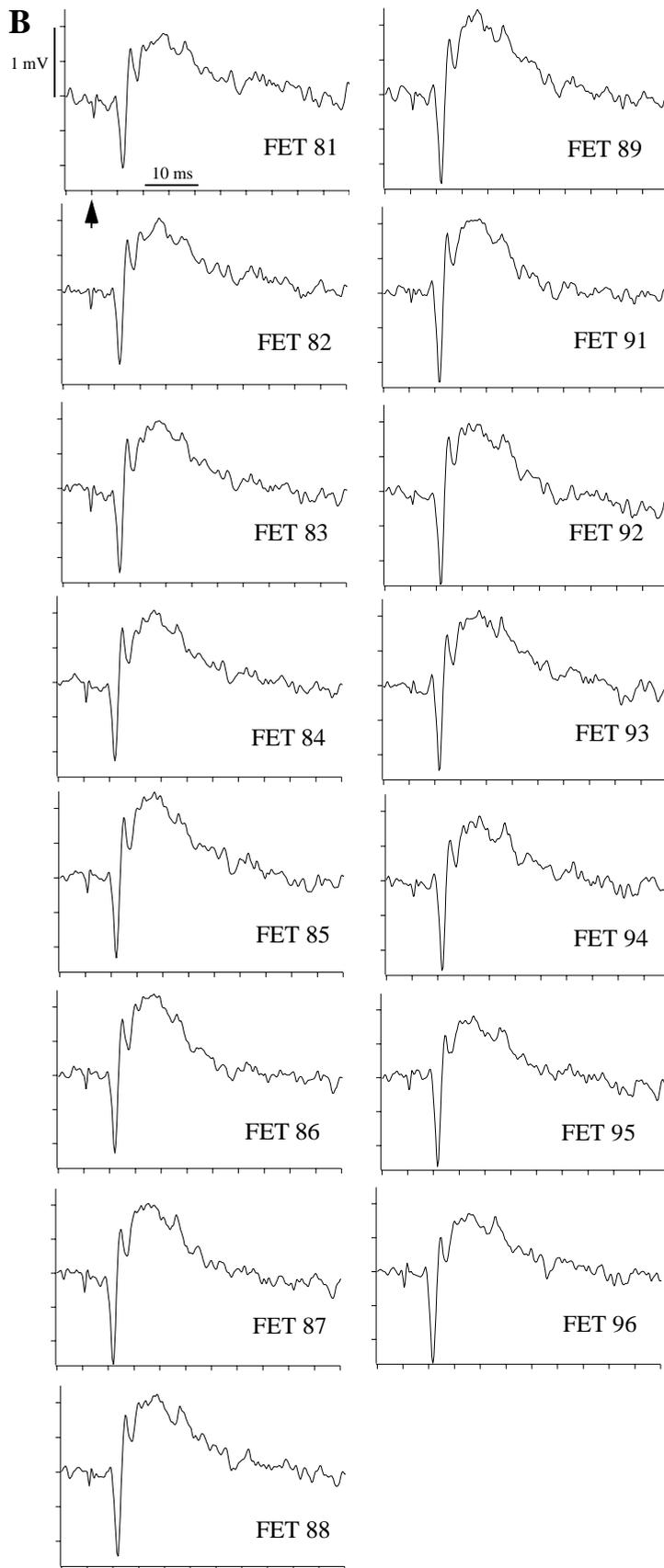


ABBILDUNG 4.32
Adhesios-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Adhesios-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

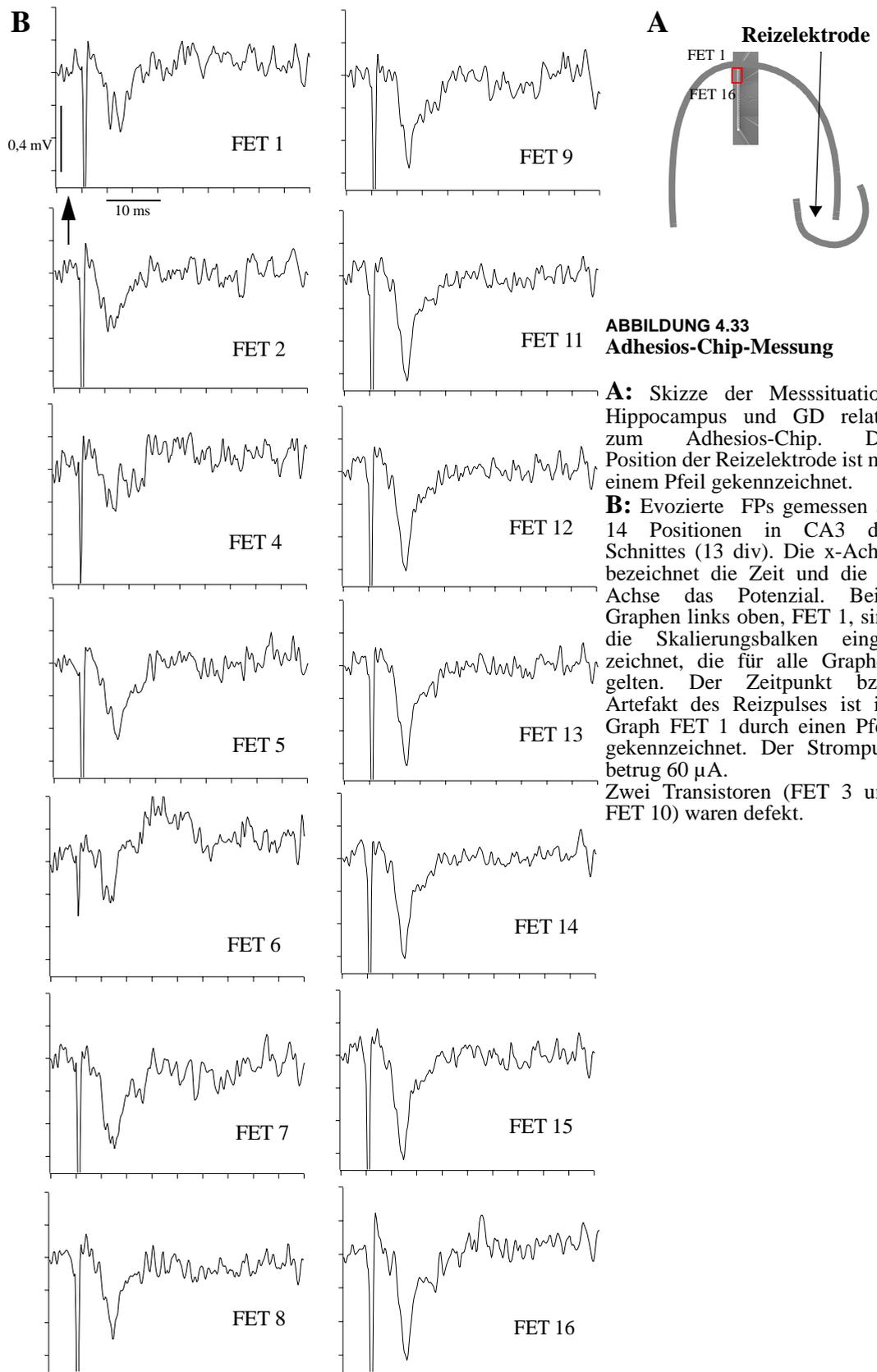
B: Evozierte FPs gemessen an 15 Positionen in CA1 des Schnittes (12 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 81, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 81 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $40 \mu\text{A}$. FET 90 war defekt. Nissl-Färbung der Kultur ist in Abb.3.14 zu sehen.

Im Str. radiatum abgeleitete Feldpotenziale ([Abb.4.33](#) und [Abb.4.34](#)) sind nicht so einheitlich in Form und Größe über alle 16 FETs wie dies im Str. pyramidale zu sehen ist ([Abb.4.31](#) und [4.32](#)).

[Abb.4.33](#) zeigt eine Messung im Str. radiatum von CA3 nach Reizung der Moosfasern (60 μ A). Das pEPSP auf FET 1 bis FET 6 hat eine Amplitude von etwa $-0,3$ mV, dann steigt die Amplitude entlang des Str. radiatum, bis zu $-0,7$ mV auf FET 11 bis FET 16. Besonders auffällig ist, dass die Form der Signale stärker variiert.

In [Abb.4.34](#) wurde in CA3 mit einem 45 μ A Strompuls gereizt und in CA1 entlang des Str. radiatum abgeleitet. Die Amplitudenhöhe reicht von $-0,4$ mV, FET 81, bis $-1,2$ mV auf FET 95. Auch die Form der Signale ist unterschiedlich: Während auf FET 88 bis FET 95 das pEPSP eine schmale Form hat, ist bei FET 83 bis FET 86 an die schmale Form ein bauchiges FP angehängt.

Entlang der Dendriten verändert sich also die Form des extrazellulären Feldpotenziale stärker als innerhalb des Str. pyramidale. Dies könnte durch unterschiedliche Anzahl der ausgebildeten Synapsen entlang von Str. radiatum zustande kommen ([Spe 67]), so dass die Struktur von Str. radiatum nicht so einheitlich angeordnet ist wie die Struktur der Somata im Str. pyramidale.



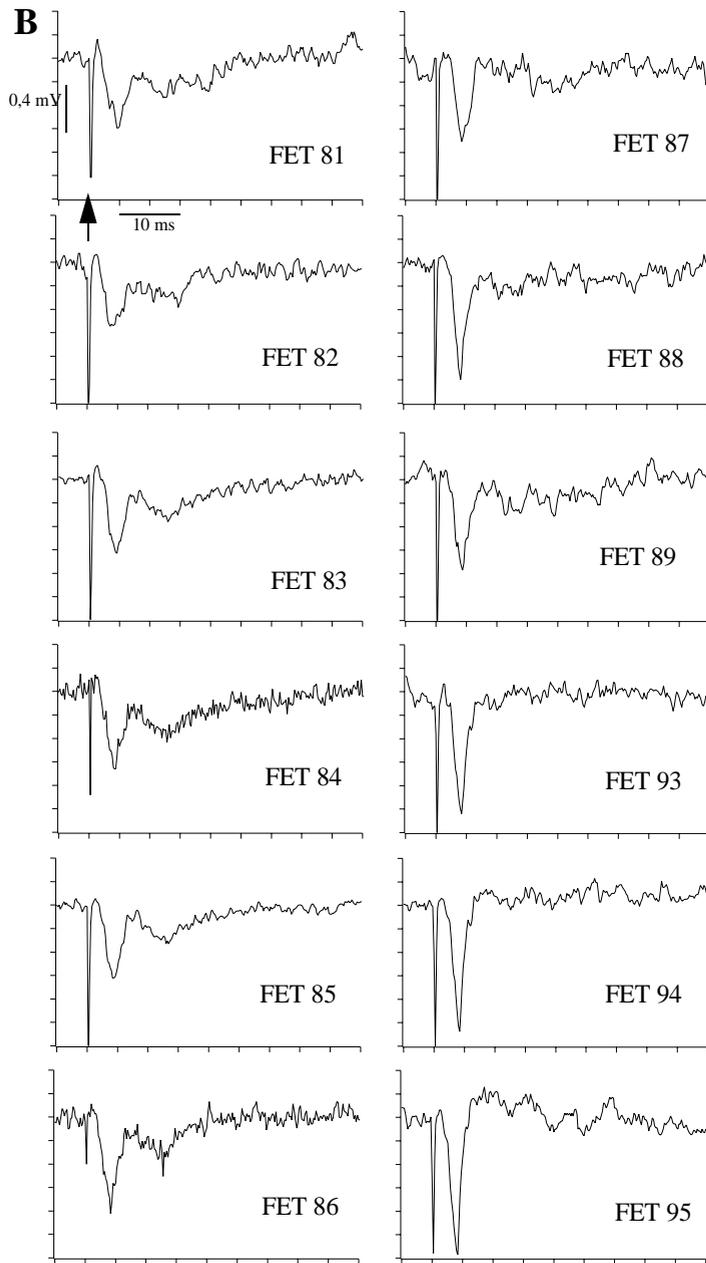


ABBILDUNG 4.34
Adhesios-Chip-Messung

A: Skizze der Messsituation: Hippocampus und GD relativ zum Adhesios-Chip. Die Position der Reizelektrode ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

B: Evozierte FPs gemessen an 12 Positionen in CA1 des Schnittes (14 div). Die x-Achse bezeichnet die Zeit und die y-Achse das Potenzial. Beim Graphen links oben, FET 81, sind die Skalierungsbalken eingezeichnet, die für alle Graphen gelten. Der Zeitpunkt bzw. Artefakt des Reizpulses ist im Graph FET 81 durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der Strompuls betrug $45 \mu\text{A}$. Drei Transistoren (FET 90, FET 91 und FET 92) waren defekt.

Die Adhesios-Chips bieten eine gute Möglichkeit, Veränderungen in kleinen Bereichen entlang von Strata zu beobachten. Z. B. könnten LTP-Änderungen genau im Mikrometerbereich verfolgt werden. Oder, da chemische Wirkstoffe nur auf bestimmte Synapsen wirken, die Veränderungen durch unterschiedliche Medikamente entlang des Dendritenbaumes beobachtet werden.

Konstanz der Amplitude

Im Abstand von zwei Minuten wurde das Feldpotenzial bei konstantem Reizpuls von $60 \mu\text{A}$ gemessen. Das Array des Transistors lag unter der CA3-Region des Hippocampus, gereizt wurde im Gyrus dentatus (siehe auch Messung in Abb.4.31). Als Beispiel wird FET 95 gezeigt.

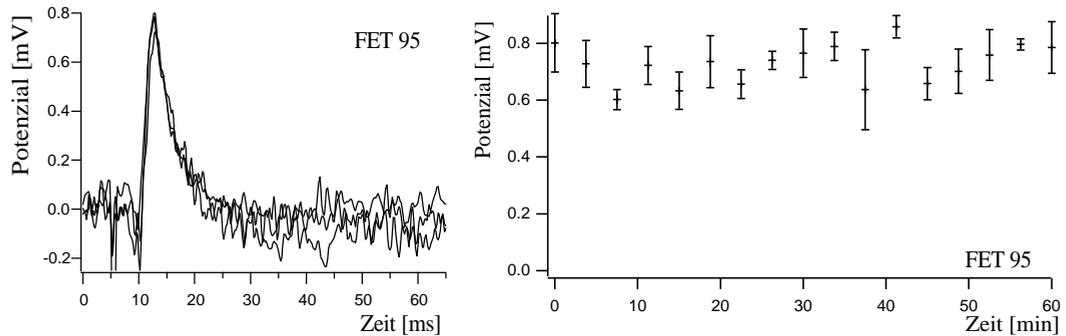


ABBILDUNG 4.35 FET 95 in CA3 (aus Abb.4.31), $60 \mu\text{A}$ Reizpuls in GD

Links: pEPSP bei 0 min, 30 min und 60 min *Rechts:* Über drei Messungen gemittelte Amplituden der pEPSP gegen die Zeit

Die Feldpotenziale sind in ihrer Amplitude und Form über eine Stunde lang konstant. In Abbildung 4.35 sind drei pEPSPs (gemittelt über 3 nacheinanderfolgende Messungen) gezeigt, gemessen im Str. pyramidale von CA3, aufgenommen bei 0 min, 30 min und 60 min, die Amplitude liegt bei $800 \mu\text{V}$.

Rechts in Abb. 4.35 sind die gemittelten Amplituden der pEPSPs im Verlauf der Messung aufgetragen. Sie schwanken zwischen $600 \mu\text{V}$ und $850 \mu\text{V}$.

Reizabhängigkeit der Amplitude

Abbildung 4.36 zeigt FET 9 der Adhäsions-Chip-Messung Abb.4.31. In 4.36A sind die pEPSPs dargestellt, aufgenommen bei $40 \mu\text{A}$, $60 \mu\text{A}$ und $80 \mu\text{A}$, in 4.36B der Amplitudenverlauf gegen die Reizstärke in $10 \mu\text{A}$ Schritten.

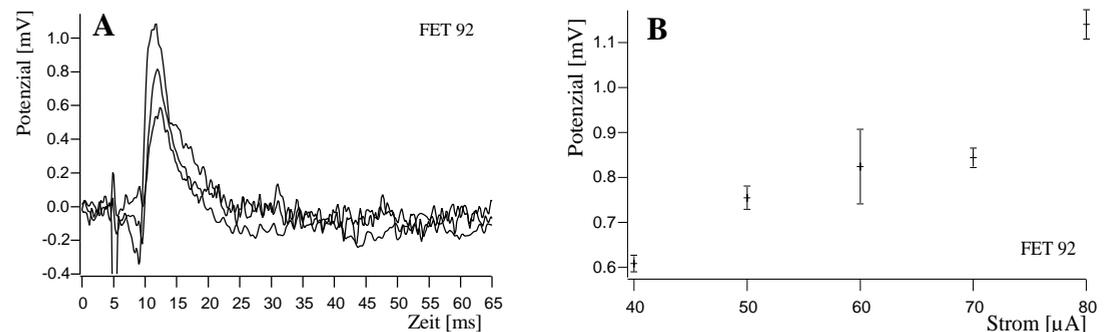


ABBILDUNG 4.36 Messung mit unterschiedlichen Reizstärken

(FET 92 in CA3, Strompulse in GD, Messung Abb.4.31)

A: pEPSP bei $40 \mu\text{A}$, $60 \mu\text{A}$ und $80 \mu\text{A}$ **B:** Über drei Messungen gemittelte Amplituden der pEPSP gegen die Reizstärke

Es ist ein linearer Verlauf der Kurve Reizstärke gegen Amplitude des pEPSP erkennbar. Bis zu einer Reizstärke von 80 μA tritt keine Sättigung der Amplitude auf.

4.2.4 Messung mit Bicucullin

Der Hippocampus ist bekannt für seine Neigung zu epileptischer Aktivität. Hirnschnitte sind ein beliebtes System, um Studien zur Entstehung und Ausbreitung von epileptischen Anfällen durchzuführen. Unter anderem wird vermutet, dass die Inhibition bei Epilepsie gestört ist und sich so die erregenden Synapsen ohne Hemmung aufschaukeln können.

Im Hippocampus existieren unterschiedliche Interneurone, die inhibitorisch auf die Pyramidenzellen und Körnerzellen wirken, und so die integrativen Eigenschaften des Netzwerkes kontrollieren. Dieser inhibitorische Input wirkt über den Transmitter GABA. Zwei Klassen an GABAergen Neuronen werden unterschieden: die einen wirken auf die Dendriten der Pyramiden- und Körnerzellen, die anderen auf die Somata. [Cos 01]

Bicucullin ist ein GABA_A -Rezeptor Antagonist. Um zu testen, ob auch mit den Transistoren bei Zugabe von Bicucullin ins Messmedium aufgrund der unterdrückten Inhibition eine Veränderung der Feldpotenziale gemessen wird, wurde eine Messung mit einem Cablos-Chip durchgeführt. Das Übersichtsschema der Messung ist in Abb.4.25 zu sehen. Die Nissl-Färbung des Schnittes (17 div) ist in Abb.3.14 gezeigt. Die CA1-Region der Hippocampuskultur liegt auf dem Transistorarray. Während der gesamten Messung wird in CA3 (Schaffer Kollaterale) mit einem konstanten Strompuls von 40 μA im Abstand von 20 s gereizt.

Das Diagramm in Abb. 4.37 zeigt die Amplituden, gemessen auf FET 61 und FET 72 im Verlauf der Messung. Jeder Messpunkt ist eine Mittelung aus drei hintereinanderfolgenden Messungen ($3 \times 20 \text{ s} = 1 \text{ min}$). Zu beachten ist die Stabilität der evozierten Feldpotenziale während der ersten 95 min des Experiments, also vor Zugabe von Bicucullin.

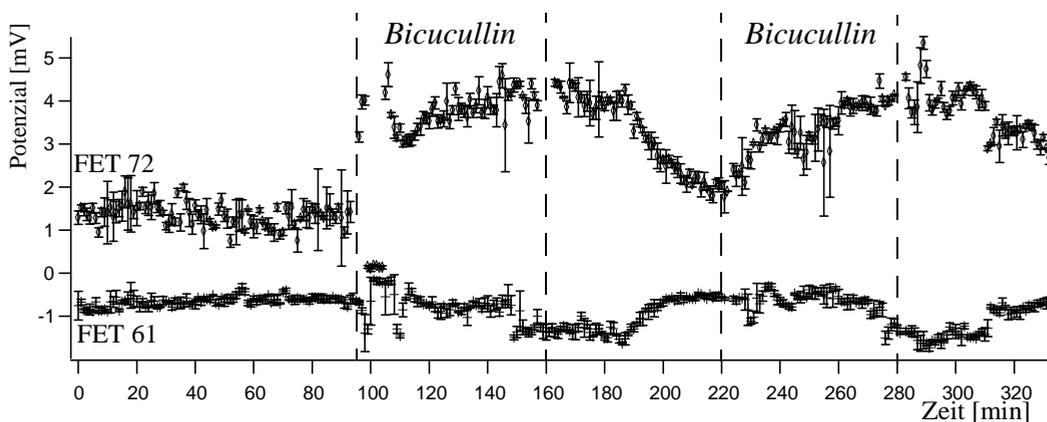


ABBILDUNG 4.37 Amplitude der evozierten Feldpotenziale auf FET 61 und FET 72 im Verlauf der Messung

Nach 95 min wird die Messkammer mit 2 μM Bicucullinlösung gespült. In der Messkammer ist 1 ml Messmedium enthalten, die Perfusionsrate beträgt 500 $\mu\text{l}/\text{min}$. Innerhalb von 2 min ist das Messmedium ausgetauscht.

Es wurde zweimal mit Bicucullin im Messmedium gemessen. Das erste Mal von 95 min bis 160 min, dann wurde von 160 min bis 220 min mit normalem Medium gemessen, und dann noch einmal mit 2 μM Bicucullin von 220 min bis 280 min.

Auf keinem der 12 Transistoren wurde ein komplettes Verschwinden der evozierten Potenziale und ein Übergang nur zu spontanen Potenzialen beobachtet, wie es Stoppini ([Sto 97]) beschreibt. Allerdings wird dort 10 μM Bicucullin ins Messmedium gegeben. Es ist bekannt, dass Bicucullin die inhibitorischen Synapsen konzentrationsabhängig blockiert (siehe [Din 84]: Hippocampus: Epileptiform Activity in Vitro).

Die stark veränderte Form der Feldpotenziale durch Bicucullin erschwert die Amplitudenauswertung. Es wandern scharfe Spikes in die fEPSP ein und es findet sogar auf manchen FETs ein Wechsel zwischen positiven und negativen Signalformen statt, siehe FET 67 in Abb. 4.38.

Während der Zugabe von Bicucullin und danach konnte eine Veränderung der Potenziale auf allen Transistoren festgestellt werden. In Abbildung 4.38 sind als Beispiele FET 61, FET 67, FET 68 und FET 72 dargestellt. FET 61 liegt in Stratum radiatum, FET 67 in dem Übergang zwischen Stratum radiatum und pyramidale und FET 68 und FET 72 im Stratum pyramidale. Zwischen FET 61 und FET 67 liegen 132 μm Messintervall, zwischen FETs 67 und 68 liegen 22 μm und zwischen FET 68 und FET 72 ist ein Abstand von 88 μm .

Die Signale sind zu den Zeitpunkten $t = 0$ min (oberste Reihe, Abb. 4.38), $t = 130$ min (zweite Reihe), $t = 160$ min und $t = 220$ min (unterste Reihe) aufgenommen; $t = 0$ min und $t = 220$ min ist vor, bzw. nach Bicucullin-Applikation, $t = 130$ min und $t = 160$ min ist während Bicucullin-Applikation. Nach dem Auswaschen von Bicucullin kehrt die Signalform und Amplitude nach ca. 40 min, $t = 220$ min, zu ihrer Ausgangsform, $t = 0$ min, zurück. Während bis kurz nach der Bicucullin-Applikation sind die Signale stark verbreitert, es wandern scharfe Spikes ein und auf FET 67 ändert sich sogar die Polarität des Signals von negativ zu positiv.

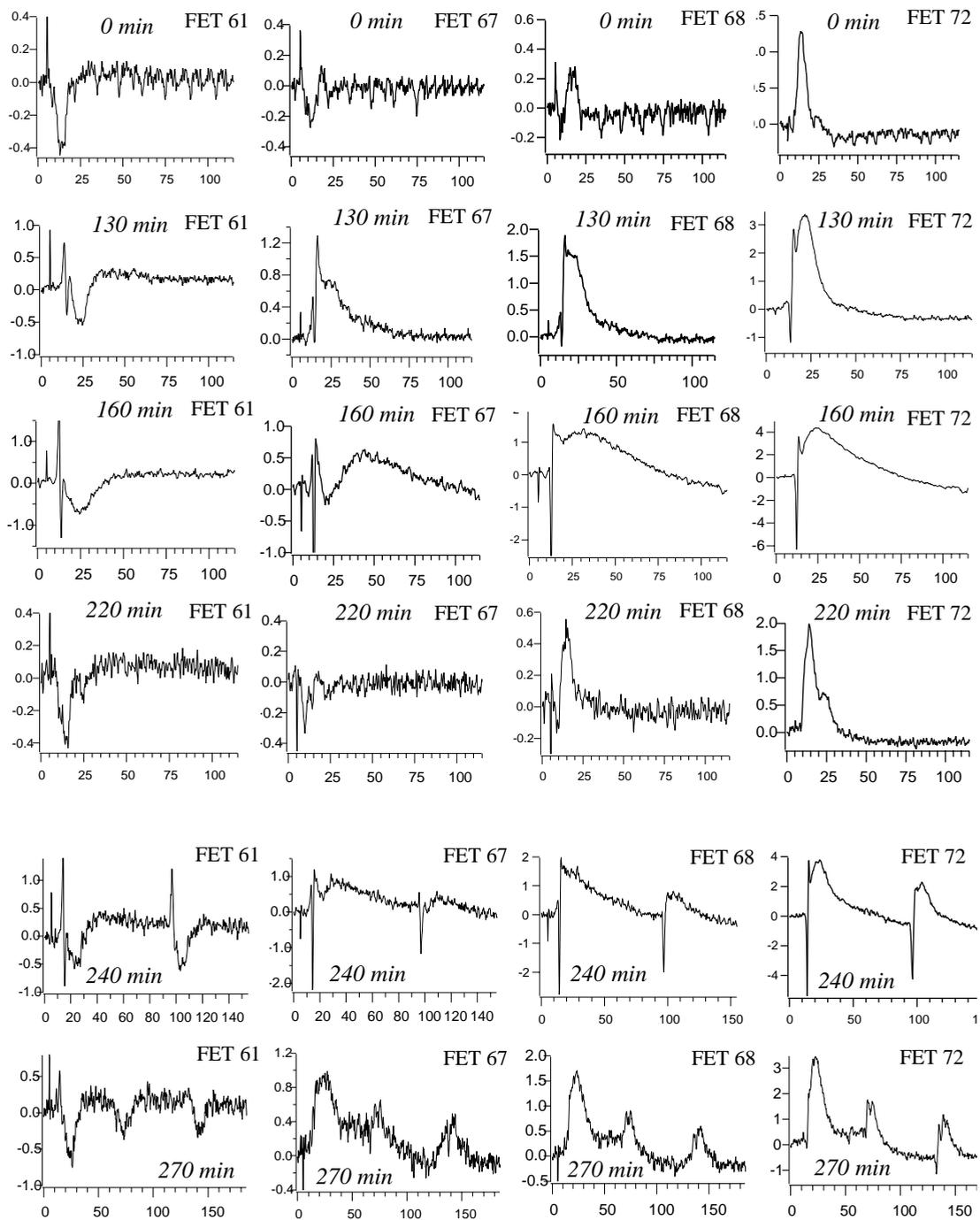


ABBILDUNG 4.38 Evozierte Feldpotenziale auf FET 61, FET 67, FET 68 und FET 72 zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$, $t = 120 \text{ min}$, $t = 160 \text{ min}$, $t = 220 \text{ min}$, $t = 240 \text{ min}$ und $t = 270 \text{ min}$

Beim zweiten Durchlauf von $2 \mu\text{M}$ Bicucullin, $t = 240 \text{ min}$ und 270 min in Abb.4.38, war die Veränderung der fEPSPs sehr viel stärker. Nach dem Reiz treten mehrere Feldpotenziale in Folge auf. Diese ähneln den spontanen Signalen, die Stoppini ([Sto 97]) misst. Der Hippocampus scheint die vorherige Applikation von Bicucullin noch nicht vergessen zu haben und reagiert nun viel stärker. Aber auch nach der zweiten

Applikation von Bicucullin kehren die Signale wieder nach ~40 min zu ihrer ursprünglichen Form zurück (Abb. 4.37).

Die Transistoren eignen sich also auch für pharmakologische Untersuchungen und können mit einer guten spatiotemporalen Auflösung die Veränderung der Feldpotenziale detektieren.

4.2.5 Siemens-Chip

Mit einer Ausdehnung des Sensorfeldes von $3,2 \times 1,6 \text{ mm}^2$ bei einem Rasterabstand von $50 \mu\text{m}$ eignet sich dieser Chip ideal für die Messung mit Hippocampuschnitten.

Bei den ersten Kulturversuchen ergab sich, dass der Chip ungefähr zweimal ohne Verlust der Funktionsfähigkeit für die Kultivierung von Hirnschnitten (~ 4 Wochen) verwendet werden kann. Die Kennlinienfelder hatten sich nur wenig verändert.

Die hier vorgestellte Siemens-Chip-Messung wurde an einer 14 Tage alten Hippocampuskultur durchgeführt. Das Experiment zeigt die Ableitung in der CA3-Region mit einem ausgewähltem Sensorarray von 100 Transistoren.

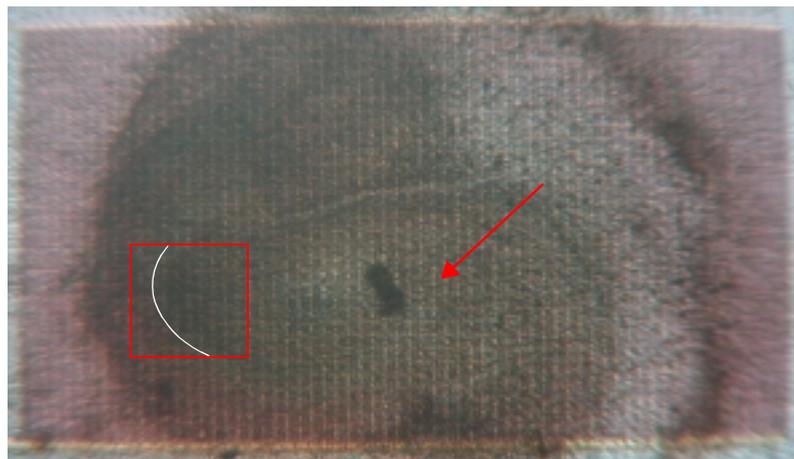


ABBILDUNG 4.39 Schnitt (14 div) auf Siemens-Chip

Rotes Rechteck gibt das ausgewählte Sensorarray wieder (10 x10 Array: Zeile 8 Spalte 7 bis Zeile 17 Spalte 16). Zur Verdeutlichung ist das Zellkörperband der CA3/CA2-Region innerhalb des Messfensters nachskizziert. Der Pfeil deutet die Spitze der Reizelektrode an, die zu Beginn CA4/Übergang GD, platziert war.

Bild 4.39 zeigt die Lage des Hirnschnittes auf dem Chip: Der Schnitt wird in GD gereizt (Pfeil) und in CA3/CA2 wird ein Sensorfeld von 10 x 10 Transistoren im rot markierten Rechteck (Zeile 8 Spalte 7 bis Zeile 17 Spalte 16) zur Signalaufnahme ausgewählt. Das Sensorarray überspannt sowohl Str. radiatum, Str. pyramidale und Str. oriens.

Im Abstand von 30 s wurde der Schnitt mit $100 \mu\text{A}$, $100 \mu\text{s}$ Dauer, im Hilus gereizt. Als Kontrolle und Referenz wurde gleichzeitig mit einer Glaselektrode extrazellulär

im Str. pyramidale innerhalb des Sensor-Quadrats abgeleitet. In Abb. 4.40 und 4.41 sind die gemessenen Signale dargestellt. 4.40 zeigt das Glaselektrodensignal gemittelt über drei nacheinanderfolgende Messungen. In 4.41 sind die pEPSPs gemessen mit dem Siemens-Chip aufgetragen. Da die Sensorkennlinien leider sowohl räumlich (über den Chip verteilt) als auch zeitlich inhomogen sind, konnte bei einem Sweep nicht auf allen Transistoren ein Signal gemessen werden. So wurde zwischen den Einzelmessungen der Offset verändert, und die Messung in 4.41 zeigt pEPSPs gemessen bei drei nacheinander aufgenommenen Sweeps. Alle schwarz umrahmten pEPSPs sind zum Zeitpunkt 0 s aufgenommen, die rot umrahmten (Sp 10) bei $t = 30$ s und die blau umrahmten (Sp11) bei $t = 60$ s. Zeitpunkt und Form der Sensorsignale und des Mikroelektrodensignals stimmen gut überein.

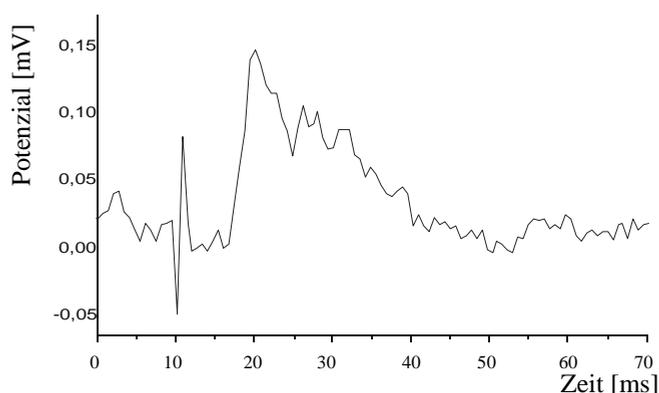


ABBILDUNG 4.40 Gemitteltetes Glaselektrodensignal aufgenommen über 3 sweeps

Die Samplingfrequenz der Messung betrug 1,6 kHz. Das unterschiedlich gute Signal-Rausch-Verhältnis zwischen den einzelnen Transistoren erklärt sich aus den inhomogenen Einsatzspannungen der Sensoren. Der vor der Messung erfolgte Offsetabgleich wurde so durchgeführt, dass sich die an der Messung beteiligten Sensoren im Mittel am steilen Punkt ihrer Kennlinien befinden. Dies bedeutet, dass die Sensoren mit den extremsten Offsets am Rande ihres Auflösungsvermögens operieren, daher zeigen ihre hochskalierten Signale bereits die Digitalisierungsschritte des A/D-Wandlers.

Eine Umrechnung der Signale auf effektive Gatespannungen wurde nicht durchgeführt, da eine Kennlinienmessung zum Messzeitpunkt nicht vorliegt und eine offsetabhängige Umrechnung der Signale mit der Kennlinie im Messprogramm zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht implementiert ist.

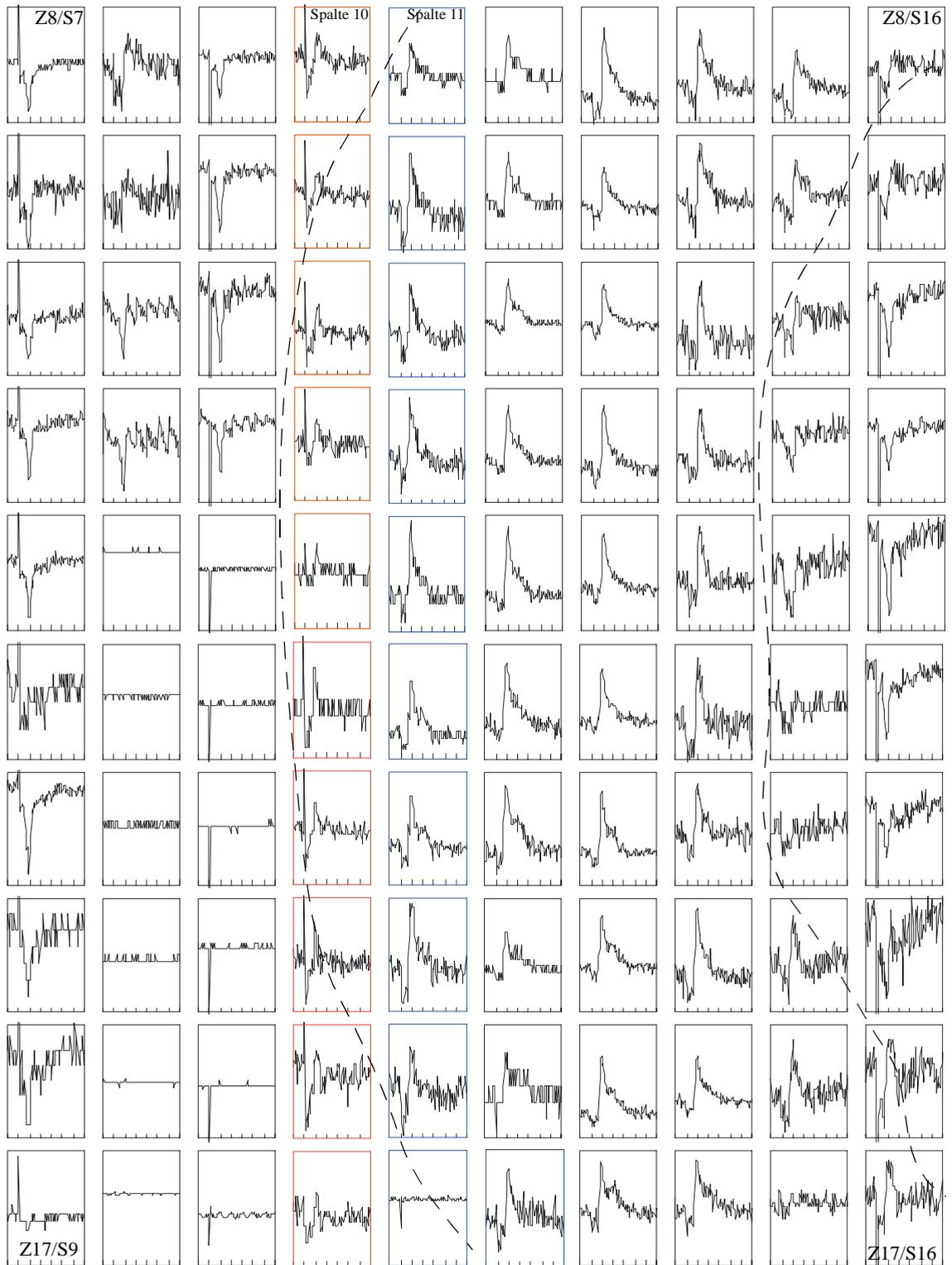


ABBILDUNG 4.41 Messung mit 100 Sensoren des Siemens-Chips

Hippocampuskultur: 14 div: Messung in CA3, 100 μ A Strompuls (100 μ s) in GD/CA4
 x-Achse ist Zeitachse von 0 ms bis 70 ms (10 ms Unterteilung), Reizartefakt bei 10 ms, y-Achse ist nur qualitativ (Erklärung siehe Text); gestrichelte Linien markieren Str. pyramidale von CA3.
 Spalte 10 (rot) wurde aus einer Messung 30 s später eingebaut, Spalte 11 (blau) aus einer Messung 60 s später

Die dendrosomatische Achse zieht entlang des Sensorarrays von rechts nach links, wobei Str. radiatum rechts ist, Str. oriens links. In der Mitte sieht man an den positiven pEPSP wie sich das Stratum pyramidale durch den Schnitt zieht (auch gekennzeichnet durch gestrichelte Linien). Im Str. radiatum und im Str. oriens sind die gemessenen Potenziale negativ.

5 *Diskussion*

5.1 *Dendrosomatische Profile*

Die unterschiedlichen Signale, die entlang der Achse der Pyramidenzellen nach Stimulation einer exzitatorischen Verbindung wie den Moosfasern oder Schaffer Kollateralen, gemessen werden, sind eingehend in der Literatur untersucht. Die Achse der parallel nebeneinanderliegenden Pyramidenzellen läuft vom Str. radiatum (apikaler Dendritenbaum), über Str. pyramidale (Somataschicht) nach Str. oriens (basale Dendriten) und das typische Feldpotenzialprofil entlang der Strata wird hauptsächlich der Aktivität der Pyramidenzellen zugeordnet ([And 64b], S. 603).

Speziell bei den Cablos-Messungen ist der Übergang der einzelnen Strata in den Messungen verfolgbare. Die einzelnen, gemessenen Signale wurden bereits in Kapitel 4 besprochen und mit Feldpotenzialen aus der Literatur verglichen. Hier soll ein Überblick über die Literatur zu evozierten Feldpotenzialen entlang der dendrosomatischen Achse gegeben werden.

In den 60er Jahren wurden viele extrazelluläre Messungen mit Mikroelektroden im Hippocampus im intakten Gehirn durchgeführt. Dabei wurden die Profile je nach Ableitungsort, antidromer oder orthodromer Stimulation und je nach Reizstärke kartiert (u.a.: [Fuj 62], [And 64a], [Spe 67], [And 71a]). Erst durch diese Messungen wurden die genauen Faserverbindungen, synaptischen Verschaltungen und Orte der Aktionspotenzialgenerierung des Hippocampus untersucht.

Profile der Feldpotenziale aufgenommen in Hirnschnitten der Ratte werden in [Ric 87] und [Ple 92] beschrieben.

[Ric 87] nimmt die Profile mit einer Mikroelektrode in der CA1-Region in einem Abstand von 25 μm auf, nach Stimulation entweder des Alveus (antidrom), oder nach orthodromer Stimulation im Str. oriens oder im Str. radiatum. Es werden jeweils zwei Profile aufgenommen: Antworten nach unterschwelligem Reiz und Antworten nach überschwelligem Reiz. Die Cablos-Chip-Messungen

entsprechen den Profilen nach Reizung im Str. radiatum. Abb.4.23 ist eine Messung in CA1 nach unterschwelliger Stimulation der afferenten Fasern im Str. radiatum. Es tritt kein pSpike auf. Das Profil (Abb.4.23), vom langsamen, negativen FP im Str. radiatum, dann Übergang mit biphasischem Signal bis hin zum langsamen, positiven Signal in Str. pyramidale, entspricht Fig.2C, S.986 aus [Ric 87]. Überschwellige Str. radiatum-Stimulation ist in Fig.5A, S.989 in [Ric 87] gezeigt. Hier tritt ein pSpike auf, der allerdings so groß ist, dass keine direkt entsprechende Cablos-Chip-Messung existiert.

Richardson et al. haben mit diesem Paper das Soma der Pyramidenzellen als Entstehungsort für das Aktionspotenzial festgelegt, von wo aus es in die Dendriten fortgeleitet wird.

In [Ple 92] wird mit einer Mikroelektrode das Profil in CA1 im Abstand von 30 μm nach sowohl unterschwelliger als auch überschwelliger Stimulation der Schaffer Kollaterale aufgenommen. Die unterschwellig evozierten FPs (Fig.1a) entsprechen hier wieder der Cablos-Chip-Messung Abb.4.23. Bei den überschwellig evozierten FPs in [Ple 92], Fig.1a, ist der pSpike nicht so groß, und das Profil kann mit den Cablos-Chip-Messungen Abb.4.22 (allerdings CA3) und Abb.4.26 verglichen werden.

Zu Profilen gemessen mit planaren Metallelektrodenarrays gibt es [Bop 92] und [Nov 88], die in akuten Hippocampusschnitten messen. Die Profile bestehen jeweils nur aus 4 Metallelektroden (4 x 4 Array) im Abstand von 200 μm . Die gemessenen Signale entsprechen z. T. den Signalen mit dem Transistor gemessen. Eine richtige Profilaufnahme evozierter FPs mit kleinem Elektrodenabstand, als Multi-Site-Recording (also gleichzeitig aufgenommen), wurde nicht in der Literatur gefunden.

5.2 Signal/Rausch-Verhältnis

Die großen Kopplungssignale auf den Feldeffekttransistoren erlauben es trotz des Rauschens der Chips, die Feldpotenziale mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis zu detektieren.

Das Peak-to-Peak-Rauschen der Transistoren beträgt 100 μV bis 400 μV , je nach Zustand des Chips. Bei den meisten Messungen ist das Rauschen um die 200 μV .

Die größten positiven Signale gemessen mit den Eigenbau-Chips haben eine Amplitude von 4 mV (Abb.4.16, FET 16), die größten negativen Signale -3 mV. Die am häufigsten gemessene, mittlere Amplitudenhöhe des größten monophasischen Signals eines Sweeps liegt bei ~ 2 mV.

Bei den Cablos-Chips beträgt das größte gemessene, positive Signal 4 mV (Abb.5.4A), das größte negative Signal -2 mV. Die am häufigsten gemessene, mittlere Amplitudenhöhe des größten, monophasischen Signals eines Sweeps liegt bei $\sim 1,5$ mV.

Das schlechteste Signal/Rausch-Verhältnis bieten die Adhesios-Chips. Das größte, positiv gemessene Signal liegt bei 1,5 mV, das größte negative FP bei -1,3 mV. Die mittlere Amplitudenhöhe der Signale liegt unter 1 mV.

5.3 Vergleich: Planare Metallelektroden – Feldeffekttransistoren

An dieser Stelle möchte ich die Transistor-Messungen in Bezug auf Rauschen und Signalgröße mit Metallelektroden-Messungen der Literatur vergleichen. Ein direkter Vergleich ist schwierig, da Wheeler et al. ([Nov 87], [Nov 89], [Nov 88], [Bop 92]) und Oka et al. ([Oka 99]) an akuten Hippocampusschnitten messen und Stoppini et al. ([Buc 93], [Thi 97], [Sto 97], [Dup 99]) zwar an Kulturen messen, diese aber mit einer eigens entwickelten Interface-type Technik kultiviert werden. Lediglich Egert et al. ([Ege 98]) messen auch an organotypischen Hippocampuskulturen nach Gähwiler. Folgendes läßt sich sagen:

1. Die Metallelektroden-Arrays haben ein bis zu 10-fach geringeres Peak-Peak Rauschen als die Feldeffekttransistoren (aus [Jah 99], S. 165, die in ihrem Paper einen Überblick über Metallelektrodenmessungen geben: „...Signals have typical amplitudes in the range 100 μ V–1 mV and are embedded in biological noises of 50 μ V.“).
2. Ein Nachteil ist jedoch, dass die gemessene Signalgröße kleiner ist als mit konventionellen Methoden ([Jah 99], S. 171: „As mentioned earlier recordings from tissue grown on silicon-based microelectrode arrays typically have an amplitude in the order of tens to hundreds of microvolts, whereas conventional recording techniques routinely give signals that are ten times larger.“).
In [Ege 98] (S. 237) werden die größten gemessenen FPs mit 400 μ V angegeben und die beiden dargestellten FPs haben nur eine Amplitude von \sim 50 μ V (Fig.8a und 9a). Im Gegensatz dazu sind die größten mit FETs gemessenen Signale 4 mV groß und die Durchschnittsamplitude liegt bei 2 mV.

Das stärkere Rauschen der FET-Messungen erklärt sich durch die Transistoren selbst. Ursache des Rauschens in OS-FETs sind Einfangzentren im Oxid, die durch Ladungsträgereinfang den Kanalstrom modulieren. Details darüber sind in [Völ 00] zu finden.

Die kleinen Signale, gemessen mit planaren Metallelektroden, deuten darauf hin, da sie ebenfalls lokale Spannungen messen, dass tatsächlich ein geringeres Potenzial an ihnen anliegt. Die Oberfläche der Elektrodenarrays ist inhomogen, denn die Metallelektroden sind z. B. mit TiN bedeckt, während der Rest des Chips mit Si_3N_4 isoliert ist [Ege 98]. Diesen Unterschied könnten die Zellen spüren, und um die TiN-Elektroden ein anderes Wachstumsverhalten zeigen als auf Si_3N_4 . Z. B. könnte sich um die Elektrode ein Gliazellrasen bilden, der das extrazelluläre Potenzial der aktiven Nervenzellen zur Metallelektrode hin abschirmt. Im Gegensatz dazu sind die Silizium-Chips homogen mit SiO_2 beschichtet. Für das Kultivieren von Nervenzellen und Hirnschnitten ist eine homogene Oberfläche von Vorteil.

5.4 Vergleich: Glasmikroelektrode – Feldeffekttransistor

Um die mit Feldeffekttransistoren gemessenen Signale vergleichen zu können mit Signalen, wie sie mit konventionellen Methoden im Hippocampusschnitt gemessen werden, wurde in der Hippocampuskultur eine Glaselektrode über dem Gate des Transistors platziert.

Eigenbau-Feldeffekttransistor

In Abbildung 5.1 und 5.2 sind Messungen mit FET und Glaselektrode über dem FET gezeigt.

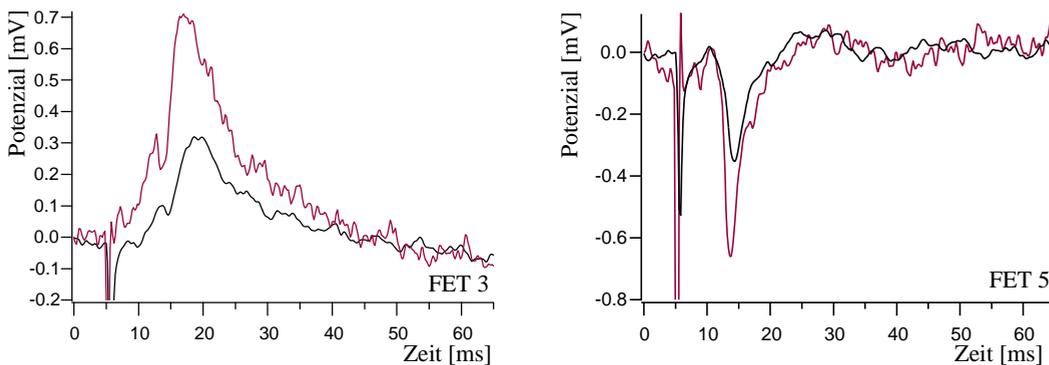


ABBILDUNG 5.1 Eigenbau-Chip-Messung mit Transistor (roter Graph) und Glaselektrode über Gate des Transistors (schwarzer Graph) Messung in CA3, Str. pyramidale und Str. radiatum, 40 μ A Strompuls in GD (aus Messung Abb.4.12)

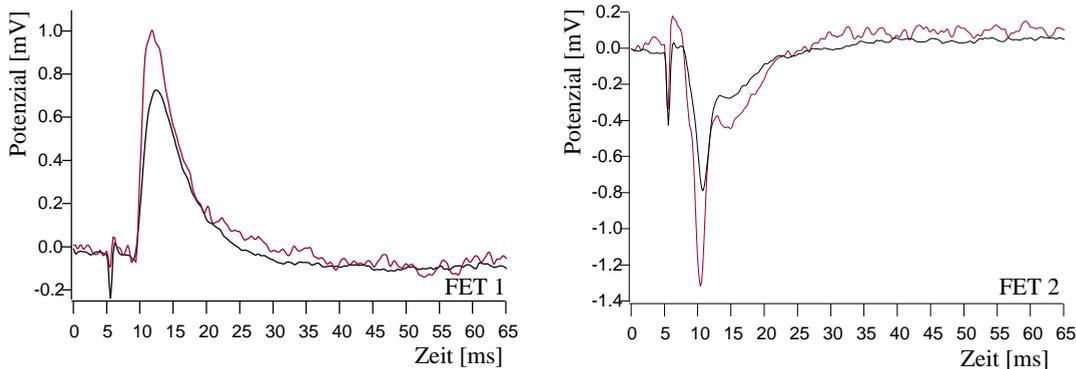


ABBILDUNG 5.2 Eigenbau-Chip-Messung mit Transistor (roter Graph) und Glaselektrode über Gate des Transistors (schwarzer Graph) Messung in CA1, Str. pyramidale und Str. radiatum, Strompuls in CA3 (links 30 μ A, rechts 40 μ A) (aus Messung Abb.4.15)

Wie sich bereits in den Beispielen von Abb. 5.1 und 5.2 erkennen lässt, hat das Feldpotential mit dem Transistor gemessen eine größere Amplitude als mit der Glaselektrode gemessen. Um dies zu quantifizieren, wurden 12 Messungen (12 unterschiedliche Transistoren), an insgesamt 5 Schnittkulturen, ausgewertet, Signale sowohl in CA1 wie auch CA3, in Str. pyramidale und Str. radiatum. Es wurden die

Maxima/Minima der Amplituden der Feldpotenziale bestimmt, gemittelt über drei nacheinanderfolgende Messungen (10 s Reizintervall). Ebenso wurde der Zeitpunkt der ermittelten Extremwerte nach Stimulation bestimmt. (Siehe auch Tabelle in Anhang)

Um einen Wert für das Amplitudenverhältnis beider Messmöglichkeiten zu erhalten, ist in Abbildung 5.3A der Betrag des Maximum/Minimum am Transistor gegen den Betrag der Amplitude an der Glaselektrode aufgetragen. Die Datenpunkte liegen alle über der Winkelhalbierenden. Ein linearer Fit durch die Datenpunkte und den Ursprung (Annahme: wenn kein Potenzialgradient im Gewebe vorhanden ist, misst sowohl der FET als auch die Elektrode kein Signal) ergibt eine Steigung von 1,96 ($1,96 \pm 0,17$, $N = 12$).

Außerdem wurde der Zeitpunkt des Extremums am Transistor gegen den Zeitpunkt an der Glaselektrode aufgetragen (Abb.5.3B). Alle Datenpunkte liegen unterhalb der Winkelhalbierenden. Der lineare Fit liefert als Steigung 0,89 ($0,89 \pm 0,02$, $N = 12$).

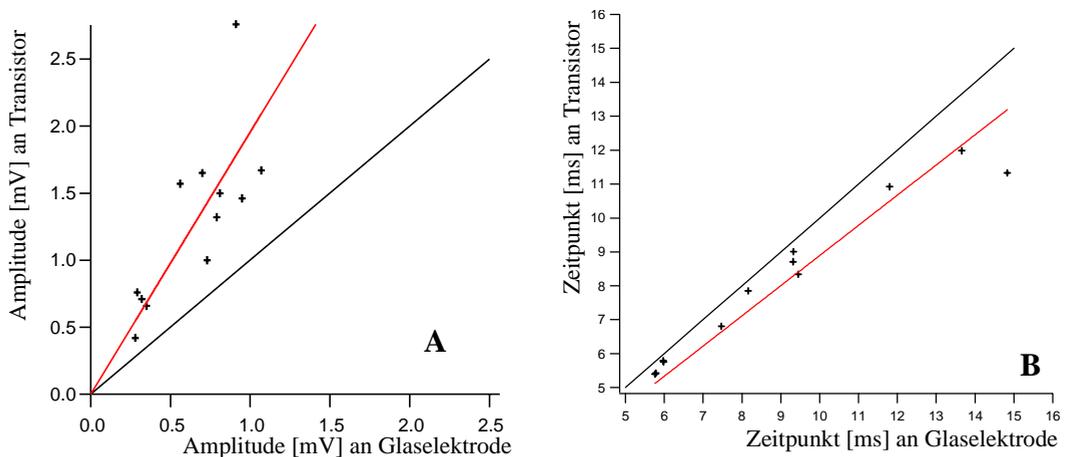


ABBILDUNG 5.3 Lineare Regression A: Abszisse: Amplitude des Feldpotenzials gemessen mit Glaselektrode Ordinate: Amplitude des Feldpotenzials gemessen mit Feldeffekttransistor (Eigenbau-Chip)

B: Abszisse: Zeitpunkt des Extremums des Feldpotenzials gemessen mit Glaselektrode Ordinate: Zeitpunkt des Extremums gemessen mit Feldeffekttransistor (Eigenbau-Chip)

Kreuze: Messpunkte Gerade: Linearer Fit durch Messpunkte Schwarze Linie: Winkelhalbierende

Es ist also die Amplitude gemessen mit dem Transistor größer als an der Glaselektrode, und zwar um einen Faktor von 1,96 (5.3A). Das Maximum des Feldpotenzials erscheint auf dem Feldeffekttransistor früher als an der Glaselektrode (Abb.5.3B). Trotzdem war bei allen Messungen die Form der Signale an beiden „Detektoren“ identisch (Abb. 5.1 und 5.2).

Cablos- und Adhesios-Feldeffekttransistor

Sowohl bei den Cablos- als auch bei den Adhesios-Messungen wurde versucht, eine Glaselektrode zum Signalvergleich zu positionieren. Bei diesen Chips ist es

schwieriger, die Glaselektrode genau über ein Gate zu fahren, weil die einzelnen Gates unter dem Schnitt schlecht sichtbar sind. Es konnte nur die ungefähre Position über den Gates erreicht werden.

Bei den Cablos-Chips gibt es zwei Messungen mit Glaselektroden, an zwei unterschiedlichen Hippocampuskulturen. Insgesamt wurden bei den beiden Hippocampuskulturen nur an fünf unterschiedlichen Positionen über den Gates gemessen. Bei der Auswertung der Extrema waren bei drei Messungen die FET-Signale größer (Abb.5.4A), bei den zwei anderen (Abb.5.4B) die Glaselektrodensignale (siehe auch Tabelle in Anhang).

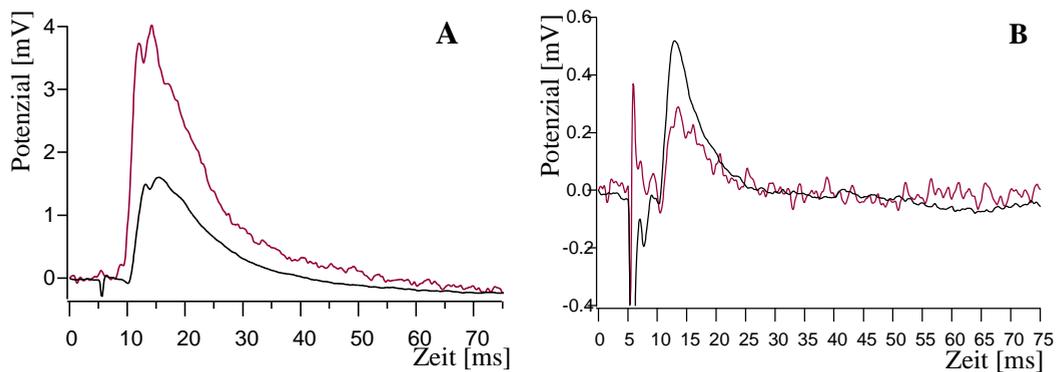


ABBILDUNG 5.4 Cablos-Chip-Messungen: *A:* pEPSP in CA1, 40 μ A Strompuls in CA3 (aus Messung Abb.4.25) *B:* pEPSP in CA1, 90 μ A Strompuls in CA3 (aus Messung Abb.4.26)
 rot: FET-Signal schwarz: Glaselektrode; Reizartefakt bei 5 ms

In Abb.5.5 sind Messungen mit Adhesios-FET und Glaselektrode über dem FET gezeigt. Der rote Graph ist das Feldpotenzial mit dem Transistor aufgenommen, der schwarze Graph mit der Glaselektrode. Auch hier ist zu sehen, dass die Signalforn gemessen mit den Adhesios-Chips identisch ist zur Form der Signale an der Glaselektrode.

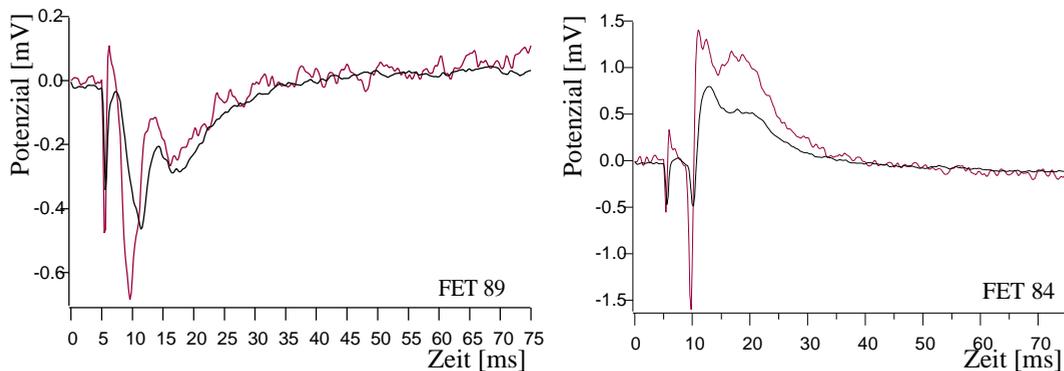


ABBILDUNG 5.5 Adhesios-Chip-Messung: *Links:* Messung in CA1, 40 μ A Strompuls in CA3 (Str. radiatum) (siehe auch Abb.4.34)
Rechts: Messung in CA1 (Str. pyramidale), 40 μ A Strompuls in CA3 (siehe auch Abb.4.32)
 rot: FET-Signal schwarz: Glaselektrode

Um das Verhältnis der Amplitudenwerte beider Messmethoden zu quantifizieren, wurden 9 Adhesios-Messungen (9 unterschiedliche Transistoren), an insgesamt 4 Hippocampuskulturen, ausgewertet. Die Maxima und Minima der Amplituden der Feldpotenziale wurden jeweils aus den über drei nacheinanderfolgenden (10 s) gemittelten Messungen bestimmt. Auch der Zeitpunkt der ermittelten Extremwerte wurde bestimmt. (Siehe auch Tabelle in Anhang)

In Abb.5.6A ist der Betrag des Maximum/Minimum am Adhesios-Transistor gegen den Betrag der Amplitude an der Glaselektrode aufgetragen. Nur ein Wert liegt unterhalb der Winkelhalbierenden. Ein linearer Fit durch die Datenpunkte und den Ursprung ergibt eine Steigung von 1,63 ($1,63 \pm 0,18$, $N = 9$).

Außerdem wurde der Zeitpunkt des Extremums am Transistor gegen den Zeitpunkt an der Glaselektrode aufgetragen (Abb.5.6B). Alle Werte liegen unterhalb der Winkelhalbierenden. Der lineare Fit liefert eine Steigung von 0,77 ($0,77 \pm 0,02$, $N = 9$).

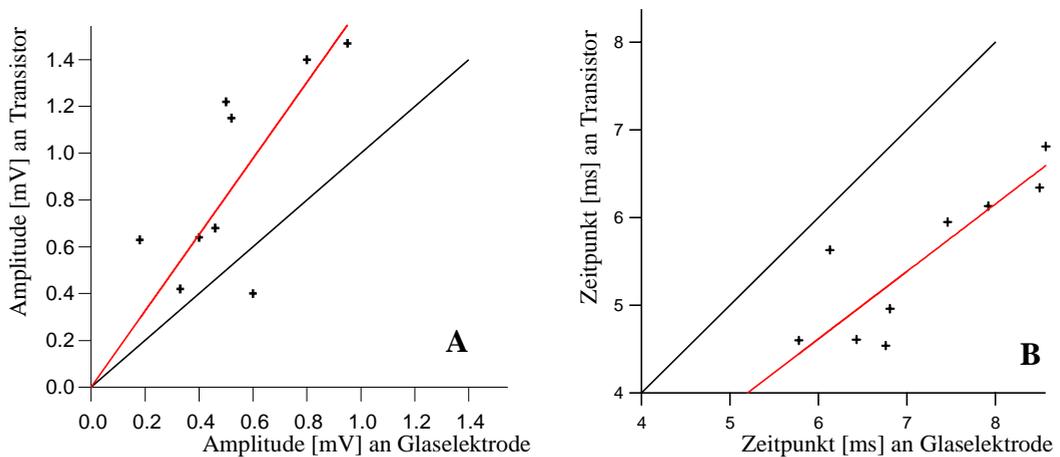


ABBILDUNG 5.6 Lineare Regression der Adhesios-Amplituden

A: pEPSP-Amplitude FET gegen pEPSP-Amplitude Glaselektrode

B: Zeitpunkt der Extrema am FET gegen Zeitpunkt an der Glaselektrode

Kreuze: Messpunkte Rote Linie: Linearer Fit durch Messpunkte Schwarze Linie: Winkelhalbierende

Wenn man die Punkte der Cablos Messungen mithinzunimmt, ergibt sich folgendes Bild:

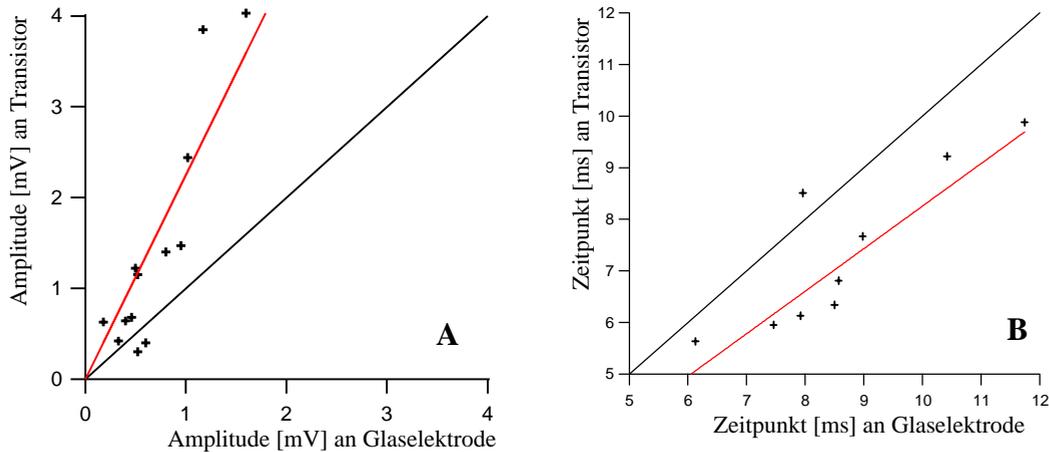


ABBILDUNG 5.7 Lineare Regression: Amplituden bei Adhesios- und Cablos-Messungen

A: Abszisse: Amplitude des Feldpotenzials gemessen mit Glaselektrode Ordinate: Amplitude des Feldpotenzials gemessen mit Feldeffekttransistor

B: Abszisse: Zeitpunkt des Extremums des Feldpotenzials gemessen mit Glaselektrode Ordinate: Zeitpunkt des Extremums gemessen mit Feldeffekttransistor

Kreuze: Messpunkte Rote Linie: Linearer Fit durch Messpunkte Schwarze Linie: Winkelhalbierende

Der lineare Fit „Betrag des Amplitudenextremums am Transistor“ gegen „Betrag des Amplitudenextremums an der Elektrode“ (Abb.5.7A) hat als Steigung den Wert 2,25 ($2,25 \pm 0,21$, $N = 13$). Der Fit durch den Zeitpunkt des Extremums am FET gegen den Zeitpunkt an der Glaselektrode (Abb.5.7B) ergibt eine Steigung von 0,83 ($0,83 \pm 0,03$, $N = 13$).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der Transistor die Feldpotenziale um einen Faktor zwischen 1,6 und 2,3 größer detektiert als die Glaselektrode, und das Maximum/Minimum erscheint auf dem Transistor früher als an der Elektrode. Die Form der Signale ist an beiden „Detektoren“ identisch.

Welche Erklärungen gibt es dafür?

Ort der Ableitung

Wenn man mit der Glaselektrode unterschiedliche Positionen im Schnittgewebe ansteuert, verändert sich das gemessene Feldpotenzial innerhalb eines Stratum nur wenig.

Die Größe der Amplitude nimmt jedoch am Anfang, wenn man von der Oberfläche des Schnittes tiefer geht, zu. Bei den oben vorgestellten Messungen wurde die Glaselektrode solange über dem Gate verstellt, bis das Signal am stärksten war. Es wurde also versucht, das mit der Glaselektrode größtmögliche Signal zu messen. Allerdings wurde vermieden, zu tief in den Schnitt einzutauchen, um nicht mit der Spitze auf dem Gate aufzufahren und damit dieses zu zerstören. So ist die maximale Eintauchtiefe der Mikroelektrode ungefähr in der Mitte der Schnittkultur, und somit der Ableitungsort für Feldpotenziale am Transistor ein anderer als mit der Elektrode. So ergeben sich folgende Möglichkeiten für die unterschiedlichen Amplituden und das Zeitverhalten der Feldpotenziale:

1. Inhomogenität des Schnittes

Damit ist gemeint, dass sich der Hippocampuschnitt während der Kultivierung verändern kann und die Pyramidenzellen vielleicht am Boden der Kultur dichter wachsen oder sich Gliazellschichten bilden, die das Feldpotenzial inhomogen sowohl in Größe als auch zeitlichem Verlauf je nach Tiefe des Schnittes werden lassen. Oder es verändert sich die Synapsendichte und je nach Tiefe des Schnittes sind mehr oder weniger Synapsen ausgebildet. Um dies abzuklären, fehlen Untersuchungen zur Morphologie der Schnittkulturen.

2. Geometrie der festen Unterlage

Eine Möglichkeit für die unterschiedliche Messsignalgröße ist, dass an der Schnittstelle Chip-Hippocampuskultur ein sehr großes Potenzial aufgrund der geometrischen Besonderheit aufgebaut wird. Der Stromfluss in negative z-Richtung ist durch die Chipoberfläche begrenzt (siehe auch Kap. 5.4). Sowohl zeitliche Unterschiede als auch Unterschiede in der Amplitude der Feldpotenziale sind dadurch möglich.

3. Widerstand des Schnittes

Wie aus [Mit 85] bekannt, hat der extrazelluläre Raum im Hirngewebe einen Widerstand von $\sim 200 \Omega \text{ cm}$. Die Tiefe der Ableitung beeinflusst den Spannungsabfall über den Gewebewiderstand und damit das gemessene Potenzial. Wenn die Glaselektrode nur $50 \mu\text{m}$ tief im Schnitt ist, das Gate aber $100 \mu\text{m}$ Schnitt über sich hat, kann so die Amplitude des abgeleiteten Signals unterschiedlich groß sein.

Apparatur

Nicht auszuschließen sind Unterschiede in den verwendeten Verstärkern oder sonstige Apparatur-bedingte Einflüsse.

4. RC-Glieder/ Streukapazitäten

Über Kabel können Streukapazitäten von 100 pF pro Meter Kabel auftreten. Das Kabel zwischen Elektrode und Vorverstärker ist 10 cm lang (ergibt $\sim 10 \text{ pF}$), die Eingangskapazität des Vorverstärkers ist $\sim 10 \text{ pF}$, und die Glaselektrode hat einen Widerstand $\sim 10 \text{ M}\Omega$. Daraus ergibt sich eine Zeitkonstante von $200 \mu\text{s}$ (siehe [Neh 74], S. 28).

Die Frage, ob der unterschiedliche Zeitpunkt der Maxima am Transistor bzw. an den Elektroden auf eine Verschiebung des Signals oder einer Verzögerung der Anstiegszeit beruht, ist nicht geklärt. Eine Verschiebung ist über die Apparatur schwer erklärbar, aber Verzögerungen durch Streukapazitäten sind durchaus möglich.

5.5 Eindimensionale Current Source-Density Analyse

Die in Kapitel 2.3 beschriebene Methode der Current Source-Density Analyse zur genauen Ermittlung der Orte von Stromquellen und -senken wurde extensiv auf die Schichtstrukturen des Neocortex, des olfaktorischen Cortex und des Hippocampus angewendet, um die Abfolge von Ereignissen in Antwort auf einen elektrischen Stimulus zu verstehen ([Mit 85], [Hol 98]). Die Experimente wurden am intakten Gehirn durchgeführt und folgende Vereinfachungen dabei vorgenommen:

Die Poisson-Gleichung für die CSD I_m ist

$$\nabla \sigma \nabla \phi = -I_m \tag{GL 2.10}$$

Bei neuronaler Aktivität im Gehirn kann der Strom in alle Richtungen fließen. Die Leitfähigkeit σ wird als Skalar behandelt (Leitfähigkeit als isotrop angenommen). Dann ist die Poisson-Gleichung

$$\sigma \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} \right) = -I_m \tag{GL 5.1}$$

Wenn die Feldpotenziale ϕ in einer Schicht-Struktur, wie z. B. dem Hippocampus, abgeleitet werden, kann die Gleichung weiter vereinfacht werden. Bei Schicht-Strukturen, die homogen in Bezug auf die Schicht-Ebenen aktiviert werden, ist das Feldpotenzial translationsinvariant in den zwei Richtungen parallel zu den Schichten:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 0 \tag{GL 5.2}$$

Damit kann die eindimensionale CSD Methode angewendet werden:

$$\sigma \cdot \frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = -I_m \tag{GL 5.3}$$

wobei x die Richtung senkrecht zu den Schichten ist (entlang der dendrosomatischen Achse) ([Mit 85]).

Diese eindimensionale CSD Analyse, die für Schicht-Strukturen im intakten Hirn entwickelt wurde, wurde von vielen Gruppen für die Anwendung in Schnitten übernommen ([Ric 87], [Ple 93]).

Die Cablos-Chip-Messungen mit einem Rasterabstand von 22 μm bieten sich an, um eine eindimensionale CSD-Analyse in den organotypischen Hippocampuskulturen durchzuführen. Die Messungen in äquidistanten Abständen können im Gegensatz zu Mikroelektroden-Messungen mit einem Reizpuls durchgeführt werden. Es treten jedoch zwei Probleme auf:

Reicht der Abtastabstand von 22 μm aus? Bei Mikroelektrodenmessungen in Schnitten wurde für die CSD-Analyse in 25 μm ([Ric 87]) und 30 μm ([Ple 93]) Abständen gerastert. Bei planaren Metallelektrodenmessungen wurde sogar mit einem 100 μm –200 μm Abtastabstand eine CSD-Analyse durchgeführt ([Ege 98], [Nov 89]). Wie bei den Cablos-Messungen festgestellt, ändern sich jedoch die Feldpotenziale durchaus im Str. radiatum innerhalb von 22 μm (Abb.4.25, FET 67/FET 69) und so muss vielleicht sogar mit noch kleineren Abständen abgetastet werden, um keinen Fehler zu machen. Die Adhesios-Chips und deren 4,6 μm Messintervall wären eine Lösung für dieses Problem.

Zum zweiten ist zu überlegen, ob die eindimensionale CSD-Analyse bei der gegebenen Messsituation „Hirnschnitt auf festem Substrat“ überhaupt gilt. Aus den Ergebnissen, dass die Glaselektrode in der Mitte des Schnittes ein geringeres Potenzial als der FET, der an der Schnittstelle Substrat-Kultur sitzt, misst, entsteht die Überlegung, ob das Potenzial entlang der z-Richtung eines Schnittes wirklich unverändert bleibt. Falls das Potenzial in z-Richtung, von der Grenzfläche Chip zur Grenzfläche Elektrolyt, gekrümmt ist, kann diese Richtung bei der CSD-Analyse nicht vernachlässigt werden. Genauere Experimente zur Aufklärung, inwieweit die eindimensionale CSD-Methode auf Schnitte adaptiert werden kann, stehen noch aus.

6 *Ausblick*

Die Kopplung von Hirnschnitten mit Silizium-Chips ist in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt worden. Durch die Möglichkeit des Multi-Site-Recordings kann die Netzwerkaktivität in Hirnschnitten nun mit großer räumlich-zeitlicher Auflösung untersucht werden.

Durch Nissl-Anfärbung wurde gezeigt, dass die Anordnung des Hippocampus in seiner typischen Schichtstruktur während der Kultur erhalten bleibt. Der Schnitt ist elektrophysiologisch aktiv und die gemessenen Potenziale stimmen mit den bekannten Potenzialformen aus der Literatur überein. Eine eingehende histologische Untersuchung der Kulturen steht aber noch aus. Aus Gehirnverletzungen ist bekannt, dass sich um verletztes Gewebe eine Gliazellschicht bildet. Ist das bei der Hippocampuskultur auch der Fall? Ist der Schnitt von einer Gliazellschicht umgeben? Falls ja, wieso ist es dann möglich, so große Feldpotenziale zu messen?

Biologische Fragestellungen den Hippocampus betreffend sind die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfälle und pharmakologische Einwirkungsmöglichkeiten, sowie Fragen zur synaptischen Plastizität und Long-term Potentiation. Mit eigens dafür entworfenen Chip-Layouts kann z. B. das Zustandekommen von LTP über sehr kleine Distanzen (Adhesios: 5 μm , Chip-Technologie erlaubt bis zu 1 μm) beobachtet werden.

Mithilfe eines Multiplexing-Chips kann eine vollständige Kartierung der Feldpotenziale über den ganzen Schnitt vorgenommen werden. Von unterschiedlichen Reizorten ausgehend, wird die Ausbreitung der Erregung über den gesamten Hippocampusschnitt verfolgt. An einer neuen Chipgeneration, die die bisherigen Probleme der inhomogenen Einsatzspannungen und die Probleme beim Schaltverhalten behebt, wird bereits gearbeitet.

Auch wenn der Hippocampus nach wie vor eines der beliebtesten Schnittpräparate ist, gibt es doch in der Zwischenzeit viel Erfahrung mit akuten Schnitten, aber auch Kulturen, anderer Hirnregionen (visueller Cortex: [Cae 89b], Neostriatum: [Din 84], Cerebellum: [Bra 99], Hypothalamus: [Din 84], Neocortex: [Din 84]). Akute Schnittpräparate hätte den Vorteil, dass die Oberfläche der Silizium-Chips nicht so stark angegriffen würde. Aus Erfahrungen mit planaren Metallelektroden sind Ableitungen an akuten Schnitten trotz der toten Schicht an der Schnittstelle möglich [Oka 99], [Nov 88].

Anhang

Lösungen für Schnittkultur

1. Gey's Lösung

- 100 ml Gey's Salzlösung (GBSS, Gibco Nr. 041-4260)
- 1 ml 50 %ige Glucoselösung

2. Zubereitung der Plasmalösung

- Hühnerplasma in 5 ml Gefäß (Difco Nr. 5354-57-3)
- Zugabe von 5 ml „Difco reconstitution fluid“ (Difco Nr. 5352-72-6) durch einen Spritzenfilter
- Warten bis Plasma sich vollständig gelöst hat
- Zentrifugieren (2500 rpm) für 30 min
- Zentrifugierte Plasmalösung steril in Probenröhrchen als Aliquots abfüllen.
- Lagerung bei -20°C

Eingefrorene Plasmalösung ist die Arbeitslösung.

3. Zubereitung der Thrombinlösung

- 0,1 g Thrombin wird als Pulver geliefert in einem 5 ml Gefäß (Hoffmann La Roche Nr. 07-4010-1)
- weiteres wie bei Plasmalösung
- Abfüllen als Aliquot in Probenröhrchen
- Lagerung bei -20°C

Eingefrorene Lösung ist die Stammlösung.

- Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit der Gey's Lösung (1.) verdünnt. Dies ergibt die eigentliche Arbeitslösung. Für das Aufkleben auf Siliziumoxidoberfläche wurde 50 μl auf 500 μl Gey's Lösung gegeben.

4. Zubereitung von 406 ml Medium

- 200 ml Basalmedium, Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ (Hank's BME ohne Glutamin, Gibco Nr. 041-1370)
 - 100 ml Hank's balanced salt solution, Lagerung bei $+20^{\circ}\text{C}$ (HBSS, Gibco Nr. 041-4020)
 - 100 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C , Mycoplasma geprüft, Lagerung bei -20°C (Gibco Nr. 034-6055)
 - 4 ml 28,0 M (500mg/ml) Glucoselösung = 50% d-Glucose in Bidest. In Aliquot abfüllen und bei -20°C lagern
-

-
- 2 ml 200 mM l-Glutaminlösung, Lagerung in Aliquots bei -20°C
Aufbewahrung des Mediums bei 4°C für ca. 4 Wochen.
5. *Cytostatikalösung*
- 2,422 mg Uridine (Sigma Nr. U-3750), abfüllen auf 10 ml Bidest
 - 2,797 mg ARA-C (Sigma Nr. C-6645), abfüllen auf 10 ml Bidest
 - 2,462 mg 5-Fluorodeoxyuridine (Sigma Nr. F-0503), abfüllen auf 10 ml Bidest
- Alle drei Lösungen in gleichen Teilen mischen, ergibt Arbeitslösung in der jede Komponente in 1 mM Konzentration vorkommt. Als Aliquots abfüllen und bei -20°C lagern.
- Zugabe von 10 μl Arbeitslösung zu ca. 1 ml Kulturmedium ergibt eine 10 μM Konzentration der Cytostatika im Medium
6. *Poly-L-Lysin-Lösung*
- 25 mg PLL (P6516, MW 9800, Sigma) auf 25 ml TRIS (pH 8,4)
(TRIS: 50 ml von 0,1 M tris(hydroxymethyl) aminomethane + 17,2 ml 0,1 M HCl)
7. *BM-flüssig*
- Reinigungsmittel; BIOMED Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim
8. *Barrycidal*
- Desinfektionsmittel; Vertrieb: Helmut Schröder, Stuttgart
9. *Medizinischer Kleber MK3*
- Dr. Osypka GmbH, Basler Str. 109, D-79639 Grenzach-Wyhlen
10. *Nissl-Färbung*
- *Färbelösung:* 1 % Cresylviolett
1 g Cresylviolett (C-1791, Sigma) in 10 ml abs. EtOH lösen, 10 min stehen lassen, 100 ml H_2O zugeben, erhitzen, abkühlen lassen, filtrieren.
 - *Färbeprozedur:* 50 % EtOH (2 min), 70 % EtOH (2 min), 96 % EtOH (2 min), 100 % EtOH (2 min), 100 % EtOH (2 min), Xylol (3 min), 100 % EtOH (2 min), 100 % EtOH (2 min), 96 % EtOH (2 min), 70 % EtOH (2 min), 50 % EtOH (2 min), H_2O (4 min oder länger), Cresylviolett (30 s bis 5 min), H_2O (dippen), 70 % EtOH (2- 5 min), 96 % EtOH (2 min), 96 % EtOH + 1 Spritzer Essigsäure (2 min), 96 % EtOH (2 min), ButOH I (2 min), ButOH II (2 min), Xylol I (4 min), Xylol II (4 min), Xylol III (4 min)
- Bei Schnitten auf Deckglas würden diese jetzt in Entellan eingedeckt. Bei Schnitten auf Silizium-Chips ist dies nicht möglich, denn mit einem Auflichtmikroskop sieht man dann nichts. Es müssen sofort in Xylol Aufnahmen gemacht werden.

Rezepte für Elektrophysiologie und Reizen

11. *Zubereitung von 250 ml Messmedium*
- 225 ml Milliporewasser
 - 22 ml HBSS (10x, Gibco Nr. 14065-049)
 - 55 mg CaCl_2
 - 86 mg NaHCO_3
12. *Ag/AgCl-Pellet* von Science Products (E 201)
-

13. Reizelektroden

- Ätzlösung: 71 g NaNO₂

34 g KOH

100 ml H₂O

- Wolframrohlinge (Science Products, TW 8-3, 0,008" x 3,0") in Ätzlösung 80 s lang elektrolytisch ätzen (50 Hz Wechselspannung, V_{PP} = 10 V), dabei die Wolframelektrode über einen Motor wiederholt in die Ätzlösung hinein- und herausfahren (ungefähr 0,5 cm eintauchen)

- Nach dem Ätzen die Spitze mit EtOH und Wasser spülen

- Mit Epon (EpoxyLite International LTD., EIR6001M) isolieren

Tabelle der Geräte im Messaufbau

Gerät	Firma	Artikel
Current Clamp Verstärker	Axon Instruments, Inc.	Axoclamp2B
Computer		300 MHz, 64 MB RAM, 4,5 GB Festplatte
64 Kanal AD-Wandler	National Instruments	PCI-6071 E
(16 Kanal AD-Wandler), 1 Kanal DA, 20 TTL I/O	Kolter Electronic	Hyper I/O 12 Bit, 33 kHz
4 Kanal DA-Wandler	Kolter Electronic	DAC4 12 Bit
Stimulus Isolator	WPI	A360D
Filter	MPI für Kybernetik, Tübingen	
Mikroskop	Mitutoyo, Kawasaki	FS-60FC
Mikromanipulator	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Patch Man
Fotoapparat	KYOCERA Corporation	Contax 167 MT
Peristaltische Pumpe	Gilson	Minipuls 3
Oszilloskop	Hewlett Packard	HP 54600
16 Kanal Messverstärker	Eigenbau	siehe [Wei 92]
16 Kanal DA-Wandler	Eigenbau	siehe [Wei 92]
Heizregler	Störk Tronic	Regler ST XX-XX.02
Roller-Brutschrank	Schütt Labortechnik	

Tabellen für „Vergleich: Glasmikroelektrode – Feldeffekttransistor“

Maxima/Minima der Feldpotenzialamplituden und Zeitpunkt der Amplituden der Eigenbau-Chips-Messungen:

Hippocampuskultur	Position der Glaselektrode	Reizstärke /wo	FET Extremum	Glas-elektrode Extremum	FET Zeitpunkt	Glas-elektrode Zeitpunkt
Schnitt 1	FET 3 in CA3	40 μ A/GD	0,71 mV	0,32 mV	11,98 ms	13,66 ms
Schnitt 1	FET 4 in CA3	40 μ A/GD	0,42 mV	0,28 mV	11,33 ms	14,83 ms
Schnitt 1	FET 5 in CA3	40 μ A/GD	-0,66 mV	-0,35 mV	8,71 ms	9,32 ms
Schnitt 1	FET 9 in CA3	40 μ A/GD	0,76 mV	0,29 mV	8,34 ms	9,45 ms
Schnitt 2	FET 3 in CA3	40 μ A/GD	2,76 mV	0,91 mV	9,01 ms	9,33 ms
Schnitt 3	FET 6 in CA3	30 μ A/GD	-1,57 mV	-0,56 mV	5,76 ms	5,98 ms
Schnitt 3	FET 8 in CA3	40 μ A/GD	1,67 mV	1,07 mV	5,79 ms	5,97 ms
Schnitt 3	FET 11 in CA3	40 μ A/GD	1,65 mV	0,7 mV	5,4 ms	5,76 ms
Schnitt 4	FET 13 in CA1	50 μ A/CA3	1,46 mV	0,95 mV	10,92 ms	11,8 ms
Schnitt 5	FET 1 in CA1	30 μ A/CA3	1 mV	0,73 mV	6,81 ms	7,47 ms
Schnitt 5	FET 2 in CA1	40 μ A/CA3	-1,32 mV	-0,79 mV	5,43 ms	5,78 ms
Schnitt 5	FET 2 in CA1	35 μ A/GD	-1,5 mV	-0,81 mV	7,85 ms	8,16 ms

Maxima/Minima und Zeitpunkt der Feldpotenzialamplituden der Cablos-Chips-Messungen:

Hippocampuskultur	Position der Glaselektrode	Reizstärke /wo	FET Extremum	Glas-elektrode Extremum	FET Zeitpunkt	Glas-elektrode Zeitpunkt
Schnitt 1	FET 8 in CA1	90 μ A/ CA3	0,3 mV	0,52 mV	8,51 ms	7,96 ms
Schnitt 1	FET 9 in CA1	90 μ A/ CA3	0,29 mV	0,52 mV	8,55 ms	7,96 ms
Schnitt 2	FET 71 in CA1	40 μ A/ CA3	4,03 mV	1,6 mV	9,22 ms	10,42 ms
Schnitt 2	FET 72 in CA1	40 μ A/ CA3	3,85 mV	1,17 mV	7,67 ms	8,98 ms
Schnitt 2	FET 74 in CA1	40 μ A/ CA3	2,44 mV	1,02 mV	9,88 ms	11,74 ms

Maxima/Minima und Zeitpunkt der Feldpotenzialamplituden der Adhesios-Chips-Messungen:

Hippocampuskultur	Position der Glaselektrode	Reizstärke /wo	FET Extremum	Glas-elektrode Extremum	FET Zeitpunkt	Glas-elektrode Zeitpunkt
Schnitt 1	FET 1 in CA3	110 μ A/ GD	-0,42 mV	-0,33 mV	4,96 ms	6,81 ms
Schnitt 1	FET 12 in CA3	110 μ A/ GD	-0,4 mV	-0,6 mV	5,63ms	6,13ms
Schnitt 2	FET 85 in CA1	40 μ A/ CA3	-0,68 mV	-0,46 mV	4,61 ms	6,43 ms
Schnitt 2	FET 89 in CA1	35 μ A/ CA3	-0,64 mV	-0,4 mV	4,54 ms	6,76 ms
Schnitt 2	FET 94 in CA1	30 μ A/ CA3	-0,63 mV	-0,18 mV	4,6 ms	5,78 ms
Schnitt 3	FET 83 in CA1	40 μ A/ CA3	1,47 mV	0,95 mV	5,95 ms	7,46 ms
Schnitt 3	FET 84 in CA1	40 μ A/ CA3	1,4 mV	0,8 mV	6,13 ms	7,92 ms
Schnitt 4	FET 92 in CA3	50 μ A/GD	1,22 mV	0,5 mV	6,81 ms	8,57 ms
Schnitt 4	FET 95 in CA3	50 μ A/GD	1,15 mV	0,52 mV	6,34 ms	8,5 ms

Literaturverzeichnis

- [And 64a] Andersen P., Eccles J.C., Loyning Y., Location of postsynaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.*, 27: 592, 1964a
- [And 64b] Andersen P., Eccles J.C., Loyning Y., Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 27: 608, 1964b
- [And 71a] Andersen P., Bliss T.V.P., Skrede K.K., Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.*, 13: 222, 1971a
- [And 71b] Andersen P., Bliss T.V.P., Skrede K.K., Unit Analysis of Hippocampal Population Spikes. *Exp. Brain Research*, 13: 208, 1971b
- [And 77] Andersen P., Sundberg S.H., Sveen D., Wigström H., Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature*, 266: 736, 1977
- [Ban 98] Banker G., Goslin K. (Eds.), *Culturing Nerve Cells*. MIT Press, Cambridge, Mass. and London, England, 1998
- [Bop 92] Boppart S. A., Wheeler B. C., Wallace C. S., A Flexible Perforated Microelectrode Array for Extended Neural Recordings. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 39, No. 1: 37, 1992
- [Bra 99] Brandt A., Heck D., Aertsen A., Spatio-Temporal Structure of Cerebellar Responses to 'Tidal-Wave'-Stimuli. *Contributions to the 27th Göttingen Neurobiology Conference*, Elsner N., Eysel U. (eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999
- [Brau 99] Braun D., Capacitive stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes. *Dissertation*, Technische Universität München, 1999
- [Bre 95] Brenner M., Messung neuronaler Aktivität mit einem 2048 Transistoren Chip. *Diplomarbeit*, Universität Ulm, 1995
- [Bre 00] Brenner M., Interface zwischen 2000-Transistoren-Chip und neuronaler Zellkultur. *Dissertation*, Technische Universität München, 2000
- [Buc 93] Buchs P.-A., Stoppini L., Muller D., Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures. *Developmental Brain Research*, 71: 81, 1993
- [Cae 89a] Caeser M., Zellkulturen als in vitro Modell in der Neurobiologie. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1989
- [Cae89b] Caeser M., Bonhoeffer T., Bolz J., Cellular organization and development of slice cultures from rat visual cortex. *Exp. Brain Res.*, 77: 234, 1989

- [Cos 01] Cossart R. et al., Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nature Neuroscience*, Vol. 4 no 1: 52, 2001
- [Din 84] Dingledine R. (Ed.), *Brain Slices*. Plenum Press, New York and London, 1984
- [DiS 86] DiScenna P. Method and Myth in Maintaining Brain Slices. in [Scu 86]
- [Dup 99] Duport S., Millerin C., Muller D., Corrèges P., A metallic multisite recording system designed for continuous long-term monitoring of electrophysiological activity in slice cultures. *Biosensors & Bioelectronics*, 14: 369, 1999
- [Ege 98] Egert U. et al., A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols*, 2: 229, 1998
- [Fej 98] Fejtl M. et al., Multi-site Recording As A New Tool To Study Epileptogenesis In Organotypic Hippocampal Slices. *Eur. J. Neurosci. Abstract Book 20.16*, 1998,
- [Fro 91] Fromherz P., Offenhäuser A., Vetter T., Weis J., A neuron-silicon junction: A retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252: 1290-1293, 1991
- [Fig 99] Figger Ch., Optimierung der kapazitiven Stimulation individueller Neuronen mit Halbleiter Mikrostrukturen. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1999
- [Fuj 62] Fujita Y., Sakata H., Electrophysiological properties of CA1 and CA2 apical dendrites of rabbit hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 25: 208, 1962
- [Gah 81] Gähwiler B. H., Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Meth.*, 4: 329-342, 1981
- [Gah 84] Gähwiler B. H., Development of the hippocampus in vitro: cell types, synapses and receptors. *Neuroscience*, 11: 751-760, 1984
- [Hol 98] Holt G. R., A Critical Reexamination of Some Assumptions and Implications of Cable Theory in Neurobiology. Dissertation, California Institute of Technology, Pasadena, California, 1998 (<http://www.klab.caltech.edu/~holt/papers/thesis/index.html>)
- [Hor 96] Horowitz P., Hill W., *Die Hohe Schule der Elektronik. Teil 1: Analogtechnik*. Elektor-Verlag, Aachen, 1996
- [Hub 69] Hubbard J. I., Llinás R., Quastel D. M. J., *Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1969
- [Jah 99] Jahnsen H. et al., Coupling of Organotypic Brain Slice Cultures to Silicon-Based Arrays of Electrodes. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 18: 160, 1999
- [Jen 97] Jenkner M., Fromherz P., Bistability of Membrane Conductance in Cell Adhesion Observed in a Neuron Transistor. *Phys. Rev. Lett.*, 79: 4705,

1997

- [Jen 99] Jenkner M., Hybride Netzwerke aus Neuronen von Lynmaea stagnalis und Silizium-Chips. Dissertation, Technische Universität München, 1999
- [Job 81] Jobling D. T., Smith J. G., Wheal H. V., Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous system in vitro. *Med. & Biol. Eng. & Comput.*, 19: 553, 1981
- [Joh 99] Johnston D., Wu S. M.-S. (eds.), *Foundations of cellular neurophysiology*. The MIT Press, Cambridge, London, 1999
- [Kan 96] Kandel E., Schwartz J., Jessell T. (Hrsg.), *Neurowissenschaften*. Spektrum Verlag Heidelberg/Berlin/Oxford, 1996
- [Kie 99] Kießling V., Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe. *Langmuir*, Vol.16, No. 7: 3517, 1999
- [Kot 95] Kottig K., Flache Membrankabel auf Silizium Feldeffekt-Transistoren. Diplomarbeit, Universität Ulm, 1995
- [Lei 99] Leibrock C., Müller T., Hämmerle H., Fejtl M., Netzwerkanalyse erregbarer Zellen. *Neuroforum* 1: 13–15, 1999
- [Mit 85] Mitzdorf U., Current Source-Density Method and Application in Cat Cerebral Cortex: Investigation of Evoked Potentials and EEG Phenomena. *Physiological Reviews*, Vol. 65, No. 1: 37 ff., 1985
- [Mul 93] Muller D., Buchs P.-A., Stoppini L., Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Developmental Brain Research*, 71: 93, 1993
- [Neh 74] Neher E., *Elektronische Meßtechnik in der Physiologie*. Springer Verlag Berlin/Heidelberg, 1974
- [Nov 87] Novak J. L., Wheeler B. C., Epileptiform Activity Recorded Simultaneously at Multiple Sites on the Surface of a Hippocampal Slice with a Planar Microelectrode Array, in [Scu 86]
- [Nov 88] Novak J. L., Wheeler B. C., Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array. *J. of Neuroscience Methods*, 23: 149, 1988
- [Nov 89] Novak J. L., Wheeler B. C., Two-dimensional current source density analysis of propagation delays for components of epileptiform bursts in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 497: 223, 1989
- [Oka 99] Oka H. et al., A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J. of Neurosci. Methods*, 93: 61, 1999
- [Ple 93] Plenz D., Aertsen A., Current Source Density Profiles of Optical Recording Maps: a New Approach to the Analysis of Spatio-temporal Neural Activity Patterns. *European J. of Neurosci.*, Vol. 5: 437, 1993
- [Plo 69] Plonsey R., *Bioelectric Phenomena*. New York, McGraw-Hill, 1969
- [Plo 88] Plonsey R., Barr R. C., *Bioelectricity: A quantitative approach*. New

- York: Plenum, 1988
- [Plo 74] Plonsey R., The Active Fiber in a Volume Conductor. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* Vol. BME-21, NO. 5: 371, 1974
- [Ric 87] Richardson T., Turner R., Miller J., Action-Potential Discharge in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons: Current Source-Density Analysis. *J. of Neurophysiology*, Vol. 58, No. 5: 981, 1987
- [Sch 98] Schätzthauer R., Fromherz P., Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 1956 ff., 1998
- [Scm 90] Schmidt, Thews (Hrsg.), *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990
- [Scb 79] Schubert P., Mitzdorf U., Analysis and quantitative evaluation of the depressive effect of adenosine on evoked potentials in hippocampal slices. *Brain Res.*, 172: 186, 1979
- [Scu 86] Schurr, Teyler, Tseng (eds.), *Brain Slices: Fundamentals, Applications and Implications*. Conf., Louisville, Ky. 1986, pp. 89-104 (Karger, Basel 1987)
- [She 98] Shepherd G. (ed.), *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, 1998
- [She 93] Shepherd G., *Neurobiologie*. Springer Verlag, 1993
- [Som 87] Somjen G. G. et al., Uses and Abuses of in vitro Systems in the Study of the Pathophysiology of the Central Nervous System. in: [Scu 86]
- [Spe 67] Sperti L., Gessi T., Volta F., Extracellular potential field of antidromically activated CA1 pyramidal neurons. *Brain Res.*, 3: 343, 1967
- [Ste 95] Stett A., Extrazelluläre kapazitive Stimulation und Detektion elektrischer Signale individueller Nervenzellen mit planaren Silizium-Mikrostrukturen. Dissertation, Universität Ulm 1995
- [Stev 66] Stevens C. F., *Neurophysiology: A Primer*. New York: Wiley, 1966
- [Sto 97] Stoppini L., Dupont S., Corrèges P., A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures. *J. Neuroscience Methods*, 72: 23 - 33, 1997
- [Str 00] Straub B., Kopplung von Feldeffekttransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen. Dissertation, Technische Universität München, 2000
- [Sze 85] Sze S. M., *Semiconductor Devices*. John Wiley & Sons, 1985
- [Thi 97] Thiébaud P., de Rooij N. F., Koudelka-Hep M., Stoppini L., Microelectrode Arrays for Electrophysiological Monitoring of Hippocampal Organotypic Slice Cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 44, No. 11:1159, 1997
- [Vas 98] Vassanelli S., Fromherz P., Transistor-records of excitable neurons from rat brain. *Appl. Phys. A*, 66: 459, 1998
- [Vol 00] Völker M., Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei Neurotransistoren. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2000
- [Wei 90] Weis J., Neuron Silizium-Kopplung: Nervenzelle auf Gateoxid steuert

-
- Feldeffekttransistor durch Aktionspotentiale. Diplomarbeit, Universität Ulm, 1990
- [Wei 92] Weis R., Neuron-Silizium-Kopplung mit einer quadratischen Anordnung von Feldeffekttransistoren. Diplomarbeit, Universität Ulm 1992
- [Wei 94] Weis R., Neuron-Transistor-Kopplung: Bestimmung der elektrischen Übertragungseigenschaften. Dissertation, Universität Ulm, 1994
- [Wol 87] Wolf S., Tauber R. N., Silicon Processing for the VLSI Era. Vol. 1: Process Technology. Lattice Press, Sunset Beach, California 1987
- [Wol 90] Wolf S., Silicon Processing for the VLSI Era. Vol. 2: Process Integration. Lattice Press, Sunset Beach, California 1990
- [Yam 66] Yamamoto C., McIlwain H., Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically defined media in vitro. J. Neurochem., 13: 1333, 1966

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Peter Fromherz für die herausfordernde Themenstellung und die Unterstützung während der gesamten Arbeit

Herrn Prof. Dr. Paul Tavan für die Übernahme des Zweitgutachtens

Herrn Manfred Herre vom MPI für biologische Kybernetik für die vielen Bandpässe

Bernt Müller, Volker Kießling und Karsten Kottig für die Cablos- und Adhesios-Chips

der Firma Siemens für den 2048-Transistoren-Chip

Helge Vogl für die Hilfsbereitschaft bei Reinraumfragen

Herrn Neusser, Herrn Wagner und Herrn Pabst für die Arbeiten an Apparatur und Zellkulturkammern

Wolfgang Emmert für die Hilfe mit der Elektronik

Markus Brenner und Martin Jenkner für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Siemens-Chip-Hirnschnitt-Projekt und fürs Korrekturlesen der Arbeit

Moritz Völker und Georg Wagner für das Korrekturlesen der Dissertation

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei der Abteilung Neurophysiologie des MPI für Neurobiologie und Herrn Dr. Tobias Bonhoeffer für die Hilfe mit den Hippocampusschnittkulturen. Der Dank gilt insbesondere Vilem Bulka für die Präparation der Schnitte und Volker Staiger für die wertvollen Tipps zu extrazellulären Ableitungen.

Die Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung.
