

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Membran- und Neurophysik

**Kopplung von
Halbleiterchips an organotypische Hirnschnitte:
Stimulation, Detektion und Modulation neuronaler Aktivität**

Michael Hutzler

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. Manfred Kleber
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief

Die Dissertation wurde am 03.08.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 11.10.2006 angenommen.

Zusammenfassung

Zwei wichtige Gehirnfunktionen sind die Repräsentation und Speicherung von Information.

Repräsentiert wird Information im Gehirn in Form von raumzeitlichen Mustern in der elektrischen Aktivität des neuronalen Netzes. Solche Muster konnten in dieser Arbeit detektiert werden, indem Hirnschnitte der Hippocampusregion der Ratte mit einem industriell gefertigten Siliziumchip gekoppelt wurden. 16384 Sensortransistoren auf einer Fläche von 1x1 mm erlaubten eine simultane Messung lokaler neuronaler Aktivität im Hirnschnitt, mit feiner räumlicher Abtastung ($7.8 \mu\text{m}$) und hoher zeitlicher Auflösung (2 kHz). Das Auslesen aller Transistoren des Multi-Transistor-Arrays (MTA) ergab ein dynamisches Abbild der Informationsübertragung im Hippocampus. Über pharmakologische Experimente konnten Messergebnisse und Anatomie des Hippocampus korreliert werden. Da auf dem MTA-Chip keine Möglichkeit zur Stimulation vorgesehen war, wurde durch Strominjektion über eine externe Mikroelektrode elektrische Aktivität im Hirngewebe ausgelöst.

Um eine Stimulation vom Chip aus zu ermöglichen, wurde ein eigener Chiptyp selbst entwickelt und hergestellt. Er bestand aus Arrays aus 12 Kondensatoren und 12 Transistoren und war mit TiO_2 beschichtet, um hohe Kapazitäten und eine Passivierung der Oberfläche zu erreichen. Der Eigenbauchip erlaubte erstmals sowohl eine kapazitive Stimulation der Hirnschnitte durch Anlegen definierter Spannungspulse an die Kondensatoren, als auch eine kapazitive Detektion der ausgelösten neuronalen Aktivität mit den Transistoren. Durch die kapazitive Kopplung wurde faradayscher Stromfluss vermieden und weder Chip noch Hirnschnitt durch elektrochemische Reaktionen beschädigt. Damit waren Langzeitmessungen durchführbar. Über die Arrays des Eigenbauchips war es möglich, den Hirnschnitt an verschiedenen Orten zu stimulieren und simultan dazu an verschiedenen Orten zu detektieren. Räumliche Abbildungen konnten gemessen werden. Die Stärke der elektrischen Aktivität des Hirnschnittes hing von der Amplitude der Reizspannung ab, die an den Kondensator angelegt wurde. Der experimentell gefundene Zusammenhang konnte mit einem einfachen theoretischen Modell mit hoher Präzision erklärt werden. Eine numerische Simulation beschrieb in erster Näherung die Orts- und Zeitabhängigkeit der elektrischen Aktivität. Um den Eigenbauchip einsetzen zu können, musste eine komplexe Sekundärelektronik aufgebaut werden, die über eine eigens entwickelte Software angesteuert wurde. Ein vollständiges Messsystem zur bidirektionalen kapazitiven Kopplung von Hirnschnitten an Halbleiterchips wurde damit realisiert.

Gespeichert wird Information im Gehirn durch Veränderung der Wirksamkeit der synaptischen Übertragung im neuronalen Netz. Das Aktivitätsmuster, das die Information repräsentiert, muss also selbst auch die Modulation der Wirksamkeit der synaptischen Übertragung auslösen, wenn diese Information gespeichert werden soll. Über die Kondensatorarrays des Eigenbauchips wurde der Hirnschnitt mit solchen Mustern stimuliert. Chipgesteuert konnten dadurch selektiv bis zu zwei Informationseinheiten im neuronalen Netz des Hirnschnittes gespeichert, abgerufen und wieder gelöscht werden.

Abstract

Two important brain functions are representation and storage of information.

Information is *represented* in the brain in terms of spatiotemporal patterns in the electrical activity of the neuronal network. It was possible to detect such patterns in this work by coupling brain slices of the hippocampus region of the rat with an industrially manufactured silicon chip. 16384 sensor transistors on an area of 1x1 mm allowed a simultaneous measurement of local neuronal activity in the brain slice with narrow spatial sampling ($7.8 \mu\text{m}$) and high temporal resolution (2 kHz). By reading out all transistors of the Multi-Transistor-Array (MTA) a dynamical map of information transmission in the hippocampus was obtained. Pharmacological experiments were performed to correlate measured results with hippocampus anatomy. Since the MTA-chip did not provide means for stimulation, electrical activity in brain tissue was evoked by current injection using an external microelectrode.

To enable stimulation by chip, a special type of chip was self-developed and made. It consisted of arrays of 12 capacitors and 12 transistors and was coated with TiO_2 to obtain high capacitances and a passivation of the surface. The self-made chip allowed a capacitive stimulation of brain slices by applying defined voltage pulses to the capacitors as well as a capacitive detection of evoked neuronal activity with the transistors. Capacitive coupling avoided faradatic current flow and neither chip nor brain slice were damaged by electrochemical reactions. Therefore long-term measurements were possible. The arrays on the chip allowed a stimulation of the brain slice at different locations and a simultaneous recording at different locations. It was possible to measure spatial mappings. The intensity of the electrical activity of the brain slice depended on the amplitude of stimulation voltage applied to the capacitor. The experimental relation was rationalized with a simple theoretical model with high accuracy. A numerical simulation described the space- and time-dependence of electrical activity as a first approximation. To utilize the self-made chip a complex electronic setup had to be built, controlled with a specially developed software. A complete system for a bidirectional capacitive coupling of brain slices with semiconductor chips was implemented.

Information is *stored* in the brain by changing the efficacy of synaptic transmission in the neuronal network. The activity pattern representing the information must by itself also trigger the modulation of efficacy of synaptic transmission if this information is to be stored. Using the capacitor arrays of the self-made chip the brain slice was stimulated with such patterns. Two units of information could be selectively stored, recalled and deleted in the neuronal network of the brain slice under chip control.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Modellsystem	1
1.2	Aktor- und Sensormethoden	2
2	Materialien und Methoden	5
2.1	Hippocampus	5
2.1.1	Anatomie und Funktion	5
2.1.2	Synaptische Plastizität	8
2.1.3	Gewebekultur	13
2.2	Eigenbauchip	15
2.2.1	Entwicklung	15
2.2.2	Funktionstest	17
2.2.3	Messmethodik	20
2.3	Multi-Transistor-Array Chip	26
2.4	Konventionelle Elektrophysiologie	28
2.4.1	Stimulation mit Wolframelektroden	28
2.4.2	Detektion mit Mikroelektroden	28
3	Theorie der Feldpotentiale	29
3.1	Volumenleitermodelle	30
3.1.1	Mikroskopisches Modell	30
3.1.2	Makroskopisches Modell und Current-Source-Density	32
3.2	Schichtleitermodell	38
3.2.1	Feldpotential generiert durch neuronale Stromquellen	38
3.2.2	Feldpotential generiert durch externe Stromquellen	40
3.2.3	Input-Output-Relation	46
3.3	Simulation: 1D-Modell eines Einzelneurons im Hirnschnitt	49
3.3.1	Ziel und Konzept	49
3.3.2	Vom biologischen zum mathematischen Modell	49
3.3.3	Parameter und synaptische Leitfähigkeit	50
3.3.4	Methode zur numerischen Lösung des mathematischen Modells	53

4 Resultate und Diskussion	55
4.1 Kapazitive Kopplung Hirnschnitt – Chip	55
4.1.1 Chip – Hirnschnitt – Chip Schleife	55
4.1.2 Methodenvergleich: EOS-Kondensator – Wolframelektrode EOS-Transistor – Mikroelektrode	60
4.1.3 Transmembranspannung eines CA1-Neurons bei präsynaptischer kapazitiver Stimulation	62
4.2 Räumliche Abbildung neuronaler Aktivität – Eigenbauchip	63
4.2.1 Abbildung $1 \mapsto (4, 3)$	63
4.2.2 Abbildung $(4, 3) \mapsto 1$	65
4.2.3 Abbildung $(1, 3) \mapsto (1, 3)$	66
4.3 Räumliche Abbildung neuronaler Aktivität – MTA-Chip	69
4.3.1 Methodenvergleich: EOMOS-Transistor – Mikroelektrode	69
4.3.2 Zweidimensionale Abbildung $1 \mapsto (128, 128)$	71
4.3.3 Eindimensionale Abbildung: Feldpotentialprofil	74
4.3.4 Nulldimensionale Abbildung $1 \mapsto 1$: Vergleich lokaler Feldpotentiale . .	75
4.3.5 Vergleich simuliertes – gemessenes Feldpotentialprofil	76
4.4 Input-Output-Relation	80
4.4.1 Messung mit großer Schrittweite	80
4.4.2 Messungen mit kleiner Schrittweite	84
4.5 Chipinduziertes Lernen: LTP und LTD	90
4.5.1 Zunahme der Feldpotentialamplitude nach hochfrequenter Stimulation	90
4.5.2 Zunahme der Feldpotentialamplitude ist Langzeitpotenzierung (LTP)	92
4.5.3 LTP- und LTD-Induktion (1-BIT memory)	95
4.5.4 LTP-Induktion über zwei unabhängige Kondensatoren	99
4.5.5 LTP- und LTD-Induktion über zwei unabhängige Kondensatoren (2-BIT memory)	101
4.6 Fazit	103
A Eigenbauchip	105
A.1 Prozessierung	105
A.2 Elektronik und Software zur Ansteuerung	107
B Zellkultur	109
B.1 Lösungen	109
B.2 Geräte und Material	110
C Theorie	111
C.1 Näherung der inversen Besselfunktionen	111

C.2	Ableitung der Differentialgleichungen zur Simulation	112
C.3	Randbedingungen	113

Kapitel 1

Einführung

In der Science Fiction Literatur sind biokybernetische Wesen ein beliebtes Thema. Zentrales Element dieser Phantasie ist oft ein *neuroelektronisches Interface*, über das das Gehirn des Wesens in direktem Kontakt mit einem Computer steht und Informationen austauschen, sowie seine kybernetischen Gliedmaße (*Neuroprothesen*) steuern kann.

Verlässt man den Bereich der Fiktion und fragt nach wissenschaftlichen Anwendungen, so könnte ein derartiges neuroelektronisches Interface auch als *biophysikalische Sonde* verwendet werden. Damit könnte untersucht werden, wie Information im Gehirn repräsentiert, verarbeitet und gespeichert wird [Csic 03]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wäre ein *Neurocomputer*, der nicht elektronische Bauelemente, sondern Gehirngewebe zur Informationsverarbeitung nutzt.

In dieser Arbeit soll in Form eines selbst entwickelten Halbleiterchips (Abb. 1.1) ein einfaches neuroelektronisches Interface hergestellt und als biophysikalische Sonde eingesetzt werden.

Um ein neuroelektronisches Interface zu entwickeln, muss eine geeignete Aktor-/Sensormethode auf ein biologisches Modellsystem des Gehirns angewendet werden.

1.1 Modellsystem

Das Modellsystem sollte einen Kompromiss aus Systemkomplexität (definiert als die Anzahl möglicher Verbindungen der Elemente eines Systems) und Realitätsnähe (definiert als Abweichung des Systems vom tatsächlichen neuronalen Netzwerk des Gehirns) darstellen.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von dissoziierten Nervenzellen sind inzwischen gut verstanden. Das nächst komplexere aber auch realistischere System sind kleine, künstlich definierte Netzwerke aus Einzelneuronen oder planare Schnitte aus natürlichem Hirngewebe. Hier hofft man die bei Einzelzellen nicht auftretenden Eigenschaften von Netzwerken untersuchen zu können [Grin 04], die die eigentliche Komplexität des Gehirns ausmachen.



Abbildung 1.1: Neuroelektronisches Interface. Über den Eigenbauchip ist sowohl eine Stimulation (S) als auch eine Detektion (D) neuronaler Aktivität in einem Hirnschnitt möglich.

Die Elektrophysiologie des dreidimensionalen neuronalen Netzwerks des intakten Gehirns ist noch weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit werden deshalb planare Hirnschnitte der Hippocampusregion der Ratte als Modellsystem verwendet.

Warum der Hippocampus? Im Vergleich zu anderen Gehirnarealen ist der Hippocampus stark strukturiert. Aufgrund seines schichtartigen Aufbaues werden bei einem geeignet durchgeführten Schnitt die wesentlichen neuronalen Verbindungen nicht durchtrennt. Derartige Hirnschnitte sind aus Neuronen mit zueinander parallel ausgerichteten Dendritenbäumen aufgebaut. Bereiche, in denen die Zellkörper liegen, sind räumlich klar von den Regionen getrennt, in denen die Dendritenbäume auftreten. Diese Eigenschaften sind die Ursache für die Mess- und Modellierbarkeit von *Feldpotentials*, der extrazellulären elektrischen Aktivität solcher Schnitte. Sie ermöglichen außerdem die mikroskopische Identifikation unterschiedlicher Bereiche des Gehirngewebes. Planare Hirnschnitte können leicht an planare Interfacestrukturen gekoppelt werden. Von besonderem neurobiologischen Interesse ist der Hippocampus, da er zum Einen für einige Formen des Lernens verantwortlich ist, zum Anderen eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie Epilepsie und Alzheimer spielt.

Was sind organotypische Kulturen? Durch das Schneiden des Hippocampus in Scheiben (*akute* Schnitte) entsteht in der Schnittebene eine Schicht toter Zellen, die den elektrischen Kontakt lebender Zellen zum Aktor/Sensor verschlechtert [Heus 02]. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Hirnschnitte einer einwöchigen Kultivierungsprozedur [Gahw 81] unterzogen, wodurch die Mehrheit beschädigter bzw. toter Zellen abgebaut und der elektrische Kontakt zum Aktor/Sensor verbessert wird. Sauerstoff und die Nährstoffe des Kulturmediums können in ausreichendem Maße in die dünnen Hirnschnitte diffundieren und deren Zellen für einige Wochen *in vitro* am Leben erhalten. Derart kultivierte Hirnschnitte sind *organotypisch*, d.h. die Zelltypen sowie deren intrinsische Verbindungen, sind auch nach der Kultivierung noch wie im intakten Gehirn erhalten [Gahw 81, Caes 91]. Die in dieser Arbeit verwendeten *organotypischen Hirnschnitte* sind also ein gutes planares Modellsystem der dreidimensionalen Gehirnstruktur.

1.2 Aktor- und Sensormethoden

Anforderungen Das zu untersuchende Modellsystem „Hirnschnitt des Hippocampus“ besitzt eine hohe Neuronendichte und eine relativ große räumliche Ausdehnung. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften ist ein Messsystem mit hoher Ortsauflösung und großer aktiver Fläche notwendig. Deswegen ist eine große Anzahl an Aktoren/Sensoren erforderlich, um letztlich in einzelnen, der sehr vielen Neuronen, Aktivität auslösen und beobachten zu können. Mit einem solchen System wäre es dann möglich, die lokalen neuronalen Netze zu verstehen, aus denen der Hirnschnitt aufgebaut ist. Deren elektrische Aktivität repräsentiert in Form von raumzeitlichen Mustern Information im Gehirn.

Es ist also ein *hochauflösendes, biokompatibles Multi-Site Stimulations- und Detektionssystem* notwendig. Biokompatibilität bedeutet zum Einen, dass der mit den Zellen in Kontakt stehende Aktor/Sensor den Metabolismus, die Morphologie sowie die Entwicklung der Zellen und deren Verbindungen nicht oder nur wenig stört. Zum Anderen darf der Aktor/Sensor selbst durch die Umgebungsbedingungen (wässrige Lösung, Gewebekultur) in seiner Funktion nicht beeinträchtigt werden. Solche nichtinvasiven Methoden sind insbesondere für Langzeitstudien wichtig. Es werden nun einige in Frage kommenden Methoden vorgestellt:

Mikroelektroden Mikroelektroden bestehen aus spitzen Glaspipetten, die mit Elektrolytlösung befüllt und über einen Metalldraht elektrisch kontaktiert werden können. Über intrazellulär platzierte Mikroelektroden kann die Aktivität einzelner Neurone zuverlässig ausgelöst und beobachtet werden. Diese klassische Methode ist aber bei größeren Netzwerken aus vielen Neuronen nicht mehr praktikabel, d.h. die Forderung nach hoher Auflösung ist nicht zu erfüllen. Die Ensemble-Aktivität eines solchen Netzwerks (Feldpotential) kann über extrazellulär platzierte Mikroelektroden aufgenommen werden. In beiden Fällen werden Neurone bzw. neuronales Gewebe mit Elektroden penetriert, es handelt sich um eine sehr invasive Messmethode.

Farbstoffe Die mechanische Schädigung der Neuronen kann vermieden werden, indem man spannungsabhängige Farbstoffe zur Detektion neuronaler Aktivität verwendet [Grin 82, Bonh 89, Naka 97, Seki 97, Tomi 00, Grin 04]. Diese Methode bietet zwar eine sehr gute räumliche und zeitliche Auflösung neuronaler Aktivität, aber die Zellen werden hier durch den Farbstoff chemisch geschädigt (Phototoxizität), und die elektrophysiologischen Eigenschaften können sich ändern [Tomi 00, Grin 04]. Langzeitstudien werden außerdem durch Auswaschen und Bleichen des Farbstoffs erschwert [Tomi 00]. Weitere Probleme dieser Methode sind das mäßige Signal/Rausch-Verhältnis [Grin 04] sowie die Schwierigkeit einer Stimulation.

Multi-Elektroden-Arrays Mit planaren Multi-Elektroden-Arrays (MEAs) ist eine simultane Stimulation und Detektion extrazellulärer neuronaler Aktivität an mehreren Orten möglich [Jobl 81, Nova 88, Stop 97, Eger 98, Jahn 99, Oka 99, Thie 99, Dupo 99, Ghol 01, Heus 02, Berg 03]. Es handelt sich hierbei um eine gering invasive Methode, da das neuronale Gewebe lokal nicht durch spitze Mikroelektroden verdrängt oder zerstört wird. Nur die chemisch und topographisch inhomogene Oberfläche könnte das Gewebe beeinflussen. Problematisch ist die geringe Anzahl (9-64) an Sensoren, sowie deren großer räumlicher Abstand von 100-200 μm . Die Stimulation und Detektion erfolgt dominant über ohmsche Kopplung. Der damit einhergehende faradaysche Stromfluss basiert auf Redoxreaktionen an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt. Dadurch werden toxische Reaktionsprodukte im Elektrolyt erzeugt und die Elektrode kann korrodieren. Dies erschwert Langzeitmessungen. Die mit MEAs extrazellulär gemessenen Feldpotentialamplituden sind in den meisten Fällen wesentlich kleiner als die extrazellulär platzierte Mikroelektroden (Referenzmethode). Dies erschwert eine Interpretation der Messdaten, der Ursprung dieser Diskrepanz ist unbekannt.

Siliziumchips Ein großer Teil der Probleme der oben beschriebenen Verfahren lässt sich beheben, indem etablierte Methoden der planaren Silizium-Halbleitertechnologie auf die planaren Hirnschnittstrukturen angewendet werden [From 03]. Mit dieser Technologie ist eine extreme Miniaturisierung der Aktoren/Sensoren sowie deren Integration mit Sekundärelektronik wie z.B. Verstärkern auf einem Chip möglich, was besonders für *in vivo*-Anwendungen wichtig ist. Ein neuroelektronisches Interface im Sinne der Einleitung scheint mit dieser Technologie möglich zu sein:

Mittels linearer Arrays aus Elektrolyt-Oxid-Silizium-Feld-Effekt-Transistoren (EOSFETs) kann neuronale Aktivität organotypischer Hirnschnitte rein kapazitiv an 16 Positionen alle 4.6 μm detektiert werden [Besl 02, From 03]. Der Platzbedarf für die Zuleitungen erlaubt bei dieser Technologie jedoch keine hochaufgelöste zweidimensionale Detektion. Das Problem wurde gelöst, indem ein neuartiger Chiptyp entwickelt und über CMOS-Fertigungstechnologie hergestellt wurde [Ever 03, Lamb 04]. Die Detektionsstrukturen des Chips bestehen aus Elektrolyt-Oxid-Metall-Oxid-Silizium-Feld-Effekt-Transistoren (EOMOSFETs). Ein solcher Multi-Transistor-Array (MTA)-Chip besteht aus 128x128 Transistoren auf 1 mm^2 mit einem

Abstand der Sensorpunkte von $7.8 \mu\text{m}$. Diese hohe Ortsauflösung wird in der vorliegenden Arbeit zur hochauflösenden Detektion neuronaler Aktivität organotypischer Hirnschnitte ausgenutzt. Die Chipoberfläche ist hier im Gegensatz zu MEAs chemisch homogen und inert.

Mit den bisher beschriebenen Siliziumchips ist keine kapazitive Stimulation neuronaler Aktivität möglich. Wie in [Hutz 03] gezeigt, können durch Abgabe definierter Spannungspulse an einen EOS-Kondensator, dessen Dielektrikum aus TiO_2 besteht, organotypische Hirnschnitte kapazitiv stimuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wird ein Chip entwickelt, der über EOS-Kondensatoren sowohl eine *kapazitive Stimulation* als auch über EOS-Transistoren eine *kapazitive Detektion* elektrischer Aktivität in organotypischen Hirnschnitten ermöglicht (Abb. 1.1). Ein hybrides System aus Halbleiterchip und Gehirngewebe wird realisiert - ein *neuroelektronisches Interface*.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

Das biologische Modellsystem Hippocampus wird beschrieben, sowie dessen Fähigkeit zur Modulation seiner elektrischen Aktivität. Die verschiedenen verwendeten Methoden und Instrumente zur Stimulation, Detektion und Modulation neuronaler Feldpotentiale werden vorgestellt.

2.1 Hippocampus

Eine schematische, dreidimensionale Ansicht des Gehirns einer Ratte ist in Abb. 2.1A gezeigt. Ein beträchtlicher Anteil des Gehirnvolumens wird durch den bananenförmigen Hippocampus gebildet, dessen anatomische und funktionale Struktur nun beschrieben wird [Ande 71, Amar 89, Ishi 90, John 98, Ande 00]. Bei Tieren scheint der Hippocampus eine besondere Rolle bei der Speicherung räumlicher Orientierungspunkte zu spielen.

2.1.1 Anatomie und Funktion

2.1.1.1 Lamellare Organisation des Hippocampus

Der Hippocampus ist aus Schichten (Lamellen) aufgebaut, die entlang seiner Längsachse übereinander gestapelt angeordnet sind. Die Neuronen *einer* Lamelle sind daher hauptsächlich mit Neuronen in *derselben* Lamelle verbunden [Ande 71, Ande 00]. Ein Schnitt senkrecht zur Längsachse (transversal) durchtrennt deshalb nur wenige intrinsische Verbindungen zwischen den Neuronen einer Schicht. Da eine Lamelle vermutlich eine funktionale Grundeinheit des Hippocampus bildet [Ande 00], sind transversale Schnitte, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, ein gutes Modell des gesamten Hippocampus.

2.1.1.2 Anatomische Organisation eines transversalen Schnittes

Ein solcher transversaler Schnitt ist aus mehreren bandförmigen Strukturen, sogenannten *strata* aufgebaut (Abb. 2.1B und C).

Der *gyrus dentatus* (Dentate Gyrus) besteht aus einem 4-6 Zellen breiten, C-förmigen Band, dem *stratum granulosum*. Die Körnerzellen darin haben einen Durchmesser von etwa 10 μm und sind sphärisch. Ihre Dendritenbäume sind monopolar, senkrecht nach außen gerichtet und bilden das *stratum moleculare* [John 98].

Die zweite C-förmige Struktur ist der sogenannte *CA-Bogen*, ein 3-6 Zellen breites Band, das *stratum pyramidale*. Die konstituierenden *Pyramidalzellen* sind bipolar, haben also sowohl

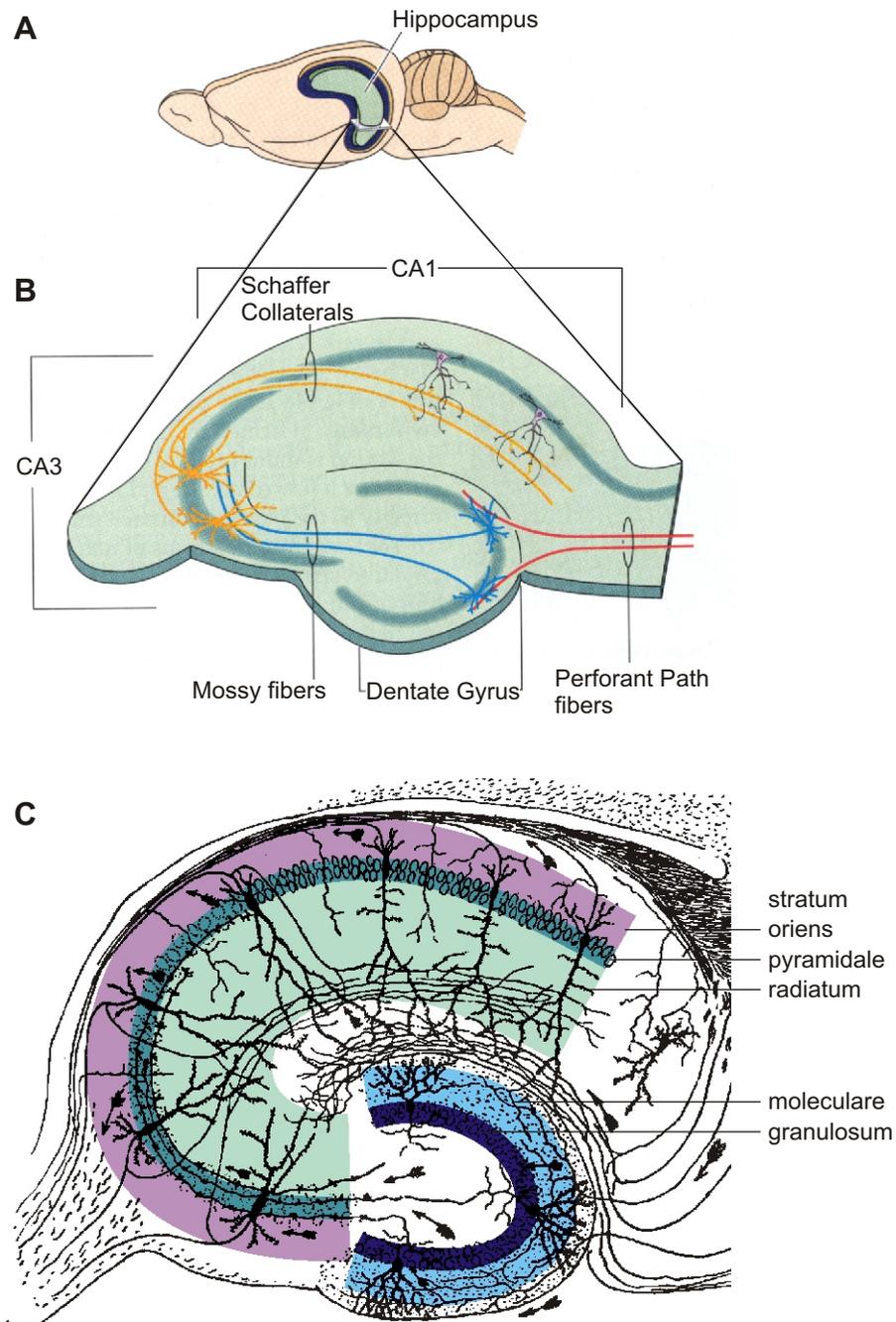


Abbildung 2.1: Der Hippocampus. (A) Lage des Hippocampus im Gehirn der Ratte. Gezeigt ist eine Seitenansicht, links ist vorne. (B) Schematische Darstellung eines transversalen Schnittes durch den Hippocampus. Gezeigt sind die Somaregionen von gyrus dentatus, CA3 und CA1 sowie deren wichtigste exzitatorische synaptische Verbindungen nach [Purv 97], modifiziert. (C) Zeichnung eines Golgi gefärbten Hippocampusschnittes nach [Caja 11]. Hervorgehoben sind die bandförmigen Strukturen des gyrus dentatus (stratum moleculare: hellblau, granulosum: blau) sowie des CA-Bogens (stratum radiatum: hellgrün, pyramidale: grün, oriens: lila).

einen apikalen (nach innen gerichteten) als auch basalen (nach außen gerichteten) Dendritenbaum senkrecht zur Zellschicht. Die längeren, apikalen Dendritenbäume bilden das *stratum radiatum*, die basalen das *stratum oriens*. Da sich die Pyramidalzellen entlang des CA-Bogens morphologisch voneinander unterscheiden, wird der Bogen in eine CA3- und CA1- Zone eingeteilt. Die dem gyrus dentatus nahe liegende Hälfte des CA-Bogens entspricht in etwa CA3 [John 98].

Die klare Abgrenzung in somatische und dendritische Bereiche, spiegelt sich in den optischen (Visualisierung der Strukturen) und elektrophysiologischen Eigenschaften (Ortsabhängigkeit der Feldpotentiale) der hippocampalen Hirnschnitte wieder.

2.1.1.3 Funktionale Organisation eines transversalen Schnittes

Die zu verarbeitenden Informationen erreichen den Hippocampus aus dem *enthorinalen Cortex* über die *perforant path fibers*, die im stratum moleculare Synapsen an die Neuronen des gyrus dentatus bilden [John 98].

Deren Axone, die *Moosfasern* (Mossy fibers), laufen im Anfangspunkt des CA-Bogens zusammen und breiten sich im stratum pyramidale von CA3 aus [Ande 71]. Sie bilden im Vorbeilaufen die synaptische Verknüpfung zwischen Körnerzellen und CA3-Neuronen. Der CA1-Bereich kann also von CA3 durch das Fehlen der Moosfasern unterschieden werden [John 98].

Die CA3-Neurone bilden ihrerseits myelinisierte Axone aus [Ande 71], die zunächst basal verlaufen, im Übergangsbereich CA3/CA1 durch den Bogen durchtreten und sich zu den *Schaffer Kollateralen* (Schaffer Collaterals) bündeln. Im stratum radiatum bilden sie im Vorbeilaufen schließlich exzitatorische Synapsen an die Dendritenbäume der CA1-Neuronen. Jedes Axon bildet Synapsen an viele CA1-Neuronen, wobei einzelne Neuronen dadurch aber nur über ein bis zwei Synapsen kontaktiert werden [Purv 97, John 98]. Die Schaffer Kollaterale aktivieren auch Interneurone im stratum radiatum, die inhibitorische Synapsen an die Dendritenbäume der Pyramidalzellen bilden [John 98].

Die Axone der CA1-Neuronen verlassen über die Außenseite des CA-Bogens den Hippocampus zu anderen Hirnregionen.

Die beschriebene Organisation des Hippocampus bleibt auch in organotypischen Schnittkulturen nach Gähwiler [Gahw 81] erhalten. Die Hauptzelltypen sowie der Verlauf deren intrinsischer Verbindungen sind wie in der *in vivo* Situation konserviert [Caes 91].

Den schrittweisen Transfer von Information über die drei synaptischen Hauptverbindungen im Hippocampus bezeichnet man als *trisynaptic pathway* [Ande 71]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich die monosynaptische Übertragung von CA3 zu CA1 beobachtet und moduliert.

2.1.1.4 Chemische synaptische Übertragung und Messgröße

Der dominierende inhibitorische Neurotransmitter im Hippocampus ist GABA¹, der GABA_A-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle für Cl⁻ öffnet [John 98]. Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter ist Glutamat, der z.B. über die Synapsen der Moosfasern oder der Schaffer Kollaterale ausgeschüttet wird [John 98]. Durch ihn werden in den Dendriten von CA3- und CA1-Neuronen AMPA²-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle für Na⁺ und K⁺ geöffnet, sowie NMDA³-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺.

¹GABA: γ -aminobutyric acid

²AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

³NMDA: N-methyl-D-aspartate

Durch die fließenden Ionen wird die Transmembranspannung der postsynaptischen Neurone für einige 10 ms depolarisiert. Diese intrazelluläre Depolarisation wird als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet. Die EPSPs einzelner Neurone sind mit der extrazellulären Detektionsmethode dieser Arbeit nicht direkt messbar. Überlagern sich aber die EPSPs einer Population von Neuronen, so entsteht extrazellulär ein **p**EPSP. Dieses pEPSP ist die wichtigste Signalform der Messgröße dieser Arbeit, dem Feldpotential. Im Theorieteil werden alle Komponenten des Feldpotentials ausführlich erklärt.

Die Leitfähigkeit der NMDA-Kanäle ist sowohl von der Membranspannung als auch von der extrazellulären Mg^{2+} Konzentration abhängig [Zado 90]. Diese Eigenschaft ist für eine spezielle Form *synaptischer Plastizität*, der Grundlage vieler Lernprozesse, essentiell.

2.1.2 Synaptische Plastizität

Die Fähigkeit eines Organismus, sich schnell an eine sich verändernde Umwelt anzupassen, ist ein wichtiges Selektionskriterium der Evolution. Organismen, die ein neuronales Netzwerk besitzen, das sich aufgrund äußerer Reize in gewissen Grenzen verändern lässt, haben daher einen evolutionären Vorteil. Im Hippocampus tritt eine bestimmte Art einer solchen neuronalen Plastizität auf: Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD).

2.1.2.1 Langzeitpotenzierung

Definition LTP ist eine lang anhaltende (>20 min bis zu Tagen), aktivitätsabhängige Zunahme der synaptischen Wirksamkeit [Capo 92, John 99] und wird häufig durch eine kurze (1 s), hochfrequente (100 Hz), präsynaptische Stimulation induziert. Bliss und Lømo beobachteten 1973 zum ersten Mal LTP im Hippocampus des Kaninchens [Blis 73].

In der *Induktionsphase* während oder kurz nach der Abgabe der induzierenden Pulsform wird LTP ausgelöst. Die eigentliche Zunahme der synaptischen Wirksamkeit, in Form einer stärkeren Depolarisierung durch ein zunehmendes EPSP, findet in der *Expressionsphase* statt. Daraus resultiert ein Anstieg der Feldpotentialamplitude, sodass LTP durch Vergleich der Feldpotentiale vor und nach Abgabe der induzierenden Pulsform nachgewiesen werden kann [Blis 93].

Eigenschaften LTP hat folgende wichtige Eigenschaften [Blis 93, John 99]:

1. Synapsenspezifität

LTP an den Schaffer-kollaterale-CA1 Synapsen ist *homosynaptisch*, d.h. nur diejenigen Synapsen werden potenziert, die auch durch die induzierende Pulsform stimuliert wurden. Diese Eigenschaft erhöht drastisch die pro Neuron speicherbare Informationsmenge. Würden auch andere (inaktive) Synapsen potenziert, so wäre LTP *heterosynaptisch*. Eine LTP-Induktion kann daher im postsynaptischen Neuron nur einen lokalen Effekt am Dendritenbaum haben, bei einer globalen Wirkung müsste LTP heterosynaptisch sein.

2. Sättigung

Durch wiederholte LTP-Induktion erreicht die Potenzierung einen *Sättigungswert*.

3. Kooperativität

Es muss eine noch unbekannte [Deba 96] Mindestanzahl an Axonen/Synapsen aktiviert werden, die *kooperativ* die Ausbildung von LTP bewirken. Es gibt daher auch eine kritische Stimulationsintensität. Wird diese unterschritten, so kann kein LTP erzeugt

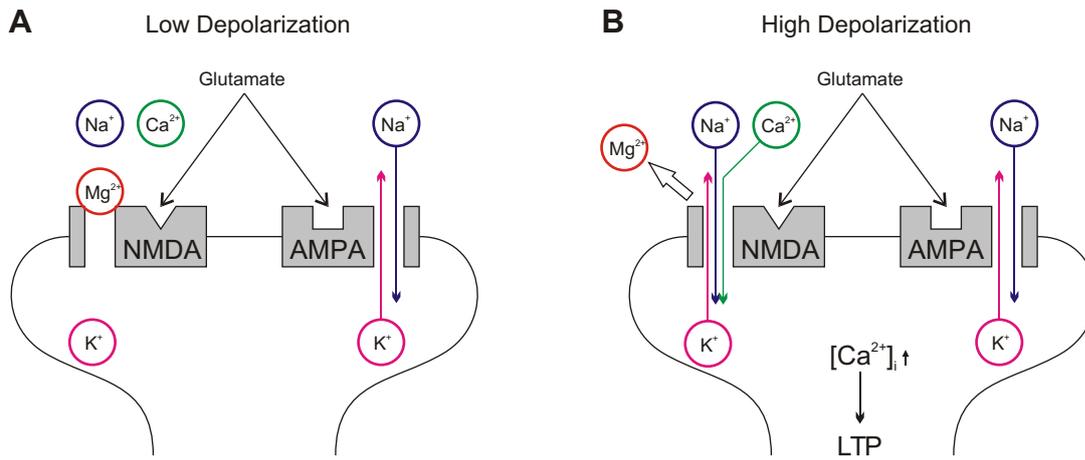


Abbildung 2.2: Ionenfluss durch die postsynaptische Membran bei schwacher und starker Depolarisation. Aufgrund präsynaptischer Stimulation wird Glutamat ausgeschüttet, das an AMPA- und NMDA-Rezeptoren bindet. Durch die AMPA-Kanäle fließen Na^+ sowie K^+ Ionen und depolarisieren die Membran. (A) Einfache präsynaptische Stimulation löst normale synaptische Aktivität mit schwacher Depolarisation aus. Hier bleiben die NMDA-Kanäle durch den spannungsabhängigen Mg^{2+} Block praktisch geschlossen. (B) Bei starker postsynaptischer Depolarisation (z.B. über mehrfache präsynaptische Stimulation) wird der Mg^{2+} Block der NMDA-Kanäle entfernt, die Kanäle werden leitend für Na^+ , K^+ sowie Ca^{2+} Ionen. Ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ist das Signal zur Bildung von LTP. Zeichnung basiert auf [John 98].

werden, was möglicherweise die Ursache für viele fehlgeschlagene LTP-Experimente in dieser Arbeit war.

4. Assoziativität

Eine Synapsengruppe A, die ein kleines EPSP im postsynaptischen Neuron bewirkt, kann potenziert werden, wenn sie wiederholt gleichzeitig mit einer Synapsengruppe B aktiv ist, die ein großes EPSP generiert.

Aus diesen experimentell bestimmten Eigenschaften kann folgende, für alle LTP-Formen allgemein gültige Bedingung abgeleitet werden:

Eine Synapse wird genau dann potenziert, wenn sie [wiederholt] zu einer Zeit aktiv ist, zu der der Bereich des Dendriten, den sie kontaktiert, hinreichend stark depolarisiert ist [Blis 93].

Die Synapse muss also einen *Koinzidenzdetektor* besitzen, der auf Gleichzeitigkeit präsynaptischer Aktivität und postsynaptischer Depolarisation mit der Initiierung von LTP reagieren kann. Auf molekularer Ebene übernimmt wahrscheinlich der NMDA-Rezeptor diese Detektorfunktion [Blis 93].

Induktionsphase und Rolle des NMDA-Rezeptors Der zum NMDA-Rezeptor gehörige Ionenkanal ist abhängig von der Membranspannung durch Mg^{2+} blockiert (Abb. 2.2A). Um den NMDA-Kanal zu öffnen, müssen simultan, also *koinzident*, zwei Ereignisse stattfinden [Blis 93]:

1. Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor, ausgeschüttet als Reaktion auf ein präsynaptisches Aktionspotential.
2. Lokal hinreichend starke Depolarisation der postsynaptischen Membran, um die Mg^{2+} Blockade aufzuheben.

Durch den geöffneten NMDA-Kanal können dann u.a. auch Ca^{2+} Ionen fließen, die das intrazelluläre Signal zur Expression von LTP bilden [Blis 93].

Einfache präsynaptische Stimulation induziert normale synaptische Übertragung
Bei jedem präsynaptischen Reiz wird ein Aktionspotential ausgelöst, das die Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt bewirkt, welches sowohl an AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren binden kann (Abb. 2.2A, Bedingung 1 erfüllt).

Durch das Glutamat werden AMPA-Kanäle geöffnet, die fließenden Na^+/K^+ Ionen depolarisieren das postsynaptische Neuron für die Dauer von einigen 10 ms. Die Depolarisation ist aber meist klein, sodass der spannungsabhängige Mg^{2+} Block der NMDA-Kanäle weitgehend erhalten bleibt und diese nur wenig und erst spät zum synaptischen Stromfluss beitragen (Bedingung 2 *nicht* erfüllt) [John 98, John 99]. Insbesondere fließen nur wenige Ca^{2+} Ionen ein.

Das EPSP wird bei einfacher Stimulation (z.B. alle 5-10 s) also hauptsächlich durch AMPA-Kanäle verursacht.

Mehrfach korrelierte prä- und postsynaptische Stimulation/Aktivität induziert LTP Information wird im Gehirn in Form raumzeitlicher Aktivitätsmuster repräsentiert. Um die Information auch zu speichern, muss deren zugehöriges Aktivitätsmuster selbst eine Veränderung der Verknüpfungen im neuronalen Netz verursachen. Auf zellulärer Ebene muss also der Aktivitätszustand der prä- und postsynaptischen Neuronen die Stärke ihrer synaptischen Verbindung beeinflussen können. Eine zeitlich korrelierte Aktivität führt zu einer Potenzierung, unkorrelierte Aktivität zu einer Depotenzierung [John 99].

In Abb. 2.3 sind drei verschiedene Stimulationsarten unterschieden, die über mehrfache Paarung präsynaptischer Aktivität und gleichzeitiger, starker, postsynaptischer Depolarisation den NMDA-Kanal öffnen und künstlich LTP induzieren können.

1. *Klassische Induktion (Abb. 2.3A):
Hochfrequenter, präsynaptischer Reiz*

LTP kann über eine hochfrequente, extrazelluläre Stimulation der Schaffer Kollaterale (=Gruppe präsynaptischer Axone), induziert werden. In der Literatur werden dazu verschiedenste Stimulationsmuster verwendet. Eine klassische Variante ist die Stimulation mit 100 Hz für 1 s, ein sogenannter *Tetanus* [Tomi 00].

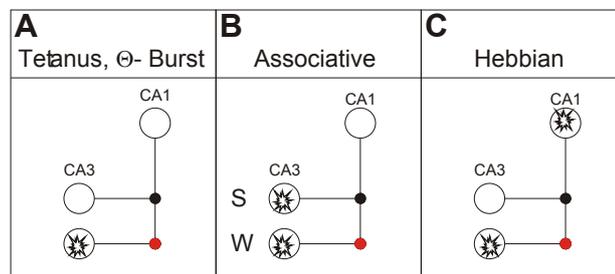


Abbildung 2.3: Vergleich LTP-induzierender Stimulationsarten. Schematisch gezeichnet sind CA3-Neurone, die über Schaffer Kollaterale CA1-Neurone kontaktieren. Die Synapsen, die aufgrund der Reize jeweils potenziert werden, sind rot hervorgehoben. (A) Klassische Induktion: hochfrequenter, präsynaptischer Reiz. (B) Assoziative Induktion: mehrfacher, synchroner, präsynaptischer Reiz zweier verschiedener Synapsengruppen. (C) Hebb-artige Induktion: mehrfacher, synchroner, prä- und postsynaptischer Reiz.

In dieser Arbeit wurde stattdessen eine komplexere Pulsform, ein sogenannter Θ -Burst verwendet [Capo 92]. Dazu wurden vier Stimuli mit je 10 ms Pause (also 100 Hz), in einem zeitlichen Abstand von 200 ms, 10x hintereinander abgegeben. Details der experimentellen Implementierung sind in Abb. 2.12 links auf Seite 23 gezeigt. Die Θ -Burst Induktion ist aus zweierlei Gründen dem Tetanus vorzuziehen: Zum Einen ist sie effektiver [Capo 92], da mit weniger Reizpulsen (40 vs. 100) eine ähnlich starke Potenzierung erreicht werden kann, zum Anderen zeigen hippocampale Neuronen ein ähnliches Aktivitätsmuster auch *in vivo*, womit diese Pulsform auch neurobiologisch sinnvoll ist.

Stimuliert man derart hochfrequent, so werden bei der 100 Hz Stimulation alle 10 ms EPSPs ausgelöst, die sich zeitlich konstruktiv überlagern und zu einer *starken Depolarisation* des postsynaptischen Neurons führen (Bedingung 2 auf Seite 9 erfüllt). Der spannungsabhängige Mg^{2+} Block der NMDA-Kanäle wird aufgehoben, sie werden leitend und tragen nun wesentlich zum synaptischen Stromfluss bei [John 98, John 99] (Abb. 2.2B). Insbesondere fließen signifikante Mengen an Ca^{2+} Ionen ein, was ein intrazelluläres Signal zur Ausbildung von LTP darstellt.

2. Assoziative Induktion (Abb. 2.3B):

Mehrfacher, synchroner, präsynaptischer Reiz zweier verschiedener Synapsengruppen

Zwei Elektroden stimulieren präsynaptisch und extrazellulär die Schaffer Kollaterale. Über eine der Elektroden (W) wird nur ein kleines EPSP im postsynaptischen CA1-Neuron ausgelöst, die zweite Elektrode (S) depolarisiert über ein großes EPSP das Neuron stark. Wenn die beiden Elektroden verschiedene Synapsen aktivieren, so führt eine mehrfache, gleichzeitige Reizung über W und S (Induktionsphase) zu einer Potenzierung des durch W hervorgerufenen EPSPs [Barr 83, Lin 03]. Das Feldpotential nimmt entsprechend zu.

Die „Helfer“-Elektrode S sorgt hier also für eine starke Depolarisation des postsynaptischen Neurons, die Elektrode W bewirkt die Ausschüttung von Glutamat zu den NMDA-Kanälen der durch W aktivierten Synapsen. Bei mehrfacher Wiederholung (100x) sind wiederum die Voraussetzungen zur Bildung von LTP erfüllt. Nur wenn die Stimulationen W und S in einem Zeitfenster von einigen 10 ms hintereinander erfolgen, ist eine Potenzierung zu beobachten [Lin 03]. Assoziativ induziertes LTP wurde schon in [Lee 83] beobachtet, jedoch erst in [Barr 83] als solches klar identifiziert.

Auf zellulärer Ebene ähnelt dieses Lernmuster der Pavlovschen Konditionierung auf Verhaltensebene.

3. Hebb-artige Induktion (Abb. 2.3C):

Mehrfacher, synchroner, prä- und postsynaptischer Reiz

Die folgende Liste sortiert einige Hebb-artige LTP-Induktionsformen nach dem Stimulationsort (prä–postsynaptisch). Der zeitliche Überlapp von präsynaptischer Stimulation und postsynaptischer Depolarisation bestimmt dabei den Grad der Potenzierung bzw. LTP-Expression [Gust 87, Lin 03].

(a) Extrazellulär-Intrazellulär

Ein CA1-Neuron eines Hirnschnittes wird über eine Mikroelektrode angestochen und über einen langen Zeitraum stark depolarisiert (50-100 ms, 2-5 nA). Wird über eine Wolframelektrode synchron dazu (z.B. 10 ms nach Beginn der Depolarisation), extrazellulär in den Schaffer Kollateralen, mehrfach (20-30x) ein präsynaptisches Aktionspotential ausgelöst, so beobachtet man mit der Mikroelektrode eine Potenzierung des EPSPs [Gust 87, Bonh 89].

Bei assoziativem LTP wird die zur Bildung von LTP notwendige, starke Depolarisation über eine Synapsengruppe (S) bewirkt. Hier wird dies durch künstliche Strominjektion über die Mikroelektrode realisiert.

(b) Intrazellulär-Intrazellulär

In kleinen Netzwerken aus dissoziierten Zellen kann durch wiederholt über Mikroelektroden intrazellulär ausgelöste prä- und postsynaptische Aktionspotentiale eine Potenzierung der verbindenden Synapsen bewirkt werden [Tao 00].

(c) Extrazellulär-Extrazellulär

Stimuliert man mehrfach präsynaptisch die Schaffer Kollaterale extrazellulär und synchron dazu postsynaptisch CA1-Neurone/Axone extrazellulär, so führt dies in Hippocampuschnitten *nicht* zu einer Potenzierung des pEPSPs [Lee 83, Jest 95]. Da über die Kondensatoren der Chips extrazellulär gereizt wird, ist eine erfolgreiche Hebb-artige LTP-Induktion über Chips nicht wahrscheinlich.

Sowohl bei klassischer, als auch bei assoziativer oder Hebb'scher Induktion von LTP muss die synchrone prä- und postsynaptische Aktivität *mehrfach* hintereinander auftreten. Dies könnte die molekulare Ursache für die Gültigkeit der Redewendung „*Repetitio est mater studiorum*“ sein.

Expressionsphase Das intrazelluläre Ca^{2+} Signal zur Expression von LTP löst eine noch ungeklärte biochemische Reaktionskaskade aus, deren Ergebnis die Verstärkung der synaptischen Übertragung ist. Welche Modifikationen an der Synapse könnten dies leisten und würden eine Zunahme der Amplitude des EPSPs (und damit auch des Feldpotentials) bewirken [Blis 93]?

1. Präsynaptische Modifikationen über einen retrograden Botenstoff, die zu einer Vergrößerung der pro Aktionspotential ausgeschütteten Glutamatmenge führen.
2. Postsynaptische Modifikationen, wie z.B. eine zunehmende Anzahl von Ionenkanälen (Genexpression) oder eine Änderung ihrer funktionalen Eigenschaften (z.B. Leitfähigkeit).
3. Extrasynaptische Veränderungen, wie z.B. eine reduzierte Aufnahme von Glutamat durch Gliazellen, was zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Glutamat an den Rezeptoren führt.
4. Morphologische Veränderungen der Synapsen z.B. Spinewachstum.

2.1.2.2 Langzeitdepression

Definition LTD ist eine lang anhaltende, aktivitätsabhängige Abnahme der synaptischen Wirksamkeit (EPSP-Amplitude) [John 99], die über eine abnehmende Feldpotentialamplitude festgestellt werden kann. LTD ist wesentlich weniger erforscht als LTP, wurde aber schon früh als dazu komplementärer, essentieller Mechanismus zur Reduzierung der synaptischen Wirksamkeit postuliert. In einem synaptischen Netzwerk endlicher Größe ist die Speicherung neuer Information nur möglich, wenn sowohl Mechanismen zur Stärkung (z.B. LTP) als auch zur Schwächung (z.B. LTD) der synaptischen Übertragung zur Verfügung stehen [Purv 97].

Eigenschaften LTD an Schaffer Kollaterale-CA1 Synapsen ist wie LTP *synapsenspezifisch* also *homosynaptisch*, *reversibel* und zeigt ein *Sättigungsverhalten* [Bear 96].

Induktionsphase LTD kann durch niederfrequente, präsynaptische Stimulation der Schaffer Kollaterale (3 Hz, 3 min) extrazellulär hervorgerufen werden [Teyl 99]. Ein solches Induktionsmuster wurde in dieser Arbeit verwendet. Details der experimentellen Implementierung sind in Abb. 2.12 rechts auf Seite 23 gezeigt. Es ist auch möglich, durch mehrfach asynchrone prä- und postsynaptische Stimulation/Aktivität LTD zu induzieren [John 99].

Es ist noch unklar, ob die Induktionsphase von LTD analog zu LTP ebenfalls vom NMDA-Kanal abhängig ist oder nicht [Bear 96, Anwy 06]. Falls ja, könnte die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration bestimmen, ob LTP oder LTD ausgebildet wird: Bei LTD-Induktion (z.B. niederfrequente Stimulation) fließt wenig Ca^{2+} in die postsynaptische Zelle, bei LTP-Induktion (z.B. hochfrequente Stimulation) viel [Teyl 99]. Der regulatorische biochemische Mechanismus, der damit die Expressionsphase von LTP oder LTD steuert, ist noch ungeklärt [John 99, Teyl 99].

2.1.3 Gewebekultur

Die Herstellung organotypischer Hippocampusschnitte auf Siliziumchips folgte im wesentlichen etablierten Verfahren [Gahw 81, Deba 96, Besl 02]. Der primäre Zweck der Kultivierungsprozedur war der Abbau der durch den Schneidevorgang erzeugten Schicht toter Zellen, um den elektrischen Kontakt zum Chip zu verbessern und den Hirnschnitt auf dem Chip zu fixieren. Da die Gewebekulturen über einige Wochen physiologisch aktiv gehalten werden können, ist es möglich, über mehrere Tage verteilt zu messen, ohne jedes Mal neu präparieren zu müssen - ein wichtiger messtechnischer Vorteil.

Chipreinigung und Beschichtung Die Chipreinigung und auch die Kultivierung mussten unter streng sterilen Arbeitsbedingungen (Flowbox, Desinfektion) durchgeführt werden, um eine spätere Kontamination der Kulturen durch Bakterien oder Pilzbefall zu vermeiden. Vor jedem Kultivierungszyklus wurden Chip und Kulturkammer mit Reinigungsmittel und Wattestäbchen gründlich gesäubert und mit entionisiertem Wasser intensiv gespült. Dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt. Nach dem Trocknen wurden die Chips 30 min unter UV-Licht sterilisiert und dann 400 μl Poly-L-Lysin Lösung auf den Chip pipettiert, sodass die Chipoberfläche vollständig bedeckt war. Nach einer Einwirkzeit von 48 h wurden die Chips mit sterilisiertem, entionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Sie waren dann für die Präparation vorbereitet.

Präparation und Kultivierung nach Gähwiler Fünf bis sieben Tage alte Wistar Ratten wurden dekapitiert und deren Hippocampus mit einem McIlwain tissue chopper in transversale Scheiben von 400 μm Dicke geschnitten. Auf die Chipmitte wurden 5 μl Chicken Plasma pipettiert (MTA-Chip: 3 μl), mit einer Spatel der Schnitt in den Plasmotropfen übertragen und durch vorsichtiges Verschieben mit einer Pipettenspitze positioniert. Eine exakte, manuelle Platzierung der CA3- und CA1-Strukturen auf den Kondensator- und Transistorarrays war aufgrund der schlechten Sichtbarkeit und der geringen Größe der Strukturen schwierig. Im Falle des MTA-Chips wurde der Hirnschnitt im Plasmotropfen aufgrund kapillarer Kräfte zur Wand der engen Kammer gezogen, was eine mittige Platzierung des Schnittes auf dem Chip erschwerte. Die Gerinnungsreaktion wurde gestartet, indem 5 μl Thrombinlösung (MTA-Chip: 3 μl) zupipettiert wurde, die den Schnitt auf dem Chip immobilisierte. Nach 4 min wurde 1 ml Kulturmedium zugegeben, der Chip mit einem Gummiring, Deckel und Metallclip [Besl 02] verschlossen und in einen Rotationsbrutschrank eingespannt (34°C, 10 U/h). Drei Tage nach der Präparation wurden Mitosehemmer bis zu einer Konzentration von 10 μM zupipettiert. Einen Tag nach Zugabe wurde das Kulturmedium gewechselt, was nach einer Woche wiederholt wurde. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 bis 11 Tagen

im Brutschrank, wurden die Chips mit den Hirnschnitten zur Messung in entsprechende Sockel der Verstärker für Eigenbau- bzw. MTA-Chip eingesetzt. Über ein Perfusionssystem wurden sie sofort mit frischem Messmedium (nach [Deba 96], 32°C, 1 ml/min) versorgt.

Perfusionssystem Das Messmedium war in einem 0.5 l Vorratsbehälter über dem Versuchsaufbau gelagert und floss über einen Schlauch in einen Aluminiumblock, von wo aus es direkt in die Kulturkammer des Chips eingeleitet wurde. Im Aluminiumblock wurde das Medium auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Die Zuflussmenge konnte über einen medizinischen Tropfregler sehr präzise eingestellt werden. Über eine peristaltische Pumpe wurde das verbrauchte Medium aus der Kulturkammer wieder abgesaugt. Eine im 45° Winkel angeschliffene Kanüle saugte zu gleichen Teilen Luft und Medium ab und garantierte somit einen sehr stabilen Flüssigkeitsstand in der Kammer. Das Perfusionssystem mit Tropfregler war essentiell, um über lange Versuchsdauern hinweg stabile neuronale Signale zu erhalten.

Toxine In drei verschiedenen Experimentarten wurden dem Messmedium Toxine zugesetzt:

1. Um exzitatorische synaptische Übertragung zu blockieren, wurden dem Messmedium 50 μM des spezifischen NMDA-Antagonisten AP5 [Davi 82] sowie 50 μM des spezifischen AMPA-Antagonisten DNQX [Hono 88, Oka 99] zugegeben.
2. Langzeitpotenzierung wurde durch 50 μM AP5 verhindert [Lin 03].
3. Inhibitorische synaptische Übertragung durch Interneurone konnte mit 100 μM des GABA_A-Antagonisten Picrotoxin unterbunden werden [Lin 03].

Die Reversibilität der toxischen Wirkung konnte in allen Fällen durch 30-minütiges Auswaschen mit normalem Messmedium bestätigt werden.

Dicke der kultivierten Hirnschnitte Werden 400 μm dicke Hirnschnitte nach der Gähwiler Methode auf Glasplättchen kultiviert, so flachen diese laut [Gahw 81, Bonh 89] nach einer Kulturdauer von etwa 2 Wochen auf *eine* Zellschicht (Monolayer) ab. Bei der Kultivierung auf Siliziumchips weisen die Schnitte nach derselben Kulturmethode und -dauer jedoch eine Dicke von ca. 70 μm auf [Besl 02], was in etwa *vier* Zellschichten entspricht. Da aber wahrscheinlich nur die unterste Lage von Neuronen über den Chip *stimuliert* wird, ist die Monolayer-Annahme gerechtfertigt, die im weiteren Text an mehreren Stellen verwendet wird. Zum *detektierten* neuronalen Feldpotential tragen allerdings gewichtet Neuronen aller Schichten bei.

2.2 Eigenbauchip

Dieser Chiptyp wurde von mir entworfen und im abteilungsinternen Reinraum hergestellt.

2.2.1 Entwicklung

Die Modulation der Leitfähigkeit eines Halbleiters durch ein elektrisches Feld senkrecht zur Oberfläche des Halbleiters bezeichnet man als *Feldeffekt* [Pier 96]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt zur kapazitiven Detektion neuronaler Aktivität verwendet. Implementiert wurde dies über einen sogenannten Elektrolyt-Oxid-Silizium (EOS)-Feldeffekttransistor, dessen Grundstruktur einem Metall-Oxid-Silizium (MOS)-Feldeffekttransistor entspricht, wobei die Gatemetallisierung durch ein leitendes Elektrolytbad ersetzt wurde. Zur kapazitiven Stimulation neuronaler Aktivität wurden EOS-Kondensatoren verwendet.

2.2.1.1 Layout

Abb. 2.4 zeigt einen schematischen Querschnitt durch den Eigenbauchip. Die Kondensatoren sowie die Source und Drains der Transistoren wurden durch p-Dotierung von n-Silizium hergestellt. Der *passive* Teil der Chipoberfläche war mit einer 1000 nm dicken Schicht aus SiO_2 vom Elektrolytbad isoliert. Die Transistorgates waren mit 8 nm SiO_2 überzogen und bildeten zusammen mit den Kondensatoren die *aktiven* Strukturen. Mit Ausnahme der Bondkontakte war die gesamte Chipoberfläche mit 10 nm TiO_2 beschichtet, um hohe Kapazitäten und eine gute Passivierung der Chipoberfläche zu erreichen.

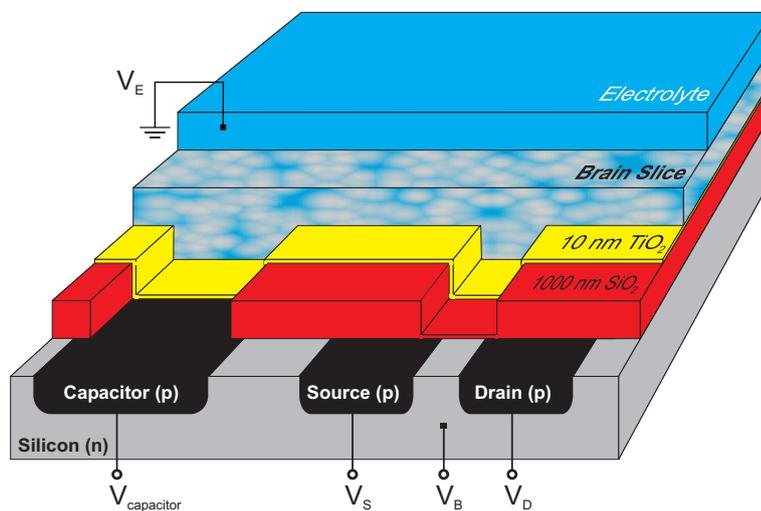


Abbildung 2.4: Schematische Ansicht des Eigenbauchips mit angelegten Spannungen und Hirnschnitt. Das n-Silizium Substrat war an den Orten der Zuleitungen, Kondensatoren sowie Source und Drains der Transistoren p-dotiert. Die Kondensatorkontakte waren mit 10 nm TiO_2 bedeckt, die Transistorgates (Bereich zwischen Source und Drain) mit 8 nm SiO_2 sowie 10 nm TiO_2 . Die passive Chipoberfläche war mit 1000 nm SiO_2 und 10 nm TiO_2 isoliert. Das Substrat (n-Si, Bulk), die Kondensatoren sowie die Source und Drains der Transistoren wurden auf definierten Spannungen bezüglich Elektrolytbad (Massepotential) gehalten. Das Schema ist nicht maßstabsgetreu.

Der Chip (Abb. 2.5A) hat eine Fläche von 12 mm x 12 mm und besteht aus einem 4x3 Array von EOS-Transistoren mit einem Mitte-Mitte Abstand von horizontal 220 μm und vertikal 130 μm sowie einem 4x3 Array aus EOS-Kondensatoren (Radius 50 μm) mit einem Mitte-Mitte-Abstand von horizontal 200 μm und vertikal 140 μm . Die Gatefläche der Transistoren wurde mit 78 μm x 10 μm vergleichsweise groß gewählt, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten [Besl 02]. Dieses Chiplayout ist auf die Anatomie von Hippocampuschnitten fünf bis sieben Tage alter Ratten ausgelegt und sollte sowohl eine Stimulation im CA3-Bereich über die Kondensatoren, als auch eine Detektion im CA1-Bereich über die Transistoren zulassen.

Die Verwendung von *Arrays* aus Transistoren bzw. Kondensatoren bringt mehrere Vorteile mit sich: Zum Einen eine gewisse Flexibilität, da eine exakte manuelle Platzierung der Hirnschnitte auf dem Chip schwierig ist und Größe und Form der Hippocampuschnitte variiert. Zum Anderen können damit räumliche Abbildungen von verschiedenen Stimulationsorten (z.B. in CA3) zu verschiedenen Detektionsorten (z.B. in CA1) untersucht werden.

2.2.1.2 Prozessierung

Um einen derartigen Chip herzustellen, waren vier verschiedene Lithographiemasken und 22 Prozessschritte nötig, die im Anhang A.1 gezeichnet (Abb. A.1) bzw. beschrieben sind.

Der fertig prozessierte Chip sowie weitere Komponenten des Eigenbauchips sind in Abb. 2.6 gezeichnet. Die Kulturkammer aus Plexiglas dient der Isolation und dem Schutz der Bondkontakte, ermöglicht aber gleichzeitig den direkten Kontakt der Sensorfläche mit dem Hirnschnitt im Kulturmedium. Eine mikroskopische Aufnahme der Kondensator- und Transistorarrays ist in Abb. 2.5A zu sehen. Das Layout ist sehr gut für die Untersuchung der CA3-CA1 Verbindung im Hippocampus geeignet. Es kann in CA3 stimuliert und in CA1 detektiert werden (Abb. 2.5B).

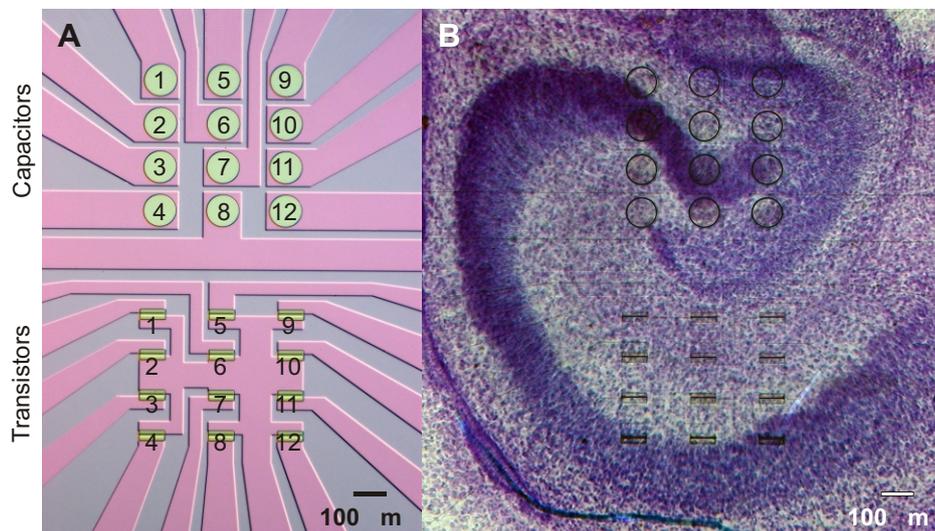


Abbildung 2.5: Eigenbauchip und kultivierter Hippocampuschnitt. (A) Mikroskopaufnahme des Zentrums des Eigenbauchips mit Arrays aus 12 Kondensatoren (oben) und 12 Transistoren (unten). Die verschiedenen reflektierten Farben zeigen die unterschiedlichen Bereiche des Chips (grau: n-Si Substrat, rosa: p-dotierte Zuleitungen, grün: dünnes Oxid über Kondensatoren und Transistorgates). (B) Mikroskopaufnahme eines Nissl-gefärbten Hirnschnittes (nach [Besl 02]) auf dem Eigenbauchip nach 10 Tagen in Kultur. Die Chipstruktur ist schwarz hervorgehoben. Das Chiplayout ist gut zur Untersuchung von Hippocampuschnitten geeignet.

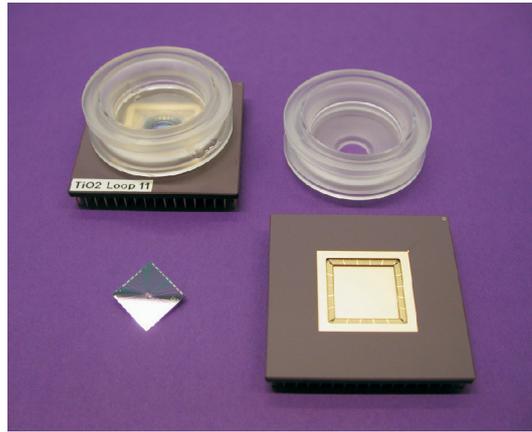


Abbildung 2.6: Die Komponenten des Eigenbauchips (l.o.). Der glänzende Chip (l.u.) wurde in einen Keramiksockel eingeklebt (r.u.), elektrisch kontaktiert und eine Kulturkammer (r.o.) befestigt.

2.2.2 Funktionstest

Bevor die Eigenbauchips mit Hirnschnitten gekoppelt und eine Messung versucht werden konnte, mussten die beiden aktiven Komponenten, Kondensator und Transistor, auf Funktion getestet werden.

2.2.2.1 Kondensatoren

Die Kondensatoren des Chips können durch ihren Radius a_0 sowie ihre spannungsabhängigen, flächenspezifischen Kapazitäten c_s und Leitfähigkeiten g_s charakterisiert werden. Bei Anlegen einer zeitabhängigen Spannung V_s fließt dann durch einen Kondensator der Strom:

$$I = a_0^2 \pi \left(c_s \frac{dV_s}{dt} + g_s V_s \right) \quad (2.1)$$

Der kapazitive Anteil des Stromflusses entsteht durch eine Umverteilung von Ionen im Elektrolyten, wohingegen der faradaysche Anteil auf Elektronen-Transfer-Reaktionen an der Grenzfläche Kondensator-Elektrolyt basiert, die den Kondensator korrodieren und toxische Substanzen im Elektrolytbad erzeugen. Um solche Redoxprozesse zu vermeiden, ist es wünschenswert, einen Kondensator mit hoher Kapazität und niedriger elektrochemischer Leitfähigkeit zu realisieren. Aus diesem Grunde wurden die p-dotierten Kontaktflächen des Chips mit 10 nm TiO_2 beschichtet, einem Material mit hoher Dielektrizitätskonstante [Wall 06].

Kapazität SiO_2 -beschichtete Kontakte mit $c_s \approx 0.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ waren *nicht* zur Stimulation kultivierter Hirnschnitte geeignet [Hutz 03]. Experimentell konnte die Kapazität der TiO_2 -Kondensatoren, aufgrund ihres kleinen Betrags und der Streukapazitäten in der Chipstruktur, nur ungenau zu spezifisch $c_s \approx 2.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ abgeschätzt werden [Messung C. Stangl]. Mit größeren Kondensatoren und einer stark vereinfachten Chipgeometrie wurde für 10 nm dickes TiO_2 ein zuverlässiger Wert von $c_s \approx 1.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gefunden [Wall 06]. Die spannungsabhängigen Kapazitäten der EOS-Kondensatoren können im relevanten Spannungsbereich (0-4.5 V) in erster Näherung durch diese konstanten Werte approximiert werden.

Leitfähigkeit Die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit $g_s(V_s)$ konnte mittels eines Potentiostaten bestimmt werden. Der faradaysche Stromfluss als Funktion der angelegten

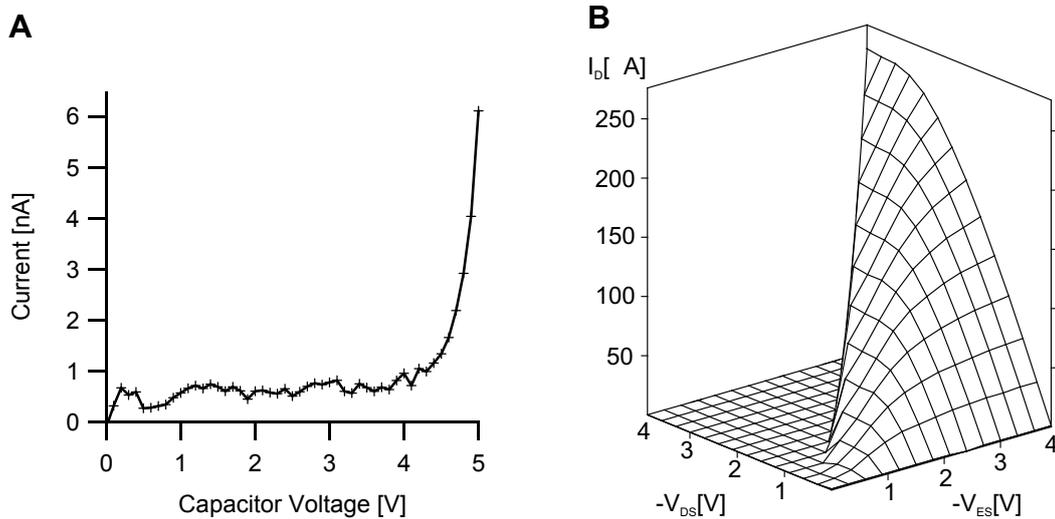


Abbildung 2.7: Charakterisierung der Kondensatoren und Transistoren. (A) DC-Stromfluss durch einen Kondensator als Funktion der angelegten Kondensatorspannung. (B) Transferkennlinienfeld $I_D(V_{ES}, V_{DS})$ eines TiO_2 -beschichteten Transistors eines Eigenbauchips.

Kondensatorspannung ist im Bereich 0-4.5 V kleiner als 1 nA ($g_s < 2.8 \mu\text{S}/\text{cm}^2$) und nimmt dann sehr stark zu (ein repräsentativer Kondensator in Abb. 2.7A). Die an die Kondensatoren anlegbare Spannung ist also auf etwa 4.5 V limitiert, wenn elektrochemische Reaktionen vermieden werden sollen.

Die Kondensatoren des Eigenbauchips (Radius $a_0 = 50 \mu\text{m}$) haben also die

$$\begin{aligned} \text{Gesamtkapazität} \quad C &= a_0^2 \pi c_s \approx 140 \text{ pF} \\ \text{Gesamtleitfähigkeit} \quad G &= a_0^2 \pi g_s \approx 220 \text{ pS.} \end{aligned}$$

2.2.2.2 Transistoren

In einem p-Kanal EOSFET wird der Stromfluss I_D von Source zu Drain über die Spannung V_{DS} zwischen Drain und Source sowie der Spannung V_{ES} zwischen Elektrolyt und Source gesteuert. Ein exemplarisches Transferkennlinienfeld $I_D(V_{ES}, V_{DS})$ eines TiO_2 -beschichteten Transistors eines Eigenbauchips ist in Abb. 2.7B gezeigt (0.3 V Schritte). Um das Eindringen von Kationen in das Gateoxid und damit eine Zunahme des Transistorrauschens, sowie kathodische Korrosion zu vermeiden, werden nur positive Spannungen relativ zum Elektrolytbad an den Chip angelegt: $V_S, V_B, V_D > V_E$. Die Bereiche des Kennlinienfelds die aufgrund der daraus folgenden Bedingung $V_{DS} > V_{ES}$ nicht zugänglich sind, wurden auf 0 gesetzt ($V_B = V_S$). Das Kennlinienfeld ähnelt dem von MOS-Feldeffekttransistoren, das in der Literatur detailliert beschrieben ist [Pier 96]. Die Transistoren auf den selbst prozessierten Chips waren also trotz TiO_2 -Beschichtung voll funktionsfähig.

2.2.2.3 Langzeitstabilität

Um den Eigenbauchip auch in Langzeitstudien (Messungen im Brutschrank) oder wiederholt über viele Kultivierungs- und Messzyklen verwenden zu können, dürfen sich die Chipparameter im Verlauf nicht wesentlich ändern.

Betrachten wir zunächst die Transistorseite. Rein SiO_2 -beschichtete Gates werden schon durch etwa zwei Kultivierungszyklen strukturell derart verändert, dass dies zum Defekt der Transistoren führt [Besl 02, Hutz 03]. Alle Kennlinien der in [Besl 02] prozessierten Transistoren waren nach spätestens 30 Tagen in Kultur fast völlig zusammengebrochen. Dieser Effekt wurde durch die neuartige TiO_2 -Beschichtung eliminiert. Die Kennlinie $I_D(V_{ES})$ eines derartigen Transistors ist in Abb. 2.8 für $V_{DS} \in \{0 \text{ V}, -0.8 \text{ V}, -1.6 \text{ V}, -2.4 \text{ V}, -3.2 \text{ V}\}$ gezeigt. Im Verlauf der mehrmonatigen Kultivierung ist keine signifikante Änderung der Steilheit oder der Schwellspannung zu erkennen. Die Transistoren bleiben funktionstüchtig.

Nun zu den Kondensatoren: Die kapazitive Kopplung der Stimulationsspannung an das Bad und damit die korrekte Funktion der Kondensatoren konnte bei jeder Messung anhand der Form des Stimulationsartefaktes gesehen werden. Um eine eventuelle Abnahme der Oxiddicke durch Korrosion der Kondensatoren feststellen und deren Qualität im Laufe der Kultivierungen bewerten zu können, wurden mehrfach Potentiostatmessungen von $g_s(V_s)$ durchgeführt. Eine signifikante Zunahme der Leitfähigkeit konnte aber nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Korrosion der Oxidschicht würde auch die Kennlinien der Transistoren verändern. Die Kondensatoren sind also ebenfalls langzeitstabil.

Die bei SiO_2 -beschichteten Chips optisch klar sichtbare Korrosion der Gate- und Kondensatorregionen unterbleibt. Aufgrund der Stabilität der TiO_2 -Beschichtung stellen die Eigenbauchips insgesamt eine signifikante Verbesserung gegenüber [Besl 02] dar und sind somit auch für Langzeitstudien gut geeignet.

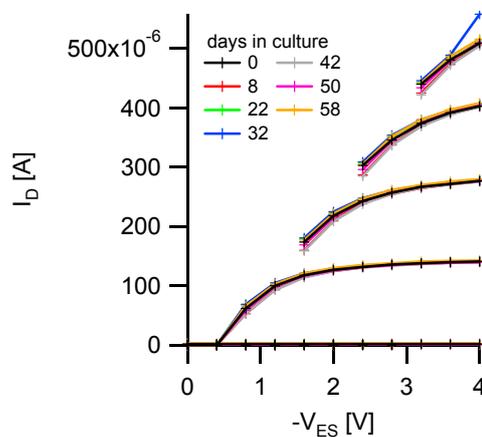


Abbildung 2.8: Kennlinien $I_D(V_{ES})$ eines TiO_2 -beschichteten Transistors für $V_{DS} \in \{0 \text{ V}, -0.8 \text{ V}, -1.6 \text{ V}, -2.4 \text{ V}, -3.2 \text{ V}\}$. Die Kennlinien verändern sich im Verlauf der Kultivierung nicht signifikant.

2.2.3 Messmethodik

Um mit dem Eigenbauchip neuronale Aktivität in Hippocampuschnitten messen zu können, musste eine umfangreiche, von Grund auf neue Hard- und Software (Abb. 2.9 und 2.10) entwickelt, aufgebaut und getestet werden.

Die beiden Komponenten kapazitive Stimulation und kapazitive Detektion des bidirektionalen Interfaces zwischen Hirnschnitt und Halbleiterchip werden nun besprochen, sowie die experimentellen Methoden zur Aufnahme von Input-Output-Relationen und zur Induktion von LTP/LTD. Die explizite Implementierung der Methoden wird detailliert anhand Abb. 2.9 im Anhang (A.2) beschrieben.

Für alle Experimente musste ein Hirnschnitt geeignet auf den Arraystrukturen eines Chips platziert werden und durfte während der Kultivierung nicht kontaminieren oder einreißen. Ein passend liegender Kondensator musste den Hirnschnitt zu Aktivität anregen können und die neuronalen Feldpotentiale sollten auf möglichst vielen Transistoren zu detektieren sein. Die Hippocampusstruktur sollte nach der Kultivierung noch gut erkennbar sein. Diese restriktiven Anforderungen reduzierten die Anzahl verwendbarer Hirnschnitt-Chip-Systeme beträchtlich.

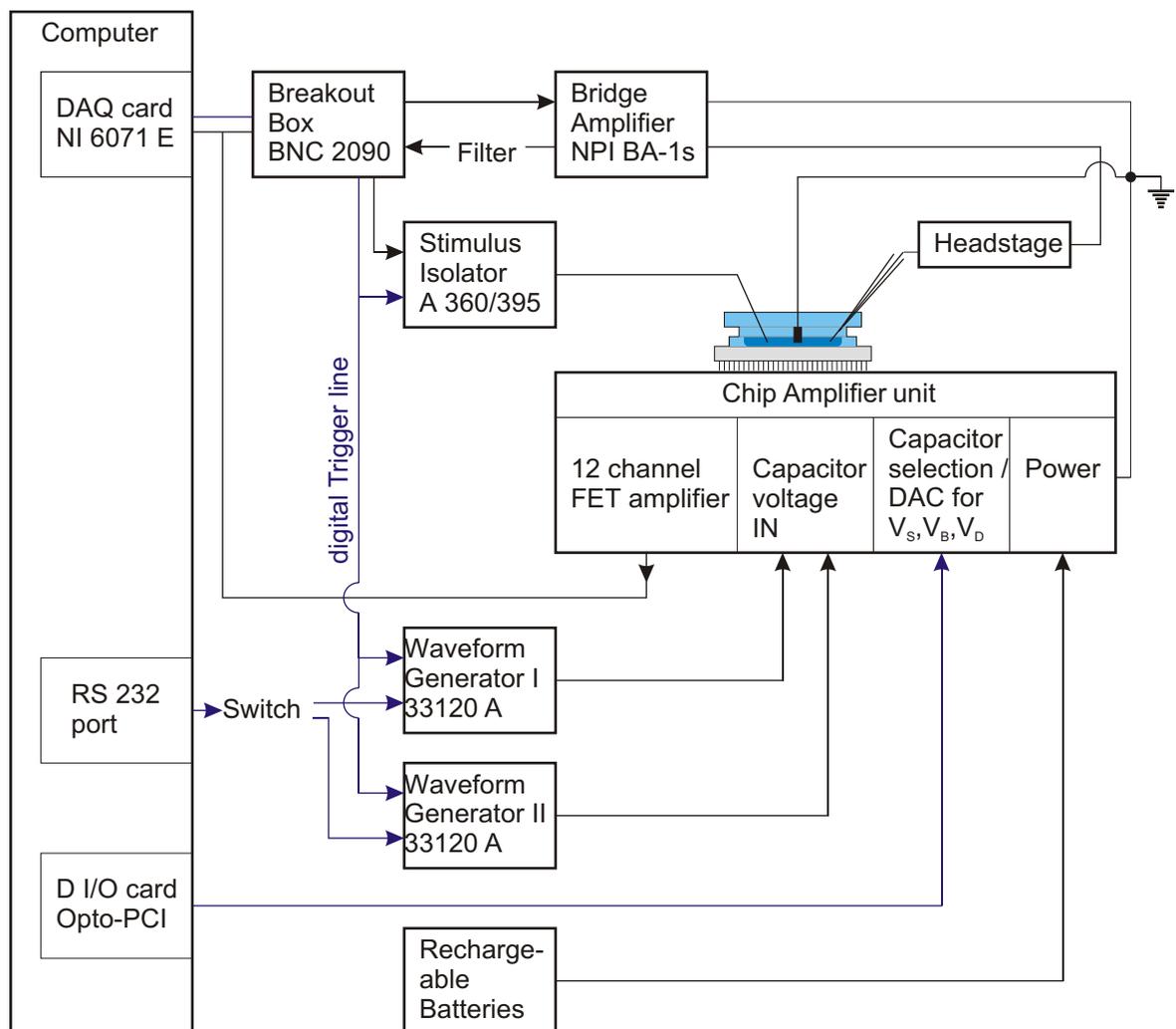


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Elektronik des Versuchsaufbaues.

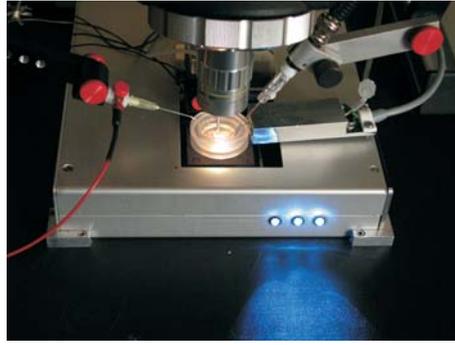


Abbildung 2.10: Messplatz. Auf einem schwingungsgedämpften Tisch stehen der graue Chipverstärker mit eingesetztem Eigenbauchip, der über ein Auflichtmikroskop beobachtet werden kann. Seitlich können über Mikromanipulatoren eine Mikroelektrode (rechts) und eine Wolframelektrode (links) über dem Chip platziert werden. Der Hirnschnitt wird über ein Perfusionssystem (Aluminiumblock, rechts) mit Messmedium versorgt. Elektrophysiologieverstärker, Funktionsgeneratoren und weitere elektronische Elemente befinden sich in einem Rack, das im Bild nicht zu sehen ist. Alle Chipmessungen mussten im abgedunkelten Raum erfolgen.

2.2.3.1 Kapazitive Stimulation

Um eine kapazitive Stimulation von Hirnschnitten zu erreichen, müssen die Kondensatoren einen Reiz geeigneter Form sowie ausreichender Amplitude und Dauer erzeugen. Es wurden dazu in der Regel Spannungsrampen *positiver* Amplitude (z.B. +4.0 V, 10 ms ansteigende Flanke, Abb. 2.11 oben) an die Kondensatoren angelegt. Der große Spannungssprung an der schnell abfallenden Flanke der Rampe ($\Delta V_s = -4.0$ V, $\Delta t \approx 10$ μ s) erzeugte einen *negativen*, kapazitiven, transienten Stromfluss ΔI_s (Abb. 2.11 unten). Mit $c_s = 1.8$ μ F/cm² erhält man aus (2.1): $\Delta I_s \approx -60$ μ A. Dieser Strompuls bewirkte im Hirnschnitt ein *negatives* externes Feldpotential ($V_{field} < 0$), das den Hirnschnitt zu Aktivität stimulierte.

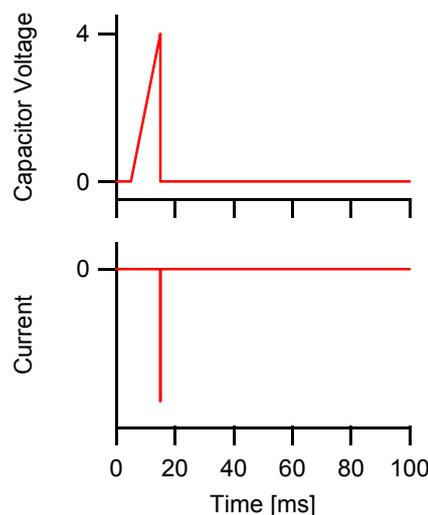


Abbildung 2.11: Kapazitive Stimulation. Bei Anlegen einer Spannungsrampe (oben) an einen Kondensator resultiert eine Stromtransiente in den Hirnschnitt (unten).

2.2.3.2 Kapazitive Detektion

Der für die Messungen relevante Bereich des Kennlinienfeldes der Transistoren, oberhalb der Schwellspannung starker Inversion $V_{ES} > V_T$ und unterhalb des Pinch-Off-Punktes, kann wie folgt ausgedrückt werden [Pier 96, From 03]:

$$I_D = \frac{b}{l} \mu_p \frac{\epsilon \epsilon_0}{d_{ox}} \left((V_{ES} - V_T) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right) \quad (2.2)$$

b und l bezeichnen Breite und Länge des Kanals zwischen Source und Drain, μ_p die Beweglichkeit der Löcher im Kanal, ϵ die Permittivitätszahl des Gateoxids, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante, d_{ox} die Dicke des Gateoxids sowie V_T die Schwellspannung.

Legt man über den Chipverstärker Spannungen an den Eigenbauchip an, die die oben genannten Bedingungen erfüllen, so beschreibt (2.2) den resultierenden Stromfluss zwischen Source und Drain I_D . Wird die Elektrolyt-Source Spannung V_{ES} um V_{field} moduliert, also $V'_{ES} = V_{ES} + V_{field}$, so ändert sich I_D um ΔI_D . Eine Taylor-Entwicklung von $I_D(V'_{ES})$ um V_{ES} liefert:

$$\Delta I_D = \underbrace{\frac{\partial I_D}{\partial V_{ES}} \Big|_{V_{DS}=const.}}_{:=\text{Steilheit}} V_{field} \quad (2.3)$$

Zur *Kalibrierung* der Transistoren wurden über einen Funktionsgenerator Rechteckpulse von 2 mV Amplitude an die Badelektrode abgegeben, d.h. $V_{field} = 2$ mV. Mit der synchron gemessenen Strommodulation ΔI_D konnte damit die Steilheit der Transistoren am Arbeitspunkt bestimmt werden.

Bei einer *Messung* wurde dieser Faktor dann verwendet, um aus der gemessenen Strommodulation auf das ursächliche neuronale Feldpotential (typisch ± 3 mV) zu schließen:

$$V_{field} = \left(\frac{\partial I_D}{\partial V_{ES}} \Big|_{V_{DS}=const.} \right)^{-1} \Delta I_D \quad (2.4)$$

Da der gewählte Arbeitspunkt ($V_S = 2.0$ V, $V_D = 0.1$ V und $V_B = 5.0$ V) stets im linearen Bereich des Kennlinienfeldes $I_D(V_{ES})$ der Transistoren lag, war diese Kalibrierung korrekt. Die durch elektrische Aktivität in Hirnschnitten hervorgerufenen neuronalen Feldpotentiale sind ortsabhängig. Die Transistoren des Eigenbauchips messen das über ihre Gatefläche integrierte, *lokale* neuronale Feldpotential.

Das Peak-to-Peak Rauschen der TiO₂-beschichteten Transistoren (etwa 100-200 μ V) ist nicht größer als das der SiO₂-beschichteten [Besl 02]. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist also ausreichend, um auch kleine hippocampale Feldpotentiale nachweisen zu können. Die Steilheit der Transistoren (typisch 50-100 nA/mV) blieb während der Experimente über mehrere Stunden konstant, was durch Badmodulation nach Messungsende häufig kontrolliert wurde. Dies bestätigte die Korrektheit der Kalibrierung während der Messung. Alle Transistormessungen (Eigenbau- und MTA-Chip) mussten im abgedunkelten Raum durchgeführt werden, um photoinduzierte 50 Hz Signaloszillationen zu vermeiden.

2.2.3.3 Aufnahme von Input-Output-Relationen

Die Abhängigkeit der Feldpotentialamplitude von der Reizstärke kann in einer Input-Output (I/O)-Relation dargestellt werden. Um eine *hochaufgelöste* I/O-Relation zu messen, wurde der Funktionsgenerator auf eine Startspannung programmiert, eine Spannungsrampe der entsprechenden Amplitude an einen Kondensator in der CA3-Somaregion abgegeben und das resultierende neuronale Feldpotential mit allen Transistoren aufgezeichnet. Nach einer Pause

von 5 s zur Regeneration, wurde die Kondensatorspannung um 0.01 V inkrementiert und obige Schritte wiederholt, bis eine bestimmte Endspannung erreicht war. In den meisten Fällen wurde die Kondensatorspannung erst nach 10 Pulsen identischer Amplitude inkrementiert, wodurch das Feldpotential 10x gemittelt werden konnte.

Für diese Art von Experimenten mussten die Hirnschnitt-Chip-Systeme restriktiven Anforderungen genügen: Ein Kondensator in der CA3-Zellkörperschicht musste eine Antwort sehr hoher Amplitude in CA1 bewirken, um mit einer geringen relativen Schwankung in den Amplitudenmessungen die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment der Input-Output-Relation klar bewerten zu können. Die Antwort sollte zusätzlich auf mehreren Transistoren zu beobachten sein, um eine eventuelle Ortsabhängigkeit untersuchen zu können.

2.2.3.4 Induktion von LTP und LTD

Über einen Kondensator Für LTP- und LTD-Experimente wurden Hirnschnitte im CA3-Somabereich alle 10 s über eine an einen Kondensator angelegte Spannungsrampe stimuliert und die resultierenden, neuronalen Feldpotentiale mit allen Transistoren in CA1 aufgezeichnet. Um Veränderungen in der Amplitude der Feldpotentiale beurteilen zu können, wurde zunächst durch Aufnahme von 60 Messpunkten ein 10 minütiges Referenzniveau definiert. Die periodische Reizung wurde dann unterbrochen und eine LTP- bzw. LTD-induzierende Pulsform an den Kondensator abgegeben (Abb. 2.12 oben). Die für die Induktionen notwendigen 2.4 s bzw. 3 min erscheinen daher in den Messkurven nicht. Nach jeder LTP- bzw. LTD-Induktion wurde die periodische Stimulation und Detektion dann für die Dauer von meist 20 Minuten fortgesetzt, um die Langzeitwirkung zu beobachten.

Die in Abb. 2.12 oben gezeichneten, komplexen Spannungsmuster wurden gewählt, da die durch sie erzeugten Strommuster (Abb. 2.12 unten) literaturübliche Induktionsmuster für LTP (Θ -Burst nach [Capo 92]) bzw. LTD (LTD-Burst nach [Teyl 99]) darstellen.

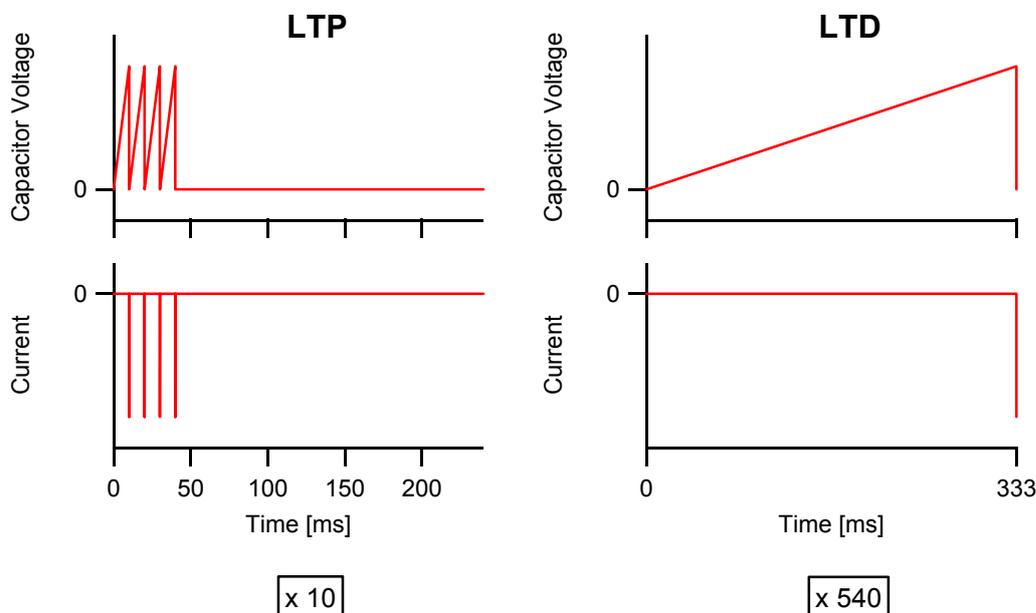


Abbildung 2.12: LTP- und LTD-induzierende Pulsformen. (Oben) Zeitverlauf der Kondensatorspannungen. (Unten) Korrespondierender kapazitiver Strom. Die gezeigten Pulsformen wurden zur Induktion von LTP 10x, für LTD 540x wiederholt. Die gesamte Induktionsdauer für LTP (über Θ -Burst) beträgt also 2.4 s, für LTD 3 min.

Über mehrere Kondensatoren Aus dem Stimulationsarray wurden drei Kondensatoren (A,B,C) ausgewählt, mit denen der Schnitt automatisiert der Reihe nach stimuliert werden sollte. Der Chipverstärker wurde auf den entsprechenden Kondensator programmiert, über den Funktionsgenerator ein Spannungspuls abgegeben und mit allen Transistoren die Antwort des Hirnschnitts gemessen. Nach 10 s Pause wurde auf den nächsten Kondensator umgeschaltet und die Sequenz wiederholt (A,B,C, A,B,C,...). Die Folge wurde nur für die Abgabe von Θ - oder LTD-Bursts auf bestimmte Kondensatoren unterbrochen. Mit dieser Messmethode kann eine eventuelle Expression von LTP/LTD auf den verschiedenen Kanälen, auf der Zeitskala von LTP/LTD, quasi gleichzeitig beobachtet werden.

Experimentelle Schwierigkeiten

1. Zeitaufwand für Stabilisierungsphase

Um ein stabiles neuronales Feldpotential (Referenzniveau) zu erreichen, musste vor Beginn der eigentlichen Messung meist über einen Zeitraum von einigen Stunden hinweg stimuliert und detektiert werden. Bei den Induktionsversuchen über mehrere Kondensatoren war diese Anforderung noch schwerer zu erfüllen, da die ausgelösten Feldpotentiale mehrerer Kondensatoren stabil sein mussten. Die Forderung nach Langzeitstabilität des Signals war insbesondere auch für die Aufnahme hochaufgelöster Input-Output-Relationen von Bedeutung: Die Reizpulse mussten auch hier einen zeitlichen Abstand von mindestens 5 s bzw. 10 s haben, um Verzerrungen der Signalamplitude zu vermeiden. Da häufig über 1000 Messpunkte aufgenommen wurden, handelte es sich auch hier um Langzeitmessungen.

2. Erfolgswahrscheinlichkeit für *einfache* LTP/LTD-Induktion

Wenn ein stabiles Ausgangssignal erreicht war, konnte versucht werden, LTP zu induzieren. Die Abgabe eines Θ -Bursts führte aber nur in 30-40 % aller Fälle zu einer Potenzierung. Diese Zahl deckt sich mit der anderer Arbeitsgruppen [Stai 04]. Für akute Hirnschnitte liegt diese bei ca. 80 %. LTD-Induktionen waren etwas zuverlässiger.

3. Erfolgswahrscheinlichkeit für *mehrfache* LTP/LTD-Induktion

Für einige Experimente war es erforderlich, viermal hintereinander erfolgreich LTP bzw. LTD über verschiedene Kondensatoren zu induzieren. Aufgrund der Multiplikation von Wahrscheinlichkeiten ist klar, dass eine Reproduktion dieser Ergebnisse nur selten gelingen konnte.

4. Instabilität in Expressionsphase

Wenn eine Potenzierung des neuronalen Feldpotentials erfolgt war, musste weiter nachgewiesen werden, dass diese über einen Zeitraum von mindestens 20 Minuten anhielt. In einigen Messungen wurde das Signal nach Abgabe von LTP- bzw. LTD-induzierenden Pulsformen instabil, sodass die Amplitude nicht mit dem Referenzniveau verglichen werden konnte.

Assoziative Induktion Um assoziatives LTP zweifelsfrei nachweisen zu können, sind mehrere Teilerperimente notwendig (nach Protokoll aus [Barr 83]):

1. Variation der Reizspannung eines Kondensators (W) in CA3, sodass ein kleines Feldpotential (≈ 0.3 mV) ausgelöst wird.
2. Variation der Reizspannung eines Kondensators (S) in CA3, sodass ein großes Feldpotential (≈ 3 mV) ausgelöst wird.
3. Nachweis der zeitlichen Konstanz der durch W ausgelösten Feldpotentialamplitude (Standardreizpuls, 0.1 Hz, 10 min)
4. Nachweis, dass über W und S unterschiedliche Synapsen aktiviert werden
5. Tetanus Stimulation über W (100 Hz, 1 s): Die durch W aktivierten Synapsen dürfen danach kein LTP zeigen, d.h. die Stimulationsintensität von W darf die Schwelle zur Kooperativität nicht erreichen.
6. Tetanus Stimulation über S (100 Hz, 1 s): Die durch S aktivierten Synapsen dürfen danach kein LTP zeigen (Test ob LTP hier homosynaptisch ist).
7. Tetanus Stimulation simultan über W und S (100 Hz, 1 s): Die durch W ausgelöste pEPSP-Amplitude sollte nach simultaner Tetanus-Stimulation über W und S relativ zum Kontrollniveau potenziert sein -
LTP wäre assoziativ induziert.

Um über die Apparatur des Eigenbauchips unabhängig voneinander, zwei verschiedene Reizspannungen an zwei unterschiedliche Kondensatoren abgeben zu können, musste ein zweiter Funktionsgenerator eingesetzt werden. Die beiden Spannungspulse konnten über die getrennten Kanäle des Chipverstärkers an die zwei verschiedenen Kondensatoren abgegeben werden. In einigen Experimenten konnten viele der oben genannten Teilerperimente erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Erfolgswahrscheinlichkeit der Schritte 4-7 gelang ein vollständiger Nachweis assoziativen LTPs so jedoch nicht.

Daraufhin wurde versucht, über eine andere Methode [Lin 03], mit niederfrequenter, leicht asynchroner Paarung (W 6 ms vor S) einzelner Stimulationspulse (alle 6 s, 100x) assoziatives LTP zu induzieren. Der Vorteil hierbei ist, dass die Nachweise 5 und 6 nicht erbracht werden müssen, Nachweis 7 wird durch die niederfrequente Paarung ersetzt. Voraussetzung für den Erfolg dieser Methode ist jedoch die Blockierung inhibitorischer synaptischer Übertragung durch Zugabe von Picrotoxin zum Messmedium. Mit diesem Toxin war eine definierte Stimulation der Hirnschnitte jedoch nicht mehr möglich, unkontrollierbare Signaloszillationen waren die Folge. Eine Variation der Mg^{2+} Konzentration im Messmedium zur Regulation der neuronalen Aktivität [Barr 83] konnte dieses Problem nicht beheben. Auch mit dieser Induktionsvariante gelang also kein assoziatives LTP.

2.3 Multi-Transistor-Array Chip

Dieser Chiptyp wurde in Kooperation mit der Infineon Technologies AG entwickelt und hergestellt (Details des Designs in [Ever 03, Lamb 04]). Die Entwicklung des MTA-Chips basierte auf einer Kombination von (i) dem Ansatz der Detektion von Feldpotentialen über EOSFETs mit perfekter Isolation von Elektrolyt und Elektronenleiter [Besl 02], mit (ii) CMOS-Technologie, die eine dichte Anordnung von Sensortransistoren in zwei Dimensionen erlaubt [Lamb 04] und (iii) einer inerten und homogenen TiO_2 -Beschichtung der Chipoberfläche [Hutz 04, Wall 06].

Layout Die Siliziumchips haben eine Größe von 5.4 mm x 6.5 mm. Auf der aktiven Sensorfläche von 1 mm x 1 mm befinden sich 16384 Transistoren in Form eines Arrays aus 128 x 128 Sensoren. Deren Abstand voneinander beträgt $7.8 \mu\text{m}$. Die Elektrolyt-Oxid-Metall-Oxid-Silizium (EOMOS)-Transistoren (Gatefläche $11 \mu\text{m}^2$) sind mit einer chemisch homogenen und elektrisch isolierenden Schicht aus TiO_2 bedeckt (Abb. 2.13). Es wurde eine Kulturkammer aufgeklebt, die der des Eigenbauchips sehr ähnlich war.

Datenerfassung und -auswertung Während einer Messung wurden die Spalten des Transistorarrays nacheinander mit 128 Zeilenverstärkern verbunden. Nach einer Einschwingzeit von $1.92 \mu\text{s}$ wurden deren Ausgangsspannungen über Multiplexer nach weiteren $1.92 \mu\text{s}$ an 16 Ausgabekanäle angelegt. Diese Spannungen wurden über ein Hochgeschwindigkeits A/D Wandlersystem an einen PC übertragen. Die Auslesedauer für den gesamten Chip betrug also $492 \mu\text{s}$ ($\Rightarrow 2 \text{ kHz}$ Samplingrate), konnte aber durch Beschränkung auf Teile des Arrays reduziert werden. Dieses Auslesemuster erzeugte einen Zeitgradienten in den Messdaten entlang des Transistorarrays, da nur 16 Transistoren zur exakt gleichen Zeit ausgelesen wurden. Isochrone Daten erhielt man durch lineare Interpolation der Signale an jedem Ort zwischen den zwei Messpunkten vor und nach der gewünschten Zeit.

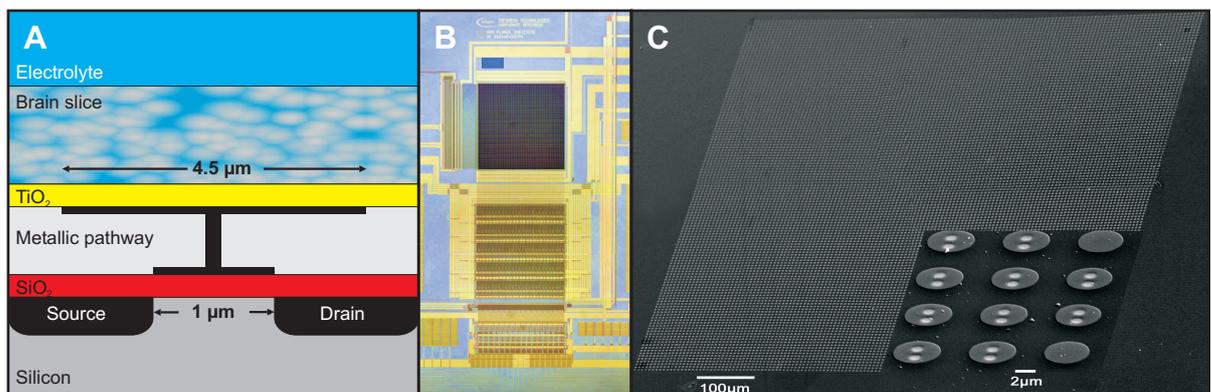


Abbildung 2.13: MTA-Chip. (A) Schematischer Querschnitt eines Sensortransistors in Elektrolyt-Oxid-Metall-Oxid-Silizium (EOMOS) Anordnung. Der Hirnschnitt steht in Kontakt mit einer Deckschicht aus TiO_2 , die über eine metallische Verbindung kapazitiv an das Gateoxid eines Feldeffekttransistors gekoppelt ist. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. (B) Photographische Aufnahme. Die dunkle Sensorfläche ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) ist von komplexer Sekundärelektronik (Multiplexer, Verstärker) umgeben. (C) Elektronenmikroskopaufnahme. Das Multi-Transistor-Array besteht aus 16384 Sensortransistoren mit einem Pitch von $7.8 \mu\text{m}$. Rechts unten ist ein vergrößerter Ausschnitt zu sehen. Die oberen Gatekontakte der Sensortransistoren sind durch die Oxidschicht hindurch sichtbar.

Das aus dem intrinsischen Rauschen der Transistoren und dem der Verstärkerelektronik zusammengesetzte Gesamtrauschen des MTA-Signals betrug etwa $250 \mu\text{V rms}$. In einigen Experimenten wurde das Signal/Rausch-Verhältnis durch räumliche Gauß-Filterung verbessert.

Kalibrierung und Messprinzip Die *Kalibrierung* der EOMOS-Transistoren erfolgte, wie die der EOS-Transistoren, durch Modulation des elektrischen Potentials des Elektrolytbades. Dazu wurden rechteckige Spannungspulse von 70 Hz und 5 mVpp an die Badelektrode angelegt. Das lokale Feldpotential - gemittelt über die Fläche des oberen Metallkontaktes - wurde durch die isolierende Elektrolyt-Chip-Grenzfläche kapazitiv an das Gate des Transistors gekoppelt und modulierte proportional dessen Source-Drain-Strom. Mit der bekannten Feldpotentialamplitude konnte dieser Strom dann kalibriert werden.

In einer *Messung* koppelte das *neuronale* Feldpotential an der Chipoberfläche - wiederum gemittelt über die Fläche des oberen Metallkontaktes - an das Gate des Transistors wie in der Kalibrierung und modulierte proportional den Source-Drain-Strom. Der MTA-Chip konnte über mehr als fünf Kultivierungs/Messzyklen ohne Qualitätsverlust verwendet werden.

2.4 Konventionelle Elektrophysiologie

Mit etablierten Standardmethoden der Neurophysiologie wurden die kultivierten Hirnschnitte auf ihre elektrische Funktionalität hin untersucht.

2.4.1 Stimulation mit Wolframelektroden

Wird ein kurzer Strompuls (ΔI , Δt) an eine im Hirnschnitt befindliche Metallelektrode abgegeben, so kann das dadurch erzeugte Feldpotential den Hirnschnitt zu neuronaler Aktivität anregen (siehe Theorieteil). Diese klassische Stimulationsmethode kam in zwei verschiedenen Varianten zur Anwendung (Abb. 2.9 auf Seite 20):

1. Manuell vorgegebene Amplitude

Über den Messrechner wurde ein 5.0 V Spannungspuls der Dauer $\Delta t = 200 \mu s$ erzeugt und damit ein Spannungs-Strom-Wandler (A 360) angesteuert, der für diese Dauer einen negativen Strom manuell einstellbarer Amplitude ΔI an die Elektrode abgab.

2. Automatisiert vorgegebene Amplitude

Für die Aufnahme von Input-Output-Relationen mit kleiner Schrittweite war es erforderlich, den Stimulationsstrom in sehr vielen, kleinen Schritten zu erhöhen. Da dies manuell nicht praktikabel ist, wurde über den Messrechner ein analoger, rechteckförmiger Spannungspuls der Dauer $\Delta t = 200 \mu s$ mit variabler Amplitude an einen Proportional-Spannungs-Strom-Wandler (A 395) abgegeben. Damit konnten per Software, automatisiert Strompulse beliebiger Amplitude ΔI zwischen 0 und 1000 μA erzeugt werden.

In allen Experimenten wurden monopolare Wolframelektroden verwendet, die mit einem Mikromanipulator unter mikroskopischer Kontrolle in der CA3-Somaregion platziert wurden.

2.4.2 Detektion mit Mikroelektroden

1. Feldpotentiale wurden mit Mikroelektroden gemessen, die aus einer Glaskapillare gezogen wurden. Die Kapillaren waren mit 3M NaCl Lösung gefüllt und mit einem chlorierten Silberdraht elektrisch kontaktiert ($R \approx 17 M\Omega$ bei Messungen auf Eigenbauchip bzw. $10 M\Omega$ auf MTA-Chip). Die Spannung wurde in Bezug auf ein im Elektrolytbad befindliches Ag/AgCl Pellet über eine Headstage mit einem Brückenverstärker (20x) gemessen, Bandpass-gefiltert (1 Hz-1 kHz), an einen Analogeingang der Breakout Box geführt und mit 5 kHz digitalisiert (Abb. 2.9 auf Seite 20). Das Pellet wandelt den ionischen Stromfluss im Elektrolytbad in einen elektronischen Stromfluss im Silberdraht um. Zur Kalibrierung der Mikroelektrode war ein Analogausgang der Breakout Box erforderlich. Mikroelektroden messen das, über ihre Öffnungsfläche integrierte, lokale neuronale Feldpotential.

2. Transmembranspannungen wurden analog mit Glasmikroelektroden detektiert, die aber mit 3M KCl Lösung gefüllt waren und einen höheren Widerstand hatten ($R \approx 40 M\Omega$). Das Signal wurde 10x verstärkt und mit 10 kHz digitalisiert um Aktionspotentiale auflösen zu können.

Durch intrazelluläre Strominjektion über die Mikroelektroden konnten die Zellen auch zur Bildung von Aktionspotentialen *stimuliert* werden.

Die Mikroelektroden wurden mit Mikromanipulatoren unter mikroskopischer Kontrolle in verschiedenen Regionen des Hippocampus, hauptsächlich CA1 platziert.

Kapitel 3

Theorie der Feldpotentiale

In dieser Arbeit wurden als Messgröße *Feldpotentiale* bestimmt. Feldpotentiale sind Differenzen im elektrischen Potential, also Spannungen, die zwischen zwei verschiedenen Orten (Mess- und Referenzpunkt) im Extrazellulärraum eines Hirnschnittes auftreten (Abb. 3.1). Sie entstehen dadurch, dass die aktiven Neuronen des Schnittes (grau) einen Transmembranstrom generieren, der zunächst in den Extrazellulärraum (gestrichelt) fließt und dann entweder an einer anderen Stelle wieder transmembran oder zum Referenzpunkt abfließt. Dieser Referenzpunkt wird üblicherweise über eine Elektrode im Elektrolytbad (blau) auf Massepotential gehalten. Da der Hirnschnitt einen endlichen Widerstand aufweist, kommt es zu einem Potentialgradienten zwischen Mess- und Referenzpunkt.

Nahezu das gesamte Kapitel wird die qualitative, analytische und numerische Modellierung dieser *neuronal* erzeugten Feldpotentiale behandeln. Ziel ist, deren Orts- und Zeitabhängigkeit hinreichend erklären zu können und damit das Chip-Hirnschnitt-Interface zu optimieren.

Feldpotentiale können auch erzeugt werden, indem über eine Wolframelektrode oder einen Kondensator ein Strom an den passiven Hirnschnitt zugeführt wird. Die Bedeutung solcher *extern* verursachten Feldpotentiale für die Wirkung der Stimulation wird ebenfalls besprochen.

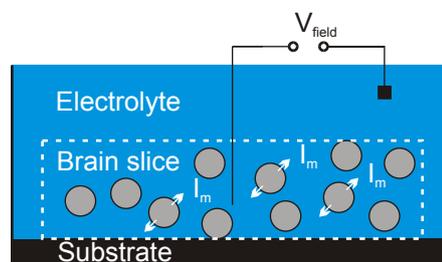


Abbildung 3.1: Zur Entstehung neuronaler Feldpotentiale. Ein Hirnschnitt befindet sich auf einem isolierenden Substrat (Chip) und ist von einem leitenden Elektrolytbad umgeben. Bei neuronaler Aktivität entsteht eine Potentialdifferenz, ein *Feldpotential*, zwischen einem im Extrazellulärraum des Hirnschnittes befindlichen Messpunkt und einem weit entfernten Referenzpunkt im Elektrolytbad. Diese Spannung kann z.B. über Elektroden gemessen werden.

3.1 Volumenleitermodelle

In diesem Abschnitt werden ein mikroskopisches und ein makroskopisches Modell vorgestellt. Die Modelle beschreiben den räumlichen Verlauf von Feldpotentialen im Extrazellulärraum eines Hirnschnittes. Ursache für die Feldpotentiale sind Transmembranströme.

3.1.1 Mikroskopisches Modell

Ein Hirnschnitt besteht aus Extrazellulärraum mit darin eingebetteten Zellen (Abb. 3.2A). Der Extrazellulärraum hat wahrscheinlich die selbe Zusammensetzung wie das Elektrolytbad das den Hirnschnitt umgibt [Glei 06]. Das Elektrolytbad wird deshalb hier als zum Extrazellulärraum gehörend betrachtet.

3.1.1.1 Differentialgleichung

Die Transmembranströme aktiver Neurone (Abb. 3.2A) fließen in den Extrazellulärraum, der als Volumenleiter der konstanten Leitfähigkeit σ_{ex} modelliert wird ($\sigma_{ex} \approx \sigma_{electrolyte}$ mit $1/\sigma_{electrolyte} \approx 50 \text{ } \Omega\text{cm}$). Die um die Anordnung der Zellen fließende Stromdichte \vec{j} folgt deshalb dem Ohmschen Gesetz:

$$\vec{j} = \sigma_{ex} \vec{E} \quad (3.1)$$

Das elektrische Feld \vec{E} ist in quasistatischer Näherung der Gradient eines Potentials Φ : $\vec{E} = -\vec{\nabla}\Phi$. Die Messgröße Feldpotential V_{field} ist eine Spannung, nämlich die Differenz des Potentials Φ zu einer weit entfernten Badelektrode auf Massepotential: $V_{field} = \Phi - 0$. Einsetzen in (3.1) liefert:

$$\vec{j} = -\sigma_{ex} \vec{\nabla} V_{field} \quad (3.2)$$

Da der Extrazellulärraum stromquellenfrei ist ($\text{div} \vec{j} = 0$), führt die Anwendung des Divergenzoperators div auf (3.2) zu:

$$\Delta V_{field} = 0 \quad (3.3)$$

Zur eindeutigen Lösung der Laplace-Gleichung ist zusätzlich die Angabe von Randbedingungen erforderlich. Diese Tatsache wird mit wenigen Ausnahmen [From 02, Nune 06] in der Literatur zur Theorie von Feldpotentialen nicht erwähnt. Abb. 3.2A zeigt gelb markiert die verschiedenen Randbedingungen, die an den Grenzflächen des Extrazellulärraums auftreten.

3.1.1.2 Randbedingungen

1. Grenzfläche Extrazellulärraum – Badelektrode

Die Referenzelektrode im Elektrolytbad liegt auf Massepotential. Dort gilt:

$$V_{field} = 0 \quad (3.4)$$

2. Grenzfläche Extrazellulärraum – Zelle

Wie verhält sich die Stromdichte \vec{j} an einer Grenzfläche zu einer Zelle, an der die Transmembranstromdichte j_m austritt? Die Kontinuitätsgleichung $\text{div} \vec{j} = -\frac{\partial \rho}{\partial t}$ wird über ein dünnes Volumen ΔV das die Grenzfläche umschließt, integriert: $\int_{\Delta V} \text{div} \vec{j} dV = -\int_{\Delta V} \frac{\partial \rho}{\partial t} dV$. Aus der linken Seite der Gleichung folgt mit dem Gaußschen Satz und dem Normalenvektor \vec{n} der Membran: $\vec{j} \cdot \vec{n} dA$. Die rechte Seite ist der negative Gesamtstrom durch die Oberfläche von ΔV also: $-j_m dA$. Gleichsetzen ergibt: $-\vec{j} \cdot \vec{n} = j_m$. Mit (3.2):

$$\sigma_{ex} \vec{\nabla} V_{field} \cdot \vec{n} = j_m \quad (3.5)$$

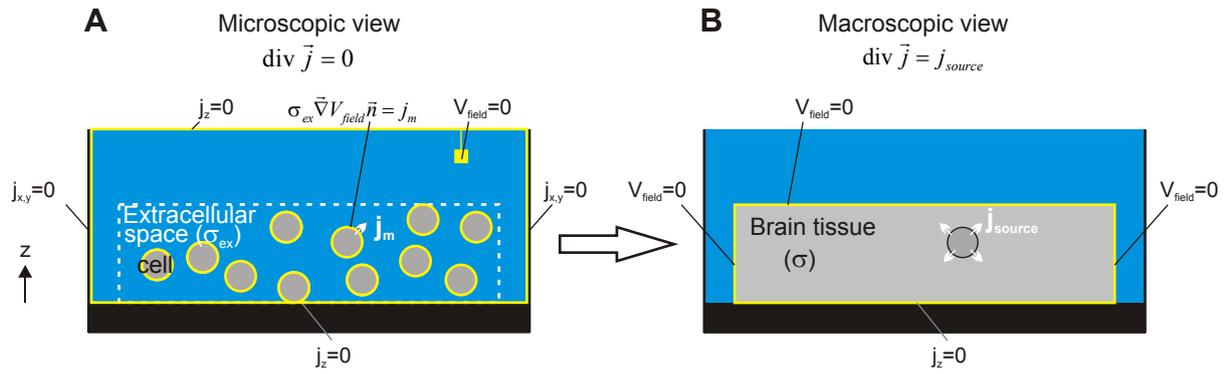


Abbildung 3.2: Mikroskopisches und makroskopisches Volumenleitermodell. An den äußeren Grenzflächen sind die gelb gezeichneten Randbedingungen einzuhalten. (A) Mikroskopische Betrachtung. Der Extrazellulärraum ist stromquellenfrei ($\text{div} \vec{j} = 0$) und wird über die Laplace-Gleichung (3.3) beschrieben. An allen Grenzflächen des Extrazellulärmediums zu den Zellen (graue Kreise) sind innere Randbedingungen zu beachten (gelb markiert). Die Bereiche des Zellinneren sind von der Beschreibung ausgenommen. Die spezifische Leitfähigkeit des Extrazellulärmediums ist σ_{ex} . (B) Makroskopische Betrachtung. Die komplizierten inneren Randbedingungen an den Orten der Zellen entfallen und können durch eine makroskopische, skalare Stromquellendichte j_{source} ersetzt werden. Das homogene Medium Gehirngewebe ist dann nicht mehr stromquellenfrei ($\text{div} \vec{j} = j_{source}$) und hat jetzt die spezifische Leitfähigkeit σ . Eine Beschreibung ist über die Poisson-Gleichung (3.7) möglich.

3. Grenzfläche Extrazellulärraum – Substrat/Kulturkammer/Luft

Das Extrazellulärmedium befindet sich in einem Plexiglasring (Kulturkammer) der auf dem Substrat befestigt ist. Das Substrat ist ein Isolator, deshalb kann in der $z = 0$ Ebene kein Strom in negativer z -Richtung abfließen. Mit (3.2) folgt:

$$j_z = -\sigma_{ex} \frac{\partial V_{field}}{\partial z} = 0 \quad (3.6)$$

Da der Plexiglasring und die Luft über dem Elektrolytbad ebenfalls isolieren, gilt mit analoger Argumentation: $j_{x,y} = 0$ bzw. $j_z = 0$ an den jeweiligen Grenzflächen.

Um die zweite Randbedingung berücksichtigen und damit ein exaktes Feldpotential berechnen zu können, müssten folgende Daten bekannt sein:

- Lage, Struktur und elektrophysiologische Eigenschaften der Dendritenbäume, Zellkörper und Axone aller Neurone und Interneurone im Hirnschnitt.
- Lage, Stärke und Art aller Synapsen, die die Neurone und Interneurone miteinander verknüpfen.

Ein Blick auf die Zeichnungen des Hippocampus nach Cajal (Abb. 2.1 auf Seite 6) zeigt, dass diese *mikroskopischen Informationen*, in einem derart komplexen Netzwerk von etwa 1 mm^3 Hirngewebe, nicht zugänglich, also unbekannt sind.

Bei einer *makroskopischen Messung* wird immer ein auf mikroskopischer Skala *großes* Gebiet abgetastet und dessen räumlicher Mittelwert gebildet [Nolt 97]. Mikroskopische Details der dicht gepackten Verteilung neuronaler Transmembranströme j_m werden dadurch geglättet und sind in der Messgröße Feldpotential nicht mehr enthalten (Abschnitt 3.1.2.3). Eine mikroskopisch exakte Theorie ist deshalb auch nicht sinnvoll.

Die Einführung extrem vereinfachter, makroskopischer Feldpotentialmodelle ist also notwendig und gerechtfertigt.

3.1.2 Makroskopisches Modell und Current-Source-Density

Eine mögliche Vereinfachung besteht darin, die mikroskopische Struktur des Hirnschnittes zu vernachlässigen, indem Extrazellulärraum und Zellen zu einem homogenen Medium „Gehirngewebe“ zusammengefasst werden (*mean-field*-Ansatz, Abb. 3.2B).

Ströme breiten sich in diesem linearen Medium hauptsächlich über ohmsche Kopplung aus, kapazitive sowie induktive Anteile sind vernachlässigbar. Dies wurde über Impedanzmessungen im hier physiologisch relevanten Frequenzbereich von 0-1 kHz gezeigt. Die elektrischen Eigenschaften eines passiven Hirnschnittes können also näherungsweise durch einen Volumenleiter des spezifischen Widerstands $\rho \approx 300 \Omega\text{cm}$ beschrieben werden [Lang 69, Nich 73, Nich 75]. ρ ist der mittlere spezifische Widerstand des Extrazellulärraums mit eingebetteten Zellen.

Die komplexen inneren Randbedingungen (Transmembranströme der Zellen) werden durch Einführung einer makroskopischen Hilfsgröße, der skalaren Stromquellendichte j_{source} ersetzt, wie in Abb. 3.2B gezeigt [Nune 06]. j_{source} wird in der elektrophysiologischen Literatur auch als *Current-Source-Density* (CSD) bezeichnet.

3.1.2.1 Differentialgleichung

Der Volumenleiter ist nun also nicht mehr stromquellenfrei ($\text{div} \vec{j} =: j_{source}$). Die Anwendung des Divergenzoperators div auf (3.2) führt jetzt auf die Poisson-Gleichung:

$$\Delta V_{field} = -\rho \cdot j_{source} \quad (3.7)$$

Fließt also die Stromquellendichte j_{source} in einen Volumenleiter des spezifischen Widerstandes ρ ein, so entsteht das Feldpotential V_{field} .

3.1.2.2 Randbedingungen

Beim Übergang vom mikroskopischen zum makroskopischen Modell verändern sich die zu beachtenden Randbedingungen. Die wichtigste Vereinfachung des makroskopischen Modells ergibt sich aus der Ersetzung der inneren Randbedingungen. An den äußeren Grenzflächen des Gehirngewebes zum Elektrolytbad und zum Substrat (gelb in Abb. 3.2B) sind folgende Bedingungen zu beachten:

1. Grenzfläche Gehirngewebe – Elektrolytbad

Durch die Zusammenfassung von Extrazellulärraum und Zellen zu einem homogenen Gehirngewebe entsteht eine Grenzfläche zum Elektrolytbad. Das Elektrolytbad gehört nun also nicht mehr zum Extrazellulärraum. Der spezifische Widerstand des Elektrolytbades ($\rho \approx 50 \Omega\text{cm}$) ist wesentlich kleiner als der des Gehirngewebes ($\rho \approx 300 \Omega\text{cm}$). Ein Stromfluss aus dem Gewebe durch das Elektrolytbad an die Badelektrode wird deshalb im Bad nur einen vernachlässigbaren Spannungsabfall erzeugen. Die Oberseite des Hirnschnittes, sowie die Seitenflächen liegen also in guter Näherung auf Massepotential:

$$V_{field} = 0 \quad (3.8)$$

Dies ersetzt die Randbedingungen an den Grenzflächen Extrazellulärraum – Badelektrode/Kulturkammer/Luft im mikroskopischen Modell.

2. Grenzfläche Gehirngewebe – Substrat

Es kann kein Strom aus dem Gewebe ans Substrat abfließen.

$$j_z = -\sigma \frac{\partial V_{field}}{\partial z} = 0 \quad (3.9)$$

Aktive Neurone modulieren durch synaptische Übertragung und der Ausbildung von Aktionspotentialen ihre Transmembranstromdichte j_m . Welche Verbindung besteht also zwischen der mikroskopischen Größe j_m der Einheit $[\frac{A}{m^2}]$ und der makroskopischen Größe j_{source} der Einheit $[\frac{A}{m^3}]$?

3.1.2.3 Zusammenhang Transmembranstrom – CSD

Am Ort \vec{r} innerhalb des Volumenleiters/Hirnschnittes befinde sich ein kugelförmiges Volumen V mit der Oberfläche S (Abb. 3.3 links). Der Hirnschnitt bestehe aus N Neuronen, die teilweise durch V verlaufen können. Das in V liegende Volumen des k -ten Neurons sei V_k mit der Oberfläche S_k (also ohne die Schnittflächen $S \cap V_k$). Wird Neuron k aktiv, so kann der gesamte über S_k abfließende Strom I_{m_k} aus der Transmembranstromdichte j_{m_k} berechnet werden:

$$I_{m_k} = \int_{S_k} j_{m_k}(\vec{r}') dA' \quad (3.10)$$

j_{m_k} ist dabei nur auf der Oberfläche S_k von Null verschieden. Insgesamt fließt über die Oberflächen aller in V enthaltenen Neuronen der Strom:

$$I = \sum_{k=1}^N I_{m_k} = \sum_{k=1}^N \int_{S_k} j_{m_k}(\vec{r}') dA' \quad (3.11)$$

Da das Volumen $V \setminus \sum_{k=1}^N V_k$ (Extrazellulärmedium) keine weiteren Stromquellen enthält, muss der Strom I durch die Oberfläche S abfließen. Das Volumen V gibt also die Stromquellendichte I/V an den Volumenleiter ab. Der durch die Schnittflächen $S \cap V_k$ fließende Intrazellulärstrom trägt zu dieser Bilanz nicht bei, da dieser Strom nicht über die Membran an den Volumenleiter abfließt. Für ein mikroskopisch großes aber makroskopisch kleines Volumen V (Messsituation) an einem beliebigen Ort \vec{r} erhält man so eine Definition der Stromquellendichte $j_{source}(\vec{r})$:

$$j_{source}(\vec{r}) := \frac{1}{V(\vec{r})} \sum_{k=1}^N \int_{S_k(\vec{r})} j_{m_k}(\vec{r}') dA' = \frac{1}{V(0)} \sum_{k=1}^N \int_{S_k(0)} j_{m_k}(\vec{r}' + \vec{r}) dA' \quad (3.12)$$

Es wird dadurch theoretisch der experimentelle Mittelungsprozeß einer Messung beschrieben. Die mikroskopischen Details des Transmembranstromflusses j_{m_k} aus V in den Volumenleiter

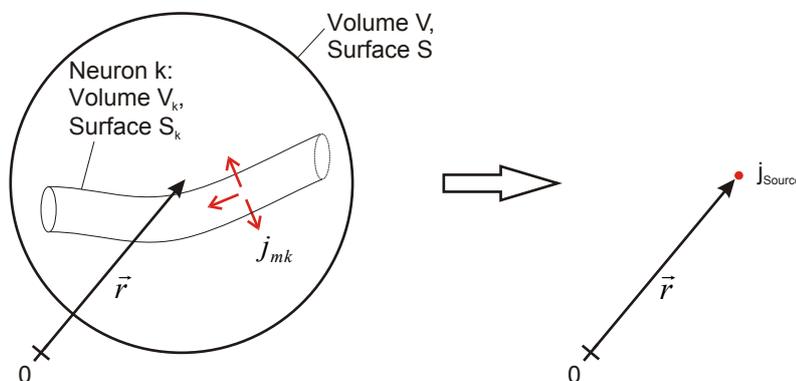


Abbildung 3.3: Zur Ableitung des Zusammenhangs zwischen j_m und j_{source} .

gehen durch die Integration verloren. Sie bilden aber netto die in Abb. 3.3 rechts gezeichnete makroskopische Stromquellendichte $j_{source}(\vec{r})$, die aus V austritt und am Ort \vec{r} in den Volumenleiter einfließt. Dadurch entsteht im Volumenleiter die vektorielle Stromdichte \vec{j} mit $\text{div}\vec{j} = j_{source}$. Die verschiedenen Stromdichten j_{m_k} , j_{source} sowie \vec{j} müssen klar unterschieden werden. Die Ableitung basiert entfernt auf Ideen aus [Nich 73, Mitz 85, Nolt 97].

3.1.2.4 Lösungen

Wie kann die Differentialgleichung (3.7) nun gelöst werden?

Analytisch: Feldpotential eines unendlich ausgedehnten Hirnschnittes In den meisten Arbeiten wird durch die Verwendung von $V_{field} \rightarrow 0$ für $x, y, z \rightarrow \pm\infty$ implizit angenommen, dass der Hirnschnitt in allen Raumrichtungen unendlich ausgedehnt ist, also keine Grenzflächen auftreten. Dies hat den Vorteil, dass die Gleichung (3.7) für eine Stromquellendichte, bestehend aus N punktförmigen Stromquellen der Amplitude I_k am Ort \vec{r}_k : $j_{source}(\vec{r}) = \sum_{k=1}^N I_k \delta(\vec{r} - \vec{r}_k)$ folgende, sehr einfache analytische Lösung besitzt [Nolt 97]:

$$V_{field}(\vec{r}) = \frac{\rho}{4\pi} \sum_{k=1}^N \frac{I_k}{|\vec{r} - \vec{r}_k|} \quad (3.13)$$

Diese Eigenschaft wird z.B. für die Compartment-Modellierung von Feldpotentialen (Diskussion in Abschnitt 4.3.5) ausgenutzt.

Numerisch: Feldpotential eines endlich ausgedehnten Hirnschnittes Da ein *realer* Hirnschnitt eine endliche räumliche Ausdehnung besitzt, dürfen die Randbedingungen an den Grenzflächen (Abb. 3.2B) nicht mehr ignoriert werden [From 02], da sie Verlauf und Amplitude der Feldpotentiale entscheidend beeinflussen. Eine Lösung der Volumenleitergleichung (3.7) ist bei gegebenem j_{source} dann allerdings nur noch numerisch möglich.

Qualitativ: Feldpotential überlagerter synaptischer- und Aktionspotentiale Mit einem rein *qualitativen* Ansatz können wesentliche Eigenschaften des Orts- und Zeitverlaufs von Feldpotentialen aus dem Volumenleitermodell abgeleitet und wichtige literaturübliche Bezeichnungen eingeführt werden.

Ist in einem makroskopisch kleinen Volumen um \vec{r}_0 die in den Volumenleiter abfließende Transmembranstromdichte j_m positiv, so kann dies durch ein positives $j_{source}(\vec{r}_0)$, eine *Stromquelle* repräsentiert werden. Der positive Strom fließt u.a. zur weit von \vec{r}_0 entfernten Referenzelektrode ab, d.h. eine Messelektrode nahe \vec{r}_0 wird eine positive Spannung, ein positives Feldpotential messen. Analog erzeugt ein negatives j_m eine *Stromsenke* und ein negatives Feldpotential. Der Zeitverlauf des Feldpotentials ist durch den Zeitverlauf aller beitragenden j_m bestimmt [John 99]. Wie schon in der Beschreibung der Anatomie des Hippocampus erwähnt, besteht der CA1-Bereich, stark vereinfacht, aus dem wiederholt auftretenden Grundbaustein Axon-Synapsen-CA1-Neuron (Abb. 3.4B). Will man die auftretenden Feldpotentiale verstehen, so muss man zunächst die elektrischen Signalformen untersuchen, die das in Abb. 3.4A gezeigte Grundelement erzeugen kann. Die folgende Beschreibung der zeitlichen Abläufe basiert auf Konzepten aus [John 98]:

1. Bildet ein CA3-Neuron ein Aktionspotential, so breitet sich dieses entlang der Schaffer-Kollaterale aus (*fiber volley*), bis es eine Synapse erreicht (Abb. 3.4A). Über spannungsabhängige Ionenkanäle fließt dabei *lokal aktiver* Strom in die Axone ein ($j_m(\vec{r}_0) <$

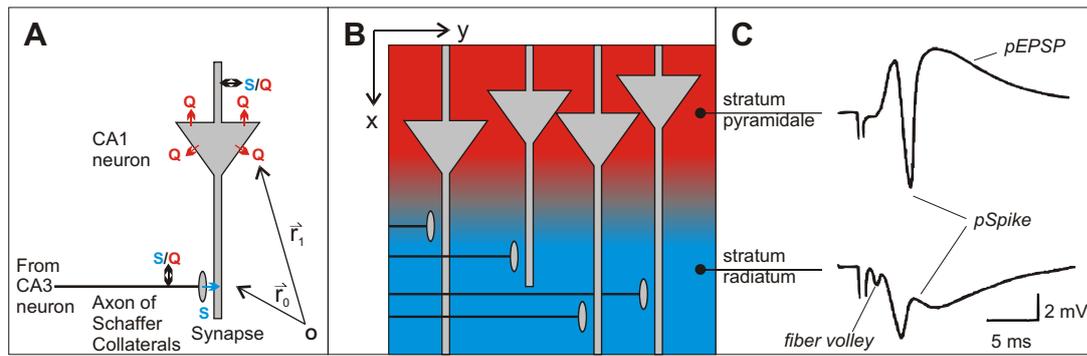


Abbildung 3.4: Die Entstehung neuronaler Feldpotentiale. (A) Der aktive Grundbaustein Axon-Synapsen-CA1-Neuron erzeugt die Verteilung $j_{source}^{element}$ von Stromsenken (S) und quellen (Q) im Volumenleiter. Zwei repräsentative Orte im dendritischen (\vec{r}_0) und im somatischen Bereich (\vec{r}_1) werden im Text diskutiert. (B) Die Stromquellendichten $j_{source}^{element}$ verschiedener Elemente überlagern sich zu j_{source} und bilden das experimentell zugängliche Feldpotential V_{field} . Da hippocampale CA1-Neuronen regelmäßig angeordnet sind, interferieren die durch synaptische Übertragung erzeugten Stromquellendichten überwiegend konstruktiv. V_{field} verläuft deshalb in erster Näherung konstant in y- und dipolartig in x-Richtung (positiv in str. pyramidale, rot und negativ in str. radiatum, blau). (C) Extrazellulär gemessene Feldpotentiale im stratum pyramidale $V_{field}(\vec{r}_1)$ und radiatum $V_{field}(\vec{r}_0)$ der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer Kollaterale [John 98].

0, Stromsenke), der über räumlich entlang des Axons verteilte, *passive* Stromquellen kompensiert wird. Ein Aktionspotential, das extrazellulär von einem Ort \vec{r}_0 im Bereich des Dendritenbaums des CA1-Neurons aus beobachtet wird, wird also ein schnelles ($\sim 1-2$ ms) Feldpotential mit positiv/negativ/positiv Zeitverlauf zeigen. Der negative Anteil wird dominieren [John 99].

2. Trifft das Aktionspotential an der Synapse ein, so werden dort Neurotransmitter ausgeschüttet, die durch den synaptischen Spalt diffundieren und in der Zellmembran des postsynaptischen Neurons ligandengesteuerte Ionenkanäle öffnen (Abb. 3.4A). Ein **Excitatory PostSynaptic Potential (EPSP)** entsteht. Da es sich um exzitatorische Synapsen handelt, fließt *lokal aktiver* Strom in den postsynaptischen Dendritenbaum ein. Aus Gründen der Stromerhaltung tritt ein *räumlich verteilter, passiver* Strom u.a. über den Zellkörper wieder aus. Bei \vec{r}_0 ist also $j_m(\vec{r}_0) < 0$ (Senke), ein negatives, langsames (~ 20 ms) Feldpotential entsteht. Beobachtet man dagegen an einem Ort \vec{r}_1 nahe des Zellkörpers, so ist dort $j_m(\vec{r}_1) > 0$ (Quelle), hier entsteht also ein positives, langsames Feldpotential. Insgesamt ist das durch synaptischen Stromfluss verursachte Feldpotential dipolartig, wobei der Dendritenbaum den negativen, das Soma den positiven Pol bildet.
3. Wird das postsynaptische Neuron (Abb. 3.4A) durch den synaptischen Einstrom überschwellig depolarisiert, so bildet es selbst ein Aktionspotential aus, das bei \vec{r}_1 ein schnelles, dominant negatives Feldpotential (*Spike*) erzeugt. Fließt der korrespondierende Strom in die Dendriten, so kann der Spike mit Vorzeichenwechsel auch bei \vec{r}_0 zu sehen sein.

Das Grundelement bildet also, in der oben beschriebenen zeitlichen Reihenfolge, die drei Komponenten seiner Stromquellenverteilung $j_{source}^{element}$ aus. Zur gesamten Stromquellendichte j_{source} trägt im Hippocampus aber eine ganze Population dieser Elemente bei, sodass im messbaren Feldpotential V_{field} nicht notwendigerweise jede der drei Komponenten noch erkennbar ist. Dies geschieht nur, wenn sich die $j_{source}^{element}$ der verschiedenen Bausteine *räumlich*

und *zeitlich* konstruktiv überlagern. Eine perfekte konstruktive Interferenz würde dann auftreten, wenn alle Elemente am selben Ort lokalisiert und synchron aktiviert werden würden.

Räumliche Interferenz: Die CA1-Neuronen, und damit auch die Grundelemente, sind im Hippocampus in Form eines etwa vier Neuronen breiten Streifens geometrisch angeordnet (Abb. 3.4B). Senkrecht zur Soma-Dendrit-Achse ($:=y$) erzeugt diese parallele Anordnung eine Translationsinvarianz in der Verteilung der Stromquellen/-senken und damit auch im Feldpotential ($\partial V_{field}/\partial y = 0$, ähnlich einer Dipolschicht). Parallel zur Achse ($:=x$) kompensieren sich die beitragenden $j_{source}^{element}$ jedoch teilweise, wegen ihrer leicht unterschiedlichen relativen Lage. Nur aufgrund der räumlichen Anordnung der Grundelemente in Form der oben beschriebenen „*open-field*“-Struktur [John 99] ist im Hippocampus überhaupt ein Feldpotential detektierbar. Bei einer rein statistischen Verteilung würden sich die Stromquellen und -senken gegenseitig kompensieren und das Feldpotential verschwinden.

Zeitliche Interferenz: Bei der zeitlichen Interferenz muss zwischen Aktionspotentialen und EPSPs differenziert werden: Verschiedene präsynaptische Aktionspotentiale überlagern sich nur dann konstruktiv zu einem fiber volley, wenn sie auf etwa eine Millisekunde synchronisiert in CA1 einlaufen. Die Amplitude des fiber volley ist proportional zur Anzahl der präsynaptischen Axone die stimuliert werden. Analog müssen auch postsynaptische Aktionspotentiale derart synchron sein, um einen *pSpike* ausbilden zu können (Das Präfix „*p*“ kennzeichnet Größen, die durch eine *Population* von Grundelementen erzeugt wurden.). Fiber volleys und pSpikes sind aufgrund dieser Anforderungen an die Synchronität nicht immer in V_{field} erkennbar. Wenn dagegen EPSPs um wenige Millisekunden verzögert auftreten, so überlagern sich die korrespondierenden Stromquellen, aufgrund ihrer Monopolarität und Länge von etwa 20 ms, zeitlich praktisch vollständig konstruktiv zu einem *pEPSP*.

Obwohl der durch Aktionspotentiale erzeugte Transmembranstrom pro Zeit wesentlich größer ist als der durch synaptische Ströme, werden aufgrund der raumzeitlichen Interferenz, die experimentell beobachtbaren Feldpotentiale durch den Beitrag von pEPSPs dominiert (Abb. 3.4C).

3.1.2.5 CSD-Analyse

Bisher wurde stets aus einer theoretisch vorgegebenen Verteilung von Stromquellen j_{source} das zugehörige Feldpotential bestimmt. In vielen Arbeiten (u.a. [Nich 75, Mitz 85]) wird aber auch eine eindimensionale, diskretisierte Form der Beziehung (3.7) verwendet, um umgekehrt aus experimentell, im Abstand dx bestimmten Feldpotentialen, auf die ursächliche Stromquellendichte $j_{source}(x)$ zurückzuschließen :

$$j_{source}(x) = -\frac{1}{\rho} \cdot \frac{V_{field}(x + dx) - 2V_{field}(x) + V_{field}(x - dx)}{(dx)^2} \quad (3.14)$$

Praktisch wird durch dieses, als *Current-Source-Density (CSD)-Analyse* bezeichnete Verfahren, das durch den Volumenleiter „verschmierte“ Abbild der Stromquellendichte, in Analogie zur digitalen Bildbearbeitung, wieder scharfgezeichnet. Durch die Methode können also die, das Feldpotential verursachenden, Stromquellen und -senken räumlich lokalisiert werden.

Da aber auch hier wieder die Randbedingung der endlichen Ausdehnung des Schnitts nicht berücksichtigt wird, weist der CSD-Algorithmus einen grundlegenden Mangel auf. Des weiteren ist in den meisten Arbeiten, in denen eine CSD-Analyse durchgeführt wurde (z.B. [Mitz 85, Hols 87, Eger 98]), die räumliche Auflösung der Messmethode nicht ausreichend:

Ein System, das im Abstand dx ($\approx 50 \mu\text{m}$) Messpunkte aufnehmen kann, besitzt die Ortsauflösung $\frac{1}{dx}$. Verändert sich die Amplitude des zu messenden Signals signifikant¹ im Intervall dx_{field} ($\approx 20 \mu\text{m}$), so müsste die Auflösung der Messmethode das Nyquist-Abtasttheorem $\frac{1}{dx} > 2 \cdot \frac{1}{dx_{field}}$ erfüllen.

Der Abstand der Sensoren des MTA-Chips ($7.8 \mu\text{m}$) ist dagegen fein genug um das Abtasttheorem zu erfüllen. Verwendet man einen Algorithmus, der die Randbedingungen berücksichtigt, so könnte aus dem Feldpotential die Verteilung neuronaler Stromquellen j_{source} korrekt berechnet werden - ein Ziel das in der Neurobiologie schon seit langem angestrebt wird.

¹z.B. um mehr als 5% des Maximalwertes

3.2 Schichtleitermodell

Um ein analytisch lösbares Modell zu erhalten, das zusätzlich die Randbedingungen an den Grenzflächen des Hirnschnittes zum Elektrolyt und zum Substrat (Abb. 3.2B auf Seite 31) berücksichtigt, wurde das Volumenleitermodell weiter vereinfacht: Da die Ausdehnung eines kultivierten Hirnschnittes in z-Richtung (Dicke h) wesentlich kleiner ist, als die Ausdehnung in x- (Länge l) und y-Richtung (Breite b) also $l, b \gg h$, ergeben sich zwei Konsequenzen: (i) eine planare Näherung als Schichtleiter ist gerechtfertigt und (ii) die Beachtung der Randbedingungen an der Ober- und Unterseite des Hirnschnittes wird besonders wichtig.

3.2.1 Feldpotential generiert durch neuronale Stromquellen

3.2.1.1 Differentialgleichung und Lösung

Für einen isotropen, homogenen Schichtleiter des Widerstands $r_{sheet} = \rho/h$ ist der Zusammenhang zwischen neuronaler Stromquellendichte j_{source} (Einheit $[\frac{A}{m^2}]$) und Feldpotential in kartesischen Koordinaten gegeben durch [From 02]:

$$\left(\frac{\partial^2 V_{field}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V_{field}}{\partial y^2} \right) = -r_{sheet} j_{source} \quad (3.15)$$

Dadurch ist automatisch die Randbedingung des verschwindenden Stromflusses in Richtung Substrat an der Schnittunterseite erfüllt (Abb. 3.2B). Der Grenzfläche Schnittoberseite-Elektrolytbad wird eine flächenspezifische Leckleitfähigkeit $g_{leak} = 2/\rho h$ zugeordnet (aus Mitte $z = h/2$ des Schnitts), sodass eine Leckstromdichte $j_{leak} = g_{leak} V_{field}$ modelliert werden kann (Abb. 3.5). Das bedeutet, dass Strom sich nicht nur lateral im Hirnschnitt ausbreiten, sondern auch vertikal ans Bad abfließen kann. j_{leak} reduziert deshalb die neuronal generierte Stromquellendichte j_{source} , womit sich folgende Gleichung für einen Schichtleiter unter Berücksichtigung der Randbedingung an der Schnittoberseite ergibt:

$$\left(\frac{\partial^2 V_{field}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V_{field}}{\partial y^2} \right) = -r_{sheet} (j_{source} - j_{leak}) \quad (3.16)$$

Die laterale Ausdehnung des Hirnschnittes wird nach wie vor als unendlich angenommen ($V_{field} \rightarrow 0$ für $x, y \rightarrow \pm\infty$), d.h. kein lateraler Stromfluss ans Bad. Der dadurch gemachte

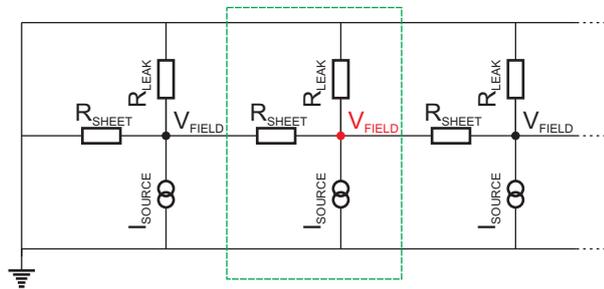


Abbildung 3.5: Schaltplan eines Schichtleiters mit Randbedingungen. Ein durch neuronale oder externe Stromquellen erzeugter Strom I_{source} kann über den Leckwiderstand R_{leak} an das auf Massepotential liegende Elektrolytbad abfließen oder sich lateral über die Widerstände R_{sheet} ausbreiten. Dadurch wird das Feldpotential V_{field} erzeugt. Gezeichnet ist die Seitenansicht dreier infinitesimaler Elemente des Schichtleiters, der sich sowohl weiter nach rechts als auch in die Papierebene hinein erstreckt (nicht gezeichnet).

absolute Fehler ist klein, weil wegen $l, b \gg h$ über die Fläche der Oberseite $O = l \cdot b$ wesentlich mehr Strom abfließen kann als über die Seitenfläche $S = 2h \cdot b + 2l \cdot b$.

Die synchrone Aktivierung der parallel orientierten CA1-Neurone erzeugt ein symmetrisches Feldpotential ($\frac{\partial V_{field}}{\partial y} = 0$), welches nur entlang der Soma-Dendrit-Achse ($:=x$) eine Ortsabhängigkeit aufweist. Um eine einfachere Parameterisierung der Differentialgleichung zu erreichen, wird außerdem die Längskonstante $\lambda_{sheet} = 1/\sqrt{g_{leak} \tau_{sheet}}$ eingeführt:

$$-\lambda_{sheet}^2 \frac{\partial^2 V_{field}}{\partial x^2} + V_{field} = \frac{j_{source}}{g_{leak}} \quad (3.17)$$

Für eine rechteckförmige Verteilung von Stromquellen der Breite $2x_0$ um den Ursprung:

$$j_{source} = \begin{cases} \text{const.} & |x| < x_0 \\ 0 & |x| > x_0 \end{cases} \quad (3.18)$$

kann die Gleichung analytisch gelöst werden [From 02]:

$$V_{field}(x) = \frac{j_{source}}{g_{leak}} \begin{cases} 1 - \exp\left(-\frac{x_0}{\lambda_{sheet}}\right) \cosh\left(\frac{|x|}{\lambda_{sheet}}\right) & |x| < x_0 \\ \sinh\left(\frac{x_0}{\lambda_{sheet}}\right) \exp\left(-\frac{|x|}{\lambda_{sheet}}\right) & |x| > x_0 \end{cases} \quad (3.19)$$

Um daraus einen realistischen Ortsverlauf hippocampaler Feldpotentiale berechnen zu können, wurde die folgende einfache, aber physiologisch sinnvolle Stromquellenverteilung verwendet:

Im Bereich der Dendriten (str. radiatum) kann Strom über postsynaptische Ionenkanäle in die Zellen einfließen und durch die Zellkörper (str. pyramidale) wieder austreten: im Intervall $200 \mu\text{m}$ bis $500 \mu\text{m}$ (Dendriten) sei $j_{source} = -13.3 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ also negativ, im Intervall $100 \mu\text{m}$ bis $200 \mu\text{m}$ (Somata) positiv: $j_{source} = 40 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$, sodass sich der Gesamtstrom zu Null addiert. Für einen Schnitt der Dicke $h = 70 \mu\text{m}$ [Besl 02] und des spezifischen Widerstandes $\rho = 300 \Omega\text{cm}$ [Lang 69] erhält man $g_{leak} = 9.5 \text{ nS}/\mu\text{m}^2$ und $\lambda_{sheet} = 50 \mu\text{m}$.

Setzt man jeweils die beiden konstanten Stromquellendichten in (3.19) ein, so erhält man zwei Lösungen (blaue Kurven in Abb. 3.6), die superponiert das zu erwartende Feldpotential entlang der Soma-Dendrit-Achse, in Abhängigkeit vom Ort beschreiben (rote Kurve). Die Amplitude j_{source}/g_{leak} ist schwarz gestrichelt gezeichnet. Der so theoretisch vorhergesagte Ortsverlauf der Feldpotentiale konnte experimentell mit einer Messgenauigkeit von $21 \mu\text{m}$ bestätigt werden [Besl 02].

Der Schichtleiter glättet die Stromquellenverteilung $j_{source}(x)$ also zu einem Feldpotential mit negativem Vorzeichen in str. radiatum und positivem Vorzeichen in str. pyramidale. Im

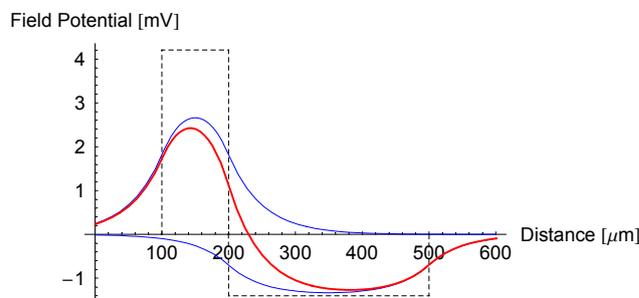


Abbildung 3.6: Ortsabhängigkeit des Feldpotentials generiert durch neuronale Stromquellen, berechnet aus dem Schichtleitermodell. Die ursächliche Stromquellendichte ist als Amplitude j_{source}/g_{leak} schwarz gestrichelt gezeichnet. Die beiden aus ihr resultierenden Feldpotentiale (blaue Kurven) werden zum Gesamtfeldpotential (rote Kurve) überlagert.

Übergangsbereich führt nach dieser Theorie eine kleine Ortsänderung von $dx_{field} = 20 \mu\text{m} \approx \lambda_{sheet}/2$ zu einer großen Änderung von $dV_{field} \approx 0.5 \text{ mV}$, also etwa 25% der Maximalamplitude. Diese theoretisch vorhergesagte, starke Ortsabhängigkeit verlangt nach einer Messmethode mit hoher räumlicher Auflösung (Abschnitt 3.1.2.5). Die theoretische Forderung wird auch durch die Experimente mit dem MTA-Chip in dieser Arbeit bestätigt.

3.2.2 Feldpotential generiert durch externe Stromquellen

Bis jetzt wurden nur neuronale Stromquellen als Ursache eines Feldpotentials betrachtet. Es ist jedoch auch möglich, über eine Wolframelektrode oder einen EOS-Kondensator einen Strom I_s an den Hirnschnitt abzugeben, der in Abb. 3.5 den neuronalen Strom I_{source} ersetzt und der ebenfalls ein Feldpotential zur Folge hat. Dieses ist von Interesse, da dadurch die Neurone des Schnitts zu Aktivität stimuliert werden können. Es ist also denkbar, dass man mit einem entsprechenden Modell Aussagen über die Wirkung verschiedener Stimulationsarten und -amplituden treffen könnte.

3.2.2.1 Differentialgleichung und Lösung

Wie sieht nun der Ortsverlauf eines, durch die extern zugeführte Stromquellendichte j_s erzeugten, Feldpotentials aus? Ausgangspunkt ist wieder das Schichtleitermodell aus Abschnitt 3.2.1 [From 02]:

$$\left(\frac{\partial^2 V_{field}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V_{field}}{\partial y^2} \right) = -r_{sheet}(j_s - j_{leak}) \quad (3.20)$$

Da in den Experimenten runde Kondensatoren verwendet werden, liegt es nahe, zu Zylinderkoordinaten überzugehen, wobei a den radialen Abstand von der Kondensatormitte angeben soll und λ_{sheet} und g_{leak} die schon aus Abschnitt 3.2.1 bekannten Größen sind:

$$-\lambda_{sheet}^2 \left(\frac{\partial^2 V_{field}}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial V_{field}}{\partial a} \right) + V_{field} = \frac{j_s}{g_{leak}} \quad (3.21)$$

Legt man an einen Kondensator des Radius a_0 und der spezifischen Kapazität c_s die Spannung V_s an, so fließt die Stromquellendichte:

$$j_s = \begin{cases} c_s \frac{\partial V_s}{\partial t} & a < a_0 \\ 0 & a > a_0 \end{cases} \quad (3.22)$$

Daraus kann unter Verwendung der modifizierten Besselfunktionen I_0, I_1, K_0, K_1 , das resultierende Feldpotential berechnet werden [From 02]:

$$V_{field}(a) = \frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t} \begin{cases} 1 - \frac{a_0}{\lambda_{sheet}} K_1 \left(\frac{a_0}{\lambda_{sheet}} \right) I_0 \left(\frac{a}{\lambda_{sheet}} \right) & a < a_0 \\ \frac{a_0}{\lambda_{sheet}} I_1 \left(\frac{a_0}{\lambda_{sheet}} \right) K_0 \left(\frac{a}{\lambda_{sheet}} \right) & a > a_0 \end{cases} \quad (3.23)$$

Setzt man konkrete Werte für einen TiO_2 -beschichteten Kondensator wie auf dem Eigenbauchip: $a_0 = 50 \mu\text{m}$, $c_s = 1.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Wall 06], $g_{leak} = 9.5 \text{ nS}/\mu\text{m}^2$, $\lambda_{sheet} = 50 \mu\text{m}$ sowie einen Spannungssprung $\Delta V_s = -2.0 \text{ V}$ der Dauer $\Delta t = 10 \mu\text{s}$ ein, so erhält man eine Amplitude $\frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t} = -380 \text{ mV}$, die in Abb. 3.7A schwarz gestrichelt gezeichnet ist. Das zugehörige Feldpotential (rot) zeigt einen negativen, glockenförmigen, über die Grenzen der Kondensatorfläche hinausreichenden Verlauf. Derartige negative Spannungssprünge, mit einhergehendem negativen Feldpotential, werden im experimentellen Teil zur kapazitiven

Stimulation von Hirnschnitten angewendet. Die grundlegende Form dieses Feldpotentialverlaufes über einer kreisförmigen Elektrode, sowie eine abnehmende Feldpotentialamplitude in positiver z-Richtung, konnte durch Messung im Volumenleiter „Elektrolytbad“ experimentell bestätigt werden [Nisc 94, Hutz 03].

Als weitere Anwendung von (3.23) soll nun noch das Feldpotential berechnet werden, das durch eine quasi-punktförmige Stromquelle entsteht. Über eine Wolframelektrode mit Spitzenradius $a_0 = 1 \mu\text{m}$ soll ein Strompuls von $\Delta I = I_s = -10 \mu\text{A}$ an den Hirnschnitt abgegeben werden, also eine Stromquellendichte $j_s \approx -3 \mu\text{A}/\mu\text{m}^2$. Als Näherung wird angenommen, dass die Fläche die die Elektrode im Schichtleiter einnimmt ($3 \mu\text{m}^2$) vernachlässigbar ist, und damit die Verdrängung des Gewebes nicht berücksichtigt werden muss. Ersetzt man in (3.23) die kapazitive ($c_s \frac{\partial V_s}{\partial t}$) durch die ohmsche Stromquellendichte (j_s), so erhält man daraus das rote Feldpotential in Abb. 3.7B. Es fällt sehr viel schneller gegen Null ab, als das durch den Kondensator erzeugte.

Ab einem, an den Kondensator angelegten Spannungssprung von etwa $\Delta V_s = -2.0 \text{ V}$ oder einem, über die Wolframelektrode abgegebenen Strompuls von $\Delta I = -10 \mu\text{A}$ konnten Hirnschnitte *experimentell* zu Aktivität angeregt und ein evoziertes, neuronales Feldpotential nachgewiesen werden. Dies begründet die oben gewählten Parameter. Die Amplituden dieser kritischen Feldpotentiale der beiden Stimulationsverfahren liegen dicht beieinander.

Welche Wirkung haben diese, durch eine externe Stromquelle erzeugten, *negativen* Feldpotentiale nun auf die Neuronen des Hirnschnittes? Warum setzt gerade bei den oben beschriebenen Reizstärken neuronale Aktivität ein?

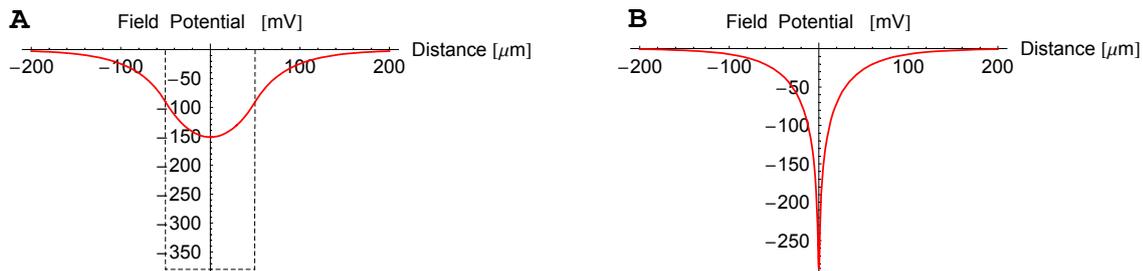


Abbildung 3.7: Ortsabhängigkeit des Feldpotentials generiert durch externe Stromquellen, berechnet aus dem Schichtleitermodell. (A) Kondensatorstimulation. Die ursächliche Stromquellendichte ist als Amplitude $\frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t}$ schwarz gestrichelt gezeichnet. Die rote Kurve zeigt den Verlauf des resultierenden Feldpotentials. (B) Wolframelektrodenstimulation. Gleiches Farbschema, keine Amplitude j_s/g_{leak} eingezeichnet.

3.2.2.2 Modell zur Stimulation von Neuronen

Ein Neuron des Durchmessers d befinde sich in einem Hirnschnitt am Ort (a_0, ϕ_0, z_0) . Über eine Wolframelektrode oder einen Kondensator werde bei $(a_0, \phi_0, 0)$ nach dem Schichtleitermodell (3.23) das Feldpotential $V_{field}(a_0)$ erzeugt (Abb. 3.8). Da die Oberseite $z = h$ des Hirnschnittes auf Massepotential liegt, entsteht ein vertikaler, linearer Spannungsgradient im Volumenleiter Hirnschnitt von $\partial V_{field}/\partial z|_{a_0, \phi_0} = V_{field}(a_0)/h$. Über das gesamte Neuron fällt damit die Spannung $V_{field}(a_0)/h \cdot d$ ab. Da die Zellmembran einen wesentlich größeren spezifischen Widerstand hat als das Intrazellulärmedium, ändert sich, im stationären Fall, praktisch nur dort die Spannung. D.h. durch den Reiz wird die Membran auf einer Seite des Neurons um

$$\Delta V_m = \frac{V_{field}(a_0)}{h} \cdot d \cdot \frac{1}{2} \quad (3.24)$$

de- auf der anderen um den gleichen Wert hyperpolarisiert. Überschreitet die Depolarisation den kritischen Wert: $\Delta V_m > \Delta V_m^{crit}$, so wird das Neuron ein Aktionspotential ausbilden und neuronale Aktivität im Schnitt entstehen. Im letzten Abschnitt wurden die, zu experimentell ermittelten, kritischen Stimuli gehörigen Feldpotentiale berechnet (Abb. 3.7). Verwendet man nun typische Werte: $V_{field}^{crit} \approx -140$ mV, $h = 70$ μm und $d = 20$ μm , so erhält man daraus $|\Delta V_m^{crit}| \approx 20$ mV.

Der Mechanismus der Stimulation von Neuronen durch ein externes Feldpotential (z.B. Elektroporation oder das direkte Öffnen spannungsabhängiger Ionenkanäle) ist noch unklar [From 03]. Mit dem vorgestellten, sehr einfachen Modell, kann aber aus dem kritischen, externen Feldpotential auf einen realistischen Wert für eine Membrandepolarisation geschlossen werden, die ein Aktionspotential auslösen würde.

Zusammenfassend wird also ein am Ort a_0 befindliches Neuron genau dann ein Aktionspotential ausbilden, wenn das lokale Feldpotential $V_{field}(a_0)$ eine kritische Amplitude V_{field}^{crit} überschreitet:

$$|V_{field}(a_0)| > |V_{field}^{crit}| \quad (3.25)$$

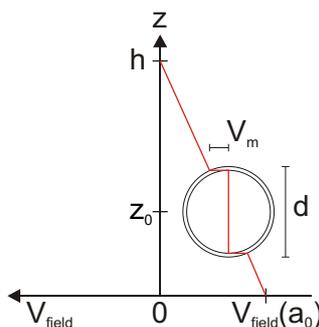


Abbildung 3.8: Ein Neuron im Hirnschnitt, stimuliert durch den Spannungsabfall ΔV_m über die Membran, erzeugt durch das Feldpotential $V_{field}(a_0)$.

3.2.2.3 Kritischer Radius

Wie man in Abb. 3.7A aus dem Ortsverlauf des Feldpotentials bei externer Stimulation $V_{field}(a)$ erkennt, wird die Bedingung (3.25): $|V_{field}(a)| > |V_{field}^{crit}|$ immer innerhalb eines „kritischen Radius“ erfüllt sein. Nimmt a langsam zu, so wird der kritische Radius a^{crit} genau dann erreicht, wenn $V_{field}(a^{crit}) = V_{field}^{crit}$. Anschaulich definiert der kritische Radius also eine Fläche $(a^{crit})^2\pi$ des Hirnschnittes, innerhalb derer alle Neurone ein Aktionspotential ausbilden.

Da $V_{field}(a)$ von der angelegten Reizstärke abhängt, wird dies auch für den kritischen Radius zutreffen. Im folgenden Abschnitt wird eine Funktion $a^{crit}(\Delta V_s)$ abgeleitet werden, die einem gegebenen Spannungssprung ΔV_s , angelegt an einen Kondensator, einen kritischen Radius a^{crit} zuordnet.

Ausgangspunkt ist das durch einen kreisförmigen Kondensator generierte Feldpotential, wie es sich aus dem Schichtleitermodell ergibt:

$$V_{field}(a) = \frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t} \begin{cases} 1 - \frac{a_0}{\lambda_{sheet}} K_1\left(\frac{a_0}{\lambda_{sheet}}\right) I_0\left(\frac{a}{\lambda_{sheet}}\right) & a < a_0 \\ \frac{a_0}{\lambda_{sheet}} I_1\left(\frac{a_0}{\lambda_{sheet}}\right) K_0\left(\frac{a}{\lambda_{sheet}}\right) & a > a_0 \end{cases} \quad (3.26)$$

Um die notwendigen Umformungen kompakt zu halten, wird wie folgt substituiert:

$$\begin{aligned} V_{stim} &= \frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t} & \tilde{a} &= \frac{a}{\lambda_{sheet}} \\ \tilde{a}_0 &= \frac{a_0}{\lambda_{sheet}} & \tilde{a}^{crit} &= \frac{a^{crit}}{\lambda_{sheet}} \end{aligned}$$

Damit soll nun beschrieben werden, wie sich der kritische Radius als Funktion der Kondensatorspannung verhält. Erhöht man $|V_{stim}|$, so nimmt nach (3.26) auch die Amplitude des entsprechenden Feldpotentials proportional zu. Bei unterkritischen Stimuli ist der Hirnschnitt noch nicht aktiv. Vergrößert man die Amplitude $|V_{stim}|$ weiter, so wird der kritische Wert V_{field}^{crit} , wie in Abb. 3.9A gezeigt, zuerst im Zentrum des Kondensators erreicht ($a = 0$ im Bereich $a < a_0$ von (3.26)) und zwar genau bei der Amplitude V_{stim}^{crit} . Es wird also genau ein Punkt des Hirnschnitts, nämlich die Mitte des Kondensators aktiv, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$V_{field}^{crit} = V_{stim}^{crit} [1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0) \underbrace{I_0(\tilde{a} = 0)}_{=1}] \quad (3.27)$$

Wird die Amplitude $|V_{stim}|$ weiter vergrößert, so nimmt das Feldpotential innerhalb einer Scheibe mit Radius a^{crit} um das Kondensatorzentrum überkritische Werte an (blaue und grüne Kurven in Abb. 3.9B). Das heißt, die Amplitude V_{stim} erzeugt im radialen Abstand a^{crit} genau dann das kritische Feldpotential V_{field}^{crit} , wenn gilt:

$$V_{field}^{crit} = V_{stim} \begin{cases} 1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0) I_0(\tilde{a}^{crit}) & \tilde{a}^{crit} < \tilde{a}_0 \\ \tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0) K_0(\tilde{a}^{crit}) & \tilde{a}^{crit} > \tilde{a}_0 \end{cases} \quad (3.28)$$

Die unbekannte Größe V_{field}^{crit} wird durch Gleichsetzen von (3.27) mit (3.28) eliminiert:

$$\frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} [1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)] = \begin{cases} 1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0) I_0(\tilde{a}^{crit}) & \tilde{a}^{crit} < \tilde{a}_0 \\ \tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0) K_0(\tilde{a}^{crit}) & \tilde{a}^{crit} > \tilde{a}_0 \end{cases} \quad (3.29)$$

Löst man nach $I_0(\tilde{a}^{crit})$ und $K_0(\tilde{a}^{crit})$ auf, so erhält man zwei Gleichungen, die nur noch implizit von \tilde{a}^{crit} abhängen, d.h. die Fallunterscheidung muss nun die explizite Abhängigkeit

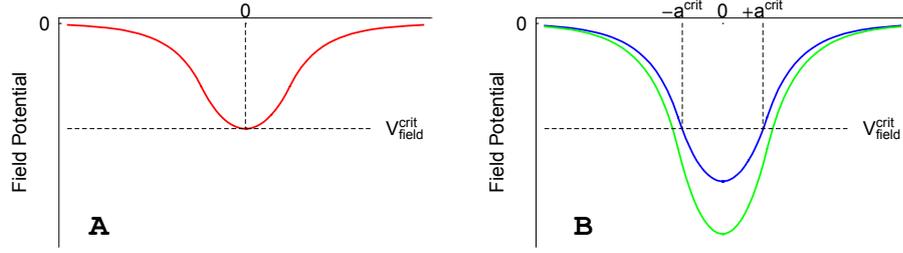


Abbildung 3.9: Kritisches Feldpotential und kritischer Radius im Schichtleitermodell. (A) Das kritische Feldpotential V_{field}^{crit} wird zuerst in der Kondensatormitte $a = 0$ bei der Amplitude V_{stim}^{crit} erreicht. (B) Für Amplituden $|V_{stim}| > |V_{stim}^{crit}|$ definiert das Schichtleitermodell einen kritischen Radius a^{crit} innerhalb dessen das kritische Feldpotential überschritten wird.

von V_{stim} berücksichtigen. Die Amplitude, bei der der kritische Radius den Kondensatorradius erreicht, wird mit V_{stim}^{limit} bezeichnet:

$$I_0(\tilde{a}^{crit}) = \frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)} + \left(1 - \frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}\right) \cdot \frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} \quad |V_{stim}| < |V_{stim}^{limit}| \quad (3.30)$$

$$K_0(\tilde{a}^{crit}) = \frac{1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}{\tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0)} \cdot \frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} \quad |V_{stim}| > |V_{stim}^{limit}| \quad (3.31)$$

Die Gleichungen (3.30) und (3.31) können weiter unter Verwendung der Umkehrfunktionen der modifizierten Besselfunktionen I_0^{-1} und K_0^{-1} nach \tilde{a}^{crit} aufgelöst werden. Es tritt dabei das Problem auf, dass $I_0^{-1}(z)$ für $z < 1$ imaginär ist, wie im Anhang C.1 in der Näherung (C.3) gezeigt ist. Mit $V_{stim} < 0$, $a_0 = 50 \mu\text{m}$ und $\lambda_{sheet} = 50 \mu\text{m}$ gilt für das Argument von I_0^{-1} :

$$\frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)} + \left(1 - \frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}\right) \cdot \frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} < 1 \Leftrightarrow V_{stim} > V_{stim}^{crit} \quad (3.32)$$

Der kritische Radius ist daher bisher im Intervall $|V_{stim}| < |V_{stim}^{crit}|$ nicht reell. Dies wird durch die nahe liegende Definition $\tilde{a}^{crit} = 0$ behoben:

$$\tilde{a}^{crit} = \begin{cases} 0 & |V_{stim}| < |V_{stim}^{crit}| \\ I_0^{-1} \left[\frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)} + \left(1 - \frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}\right) \cdot \frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} \right] & |V_{stim}^{crit}| < |V_{stim}| < |V_{stim}^{limit}| \\ K_0^{-1} \left[\frac{1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}{\tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0)} \cdot \frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} \right] & |V_{stim}| > |V_{stim}^{limit}| \end{cases} \quad (3.33)$$

In (3.34) wird nun das Verhältnis $\frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}}$ untersucht: Die spezifische Kapazität c_s des Kondensators (als spannungsunabhängig angenommen) sowie die spezifische Leckleitfähigkeit g_{leak} des Hirnschnittes können gekürzt werden. Für einen rampenförmigen Zeitverlauf (Spannungssprung ΔV_s , Dauer Δt) der Stimulationsspannung $V_s(t)$ kann der Differentialquotient durch einen Differenzenquotienten ersetzt werden. Wenn die Sprünge ΔV_s und ΔV_s^{crit} gleich schnell erfolgen, also $\Delta t(\Delta V_s) = \Delta t(\Delta V_s^{crit})$, dann kann die Dauer des Spannungssprungs ebenfalls gekürzt werden:

$$\frac{V_{stim}^{crit}}{V_{stim}} = \frac{\frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s^{crit}}{\partial t}}{\frac{c_s}{g_{leak}} \frac{\partial V_s}{\partial t}} = \frac{\frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta t(\Delta V_s^{crit})}}{\frac{\Delta V_s}{\Delta t(\Delta V_s)}} = \frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta V_s} \quad (3.34)$$

Rücksubstitution zum realen kritischen Radius und Anpassen der Fallunterscheidung an das neue Argument ΔV_s der Funktion liefert:

$$a^{crit} = \lambda \cdot \begin{cases} 0 & |\Delta V_s| < |\Delta V_s^{crit}| \\ I_0^{-1} \left[\frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)} + \left(1 - \frac{1}{\tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)} \right) \cdot \frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta V_s} \right] & |\Delta V_s^{crit}| < |\Delta V_s| < |\Delta V_s^{limit}| \\ K_0^{-1} \left[\frac{1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}{\tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0)} \cdot \frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta V_s} \right] & |\Delta V_s| > |\Delta V_s^{limit}| \end{cases} \quad (3.35)$$

Die Größe ΔV_s^{limit} ist noch unbekannt. Gesucht wird nun also der Spannungssprung ΔV_s^{limit} bei dem der kritische Radius \tilde{a}^{crit} für einen gegebenen kritischen Spannungssprung ΔV_s^{crit} den Kondensatorradius \tilde{a}_0 erreicht. Dies ist genau dann der Fall, wenn in (3.31) $\tilde{a}^{crit} = \tilde{a}_0$ gilt, mit der Vereinfachung von (3.34):

$$K_0(\tilde{a}_0) = \frac{1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}{\tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0)} \cdot \frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta V_s^{limit}} \quad (3.36)$$

Auflösen nach ΔV_s^{limit} :

$$\Delta V_s^{limit} = \frac{1 - \tilde{a}_0 K_1(\tilde{a}_0)}{\tilde{a}_0 I_1(\tilde{a}_0) K_0(\tilde{a}_0)} \cdot \Delta V_s^{crit} \quad (3.37)$$

Mit (3.35) und (3.37) kann der kritische Radius a^{crit} als Funktion des an den Kondensator angelegten Spannungssprungs ΔV_s berechnet werden. In Abb. 3.10 ist der auf a_0 normierte kritische Radius a^{crit} gezeichnet, als Funktion des auf ΔV_s^{crit} normierten Spannungssprunges ΔV_s . Dazu mussten die im Anhang C.1 beschriebenen Näherungsausdrücke für die Umkehrfunktionen I_0^{-1} und K_0^{-1} in (3.35) gefunden werden. Der Kurvenverlauf ähnelt im überkritischen Bereich dem einer Wurzelfunktion.

Die Bedeutung des kritischen Radius wird im nächsten Abschnitt erklärt.

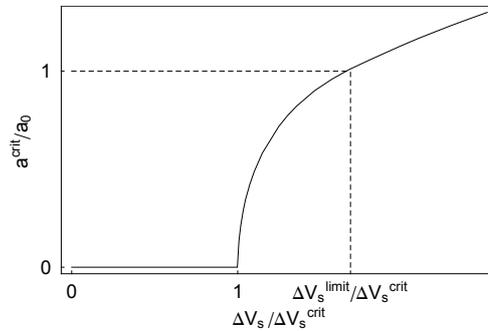


Abbildung 3.10: Normierter kritischer Radius als Funktion des normierten Kondensator-Spannungssprungs. Bei ΔV_s^{limit} erreicht der kritische Radius den Kondensatorrand: $a^{crit} = a_0$ (gestrichelt). Es wurde $a_0 = \lambda$ verwendet.

3.2.3 Input-Output-Relation

Unter einer Input-Output-Relation wird in dieser Arbeit eine Beziehung verstanden, die einer bestimmten in CA3 applizierten Kondensatorspannung (Input), eine pEPSP-Amplitude (Output) in CA1 zuordnet.

Der folgende Abschnitt wird zeigen, dass es möglich ist, aus der Spannungsabhängigkeit des kritischen Radius $a^{crit}(\Delta V_s)$ eine derartige Beziehung abzuleiten. Da die Input-Output-Relation experimentell zugänglich ist, kann die Theorie auch überprüft werden.

3.2.3.1 Ableitung

In Abb. 3.11A ist skizziert, wie ein zunehmender kritischer Radius eine zunehmende Feldpotentialamplitude bewirkt. Dies soll nun formalisiert werden. Die Anzahl N^{crit} an CA3-Neuronen (Annahme Monolayer), die durch ΔV_s überkritisch stimuliert werden, ist in Zylinderkoordinaten mit der Neuronendichte $\rho(a, \phi)$ gegeben durch das Integral:

$$N^{crit} = \int_0^{a^{crit}(\Delta V_s)} \int_0^{2\pi} \rho(a, \phi) \cdot a \cdot da d\phi \quad (3.38)$$

Da die Koordinaten (a_i, ϕ_i) der Neurone im Hirnschnitt unbekannt sind, wird vereinfachend angenommen, dass sie in einem regelmäßigen hexagonalen Gitter (Abb. 3.11B) angeordnet sind und daher eine konstante Dichte $\rho(a, \phi) = \rho = const.$ haben. Die Neurone sollen genau dann aktiviert werden, wenn der kritische Radius den Mittelpunkt des Neurons erreicht. Da nur diskrete Werte für N^{crit} sinnvoll sind, wird die round-Funktion angewendet, die ihr Argument auf ganze Zahlen rundet, womit folgt:

$$N^{crit} = \text{round} [\rho(a^{crit})^2 \pi] \quad (3.39)$$

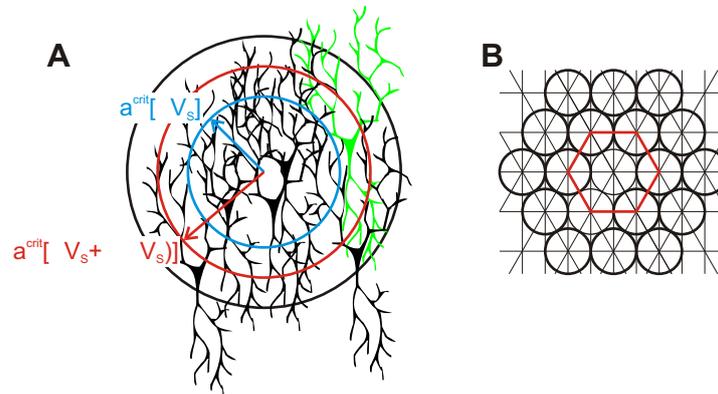


Abbildung 3.11: Illustration des Zusammenhangs zwischen kritischem Radius und Feldpotentialamplitude. (A) Einige Neurone des Hirnschnittes befinden sich auf dem schwarz gezeichneten, kreisförmigen Kondensator. Legt man einen Spannungssprung ΔV_s an den Kondensator an, so werden alle Neurone innerhalb $a^{crit}(\Delta V_s)$ (blauer Kreis) stimuliert und zum Feldpotential beitragen. Vergrößert man den Spannungssprung um $\Delta(\Delta V_s)$, so vergrößert man den kritischen Radius auf $a^{crit}[\Delta V_s + \Delta(\Delta V_s)]$ (roter Kreis). Liegt ein Neuron in der hinzugewonnenen Fläche (grün markiert), so wird auch dieses zum Feldpotential beitragen und es um $\langle V_{field}^{single} \rangle$ vergrößern. (B) Im vereinfachten theoretischen Modell seien die Neurone in einem regelmäßigen hexagonalen Gitter angeordnet.

Jedes so stimulierte CA3-Neuron bilde Aktionspotentiale aus, die über die Schaffer-kollaterale eine Gruppe von Synapsen in CA1 aktivieren. Jedes CA3-Neuron habe die gleiche Anzahl an Synapsen, die homogen entlang des stratum radiatum verteilt seien und die gleiche Stärke besitzen sollen. Durch das Feuern *eines* CA3-Neurons wird am Ort \vec{r}_0 in CA1 durch den Transmembranstrom die mittlere Stromquellldichte $\langle j_{source}^{single} \rangle$ generiert werden. Für eine unabhängige Population aus N^{crit} Neuronen ergibt sich folgende Stromquellldichte in CA1:

$$j_{source} = \langle j_{source}^{single} \rangle \cdot N^{crit} \quad (3.40)$$

Da nach dem Schichtleitermodell das Feldpotential aus neuronal generierten Stromquellen an einem Ort \vec{r}_0 proportional zur Stromquellldichte ist: $V_{field} \sim j_{source}$, folgt auch, dass:

$$V_{field} = \langle V_{field}^{single} \rangle \cdot N^{crit} \quad (3.41)$$

wobei $\langle V_{field}^{single} \rangle$ das durch $\langle j_{source}^{single} \rangle$ erzeugte Feldpotential sei. Das Gesamtfeldpotential ergibt sich also aus dem mittleren Feldpotential generiert durch ein Einzelneuron, multipliziert mit der Anzahl beitragender Neurone. Einsetzen von (3.39) in (3.41) liefert:

$$V_{field} = \langle V_{field}^{single} \rangle \cdot \text{round} \{ \rho [a^{crit}(\Delta V_s)]^2 \pi \} \quad (3.42)$$

Die Gleichungen (3.35), (3.37) und (3.42) beschreiben damit vollständig die CA3-CA1 Input-Output-Beziehung (Abb. 3.12).

3.2.3.2 Diskussion

Allgemeiner Fall:

Die oben abgeleitete Formel (3.42) stellt einen Zusammenhang her, zwischen dem am Kondensator angelegten Spannungssprung ΔV_s und dem zu erwartenden neuronalen Feldpotential V_{field} .

Nimmt der Spannungssprung um $\Delta(\Delta V_s)$ zu und befindet sich kein Neuron innerhalb des Ringes mit Innenradius $a^{crit}(\Delta V_s)$ und Außenradius $a^{crit}[\Delta V_s + \Delta(\Delta V_s)]$ (Abb. 3.11) das zur Bildung eines Aktionspotentials angeregt werden könnte, so ändert sich V_{field} nicht, eine Plateauphase entsteht. Wird aber ein weiteres Neuron aktiv, so nimmt das Feldpotential um $\langle V_{field}^{single} \rangle$ zu, ein Sprung tritt auf. Mathematisch wurde dies durch Einführen der round-Funktion realisiert. Mit kontinuierlich ansteigender Reizstärke sollte daher das Feldpotential *diskontinuierlich* oder *sprungartig* zunehmen (Abb. 3.12).

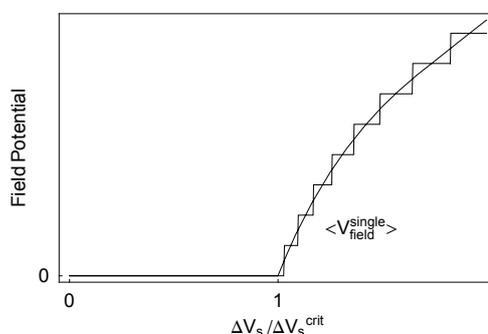


Abbildung 3.12: Input-Output-Relation. Die kontinuierliche Kurve zeigt den Fall einer großen Anzahl stimulierter Neurone, die Kurve mit Stufen der Höhe $\langle V_{field}^{single} \rangle$ zeigt den Fall einer kleineren Anzahl (8).

Falls das Signal/Rausch-Verhältnis der experimentell verwendeten Messmethode groß genug ist um $\langle V_{field}^{single} \rangle$ aufzulösen, so sollten in der Input-Output-Relation nach diesem einfachen Modell *Quantisierungen* sichtbar sein.

Näherung für $\langle V_{field}^{single} \rangle \ll V_{field}$:

Ist N^{crit} sehr groß, tragen also viele Neurone bei um V_{field} zu erzeugen, so ist der individuelle Beitrag $\langle V_{field}^{single} \rangle$ relativ klein und die Diskretisierung durch die Rundungsfunktion kann vernachlässigt werden. In diesem Grenzfall würde der Schnitt auf eine kontinuierlich ansteigende Reizstärke also mit einer quasikontinuierlichen Antwortamplitude reagieren (Abb. 3.12). Mit der Amplitude $A := \langle V_{field}^{single} \rangle \rho \pi$ folgt eine vereinfachte, kontinuierliche Darstellung von (3.42):

$$V_{field} = A \cdot [a^{crit}(\Delta V_s)]^2 \quad (3.43)$$

Im experimentellen Teil werden sowohl (3.42) als auch (3.43) auf ihre Gültigkeit hin verifiziert.

3.3 Simulation: 1D-Modell eines Einzelneurons im Hirnschnitt

In allen bisher beschriebenen quantitativen Feldpotentialmodellen wurde nur deren Ortsabhängigkeit $V_{field}(\vec{r})$ betrachtet. In diesem Abschnitt wird eine eigene numerische Simulation vorgestellt, die ein mit dem MTA-Chip gemessenes, lineares Profil $V_{field}(x, t)$ theoretisch beschreiben kann.

3.3.1 Ziel und Konzept

1985 fasste Mitzdorf [Mitz 85] die Ziele der Forschung auf dem Gebiet der Feldpotentiale zusammen:

„Es könnten Wechselwirkungsphänomene aufgeklärt werden, die über Einzelzellstudien nicht zugänglich sind und damit ein besseres Verständnis höherer Ebenen der intracortikalen Informationsverarbeitung erreicht werden. Durch die Kombination von Feldpotentialdaten mit Ergebnissen der Anatomie und Einzelzelluntersuchungen, könnte es auch möglich sein, die Lücke zwischen der mikroskopischen Beschreibung auf Einzelzellebene und der makroskopischen Beschreibung auf der Ebene von Feldpotentialen zu schließen.“

Nur in sehr wenigen Arbeiten (z.B. [Alme 98, Sarg 01, Sarg 04]) wurde versucht, diese Idee zu realisieren, also den raumzeitlichen Verlauf von Feldpotentialen aus der elektrophysiologischen Aktivität von Einzelzellen heraus zu erklären. Dies wird nun getan, indem ein einzelnes Neuron modelliert wird, das im makroskopisch homogenen Hirnschnitt (Abschnitt 3.1.2) eingebettet ist.

Ausgehend von einem biologischen Modell des Hippocampus (angeordnete Neurone) wird über Abb. 3.13 ein radikal vereinfachtes physikalisches Modell (Ersatzschaltbild: gekoppelte eindimensionale Leiter) erstellt und daraus ein mathematisches Modell (partielle Differentialgleichungen) abgeleitet. Diese Gleichungen werden über ein iteratives numerisches Verfahren mittels eines in der Programmiersprache C verfassten Programmes gelöst.

3.3.2 Vom biologischen zum mathematischen Modell

Ein Hirnschnitt besteht aus einem Netzwerk von Neuronen, Interneuronen und Gliazellen, die durch Extrazellulärmedium voneinander abgegrenzt sind. Interneurone und Glia werden nicht modelliert, da deren Dichte und Einfluss auf das Feldpotential klein sein sollte [Alme 98, Sarg 01].

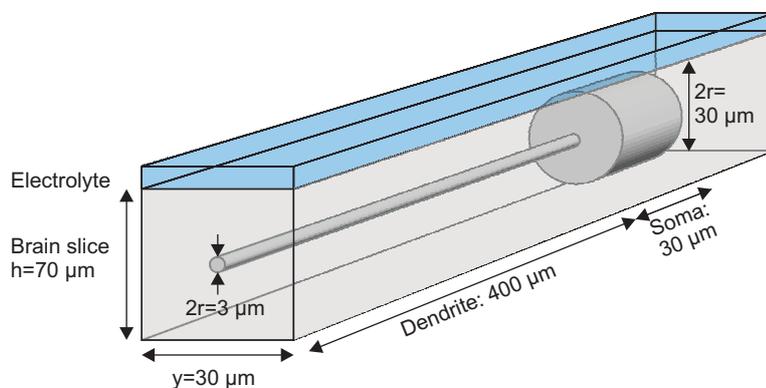


Abbildung 3.13: Modellsystem für numerische Simulation. Ein zylindrisches Neuron befindet sich in einem Hirnschnitt der mit einem Elektrolytbad bedeckt ist. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu.

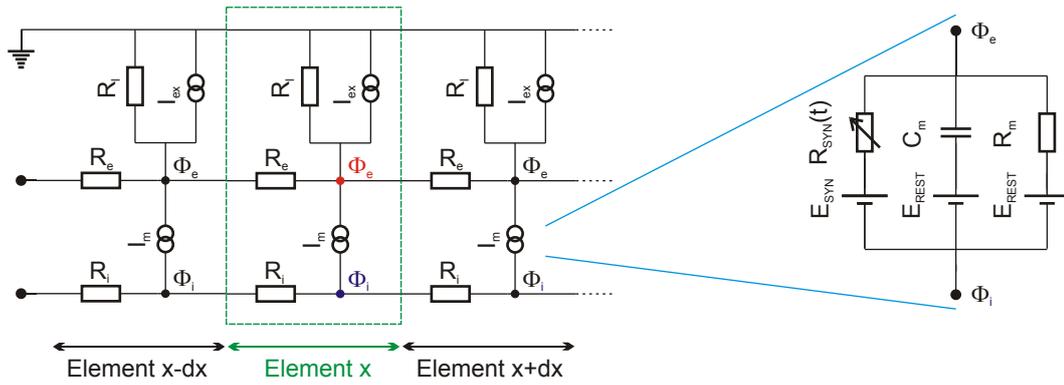


Abbildung 3.14: Ersatzschaltbild für numerische Simulation. Links: Gezeichnet sind drei infinitesimale Elemente am linken Ende eines eindimensionalen Modellneurons (unten) das an einen Leiter (mittig) gekoppelt ist. Rechts: Ersatzschaltbild für den Transmembranstrom.

Die zu simulierende CA-Region wird also durch ein Monolayer identischer, parallel angeordneter Neurone [Sarg 01] repräsentiert, die lokal synchron aktiviert werden [Hols 87, Sarg 01, Sarg 04]. Grundbaustein der Simulation ist also ein einzelnes Modellneuron, eingebettet im homogenen Medium Hirnschnitt, bedeckt mit einem leitenden Elektrolytbad (Abb. 3.13). Verzweigungen des Dendritenbaumes werden nicht berücksichtigt. Wie kann dieses biologische System nun in Form eines elektrischen Ersatzschaltbildes eindimensional modelliert werden?

Ein aktives Neuron bildet einen Transmembranstrom $I_m(x, t)$ aus (Abb. 3.14), der sich intrazellulär über den Widerstand $R_i(x)$ bis zu den Grenzen des Neurons ausbreiten kann, dort aber nicht abfließt (sealed-end boundary condition). Extrazellulär kann der Strom über den Widerstand R_e des homogenen Mediums Hirnschnitt bis zu dessen Grenzen fließen (ebenfalls sealed-end boundary condition), oder über den Widerstand $R_l(x)$ durch die Grenzfläche Hirnschnitt-Elektrolytbad an die auf Massepotential liegende Badelektrode abfließen. Es soll außerdem möglich sein, über $I_{ex}(x, t)$ einen extern applizierten Strom in den Extrazellulärraum abzugeben. Damit könnte die Wirkung einer Wolframelektroden- oder Kondensatorstimulation auf die Transmembranpotential des Modellneurons untersucht werden. Das elektrische Potential im Zellinneren sei $\Phi_i(x, t)$, das im Extrazellulärraum $\Phi_e(x, t)$.

Aus dem Ersatzschaltbild 3.14 kann ein mathematisches Modell in Form zweier gekoppelter partieller Differentialgleichungen abgeleitet werden (Anhang C.2). Die oben beschriebenen Parameter gehen in längenspezifischer Form (klein gedruckt) ein:

$$\begin{aligned} \frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 \Phi_e(x, t)}{\partial x^2} &= -j_m(x, t) + j_{ex}(x, t) + j_l(x, t) \\ \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{1}{r_i(x)} \frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \right] &= j_m(x, t) \end{aligned} \quad (3.44)$$

Die Transmembranpotential ist dann:

$$V_m(x, t) = \Phi_i(x, t) - \Phi_e(x, t) \quad (3.45)$$

Das Feldpotential ist die Potentialdifferenz zwischen Extrazellulärraum und Masse:

$$V_{field}(x, t) = \Phi_e(x, t) \quad (3.46)$$

3.3.3 Parameter und synaptische Leitfähigkeit

Es werden nun die in den Differentialgleichungen (3.44) auftretenden längenspezifischen Parameter, aus geometrischen und spezifischen Größen anhand Abb. 3.13 abgeleitet.

3.3.3.1 Längenspezifische Parameter

Der Hirnschnitt wird als resistives Medium der Länge x , Breite y , Dicke h und des spezifischen Widerstandes ρ betrachtet. Er hat also in x -Richtung den Widerstand pro Länge $r_e = \frac{\rho}{hy}$. Über den Leckwiderstand $r_l(x) = \frac{\rho h}{2y}$ kann Strom aus der Mitte $h/2$ des Hirnschnittes an das Elektrolytbad abfließen.

Der Dendritenbaum und der Zellkörper des Modellneurons seien zylinderförmig, mit Radius $r(x)$. Will man eine längenspezifische Stromdichte $j_m(x, t)$ (Einheit $[\frac{A}{m}]$) aus der Transmembranstromdichte (Einheit $[\frac{A}{m^2}]$) erhalten, so sind die Parameter, die die elektrischen Eigenschaften des Modellneurons beschreiben, über eine Scheibe des Zylinders aufzuintegrieren. Der spezifische Widerstand ρ_i des Intrazellulärmediums, der spezifische Membranwiderstand ρ_m sowie die flächenspezifische Membrankapazität C_m bestimmen dann die längenspezifischen Größen $r_i(x)$, $r_m(x)$ sowie $c_m(x)$. Neben diesen Größen sind in der folgenden Tabelle auch noch weitere, für die Simulation wichtige Parameter definiert:

r_e	$= \frac{\rho}{hy}$	Widerstand Hirnschnitt
$r_l(x) = 1/g_l(x)$	$= \frac{\rho h}{2y}$	Leckwiderstand Hirnschnitt-Elektrolytbad
$r_i(x)$	$= \frac{\rho_i}{r(x)^2\pi}$	Widerstand Intrazellulärmedium
$r_m(x) = 1/g_m(x)$	$= \frac{\rho_m}{2r(x)\pi}$	Widerstand Zellmembran
$c_m(x)$	$= 2r(x)\pi C_m$	Kapazität Zellmembran
$j_m(x, t)$		Transmembranstromdichte
$j_{ex}(x, t)$		Extern applizierte Stromdichte
$r_{syn}(x, t) = 1/g_{syn}(x, t)$		Synaptischer Widerstand
E_{rest}		Ruhepotential Zelle
E_{syn}		Umkehrpotential Synapsen

Mit Hilfe von Abb. 3.14 rechts kann damit die Transmembranstromdichte wie folgt ausgedrückt werden:

$$j_m(x, t) = c_m(x) \frac{\partial}{\partial t} [V_m(x, t) - E_{rest}] + g_m(x) [V_m(x, t) - E_{rest}] + g_{syn}(x, t) [V_m(x, t) - E_{syn}] \quad (3.47)$$

Es werden also sowohl passive als auch aktive synaptische Ströme durch die Membran berücksichtigt. Die komplexe Orts- und Zeitabhängigkeit der synaptischen Leitfähigkeit $g_{syn}(x, t)$ wird in einem eigenen Abschnitt beschrieben.

Die Leckstromdichte an das Elektrolytbad ist:

$$j_l(x, t) = g_l(x) \Phi_e(x, t) \quad (3.48)$$

3.3.3.2 Synaptische Leitfähigkeit $g_{syn}(x, t)$

Die exzitatorische synaptische Übertragung von CA3 zu CA1 erfolgt im Hippocampus dominant über AMPA- und NMDA-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle, deren Dynamik den Verlauf der Feldpotentiale entscheidend bestimmt. Der durch AMPA- und NMDA-Kanäle fließende synaptische Strom ist:

$$I_{syn}(x, t) = g_{AMPA}(x, t)[V_m(x, t) - E_{AMPA}] + g_{NMDA}(x, t)[V_m(x, t) - E_{NMDA}] \quad (3.49)$$

Das Umkehrpotential ist für beide Kanäle gleich [Sarg 01]: $E_{syn} := E_{AMPA} = E_{NMDA}$. Die Leitfähigkeiten können in einen orts- und einen zeitabhängigen Anteil separiert werden:

$$g_{AMPA/NMDA}(x, t) = g_{AMPA/NMDA}(x) \cdot g_{AMPA/NMDA}(t) \quad (3.50)$$

Damit vereinfacht sich (3.49) zu:

$$I_{syn}(x, t) = \underbrace{[g_{AMPA}(x)g_{AMPA}(t) + g_{NMDA}(x)g_{NMDA}(t)]}_{:=g_{syn}(x, t)} [V_m(x, t) - E_{syn}] \quad (3.51)$$

Ortsabhängigkeit:

Die räumliche Verteilung der AMPA- und NMDA-Kanäle über den Dendritenbaum soll durch die beiden Funktionen:

$$g_{AMPA}(x) = g_{max,AMPA} \cdot e^{-a(x-x_0)^2} \quad (3.52)$$

$$g_{NMDA}(x) = g_{max,NMDA} \cdot e^{-a(x-x_0)^2} \quad (3.53)$$

dargestellt werden (Abb. 3.15A). Beide Kanaltypen seien also gleich und gaußförmig mit der durch a bestimmten Breite um die Mitte x_0 des Dendritenbaums verteilt, mit den Amplituden $g_{max,AMPA}$ bzw. $g_{max,NMDA}$.

Zeitabhängigkeit:

Die Dynamik der AMPA-Kanäle wird beschrieben durch [Sarg 01]:

$$g_{AMPA}(t) = A \cdot [e^{-(t-t_0)/\tau_2} - e^{-(t-t_0)/\tau_1}] \quad (3.54)$$

τ_1 und τ_2 sind Zeitkonstanten, die Anstieg und Abfall der Kanalleitfähigkeit beschreiben. Die Kanäle öffnen ab dem Zeitpunkt t_0 (Abb. 3.15B). A ist eine Konstante die $g_{AMPA}(t)$ auf 1 normiert. Die Amplitude der Leitfähigkeit der AMPA-Kanäle $g_{AMPA}(x, t)$ beträgt also $g_{max,AMPA}$.

Die Dynamik der NMDA-Kanäle wird beschrieben durch [Zado 90]:

$$g_{NMDA}(t) = \frac{1}{1 + \eta[Mg^{2+}]e^{-\gamma V_m}} \cdot B \cdot [e^{-(t-t_0)/\tau_4} - e^{-(t-t_0)/\tau_3}] \quad (3.55)$$

Es tritt hier ein zusätzlicher Vorfaktor auf, der die Abhängigkeit des NMDA-Rezeptors von der extrazellulären Magnesiumkonzentration $[Mg^{2+}]$ und von der Transmembranspannung V_m beschreibt. Nach [Zado 90] gilt: $\eta = 0.33/\text{mM}$ und $\gamma = 0.06/\text{mV}$. Die im Messmedium vorliegende Konzentration $[Mg^{2+}] = 2 \text{ mM}$ wurde eingesetzt. Durch B wird der in eckige Klammern gesetzte Ausdruck auf 1 normiert. Die Amplitude der Leitfähigkeit der NMDA-Kanäle $g_{NMDA}(x, t)$ beträgt also $g_{max,NMDA} \cdot \frac{1}{1 + \eta[Mg^{2+}]e^{-\gamma V_m}}$.

Die Spannungsabhängigkeit der Kanäle wurde in der Ableitung der Differentialgleichungen nicht beachtet. In der Simulation wird aber nach jedem Iterationsschritt ein neuer Wert für $g_{NMDA}(x, t, V_m)$ berechnet und so diese Abhängigkeit korrekt berücksichtigt.

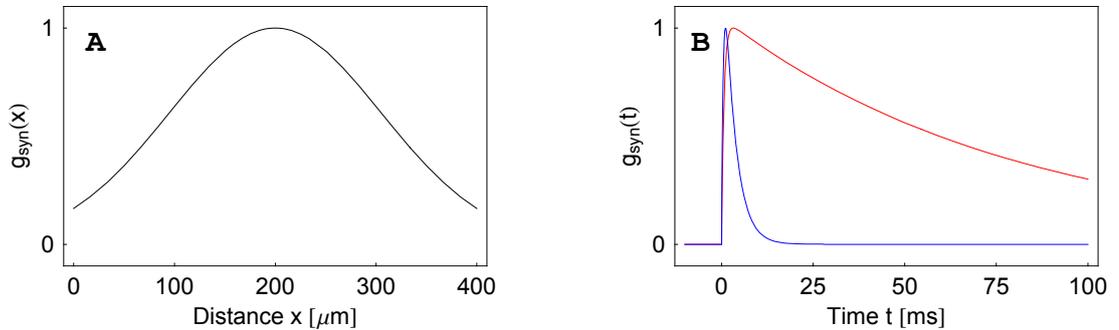


Abbildung 3.15: Orts- und Zeitabhängigkeit der synaptischen Leitfähigkeit $g_{syn}(x, t)$. (A) Gaußförmige Verteilung ($a = 4.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^{-2}$) der AMPA- und NMDA-Kanäle um $x_0 = 200 \mu\text{m}$, normiert auf 1. (B) Dynamik der AMPA- (blaue Kurve mit $\tau_1 = 0.5 \text{ ms}$, $\tau_2 = 3 \text{ ms}$, $t_0 = 0 \text{ ms}$) und NMDA-Kanäle (rote Kurve mit $\tau_3 = 0.67 \text{ ms}$, $\tau_4 = 80 \text{ ms}$, $t_0 = 0 \text{ ms}$), normiert auf 1.

3.3.4 Methode zur numerischen Lösung des mathematischen Modells

Bei (3.44) handelt es sich um ein System aus zwei gekoppelten, linearen partiellen Differentialgleichungen (pDGLs) zweiter Ordnung. Gesucht werden die beiden Funktionen $\Phi_i(x, t)$ und $\Phi_e(x, t)$ in einem Gebiet $G = [0, L] \times [0, T]$ die sowohl die pDGLs erfüllen, als auch die Dirichlet- und von Neumann-artigen Randbedingungen auf ∂G (im Anhang C.3 erklärt).

Um das gegebene Problem numerisch zu lösen, wird das Differenzenverfahren angewendet [Schw 04, Pres 92]: Dazu wird über G ein Gitter der Maschenweite Δx und Δt gelegt, wobei die Lösungsfunktionen durch ihre Werte an den Gitterpunkten (k, l) repräsentiert werden:

$$\Phi_i^{k,l} := \Phi_i(k\Delta x, l\Delta t) \quad (3.56)$$

$$\Phi_e^{k,l} := \Phi_e(k\Delta x, l\Delta t) \quad (3.57)$$

k und l sind ganze Zahlen mit $k \in [0, \frac{L}{\Delta x}]$ und $l \in [0, \frac{T}{\Delta t}]$. Alle orts- oder zeitabhängigen Parameter werden analog dargestellt. Um $\Phi_i^{k,l}$ und $\Phi_e^{k,l}$ zu berechnen, werden die Ableitungen in den pDGLs (3.44) durch zentrale Differenzenquotienten wie folgt approximiert:

$$\frac{1}{r_e} \frac{\Phi_e^{k+1,l} - 2\Phi_e^{k,l} + \Phi_e^{k-1,l}}{(\Delta x)^2} = -j_m^{k,l} + j_{ex}^{k,l} + j_l^{k,l} \quad (3.58)$$

$$\frac{1}{2} \left(\frac{1}{r_i^k} + \frac{1}{r_i^{k+1}} \right) (\Phi_i^{k+1,l} - \Phi_i^{k,l}) - \frac{1}{2} \left(\frac{1}{r_i^k} + \frac{1}{r_i^{k-1}} \right) (\Phi_i^{k,l} - \Phi_i^{k-1,l}) = (\Delta x)^2 j_m^{k,l} \quad (3.59)$$

Weiter gilt:

$$j_l^{k,l} = g_l^k \Phi_e^{k,l} \quad (3.60)$$

$$j_m^{k,l} = c_m^k \left(\frac{\Phi_i^{k,l+1} - \Phi_e^{k,l+1} - (\Phi_i^{k,l-1} - \Phi_e^{k,l-1})}{2\Delta t} \right) + g_m^k (\Phi_i^{k,l} - \Phi_e^{k,l} - E_{rest}) + g_{syn}^{k,l} (\Phi_i^{k,l} - \Phi_e^{k,l} - E_{syn}) \quad (3.61)$$

Diese Näherungen haben eine Fehlerordnung von $O(\Delta x^2)$ bzw. $O(\Delta t^2)$. Die Randbedingungen werden ebenso diskretisiert.

Setzt man (3.60) und (3.61) in (3.58) und (3.59) ein und löst nach $\Phi_e^{k,l}$ und $\Phi_i^{k,l}$ auf, so erhält man für jeden Punkt des Gitters eine lineare Differenzgleichung, womit für das gesamte Gitter ein lineares Gleichungssystem aufgestellt werden kann, das die diskrete Form der pDGLs darstellt.

Dieses Gleichungssystem wurde mittels eines in der Programmiersprache C geschriebenen Programms, über den SOR-Algorithmus [Schw 04] iterativ gelöst und daraus das Feldpotential $V_{field}(x, t)$ und die Transmembranspannung $V_m(x, t)$ des einzelnen Modellneurons berechnet. Das gesamte Feldpotential ergab sich aus der Überlagerung der Feldpotentiale dreier, um jeweils $30 \mu\text{m}$ versetzter Modellneurone, was die Breite von stratum pyramidale von etwa drei Neuronen modelliert. Das so erhaltene Feldpotential wurde mit einem Faktor F skaliert, da viele Neurone beitragen.

Das Resultat der Simulation wird in Abschnitt 4.3.5 mit dem Ergebnis der MTA-Chip-Messung verglichen.

Kapitel 4

Resultate und Diskussion

Um die elektrische Funktion des Hippocampus als Ganzes verstehen zu können, muss dieser auf verschiedenen Ebenen seiner strukturellen Organisation untersucht werden [Sarg 01]: Beginnend bei Einzelkanal- über Einzelzellstudien bis hin zu Untersuchungen der Populationsdynamik des neuronalen Netzwerks über Feldpotentiale, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Man hofft, aus den Feldpotentialen wichtige Informationen über die funktionalen Eigenschaften neuronaler Netze zu erhalten [Nich 73]. Da extrazelluläre Feldpotentiale minimal invasiv gemessen werden können, sind auch Langzeitstudien und pharmakologische Experimente zur synaptischen Übertragung möglich [John 98].

4.1 Kapazitive Kopplung Hirnschnitt – Chip

Durch Abgabe von Spannungspulsen an Kondensatoren des Radius $r = 120 \mu\text{m}$ mit 10 nm TiO_2 -Beschichtung, kann ausreichend kapazitiver Strom erzeugt werden, um neuronale Aktivität in kultivierten Hirnschnitten des Hippocampus auszulösen [Hutz 03].

In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass erstens der durch Kondensatoren des Radius $r = 50 \mu\text{m}$ erzeugte, kapazitive Strom ausreicht, um den Hirnschnitt zu Aktivität zu stimulieren und zweitens, dass diese Aktivität mit den TiO_2 -beschichteten Transistoren nachgewiesen und somit eine Chip-Hirnschnitt-Chip Schleife realisiert werden kann. Die Äquivalenz der chipbasierten Stimulations- und Detektionsmethode mit der klassischen elektrophysiologischen Methode wird bewiesen. Abschließend wird die Wirkung präsynaptischer kapazitiver Stimulation auf die Transmembranspannung eines einzelnen postsynaptischen CA1-Neurons untersucht.

4.1.1 Chip – Hirnschnitt – Chip Schleife

Abb. 4.1A zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines 8 Tage lang kultivierten Hirnschnittes auf dem Eigenbauchip. Die Chipstrukturen sind aus Gründen der klareren Darstellung hervorgehoben. Sowohl der Gyrus Dentatus- als auch der CA-Bogen des Hippocampus waren nach der Kultivierung sehr gut erhalten. Das Kondensatorarray lag klar im CA3-, das Transistorarray im CA1-Bereich. Abb. 4.1B zeigt eine schematische Darstellung des Hippocampus mit den, für die meisten Messungen dieser Arbeit typischen, Stimulations- und Detektionsorten.

Es wurden nun an Kondensator Nr.7 im CA3-Somabereich nacheinander zwei verschiedene Spannungspulse der Amplitude 4.5 V angelegt und synchron dazu, mit Transistor Nr.12 im CA1-Somabereich, das lokale Feldpotential aufgezeichnet.

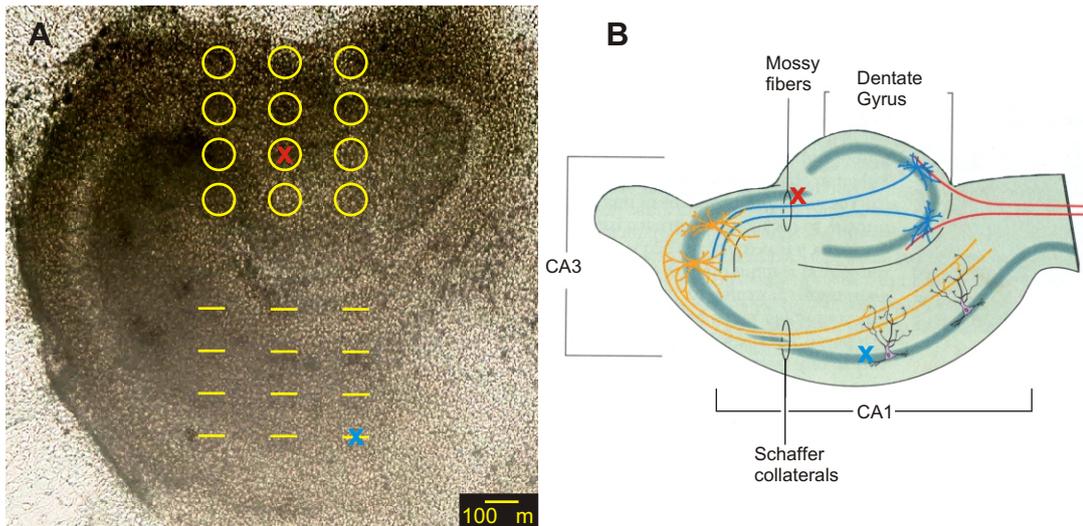


Abbildung 4.1: Stimulation in CA3 und Detektion in CA1. (A) Mikroskopische Aufnahme eines Hippocampuschnitts, kultiviert auf einem Eigenbauchip. Gewebekulturen auf Siliziumchips müssen mit einem Auflichtmikroskop betrachtet werden, deshalb ist die Struktur nicht so gut erkennbar wie mit einem, in der Neurobiologie üblichen, Durchlichtmikroskop. Die Chipstruktur (gelb) sowie der stimulierende Kondensator Nr.7 (rotes Kreuz) im stratum pyramidale von CA3 und der detektierende Transistor Nr.12 (blaues Kreuz) im stratum pyramidale von CA1 sind hervorgehoben. (B) Reizort (rotes Kreuz) und Detektionsort (blaues Kreuz) in einer schematischen Darstellung eines Hippocampuschnitts (modifiziert nach [Purv 97]).

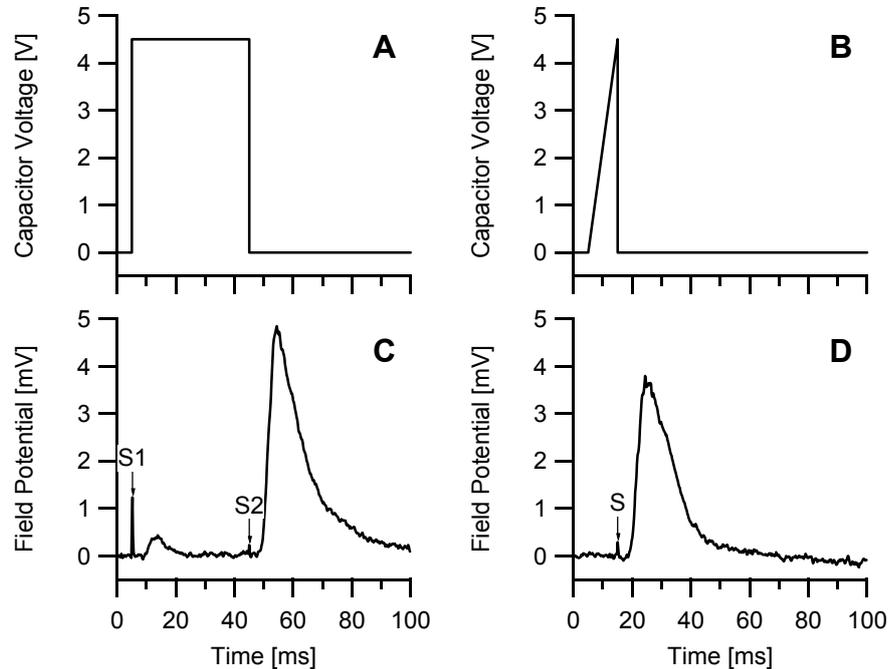


Abbildung 4.2: Bidirektionale kapazitive Kopplung Hirnschnitt-Eigenbauchip. Durch Anlegen des in (A) gezeigten, rechteckförmigen Spannungspulses an einen Kondensator, kann der Hirnschnitt zu Aktivität stimuliert werden, die mit einem Transistor detektierbar ist (C). Eine Reizung des Hirnschnittes über eine Spannungsrampe (B) erzeugt ebenfalls ein neuronales Feldpotential (D).

Der erste Spannungspuls war rechteckförmig und von 40 ms Dauer (Abb. 4.2A). Zur Zeit $t=5$ ms floß aufgrund des positiven Gradienten in der Stimulationsspannung, ein transienter kapazitiver Strom $+\Delta I_s$ in den Hirnschnitt ein, der über ein positiv gehendes Feldpotential Neuronen stimulieren hätte können. Zur Zeit $t=45$ ms wäre dasselbe mit umgekehrtem Vorzeichen möglich gewesen ($-\Delta I_s$).

Der zweite Spannungspuls war rampenförmig und von 10 ms Dauer (Abb. 4.2B). Da die positive Steigung des Spannungsverlaufs hier sehr viel kleiner war als beim Rechteckpuls, war der, zwischen $t=5$ ms und $t=15$ ms fließende, kapazitive Strom ebenfalls deutlich geringer. Die negative Stromtransiente bei $t=15$ ms hatte aber dieselbe Amplitude ($-\Delta I_s$) wie beim Rechteckreiz.

4.1.1.1 Resultat

Abb. 4.2C zeigt die zur Rechteckreizung synchrone Transistormessung. Die beiden kapazitiven Stromtransienten konnten in der Transistormessung als Spitzen im Feldpotential detektiert werden und sind mit $S1$ und $S2$ markiert. Vorzeichen und Amplituden der schnellen (≈ 100 kHz) Transienten wurden aufgrund der Filterung oberhalb von 1 kHz und der Messdatenerfassung mit 5 kHz nicht korrekt abgebildet. 5 ms nach $S1$ erkennt man ein positiv gehendes Signal von etwa 0.5 mV Amplitude und 10 ms Dauer. 5 ms nach $S2$ folgt ein weiteres positives Signal (5 mV, 40 ms).

Abb. 4.2D zeigt die zur Rampenreizung synchrone Transistormessung. Der kapazitive Stromfluss zwischen $t=5$ ms und $t=15$ ms ist mit dem Transistor nicht als positives Signal detektierbar. Die negative Transiente erzeugte bei $t=15$ ms, analog zur Rechteckreizung, ein mit S markiertes Artefakt. 5 ms nach S setzt ein positives Signal (3.8 mV, 40 ms) ein.

4.1.1.2 Diskussion

Signalform und -amplitude Form, Verzögerung nach den Reizen und Amplitude der positiven Signale deuten darauf hin, dass es sich um pEPSPs des Somabereichs von CA1 handelt [Rich 87, John 98]. Die Natur dieser Signale wird sowohl im nächsten Abschnitt über klassische Elektrophysiologie als auch in den Messungen mit dem MTA-Chip pharmakologisch klar identifiziert. Die homogene TiO_2 -Beschichtung des Eigenbauchips ist biokompatibel und beeinflusst die elektrophysiologischen Eigenschaften des Hirnschnittes nicht signifikant, da literaturübliche Signalformen erzeugt werden konnten. Obwohl die Stromtransienten bei $S1$, $S2$ und S dieselbe Amplitude hatten, sind die durch sie hervorgerufenen pEPSP-Amplituden unterschiedlich: Die durch S ausgelöste Antwort ist 8-fach größer als die durch $S1$. Das bedeutet, dass ein negativer, kapazitiver Reizstrom $-\Delta I_s$ effektiver stimuliert als ein positiver ($+\Delta I_s$). Diese Asymmetrie ist sowohl aus experimentellen (Faktor $\approx 3-7$, [Ratt 99, Heus 02]) als auch theoretischen (Faktor ≈ 4 , ortsabhängig, [Ratt 99]) Untersuchungen faradayscher Stimulation bekannt. Die nach $S2$ auftretende Antwort ist etwas größer als die nach S , obwohl in beiden Fällen der gleiche Reizstrom $-\Delta I_s$ floß. Dies kann über den sogenannten Paired-Pulse-Effekt erklärt werden: Der erste Reiz ($S1$) eines Pulspaares bewirkt eine Vergrößerung der Antwort auf einen kurz darauf (40 ms) folgenden zweiten Reiz ($S2$) [John 98].

Der Vorteil der Verwendung einer Spannungsrampe als Reizpuls ist also, dass jeweils nur *ein* pEPSP erzeugt wird, was eine definierte Stimulation ermöglicht und Verzerrungen der Signalamplitude durch Paired-Pulse-Effekte vermeidet. Wie oben gezeigt, löst ein negativer Reizstrom die größere Antwortamplitude aus. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften, wurde die Spannungsrampe in Abb. 4.2B in dieser Arbeit als Standardreizpuls verwendet.

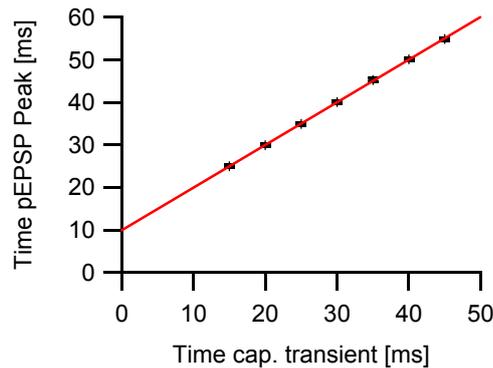


Abbildung 4.3: Die perfekte zeitliche Korrelation zwischen Auftreten der pEPSP-Maxima und der kapazitiven Stromtransienten zeigt, dass *kapazitiv* stimuliert wurde.

Kopplung ist kapazitiv Die Tatsache, dass durch *einen* Reizpuls (Abb. 4.2A) *zwei* Antworten hervorgerufen wurden (Abb. 4.2C) zeigt, dass kapazitive und nicht faradaysche Ströme den Hirnschnitt stimuliert haben. Der faradaysche Leckstrom von etwa 1 nA durch die Kondensatoren (Abschnitt 2.2.2.1) reicht für eine Stimulation (typisch $\approx 10 \mu\text{A}$) nicht aus.

Um klar zu beweisen, dass kapazitiv gereizt wurde, wurde in einem weiterführenden Experiment die Dauer der Spannungsrampen variiert (jeweils 10 Messungen). In Abb. 4.3 ist der Zeitpunkt, zu dem die gemessenen pEPSPs ihr Maximum erreichten, aufgetragen gegen den Zeitpunkt, zu dem die negativen kapazitiven Stromtransienten auftraten. Die Messpunkte können mit einer Geraden der Steigung 1 gefittet werden (rote Kurve). Die pEPSPs traten also in perfekter zeitlicher Korrelation mit den kapazitiven Transienten auf, wodurch bewiesen ist, dass der kapazitive Strom Ursache der Stimulation war. Der y-Achsenabschnitt zeigt, dass hier 10 ms nach dem Reiz das pEPSP-Maximum erreicht wurde. Die pEPSP-Amplitude ist außerdem unabhängig von der Dauer der Spannungsrampe (Daten nicht gezeigt). Eine Stimulation über faradayschen Stromfluss ist mit diesen Beobachtungen nicht zu vereinbaren.

Mechanismus der kapazitiven Kopplung Hirnschnitt-Chip (i) Durch einen räumlich ausgedehnten Kondensator fließt ein kapazitiver Strom, der dem präsynaptischen Gewebe ein Strommuster einprägt. (ii) Der Strom breitet sich im Gewebe aus und generiert ein *externes Feldpotential*. (iii) Das externe Feldpotential stimuliert Neuronen und Moosfasern in CA3 zu Aktivität. (iv) Aufgrund der Größe der Kondensatoren und der Ausbreitung des Stromes werden, abhängig von der Zelldichte, viele Neuronen stimuliert. (v) Die Schaffer Kollaterale der vielen stimulierten präsynaptischen Neurone sowie die Moosfasern aktivieren Synapsen zu den postsynaptischen Neuronen. (vi) Jedes aktivierte postsynaptische Neuron erzeugt in CA3 bzw. CA1 einen bestimmten Transmembranstrom. (vii) Die vielen aktivierten postsynaptischen Neuronen bewirken im Gewebe eine, von der Zelldichte abhängige, Volumenstromdichte. (viii) Dieser Strom breitet sich wiederum im Gewebe aus und generiert ein *neuronales Feldpotential*. (ix) Dieses neuronale Feldpotential wird, gemittelt über die Gatefläche des Transistors, detektiert (nach [Hutz 04]).

Kritische Spannung Der Spannungssprung ΔV_s^{crit} ab dem ein evoziertes Feldpotential detektierbar war, lag in einem sehr engen Intervall zwischen -1.5 V und -2.4 V : $\Delta V_s^{crit} = -1.93 \pm 0.33 \text{ V}$. Für diese Statistik wurden 9 verschiedene Hirnschnitt-Chip-Systeme bei Reizung mit 11 Kondensatoren ausgewertet. Jeder dieser Kondensatoren erzeugte bei -4.0 V ein großes pEPSP im Hirnschnitt.

Abschätzung der synaptischen Stromquellichte Nimmt man an, dass der Transistor mittig ($x = 0$) im CA1-Somabereich der Breite $2x_0$ liegt, so kann das Schichtleitermodell (Gleichung (3.19) auf Seite 39) eine Abschätzung der lokalen synaptischen Stromquellichte liefern:

$$j_{source} = \frac{g_{leak} V_{field}}{1 - \exp\left(-\frac{x_0}{\lambda_{sheet}}\right)} \quad (4.1)$$

Mit typischen Werten für $g_{leak} = 9.5 \text{ nS}/\mu\text{m}^2$, $V_{field} = 4 \text{ mV}$, $x_0 = 50 \text{ }\mu\text{m}$ und $\lambda_{sheet} = 50 \text{ }\mu\text{m}$, folgt $j_{source} \approx 60 \text{ }\mu\text{A}/\text{mm}^2$.

In der Literatur zur CSD-Analyse [Plen 93, Eger 98] werden $\partial^2 V_{field}/\partial x^2 \approx -300 \text{ mV}/\text{mm}^2$ angegeben. Setzt man $\partial^2 V_{field}/\partial y^2 = 0$, $\rho = 300 \text{ }\Omega\text{cm}$ und eine Schichtdicke $h = 400 \text{ }\mu\text{m}$ (akute Schnitte) in die Schichtleitergleichung (3.15) ein, so folgt: $j_{source} = -\frac{h}{\rho} \partial^2 V_{field}/\partial x^2 \approx 40 \text{ }\mu\text{A}/\text{mm}^2$, was in der oben berechneten Größenordnung liegt.

Signalkonstanz Nach einer (oft mehrstündigen) Stabilisierungsphase konnten über mehrere Stunden hinweg konstante Feldpotentialamplituden gemessen werden (Daten nicht gezeigt, Detektion auch [Besl 02]: bis zu 8 h). Die chipbasierte Stimulations- und Detektionsmethode verändert also die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen nicht wesentlich. Selbst wenn die Zellen bei Stimulation elektroporiert werden sollten, hat dies auf der untersuchten Zeitskala keine negativen Auswirkungen. Aufgrund dieser Stabilität der Amplitude können gezielte Manipulationen am Schnitt (pharmakologische Untersuchungen, LTP-Experimente) vorgenommen und deren Auswirkungen auf das Signal untersucht werden.

Zusammenfassung Über einen Kondensator des Eigenbauchips konnte neuronale Aktivität im Hirnschnitt ausgelöst (Kopplung Chip-Hirnschnitt) und diese über einen Transistor des Chips auch wieder detektiert werden (Kopplung Hirnschnitt-Chip).

Eine bidirektionale, kapazitive Kopplung zwischen Hirnschnitt und Halbleiterchip ist erreicht.

4.1.2 Methodenvergleich: EOS-Kondensator – Wolframelektrode EOS-Transistor – Mikroelektrode

Es wird die Äquivalenz der *Stimulationsmethoden* Kondensator/Wolframelektrode als auch die der *Detektionsmethoden* Transistor/Mikroelektrode anhand zweier Telexperimente gezeigt:

1. Durch einen Kondensator in CA3 wurde ein Hirnschnitt zu neuronaler Aktivität stimuliert ($\Delta V_s = -4.0$ V, bei $t = 15$ ms), die mit einem Transistor im CA1-Somabereich gemessen werden konnte (schwarze Kurve in Abb. 4.4). Synchron dazu, wurde mit einer, in der Nähe des Transistors platzierten Mikroelektrode, das stimulierte Feldpotential gemessen (rote Kurve).
2. Der selbe Hirnschnitt wurde dann nahe des Kondensators über eine Wolframelektrode gereizt ($\Delta I = -9 \mu\text{A}$, $\Delta t = 200 \mu\text{s}$, bei $t = 15$ ms). Die blaue bzw. grüne Kurve zeigt das synchron dazu mit Mikroelektrode und Transistor gemessene Feldpotential.

Da Form und Amplitude von Feldpotentialen sowohl vom Stimulationsort als auch vom Detektionsort abhängen, müssen die Reiz- und Messmethoden jeweils am gleichen Ort (x,y und z) verglichen werden.

4.1.2.1 Resultat und Diskussion

1. Da die Zeitverläufe der, durch Kondensator und Wolframelektrode ausgelösten, neuronalen Feldpotentiale gleich sind (rote und blaue Kurven in Abb. 4.4B), ist nachgewiesen, dass die beiden Stimulationsmethoden äquivalent sind. Die Gleichheit der Amplituden wurde durch Anpassen der über die Wolframelektrode abgegebenen Stromstärke künstlich hergestellt.
2. Zwei Detektionsmethoden sind äquivalent, wenn sowohl die Gleichheit des Zeitverlaufs, als auch die der Amplituden der gemessenen Signale gezeigt werden kann. Der Zeitverlauf der Transistor- bzw. Mikroelektrodenmessung (grüne bzw. blaue Kurve) ist gleich, die unterschiedlichen Amplituden im Verhältnis von etwa 3:1 stellen bei einer Detektionsmethode allerdings ein Problem dar, das erklärt werden muss:

Die geforderte Gleichheit der Amplituden bei Detektion gilt nur bei Messung am selben Ort. Experimentell ist es nicht möglich, mit einer Mikroelektrode exakt am Ort des Transistors zu messen. Die Elektrode wird sich immer in einer gewissen Höhe z über dem Transistor befinden. Das Volumenleitermodell eines Hirnschnittes beschreibt u.a. eine z -Abhängigkeit der Amplitude des Feldpotentials [From 02], die die obige Diskrepanz erklären kann und damit im nächsten Teilabschnitt auch die Äquivalenz der Detektionsmethoden Transistor – Mikroelektrode zeigen wird. Für EOSFETs deren Gateoxid ausschließlich aus einer Schicht SiO_2 besteht, wurde eine analoge Äquivalenz schon in früheren Arbeiten beobachtet [Besl 02].

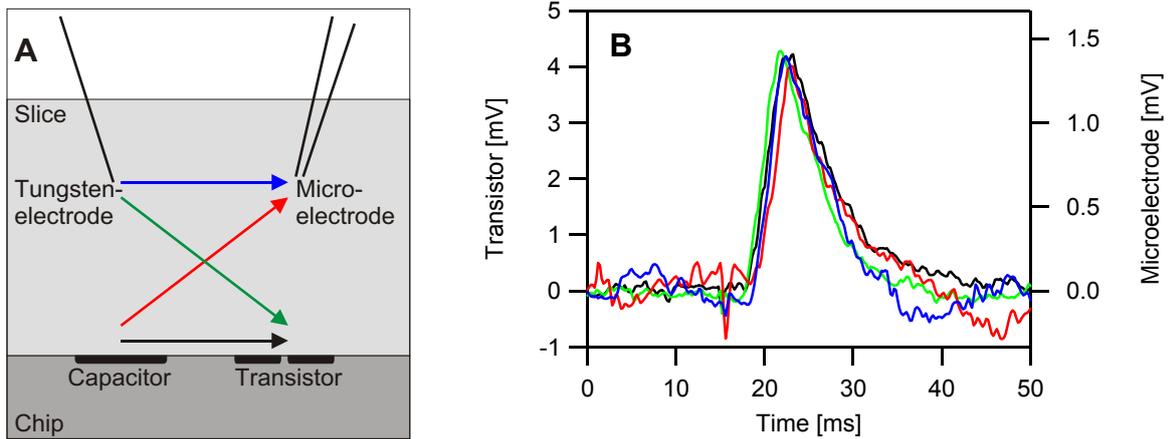


Abbildung 4.4: Nachweis der Äquivalenz der in dieser Arbeit verwendeten kapazitiven Stimulation und Detektion mit Standardmethoden. (A) Schematische Messsituation mit vier möglichen Wegen der Stimulation und Detektion. (B) Zeitverlauf von Feldpotentialen wie er sich aus der Stimulation mit Wolframelektrode oder Kondensator und der Detektion mit Mikroelektrode oder Transistor ergibt. Die linke Ordinate ist gültig für die beiden Transistormessungen (grün und schwarz), die rechte für die Mikroelektrodenmessungen (blau und rot).

4.1.2.2 Abhängigkeit der Feldpotentialamplitude von der z -Koordinate

Ein homogener Hirnschnitt des konstanten spezifischen Widerstands ρ und der Dicke h generiere durch neuronale Aktivität die konstante Stromquellendichte j_{source} und befinde sich zwischen einem isolierenden Substrat (Höhe $z = 0$) und einem auf Massepotential liegenden Elektrolytbad ($z = h$). Die zur Lösung der Volumenleiter-Differentialgleichung $\frac{\partial^2 V_{field}}{\partial z^2} = -\rho j_{source}$ notwendigen Randbedingungen ergeben sich damit aus:

1. Verschwindendem Stromfluss an das Substrat $j_z|_{z=0} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial V_{field}}{\partial z}|_{z=0} = 0$ sowie
2. $V_{field}|_{z=h} = 0$.

Dies bedeutet:

$$V_{field}(z) = \frac{j_{source} h^2 \rho}{2} \left(1 - \frac{z^2}{h^2} \right) \quad (4.2)$$

Das Feldpotential fällt also parabolisch vom Wert $V_{field}^{max} = V_{field}(z = 0) = \frac{j_{source} h^2 \rho}{2}$ am Substrat, auf den Wert $V_{field}(z = h) = 0$ am oberen Rand des Hirnschnittes ab. Nach diesem Modell würde man also erwarten, dass ein Transistor ($z_{transistor} = 0$) stets ein größeres Feldpotential misst als eine Mikroelektrode ($z_{micro} > 0$). Stehen die beiden Amplituden in einem Verhältnis c zueinander, so kann man mit (4.2) berechnen, in welcher Höhe sich die Elektrode befinden muss, um das Feldpotential V_{field}^{max}/c zu messen. Man erhält: $z_{micro} = \sqrt{\frac{c-1}{c}} h$. Für das oben experimentell beobachtete Verhältnis $c = 3 : 1$ ergibt sich bei einer Schnittstärke von $h = 70 \mu\text{m}$ eine realistische Höhe der Mikroelektrode von $z_{micro} \approx 57 \mu\text{m}$ über dem Substrat. Mit einem kalibrierbaren Mikromanipulator könnte diese Abstandsabhängigkeit verifiziert werden.

4.1.3 Transmembranspannung eines CA1-Neurons bei präsynaptischer kapazitiver Stimulation

Es wird nun die Auswirkung der präsynaptischen, kapazitiven Reizung durch einen Kondensator, auf die Transmembranspannung eines einzelnen postsynaptischen CA1-Neurons untersucht. Eine Zelle im CA1-Somabereich eines 11 Tage lang kultivierten Hirnschnittes wurde mit einer Glasmikroelektrode angestochen. Um zunächst die Vitalität der Zelle zu testen, wurde diese durch Strominjektion (1 nA, 1 ms) zur Ausbildung eines Aktionspotentials depolarisiert. Im zweiten Schritt wurde eine Spannungsrampe ($\Delta V_s = -2.5$ V) an Kondensator Nr.2 und danach an Nr.6 (beide in CA3) angelegt und die dadurch hervorgerufene Modulation der Transmembranspannung der Zelle beobachtet.

4.1.3.1 Resultat und Diskussion

In Abb. 4.5A ist die Transmembranspannung bei Reizung durch die Mikroelektrode gezeigt. Nach der transienten Depolarisation durch den Reizpuls (erste Spitze) wurde innerhalb von etwa 1 ms ein Aktionspotential ausgebildet (zweite Spitze) mit einer klar erkennbaren Hyperpolarisationsphase. Die in CA1 angestochene Zelle war also ein elektrophysiologisch aktives Neuron.

In Abb. 4.5B sieht man die Transmembranspannung des CA1-Neurons bei kapazitiver Stimulation des Hirnschnittes über die zwei Kondensatoren in CA3. Zunächst ist auch in den Intrazellulärmessungen ein kleines negatives Artefakt des kapazitiven Stimulationsstromes erkennbar. Die exzitatorischen CA3-CA1-Synapsen die durch Kondensator Nr.2 aktiviert wurden, depolarisierten die Zelle durch Bildung eines EPSP von etwa 18 mV Amplitude, die durch Kondensator Nr.6 aktivierten, um etwa 10 mV. Da die kritische Depolarisation von ca. 10 mV [John 98] jeweils überschritten war, wurde in beiden Fällen ein Aktionspotential ausgelöst. Bei Reizung über Kondensator Nr.2 setzte dieses etwas früher ein, da hier der Schwellwert schneller erreicht wurde. Die gemessenen EPSPs haben typische Werte für Amplitude und Zeitkonstante für Anstieg bzw. Abfall [John 98].

Es ist also möglich, über die Stimulation von CA3-Neuronen durch die Kondensatoren des Chips, eine starke synaptische Depolarisation in CA1-Neuronen zu bewirken.

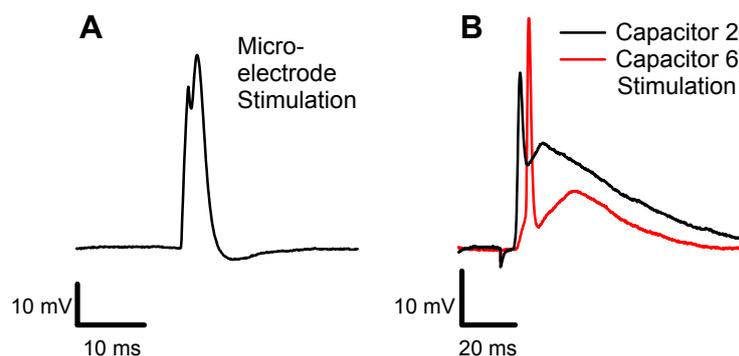


Abbildung 4.5: Transmembranspannung eines CA1-Neurons, gemessen mit einer intrazellulär platzierten Mikroelektrode. (A) Stimulation über die Mikroelektrode. (B) Stimulation über die Kondensatoren Nr.2 (schwarz) und Nr.6 (rot) des Chips.

4.2 Räumliche Abbildung neuronaler Aktivität – Eigenbauchip

Bisher wurde gezeigt, dass es möglich ist, Hirnschnitte mit *einem* Kondensator des Chips kapazitiv zur Ausbildung neuronaler Aktivität zu stimulieren und diese Aktivität mit *einem* Feldeffekttransistor des Chips kapazitiv zu detektieren. Um aber die Ortsabhängigkeit der Stimulation und Detektion von Feldpotentialen zu untersuchen, war es notwendig, die auf dem Chip zur Verfügung stehenden Arrays aus 12 Kondensatoren und 12 Transistoren zu nutzen.

In Abb. 4.6 ist eine mikroskopische Aufnahme des 9 Tage lang kultivierten Hirnschnittes gezeigt, der für die repräsentative Messung gewählt wurde. Die Chipstruktur ist künstlich hervorgehoben.

In einem zeitlichen Abstand von 10 s wurden Spannungsrampen ($\Delta V_s = -2.5$ V) der Reihe nach an alle Kondensatoren des Chips angelegt und die resultierenden neuronalen Feldpotentiale mit allen Transistoren gemessen. Dadurch ergab sich eine Matrixabbildung $(4, 3) \mapsto (4, 3)$ die jedem Stimulationsort (einer der 12 Kondensatoren) eindeutig ein neuronales Feldpotential am Detektionsort (einer der 12 Transistoren) zuordnet.

Wenn nun, wie im gezeigten Hirnschnitt-Chip-System, das Kondensatorarray in der CA3-Region platziert werden kann und das Transistorarray sich eindeutig in der CA1-Region befindet, so kann auf diese Weise eine räumliche Abbildung der synaptischen Übertragung von CA3 nach CA1 aufgenommen werden. Anhand dreier Teilmengen der Matrixabbildung wird nun deren Relevanz für die Stimulation und Detektion von Feldpotentialen besprochen.

4.2.1 Abbildung $1 \mapsto (4, 3)$

Betrachtet wird die durch den einzelnen, in der CA3-Somaregion liegenden, Kondensator Nr.7 (Abb. 4.6) auf 12 Transistoren in CA1 hervorgerufene Antwort (Abb. 4.7).

4.2.1.1 Resultat

Die Transistoren Nr.1,2,3,5,6,7 und 9 messen große pEPSPs der Amplitude -1.5 bis -3.0 mV, wie sie typischerweise im stratum radiatum von CA1 auftreten. Transistor Nr.10 befand sich im Übergangsbereich zwischen stratum radiatum und pyramidale und zeigt kleinere, bipolare Signale. Im stratum pyramidale messen die Transistoren Nr.4,8,11 und 12 positive pEPSPs von 2.1 bis 7.5 mV.

4.2.1.2 Diskussion

Der Eigenbauchip kann die durch ihn evozierten, neuronalen Feldpotentiale ortsaufgelöst detektieren. Der Abstand der Transistoren in horizontaler ($220 \mu\text{m}$) als auch in vertikaler Richtung ($130 \mu\text{m}$) ist allerdings zu groß, da sich die Feldpotentiale in beiden Raumrichtungen auf einer geringeren Längenskala signifikant verändern, so z.B. horizontal Transistor Nr.7/11 oder vertikal Transistor Nr.3/4. Die Messungen mit dem MTA-Chip werden die Notwendigkeit einer hohen Ortsauflösung bestätigen.

Dieses grundlegende Experiment war Bestandteil jeder, der mehr als 90 Messungen mit dem Eigenbauchip dieser Arbeit. Es wurden damit die Kondensator/Transistor-Kombinationen gesucht, die die größten Feldpotentiale zeigten.

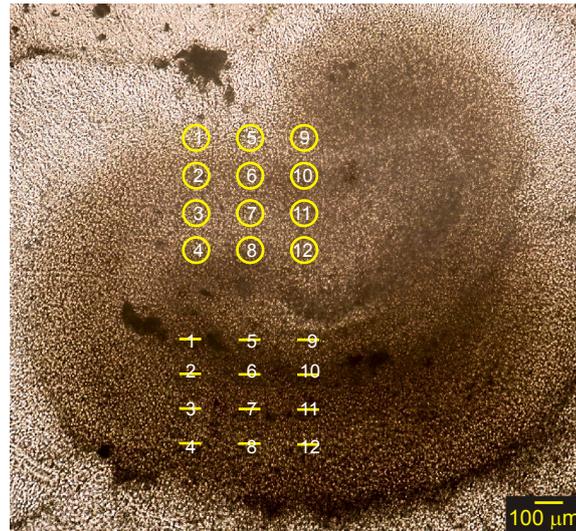


Abbildung 4.6: Mikroskopische Aufnahme eines kultivierten Hippocampusschnittes auf einem Eigenbauchip. Das Kondensatorarray (oben) und das Transistorarray (unten) sind hervorgehoben und numeriert.

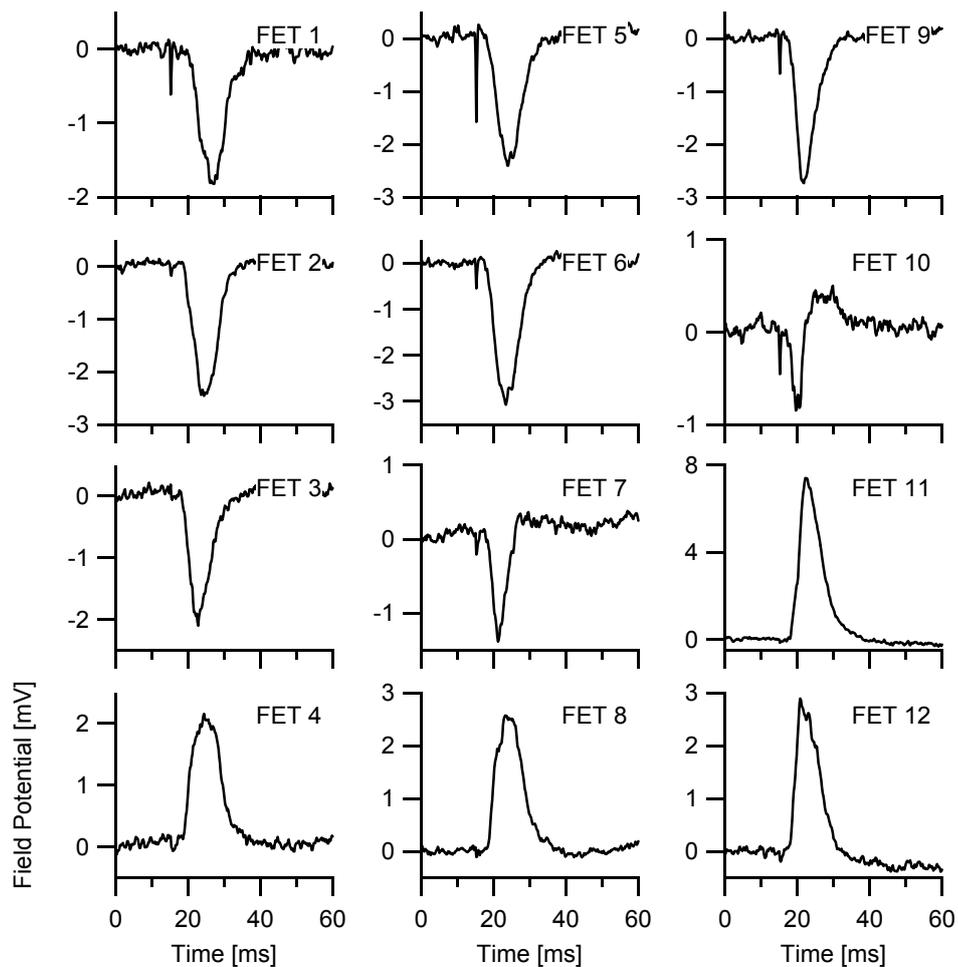


Abbildung 4.7: CA1-Feldpotentiale, gemessen mit 12 Transistoren bei Reizung von CA3 über einen Kondensator (Nr.7), eine Abbildung 1 \mapsto (4, 3).

4.2.2 Abbildung $(4, 3) \mapsto 1$

Abb. 4.8 zeigt die Signale des in der CA1-Somaregion liegenden Transistors Nr.11 bei Stimulation des Hirnschnittes durch 12, großteils in CA3 liegender Kondensatoren (Abb. 4.6).

4.2.2.1 Resultat

Über die Kondensatoren Nr.1,2,5,6,9 und 10 konnte kein, mit Transistor Nr.11 detektierbares pEPSP generiert werden. Kondensator Nr.3 bildete nur ein schwaches Signal von etwa 0.5 mV Amplitude. Durch die Kondensatoren Nr.4,7,8,11 sowie 12 wurden sehr große pEPSPs von 3.0 bis 13.0 mV Amplitude erzeugt.

4.2.2.2 Diskussion

Die Kondensatoren Nr.1 und 5 lagen außerhalb des Schnittes (Abb. 4.6). Da der spezifische Widerstand der Elektrolytlösung wesentlich kleiner ist, als der des Hirnschnittes, wird nur ein kleiner Teil des kapazitiven Stromes in den benachbarten Hirnschnitt eingeflossen und dort Neuronen stimuliert haben. Der Großteil wird direkt an die Badelektrode abgeflossen sein. Der fehlende Reizstrom erklärt also die fehlende Antwort bei Nr.1 und 5. Die Kondensatoren Nr.3,4,7,8,11 und 12 lagen im CA3-Somabereich (Abb. 4.6) und bewirkten

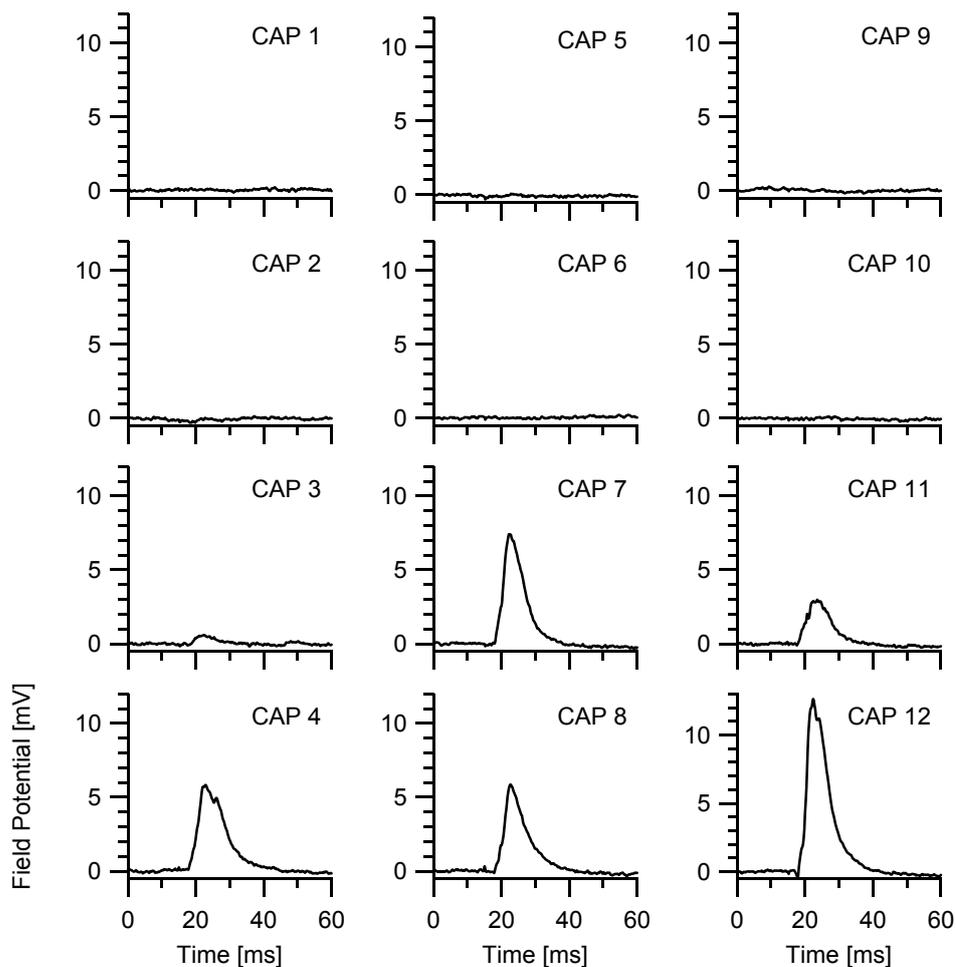


Abbildung 4.8: CA1-Feldpotentiale, gemessen mit einem Transistor (Nr.11) bei Reizung von CA3 über 12 Kondensatoren, eine Abbildung $(4, 3) \mapsto 1$.

eine Antwort in CA1 von gleicher Form aber unterschiedlicher Amplitude. Da sich die Kondensatoren Nr.2,6,9 und 10 ebenfalls klar innerhalb der Fläche des Hirnschnittes befanden, stand der gesamte kapazitive Strom zur Stimulation zur Verfügung, was aber offensichtlich nicht zu Aktivität in CA1 führte. Der Somabereich war hier effektiver zu stimulieren als andere Regionen. Die Antwortamplitude hängt, bei identischer Reizstärke (homogene Kondensatoren, gleiche Reizspannung), stark vom Ort der Reizung ab. Es ist möglich, mit dem Chip die *Stimulationseffizienz* in verschiedenen Regionen des Hippocampus zu bewerten.

Lokalisierung der kapazitiven Reizung Die Diskrepanz in der Reizeffizienz der Kondensatoren Nr.6/7 und Nr.10/11 ist von besonderer Bedeutung. Innerhalb der kritischen Radien (Abschnitt 3.2.2.3) von Kondensator Nr.6 und Nr.10 befanden sich offensichtlich keine neuronalen Strukturen, die bei Reizung eine signifikante Antwort in CA1 erzeugen konnten. Das Gegenteil war für Kondensator Nr.7 und Nr.11 der Fall. Mit dieser Beobachtung und dem bekannten, vertikalen Mitte-Mitte-Abstand der Kondensatoren von $140 \mu\text{m}$, kann eine experimentell ermittelte Obergrenze für den kritischen Radius abgeschätzt werden:

$$a^{crit}(\Delta V_s = -2.5 \text{ V}) < 140 \mu\text{m}$$

Im hier vorgestellten Versuch wurde die Kondensatorspannung nicht auf 4.0 V erhöht, aus den Messdaten vieler weiterer Experimente (Daten nicht gezeigt) kann aber analog gezeigt werden, dass auch gilt:

$$a^{crit}(\Delta V_s = -4.0 \text{ V}) < 140 \mu\text{m}$$

Bei einer Stimulationsspannung von 4.0 V wird der Hirnschnitt in einem Umkreis von *weniger* als $140 \mu\text{m}$ um die Kondensatormitte *lokal* gereizt. Obwohl die Frage der Lokalisierung der Stimulation auch für MEA-Anwendungen sehr wichtig ist, wird sie in entsprechenden Arbeiten mit Ausnahme von [Nova 88] nicht angesprochen.

4.2.3 Abbildung $(1, 3) \mapsto (1, 3)$

Abb. 4.9 zeigt die Signale der in der CA1-Region liegenden Transistoren Nr.4,8 und 12 bei sequentieller Stimulation des Hirnschnittes durch die im CA3-Somabereich liegenden Kondensatoren Nr.3,7 und 11 (Abb. 4.6).

4.2.3.1 Resultat

Mit Transistor Nr.3 und 7 wurden typische negative pEPSPs des stratum radiatum, mit Nr.11 die positiven pEPSPs des stratum pyramidale von CA1 gemessen. Während die Kondensatoren Nr.4 und 8 annähernd gleiche Antwortamplituden hervorriefen, waren die von Kondensator Nr.12 erzeugten etwa doppelt so groß. Das durch Kondensator $k \in \{4, 8, 12\}$ ausgelöste und mit Transistor $l \in \{3, 7, 11\}$ gemessene Feldpotential $V_{field}^{k,l}$ bildet eine (k,l)-Matrix, die in der nun folgenden Diskussion abstrakt beschrieben wird.

4.2.3.2 Diskussion:

Stimulation und Detektion im neuronalen Netz des Hippocampus

In Abb. 4.10 ist schematisch das neuronale Netzwerk des Hippocampus gezeigt: Eine Schicht von CA3-Neuronen ist über die Synapsen der Schaffer Kollaterale (schwarze Punkte) mit einer Schicht von CA1-Neuronen verbunden. Durch einen Kondensator A wird die mit einem Rechteck markierte Gruppe von CA3-Neuronen stimuliert. Durch die zugehörigen Synapsen (Zeile 1+2) fließen Transmembranströme in CA1-Neuronen ein und erzeugen ein Feldpotential. Transistor A detektiert das Feldpotential, das durch die, mit einem Rechteck markierte

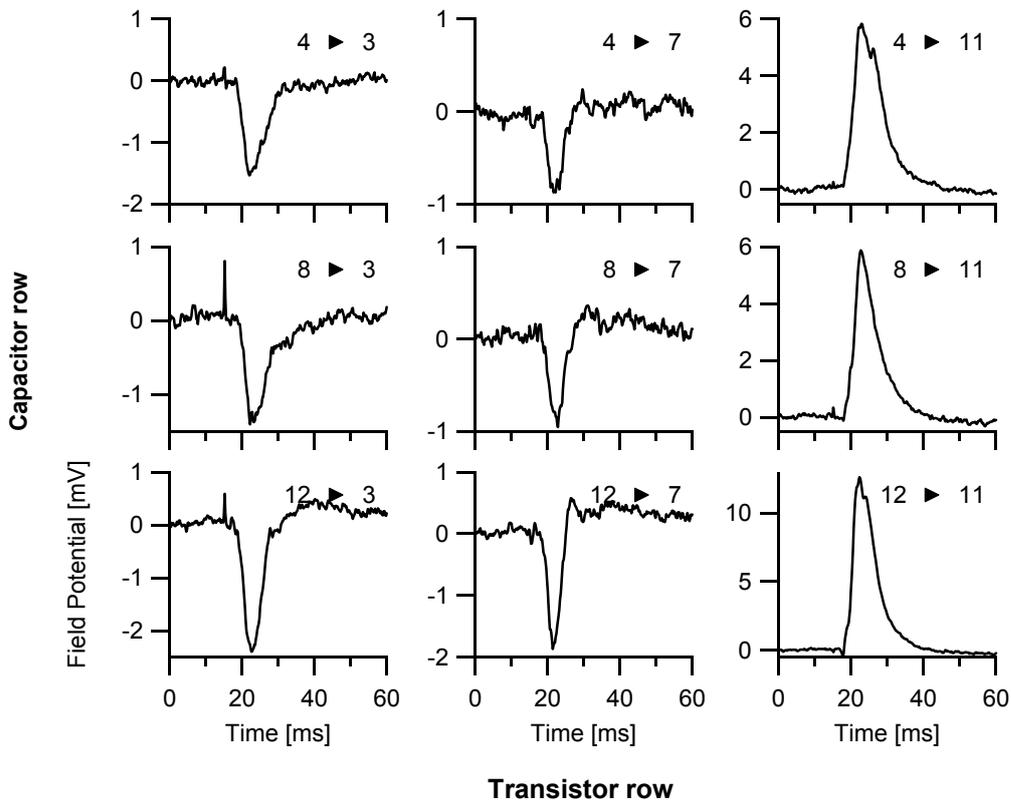


Abbildung 4.9: CA1-Feldpotentiale, gemessen mit drei Transistoren (Nr.3,7,11) bei Reizung von CA3 über drei Kondensatoren (Nr.4,8,12), eine Abbildung (1,3) \mapsto (1,3).

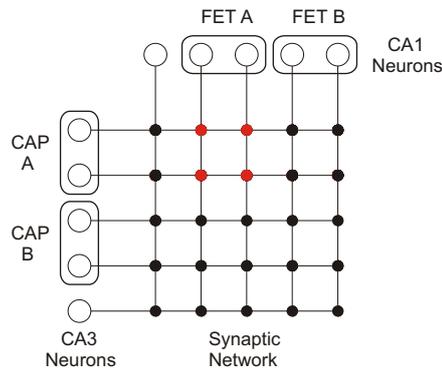


Abbildung 4.10: Schema des neuronalen Netzwerkes des Hippocampus mit Stimulation und Detektion.

Gruppe von CA1-Neuronen erzeugt wurde (vereinfachende Annahme: Alles-oder-Nichts Beitrag). In einem Abbildungsexperiment: Kondensator $A \mapsto$ Transistor A wird also das durch die rot markierten Synapsen hervorgerufene Feldpotential bestimmt.

Wird das neuronale Netzwerk über *mehrere* Kondensatoren lokalisiert gereizt und damit unterschiedliche CA3-Neuronen stimuliert (Markierungsrechtecke/kritische Radien überlappen nicht), so werden jeweils verschiedene Synapsen aktiviert (Zeile 1+2 bzw. 3+4). Im Folgenden werden Kondensatoren, die diese Bedingung erfüllen als *unabhängig* bezeichnet. Ob eine derartige Stimulation möglich ist, hängt von der Lage des jeweiligen Hirnschnittes auf dem Chip ab und wird für einige LTP/LTD-Experimente von zentraler Bedeutung sein.

Stehen *mehrere* Transistoren zur Detektion der Aktivität des neuronalen Netzwerkes zur Verfügung, so können die evozierten Feldpotentiale *unterschiedlicher* CA1-Neuronen gemessen werden (Markierungsrechtecke überlappen nicht). Experimentell ist dies nur für weit voneinander entfernt liegende Transistoren möglich.

Das durch Kondensator k stimulierte und mit Transistor l gemessene Feldpotential $V_{field}^{k,l}$ wird also bestimmt durch:

N	<i>Gesamtanzahl von CA3-CA1-Synapsen</i>
S_k	<i>Kopplungseffizienz Kondensator-Hirnschnitt:</i> Anzahl von Synapsen der durch Kondensator k stimulierten CA3-Neuronen.
$\langle W_{k,l} \rangle$	<i>Mittleres synaptisches Gewicht einer einzelnen Synapse:</i> Mittelwert der Stärke der einzelnen Synapsen die durch Kondensator k stimuliert und von denen mit Transistor l detektiert wird (in Abb. 4.10 rot markiert).
D_l	<i>Kopplungseffizienz Hirnschnitt-Transistor:</i> Anzahl von Synapsen der durch Transistor l detektierten CA1-Neuronen.
V_l	Amplitude des Feldpotentials gemessen mit Transistor l hervorgerufen durch eine Synapse der Stärke 1 im Detektionsbereich.

$$V_{field}^{k,l} = \left(\frac{S_k}{N} \right) \langle W_{k,l} \rangle \left(\frac{D_l}{N} \right) V_l N = S_k \langle W_{k,l} \rangle D_l \frac{V_l}{N} \quad (4.3)$$

Dies ist eine theoretische Beschreibung der oben experimentell bestimmten Matrix. Die integrale Feldpotentialbeschreibung in [Hutz 04] wurde dazu stark vereinfacht und diskretisiert. Die eigentlich interessierenden Größen $\langle W_{k,l} \rangle$ können aus dem Experiment damit aber nicht ermittelt werden.

Im Kapitel zum chipinduzierten Lernen werden die relativen Änderungen von Feldpotentialen gemessen. Mit dem oben beschriebenen Modell kann damit auf die relative mittlere Änderung

$$\frac{\langle \Delta W_{k,l} \rangle}{\langle W_{k,l} \rangle} = \frac{\Delta V_{field}^{k,l}}{V_{field}^{k,l}} \quad (4.4)$$

der Synapsenstärke geschlossen werden. Dies wird an entsprechender Stelle nochmals begründet.

4.3 Räumliche Abbildung neuronaler Aktivität – MTA-Chip

Mit dem Eigenbauchip ist eine kapazitive Detektion prä- und postsynaptischer neuronaler Aktivität mit geringer Ortsauflösung möglich. In diesem Kapitel wird mit dem hochauflösenden MTA-Chip die räumliche Feinstruktur neuronaler Feldpotentiale detektiert und in zwei, einer und null Raumdimensionen diskutiert. Die mit dem Eigenbauchip realisierte kapazitive Stimulation ist mit diesem Chiptyp allerdings noch nicht möglich, sodass hier mit Wolframelektroden stimuliert werden musste. Wie schon bei den EOS- ist auch bei den EOMOS-Transistoren zunächst die Natur des Signals zu untersuchen.

4.3.1 Methodenvergleich: EOMOS-Transistor – Mikroelektrode

Die Aufzeichnung extrazellulärer lokaler Feldpotentiale mit Mikroelektroden ist eine Standardmethode der Neurophysiologie. Will man eine neuartige Technologie wie z.B. die EOMOS-Transistormessung von Feldpotentialen etablieren, so muss zunächst, wie auch schon bei den EOS-Transistoren, die Äquivalenz der, über die beiden Methoden gemessenen, Signale gezeigt werden.

Dazu wurde eine Mikroelektrode in einen kultivierten Hippocampusschnitt eingestochen und die Spitze der Pipette so nahe wie möglich an die Chipoberfläche herangefahren, ohne die Spitze oder den Chip zu beschädigen. Die Position der Spitze im Gewebe konnte unter dem Mikroskop mit einer lateralen Genauigkeit von etwa $20\ \mu\text{m}$ lokalisiert werden. Als Detektionsort wurde das Zentrum von stratum pyramidale gewählt, da hier das mit den Transistoren gemessene Feldpotential innerhalb von $20\ \mu\text{m}$ fast konstant war. Die Stimulation erfolgte über eine, im stratum pyramidale von CA3 platzierte Wolframelektrode ($\Delta I = -55\ \mu\text{A}$, $\Delta t = 200\ \mu\text{s}$). Das evozierte neuronale Feldpotential wurde synchron mit der Mikroelektrode und den Transistoren detektiert. Da für diese Messung nur ein Teil des MTAs ausgelesen wurde, konnte die Samplingrate auf 8 kHz erhöht werden. Das Signal/Rausch-Verhältnis wurde durch Bessel-Filterung zwischen 1 Hz und 1 kHz und zweidimensionaler, räumlicher Gauß-Filterung mit $\sigma = \sqrt{2}$ Pixel verbessert.

4.3.1.1 Resultat

Ein Vergleich der mit Mikroelektrode und EOMOS-Transistor gemessenen Signale ist in Abb. 4.11 gezeichnet. Fünf Millisekunden nach dem Stimulationsartefakt misst die Mikroelektrode einen positiven Spannungspuls mit einer Amplitude von 2 mV und einer Dauer von etwa 20 ms. Form und Amplitude sind typisch für Feldpotentiale wie sie im stratum pyramidale des Hippocampus auftreten und aus den Messungen mit dem Eigenbauchip wohlbekannt sind. Die Aufzeichnung mit dem EOMOS-Transistor zeigt ein Signal ähnlicher Form aber einer etwas erhöhten Amplitude von 3 mV.

4.3.1.2 Diskussion

Eine Mikroelektrode misst das lokale Feldpotential an ihrer Spitze, das durch die Überlagerung von Stromquellen im Hirnschnitt entsteht (Abschnitt 3.1.2.4). Die räumliche Verteilung dieser Stromquellen kann über die Current-Source-Density Analyse aus der ortsaufgelösten Messung neuronaler Feldpotentiale berechnet werden - ein Hauptziel von Multi-Site Detektionsmethoden. Dazu ist es notwendig, dass gemessene Signalform und -amplitude der verwendeten Detektionsmethode mit der Referenzmethode Mikroelektrode übereinstimmt.

Das Mikroelektrodensignal in Abb. 4.11 zeigt ein für das stratum pyramidale typisches Feldpotential, wie es durch Aktivierung exzitatorischer Synapsen entsteht [Rich 87, John 98]. Das

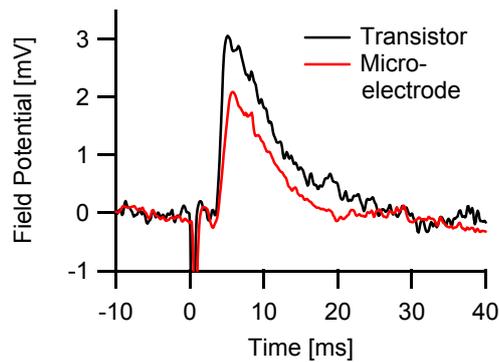


Abbildung 4.11: Vergleich von EOMOS-Transistor- und Mikroelektrodenmessung. Transistor- (schwarz) und Mikroelektrodensignal (rot), gemessen im stratum pyramidale eines kultivierten Hirnschnittes nach Stimulation mit einer Wolframelektrode zur Zeit $t = 0$. Das Transistorsignal wurde räumlich Gauß-gefiltert ($\sigma = \sqrt{2}$ Pixel). Die Spitze der Mikroelektrode befand sich im Hirnschnitt, lateral am Ort des Transistors, vertikal etwas über der Chipoberfläche.

Signal des einzelnen EOMOS-Transistors in Abb. 4.11 stimmt mit dem Signal der Mikroelektrode überein, die mit ihrer Spitze in der Nähe des Transistors platziert war. Die Amplitude des Transistorsignals ist etwas höher, was, wie schon im Methodenvergleich EOS-Transistor – Mikroelektrode, auf die unterschiedliche vertikale Detektionsposition zurückgeführt werden kann. Nach dem besprochenen Modell hätte sich, bei einem Amplitudenverhältnis von $c = 3 : 2$, die Mikroelektrode in einer Höhe $z = 40 \mu\text{m}$ über dem MTA-Chip befunden. EOMOS-Transistoren messen also, wie auch EOS-Transistoren das lokale elektrische Feldpotential an der Chipoberfläche. Dies ist eine Konsequenz aus (i) der kapazitiven Ankopplung des lokalen Feldpotentials durch die isolierende Elektrolyt-Chip Grenzfläche an die Transistoren und (ii) einer entsprechenden Kalibrierung des Signals [Lamb 04].

Anmerkung zu Feldpotentialmessungen mit MEAs Mit planaren, metallischen Multi-Elektroden-Arrays konnten hippocampale Feldpotentiale alle $100\text{-}200 \mu\text{m}$ detektiert werden. Auffallend ist dabei jedoch, dass die Arbeiten, die sich auf pEPSPs in der CA1- oder CA3-Region kultivierter Schnitte beziehen [Stop 97, Eger 98, Jahn 99, Dupo 99, Ghol 01, Berg 03], eine Signalamplitude von nur etwa $400 \mu\text{V}$ oder darunter messen. Im Vergleich hierzu liefern MTA- und Mikroelektrodenmessungen einige mV. Die mit MEAs gemessenen Amplituden von pEPSPs akuter Schnitte betragen $200 \mu\text{V}$ oder darunter [Jobl 81, Nova 88, Oka 99, Thie 99, Heus 02]. Offensichtlich sind die mit planaren Metallelektroden detektierten Spannungen *nicht* mit den lokalen neuronalen Feldpotentialen identisch. Der Ursprung dieser Diskrepanz wird in der Literatur nicht besprochen. Wie oben gezeigt werden konnte, messen MTAs also im Gegensatz zu MEAs die korrekte Amplitude neuronaler Feldpotentiale. Dies ist eine Voraussetzung für die Durchführung einer sinnvollen CSD-Analyse.

Wenn die feinste räumliche Abtastung ($7.8 \mu\text{m}$) und die gesamte Fläche ($1000 \mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$) des Chips verwendet wird, beträgt die maximale Samplingrate 2 kHz bei einem Rauschen von etwa $250 \mu\text{V rms}$. Obwohl das rms-Rauschen der MTAs größer ist als das der MEAs, ist das Signal/Rausch-Verhältnis der MTA-Messungen dennoch hoch, da die gemessenen, tatsächlichen Feldpotentialamplituden etwa $10\times$ höher als bei MEAs sind.

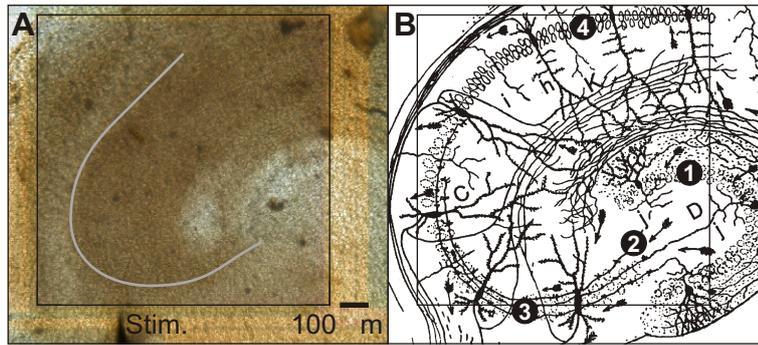


Abbildung 4.12: Hippocampus der Ratte und Multi-Transistor-Array (MTA). (A) Mikroskopische Aufnahme eines kultivierten Hirnschnittes auf einem Siliziumchip. Die aktive Fläche des MTA (1 mm x 1 mm) ist mit einem schwarzen Quadrat markiert. Die graue Kurve kennzeichnet den Übergang von stratum pyramidale (helleres Feld links und unterhalb davon) zu stratum radiatum (rechts davon), wie er aus der MTA-Messung in Abb. 4.14 abgeleitet wurde. Das schwarze Dreieck am unteren Ende (Stim.) ist die Spitze der Wolframelektrode. (B) Zum Vergleich eine Zeichnung eines Golgi-gefärbten Schnittes des Hippocampus der Ratte nach Cajal ([Caja 11], modifiziert). Aus den Neuronen des gyrus dentatus (1) entspringen Moosfasern (2) und laufen in das stratum pyramidale von CA3 (3) ein. CA1 ist mit (4) markiert. Das schwarze Quadrat kennzeichnet die ungefähre Fläche des Schnittes die mit dem MTA abgetastet werden konnte.

4.3.2 Zweidimensionale Abbildung $1 \rightarrow (128,128)$

Anhand des in Abb. 4.12A gezeigten Hirnschnitt-Chip-Systems soll nun exemplarisch eine zeitaufgelöste, räumliche Abbildung der elektrischen Aktivität eines kultivierten Hippocampuschnittes mittels MTA-Chip vorgestellt werden. *Einem* Stimulationsort (Wolframelektrode in Pyramidalzellschicht von CA3) wird das neuronale Signal, gemessen mit einer *Matrix von 128x128 Transistoren*, zugeordnet. Das MTA kann einen großen Teil des Hippocampus abtasten, CA-Bogen und gyrus dentatus können durch Vergleich mit den anatomischen Zeichnungen von Cajal klar identifiziert werden (Abb. 4.12). Ein Video der gesamten Messung kann über die Homepage des Instituts heruntergeladen werden¹. Sowohl die Detektionsmethode MTA-Chip als auch der Hirnschnitt waren stabil in dem Sinne, dass eine wiederholte Stimulation gleiche Messergebnisse lieferte. Eine ähnliche raumzeitliche Dynamik konnte in 12 weiteren Hirnschnitt-Chip-Systemen reproduziert werden, mit jeweils unterschiedlichen Positionen des kultivierten Hirnschnittes relativ zum Transistorarray.

4.3.2.1 Messung ohne Toxine

Wir betrachten zunächst ein Abbildungsexperiment, in dem der Schnitt in normalem Messmedium, über eine im stratum pyramidale von CA3 platzierte Wolframelektrode, wie in Abb. 4.12A gezeigt, stimuliert wurde ($\Delta I = -70 \mu A$, $\Delta t = 200 \mu s$).

Resultat Die Amplituden der mit dem Transistorarray gemessenen Feldpotentiale sind in der linken Spalte von Abb. 4.13 zu acht Zeiten, zwischen 1 ms und 20 ms nach der Stimulation gezeichnet. In den Messungen erkennt man 1 ms und 1.5 ms nach der Stimulation negative Transienten, die sich in zwei Richtungen ausbreiten. Zwei Millisekunden nach der Stimulation treten zusätzliche positive und negative Signale entlang des CA-Bogens auf. Die Ausbreitung der positiven und negativen Signale erfolgt nicht synchron und ist in beiden Raumrichtungen begrenzt. Etwa 20 ms nach der Stimulation verschwindet das Signal.

¹www.biochem.mpg.de/mnphys

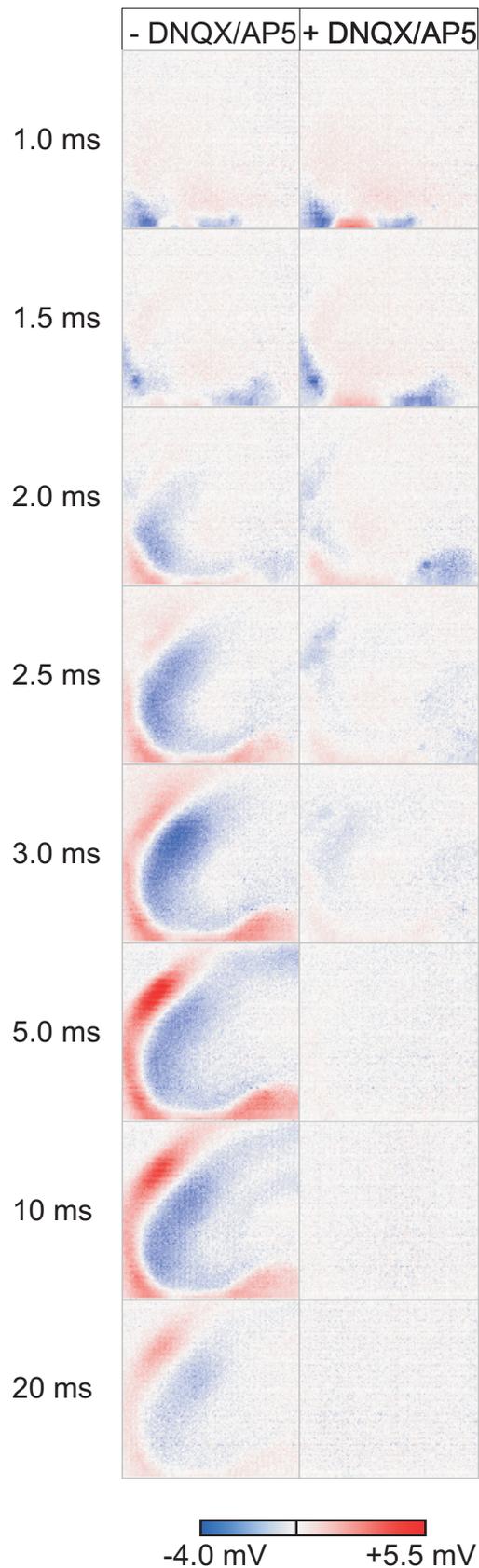


Abbildung 4.13: Bilder des neuronalen Feldpotentials eines kultivierten Hippocampuschnittes, zeitaufgelöst gemessen mit dem MTA. Abgetastete Fläche: 1 mm x 1 mm. Es wurden acht Bilder zu verschiedenen Zeiten nach der Stimulation mit einer Wolframelektrode im stratum pyramidale von CA3 (siehe Abb. 4.12A), ausgewählt. Linke Spalte: Schnitt perfundiert mit Messmedium ohne DNQX/AP5. Rechte Spalte: Schnitt perfundiert mit Messmedium mit DNQX/AP5.

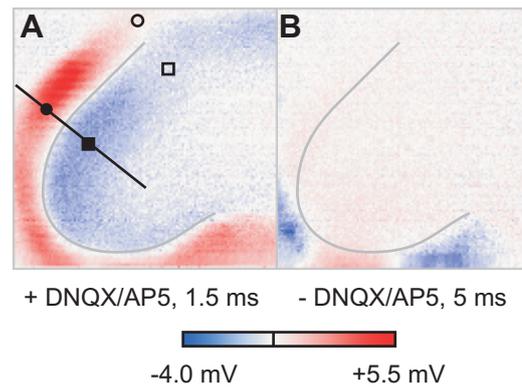


Abbildung 4.14: Vergleich früher und später Feldpotentiale. (A) Feldpotential gemessen ohne Toxine 5 ms nach Stimulation. (B) Feldpotential gemessen mit Toxinen 1.5 ms nach Stimulation. Die graue Kurve kennzeichnet die Grenze zwischen positiven und negativen Signalen in (A). Die schwarze Linie markiert den Ort des linearen Feldpotentialprofils in Abb. 4.15. Die Kreise und Quadrate kennzeichnen die Orte der in Abb. 4.16 gezeichneten, lokalen Feldpotentiale.

Diskussion Hippocampale Feldpotentiale entstehen hauptsächlich aus dem exzitatorischen synaptischen Einwärtsstrom im stratum radiatum und einem kompensierenden Auswärtsstrom im stratum pyramidale [John 98], haben also einen dominant *postsynaptischen* Ursprung (Abschnitt 3.1.2.4). Der präsynaptische Anteil des Feldpotentials wird im nächsten Abschnitt identifiziert.

In Abb. 4.14A ist die MTA-Messung 5 ms nach der Stimulation vergrößert gezeichnet. Aufgrund ihrer langen Dauer sind die postsynaptischen Signale am Ort der Stimulation noch detektierbar, wenn ihre Ausbreitungsfront schon die Grenzen von CA3 erreicht hat. Die Grenze zwischen negativem und positivem Signal ist mit einer grauen Kurve markiert. Diese Kurve wurde in die Mikroskopaufnahme von Abb. 4.12A übertragen und folgt eindeutig der Form des CA-Bogens - die anatomische Struktur ist also in den Messergebnissen wiederzuerkennen.

Der MTA-Chip besitzt eine derart hohe Dichte an Transistoren, dass die lokal detektierten Feldpotentiale zu einem räumlich fast kontinuierlichen Abbild des gesamten neuronalen Feldpotentials über der großen aktiven Fläche des MTA zusammengesetzt werden können. Als Konsequenz daraus kann mit dieser Methode neuronale Aktivität nicht nur *lokal* mit hoher Auflösung detektiert werden, es ist auch möglich über große Distanzen hinweg Korrelationen in der Aktivität zu untersuchen, ohne wie bei Mikroelektroden, auf wenige, vorher festgelegte Positionen beschränkt zu sein.

Mit dem MTA-Chip kann das Feldpotential auch mit hoher Ortsauflösung entlang der Dendriten im stratum radiatum beobachtet werden. Damit könnten z.B. Inhomogenitäten in der LTP-Expression festgestellt werden, oder über pharmakologische Untersuchungen die räumliche Verteilung bestimmter Ionenkanäle.

4.3.2.2 Messung mit Toxinen

Wir betrachten nun ein Abbildungsexperiment, in dem die durch AMPA- bzw. NMDA-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle vermittelte synaptische Übertragung, durch die Toxine DNQX und AP5 im Messmedium blockiert war. Es sollte damit der präsynaptische Anteil des Feldpotentials identifiziert werden.

Resultat In den Messungen 1, 1.5 und 2 ms nach der Stimulation (Abb. 4.13 rechte Spalte) erkennt man ausgeprägte, negative Transienten, die sich vom Stimulationsort in zwei Richtungen entlang des CA-Bogens ausbreiten.

Diskussion In Abb. 4.14B ist die MTA-Messung mit Toxinen 1.5 ms nach der Stimulation vergrößert gezeichnet. Die aus Abb. 4.14A übernommene graue Kurve stellt die Grenze zwischen stratum radiatum und pyramidale dar (vgl. Abb. 4.12). Das Bild zeigt also, dass der schnelle Puls präsynaptischer Aktivität nahe des stratum pyramidale lokalisiert ist. Diese Lokalisierung lässt darauf schließen, dass der Puls durch Aktionspotentiale in Moosfasern gebildet wurde, die durch CA3 verlaufen und über die Wolframelektrode stimuliert wurden [Ade 71, Amar 89, Ishi 90]. Bestätigt wird diese Schlussfolgerung durch das Ende der orthodromen Ausbreitung in einem Bereich des CA-Bogens, in dem sich der Übergang CA3-CA1 befinden musste und durch das Ende der antidromen Ausbreitung in der Nähe des gyrus dentatus (Abb. 4.13 rechts). Aus den Messungen bei 1, 1.5 und 2 ms kann eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von etwa 0.25 m/s abgeschätzt werden, ein typischer Wert für Moosfasern ohne Myelinhülle [Ade 71]. In der letzten Phase (3 ms in Abb. 4.13 rechts) breitet sich eine Welle in stratum radiatum von CA3 hinein aus. Wenn man die raumzeitliche Gesamtentwicklung dieser Signale betrachtet, kann man daraus schließen, dass das Signal der Moosfasern in den dendritischen Bereich von CA3 einläuft. Der über GABA-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle vermittelte postsynaptische Beitrag inhibitorischer Synapsen zum Feldpotential ist vernachlässigbar (Abb. 4.13 rechts, nach 3 ms).

In den Messungen ohne Toxine ist schwache postsynaptische Aktivität in CA1 mit negativer Amplitude im stratum radiatum und positiver Amplitude im stratum pyramidale erkennbar (5 ms und 10 ms in Abb. 4.13 links). Diese muss durch die Aktivierung von Synapsen der Schaffer Kollaterale verursacht worden sein, die von CA3 nach CA1 im stratum radiatum verlaufen [Ade 71, Amar 89, Ishi 90, Caes 91]. Die zugehörige präsynaptische Aktivität (Aktionspotentiale) entlang dieser Fasern war jedoch in den Messungen mit Toxinen nicht erkennbar. Die Anzahl der stimulierten Kollaterale war im vorgestellten Experiment vermutlich zu klein, um ein fiber volley zu erzeugen, dessen Amplitude mit dem MTA detektiert werden hätte können.

Verwendet man Messmedium mit Toxinen, so kann mit dem MTA-Chip also eine Abbildung der präsynaptischen Aktivität aufgezeichnet werden.

4.3.3 Eindimensionale Abbildung: Feldpotentialprofil

Im Folgenden werden Teile der vorgestellten zweidimensionalen Abbildung genauer untersucht, da dadurch einige Vorzüge der Detektion von Feldpotentialen mit MTA-Chips klar werden. Zunächst werden eindimensionale Abbildungen betrachtet: *Einem* Stimulationsort (Position der Wolframelektrode) wird das mit einer *linearen Anordnung* von Transistoren detektierte Feldpotentialprofil zugeordnet.

Resultat Abb. 4.15 zeigt ein lineares Profil des Feldpotentials senkrecht zum CA3-Bogen, ohne Toxine, 5 ms nach der Stimulation. Der Ort des Profils ist in Abb. 4.14A als Linie eingezeichnet. Ein breiter negativer Bereich im stratum radiatum geht in einen schmaleren positiven im stratum pyramidale über. Das zweite Profil in Abb. 4.15 zeigt eine Messung mit Toxinen, 2.5 ms nach Stimulation am selben Ort. Hier erkennt man nur einen schmalen, negativen Bereich im stratum pyramidale.

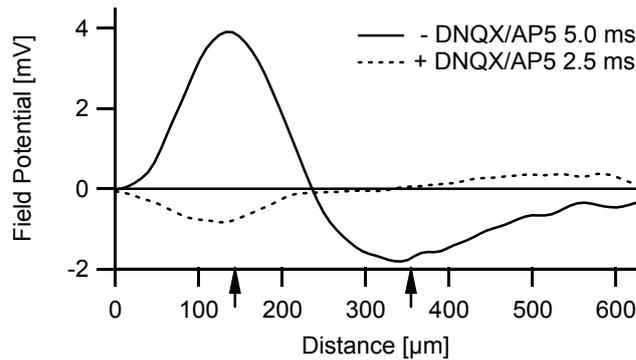


Abbildung 4.15: Eindimensionale Profile des Feldpotentials in Abb. 4.13 (Ort markiert in Abb. 4.14A). Durchgezogene Linie: Messung ohne Toxine, 5 ms nach Stimulation. Gestrichelte Linie: Messung mit Toxinen, 2.5 ms nach Stimulation. Räumliche Gauß-Filterung mit $\sigma = \sqrt{2}$ Pixel. Die Pfeile markieren den Ort der in Abb. 4.16A gezeigten, lokalen Feldpotentiale.

Diskussion Das Profil in Abb. 4.15 zeigt, dass sich das Feldpotential über kurze Distanzen von $20 \mu\text{m}$ um etwa 1 mV , bzw. 25% seiner Amplitude, also signifikant ändern kann. Eine hohe räumliche Auflösung der Detektionsmethode, wie sie mit dem MTA-Chip zur Verfügung steht, ist offensichtlich unabdingbar, wenn aus den Feldpotentialen über zweite räumliche Ableitungen eine quantitative CSD-Analyse [Mitz 85] erstellt werden soll. Gewöhnliche MEAs liefern Messpunkte in einem räumlichen Abstand von $100\text{-}200 \mu\text{m}$ und sind daher nicht zur Berechnung der CSD geeignet - eine Interpolation der Feldpotentiale ist hier ebenfalls nicht sinnvoll. Mit Mikroelektroden wurde ein analoges Profil in $25 \mu\text{m}$ Abständen gemessen [Rich 87], eine simultane Messung an mehreren Detektionsorten ist damit aber nicht möglich.

Qualitativ kann das Profil ohne Toxine durch den einwärts gerichteten Strom durch Glutamat-rezeptoren in die Dendriten und einen komplementären Auswärtsstrom in den Somata erklärt werden [John 98]. Abschnitt 4.3.5 wird den Versuch einer *quantitativen* Erklärung der Orts- und Zeitabhängigkeit solcher Feldpotentialprofile behandeln.

4.3.4 Nulldimensionale Abbildung $1 \mapsto 1$: Vergleich lokaler Feldpotentiale

Mit dem MTA-Chip können an beliebigen, weit voneinander entfernten Orten des Schnittes, lokale Feldpotentiale (z.B. Signale einzelner Transistoren) miteinander verglichen werden. Dies ist mit konventionellen Mikroelektroden oder der groben Abtastung mit MEAs nicht möglich und könnte zu neuen Erkenntnissen über die Funktion des Hippocampus führen. Betrachtet werden nun also Abbildungen von *einem* Stimulationsort zu *einem* Detektionsort.

Resultat und Diskussion Als Beispiele werden die Aufzeichnungen der in Abb. 4.14A markierten Transistoren untersucht. Das Signal/Rausch-Verhältnis wurde durch zweidimensionale räumliche Gauß-Filterung mit $\sigma = \sqrt{2}$ Pixel verbessert. Die Messungen in CA3 (Abb. 4.16A) zeigen pEPSPs mit einer Amplitude von 4 mV im stratum pyramidale bzw. -2 mV im stratum radiatum. Die pEPSPs von CA1 (Abb. 4.16B) sind hier um einen Faktor zwei kleiner. Im Gegensatz zu CA3 erkennt man in CA1 klare pSpikes, hervorgerufen durch die Bildung von Aktionspotentialen in Pyramidalneuronen. Der biologische Ursprung und die Konsequenzen dieser Diskrepanzen müssen noch untersucht werden.

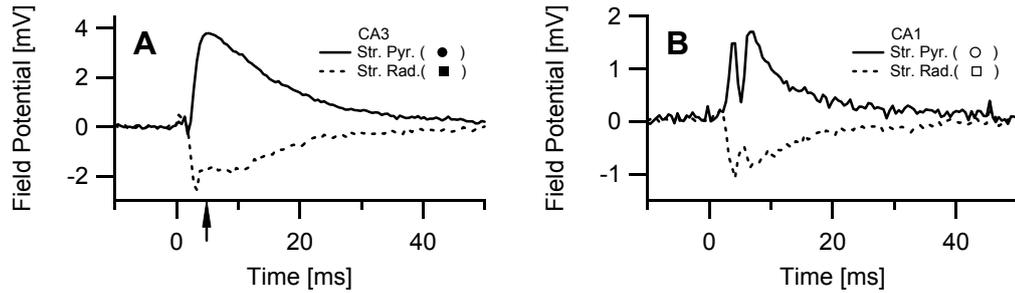


Abbildung 4.16: Lokale Dynamik des Feldpotentials in Abb. 4.13 ohne Toxine. (A) Transistoraufzeichnungen in stratum pyramidale (durchgezogene Linie) und radiatum (gestrichelte Linie) von CA3. Die Positionen der ausgewählten Transistoren sind in Abb. 4.14A mit Symbolen gekennzeichnet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, zu dem das eindimensionale Profil in Abb. 4.15 aufgenommen wurde. (B) Transistoraufzeichnungen in CA1 an den in Abb. 4.14A markierten Positionen. Nach Entfernung des Stimulationsartefaktes wurden die Daten zweidimensional räumlich Gauß-gefiltert ($\sigma = \sqrt{2}$ Pixel).

4.3.5 Vergleich simuliertes – gemessenes Feldpotentialprofil

Ein gemessenes, repräsentatives Feldpotentialprofil senkrecht zum CA-Bogen wird nun mit den Ergebnissen einer Simulation nach Abschnitt 3.3 verglichen.

Zunächst wurde mit den in der untenstehenden Tabelle angegebenen, literaturkonformen Parametern die Transmembranspannung (Abb. 4.17E und F) und das Feldpotential eines einzelnen Modellneurons berechnet:

Größe	Parameter	Wert	Quelle
Dicke Hirnschnitt	h	$70 \mu\text{m}$	[Besl 02]
Breite Linienleiter	y	$30 \mu\text{m}$	folgt aus Radius Soma
spez. Widerstand Hirnschnitt	ρ	$300 \Omega\text{cm}$	[Lang 69, Hols 87]
Radius Dendrit	$r(x)$	$1.5 \mu\text{m}$	-
Länge Dendrit	-	$400 \mu\text{m}$	[Alme 98]
Radius Soma	$r(x)$	$15 \mu\text{m}$	-
Länge Soma	-	$30 \mu\text{m}$	folgt aus Radius Soma
spez. Widerstand Intrazellulärmed.	ρ_i	$100 \Omega\text{cm}$	[Zado 90, Trau 91, Sarg 01]
spez. Widerstand Membran	ρ_m	$20000 \Omega\text{cm}^2$	[Zado 90, John 99]
spez. Kapazität Membran	C_m	$3 \mu\text{Fcm}^{-2}$	[Turn 80, Trau 91, Sarg 01]
Ruhepotential	E_{rest}	-70mV	[Sarg 01]
Umkehrpotential AMPA/NMDA	E_{syn}	0mV	[Zado 90, Sarg 04]
AMPA-Dynamik	τ_1	0.5ms	[Sarg 04]
	τ_2	3ms	[Sarg 04]
NMDA-Dynamik	τ_3	0.67ms	[Zado 90, Sarg 04]
	τ_4	80ms	[Zado 90, Sarg 04]
Leitfähigkeit AMPA (max.)	$g_{max,AMPA}$	$1.04 \cdot 10^{-10} \Omega^{-1} \mu\text{m}^{-1}$	-
Leitfähigkeit NMDA	$g_{max,NMDA}$	$4 \cdot g_{max,AMPA}$	[Sarg 01, Alme 98]: 1x-4x
Breite der Gauß-Verteilung	a	$4.5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^{-2}$	-
Skalierung	F	154	[Alme 98]: 100

Die Simulationsgröße betrug $L = 600 \mu\text{m}$ mit einer Schrittweite von $\Delta x = 10 \mu\text{m}$, die Simulationsdauer betrug $T = 300 \text{ms}$ mit $\Delta t = 1 \text{ms}$. Das in Abb. 4.17B, C und D gezeigte Gesamtfeldpotential entstand aus der Überlagerung der Feldpotentiale dreier Modellneurone, die um je $30 \mu\text{m}$ versetzt waren (Das stratum pyramidale ist etwa drei Neurone breit.). Außerdem wurde mit einem Faktor F skaliert, da auch benachbarte Neurone beitragen. Die Somata der Modellneurone lagen also im Bereich von $340\text{-}430 \mu\text{m}$, die Dendriten links davon.

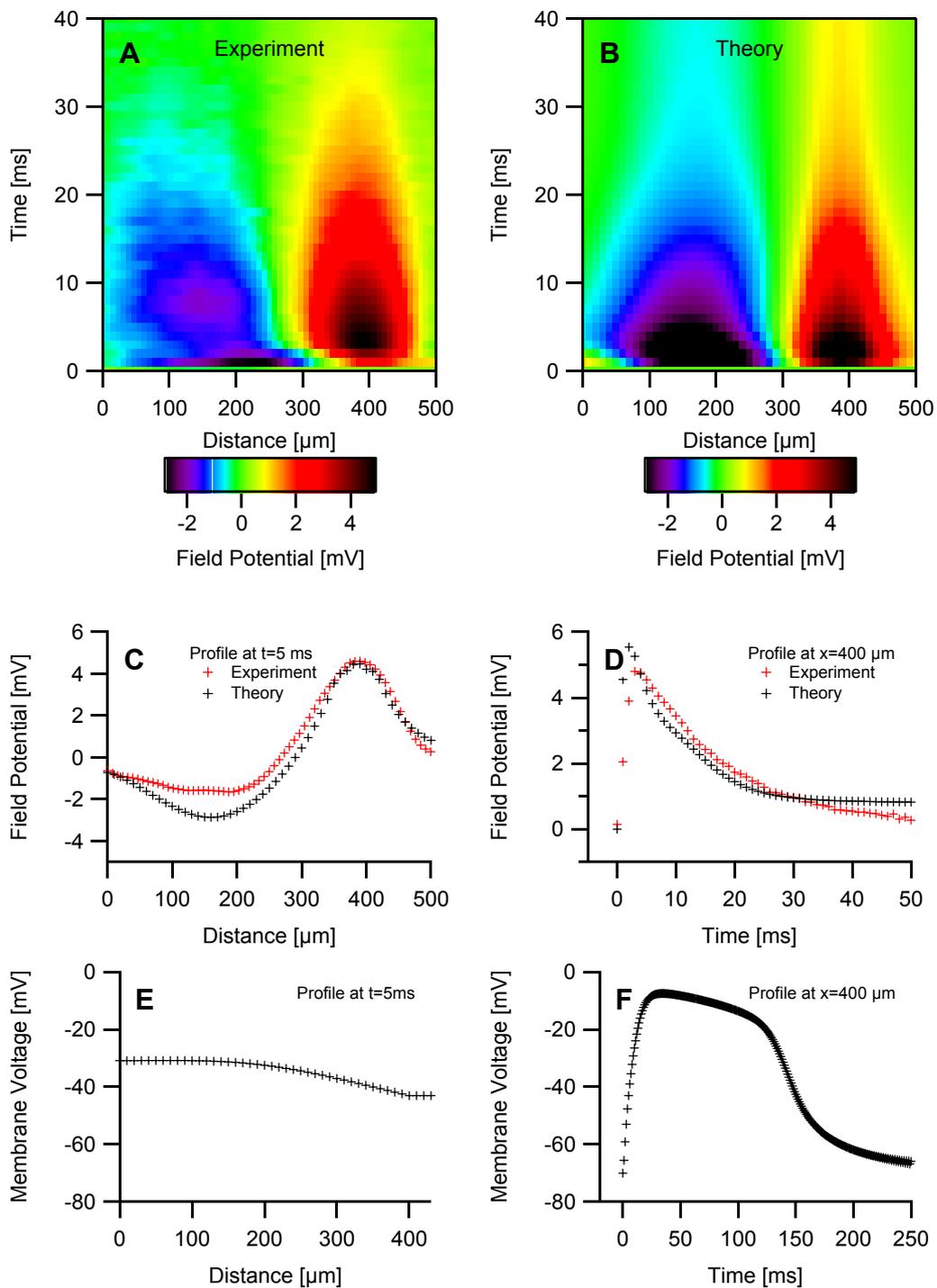


Abbildung 4.17: Ergebnisse der Simulation im Vergleich mit gemessenen Feldpotentialen.

Resultat Abb. 4.17A zeigt das gemessene Profil, 4.17B die Simulation. Die blauen Bereiche kennzeichnen negative, die roten positive Feldpotentiale. Für A und B wurde dieselbe Farbskala verwendet. Die negativen Feldpotentiale zeigen anfangs im Experiment eine im Vergleich zur Theorie reduzierte Amplitude. Ansonsten besteht eine gute Übereinstimmung. In Abb. 4.17C ist der fast identische Ortsverlauf des gemessenen und simulierten Feldpotentials zur Zeit $t = 5$ ms gezeichnet. Abb. 4.17D zeigt vergleichend den Zeitverlauf des Feldpotentials am Ort $x = 400 \mu\text{m}$. Die Transmembranspannung zur Zeit $t = 5$ ms (Abb. 4.17E) nimmt Richtung Soma kontinuierlich ab und erreicht dort einen konstanten Wert von etwa -45 mV. Der Zeitverlauf der Transmembranspannung am Ort $x = 400 \mu\text{m}$ (Abb. 4.17F) zeigt eine starke Depolarisierung des Modellneurons auf etwa -10 mV, die nach ca. 150 ms wieder auf das Ruhepotential abfällt.

Im Bereich der Dendriten waren AMPA- und NMDA-Kanäle modelliert, über die Strom in die Neurone einfließen konnte. Dieser Strom breitete sich intrazellulär aus und trat über die Somata ohne Ionenkanäle über kapazitive und ohmsche Ströme wieder aus. Der ein- bzw. ausfließende Strom bewirkte im extrazellulären Leiter einen negativen bzw. positiven Spannungsabfall (Feldpotential). Die Depolarisation der Transmembranspannung nahm Richtung Soma ab, da über Leckströme der intrazelluläre Stromfluss reduziert wurde. Für die Modellierung der Dynamik der Feldpotentiale war neben der Dynamik der AMPA- auch die der NMDA-Kanäle und die Kapazität der Modellneurone von großer Bedeutung.

Diskussion In [Alme 98] wurden extrazelluläre Feldpotentiale $V_{field}(x, t)$ der CA1-Region über eine Gruppe von Modellneuronen simuliert. Die numerische Berechnung wurde, wie auch in [Sarg 01, Sarg 04], in einem zweistufigen Verfahren durchgeführt:

In einem ersten Schritt wurde ein CA1-Neuron als zylindrisches, aus 6 [Alme 98] bzw. 19 [Sarg 01] verschiedenen Abschnitten aufgebautes Modellneuron repräsentiert und die elektrischen Eigenschaften der einzelnen Compartments (\rightarrow *Compartmentmodell*) durch ein Ersatzschaltbild beschrieben. Es wurde dabei die Dynamik von AMPA-, GABA_A-, GABA_B- sowie NMDA-gesteuerten Ionenkanälen in der Zellmembran modelliert. Die Möglichkeit der Ausbildung von Aktionspotentialen war dabei nur in [Sarg 01] berücksichtigt. Die Abmessungen der verwendeten Modellzelle waren teilweise realistisch gewählt [Alme 98] häufig jedoch schlicht abwegig [Sarg 01, Sarg 04]. Über das Ersatzschaltbild wurde dann der Transmembranstrom für jedes Compartment berechnet, unter der Annahme dass der Extrazellulärraum auf Massepotential liegt.

Im zweiten Schritt wurde der Transmembranstrom dann in die Lösung (3.13) des Modells eines unendlich ausgedehnten Volumenleiters für punktförmige Stromquellen eingesetzt und daraus ein Feldpotential berechnet [Alme 98, Sarg 01].

In der eigenen Simulation wurde dieser zweistufige Algorithmus durch einen physikalisch geschlossenen Ansatz ersetzt, der auch die Randbedingungen des endlich ausgedehnten Hirnschnittes korrekt berücksichtigt. Es konnte damit gleichzeitig die Transmembranspannung des Modellneurons als auch dessen Feldpotential berechnet werden. Dies ist mit beliebiger räumlicher und zeitlicher Präzision möglich, die Beschränkung auf eine geringe Anzahl von Compartments entfällt. Die physiologische Komplexität der Compartmentmodelle wurde auf das Wesentliche vereinfacht, die Geometrie des Modellneurons aber realistisch gewählt. Es wurde nicht mehr angenommen, dass der Extrazellulärraum auf Massepotential liegt, was eine realistischere Modellierung ermöglicht.

Der Zweck einer Simulation ist es, theoretische Modelle durch Vergleich mit Experimenten bewerten zu können, oder neue experimentelle Ansätze zu finden [Sarg 01]. Für die gewählten, literaturkonformen bzw. realistischen Parameter besteht eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment. Bei einer kleineren Leitfähigkeit $g_{max,AMPA}$, d.h.

einer geringeren Depolarisation, ist dies jedoch nur noch eingeschränkt der Fall. Um mit der Simulation einen größeren Gültigkeitsbereich abzudecken, muss wahrscheinlich die Verästelung des Dendritenbaumes berücksichtigt werden. Dazu könnten z.B. mehrere Dendritenäste zu einem repräsentativen Dendriten zusammengefasst werden, dessen Geometrie von der des hier verwendeten abweicht (analog Rall-Modell, [John 99]). Es müsste dann ein entsprechend veränderter Parametersatz in die Simulation eingesetzt werden.

Mit der Simulation steht eine neue Möglichkeit zur Erklärung hippocampaler Feldpotentiale zur Verfügung.

4.4 Input-Output-Relation

Wird in traditionellen Elektrophysiologieexperimenten der durch eine Wolframelektrode fließende Strom (Reiz) schrittweise erhöht, so nimmt die mit einer Mikroelektrode gemessene Amplitude des Feldpotentials (Antwort) zu. Der Zusammenhang zwischen Reiz und Antwort wird als *Input-Output (I/O)-Relation* bezeichnet.

Die nun folgenden Experimente mit dem Eigenbauchip werden zeigen, dass auch für Kondensator-Reiz und Transistor-Antwort ein analoger Zusammenhang gilt und dieser, mit den im Theorieteil abgeleiteten Beziehungen, gut erklärt werden kann.

4.4.1 Messung mit großer Schrittweite

Die Amplitude der an den Kondensator (Nr.3, CA3-Zellkörperbereich) angelegten Spannungsrampen, wurde in 0.2 V Schritten von 1.0 V auf 4.0 V erhöht. Diese Sequenz wurde dreimal wiederholt um die Standardabweichung und damit ein Maß für die Amplitudenschwankung berechnen zu können. Die kritische Spannung, ab der eine Antwort detektiert werden konnte, lag bei 1.6 V.

4.4.1.1 Resultat und Diskussion: Einzeltransistor

In Abb. 4.18A ist der Zeitverlauf der an den Kondensator angelegten Spannungsrampen für vier exemplarische Amplituden gezeigt. Die mit einem Transistor (Nr.6) im stratum radiatum von CA1 gemessenen, korrespondierenden Feldpotentiale sind in Abb. 4.18B zu sehen. Eine zunehmende Reizstärke bewirkt eine Vergrößerung der Amplitude der Antworten. Ursache dafür ist die mit zunehmender Stimulusintensität größer werdende Anzahl stimulierter CA3-Neurone bzw. Axone und die dadurch zunehmende Anzahl beitragender EPSPs [John 99].

Ein aussagekräftigeres Bild liefert Abb. 4.19A. Die Datenpunkte zeigen mit Transistor Nr.6 gemessene Amplituden der Feldpotentiale (arithmetisches Mittel mit Standardabweichung) in Abhängigkeit von der angelegten Kondensatorspannung $|\Delta V_s|$. Transistorrauschen oder einzelne statistische Spitzen bestimmten die Amplituden der Messdaten unterhalb einer Grenze von etwa 0.34 mV. Aus diesem Grunde wurden Datenpunkte, die diesen Wert unterschritten, auf 0 gesetzt.

Man kann die experimentell bestimmte I/O-Relation in Abb. 4.19A klar in drei Intervalle einteilen (linke und mittlere Spalte der folgenden Tabelle) und den im Theorieteil abgeleiteten Intervallen (rechte Spalte) zuordnen:

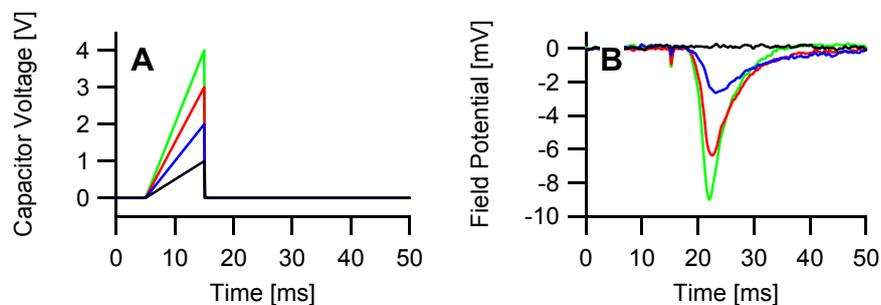


Abbildung 4.18: Mit ansteigender Reizstärke nimmt das Feldpotential zu. (A) Zeitverlauf der an den Kondensator angelegten Spannungsrampen unterschiedlicher Amplitude. (B) Mit Transistor im stratum radiatum gemessene, korrespondierende Feldpotentiale.

$ \Delta V_s < 1.6 \text{ V}$ $1.6 \text{ V} < \Delta V_s < 2.7 \text{ V}$ $ \Delta V_s > 2.7 \text{ V}$	kein Feldpotential nachweisbar nichtlineare Zunahme der Amplitude näherungsweise lineare Zunahme	$ \Delta V_s < \Delta V_s^{crit} $ $ \Delta V_s^{crit} < \Delta V_s < \Delta V_s^{limit} $ $ \Delta V_s > \Delta V_s^{limit} $
--	--	--

Vergleich mit Theorie Die durchgezogene Linie in Abb. 4.19A stellt die I/O-Relation in der Näherung $\langle V_{field}^{single} \rangle \ll V_{field}$ dar (Gleichung (3.43) auf Seite 48). Als Parameter gingen dabei ein:

- Radius des Kondensators: $a_0 = 50 \text{ } \mu\text{m}$ (bekannt)
- Längskonstante: $\lambda_{sheet} = \frac{70}{\sqrt{2}} \text{ } \mu\text{m}$ (aus [Besl 02])

Als freie Fitparameter verbleiben damit nur noch:

- Kritische Spannung ($\Delta V_s^{crit} = -1.6 \text{ V}$, aus Messpunkten klar ersichtlich)
- Amplitude (unbekannt, hier $A = -6.8 \cdot 10^{-4} \text{ mV}$)

Das verschwindende neuronale Feldpotential für unterkritische Stimuli wird durch die Theorie ebenso korrekt beschrieben, wie das nichtlineare Verhalten darüber. Der Übergang zum annähernd linearen Bereich ist auch im Experiment deutlich. Ein Sättigungsverhalten wie in [Besl 02] trat nicht auf, da vermutlich der kapazitive Strom nicht ausreichend hoch gewählt werden konnte. Insgesamt besteht eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment.

Verwendet man Multi-Elektroden-Arrays zur Stimulation von Hirnschnitten, so wird über ebenfalls *scheibenförmige* Elektroden faradayscher Strom abgegeben. Man würde also einen identischen Verlauf der I/O-Relation erwarten wie bei Kondensatorreizung. Dass dies qualitativ der Fall ist, sieht man in [Heus 02]. Eine ähnliche I/O-Kurve wurde auch mit spannungsabhängigen Farbstoffen bei Stimulation über eine Mikroelektrode detektiert [Tomi 00].

Kritischer Radius In Abb. 4.19B ist der kritische Radius a^{crit} als Funktion der Kondensatorspannung gezeigt, wie er sich aus Gleichung (3.35) auf Seite 45 mit den oben genannten Parametern ergibt. Der kritische Radius wird für $|\Delta V_s| > 1.6 \text{ V}$ von Null verschieden, nimmt zunächst rapide zu und erreicht bei $|\Delta V_s^{limit}| = 2.68 \text{ V}$ den Kondensatorrand. Danach nimmt er nur noch langsam zu. Das Modell sagt also voraus, dass für Kondensatorspannungen zwischen 1.60 und 2.68 V das Hirnschnittgewebe ausschließlich innerhalb der Kondensatorfläche,

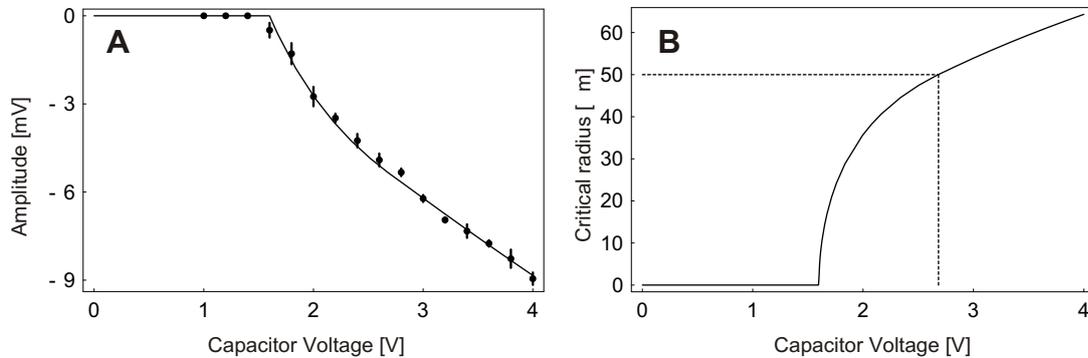


Abbildung 4.19: I/O-Relation im exemplarischen Vergleich von Theorie und Experiment. (A) Amplitude der Feldpotentiale gegen applizierte Kondensatorspannung (Messung: Punkte, Theorie: durchgezogene Kurve). (B) Kritischer Radius als Funktion der Kondensatorspannung. Bei 2.68 V überschreitet der kritische Radius den Kondensatorradius von $50 \text{ } \mu\text{m}$ (gestrichelte Linie).

also *stark lokalisiert* gereizt werden kann. Dies steht auch mit den experimentellen Beobachtungen (Abschnitt 4.2.2.2) in Einklang.

4.4.1.2 Resultat und Diskussion: Transistorarray

Die Datenpunkte in Abb. 4.20 zeigen die mit allen 12 Transistoren gemessenen Amplituden der Feldpotentiale (arithmetisches Mittel mit Standardabweichung), in Abhängigkeit der angelegten Kondensatorspannung. Für die 12 Theoriekurven (durchgezogene Linien) wurden die gleichen Fitparameter wie oben verwendet, mit Ausnahme der in der untenstehenden Tabelle angegebenen Werte A für die Amplituden (Gleichung (3.43) auf Seite 48).

A in $[10^{-4} \text{ mV}]$		
-5.50	-7.80	-0.85
-5.90	-6.80	+6.50
-3.40	+5.00	+10.00
+2.40	+5.70	+4.00

Die grundlegende Form aller 12 Transistoraufzeichnungen unterscheidet sich kaum von der des oben exemplarisch besprochenen Transistors Nr.6. Es ergeben sich sehr gute Übereinstimmungen zwischen Theorie und Experiment für die Transistoren Nr.2,3,6, 8,9,11 und 12. Am Ort des Transistors Nr.9 werden nur kleine Feldpotentiale von etwa -1 mV gemessen, was relativ große Fehlerbalken zur Folge hat. Die Messpunkte

der Transistoren Nr.1,4,5,7 und 10 zeigen im Bereich $|\Delta V_s| < 3.0 \text{ V}$ ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung. Oberhalb davon liegt der gemessene Wert konsistent etwas unterhalb der theoretischen Vorhersage.

Die gesamte Input-Output-Matrix in Abb. 4.20 kann also mit einem sehr kleinen Satz aus drei allgemein gültigen Parametern (a_0 , λ_{sheet} , ΔV_s^{crit}) und 12 ortsspezifischen Amplitudenwerten (A) gut approximiert werden. In drei weiteren Hirnschnitt-Chip-Systemen konnte eine Übereinstimmung ähnlicher Qualität zwischen Theorie und Experiment gefunden werden.

Wie weit kann der Kondensatorradius reduziert werden? Mit der kritischen Stimulationsspannung kann abgeschätzt werden, ob eine signifikante Verkleinerung der Kondensatorfläche in nachfolgenden Chipgenerationen sinnvoll ist. Der kritische Strom durch einen kreisförmigen Kondensator ist gegeben durch:

$$I^{crit} = \frac{\epsilon\epsilon_0 r^2 \pi}{d} \frac{\Delta V_s^{crit}}{\Delta t} \quad (4.5)$$

Ein Kondensator A bzw. B mit Radius r_A bzw. r_B erreicht den kritischen Strom bei einer Stimulationsspannung von $\Delta V_{s,A}^{crit}$ bzw. $\Delta V_{s,B}^{crit}$. Haben A und B dasselbe Dielektrikum und ist $\Delta t_A = \Delta t_B$, so gilt:

$$r_B = r_A \sqrt{\frac{\Delta V_{s,A}^{crit}}{\Delta V_{s,B}^{crit}}} \quad (4.6)$$

In dieser Arbeit war $r_A = 50 \mu\text{m}$ und im besten Fall $\Delta V_{s,A}^{crit} = -1.5 \text{ V}$. Die Reizamplitude kann maximal auf $\Delta V_{s,B}^{crit} = -4.5 \text{ V}$ erhöht werden, wenn ohmsche Leckströme vermieden werden sollen. Mit diesen Informationen kann der kleinstmögliche Kondensatorradius zu $r_B \approx 30 \mu\text{m}$ abgeschätzt werden, für den eine kapazitive Stimulation mit dem vorliegenden Dielektrikum gerade noch erfolgreich sein könnte. Eine derartige Reduktion ohne einhergehende Vergrößerung der Dielektrizitätskonstante der Materialien ist allerdings nicht sinnvoll, da dies die Wahrscheinlichkeit für erfolgreiche kapazitive Kopplungen zu stark schmälern würde.

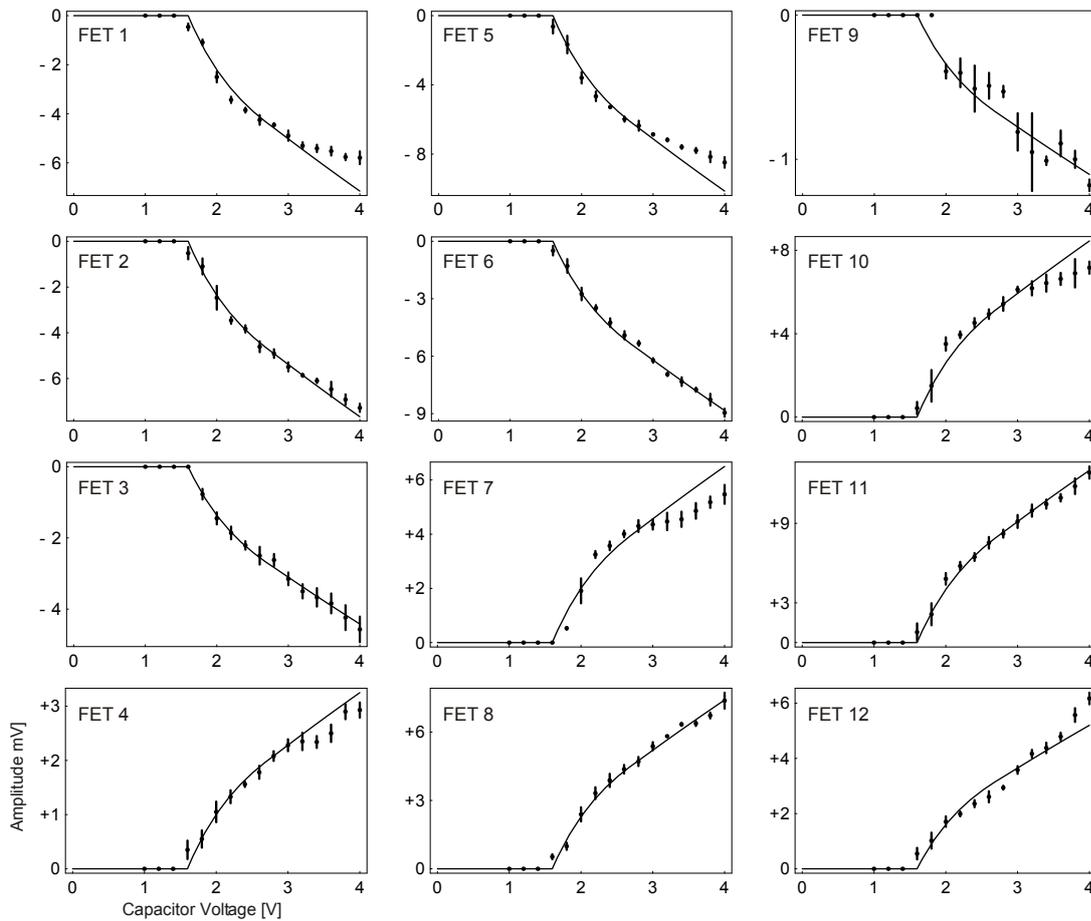


Abbildung 4.20: Messung der I/O-Relation mit Transistorarray und Vergleich mit Theoriekurven. Die Messpunkte zeigen das arithmetische Mittel ($n=3$) und die Standardabweichung der Extrema der pEPSPs, gemessen mit 12 Transistoren als Funktion der angelegten Kondensatorspannung. Für die durchgezogenen Theoriekurven wurden drei allgemeine Fitparameter und 12 ortsspezifische Amplitudenwerte verwendet.

4.4.2 Messungen mit kleiner Schrittweite

Im letzten Abschnitt konnte die theoretische Vorhersage der I/O-Relation für den quasikontinuierlichen Fall bestätigt werden. Nun wird untersucht ob auch die postulierte *Quantisierung* der I/O-Relation experimentell nachweisbar ist. Dies sollte genau dann möglich sein, wenn der Beitrag eines einzelnen Neurons zum Gesamtfeldpotential in CA1 über der Nachweisgrenze der Transistoren liegt. Das Transistorrauschen beträgt etwa 0.2 mVpp. Wenn man annimmt, dass Feldpotentiale ab 0.3 mV damit zuverlässig detektiert werden können, so dürfen bei einer gemessenen Feldpotentialamplitude von 10 mV nicht mehr als $10/0.3 \approx 30$ Neurone beitragen. Wären es mehr, so würde man mit den Transistoren nur eine quasikontinuierliche Kurve messen können. Quantisierungen sind durch breite Plateauphasen gekennzeichnet, auf die Sprünge in der Amplitude folgen. Da in den Messungen des letzten Abschnittes mit 0.2 V Stimulations-Spannungsincrement keine dieser Charakteristiken zu erkennen waren, musste nun die Präzision der Messung erhöht werden.

4.4.2.1 Messung mit Chip

Es wurde dazu eine hochaufgelöste I/O-Relation aufgenommen wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben (Kondensator Nr.8, Startspannung 2.20 V, Inkrement 0.01 V, Endspannung 4.00 V). Bei jeder Kondensatorspannung wurden 10 neuronale Feldpotentiale aufgezeichnet. Die Messung erfolgte automatisiert alle 5 s über einen Zeitraum von 2.5 Stunden.

Resultat und Diskussion Abb. 4.21A zeigt die ungemittelte, mit Transistor Nr.3 gemessene I/O-Relation, welche eindeutig diskontinuierlich ansteigt. Bei der in Abb. 4.21C gezeigten, 10x gemittelten I/O-Relation sind klar Plateauphasen, sowie Sprünge in der Antwortamplitude sichtbar - typische Eigenschaften quantisierter Größen. Die Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten Feldpotentialamplitude ist in Abb. 4.21B für den ungemittelten und in Abb. 4.21D für den gemittelten Fall, in Form von Histogrammen aufgetragen (100 bzw. 50 BINs). Wäre die I/O-Relation kontinuierlich, so dürften die Histogramme keine Maxima zeigen. In Abb. 4.21B bzw. Abb. 4.21D zählt man aber 6-8 Maxima. So tritt z.B. ein Feldpotential von 3.1 mV Amplitude doppelt so häufig auf, als eines mit 3.5 mV. Abb. 4.21E zeigt die gemittelten I/O-Relationen der Transistoren Nr. 3, 5 und 8. Um besser vergleichen zu können, wurden die Messpunkte der Transistoren Nr.5 und Nr.8 skaliert (Faktor -2 bzw. 3). Obwohl die Transistoren an weit voneinander entfernten Orten im Hippocampus messen, sind bei denselben Kondensatorspannungen Quantisierungssprünge zu erkennen, die in der Abbildung gekennzeichnet sind. Der Effekt ist hier also *nicht lokalisiert*. In Abb. 4.21F wurde an das Histogramm 4.21B folgende Überlagerung aus Gauß-Verteilungen

$$H(V_{field}) = \sum_{k=1}^8 a_k \exp \left[- \left(\frac{V_{field} - V^k}{w_k} \right)^2 \right] \quad (4.7)$$

gefittet und daraus die in der Tabelle 4.1 angegebenen gerundeten Fitparameter erhalten. Die Verteilung kann gut an das Histogramm gefittet werden. Abgesehen von Nr.1 und Nr.8 treten alle Maxima im Histogramm mit annähernd gleicher Häufigkeit a_k auf. Die Koordinaten der Maxima in Spalte V^k wurden in Abb. 4.21C zur blau gestrichelten Markierung der Plateaus verwendet. Die Spalte $V_{field}^k = V^k - V^{k-1}$ der Tabelle zeigt, dass der Abstand der Maxima voneinander jeweils etwa 0.7 mV beträgt.

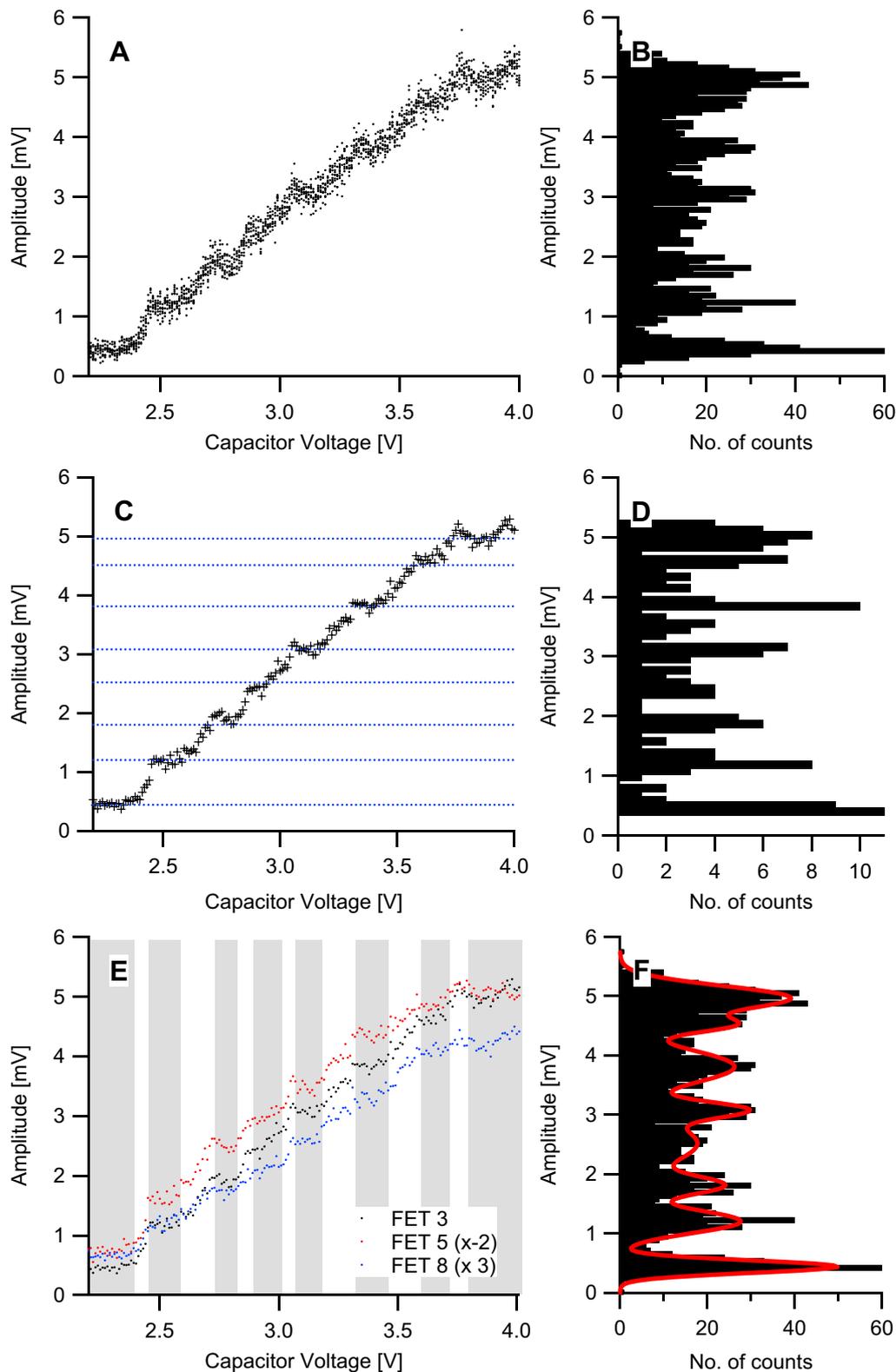


Abbildung 4.21: Quantisierungen in der I/O-Relation: Messung mit Chip. Abgesehen von (E) sind alle gezeigten Messdaten von Transistor Nr.3. (A) Messdaten, ungemittelt. Bei jeder Kondensatorspannung wurden 10 neuronale Feldpotentiale aufgezeichnet. (B) Histogramm, ungemittelt. Die Feldpotentialverteilung zeigt Maxima. (C) Messdaten, 10x gemittelt. Plateauphasen (blau gestrichelt) und Sprünge von etwa 0.7 mV sind klar sichtbar. (D) Histogramm, 10x gemittelt. (E) Messdaten Transistoren Nr.3, 5 und 8, 10x gemittelt. Verschiedene Transistoren zeigen Sprünge bei denselben Kondensatorspannungen (weiße Balken). (F) Histogramm, ungemittelt. Eine Gauß-Verteilung wurde an die Kurve gefittet.

Peak Nr.	a_k	w_k	V^k	V_{field}^k
1	50 ± 3	0.15 ± 0.01	0.44 ± 0.01	-
2	28 ± 2	0.27 ± 0.04	1.20 ± 0.02	0.76
3	21 ± 5	0.22 ± 0.06	1.80 ± 0.03	0.60
4	18 ± 2	0.50 ± 0.27	2.52 ± 0.09	0.71
5	24 ± 7	0.19 ± 0.05	3.09 ± 0.03	0.57
6	26 ± 2	0.41 ± 0.06	3.81 ± 0.03	0.72
7	22 ± 4	0.18 ± 0.05	4.51 ± 0.03	0.70
8	39 ± 2	0.29 ± 0.04	4.96 ± 0.03	0.45

Tabelle 4.1: Parameter der Gauß-Fitkurve in Abb. 4.21F.

Vergleich mit Theorie Die Messdaten von Transistor Nr.3 werden nun mit der im Theorieteil abgeleiteten, quantisierten bzw. kontinuierlichen I/O-Beziehung verglichen. Setzt man die Parameter $h = 70 \mu\text{m}$, $\Delta V_s^{crit} = -2.19 \text{ V}$, $\langle V_{field}^{single} \rangle = 0.7 \text{ mV}$ und eine Neuronendichte $\rho = 780 \text{ mm}^{-2}$ in die Gleichungen (3.42) und (3.43) auf Seite 48 ein, so ergeben sich die in Abb. 4.22 blau und rot gezeichneten Theoriekurven. Ignoriert man die Feinstruktur, so wird die I/O-Relation gut durch die kontinuierliche, blaue Kurve beschrieben (Abb. 4.22A, bekanntes Ergebnis für große Schrittweiten). Eine exakte Übereinstimmung der roten, quantisierten Theoriekurve (Abb. 4.22B) mit der Feinstruktur der Messung ist, aufgrund der sehr vielen vereinfachenden Annahmen, nicht zu erwarten.

Aus den Minima der Gauß-Fitkurve in Abb. 4.21F wurden die Feldpotentialamplituden bestimmt, bei denen Sprünge vorkamen. Mit Abb. 4.21C konnten daraus die Kondensatorspannungen ΔV_s^k ermittelt werden, bei denen die Sprünge auftraten. Setzt man die Parameter $h = 70 \mu\text{m}$ und $\Delta V_s^{crit} = -2.19 \text{ V}$ in Gleichung (3.35) auf Seite 45 ein, so können die, zu den ΔV_s^k Werten gehörigen, kritischen Radien $a^{crit,k}$ berechnet werden. Da bei diesen radialen Abständen von der Kondensatormitte jeweils Sprünge in der Feldpotentialamplitude auftraten, ist zu erwarten, dass dort auch jeweils ein Neuron lag. Dies folgt aus der modellhaften Vorstellung im Theorieteil. In Abb. 4.23 ist die Anzahl von Neuronen gezeigt, die innerhalb des auf der Abszisse gezeichneten radialen Abstandes von der Kondensatormitte lagen. Aus den Messdaten kann so die räumliche Verteilung der Neuronen im Hirnschnitt bestimmt werden. Die Sprungspannung des ersten Neurons ΔV_s^1 lag außerhalb des Messintervalls. Die durchgezogene Theoriekurve in der Abbildung zeigt den Fall einer homogenen Neuronenverteilung der Dichte ρ , also $N(a) = \rho\pi a^2$. Als Fitparameter erhält man $\rho \approx 1000 \text{ mm}^{-2}$. In Abschnitt 4.4.2.4 wird gezeigt, dass dieser Wert sinnvoll ist. Da zwischen Theorie und Experiment eine sehr gute Übereinstimmung besteht, ist anzunehmen, dass im stimulierten Bereich des Hirnschnittes die Neurone tatsächlich derart homogen verteilt waren.

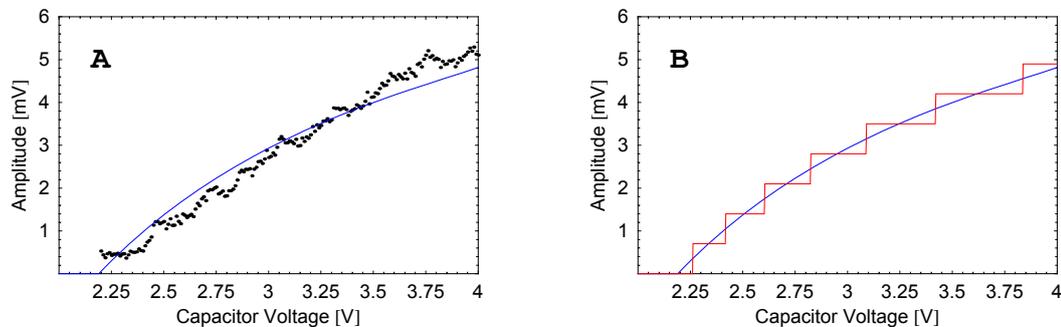


Abbildung 4.22: I/O-Relation im Vergleich von Theorie und Experiment. (A) Die Messpunkte von Transistor Nr.3 sind schwarz gezeichnet, die kontinuierliche Theoriekurve blau. (B) Kontinuierliche Theoriekurve blau, quantisierte Kurve rot.

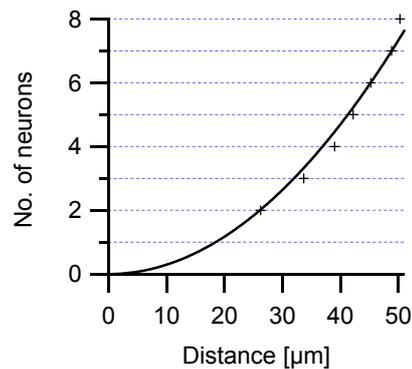


Abbildung 4.23: Anzahl von Neuronen die innerhalb des auf der Abszisse gezeichneten radialen Abstandes von der Kondensatormitte liegen. Experiment: Messpunkte, Theorie: durchgezogene Kurve.

Statistik Um den beobachteten Effekt zu reproduzieren, wurden weitere hochaufgelöste I/O-Relationen aufgenommen, z.B. (Kondensator Nr.10, Startspannung 2.50 V, Inkrement 0.01 V, Endspannung 3.40 V).

Abb. 4.24A und C zeigt die 10x gemittelten I/O-Beziehungen für zwei exemplarische Transistoren Nr.9 (A) und 10 (C) dieser Messung. Es sind deutlich drei Plateauphasen zu erkennen, die durch zwei Sprungstellen unterbrochen sind. Die korrespondierenden Histogramme in (B) und (D) zeigen drei klare, annähernd äquidistante Maxima.

In sieben weiteren hochaufgelösten Messungen mit Chip wurden Quantisierungen beobachtet. Die Anzahl sichtbarer Sprünge bis zu einer Kondensatorspannung von 4.0 V variierte dabei zwischen vier und sieben.

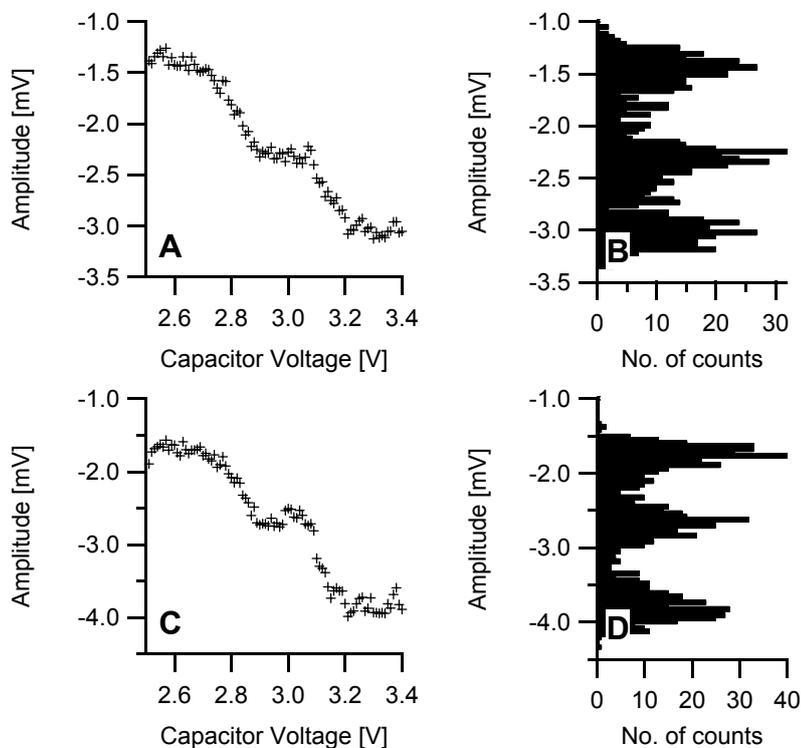


Abbildung 4.24: Quantisierungen in der I/O-Relation: Messung mit Chip. (A) Messdaten Transistor Nr.9, 10x gemittelt. (B) Histogramm, Transistor Nr.9, ungemittelt. (C,D) Transistor Nr. 10, analoge Darstellung.

4.4.2.2 Messung mit konventioneller Elektrophysiologie

Um ausschließen zu können, dass der beobachtete Quantisierungseffekt auf einem Artefakt der komplexen Messelektronik: Kondensatorreiz-Transistordetektion basiert, wurde versucht, obige Ergebnisse mit konventioneller Elektrophysiologie auf einem Chip ohne elektrischer Funktionalität zu reproduzieren. Über eine Wolframelektrode im CA3-Somabereich wurde ein Hirnschnitt stimuliert (Startstrom $35 \mu\text{A}$, Inkrement $1 \mu\text{A}$, Endstrom $102 \mu\text{A}$) und mit einer Mikroelektrode im CA1-Somabereich das neuronale Feldpotential detektiert. Bei jeder Stromamplitude wurden 20 Feldpotentiale aufgezeichnet, mit jeweils 5 s Abstand.

Resultat und Diskussion Abb. 4.25A zeigt das 20x gemittelte Ergebnis im Intervall $35\text{-}90 \mu\text{A}$. Auch bei Verwendung rein klassischer elektrophysiologischer Methoden, sind bei starker Signalmittelung Quantisierungen der I/O-Relation erkennbar. Im gezeigten Experiment werden drei Plateauphasen durch zwei Sprungstellen voneinander abgegrenzt. Aufgrund der geringeren Signalamplitude im Vergleich zu den Transistormessungen sind auch die drei Maxima bei etwa 1.05 mV , 1.42 mV sowie 1.60 mV im Histogramm (Abb. 4.25B) nicht so deutlich. Zeichnet man die I/O-Relation für den in dieser Messung klar sichtbaren fiber volley, so sind darin ebenfalls, wenn auch undeutlich, Quantisierungen erkennbar. Da die Amplitude des fiber volleys proportional zur Anzahl präsynaptischer Axone ist, die stimuliert werden [John 99], deutet dies darauf hin, dass die Stimulation einzelner präsynaptischer Elemente detektiert wurde.

4.4.2.3 Zusammenfassung der experimentellen Befunde zur Quantisierung

1. Die I/O-Relation hippocampaler Hirnschnitte zeigt annähernd äquidistante Sprünge, die von Plateauphasen abgegrenzt sind. Sie ist also *quantisiert*.
2. Die Sprünge treten an verschiedenen Orten des Hippocampus bei den gleichen Reizspannungen auf. Der Effekt ist also in CA1 *nicht lokalisiert*.
3. Es handelt sich um *kein Artefakt* des Chips oder der Elektronik wie durch eine Messung mit klassischer Elektrophysiologie gezeigt werden konnte.

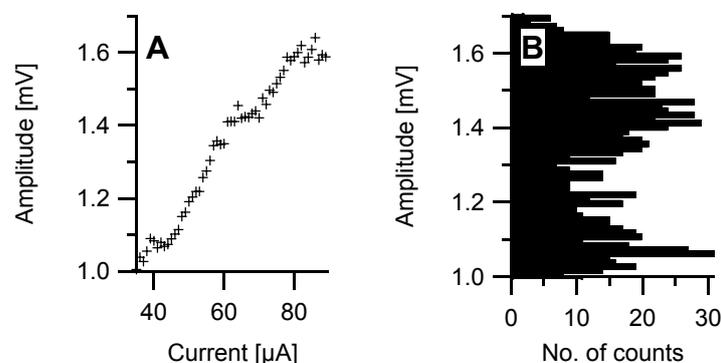


Abbildung 4.25: Quantisierungen in der I/O-Relation: Messung mit konventioneller Elektrophysiologie. (A) Messdaten Mikroelektrode, 20x gemittelt. (B) Histogramm, ungemittelt.

4.4.2.4 Suche nach dem Ursprung der Quantisierung

Da technologische Ursachen durch die Beobachtung (3) ausgeschlossen werden konnten, kommt nur eine physiologische Quelle in Frage. Im Hirnschnitt müsste es Strukturen geben, die einen quasi kontinuierlich zunehmenden Reiz im CA3-Somabereich in ein sprunghaft zunehmendes Feldpotential im CA1-Detektionsbereich konvertieren. Grob vereinfachend ist der Hippocampus im relevanten Bereich aus CA3-Neuronen aufgebaut, die über Synapsen mit vielen CA1-Neuronen verbunden sind. Die Quantisierung kann also prinzipiell nur zwei Quellen haben: präsynaptisches CA3-Neuron(en) oder postsynaptisches CA1-Neuron(en). Da der Effekt nicht lokalisiert ist, sind einzelne oder Cluster von CA1-Neuronen als Quelle ausgeschlossen, da diese notwendigerweise nur eine lokale Wirkung haben könnten. Es bleibt nur folgende Erklärung: Durch die zunehmende Reizstärke werden mehr und mehr einzelne oder synchron aktivierte Cluster von CA3-Neuronen einen sprunghaft zunehmenden synaptischen Strom in CA1 und damit ein quantisiertes Feldpotential generieren.

Handelt es sich nun um Einzelneuronen oder Ensembles von CA3-Neuronen, die gleichzeitig stimuliert werden? Wenn man nochmals die Ergebnisse des Experiments in Abb. 4.21 auf Seite 85 betrachtet, so tragen hier acht diskrete Strukturelemente zum Gesamtfeldpotential des Hirnschnitts bei (Bei der Startspannung der I/O-Relation von 2.2 V ist bereits ein Strukturelement aktiviert, sodass die pEPSP-Amplitude schon 0.5 mV beträgt.). Nimmt man an, dass der kritische Radius bei einer Kondensatorspannung von 4.0 V in etwa gleich dem Kondensatorradius ist, so liegen laut Messung acht Strukturelemente innerhalb der Kondensatorfläche. Dies entspricht einer Strukturdichte von $\rho \approx 1000 \text{ mm}^{-2}$.

Für ein Monolayer aus hexagonal angeordneten Neuronen ($r = 10 \text{ }\mu\text{m}$) erhält man eine theoretische Strukturdichte von $\rho = 2500 \text{ mm}^{-2}$. Die einzigen biologischen Strukturen, die im Hippocampus am Stimulationsort also mit der richtigen Strukturdichte vorkommen, sind *einzelne* Neurone:

Bei den beobachteten Sprüngen (wie z.B. in Abb. 4.21 auf Seite 85) dürfte es sich deshalb um den synaptischen Beitrag $\langle V_{field}^{single} \rangle \approx 0.7 \text{ mV}$ von acht einzelnen CA3-Neuronen zum Gesamtfeldpotential $V_{field} \approx 5.5 \text{ mV}$ in CA1 handeln, wie im Theorieteil postuliert wurde. Dieser Effekt ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Auch wenn ein definitiver Nachweis noch aussteht, kann mit hoher Sicherheit also durch langsames Inkrementieren der Kondensatorspannung, der Hirnschnitt auf der Ebene *einzelner* Neurone stimuliert werden.

Experiment zur Bestätigung der Hypothese Über eine intrazelluläre Mikroelektrode müsste die Transmembranspannung eines CA3-Neurons beobachtet werden, das im Stimulationsbereich eines Kondensators liegt. Mit zunehmender Kondensatorspannung sollte die Depolarisation des Neurons zunehmen, bis schließlich ein Aktionspotential ausgebildet wird. Korreliert das einsetzende Aktionspotential mit einem Sprung in der Amplitude des CA1-Feldpotentials, so wäre eindeutig gezeigt, dass dieses Neuron für die Zunahme verantwortlich ist. Da das System Hirnschnitt-Chip über ein Auflichtmikroskop beobachtet werden muss, ist eine Identifikation und gezieltes Anstechen einzelner Neurone im Hirnschnitt allerdings schwierig, sodass dieses Experiment nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Abschnitt 4.1.3 ist als Vorexperiment hierzu zu sehen.

4.5 Chipinduziertes Lernen: LTP und LTD

Im Kapitel Input-Output-Relation führte eine Erhöhung der Kondensatorspannung zu einem größer werdenden kritischem Radius und mehr stimulierten CA3-Neuronen/Axonen. Die zunehmende pEPSP-Amplitude dort, basierte also auf einer zunehmenden *Anzahl* beitragender EPSPs.

In diesem Kapitel bleibt die Kondensatorspannung und damit die Anzahl der, durch den Stimulus ausgelösten, EPSPs konstant. Die zu-/abnehmende pEPSP-Amplitude hier basiert auf einer zu-/abnehmenden *Amplitude* der beitragenden EPSPs.

Die EPSP-Amplituden können moduliert werden, da die exzitatorischen Verknüpfungen zwischen CA3- und CA1-Neuronen *synaptische Plastizität* zeigen. Durch hoch- und niederfrequente kapazitive Reizmuster konnte über den Eigenbauchip LTP und LTD induziert und damit die synaptischen Gewichte im neuronalen Netz des Hippocampus spezifisch auf bis zu zwei Pfaden verändert werden.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Hirnschnitt-Chip-Systeme wird in diesem Abschnitt präsentiert und diskutiert. Die Lage der Hirnschnitte relativ zu den Chips entsprach in etwa der der Abb. 4.6 auf Seite 64. Es wurde daher auf entsprechende Skizzen verzichtet. Alle verwendeten Kondensatoren stimulierten in der CA3-Region, alle gezeigten Transistoren detektierten in CA1. Zur Orientierung sind Kondensator- und Transistornummern dennoch angegeben.

4.5.1 Zunahme der Feldpotentialamplitude nach hochfrequenter Stimulation

Um zunächst zu untersuchen, ob eine hochfrequente kapazitive Stimulation, analog zu klassischen elektrophysiologischen Methoden, zu einer Zunahme der Amplitude des Feldpotentials führt, wurde ein Experiment zur Induktion von LTP durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Kondensator Nr.2 stimulierte alle 10 s mit $\Delta V_s = -2.5$ V, die Gesamtdauer des Experiments betrug 30 min, bei $t = 10$ min wurde ein Θ -Burst abgegeben.

4.5.1.1 Resultat

Vergleicht man exemplarisch die mit den beiden Transistoren Nr.2 und Nr.10 gemessenen Feldpotentiale, 5 Minuten vor (schwarz in Abb. 4.26) mit denen 10 Minuten nach Abgabe des Θ -Bursts (rot), so erkennt man eine klare Zunahme der Amplitude.

Die Entwicklung der Feldpotentialamplituden aller Transistoren im Verlauf des Versuches ist

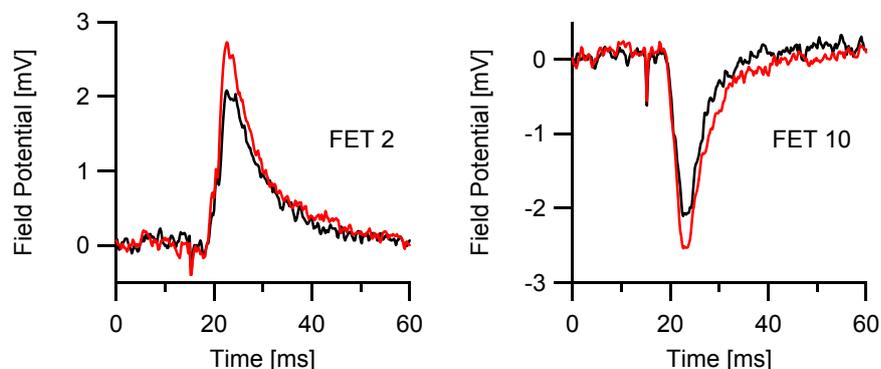


Abbildung 4.26: Feldpotentiale gemessen mit Transistor Nr.2 bzw. Nr.10 vor (schwarz) und nach (rot) Abgabe eines Θ -Bursts.

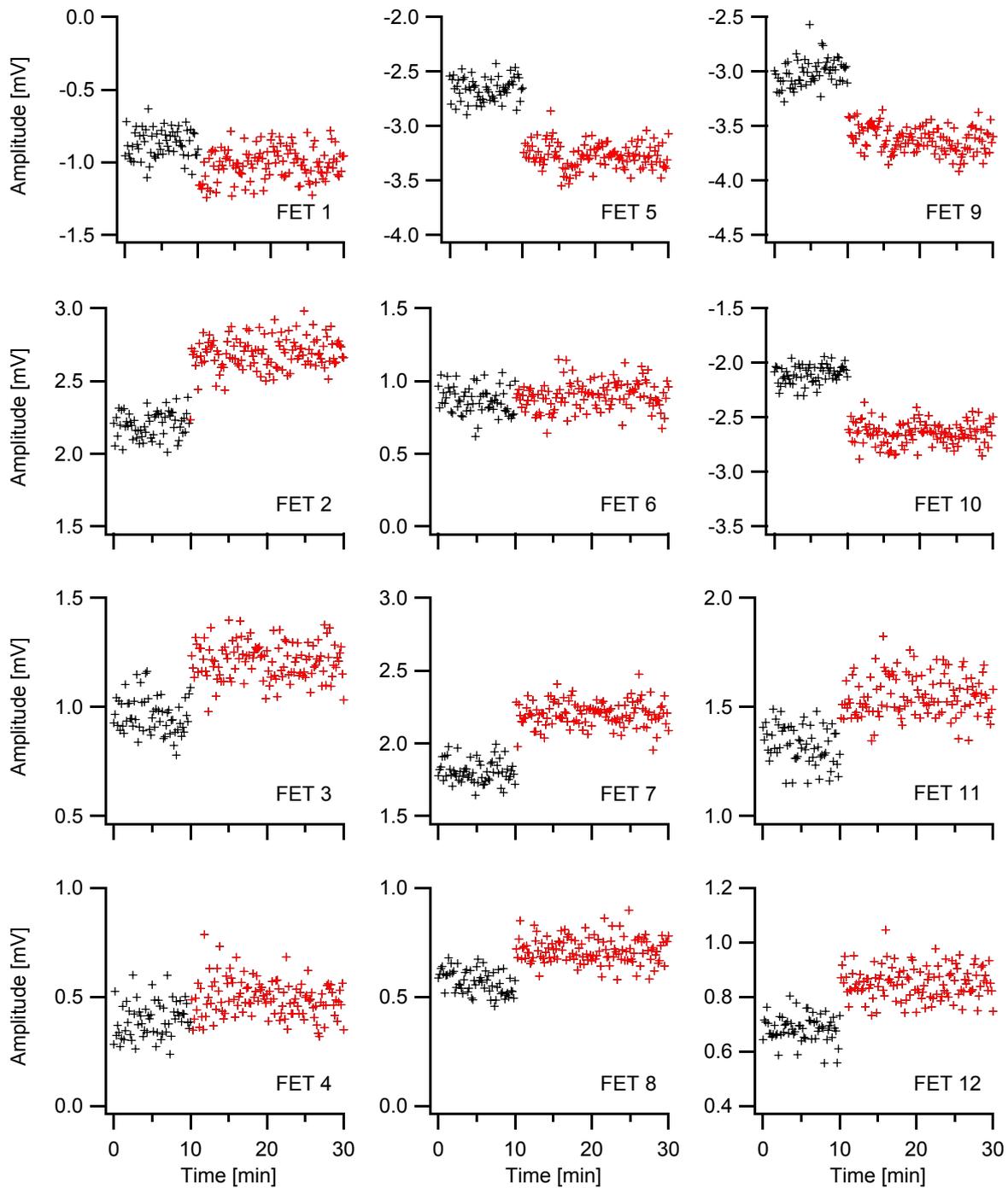


Abbildung 4.27: Zunahme der Feldpotentialamplitude nach hochfrequenter Stimulation. Nach Aufnahme eines 10 minütigen Referenzniveaus (schwarze Messpunkte), wurde ein kurzer Θ -Burst abgegeben, was zu einem, über mehr als 20 Minuten anhaltenden Anstieg des Signals führte (rote Messpunkte).

in Abb. 4.27 zu sehen. Das Referenzniveau (schwarze Messpunkte) bleibt über den Zeitraum von 10 Minuten sehr konstant. Nach Abgabe des Θ -Bursts steigt, abgesehen von Transistor Nr.6, auf allen Transistoren die gemessene pEPSP-Amplitude sprunghaft an und bleibt über 20 Minuten auf diesem erhöhten Niveau (rote Messpunkte). Die Transistoren Nr.1,5,9 und 10 lagen im stratum radiatum (negative pEPSPs), der Rest im stratum pyramidale (positive pEPSPs).

4.5.1.2 Diskussion

Die nebenstehende Tabelle zeigt den prozentualen Amplitudenzuwachs in der Anordnung des Transistorarrays. Der Grund für den fehlenden Anstieg der Amplitude bei Transistor Nr.6 im Übergangsbereich stratum radiatum-stratum pyramidale ist unklar. Da die Signale auf allen anderen Transistoren zunehmen und diese über einen weiten Bereich von CA1 verteilt lagen, ist der beobachtete Effekt in diesem Fall *nicht lokalisiert*. In vier weiteren Versuchen konnte ein derartiger Amplitudenzuwachs beobachtet werden. Unterschiede ergaben sich dabei in der Anzahl der Transistoren auf denen der Effekt erkennbar war, als auch im Grad der Veränderung.

Amplitudenzunahme		
16 %	23 %	20 %
23 %	3 %	26 %
26 %	22 %	17 %
26 %	25 %	25 %

Auch wenn die Vermutung nahe liegt, dass es sich um Langzeitpotenzierung (LTP) von CA3-CA1-Synapsen handelt, so kommen aufgrund der komplexen Messanordnung auch einige nichtbiologische Ursachen in Frage. So wäre es z.B. denkbar, dass die hochfrequente Stimulation während des Bursts das Dielektrikum der Kondensatoren beschädigte und aufgrund des daraus resultierenden höheren faradayschen Stromflusses an den Hirnschnitt die pEPSP-Amplitude zunahm. Das pharmakologische Experiment des nächsten Abschnitts wird derartige technologische Artefakte als Ursache ausschließen.

4.5.2 Zunahme der Feldpotentialamplitude ist Langzeitpotenzierung (LTP)

Funktionale NMDA-Rezeptor gesteuerte Ionenkanäle in der neuronalen Zellmembran sind zur Ausbildung von LTP notwendig. Werden diese Rezeptoren durch das selektive Toxin AP5 reversibel inaktiviert, dann sollte ein Θ -Burst *nicht* zu einer Expression von LTP führen [Capo 92, Blis 93, Purv 97]. Der Nachweis, dass es sich bei der oben beobachteten Amplitudenzunahme um LTP handelt, wurde in zwei Schritten erbracht:

1. Ein Hirnschnitt wurde mit Messmedium perfundiert, welchem 50 μM AP5 zugesetzt war und ein LTP-Experiment vorgenommen (Kondensator Nr.7, $\Delta V_s = -4.0$ V, Dauer 20 min, Θ -Burst bei $t = 10$ min).
2. Das Perfusionssystem wurde dann auf Messmedium ohne Toxin umgestellt und ca. 45 min lang das Toxin aus dem Schnitt ausgespült, um wieder ein stabiles Referenzniveau zu erhalten. Ein weiteres LTP-Experiment wurde durchgeführt (Kondensator Nr.7, $\Delta V_s = -4.0$ V, Dauer 30 min, Θ -Burst bei $t = 10$ min).

4.5.2.1 Resultat

Abb. 4.28 zeigt die Ergebnisse der zur Diskussion ausgewählten Transistoren Nr.2 und Nr.4. Messpunkte oder Kurven vor Burstabgabe sind schwarz, danach rot gezeichnet.

1. Die linke Spalte zeigt den ersten Teil des Experiments. Hier befand sich AP5 im Perforationsmedium, welches NMDA-Kanäle inaktivierte. Abb. 4.28A und 4.28C zeigen die

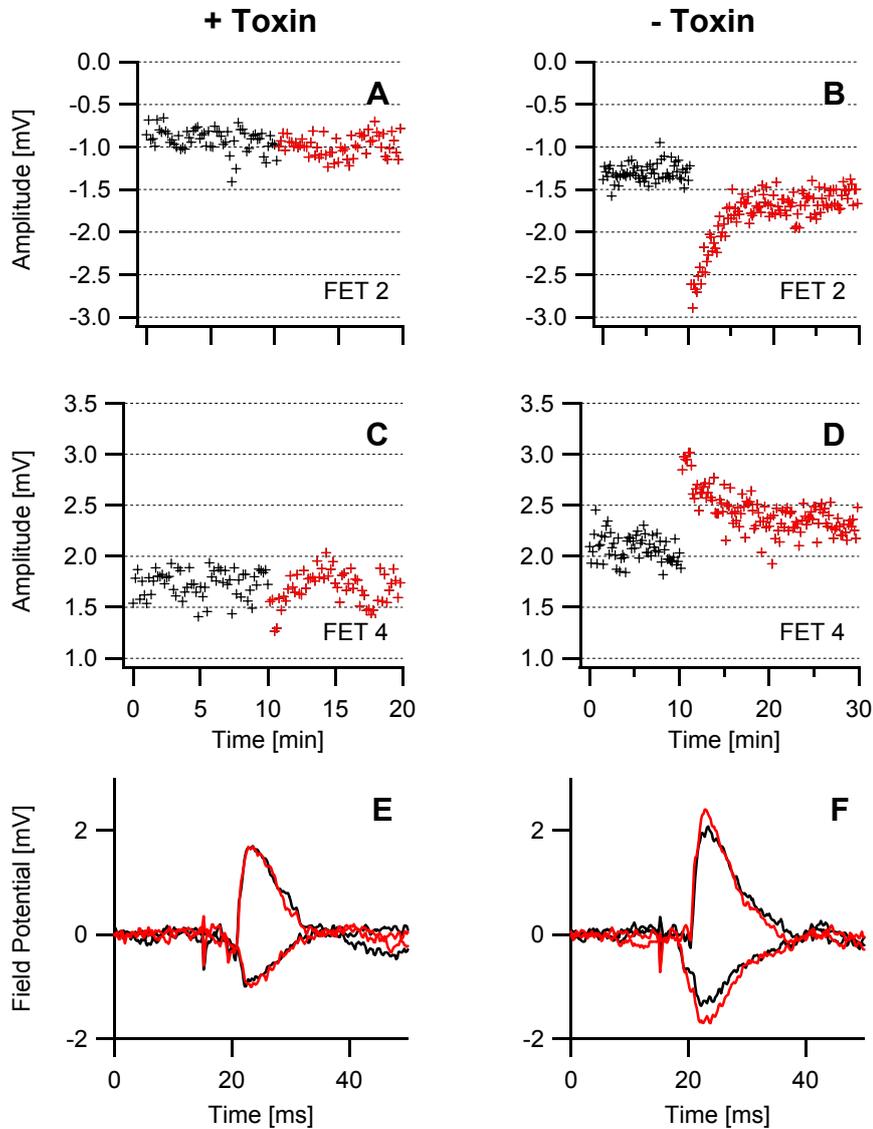


Abbildung 4.28: Zunahme der Feldpotentialamplitude nach Θ -Burst ist Langzeitpotenzierung (LTP). Messdaten vor den Θ -Bursts sind schwarz, danach rot gezeichnet. Die linke Spalte zeigt Messungen in Medium mit AP5-Toxin, die rechte Spalte ohne Toxin. (A) und (B) Amplituden der Feldpotentiale gemessen mit Transistor Nr.2. (C) und (D) Amplituden der Feldpotentiale gemessen mit Transistor Nr.4. (E) und (F) Exemplarische Feldpotentiale der Transistoren Nr.2 und Nr.4.

Amplituden der mit den Transistoren Nr.2 und Nr.4 gemessenen Feldpotentiale im Verlauf des Versuches. In beiden Fällen ist keine Zunahme der Amplitude nach Abgabe des Bursts erkennbar. Die in Abb. 4.28E gezeigten Feldpotentiale der Transistoren Nr.2 (negatives pEPSP) und Nr.4 (positiv) unterscheiden sich vor (schwarz, $t = 5$ min) und nach dem Burst (rot, $t = 15$ min) nicht.

2. Die rechte Spalte zeigt den zweiten Teil des Experiments, in dem das Toxin ausgewaschen und die NMDA-Kanäle wieder funktional waren. Abb. 4.28B und 4.28D zeigen die Amplituden der mit den Transistoren Nr.2 und Nr.4 gemessenen Feldpotentiale vor und nach Abgabe des zweiten Bursts, der klar eine instabile Übergangsphase auslöste. Danach zeigt die Amplitude einen, gegenüber dem Referenzniveau erhöhten Wert, eine lange anhaltende Potenzierung ist erfolgt. Dies wird besonders deutlich in Abb. 4.28F wo die Feldpotentiale der beiden Transistoren jeweils zur Zeit $t = 5$ min (schwarz) und $t = 20$ min (rot) gezeichnet sind. Während des 45-minütigen Medienwechsels kam es aufgrund einer kurzen Instabilität zu einer leichten Verschiebung der Referenzniveaus der Messungen mit und ohne Toxin.

4.5.2.2 Diskussion

Das Experiment zeigt, dass eine Zunahme der Feldpotentialamplitude nach Abgabe eines Θ -Bursts nur dann erfolgt, wenn der NMDA-Kanal in funktionaler Form vorliegt. Damit ist klar die Möglichkeit eines technologischen Artefakts ausgeschlossen und zugleich der Nachweis erbracht, dass es sich um die, in der Literatur bekannte, NMDA-abhängige Form von Langzeitpotenzierung (LTP) handelt. Die kapazitive Reizung war also stark genug, um die Kooperativitätsschwelle zur Induktion von LTP zu überschreiten.

Da nun die Ursache der Potenzierung identifiziert ist, kann die Interpretation von Abb. 4.27 nachgeholt werden: Durch den Θ -Burst, abgegeben über Kondensator $k = 2$, konnte die mittlere Stärke $\langle W_{k,l} \rangle$ der CA3-CA1-Synapsen im Detektionsbereich des Transistors $l = 1, \dots, 12$ über den Siliziumchip *unidirektional* um $\langle \Delta W_{k,l} \rangle$ moduliert werden (Abb. 4.10 auf Seite 67). Nach dem theoretischen Modell der Gleichung (4.3) auf Seite 68 führt dies zu einer Veränderung des beobachtbaren Feldpotentials um $\Delta V_{field}^{k,l}$:

$$\Delta V_{field}^{k,l} = S_k \langle \Delta W_{k,l} \rangle D_l \frac{V_l}{N} \quad (4.8)$$

Die in der Tabelle „Amplitudenzunahme“ gezeigte, relative Änderung des Feldpotentials:

$$\frac{\Delta V_{field}^{k,l}}{V_{field}^{k,l}} = \frac{\langle \Delta W_{k,l} \rangle}{\langle W_{k,l} \rangle} \quad (4.9)$$

ist damit gleich der relativen mittleren Änderung des synaptischen Gewichts der durch Kondensator k stimulierten und mit Transistor l detektierten Synapsen. Diese Messgröße ist unabhängig von der Kopplungseffizienz Hirnschnitt-Chip.

Da die Transistoren auf dem Eigenbauchip in einer Arraystruktur angeordnet sind, ist eine simultane Beobachtung der LTP-Expression an 12 verschiedenen Orten möglich. Nur in einer Arbeit der umfangreichen Literatur zu Multi-Elektroden-Arrays wird dies auch, anhand von 8 verschiedenen Detektionsorten, versucht [Oka 99]. Die wesentlich höhere räumliche Auflösung des MTA-Chips könnte die Frage der Ortsabhängigkeit der LTP-Expression eindrucksvoll klären.

4.5.3 LTP- und LTD-Induktion (1-BIT memory)

Wenn es gelänge, chipgesteuert auch LTD im Hirnschnitt zu induzieren, so wäre eine *bidirektionale* Modulation der Synapsenstärke gezeigt. Um dies zu untersuchen, wurden kombinierte LTP/LTD-Experimente durchgeführt wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, z.B. (Kondensator Nr.11, $\Delta V_s = -4.5$ V, Dauer 50 min, Θ -Burst bei $t = 10$ min, LTD-Burst bei $t = 30$ min).

4.5.3.1 Resultat

Abb. 4.29 zeigt für die Transistoren Nr.4 und Nr.6 jeweils drei exemplarische Feldpotentiale bei $t = 5$ min (schwarz, vor Θ -Burst), bei $t = 20$ min (rot, nach Θ -Burst) sowie bei $t = 40$ min (blau, nach LTD-Burst). In beiden Fällen führte der Θ -Burst zu einer Zunahme der Feldpotentialamplitude, der LTD-Burst reduzierte diese wieder auf Referenzniveau.

Die Amplitude der Feldpotentiale für alle Transistoren im Zeitverlauf des Versuches ist in Abb. 4.30 dargestellt (Farbschema wie oben). Das Referenzniveau ist sehr stabil, nach Abgabe des Θ -Bursts nehmen die Feldpotentiale auf allen Transistoren, mit Ausnahme von Nr.7 und Nr.11 zu. Die vergrößerte Amplitude bleibt für 20 Minuten konstant, bis bei $t = 30$ min der LTD-Burst diese wieder auf Referenzniveau reduziert. Das Signal bleibt dann auf allen Transistoren für die Restdauer des Versuches konstant.

4.5.3.2 Diskussion

Im linken Teil der nebenstehenden Tabelle ist der prozentuale Zuwachs des Feldpotentials für alle Transistoren aus dem arithmetischen Mittel der Extrema der Datenpunkte von Minute 0-10 und 10-30 berechnet. Der rechte Teil zeigt die entsprechenden Werte von Minute 10-30 und 30-50 für die Abnahme des Signals. Durch Abgabe von LTP- bzw. LTD-induzierenden Pulsformen an den Kondensator, kann die Amplitude von Feldpotentialen chipgesteuert um bis zu 47 % vergrößert bzw. wieder reduziert (35 %) werden. Jede Modulation hält dabei über mehr als 20 Minuten an. Die Transistoren Nr.7 und Nr.11 liegen im Übergangsbereich stratum pyramidale-stratum radiatum und messen deshalb ein verschwindend kleines pEPSP, weshalb hier auch keine klare Potenzierung zu erkennen ist. Alle anderen Transistoren zeigen

Amplitudenzunahme			Amplitudenabnahme		
20 %	15 %	24 %	22 %	14 %	23 %
47 %	40 %	39 %	30 %	26 %	35 %
24 %	22 %	-2 %	26 %	37 %	-7 %
35 %	32 %	34 %	28 %	24 %	22 %

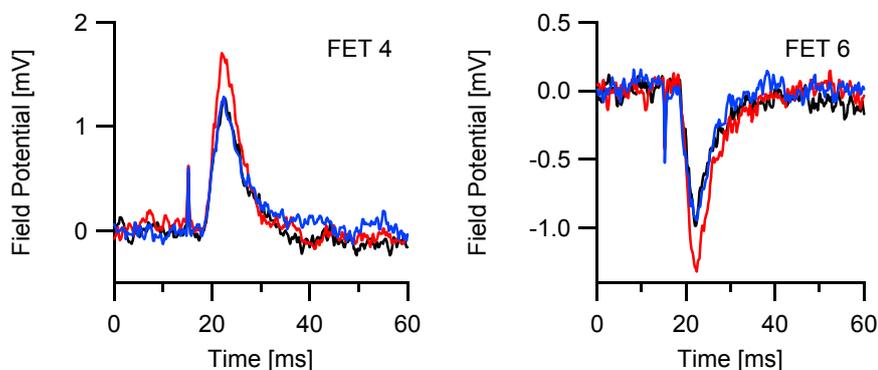


Abbildung 4.29: Modulation der Feldpotentialamplitude durch LTP und LTD. Messkurven der Transistoren Nr.4 und Nr.6 vor Ausbildung von LTP (schwarz), danach (rot) und nach LTD-Ausbildung (blau).

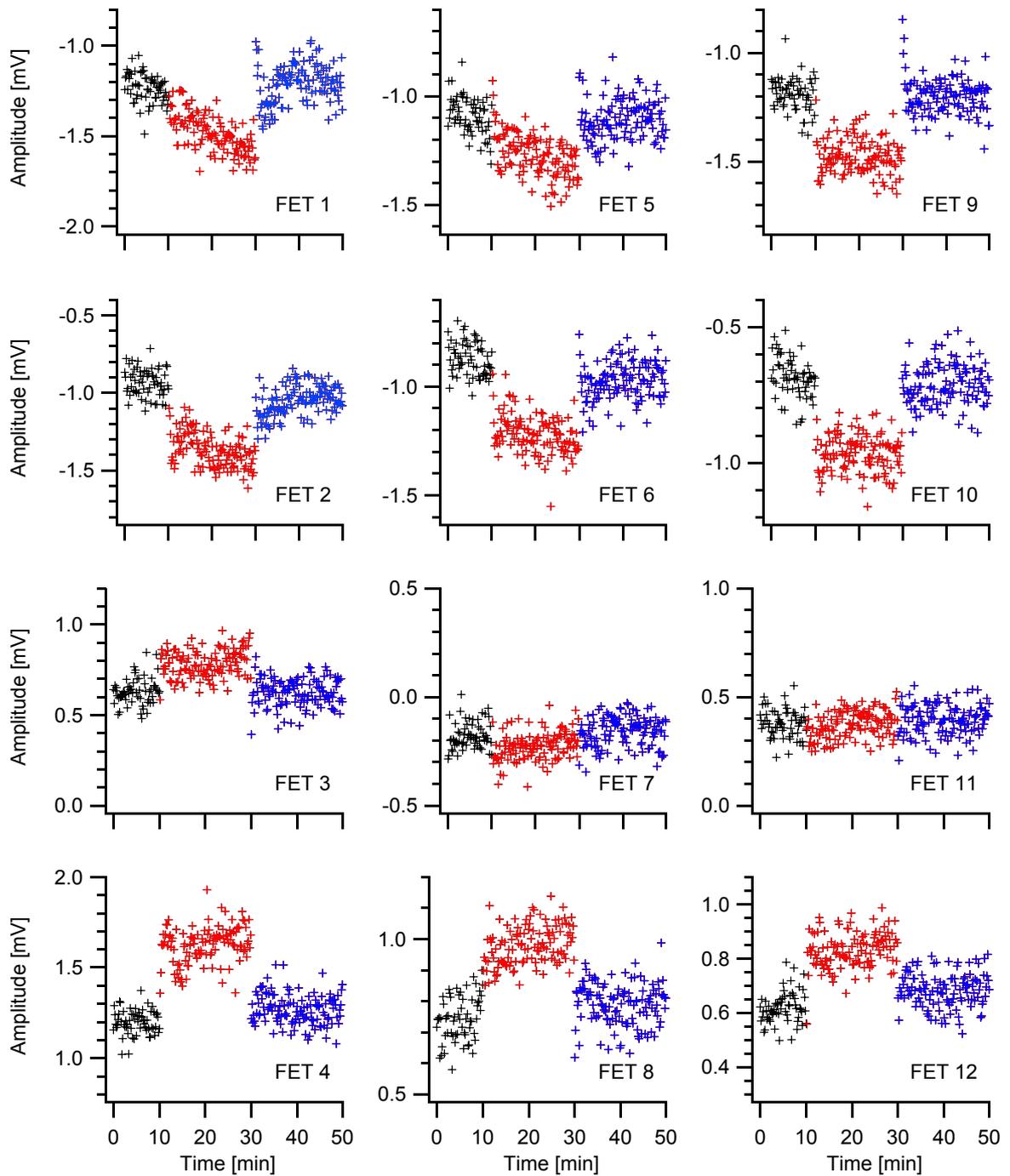


Abbildung 4.30: Siliziumchip induziert Langzeitpotenzierung und -depression in Hirnschnitt. Die Messpunkte kennzeichnen die Amplituden der Feldpotentiale vor (schwarz) und nach (rot) Abgabe einer LTP- sowie LTD- (blau) induzierenden Pulsform.

diese, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die LTP-Expression in CA1 nicht lokalisiert ist. Da die Reproduzierung derartiger Messungen nur selten gelang (fünf weitere Messungen mit geringerer oder undeutlicherer Plastizität), ist eine weitergehende Untersuchung erforderlich. Durch den verwendeten LTD-Burst kann die Signalzunahme durch den Θ -Burst relativ genau wieder kompensiert werden. D.h. die gewählten LTP/LTD-induzierenden Pulsformen sind *zufällig* gleich effektiv in ihrer Fähigkeit zur Änderung der Synapsenstärke.

Der Zuwachs ist im Bereich der proximalen Dendriten des stratum radiatum d.h. nahe des stratum pyramidale (Zeile 2 der Tabelle „Amplitudenzunahme“) größer als im Bereich der distalen Dendriten (Zeile 1). In den distalen Dendriten tragen nur lokale Synapsen zum intrazellulären Stromfluss bei, in den proximalen Dendriten aber auch der intrazelluläre Stromfluss distal liegender Synapsen, was proximal zu einer größeren Depolarisation der Zellmembran führt [Oka 99]. Während des Θ -Bursts werden dort dadurch mehr NMDA-Kanäle geöffnet und die LTP-Expression verstärkt. In der Literatur wird, vermutlich mangels einer geeigneten Detektionsmethode, die Ortsabhängigkeit der LTP-Expression nur selten und nicht detailliert angesprochen. In [Tomi 00] wurde z.B. eine in CA1 auf ca. $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ lokalisierte Expression beobachtet.

Der verwendete LTD-Burst kann sowohl NMDA-abhängige als auch NMDA-unabhängige LTD-Formen induzieren [Bear 96, Anwy 06]. Um zu klären welche Form vorlag, wurde in zwei Experimenten versucht, die Ausbildung von LTD mit dem spezifischen NMDA-Antagonisten AP5 zu blockieren (analog Abschnitt 4.5.2). In einigen Fällen verhinderte das AP5 eine LTD-Expression, in einigen Fällen hatte es keine Wirkung. Aus diesen Ergebnissen kann also keine klare Schlussfolgerung gezogen werden.

4.5.3.3 Mehrfache LTP- und LTD-Induktion

Das oben beschriebene Experiment wurde bei Minute 50 fortgesetzt, indem weitere LTP- bzw. LTD-induzierenden Burst-Pulsformen an den Kondensator abgegeben wurden:

Minute	Induktion
10	LTP
30	LTD
50	LTD
70	LTP
90	LTP

Eine *mehrfache* Anwendung von LTP- bzw. LTD-Stimulationsprotokollen kann eine *mehrfache*, reversible Veränderung der Synapsenstärke um einen *ähnlichen Betrag* bewirken (Transistor Nr.6 in Abb. 4.31).

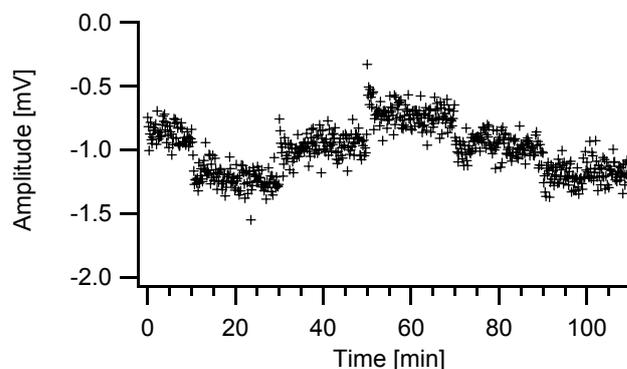


Abbildung 4.31: Mehrfache chipinduzierte Modulation der Synapsenstärke durch LTP/LTD.

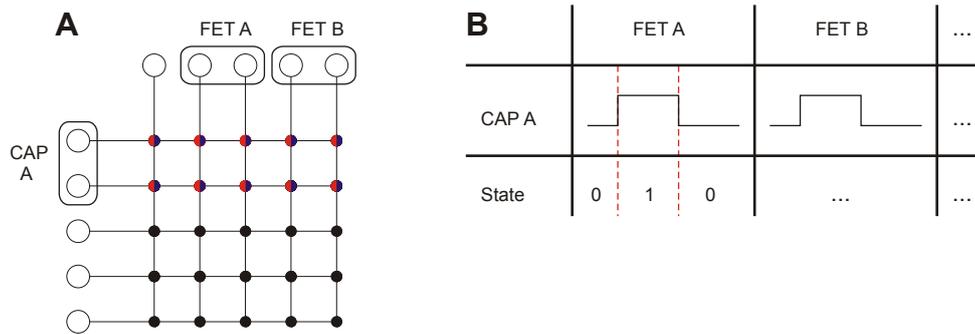


Abbildung 4.32: Schematische Darstellung der Potenzierung/Depotenzierung an CA3-CA1-Synapsen.

4.5.3.4 Zusammenfassung

Es war möglich, über einen Kondensator A, eine Gruppe von CA3-Neuronen zu reizen, deren Axone Synapsen (symbolisiert durch rote/blau Punkte in Abb. 4.32A) zu CA1-Neuronen ausbilden. Die Stärke der synaptischen Verbindung CA3-CA1 konnte chipgesteuert, durch Abgabe bestimmter Stimulationspulsformen, inkrementiert (rot) als auch dekrementiert (blau) werden. Da ein *Array* von Transistoren zur Verfügung stand, war es möglich, die Modulation orts aufgelöst anhand einer Abbildung $1 \rightarrow (4,3)$ zu beobachten (Abb. 4.30).

Das schematisierte Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 4.32B dargestellt. Interpretiert man das Referenzniveau (schwarze Messpunkte in Abb. 4.30) als Zustand 0, das inkrementierte Niveau (rot) als Zustand 1 und das dekrementierte Niveau (blau) wieder als 0, so bedeutet dies, dass eine Informationseinheit (*ein BIT*) über einen Zeitraum von 20 Minuten reversibel im Hirnschnitt gespeichert werden konnte. Eine solche Paarung von LTP/LTD zur Informationsspeicherung wird in der MEA-Literatur nicht erwähnt.

4.5.4 LTP-Induktion über zwei unabhängige Kondensatoren

Mit den Kondensatoren des Eigenbauchips ist eine räumlich lokalisierte Stimulation von Hirnschnitten möglich (Abschnitt 4.2.2.2). D.h. zwei verschiedene Kondensatoren A und B können zwei unterschiedliche Gruppen von CA3-Neuronen und damit verschiedene Synapsen in CA1 stimulieren (rot in Abb. 4.34A). A und B sind damit *unabhängig*. Da außerdem ausschließlich Synapsen potenziert werden, die auch durch den Θ -Burst stimuliert werden (LTP ist *homosynaptisch*), sollte die Anwendung eines Θ -Bursts auf A, keine Auswirkung auf das durch B hervorgerufene Feldpotential haben. Ziel dieses Versuches war also eine *selektive* Modulation der Synapsenstärke.

Dazu wurde über mehrere Kondensatoren LTP induziert (Nr.3,8,11, $\Delta V_s = -4.5$ V, Dauer 50 min, Θ -Burst Kondensator Nr.8 bei $t = 10$ min, Θ -Burst Kondensator Nr.3 bei $t = 31$ min). Das experimentelle Vorgehen ist in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben.

4.5.4.1 Resultat

Die Messung lieferte eine Abbildung von einem 1x3 Kondensatorarray auf ein 4x3 Transistorarray, die die zeitliche Entwicklung der Feldpotentiale im Versuchsablauf wiedergibt. Durch Kondensator Nr.11 konnte kein pEPSP evoziert werden. Abb. 4.33 zeigt deshalb eine Teilabbildung $(1,2) \mapsto (1,2)$ der Gesamtabbildung $(1,3) \mapsto (4,3)$. Gezeichnet sind die Feldpotentialamplituden wie sie bei Reizung mit den Kondensatoren Nr.8 (obere Zeile) und Nr.3 (untere Zeile) auf den beiden exemplarischen Transistoren Nr.2 (linke Spalte) und Nr.11 (rechte Spalte) detektiert wurden. Nach Abgabe der Θ -Bursts sind die entsprechenden Messpunkte rot gezeichnet. Das durch Kondensator Nr.8 bzw. Nr.3 hervorgerufene Feldpotential wird im Folgenden als *Antwort 8* bzw. *Antwort 3* bezeichnet.

Das Referenzniveau von Minute 0-10 ist sehr stabil. Nach Abgabe des Burst an Kondensator Nr.8 ($t = 10$ min) nimmt die Signalamplitude der Antwort 8 stark zu und bleibt für 21 Minuten konstant erhöht. Diese Ausbildung von LTP hat aber keinen bedeutenden Einfluss auf Antwort 3. Hier ist die Amplitude in Minute 10-31 nicht signifikant erhöht gegenüber Minute 0-10. Nachdem der Burst an Kondensator Nr.3 abgegeben wurde ($t = 31$ min), nimmt Antwort 3 stark zu und bleibt für den Rest des Versuchs konstant erhöht. Diese zweite LTP-Expression hat keinen Einfluss auf Antwort 8 da deren Amplitude nicht weiter zunimmt.

4.5.4.2 Diskussion

Schematisch ist das Ergebnis dieses Versuches in Abb. 4.34 zusammengefasst: Durch LTP-Induktion über Kondensator 8 (CAP A) wird Antwort 8 potenziert, nicht jedoch die durch Kondensator 3 (CAP B) stimulierte Antwort 3 und umgekehrt. Man kann deshalb folgern:

1. Die beobachtete LTP-Variante ist *homosynaptisch*.
2. Die Kondensatoren Nr.3 und Nr.8 sind hier *unabhängig*.
3. Es ist deshalb eine *selektive LTP-Induktion* über die beiden Kondensatoren möglich.

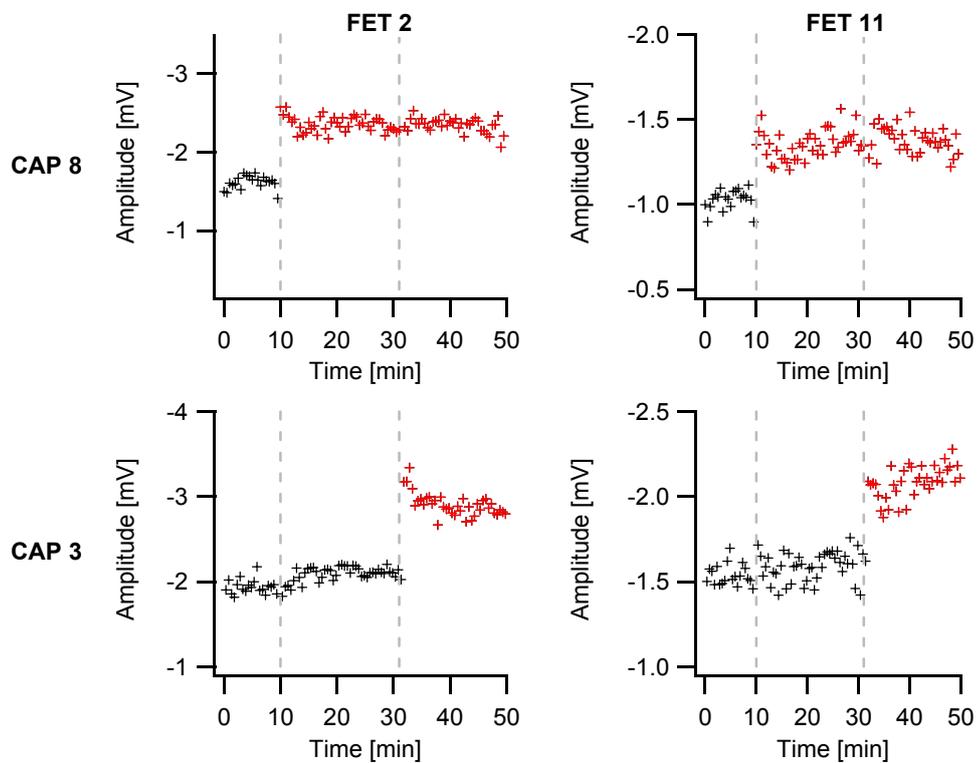


Abbildung 4.33: Zwei unabhängige Kondensatoren können selektiv LTP im Hirnschnitt induzieren. Linke Spalte: Amplituden der Feldpotentiale im Versuchsverlauf, aufgenommen mit Transistor Nr.2 vor (schwarz) und nach (rot) LTP-Induktion mit den Kondensatoren Nr.8 (oben) und Nr.3 (unten). Rechts: Analoge Messung mit Transistor Nr.11.

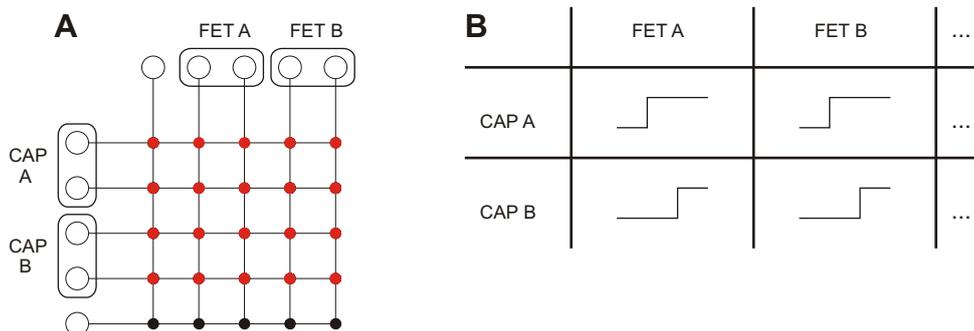


Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der selektiven Potenzierung an zwei CA3-CA1-Synapsengruppen.

4.5.5 LTP- und LTD-Induktion über zwei unabhängige Kondensatoren (2-BIT memory)

Es war nun nahe liegend zu untersuchen, ob die *selektive* Potenzierung über zwei unabhängige Kondensatoren durch LTD auch wieder *selektiv* reversibel ist.

Feldpotentiale stimuliert durch mehrere verschiedene Kondensatoren wurden aufgenommen (Nr.3,7,9, $\Delta V_s = -4.0$ V, Dauer 90 min). Zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten wurden LTP- bzw. LTD-induzierende Pulsformen an den entsprechenden Kondensator abgegeben:

Minute	Induktion	Kondensator Nr.
10	LTP	3
30	LTP	7
50	LTD	3
70	LTD	7

4.5.5.1 Resultat

Abb. 4.35 zeigt einen Teil $(1,3) \mapsto (1,2)$ der gemessenen Abbildung $(1,3) \mapsto (4,3)$. Bei diesem Experiment konnten über alle drei Kondensatoren erfolgreich pEPSPs stimuliert werden. Die durch Kondensator Nr.9 hervorgerufene Amplitude (Antwort 9) wurde als Referenz verwendet und deshalb nicht durch LTP/LTD-induzierende Pulsformen moduliert.

Die folgende Tabelle zeigt in den Spalten *Antwort 3,7* und *9* die Änderung der Feldpotentialamplituden relativ zum vorhergehenden Zeitintervall, die Spalte *Zustand* relativ zum Referenzniveau Minute 0-10.

Minute	Antwort 3	Antwort 7	Antwort 9	Zustand
0-10	-	-	-	000
10-30	potenziert	keine Änderung	keine Änderung	100
30-50	keine Änderung	potenziert	keine Änderung	110
50-70	depotenziert	keine Änderung	keine Änderung	010
70-90	keine Änderung	depotenziert	keine Änderung	000

4.5.5.2 Diskussion

In diesem Experiment hat die LTP-Expression in Antwort 3 weder einen Einfluss auf Antwort 7 noch auf Antwort 9. Das selbe gilt analog für die nachfolgenden LTP- bzw. LTD-Induktionen. Durch die drei Kondensatoren wurden also drei, voneinander verschiedene Synapsengruppen in CA1 aktiviert (Abb. 4.36A). Sie waren daher unabhängig und konnten selektiv potenziert und depotenziert werden.

Interpretiert man die Potenzierungen und Depotenzierungen der verschiedenen Antworten wieder als 1 und 0, so ergeben sich die, in der rechten Spalte der obigen Tabelle gezeigten, kombinierten Zustände. Es werden alle Zustände angenommen, die notwendig sind, um zwei Informationseinheiten reversibel im Hirnschnitt zu speichern (Abb. 4.36B). Ein *2-BIT memory* ist realisiert. Da bei dieser Messung noch ein weiterer unabhängiger Kondensator zur Verfügung stand, sollte es prinzipiell möglich sein, sogar drei Bit zu speichern.

In drei weiteren Experimenten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

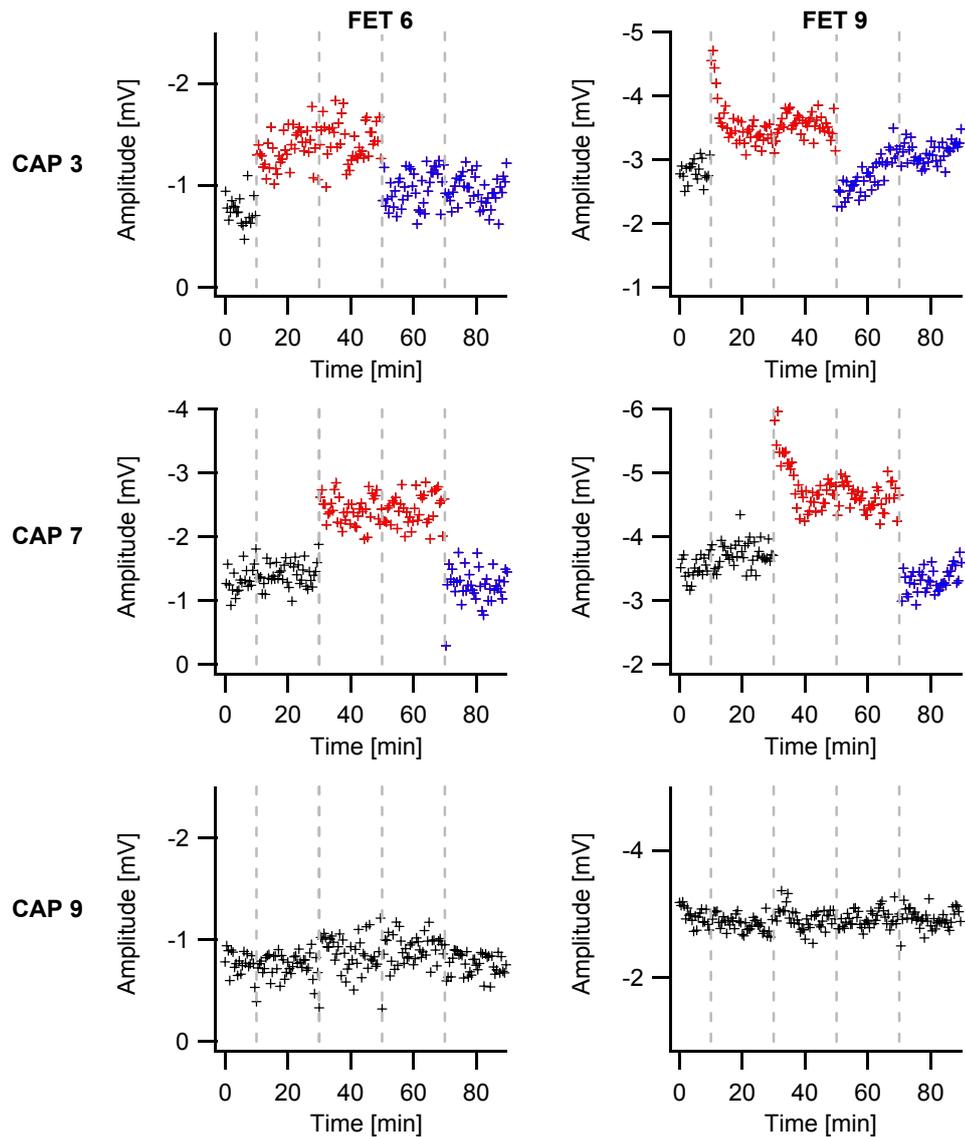


Abbildung 4.35: Selektive LTP- und LTD-Induktion über 2(+1) unabhängige Kondensatoren. Es können chipgesteuert und reversibel zwei BIT im neuronalen Netzwerk des Hippocampus (Abb. 4.36A) gespeichert werden.

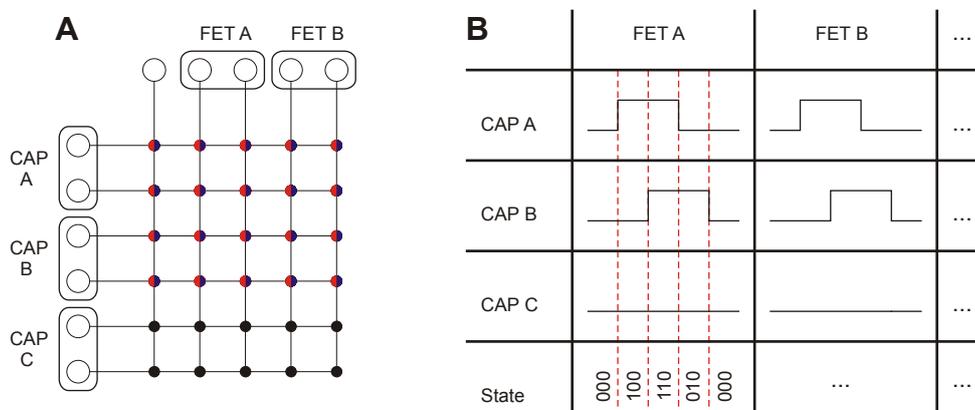


Abbildung 4.36: Schematische Darstellung: Selektive LTP- und LTD-Induktion über 2(+1) unabhängige Kondensatoren.

4.6 Fazit

Ergebnisse In dieser Arbeit wurde eine direkte elektronische Kopplung zwischen Halbleiterchips und organotypischen Hirnschnitten des Hippocampus realisiert. Es wurden dazu zwei verschiedene Chiptypen eingesetzt:

Mit dem MTA-Chip konnte die Dynamik der elektrischen Aktivität von Hirnschnitten zweidimensional mit sehr hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung detektiert werden. Eine chipseitige Stimulation war damit aber nicht möglich.

Mit einem Eigenbauchip konnte über Kondensatoren sowohl neuronale Aktivität in Hirnschnitten stimuliert als auch synchron dazu mit Transistoren detektiert werden. Die kapazitive Kopplung vermied faradayschen Stromfluss durch den Chip-Elektrolyt-Kontakt. Dieser Chiptyp wurde zur räumlichen Abbildung und Modulation synaptischer Übertragung im Hirnschnitt eingesetzt, sowie zur Aufnahme von Reiz-Antwort-Beziehungen. Die theoretische Beschreibung der gemessenen Feldpotentiale steht noch am Anfang.

Anwendungsmöglichkeiten Eigenbau- und MTA-Chip sind leistungsfähige neuroelektronische Interfaces. Sie könnten in naher Zukunft für die Grundlagen- und angewandte Forschung in folgenden Gebieten eingesetzt werden:

- *Alternative biologische Systeme*

Mit beiden Chiptypen können prinzipiell die elektrophysiologischen Eigenschaften eines breiten Spektrums alternativer biologischer Systeme wie akute Schnitte des Hippocampus, des Neocortex, des Rückenmarks sowie der Retina erforscht werden. Eine mathematische Messdatenanalyse könnte tiefere Erkenntnisse über die elektrische Funktion des jeweiligen Systems liefern.

- *Pharmascreeening*

Der MTA-Chip bietet die Möglichkeit, mit hoher Auflösung die raum- und zeitabhängige Wirkung chemischer Substanzen auf die Elektrophysiologie biologischer Systeme zu untersuchen. Es können damit einerseits Medikamente getestet werden, andererseits kann biologisches Gewebe als Biosensor (z.B. Detektion von Neurotoxinen) eingesetzt werden.

- *Langzeitstudien als Voraussetzung für in vivo Anwendung*

Im Gegensatz zu Mikroelektroden kann mit Chips prinzipiell unter sterilen Bedingungen gemessen werden. Die Stimulation und Detektion neuronaler Aktivität oder Plastizität im Brutschrank scheint über lange Zeiträume (Wochen) möglich zu sein. Derartige Langzeitstudien sind als erster Schritt in Richtung *in vivo* Anwendung der Chips zu sehen.

Die vorgestellte Technologie und die biophysikalischen Ansätze sind die Grundlage zur Entwicklung eines Chips der aus einem hochauflösenden Multi-Kondensator- und Multi-Transistor-Array besteht. Damit stünde dann ein universelles neuroelektronisches Interface zur Verfügung, das die in der Einführung genannten Anwendungen realistisch erscheinen ließe.

Anhang A

Eigenbauchip

A.1 Prozessierung

In der folgenden Tabelle sind die vier Lithographiemasken des Eigenbauchips (Abb. A.1) beschrieben (Details in [Hutz 03]):

Maske Nr.	Definiert Flächen der
I	p-dotierten Zuleitungsbahnen zu den Transistoren (Common Source, Drains) und Kondensatoren
II	Bondkontakte, Kondensatoren und Transistorgates
III	Bondkontakte und Kondensatoren
IV	Bondkontakte

Die Herstellung des Chips erfolgte in 22 Teilschritten, die auf der nächsten Seite angeführt sind. Die Prozessschritte 1-11 wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit [Hutz 03] unter Verwendung weitgehend etablierter Methoden [Besl 02, From 03] durchgeführt und in der vorliegenden Arbeit mit den Schritten 12-22 abgeschlossen. Nach jedem Oxidations- und Ätzschritt wurde die Dicke der Oxidschichten ellipsometrisch kontrolliert. Eine visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop erfolgte nach jedem Prozessschritt.

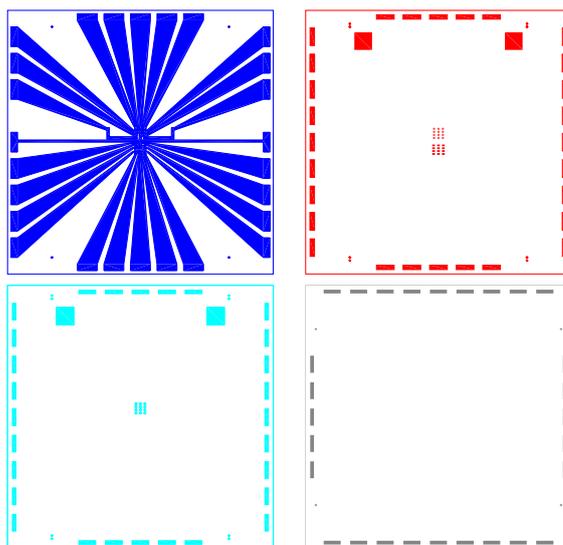


Abbildung A.1: Die vier Lithographiemasken des Eigenbauchips. Maske I (l.o.), Maske II (r.o.), Maske III (l.u.) und Maske IV (r.u.)

1. *Substrat:*
einseitig polierte, 100 mm \varnothing Si-Wafer, (100)-orientiert
mit Phosphor n-dotiert auf 4.0000-7.0000 Ωcm , Dicke 400-450 μm , MEMC Electronic Materials, Malaysia
2. *RCA-Reinigung*
3. *Oxidation: Maskenoxid*
Nasse thermische Oxidation (Centrotherm Ofen, 1000°C, 2h, Prozess S-MA7010)
Zieldicke des Oxids: 500 nm
4. *Lithographie 1: Strukturierung des Maskenoxids mit Maske I*
Photolack aufschleudern (2.5 ml, Typ 1215, Fa. micro resist) und aushärten (30 min, 90°C)
Belichtung (436 nm, 5.2 s, 21 mW/cm²)
Entwicklung (28 s, Entwickler MF84MX, Fa. micro resist)
Ätzung: Freilegen der Zuleitungsbahnen durch Ammoniumfluorid-Ätzmischung mit 12.5% HF (AF)
Ätzdauer abhängig von Oxiddicken der Wafer.
5. *RCA-Reinigung*
6. *Thermische Dotierung mit Bor:*
Borglastransfer (Centrotherm Ofen, Prozess BS-Glas)
Thermische Diffusion (1100°C, 15 min, Prozess S-Diff)
Ätzung Maskenoxid, Oxidation B-Si Belag, Ätzung B-Si Oxidschicht
7. *RCA-Reinigung*
8. *Oxidation: Feldoxid*
Trockene thermische Oxidation (Centrotherm Ofen, 1000°C, 5.5h, Prozess S-FE7010)
Zieldicke des Oxids: 1000 nm
9. *Lithographie 2: Strukturierung des Feldoxids mit Maske II*
Ätzung: Freilegen von Bondkontakten, Gate- sowie Kondensatorflächen mit AF
10. *RCA-Reinigung*
11. *Oxidation: Gateoxid*
Rapid Thermal Processing Ofen (1100°C, 27 s)
Zieldicke des Oxids: 10 nm
12. *Lithographie 3: Strukturierung des Gateoxids mit Maske III*
Ätzung: Freilegen von Bondkontakten und Kondensatorflächen
13. *RCA-Reinigung ohne HF Dip*
14. *Atomic Layer Deposition (ALD) von TiO₂ bei ASM Microchemistry, Finnland:*
HF Dip (45 s, 0.5 %)
ALD von Al₂O₃ als Pufferschicht, Zieldicke des Oxids: 1 nm
ALD von TiO₂ bei 300°C, Zieldicke des Oxids: 10 nm
15. *Reinigung in Caroscher Säure*
16. *Lithographie 4: Strukturierung des TiO₂ mit Maske IV*
Plasmaätzung: Freilegen der Bondkontakte

Plasmagas	Durchfluss	Leistung	Druck	Dauer
O ₂	30 sccm	50 W	0.5 Torr	2 min
CHF ₃ +Ar	30 und 30 sccm	50 W	0.05 Torr	10 min
CHF ₃ +O ₂	24 und 25 sccm	100 W	0.03 Torr	1 min
O ₂	30 sccm	50 W	0.5 Torr	3 min
17. *Reinigung in Caroscher Säure*
18. *Lithographie 5 mit Maske IV:*
Ätzung: Freilegen der Bondkontakte (HF, 1 min, 1%), Ellipsometrische Dicke des TiO₂ nach Ätzung:
auf Kondensatoren zwischen 9 und 12 nm, auf Bondkontakten \approx 0 nm
19. *Metallisierung der Bondkontakte:*
Aufspütern von Aluminium mit Ar-Plasma, $6 \cdot 10^{-3}$ mbar, 140 W, 4 min
Lift-off im Aceton Ultraschallbad (30 min)
20. *Sägen des Wafers in einzelne Chips*
21. *Chips in Keramiksockel einkleben, Bondkontaktierungen herstellen, Plexiglas-Zellkulturkammer aufkleben [Besl 02]*
22. *Trocknen der Chips*
Verdampfen von Lösungsmittelresten im Trockenofen (60°C, 24 h)

A.2 Elektronik und Software zur Ansteuerung

Kapazitive Stimulation Die Messelektronik (Abb. A.2) wurde über eine Messdatenerfassungskarte (DAQ), den RS-232 Port und eine Digital I/O-Karte mit einem PC verbunden. Einige Kanäle der DAQ-Karte wurden über eine Breakout-Box an BNC-Buchsen herausgeführt. Ein Digitalkanal der Breakout-Box triggerte zwei Funktionsgeneratoren, die über den RS-232 Port programmiert werden konnten und auf zwei unabhängigen Kanälen die Spannungspulse für die Kondensatoren generierten. Über die Digital I/O-Karte wurde ein 16-Bit breites Steuersignal an den Chipverstärker übertragen. Anhand dieses Steuersignals wurden Schalter gesetzt, die festlegten, welcher Kondensator auf die Ausgänge von Funktionsgenerator I, II oder auf Masse (AUS) geschaltet werden sollte.

Kapazitive Detektion Im Steuersignal der Digital I/O-Karte (Abb. A.2) war auch der Arbeitspunkt der Transistoren codiert, der über einen DAC im Chipverstärker in die stabilisierten Spannungen $V_S = 2.0$ V, $V_D = 0.1$ V und $V_B = 5.0$ V umgesetzt wurde. Die 12 Source-Drain-Ströme der Transistoren wurden jeweils zunächst intern, mit einem Operationsverstärker in eine Spannung gewandelt, über ein RC-Glied Hochpass-gefiltert (1 Hz), über einen weiteren Operationsverstärker verstärkt (100x), Tiefpass-gefiltert (1 kHz) und dann an einen Analogeingang der DAQ-Karte geführt. Die obere Grenze der Abtastfrequenz konnte auf 1 kHz festgelegt werden, weil die Messapparatur hauptsächlich niederfrequente, synaptische Signale detektieren sollte. Die Datenerfassung erfolgte synchron zur Abgabe der Spannungspulse an die Kondensatoren in einem Zeitfenster von 100 ms. Der Chipverstärker wurde über Bleiakku (± 18 V, +12 V) mit Spannung versorgt, um Störungen aus dem 220 V Netz zu vermeiden. Chipverstärker, Brückenverstärker sowie Elektrolytbad waren in Form eines Massennetzes miteinander verbunden. Das Kernstück des Versuchsaufbaues ist also der Chipverstärker, der von einem Elektroniker der Abteilung speziell für den Eigenbauchip entwickelt wurde. In Zusammenarbeit wurden die Platinen bestückt und auf Funktion getestet.

Software Die Ansteuerung der Elektronik erfolgte über ein in der visuellen Programmiersprache LabView verfasstes Softwarepaket. Es waren darin folgende Funktionen implementiert:

- Setzen der Transistorspannungen
- Programmierung der Funktionsgeneratoren auf verschiedene Pulsformen (Rampen, Rechtecke, LTP- bzw. LTD-induzierende Pulsformen, synchronisierte Pulse auf zwei Kanälen für assoziatives LTP)
- Kalibrierung der Transistoren über Badmodulation
- Automatisierte Ansteuerung der Stimulusisolatoren mit digitalen und analogen Steuerpulsen
- Auswahl zu aktivierender Kondensatoren
- Mit Stimulusabgabe synchronisierte Erfassung der 12 Transistor- und Mikroelektroden-Messdaten
- Automatisierte Speicherung der Messdaten in, nach Messzeitpunkt angeordneter, Verzeichnis- und Dateistruktur
- Visualisierung und Export von Messdaten
- Messung, Visualisierung und Export von Transistorkennlinien

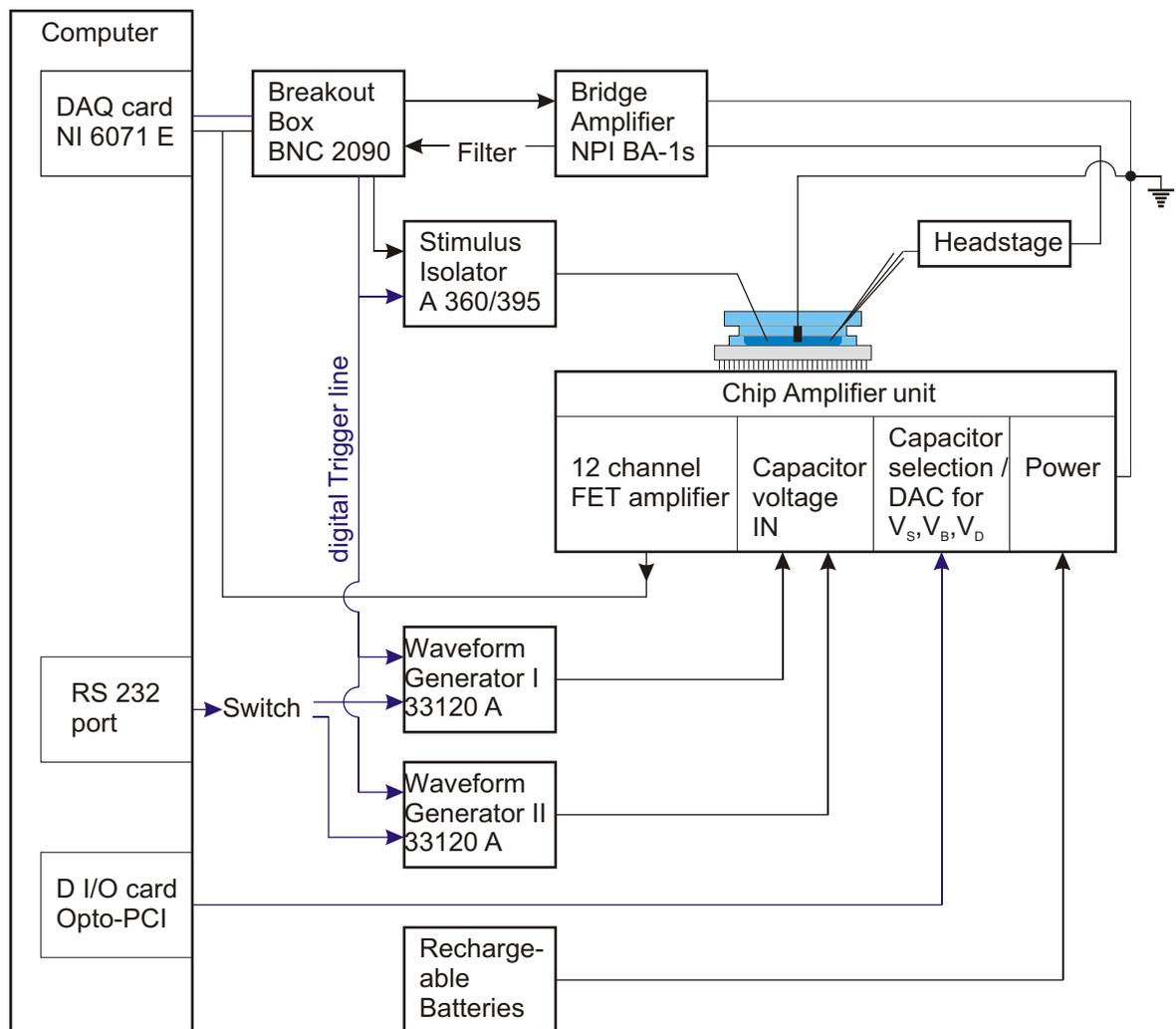


Abbildung A.2: Schematische Darstellung der Elektronik des Versuchsaufbaues.

Anhang B

Zellkultur

B.1 Lösungen

- Reinigungsmittel
BM flüssig, 104101; Biomed Labordiagnostik GmbH, Oberschleissheim
- TRIS-Puffer
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, T-1410, Sigma
Konzentration: 0.13 M
Titration der Lösung mit HCl auf pH=8.4
- Poly-L-Lysine
P-6516; Sigma
Konzentration: 1 mg pro 1 ml TRIS
- Chicken plasma (Zubereitung in [Hutz 03])
30-0390L, Cocalico Biologicals, Reamstown, USA
- Thrombin (Zubereitung in [Hutz 03])
112374, Merck
Konzentration: 140 U/ml
- Kulturmedium
50% BME, 21090-022, Invitrogen
25% Hanks' balanced salt solution, 24020-091, Invitrogen
25% Horse serum, 16050-122, Invitrogen
1 mM L-Glutamine, 25030-032, Invitrogen
25 mM D-Glucose
- Mitose Inhibitor (Zubereitung in [Hutz 03])
Uridine, U-3750
Cytosine- β -D-arabino-furanoside, C-6645
5-fluoro-2'-deoxyuridine, F-0503, Sigma
- Messmedium (in mM)

Na ⁺	149
Cl ⁻	149
K ⁺	2.7
Ca ²⁺	2.8
Mg ²⁺	2.0
HCO ₃ ⁻	11.6
H ₂ PO ₄ ⁻	0.4
Glucose	5.6

Titration der Lösung mit HCl auf pH=7.4
- AP5-Toxin
D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, 106-10, BioTrend GmbH, Köln
- DNQX-Toxin
6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione, D-0540, Sigma
from DMSO stock solution

B.2 Geräte und Material

- **Zellkultur und Perfusionssystem:**
 - Deckel der Kulturkammer*
 - Falcon 3001, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
 - Rotationsbrutschrank*
 - IncuDrive-S, Schütt Labortechnik, Göttingen
 - Peristaltische Pumpe*
 - Perimax 12, Spetec, Erding
 - Tropfregler*
 - Stat 2, Medizinischer Infusionsregler, Wenzel Laborbedarf, Heidelberg
- **Konventionelle Elektrophysiologie:**
 - Ag/AgCl-Pellet*
 - E-206, Science Products, Hofheim
 - Wolframelektroden*
 - AMS 5753, Science Products, Hofheim
 - Stimulusisolator I*
 - A360, World Precision Instruments, Berlin
 - Stimulusisolator II*
 - A395, World Precision Instruments, Berlin
 - Glaskapillaren*
 - Borosilikatglas, 1403547, Hilgenberg
 - Elektrophysiologieverstärker*
 - BA-1S, NPI electronic, Tamm
 - Mikromanipulatoren*
 - Narishige, Tokyo, Japan
 - PatchMan NP2, Eppendorf, Wesseling
 - Mikroskop*
 - Mitutoyo, mit 5/10/20x Objektiv, Japan
- **Kapazitives Chipinterface:**
 - Keramicksocket*
 - CPGA 208 L, Spectrum, San Jose, USA
 - Funktionsgeneratoren*
 - 33120 A, Agilent, Palo Alto, USA
 - Potentiostat*
 - Parstat 2263, Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA
- **Messrechner:**
 - Intel Pentium IV, 2.8 GHz, 512 MB RAM, 70 GB HDD
 - Software:*
 - Windows XP Professional, Microsoft, Seattle, USA
 - LabView 6.1, National Instruments, Austin, USA
 - Igor Pro 5, WaveMetrics, Lake Oswego, USA
 - I/O-Karten:*
 - DAQ: 6071 E, National Instruments
 - Digital I/O: OPTO-PCI, Kolter Electronic, Erfstadt
 - Breakout Box*
 - BNC 2090, National Instruments

Anhang C

Theorie

C.1 Näherung der inversen Besselfunktionen

Funktion I_0^{-1} : Die modifizierte Besselfunktion $I_0(z)$ kann durch folgende Reihe dargestellt werden [Abra 84]:

$$I_0(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(\frac{1}{4}z^2)^k}{k!\Gamma(k+1)} \quad (\text{C.1})$$

Bricht man die Entwicklung bei $k = 2$ ab, so erhält man als Näherung ein Polynom 4.Grades:

$$I_0(z) \approx 1 + \frac{z^2}{4} + \frac{z^4}{64} = \frac{1}{64}(z^2 + 8)^2 \quad (\text{C.2})$$

Diese Gleichung kann nach z aufgelöst und damit eine Näherung der Umkehrfunktion I_0^{-1} gefunden werden:

$$I_0^{-1}(z) \approx 2\sqrt{2}\sqrt{-1 + \sqrt{z}} \quad (\text{C.3})$$

Aus den vier möglichen Lösungen wurde diejenige ausgewählt, die einen positiven, reellen Funktionswert zurückliefert, da nur dies für einen Radius physikalisch sinnvoll ist.

Funktion K_0^{-1} : Die Umkehrfunktion K_0^{-1} konnte aufgrund der Komplexität der Reihendarstellung von K_0 [Abra 84] nicht analog approximiert werden. Dies musste numerisch über eine Taylorentwicklung 6.Ordnung um $z = 1$ in einem Mathematikprogramm¹ erfolgen.

Konvergenztest: Die Näherungen der Umkehrfunktionen I_0^{-1} bzw. K_0^{-1} wurden auf I_0 bzw. K_0 angewandt und graphisch überprüft ob die Identitätsfunktion $I_0^{-1}[I_0(z)] = z$ bzw. $K_0^{-1}[K_0(z)] = z$ resultiert. In den verwendeten Intervallen der Argumente war dies mit sehr hoher Genauigkeit der Fall.

¹Wolfram Research, Mathematica

C.2 Ableitung der Differentialgleichungen zur Simulation

– *No Time to be Brief* – (Wolfgang Pauli)

(A) Strombilanz:

$$\begin{aligned} I_e(x, t) &= I_e(x - dx, t) + I_m(x, t) - I_{ex}(x, t) - I_l(x, t) \\ \frac{\partial I_e(x, t)}{\partial x} &= j_m(x, t) - j_{ex}(x, t) - j_l(x, t) \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

(B) Strombilanz:

$$\begin{aligned} I_i(x, t) &= I_i(x - dx, t) - I_m(x, t) \\ \frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} &= -j_m(x, t) \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

(C) Spannungsabfall am Widerstand R_e ($r_e = \text{const}$):

$$\begin{aligned} \Phi_e(x, t) - \Phi_e(x + dx, t) &= \underbrace{r_e \cdot dx}_{R_e} \cdot I_e(x, t) \\ \frac{\partial \Phi_e(x, t)}{\partial x} &= -r_e I_e(x, t) \end{aligned} \quad (\text{C.6})$$

$$\Rightarrow \frac{\partial^2 \Phi_e(x, t)}{\partial x^2} = -r_e \frac{\partial I_e(x, t)}{\partial x} \quad (\text{C.7})$$

(D) Spannungsabfall am Widerstand R_i : ($r_i = r_i(x)$!)

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} &= -r_i(x) I_i(x, t) \\ \Rightarrow I_i(x, t) &= -\frac{1}{r_i(x)} \frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \end{aligned} \quad (\text{C.8})$$

$$\Rightarrow \frac{\partial^2 \Phi_i(x, t)}{\partial x^2} = -r_i(x) \frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} - I_i(x, t) \frac{\partial r_i(x)}{\partial x} \quad (\text{C.9})$$

(E) Einsetzen von (C.4) in (C.7) sowie (C.5) und (C.8) in (C.9) liefert:

$$\frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 \Phi_e(x, t)}{\partial x^2} = -j_m(x, t) + j_{ex}(x, t) + j_l(x, t) \quad (\text{C.10})$$

$$\frac{\partial^2 \Phi_i(x, t)}{\partial x^2} = r_i(x) j_m(x, t) + \frac{1}{r_i(x)} \frac{\partial r_i(x)}{\partial x} \frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \quad (\text{C.11})$$

$$\Rightarrow \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{1}{r_i(x)} \frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \right] = j_m(x, t) \quad (\text{C.12})$$

C.3 Randbedingungen

Das Differentialgleichungssystem (C.10 und C.12) wird nicht als Anfangswertproblem betrachtet, sondern als zweidimensionales Randwertproblem mit der Ortskoordinate $x \in [0, L]$ und der Zeitachse $t \in [0, T]$. Die zur Lösung verwendeten Randbedingungen lauten:

Randbedingungen für $\Phi_e(x, t) = V_{field}(x, t)$:

- $\Phi_e(x, t = 0) = 0$
Alle Orte befinden sich zur Zeit $t = 0$ auf Massepotential.
- $\Phi_e(x, t = T) = 0$
Alle Orte befinden sich zur Zeit $t = T$ auf Massepotential.
- $I_e(x = 0, t) = 0$
Am Ort $x = 0$ fließt für alle Zeiten kein Strom aus dem Linienleiter aus (Sealed-end boundary condition). Mit (C.6) folgt: $\frac{\partial \Phi_e(x, t)}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0$
- $I_e(x = L, t) = 0$
Am Ort $x = L$ fließt für alle Zeiten kein Strom aus dem Linienleiter aus (Sealed-end boundary condition). Mit (C.6) folgt: $\frac{\partial \Phi_e(x, t)}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0$

Randbedingungen für $\Phi_i(x, t) = V_m(x, t) + \Phi_e(x, t)$:

- $\Phi_i(x, t = 0) = V_m(x, t = 0) + \Phi_e(x, t = 0) = E_{rest} + 0$
Alle Orte befinden sich zur Zeit $t = 0$ auf Ruhepotential.
- $\Phi_i(x, t = T) = V_m(x, t = T) + \Phi_e(x, t = T) = E_{rest} + 0$
Alle Orte befinden sich zur Zeit $t = T$ auf Ruhepotential.
- $I_i(x = 0, t) = 0$
Am Ort $x = 0$ fließt für alle Zeiten kein Strom aus dem Modellneuron aus (Sealed end boundary condition). Mit (C.8) folgt: $\frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0$
- $I_i(x = L, t) = 0$
Am Ort $x = L$ fließt für alle Zeiten kein Strom aus dem Modellneuron aus (Sealed end boundary condition). Mit (C.8) folgt: $\frac{\partial \Phi_i(x, t)}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0$

Literaturverzeichnis

- [Abra 84] M. Abramowitz and I. Stegun. *Pocketbook of Mathematical Functions*. Harri Deutsch, Frankfurt, 1984.
- [Alme 98] A. Almeida, V. F. de Lima, and A. Infantosi. “Mathematical model of the CA1 region of the rat hippocampus”. *Physics in medicine and biology*, Vol. 43, pp. 2631–2646, 1998.
- [Amar 89] D. Amaral and M. Witter. “The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data”. *Neuroscience*, Vol. 31, pp. 571–591, 1989.
- [Ande 00] P. Andersen, A. Soleng, and M. Raastad. “The hippocampal lamella hypothesis revisited”. *Brain Research*, Vol. 886, pp. 165–171, 2000.
- [Ande 71] P. Andersen, T. Bliss, and K. Skrede. “Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways”. *Experimental Brain Research*, Vol. 13, pp. 222–238, 1971.
- [Anwy 06] R. Anwyl. “Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression”. *Progress in Neurobiology*, Vol. 78, pp. 17–37, 2006.
- [Barr 83] G. Barrionuevo and T. Brown. “Associative long-term potentiation in hippocampal slices”. *Proceedings National Academy of Science USA*, Vol. 80, pp. 7347–7351, 1983.
- [Bear 96] M. Bear and W. Abraham. “Long-Term Depression in hippocampus”. *Annual Reviews Neuroscience*, Vol. 19, pp. 437–462, 1996.
- [Berg 03] A. V. Bergen, T. Papanikolaou, A. Schuker, A. Moller, and B. Schlosshauer. “Long-term stimulation of mouse hippocampal slice culture on microelectrode array”. *Brain Research Protocols*, Vol. 11, pp. 123–133, 2003.
- [Besl 02] B. Besl and P. Fromherz. “Transistor array with an organotypic brain slice: field potential records and synaptic currents”. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 15, pp. 999–1005, 2002.
- [Blis 73] T. Bliss and T. Lomo. “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path”. *Journal of Physiology*, Vol. 232, pp. 331–356, 1973.
- [Blis 93] T. Bliss and G. Collingridge. “A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus”. *Nature*, Vol. 361, pp. 31–39, 1993.
- [Bonh 89] T. Bonhoeffer, V. Staiger, and A. Aertsen. “Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures: Local ”Hebbian” conjunction of pre- and postsynaptic stimulation leads to distributed synaptic enhancement”. *Proceedings National Academy of Science USA*, Vol. 86, pp. 8113–8117, 1989.

- [Caes 91] M. Caesar and A. Aertsen. “Morphological organization of rat hippocampal slice cultures”. *Journal of comparative neurology*, Vol. 307, pp. 87–106, 1991.
- [Caja 11] S. R. y Cajal. *Histologie du systeme nerveux de l’homme et des vertebres*. Maloine, Paris, 1911.
- [Capo 92] G. Capocchi, M. Zampolini, and J. Larson. “Theta burst stimulation is optimal for induction of LTP at both apical and basal dendritic synapses on hippocampal CA1 neurons”. *Brain Research*, Vol. 591, pp. 332–336, 1992.
- [Csic 03] J. Csicsvari, D. Henze, B. Jamieson, K. Harris, A. Sirota, P. Bartho, K. Wise, and G. Buzsaki. “Massively parallel recording of unit and local field potentials with silicon based electrodes”. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 90, pp. 1314–1323, 2003.
- [Davi 82] J. Davies and J. Watkins. “Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord”. *Brain Research*, Vol. 235, pp. 378–386, 1982.
- [Deba 96] D. Debanne, B. Gähwiler, and S. Thompson. “Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro”. *Proceedings National Academy of Science USA*, Vol. 93, pp. 11225–11230, 1996.
- [Dupo 99] S. Duport, C. Millerin, D. Muller, and P. Correges. “A metallic multisite recording system designed for continuous long-term monitoring of electrophysiological activity in slice cultures”. *Biosensors and Bioelectricity*, Vol. 14, pp. 369–376, 1999.
- [Eger 98] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, M. Fejtl, T. Knott, T. Müller, and H. Hämmerle. “A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays”. *Brain Research Protocols*, Vol. 2, pp. 229–242, 1998.
- [Ever 03] B. Eversmann, M. Jenkner, C. Paulus, F. Hofmann, R. Brederlow, B. Holzapfl, P. Fromherz, M. Brenner, M. Schreiter, R. Gabl, K. Plehnert, M. Steinhauser, G. Eckstein, D. Schmitt-Landsiedel, and R. Thewes. “A 128 x 128 CMOS biosensor array for extracellular recording of neural activity”. *IEEE Journal of solid state circuits*, Vol. 38, pp. 2306–2317, 2003.
- [From 02] P. Fromherz. “Sheet conductor model of brain slices for stimulation and recording with planar electronic contacts”. *European Biophysics Journal*, Vol. 31, pp. 228–231, 2002.
- [From 03] P. Fromherz. *Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain*, pp. 781–810. Wiley-VCH Berlin, 2003.
- [Gahw 81] B. Gähwiler. “Organotypic monolayer cultures of nervous tissue”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 4, pp. 329–342, 1981.
- [Ghol 01] G. Gholmieh, W. Soussou, S. Courellis, V. Marmarelis, T. Berger, and M. Baudry. “A biosensor for detecting changes in cognitive processing based on nonlinear systems analysis”. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 16, pp. 491–501, 2001.
- [Glei 06] R. Gleixner and P. Fromherz. “The extracellular electrical resistivity in cell adhesion”. *Biophysical Journal*, Vol. 90, pp. 2600–2611, 2006.

- [Grin 04] A. Grinvald and R. Hildesheim. “VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics”. *Nature*, Vol. 5, pp. 874–885, 2004.
- [Grin 82] A. Grinvald, A. Manker, and M. Segal. “Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes”. *Journal of Physiology*, Vol. 333, pp. 269–291, 1982.
- [Gust 87] B. Gustafsson, H. Wigström, W. Abraham, and Y. Huang. “Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials”. *Journal of Neuroscience*, Vol. 7, pp. 774–780, 1987.
- [Heus 02] M. Heuschkel, M. Fejtl, M. Raggenbass, D. Bertrand, and P. Renaud. “A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 114, pp. 135–148, 2002.
- [Hols 87] J. Holsheimer. “Electrical conductivity of the hippocampal CA1 layers and application to current-source-density analysis”. *Experimental Brain Research*, Vol. 67, pp. 402–410, 1987.
- [Hono 88] T. Honore, S. Davies, J. Drejer, E. Fletcher, P. Jacobsen, D. Lodge, and F. Nielsen. “Quinoxalinediones: Potent competitive non-nmda glutamate receptor antagonists”. *Science*, Vol. 241, pp. 701–703, 1988.
- [Hutz 03] M. Hutzler. *Elektrisches Interfacing von Halbleiterchips an kultivierte Hirnschnitte*. Master’s thesis, 2003.
- [Hutz 04] M. Hutzler and P. Fromherz. “Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus”. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 19, pp. 2231–2238, 2004.
- [Ishi 90] N. Ishizuka, J. Weber, and D. Amaral. “Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat”. *Journal of comparative neurology*, Vol. 295, pp. 580–623, 1990.
- [Jahn 99] H. Jahnsen, B. Kristensen, P. Thiebaud, J. Noraberg, B. Jacobsen, M. Bove, S. Martinoia, M. Koudelka-Hep, M. Grattarola, and J. Zimmer. “Coupling of organotypic brain slice cultures to silicon-based arrays of electrodes”. *Methods*, Vol. 18, pp. 160–172, 1999.
- [Jest 95] J. Jester, L. Campbell, and T. Sejnowski. “Associative EPSP-spike potentiation induced by pairing orthodromic and antidromic stimulation in rat hippocampal slices”. *Journal of Physiology*, Vol. 484, pp. 689–705, 1995.
- [Jobl 81] D. Jobling, J. Smith, and H. Wheal. “Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous-system invitro”. *Medical Biological Engineering and Computing*, Vol. 19, pp. 553–560, 1981.
- [John 98] D. Johnston and D. Amaral. *The synaptic organization of the brain*, Chap. Hippocampus. Oxford University Press, 4th Ed., 1998.
- [John 99] D. Johnston and S. Wu. *Foundations of cellular neurophysiology*. MIT Press, Cambridge, 1999.
- [Lamb 04] A. Lambacher, M. Jenkner, M. Merz, B. Eversmann, R. Kaul, F. Hofmann, R. Thewes, and P. Fromherz. “Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μm resolution”. *Applied Physics A*, Vol. 79, pp. 1607–1611, 2004.

- [Lang 69] J. Lang, A. Sances, and S. Larson. “Determination of specific cerebral impedance and cerebral current density during the application of diffuse electrical currents”. *Medical and Biological Engineering*, Vol. 7, pp. 517–526, 1969.
- [Lee 83] K. Lee. “Cooperativity among afferents for the induction of long-term potentiation in the ca1 region of the hippocampus”. *Journal of Neuroscience*, Vol. 3, pp. 1369–1372, 1983.
- [Lin 03] Y. Lin, M. Min, T. Chiu, and H. Yang. “Enhancement of associative long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors at CA1 synapses in rat hippocampal slices”. *Journal of Neuroscience*, Vol. 23, pp. 4173–4181, 2003.
- [Mitz 85] U. Mitzdorf. “Current source-density method and application in cat cerebral cortex: Investigation of evoked potentials and EEG phenomena”. *Physiological Reviews*, Vol. 65, pp. 37–100, 1985.
- [Naka 97] Y. Nakagami, H. Saito, and N. Matsuki. “Optical recording of trisynaptic pathway in rat hippocampal slices with a voltage-sensitive dye”. *Neuroscience*, Vol. 81, pp. 1–8, 1997.
- [Nich 73] C. Nicholson. “Theoretical analysis of field potentials in anisotropic ensembles of neuronal elements”. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 20, pp. 278–288, 1973.
- [Nich 75] C. Nicholson and J. Freeman. “Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum”. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 38, pp. 356–368, 1975.
- [Nisc 94] W. Nisch, J. Böck, U. Egert, H. Hämmerle, and A. Mohr. “A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro”. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 9, pp. 737–741, 1994.
- [Nolt 97] W. Nolting. *Grundkurs Theoretische Physik: Elektrodynamik*. Vieweg, 5 Ed., 1997.
- [Nova 88] J. Novak and B. Wheeler. “Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 23, pp. 149–159, 1988.
- [Nune 06] P. Nunez and R. Srinivasan. *Electric fields of the brain: The neurophysics of EEG*. Oxford University Press, 2 Ed., 2006.
- [Oka 99] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani. “A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 93, pp. 61–67, 1999.
- [Pier 96] R. Pierret. *Semiconductor device fundamentals*. Addison-Wesley, 1996.
- [Plen 93] D. Plenz and A. Aertsen. “Current source density profiles of optical recording maps: a new approach to the analysis of spatio-temporal neural activity patterns”. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 5, pp. 437–448, 1993.
- [Pres 92] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling, and B. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 2nd Ed., 1992.
- [Purv 97] D. Purves, Ed. *Neuroscience*. Sinauer Associates, 1997.

- [Ratt 99] F. Rattay. “The basic mechanism for the electrical stimulation of the nervous system”. *Neuroscience*, Vol. 89, pp. 335–346, 1999.
- [Rich 87] T. Richardson, R. Turner, and J. Miller. “Action potential discharge in hippocampal ca1 pyramidal neurons: current source density analysis”. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 58, pp. 981–996, 1987.
- [Sarg 01] A. Sargsyan, C. Papatheodoropoulos, and G. Kostopoulos. “Modeling of evoked field potentials in hippocampal CA1 area describes their dependence on NMDA and GABA receptors”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 104, pp. 143–153, 2001.
- [Sarg 04] A. Sargsyan, A. Melkonyan, H. Mkrtchian, C. Papatheodoropoulos, and G. Kostopoulos. “A computer model of field potential responses for the study of short-term plasticity in hippocampus”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 135, pp. 175–191, 2004.
- [Schw 04] H. Schwarz and N. Köckler. *Numerische Mathematik*. Teubner-Verlag, 5 Ed., 2004.
- [Seki 97] Y. Sekino, K. Obata, M. Tanifuji, M. Mizuno, and J. Murayama. “Delayed signal propagation via ca2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording”. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 78, pp. 1662–1668, 1997.
- [Stai 04] V. Staiger. “personal communication”. 2004.
- [Stop 97] L. Stoppini, S. Duport, and P. Correges. “A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 72, pp. 23–33, 1997.
- [Tao 00] H. Tao, L. Zhang, G. Bi, and M. Poo. “Selective presynaptic propagation of long-term potentiation in defined neural networks”. *Journal of Neuroscience*, Vol. 20, pp. 3233–3243, 2000.
- [Teyl 99] T. Teyler. “Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity”. *Methods*, Vol. 18, pp. 109–116, 1999.
- [Thie 99] P. Thiebaud, C. Beuret, M. Koudelka-Hep, M. Bove, S. Martinoia, M. Grattarola, H. Jahnsen, R. Rebaudo, M. Balestrino, J. Zimmer, and Y. Dupont. “An array of Pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices”. *Biosensors and Bioelectricity*, Vol. 14, pp. 61–65, 1999.
- [Tomi 00] T. Tominaga, Y. Tominaga, H. Yamada, G. Matsumoto, and M. Ichikawa. “Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices”. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 102, pp. 11–23, 2000.
- [Trau 91] R. Traub and R. Miles. *Neuronal networks of the hippocampus*. Cambridge University Press, 1991.
- [Turn 80] D. Turner and P. Schwartzkroin. “Steady-state electrotonic analysis of intracellularly stained hippocampal neurons”. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 44, pp. 184–199, 1980.
- [Wall 06] F. Wallrapp and P. Fromherz. “TiO₂ and HfO₂ in electrolyte-oxide-silicon configuration for applications in bioelectronics”. *Journal of Applied Physics*, Vol. 99, p. 114103, 2006.

- [Zado 90] A. Zador, C. Koch, and T. Brown. “Biophysical model of a hebbian synapse”. *Proceedings National Academy of Science USA*, Vol. 87, pp. 6718–6722, 1990.

Mein Dank gilt:

- *Prof. Dr. Peter Fromherz*
für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu können sowie für die stets inspirierenden Diskussionen
- *Dr. Armin Lambacher*
für die gelungene Zusammenarbeit bei den Messungen mit dem MTA-Chip
- *Olusegun Momoh, Nicole Stöhr und Doris Eckerlein*
für die zuverlässige Präparation der Hippocampusschnitte in den verschiedenen Stadien der Arbeit
- *Frank Wallrapp*
für die Hilfe bei der Titandioxidbeschichtung der Eigenbauchips und das Korrekturlesen
- *Christian Stangl und Kathrin Pflüger*
für das Korrekturlesen und die Zimmerkameradschaft
- *Alexander Kunze, Robert Pabst und Walther Wagner*
für die Hilfe beim elektronischen bzw. mechanischen Aufbau der Messapparatur
- *Den Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik*
für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei alltäglichen und nichtalltäglichen Problemen

- *Meinen Eltern Inge und Karl Hutzler*
denen diese Arbeit gewidmet ist.