

Technische Universität München

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

Elektrische und chemische Signalübertragung in Zell-Transistor-Chips mit Ionenkanälen

Matthias Brittinger

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. M. Kleber

Prüfer der Dissertation: 1. Hon.–Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.–Prof. Dr. M. Stutzmann

Die Dissertation wurde am 24.8.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 6.10.2004 angenommen.

Zusammenfassung

Die Kopplung von Ionenkanälen mit Feldeffekttransistoren ist die Grundlage für die Entwicklung und das Verständnis von halbleiterbasierten Bio- und Neurosensoren.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Kopplungsmechanismen des Ionenkanal-Zell-Transistor-Systems. Hierfür wurden durch gentechnische Methoden spannungsabhängige kaliumselektive Ionenkanäle in Zellen einer permanenten Zelllinie exprimiert. Um die Kopplung zu studieren, wurden diese Zellen auf Halbleiterchips mit metallfreien Feldeffekttransistoren kultiviert und die Ionenkanäle in der Zellmembran durch Patch-Clamp-Technik aktiviert.

Das Öffnen der Kaliumkanäle in der Adhäsionsmembran führt zu einem Einstrom von Kaliumionen in die Kontaktzone zwischen Zelle und Substrat verbunden mit einem ohmschen Spannungsabfall und einer diffusiven Konzentrationsänderung der Ionen im Spalt zwischen Zellmembran und Transistoroberfläche.

Beide Effekte modulieren den Source-Drain-Strom des Transistors, der elektrische Anteil über eine lokale Änderung der Gatespannung und die Konzentrationsänderung über eine Veränderung des Oberflächenpotentials der Siliziumoxidoberfläche. Das resultierende Transistorsignal besteht daher aus einer schnellen elektrischen Signalkomponente mit einer Zeitkonstante von $1 \mu\text{s}$ und einer langsamen chemischen Komponente mit einer Zeitkonstante von 10 ms. Die Signalantwort konnte durch ein Elektrodifusionsmodell im Spalt in Verbindung mit der Bindungskinetik der Ionen an die Oxidoberfläche modelliert werden.

Durch Reduzierung der Natriumkonzentration im extrazellulären Elektrolyten wurde das theoretische Modell der Zell-Transistor-Kopplung überprüft. Experimente in natriumfreien Elektrolyten führten zu einer Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Dadurch konnte das dynamische Gatingverhalten der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran aufgelöst und Lösungsansätze für die Verwirklichung eines nicht-invasiven Biosensors gewonnen werden.

Abstract

The interfacing of semiconductor devices with ion channels is the basis for the development of cell-based biospecific electronic sensors.

To elucidate the mechanism of cell-chip coupling the voltage-gated potassium channel Kv1.3 was studied. It is expressed in HEK 293 cells on field-effect transistors in silicon with a metal-free gate of silicon dioxide. The ion channels in the cell membrane are electrically controlled by patch clamp technique.

When the potassium channels open and close, there is a fast and a slow response of the source-drain current in the transistor that is held at constant bias voltages to bulk electrolyte. We assign both signals to K^+ ions that flow through the channels into the nanospace between cell and chip.

The fast signal on a time scale of one microsecond is due to a change of the gate voltage as caused by charge diffusion in a core-coat conductor. The slow signal on a time scale of ten milliseconds is related with a change of extracellular ion concentration (electrodifusion) which affects the transistor threshold. It is rationalized in all details by a surface model of the electrical double layer with binding dynamics of potassium and sodium ions.

In order to verify the proposed theoretical model the extracellular concentration of sodium was varied. The reduction of the sodium concentration led to an expected enhanced signal/noise ratio. In the environment of low ionic strength solution the dynamical gating of the ion channels in the adhesion membrane could be resolved. The application of this kind of electrolytes for a new type of a non-invasive biosensor was tested.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie der Zell-Transistor-Kopplung	5
2.1	Flächen- und Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung	6
2.2	Flächen- und Punktkontaktmodell der Elektrodifffusion	13
2.3	Spannungs- und Ionensensitivität des Feldeffekttransistors	22
3	Transistoren und Zellen	39
3.1	Messaufbau	39
3.2	Transistoren	43
3.3	Zellen und Ionenkanäle	48
3.4	Zell-Chip-Abstand	52
3.5	Patch-Clamp-Technik	54
4	Zell-Transistor-Kopplung	63
4.1	Transistorsignal in elektrophysiologischer Lösung	63
4.2	Gatingverhalten der Ionenkanäle in elektrophysiologischer und natriumfreier Lösung	64
4.3	Variation der extrazellulären Natriumkonzentration	66
4.4	Variation der extrazellulären Natriumkonzentration ohne zweiwertige Ionen	66
5	Elektrische Zell-Transistor-Kopplung	69
5.1	Umrechnung der Messgrößen mit Hilfe des Spaltwiderstandes	71
5.2	Gating der Kanäle in elektrophysiologischer und natriumfreier Lösung	72
5.3	Variation des Spaltwiderstandes	77
5.4	Statistik der Kopplungseigenschaften	79
6	Elektrische und Chemische Zell-Transistor-Kopplung	83
6.1	Transistorsignal in elektrophysiologischer Lösung	84
6.2	Transistorsignal bei Variation der Natriumkonzentration	89
6.3	Dynamisches Gatingverhalten der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran .	93

7 Wege zur Biosensorik	97
7.1 nichtinvasive Detektion von geöffneten Kanälen	98
7.2 Detektion von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen	100
7.3 Messung von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen	101
8 Ergebnisse	105
A Verwendete Materialien	107
A.1 Geräte	107
A.2 Lösungen	108
A.3 Bezugsquellen	109

„Κινεῖται καὶ ῥεῖ τὰ πάντα ”
(Heraklit, ca. 540-480 v. Chr.)

Kapitel 1

Einleitung

Die Verarbeitung und Übertragung von Information erfolgt im menschlichen Gehirn ebenso wie in elektronischen Rechnern durch die Regelung von elektrischen Strömen. Beide Welten verwenden jedoch unterschiedliche Trägermedien. Während in der Halbleiterindustrie durch gezielte Beeinflussung des Festkörperkristalls der Fluß von Elektronen gesteuert wird, hat die Evolution des Lebens in den Ozeanen einen anderen Weg eingeschlagen. Die neuronale Aktivität basiert auf dem Zusammenspiel unterschiedlicher Ionenströme in wässriger Lösung.

Den Grundbaustein der Elektronik bildet der Feldeffekttransistor, das kleinste Bauelement in der Welt der Ionik ist der Ionenkanal. In einem Feldeffekttransistor wird der Strom zwischen einer Ladungsträgerquelle (Source) und einer Senke (Drain) durch eine spannungssensitive Region (Gate) an der Oberfläche eines Halbleitersubstrats moduliert (Abbildung 1.1).

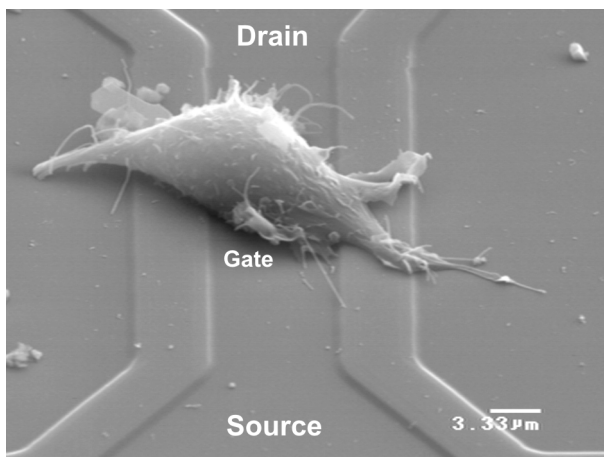


Abbildung 1.1: EM-Bild einer HEK293 Zelle transfiziert mit Kv1.3 Ionenkanälen auf der nichtmetallisierten Gate-region eines Feldeffekttransistors. Der Ausstrom der Ionen in die Spaltregion zwischen Zelle und Transistor moduliert den Löcher-Strom zwischen Source und Drain.

Ionenkanäle sind Membranproteine, die selektiv den Ionenaustausch zwischen dem Zellinneren und dem die Zelle umgebenden Elektrolyten steuern. Bei spannungsabhängigen Ionenkanälen wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanal-Ensembles durch die intrazelluläre Spannung bestimmt. Wird nun eine Zelle, die Ionenkanäle in der Zellmembran trägt, auf die spannungssensitive Region des Transistors aufgebracht, so kann das Verhalten des

Kanal-Ensembles in der Zelle über die in die Kontaktregion fließenden Ionenströme untersucht werden.

Während Aufbau und Funktionsweise des Feldeffekttransistors (FET) auf dem Reissbrett entworfen werden kann, bietet die Natur ein weites Spektrum an unterschiedlichen Sorten von Ionenkanälen. Aus wissenschaftlicher Sicht ist für ein grundlegendes Verständnis neuronaler Aktivität die Untersuchung der Funktionsweise dieser winzigen biologischen Schalter unerlässlich. Aus pharmakologischer Sicht steht besonders die Wechselwirkung dieser Kanäle mit Wirksubstanzen für die Entwicklung neuer Medikamente im Vordergrund.

Bisherige Ansätze für die Untersuchung von Ionenkanälen bestehen in einer elektrischen Kontaktierung der Zelle durch Patch-Clamp-Technik mittels Glaspipetten [Ham81]. Diese Methode hat den Nachteil, daß der Durchsatz an gemessenen Zellen aufgrund des aufwendigen Verfahrens beschränkt ist. Daher gibt es neue Ansätze, bei denen Zellen in das Pipetteninnere gespült werden, das Zellinnere einer an der Pipettenspitze haftenden Zelle aufgerissen wird und so die Ionenkanäle in der Membran kontaktiert werden [www.flyion.com]. Andere Methoden basieren auf der Kontaktierung der Zelle durch Mikrolöcher in einem Substrat (Planar Patch Clamp Technologie, siehe dazu [Sch00, Ste03, Fer02, Kle02]). Alle Verfahren sind jedoch invasiv.

Eine mögliche Verwirklichung eines nicht-invasiven Ionenkanal-Biosensors besteht in dem in Abbildung 1.1 bereits vorgestellten System aus einem FET mit einer darauf liegenden genetisch modifizierten Zelle, die von sich aus die gewünschte Sorte von Ionenkanälen exprimiert und in ihre Zellmembran einbaut. Die Kopplung in den Feldeffekttransistor erfolgt über die Kontaktzone (Spalt) zwischen Zelle und FET.

Um die Kopplung zu verstehen, ist ein fundamentales Verständnis der physikalischen Vorgänge im Spalt von Nöten. Daher wurde in dieser Arbeit ein kontrollierbares Modellsystem geschaffen, indem spannungsgesteuerte Kaliumkanäle verwendet wurden, die durch Depolarisation des Zellinneren geöffnet werden können. Hierfür wird die Zelle mittels Patch-Clamp-Technik kontaktiert und die Spannung in der Zelle auf einen definierten Wert geklemmt. Das Öffnen der Kanäle in der Adhäsionsmembran führt zu einem Einstrom der Kaliumionen in den Spalt. Die resultierenden Effekte in der Spaltregion sowie die Auswirkungen auf das Transistorsignal werden in dieser Arbeit untersucht und theoretisch modelliert.

Dazu werden experimentell die Kopplungsmechanismen in verschiedenen extrazellulären Lösungszusammensetzungen studiert. Die Basis bildet die Verwendung von allgemein üblichen elektrophysiologischen Lösungen.

Um die Kopplung besser zu verstehen, wird die Natriumkonzentration im Elektrolyten reduziert, dabei wird die Osmolalität durch eine entsprechende Erhöhung der Glukosekonzentration aufrecht erhalten. Durch die Erhöhung des spezifischen Widerstandes wird erwartungsgemäß das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert. In dieser Art von Lösung konnte das dynamische Öffnungsverhalten der Kanäle in der Adhäsionsmembran im Transistor aufgelöst werden.

Die Verwendung von spannungsabhängigen Ionenkanälen bietet den Vorteil, daß diese leicht zu kontrollieren sind, hat jedoch den Nachteil, daß das untersuchte Zell-Chip-System nach wie vor invasiv ist. Eine nicht-invasive Kopplung der Zelle an den Transistor kann durch eine Ungleichverteilung der Kanäle in der Membran erreicht werden, da in diesem Falle ein Öffnen der Kanäle zu Umladeströmen über die Zellmembran und damit auch durch den Spalt führt [Fro99]. Diese Art der Kopplung hängt sehr stark von biologischen Parametern wie der Art des verwendeten Zellsystems, der Adhäsionsproteine oder der Kulturdauer ab. Zudem ist die Signaldauer beschränkt durch die Zeitkonstante der Membranumladung, die erwartete Signalhöhe sehr gering.

Einen Ausweg bietet die Detektion einer Leitfähigkeitsänderung der Zellmembran durch sinusförmige elektrische Modulation des die Zelle umgebenden Elektrolyten. Hierbei wird die frequenzabhängige Übertragungsfunktion der Anregungsspannung in den Transistor ausgewertet. Dabei kann unterschieden werden zwischen den Fällen freier Transistor, nicht aktive Zelle auf Transistor und Zelle mit geöffneten Kanälen auf Transistor. Durch die Verwendung von hochohmigen Lösungen kann einerseits die charakteristische Frequenz erniedrigt sowie die Signalantwort erhöht werden.

Kapitel 2

Theorie der Zell-Transistor-Kopplung

In diesem Kapitel soll das System einer Zelle, die kaliumselektive Ionenkanäle exprimiert und die über ihre Adhäsionsfläche an einen Feldeffekttransistor koppelt, theoretisch beschrieben werden. Die Spannung im Inneren der Zelle wird durch Patch-Clamp-Technik (siehe dazu Abschnitt 3.5) vorgegeben. Die relevanten physikalischen Größen sind die Spannung im Inneren der Zelle V_M , der Strom durch die Zelle I_M und die Änderung der Äquivalentenspannung ΔV_{FET} , die über eine Änderung des Source-Drain-Stroms im Feldeffekttransistor gemessen wird.

Der theoretische Teil ist in drei Abschnitte gegliedert. Die aktive Zelle verändert durch den

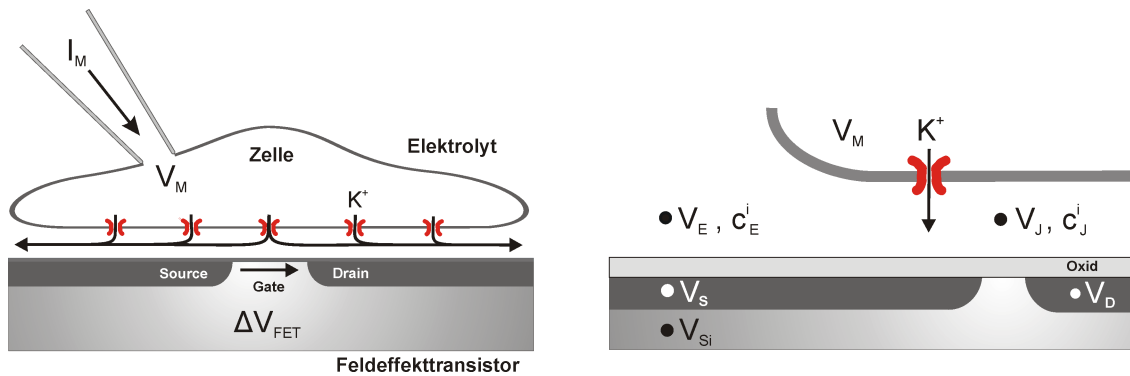


Abbildung 2.1: Schematische Ansicht des Zell-Transistor-Systems

Zustrom von Kaliumionen in die Kontaktregion zwischen Zelle und Substrat das elektrische Potential sowie die Konzentrationen im Spalt. Im ersten Teil wird unter Vernachlässigung der Konzentrationsänderungen zunächst ein rein elektrisches Modell vorgestellt. Im zweiten Teil wird mittels einer theoretischen Beschreibung durch Elektrodiffusion die Konzentrationsänderungen im Spalt mit einbezogen. Dieses Modell liefert einerseits ein modifiziertes Spannungsprofil und andererseits können die Konzentrationsänderungen der einzelnen Ionensorten berechnet werden. In der Bestrebung, ein möglichst einfaches Modell zu verwenden, werden dabei sowohl im ersten sowie im zweiten Teil integrale Modelle für den Spalt eingeführt. Dieses sogenannte Punktkontaktmodell beschreibt den Spalt als ein Kompartiment in Kontakt zu dem Badelektrolyten mit der Spannungsdifferenz $V_J - V_E$

und den Konzentrationsunterschieden $c_J^i - c_E^i$.

Der Einfluß der physikalischen Vorgänge im Spalt auf das Transistorsignal ΔV_{FET} wird im dritten Teil behandelt.

2.1 Flächen- und Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung

Es soll nun untersucht werden, welche Auswirkung eine elektrische Anregung der Zelle auf den Spalt hat. Vorerst werden Konzentrationsänderungen im Spalt vernachlässigt. Durch einen gleichmässigen Strom in die Spaltregion wird ein Spannungsprofil unter der Zelle erzeugt. Dieser Zustrom kann aus einem Ionenstrom durch geöffnete Kanäle bestehen, kann jedoch auch durch kapazitive Ströme über die Adhäsionsmembran bei Wechsellspannungsanregung oder Spannungssprüngen des Zellinneren verursacht sein. In Abbildung 2.2 sind zwei Varianten (Flächenkontaktmodell und integrales Punktkontaktmodell) der theoretischen Beschreibung skizziert, die im folgenden näher erläutert werden.

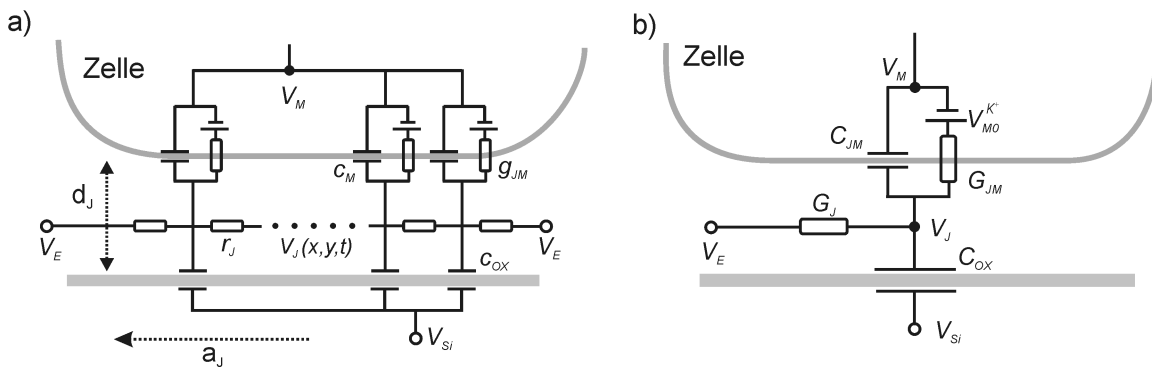


Abbildung 2.2: a) Flächenkontaktmodell der elektrischen Kopplung. Ein Zustrom $j(x,y,t)$ über die Adhäsionsmembran in den Spalt verursacht ein Spannungsprofil $V_J(x,y,t)$. Die Dicke der Spaltregion d_J wird als homogen über die gesamte Kopplungsfläche A_{JM} angenommen. Die Kopplungsfläche sei kreisförmig mit dem Radius a_J . Der Spalt wird als Kern-Mantel-Leiter mit dem Flächenwiderstand r_J und den spezifischen Kapazitäten der Membran c_M und des Oxides c_{OX} modelliert.

b) Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung. Durch Mittelung des Spannungsprofils kann der Spalt durch ein 1-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Dabei werden die integralen Größen I_{JM} , C_{JM} und C_{OX} über die gesamte Kopplungsfläche A_{JM} verwendet und der Flächenwiderstand r_J in einen Spaltwiderstand G_J^{-1} übersetzt.

2.1.1 Flächenwiderstand des Spaltes

Aufgrund der glatten Oxidoberfläche kann ein homogener Abstand zwischen Adhäsionsmembran und Substrat angenommen werden. Da sich Dicke d_J und Radius der Spaltregion a_J um zwei Größenordnungen unterscheiden, können die elektrischen Eigenschaften des Spaltes auf einen zweidimensionalen Flächenwiderstand r_J reduziert werden. Über optische Abstandsmessungen mit Fluoreszenzfarbstoffen in der Adhäsionsmembran (FLIC) wurde die Dicke des Spaltes d_J zu 70 nm bestimmt (Abschnitt 3.4), ein typischer Wert

2.1. FLÄCHEN- UND PUNKTKONTAKTMODELL DER ELEKTRISCHEN KOPPLUNG

für den Zelldurchmesser der verwendeten Zellen ist $10 \mu m$. Eine Kombination mit Untersuchungen mit spannungssensitiven Farbstoffen ergab, daß der Spalt zwischen Zelle und Substrat die gleichen Eigenschaften aufweist wie der umgebende Elektrolyt [Gle03, Bra04]. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage für eine theoretische Modellierung des Zell-Transistor-Systems, da der Flächenwiderstand r_J in einer einfachen Beziehung zu dem spezifischen Elektrolytwiderstand ρ_E im Bad steht:

$$r_J = \frac{\rho_E}{d_J} \quad (2.1)$$

Der Flächenwiderstand kann damit durch Messung des spezifischen Elektrolytwiderstandes errechnet werden. Außerdem folgt daraus, daß für die Diffusionskonstanten der einzelnen Ionen im Spalt die Literaturwerte für die Diffusion in 3D verwendet werden können. Der Flächenwiderstand ist unter Verwendung der Einsteingleichung:

$$\frac{1}{r_J} = d_J \cdot \sum_i \frac{z_i^2 e_0^2 c_J^i D_E^i}{k_B T} \quad (2.2)$$

2.1.2 Flächenkontaktmodell der elektrischen Kopplung

Der Spalt zwischen Zellmembran und Chipoberfläche kann beschrieben werden durch einen zweidimensionalen Kern-Mantel-Leiter [Wei97] mit dem Flächenwiderstand r_J (in diesem Teil eine Konstante) und der spezifischen Spaltkapazität $c_M + c_{OX}$. Die Spannung des Elektrolyten V_E sei im folgenden, wenn nicht anders beschrieben, auf Null gesetzt und taucht daher in den Gleichungen nicht auf. Der Zustrom der Ionen durch die Adhäsionsmembran wird beschrieben durch den skalaren Quellterm $j(x, y, t)$. Die Kopplung wird modelliert durch die Kabelgleichung:

$$(c_M + c_{OX}) \frac{\partial}{\partial t} V_J(x, y, t) - c_M \frac{\partial}{\partial t} V_M(t) - \nabla \left[\frac{1}{r_J} \nabla V_J(x, y, t) \right] = j(x, y, t) \quad (2.3)$$

Für den Fall, daß der Strom in den Spalt durch ein Öffnen der Kaliumkanäle verursacht wird, ist $j(x, y, t) = g_{JM} \cdot (V_M(t) - V_{M0}^{K^+} - V_J(x, y, t))$.

Dabei ist g_{JM} die spezifische Membranleitfähigkeit bei geöffneten Kanälen, $V_M - V_{M0}^{K^+} - V_J$ ist die Triebkraft für die Kaliumionen in den Spalt zusammengesetzt aus intrazellulärer Spannung V_M , dem Nernstpotential $V_{M0}^{K^+} = -\frac{k_B T}{e_0} \ln \frac{c_M^{K^+}}{c_E^{K^+}}$ und der Spaltspannung V_J . In der gesamten Arbeit war die intrazelluläre Kaliumkonzentration gleich 140 mM, die Kaliumkonzentration im Bad gleich 5 mM. Damit ist das Nernstpotential $V_{M0}^{K^+}$ gleich -84 mV. Als Modell soll eine kreisrunde Adhäsionsfläche mit gleichmässiger Kanalverteilung in der Membran verwendet werden. Somit kann das Gleichungssystem in Zylinderkoordinaten mit dem Radius a und dem Radius a_J am Rand ausgedrückt werden:

$$(c_{JM} + c_{OX}) \frac{\partial}{\partial t} V_J(a, t) - c_M \frac{\partial}{\partial t} V_M(t) - \frac{1}{r_J} \frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial a} \left[\frac{1}{a} \frac{\partial}{\partial a} V_J(a, t) \right] = j(a, t) \quad (2.4)$$

Für den Fall $V_M - V_{M0}^{K^+} \gg V_J$ ist der Zustrom $j(a, t)$ unabhängig vom Radius. Mit der Randbedingung $V_J(a_J, t) = 0$ nimmt die Spannung im Spalt V_J im stationären Fall eine parabelförmige Gestalt an:

$$V_J^\infty(a) = \frac{j r_J a_J^2}{4} \left(1 - \frac{a^2}{a_J^2} \right) \quad (2.5)$$

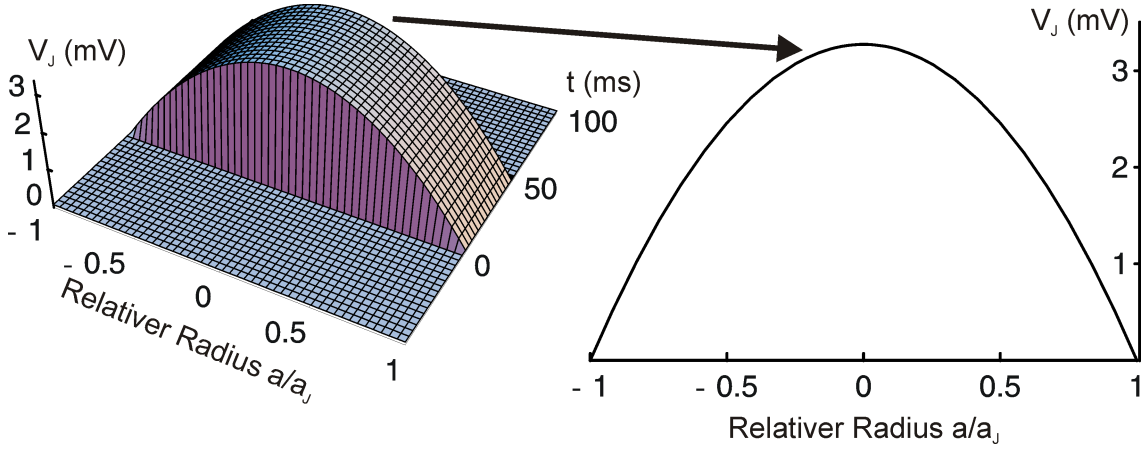


Abbildung 2.3: Spannungsprofil $V_J(a, t)$ im Spalt bei einem instantanen Öffnen der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran. Die Zellspannung wird durch einen 50 ms-Puls ausgehend von V_{M0}^{K+} auf +50 mV depolarisiert. Als Modellparameter wurde eine spezifische Leitfähigkeit der Membran von 20 mS/cm^2 , eine kreisrunde Adhäsionsfläche A_{JM} von $200 \mu\text{m}^2$ und ein Flächenwiderstand r_J von $7.9 \text{ M}\Omega_{\square}$ (entspricht elektrophysiologischer Lösung im Spalt) gewählt.

Für den Übergang in das Punktkontaktmodell wird im folgenden nur der integrierte Strom $I_{JM} = \pi a_J^2 j$ sowie eine gemittelte Spannung $\langle V_J^\infty \rangle$ betrachtet werden. Aus der Integration von Gleichung 2.5 folgt folgender Zusammenhang zwischen gemittelter Spannung und dem Flächenverhältnis zwischen der Mittelungsfläche A_{JM}^{mittel} und der gesamten Adhäsionsfläche A_{JM} :

$$\langle V_J^\infty \rangle = \frac{I_{JM} \cdot r_J}{4\pi} \left(1 - \frac{1}{2} \frac{A_{JM}^{\text{mittel}}}{A_{JM}}\right) \quad (2.6)$$

Übergang zum Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung

Die allgemeine Beschreibung durch das Flächenkontaktmodell kann durch das Punktkontaktmodell wesentlich vereinfacht werden. Die Kopplung wird durch das Ersatzschaltbild in Abbildung 2.2 b) beschrieben. Die relevanten Größen sind nun die über die Adhäsionsfläche $A_{JM} = \pi a_J^2$ integrierten Größen $I_{JM} = A_{JM} j$, $G_{JM} = A_{JM} g_{JM}$, $C_{JM} = A_{JM} c_M$ und $C_{OX} = A_{JM} c_{OX}$. Der Flächenwiderstand r_J wird durch einen Spaltwiderstand G_J^{-1} ausgedrückt:

$$(C_{JM} + C_{OX}) \frac{\partial}{\partial t} V_J(t) - C_{JM} \frac{\partial}{\partial t} V_M(t) + G_J V_J(t) = I_{JM}(t) \quad G_J = \frac{\theta}{r_J} \quad (2.7)$$

Durch Vergleich von Gleichung 2.6 und 2.7 kann für den stationären Fall die folgende Beziehung zwischen θ und dem Flächenverhältnis zwischen der Mittelungsfläche A_{JM}^{mittel} und der gesamten Adhäsionsfläche A_{JM} hergestellt werden:

$$\theta = \frac{4\pi}{1 - \frac{1}{2} \frac{A_{JM}^{\text{mittel}}}{A_{JM}}} \quad (2.8)$$

Will man also mit dem Punktkontaktmodell die über die Gesamtfläche gemittelte Spannung beschreiben, so wählt man für θ den Faktor 8π , die Spannung in der Mitte des Spaltes wird über den Faktor 4π ausgedrückt (siehe hierzu Abb. 2.4). Bis jetzt wurde nur das

2.1. FLÄCHEN- UND PUNKTKONTAKTMODELL DER ELEKTRISCHEN KOPPLUNG

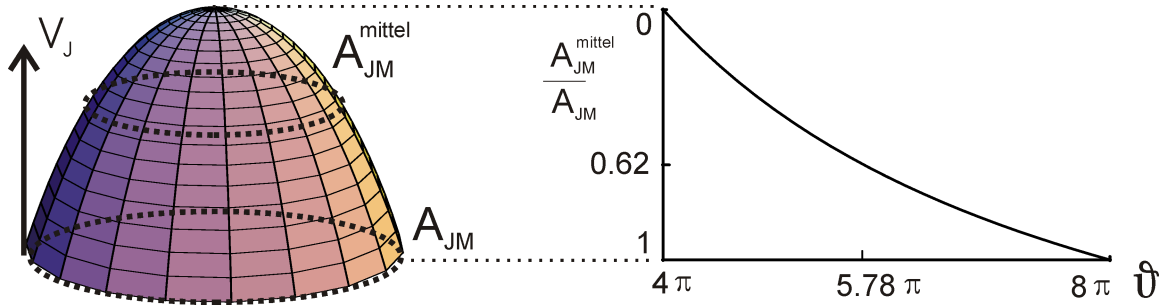


Abbildung 2.4: Im Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung wird die gemittelte Spannung in Bezug zu dem Gesamtstrom in den Spalt gesetzt. Dabei hängt der Faktor θ von der Mittelungsfläche ab. Bei $\theta = 4\pi$ beschreibt das Modell die Maximalspannung in der Mitte der Adhäsionsregion, bei $\theta = 8\pi$ wird die gemittelte Spannung über die gesamte Fläche betrachtet.

stationäre Gleichgewicht der Kopplung betrachtet. Die Zeitkonstante τ_J^{PK} der Spannungsantwort auf einen Strompuls im Punktkontaktmodell ist $\frac{C_J \cdot r_J}{\theta}$. Die vollständige zeitliche Lösung des Flächenkontaktmodells wird beschrieben durch eine Entwicklung der speziellen stationären Lösung in Besselfunktionen mit den Zeitkonstanten $\tau_n = \frac{c_J r_J A_{JM}}{x_n^2 \pi}$. Dabei sind x_n die n-ten Nullstellen der Besselfunktion. Bestimmt wird die Dynamik der Transiente durch die langsamste Zeitkonstante mit $x_1 = 2.40483$. Ein Angleichen der Zeitkonstante

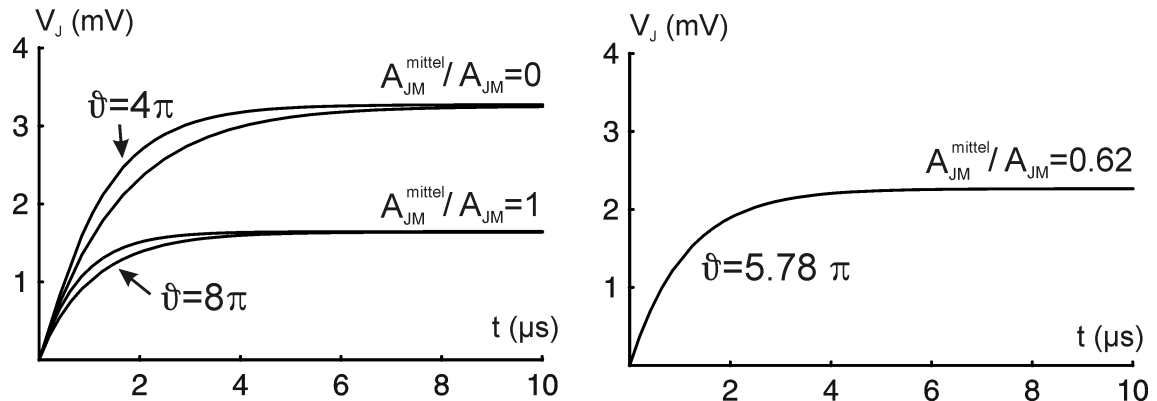


Abbildung 2.5: Vergleich der Zeitkonstanten des gemittelten Flächenkontaktmodells mit dem Punktkontaktmodell. Die Anstiegszeit der Spannung ist bei Mittelung über die Gesamtfläche im Punktkontaktmodell ($\theta = 8\pi$) zu langsam. Bei einer Mittelung über 62 % der Gesamtfläche ist die Beschreibung des gemittelten Flächenkontaktmodells und des Punktkontaktmodells ($\theta = 5.78\pi$) in Amplitude und Anstiegszeit identisch.

des Punktkontaktmodells an die Lösung des Flächenkontaktmodells führt damit auf einen θ -Faktor von 5.783 und auf ein gemitteltes Flächenverhältnis von 0.62. Mit diesen Parametern ist die integrierte zeitliche Lösung des Flächenkontaktmodells gleich der Lösung im Punktkontaktmodell (Abb. 2.5).

Die Beziehung zwischen spezifischem Widerstand des Elektrolyten zu der Leitfähigkeit des Spaltes lautet demnach [Bra00]:

$$G_J = 5.78\pi \cdot \frac{d_J}{\rho_E} \quad (2.9)$$

2.1. FLÄCHEN- UND PUNKTKONTAKTMODELL DER ELEKTRISCHEN KOPPLUNG

DC-Kopplung $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$

Entsprechend der Kirchhoffschen Regel gilt:

$$G_J V_J = G_{JM} (V_M - V_{M0}^{K+} - V_J) \quad (2.10)$$

Somit ist das Verhältnis $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$ aufgetragen gegen $R_J = \frac{1}{G_J}$:

$$\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}} = \frac{G_{JM} R_J}{1 + G_{JM} R_J} \quad (2.11)$$

Abbildung 2.7 a) zeigt das Verhältnis $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$ gegen den Spaltwiderstand R_J .

Die Kopplungsstärke ist für $G_{JM} R_J \ll 1$ proportional zum Spaltwiderstand R_J sowie zu G_{JM} .

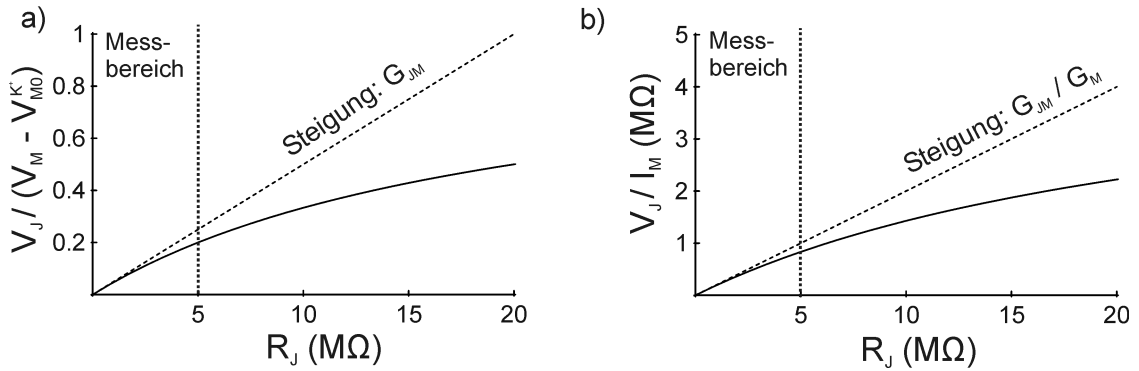


Abbildung 2.7: a) $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$ und b) $\frac{V_J}{I_M}$ gegen R_J im Gleichspannungsfall bei einer Leitfähigkeit der freien Membran von 200 nS und der Adhäsionsmembran von 50 nS, der Messbereich liegt im Bereich zwischen 0 und 5 MΩ.

Die Veränderung des Spaltwiderstandes hat demnach zwei Aspekte: So wird einerseits durch das Erhöhen des Spaltwiderstandes die Kopplungsstärke der Zelle an den Transistor erhöht und andererseits eine Messmethode für die Bestimmung der Leitfähigkeit der adhärenierten Membran gewonnen.

Bei grossen Spaltwiderständen nähert sich das Verhältnis $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$ asymptotisch dem Wert 1, die Kopplungsstärke kann also nicht beliebig vergrössert werden.

DC-Kopplung $\frac{V_J}{I_M}$

Der Strom I_M ist gegeben durch die Summe der Ströme durch die freie sowie durch die adhärenierte Membran:

$$I_M = G_{FM} (V_M - V_{M0}^{K+}) + G_{JM} (V_M - V_{M0}^{K+} - V_J) \quad (2.12)$$

Das Verhältnis $\frac{V_J}{I_M}$ ist nach Umformung von Gleichung 2.12:

$$\frac{V_J}{I_M} = \frac{1}{G_M \frac{V_M - V_{M0}^{K+}}{V_J} - G_{JM}} \quad (2.13)$$

Einsetzen der Kopplung $\frac{V_J}{V_M - V_{M0}^{K+}}$ (Gleichung 2.11) in Gleichung 2.13 liefert:

$$\frac{V_J}{I_M} = \frac{\frac{G_{JM}}{G_M} \cdot R_J}{1 + \frac{G_{JM} G_{FM}}{G_M} \cdot R_J} \quad (2.14)$$

Die Lösung von Gleichung 2.14 ist in Abbildung 2.7 b) veranschaulicht. Bei kleinen Spaltwiderständen kann aus der Steigung der Gleichung 2.14 das Verhältnis der Leitfähigkeiten $\frac{G_{JM}}{G_M}$ bestimmt werden. Bei grossen Spaltwiderständen nähert sich das Verhältnis $\frac{V_J}{I_M}$ dem festen Wert $\frac{1}{G_{FM}}$.

AC-Kopplung $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$

Entsprechend der Kirchhoffschen Regel gilt für die fouriertransformierten Spannungen:

$$(i\omega C_{OX} + G_J)\tilde{V}_J = i\omega C_{JM}(\tilde{V}_M - \tilde{V}_J) \quad (2.15)$$

Damit ist die Kopplung $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$:

$$\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M} = \frac{i\omega C_{JM} R_J}{1 + i\omega(C_{JM} + C_{OX})R_J} \quad (2.16)$$

Der Betrag ist:

$$\left| \frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M} \right| = \frac{\omega C_{JM} R_J}{\sqrt{1 + (\omega(C_{JM} + C_{OX})R_J)^2}} \quad (2.17)$$

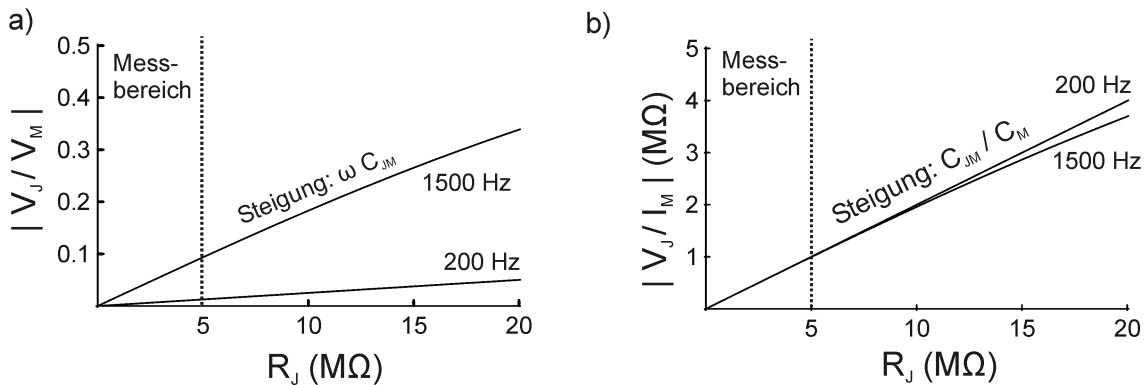


Abbildung 2.8: Betrag von a) $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$ und b) $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M}$ gegen R_J im Wechselspannungsfall bei 2 verschiedenen Frequenzen $f = 200$ Hz und 1500 Hz. Die Modellparameter sind $C_{FM} = 8$ pF und $C_{JM} = 2$ pF und $C_{OX} = 0.6$ pF.

In Abbildung 2.8 a) ist der Betrag des Verhältnisses $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$ gegen R_J aufgetragen.

Experimentell wird der Frequenzbereich (200 Hz bis 1500 Hz) so gewählt, daß einerseits die Kopplungsstärke über dem Transistorrauschen liegt und andererseits die Kopplung

noch linear mit dem Spaltwiderstand steigt. In diesem Messbereich gilt der vereinfachte Zusammenhang:

$$\left| \frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M} \right| = \omega C_{JM} R_J = A_{JM} \cdot \omega c_M R_J \quad (2.18)$$

Durch die Bestimmung der Kapazität C_{JM} der adhärenierten Zellmembran bei geschlossenen Kanälen kann über die spezifische Membrankapazität gleich $c_M = 1 \frac{\mu F}{cm^2}$ die entsprechende Fläche bestimmt werden. Aus der Steigung der $|\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}|$ -Kopplung kann also die Adhäsionsfläche A_{JM} der Zelle bestimmt werden.

AC-Kopplung $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M}$

Für das Verhältnis $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M}$ gilt nach Ersetzen der Leitfähigkeiten in Formel 2.13 durch die kapazitiven Leitfähigkeiten der allgemeine Zusammenhang zu der Kopplung $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$:

$$\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M} = \frac{1}{i\omega C_M \frac{\tilde{V}_M}{\tilde{V}_J} - i\omega C_{JM}} \quad (2.19)$$

Nach Einsetzen der AC-Kopplung $\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{V}_M}$ in Gleichung 2.19 und mit $\beta = \frac{C_{JM} + C_{OX}}{C_{JM}}$ ergibt sich:

$$\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M} = \frac{\frac{C_{JM}}{C_M} \cdot R_J}{1 + i\omega(\beta - \frac{C_{JM}}{C_M}) \cdot C_{JM} \cdot R_J} \quad (2.20)$$

Der Betrag ist:

$$\left| \frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M} \right| = \frac{\frac{C_{JM}}{C_M} \cdot R_J}{\sqrt{1 + (\omega(\beta - \frac{C_{JM}}{C_M}) \cdot C_{JM} \cdot R_J)^2}} \quad (2.21)$$

Abbildung 2.8 b) zeigt den Betrag der Kopplung $|\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M}|$ in Abhängigkeit des Spaltwiderstandes R_J . Bei kleinen R_J kann Formel 2.21 vereinfacht werden:

$$\left| \frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M} \right| = \frac{C_{JM}}{C_M} \cdot R_J = \frac{A_{JM}}{A_M} \cdot R_J \quad (2.22)$$

Somit kann durch die $|\frac{\tilde{V}_J}{\tilde{I}_M}|$ -Kopplung das Flächenverhältnis zwischen Adhäsionsmembran und der gesamten Membran $\frac{A_{JM}}{A_M}$ bestimmt werden.

2.2 Flächen- und Punktkontaktmodell der Elektrodifffusion

Analog zum rein elektrischen Fall soll nun das Modell der Elektrodifffusion durch ein Flächenkontaktmodell modelliert und ein Übergang zu einem 1-Kompartiment-Modell des Spaltes (Punktkontaktmodell) durchgeführt werden. Der Unterschied zur elektrischen Kopplung liegt in der Berücksichtigung von Konzentrationsänderungen der einzelnen Ionsorten im Spalt hervorgerufen durch den Einstrom von Kaliumionen.

2.2.1 Flächenkontaktmodell

Im Flächenkontaktmodell der Elektrodifffusion [Qui89, Str01] führen Spannungs- sowie Konzentrationsgradienten im zweidimensionalen Spalt zu einer Drift sowie zu einer Diffusion der einzelnen Ionensorten. Analog zum Flächenkontaktmodell der elektrischen Kopplung führt eine lokale Ladungstrennung im Spalt zu einer Umladung der Zellmembrankapazität und der Oxidkapazität und damit zu einer Änderung der Spannung V_J im Spalt.

Differentialgleichungssystem

Das Flächenkontaktmodell wird durch das folgende Differentialgleichungssystem 2.23 beschrieben, dabei beschreibt der obere Teil die zeitliche Spannungsänderung im Spalt aufgrund der Änderung der Nettoladung $d_J \cdot e_0 \sum_i \frac{\partial}{\partial t} z_i c_J^i$ verursacht durch diffusiv bedingte Konzentrationsänderungen. Diese werden durch die untere Gleichung mittels eines Elektrodifffusionsmodells beschrieben.

$$\begin{aligned}
 (c_{OX} + c_M) \frac{\partial}{\partial t} V_J - c_M \frac{\partial}{\partial t} V_M &= d_J \cdot e_0 \sum_i \frac{\partial}{\partial t} z_i c_J^i & (2.23) \\
 \frac{\partial}{\partial t} c_J^i - \underbrace{D_J^i \nabla^2 c_J^i}_{\text{Diffusionsterm}} - \underbrace{\frac{z_i e_0 D_J^i}{k_B T} \nabla(c_J^i \nabla V_J)}_{\text{Driftterm}} &= \underbrace{\delta_{iK^+} \frac{g_{jm}^i}{d_J z_i e_0} \cdot [(V_M - V_J) - (V_{M0}^i - V_{J0}^i)]}_{\text{Quellterm, } \delta_{iK^+}=0 \text{ für } i \neq K^+}
 \end{aligned}$$

$V_{J0}^i = -\frac{k_B T}{z_i e_0} \ln \frac{c_J^i}{c_E^i}$ ist eine neue Grösse, sie entspricht dem Nernstpotential zwischen Spaltkonzentration c_J^i und der Badkonzentration c_E^i (vorerst nur für $i = K^+$, da für andere Ionensorten der Quellterm gleich Null ist). Im elektrischen Modell blieb die Konzentration im Spalt gleich der Badkonzentration, dieses Potential spielte also keine Rolle. Die neue chemische Triebkraft ($V_{M0}^{K^+} - V_{J0}^{K^+}$) ist nun das Nernstpotential zwischen Zellinnerem und Spalt und ist abhängig von der lokalen Kaliumkonzentration im Spalt.

Lösung des Elektrodifffusionsmodells

Das Gleichungssystem soll nun für einen 50 ms-Spannungspuls auf 50 mV für eine kreisrunde Adhäsionsfläche von $200 \mu m^2$ gelöst werden. Die spezifische Membranleitfähigkeit beträgt $20 \frac{mS}{cm^2}$. Die numerische Lösung für eine elektrophysiologische Badlösung ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

Bei Öffnen der Kanäle zum Zeitpunkt $t=0$ ms führt der Einstrom der Kaliumionen in den Spalt zu einer Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Mitte der Adhäsionsfläche von 5 mM auf 27 mM. Das Konzentrationsprofil ist aufgrund der Dominanz des Diffusionsterms im stationären Fall parabelförmig. Die Spannung im Spalt V_J zeigt bei Öffnen der Kanäle einen schnellen Spannungssprung und nimmt das gleiche Profil wie bei der Lösung des elektrischen Flächenkontaktmodells an. Durch die starke Veränderung der Kaliumkonzentrationen ist der dominierende Anteil der Diffusionsstrom. Dies führt zu einem Einbruch

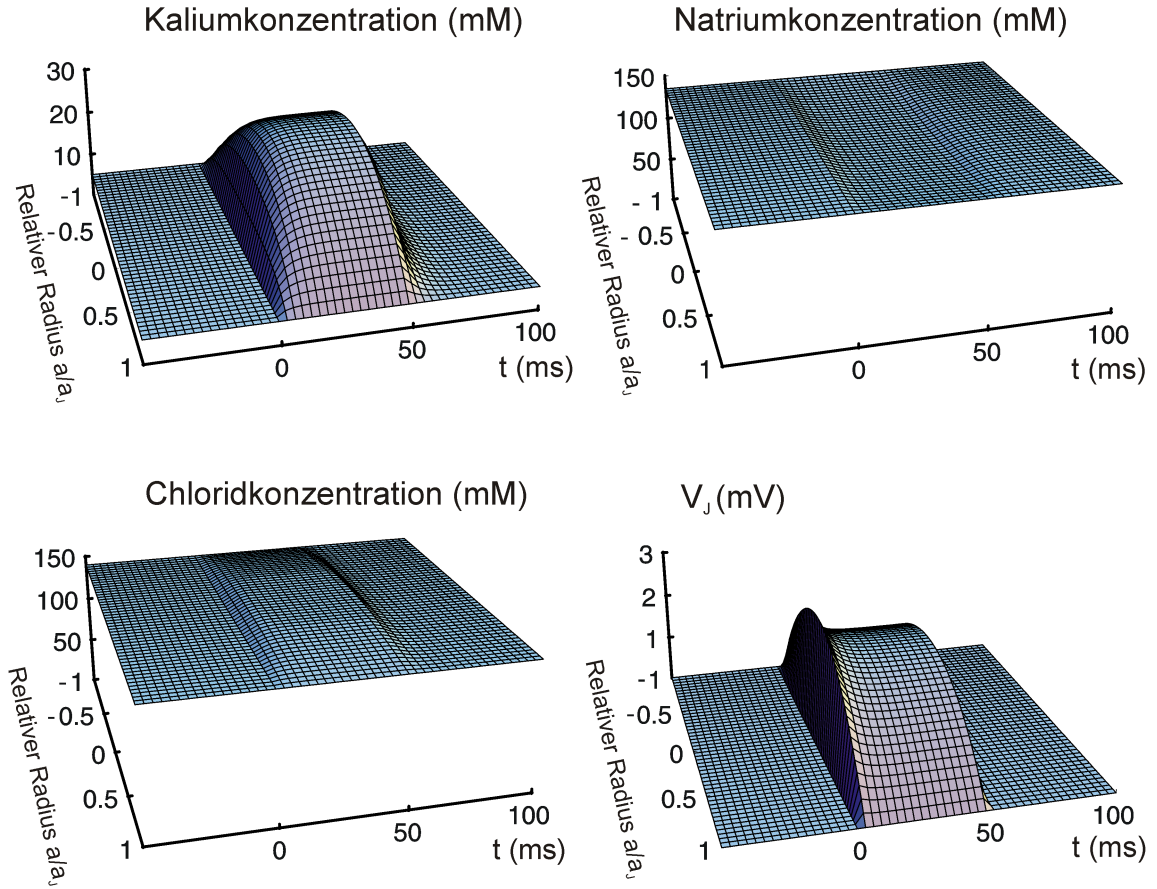


Abbildung 2.9: Numerische Lösung des Flächenkontaktmodells der Elektrodifffusion bei einem 50 ms-Spannungspuls auf +50 mV für eine kreisrunde Adhäsionsfläche von $200 \mu\text{m}^2$. Das Öffnen und Schliessen der Kaliumkanäle ist instantan, die maximale spezifische Membranleitfähigkeit g_{jm} ist $20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$. Die Salzkonzentration im Bad beträgt 135 mM Natriumchlorid und 5 mM Kaliumchlorid. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration ist gleich 140 mM. Als Anfangsbedingung wurden die Spaltkonzentrationen gleich den Badkonzentrationen und die Spannung im Spalt $V_J = 0$ gesetzt. Die Randbedingung für den Maximalradius (entspricht einem relativen Radius a/a_J von -1, +1) ist gleich den Anfangsbedingungen.

der Spannung in der Mitte der Zelle von 3 auf 2 mV. Durch die Spannung werden Natriumionen aus dem Spalt verdrängt und Chloridionen im Spalt angereichert, die relative Änderung ist jedoch gering. Bei Schliessen der Kanäle relaxieren die Ionenkonzentrationen wieder auf ihren Anfangswert.

Flächenkontaktmodell mit lokalen Nernstpotentialen V_{J0}^i

Der untere Teil des Gleichungssystems 2.23 kann unter Verwendung der konstanten Badkonzentrationen c_E^i folgendermaßen umgeschrieben werden:

$$\frac{\partial}{\partial t} c_J^i - \frac{z_i e_0 D_J^i}{k_B T} \nabla(c_J^i \nabla(V_J + \frac{k_B T}{z_i e_0} \ln \frac{c_J^i}{c_E^i})) = \delta_{iK+} \frac{g_{jm}^i}{d_J z_i e_0} \cdot [(V_M - V_J) - (V_{M0}^i - V_{J0}^i)] \quad (2.24)$$

Das Nernstpotential V_{J0}^i zwischen Spaltkonzentration und der Badkonzentration wurde bis jetzt nur für Kaliumionen verwendet, soll nun aber auf alle Ionensorten erweitert werden. Analog zu Gleichung 2.2 soll nun der Flächenwiderstand für jede Ionensorte definiert werden:

$$\frac{1}{r_J^i} = \frac{z_i^2 e_0^2 D_J^i d_J c_J^i}{k_B T} \quad (2.25)$$

Mit diesen Definitionen und durch Multiplikation mit $e_0 d_J z_i$ von Gleichung 2.24 lässt sich Gleichung 2.23 schreiben als:

$$(c_{OX} + c_M) \frac{\partial}{\partial t} V_J - c_M \frac{\partial}{\partial t} V_M = d_J \cdot e_0 \sum_i \frac{\partial}{\partial t} z_i c_J^i \quad (2.26)$$

$$e_0 z_i d_J \frac{\partial}{\partial t} c_J^i - \nabla \frac{1}{r_J^i} \nabla (V_J - V_{J0}^i) = \delta_{iK} + g_{jm}^i \cdot [(V_M - V_J) - (V_{M0}^i - V_{J0}^i)]$$

Wenn die Konzentrationsänderungen gering sind, können die Nernstpotentiale V_{J0}^i vernachlässigt werden und Gleichung 2.26 geht über in die Kabelgleichung 2.3. Im stationären Fall ($\frac{\partial}{\partial t} c_J^i = 0$) nehmen die Nernstpotentiale V_{J0}^i der passiven Ionen (alle Ionen ausser Kalium) das gleiche Profil an wie die Spannung V_J , dies erklärt die niedrige relative Konzentrationsänderung von Natrium- und Chloridionen.

2.2.2 Punktkontaktmodell der Elektrodifusion

Analog zum elektrischen Modell sollen nun die lokalen Konzentrationsänderungen sowie das Spannungsprofil gemittelt werden und durch integrale Grössen ersetzt werden. Dabei sind nun die Konzentrationen c_J^i die mittleren Konzentrationen im Spalt, V_J entspricht der mittleren Spannung analog dem Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung.

Hierzu wird Gleichung 2.26 mit der Adhäsionsfläche A_{JM} erweitert und die Ersetzungsregel $-\nabla \left[\frac{A_{JM}}{r_J^i} \nabla (V_J - V_{J0}^i) \right] \Rightarrow G_J^i (V_J - V_{J0}^i)$ angewendet:

$$(C_{OX} + C_{JM}) \frac{\partial}{\partial t} V_J - C_{JM} \frac{\partial}{\partial t} V_M = A_{JM} d_J \cdot e_0 \sum_i \frac{\partial}{\partial t} z_i c_J^i \quad (2.27)$$

$$e_0 z_i A_{JM} d_J \frac{\partial}{\partial t} c_J^i + G_J^i (V_J - V_{J0}^i) = \delta_{iK} + G_{jm}^i \cdot [(V_M - V_J) - (V_{M0}^i - V_{J0}^i)] \quad (2.28)$$

Analog zum elektrischen Modell wird eine Beziehung zwischen r_J^i und G_J^i über einen konstanten Faktor θ hergestellt. Damit im Grenzfall kleiner Konzentrationsänderungen der Übergang zum elektrischen Modell möglich ist und damit das Punktkontaktmodell der Elektrodifusion die gleichen elektrischen Eigenschaften besitzt, soll θ gleich wie im elektrischen Modell sein:

$$G_J^i = 5.78 \pi \frac{1}{r_J^i} \quad (2.29)$$

Die Grundgleichung der Elektrodifusion 2.23 ist ein nichtlineares Differentialgleichungssystem, das nicht mehr analytisch gelöst werden kann. Daher sind die Grössen V_J und c_J^i im Punktkontaktmodell auch nur eine Näherung für die integrierten Werte im Flächenkontaktmodell. Um diese Näherung zu überprüfen, sollen nun zwei Grenzfälle der Kopplung untersucht und die Lösung des Punkt- mit der des Flächenkontaktmodells verglichen werden.

Vergleich von Punkt- und Flächenkontaktmodell in elektrophysiologischer und Niedrigsalz-Lösung

Nun soll die Kopplung in elektrophysiologischer Lösung (Natriumchlorid 135 mM, Kaliumchlorid 5 mM) und die Kopplung in einer Niedrigsalzlösung ((Natriumchlorid 10 mM, Kaliumchlorid 5 mM) betrachtet werden. Den Vergleich von Punktkontaktmodell (PKM) und Flächenkontaktmodell (FKM) zeigt Abbildung 2.10. Es wurden die gleichen Modellparameter wie bei der numerischen Lösung in Abbildung 2.9 verwendet.

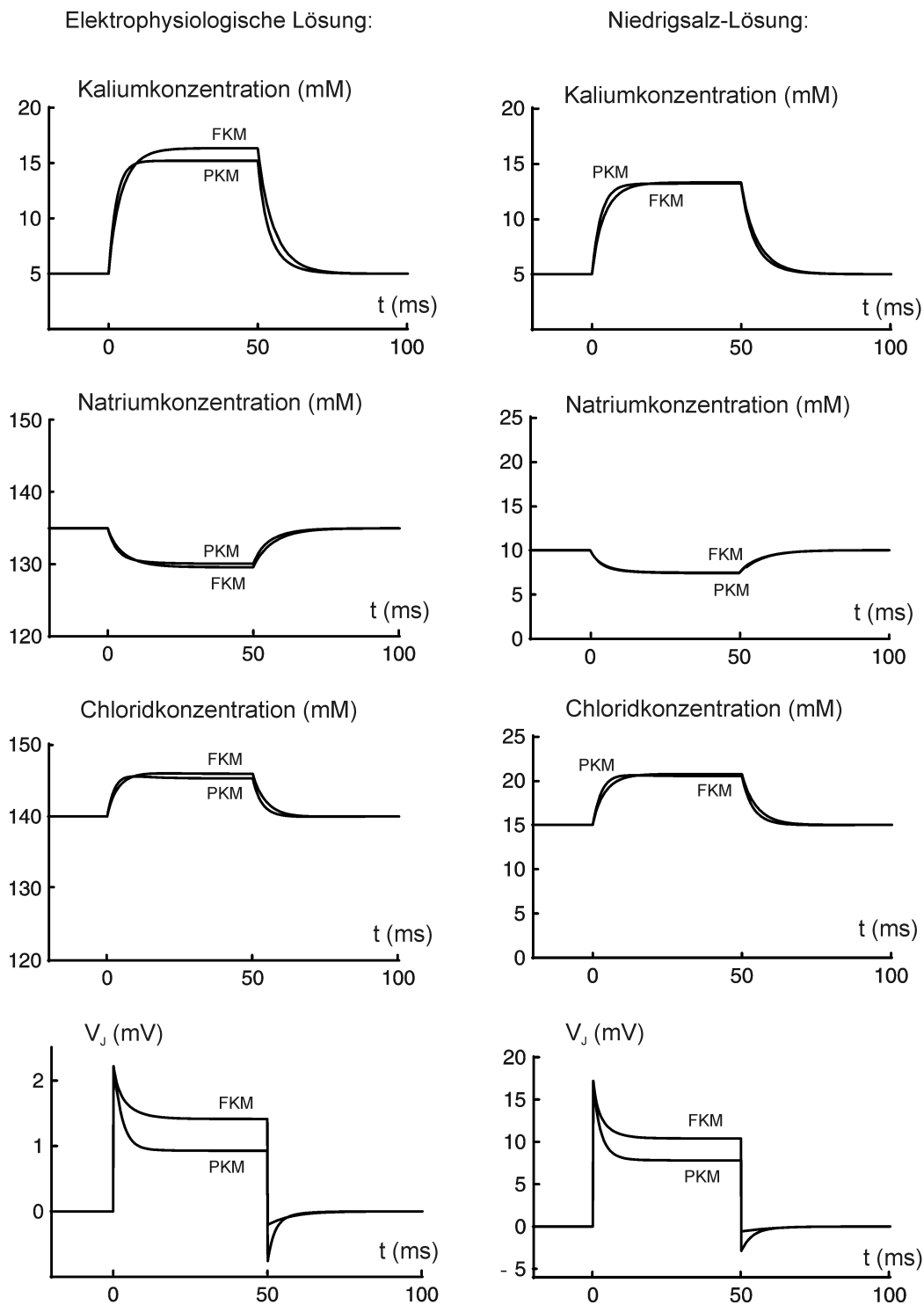


Abbildung 2.10: Numerische Lösung des gemittelten Flächenkontaktmodells (FKM) und des Punktkontaktmodells (PKM) der Elektrodifusion im Vergleich bei zwei verschiedenen Extrazellulärlösungen. Die Salzkonzentration im Bad beträgt 135 mM bzw. 10 mM Natriumchlorid und 5 mM Kaliumchlorid. Der Spannungspuls beträgt 50 mV und hat eine Dauer von 50 ms. Die Adhäsionsfläche ist gleich $200 \mu\text{m}^2$. Das Öffnen und Schliessen der Kaliumkanäle ist instantan, g_{jm} ist $20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$ im Flächenkontaktmodell, G_{jm} ist 40 nS im Punktkontaktmodell.

Um das PKM mit dem FKM in Bezug auf die Konzentrationen zu vergleichen, wurde das gesamte Konzentrationsprofil im FKM über die Gesamtfläche gemittelt. Die Lösung des PKM ist hier eine gute Näherung für die gemittelten Konzentrationen im Spalt. Durch den Zustrom von Kaliumionen in den Spalt ist die Änderung der Kaliumkonzentration wesentlich stärker als die Konzentrationsänderung der restlichen Ionensorten (Natrium und Chlorid). Die gemittelte Kaliumkonzentration im FKM steigt von anfangs 5 mM auf einen stationären Endwert von etwa 16 mM in elektrophysiologischer Lösung und auf 13 mM in der Niedrigsalzlösung. Dieser Unterschied kann durch den verschiedenen hohen Spannungsabfall im Spalt und durch eine damit verbundene verschiedenen starke Triebkraft erklärt werden. Der Vergleich mit der Lösung im Punktkontaktmodell zeigt nur geringe Abweichungen in der Niedrigsalzlösung, in elektrophysiologischer Lösung liegt der Unterschied der stationären Konzentrationswerte bei 8 %. Die Anstiegszeit der Kaliumkonzentration ist im Punktkontaktmodell etwas kürzer (2.6 ms) als im integrierten Flächenkontaktmodell (4.2 ms).

Die passiven Ionensorten Natrium und Chlorid werden in beiden Lösungen gut durch das Punktkontaktmodell beschrieben. Die Natriumkonzentration in elektrophysiologischer Lösung sinkt aufgrund der positiven Spannung im Spalt im PKM sowie im gemittelten FKM nach einer Anfangskonzentration von 135 mM auf 130 mM, der stationäre Endwert in der Niedrigsalzlösung (Anfangskonzentration ist gleich 10 mM) ist 7.3 mM. Die Chloridionen werden aufgrund der positiven Spannung im Spalt angereichert, hier beträgt der Endwert 145 mM (elektrophysiologische Lösung) bzw. 20 mM (Niedrigsalzlösung).

Das instantane Öffnen der Kaliumkanäle führt zu einem schnellen Spannungssprung der Spaltspannung V_J , die Zeitkonstante des Anstiegs ist sowohl im PKM als auch im integrierten FKM ($A_{JM}^{mittel}/A_{JM} = 0.62$) gleich $\frac{C_{OX}+C_{JM}}{\sum_i G_i} = 1.1\mu s$. Der Wert der Spannungsspitze im Spalt ist durch die Definition des Punktkontaktmodells gleich der Spannung im gemittelten Flächenkontaktmodell. Dieser Wert ist aufgrund der unterschiedlichen Leitfähigkeiten des Elektrolyten unterschiedlich und beträgt etwa 2 mV (elektrophysiologische Lösung) und 17 mV (Niedrigsalzlösung). In beiden Modellen und Extrazellulärlösungen bricht die Spannung im Spalt aufgrund der Konzentrationsänderungen ein, dieser Effekt ist jedoch im PKM stärker als im gemittelten FKM. Ein instantanes Schliessen der Kanäle führt bei elektrophysiologischer Lösung zu einem ähnlich hohen Spannungssprung wie beim Öffnen, da sich die Leitfähigkeit des Spaltes aufgrund der hohen Natriumchloridkonzentration nur wenig ändert. Die Spaltspannung V_J wird damit negativ und relaxiert wieder durch das Angleichen der Ionenkonzentrationen auf Null. Bei der Niedrigsalzlösung führt der Einstrom der Kaliumionen in den Spalt zu einer Erhöhung der Gesamtleitfähigkeit, der Spannungssprung beim Schliessen der Kanäle ist also kleiner als beim Öffnen. Das zu starke Unterschwingen der Spaltspannung in beiden Lösungen ist ein Artefakt des PKM.

Der Vergleich zwischen Punkt- und Flächenkontaktmodell zeigt, daß trotz Abweichungen das Punktkontaktmodell die wesentliche Physik der Elektrodifffusion im Spalt beschreibt und auch eine quantitative Abschätzung der Konzentrationsänderungen sowie der Spannung im Spalt zulässt. Aus diesem Grund soll im folgenden das Punktkontaktmodell für die Beschreibung der Experimente verwendet werden.

Abschätzung des Wertes der Spannungsspitze und der stationären Spannung im Spalt mittels Punktkontaktmodell

Während des Spannungssprungs bleiben die Konzentrationen im Spalt unverändert, daher kann der Endwert über die elektrische Kopplung bestimmt werden:

$$V_J^{peak} = \frac{G_{JM}^{K^+}}{\sum_i G_J^i + G_{JM}^{K^+}} (V_M - V_{M0}^{K^+}) \quad (2.30)$$

Die Spannung fällt nach Erreichen von V_J^{peak} auf einen erniedrigten Wert ab. Aus Gleichung 2.28 erhält man folgende Beziehung für den stationären ($\frac{\partial}{\partial t} c_J^{K^+} = 0$) Wert der Spaltspannung V_J^{stat} :

$$V_J^{stat} = \frac{G_{JM}^{K^+}}{G_J^{K^+} + G_{JM}^{K^+}} (V_M - V_{M0}^{K^+}) + V_{J0}^{K^+} \quad (2.31)$$

Im stationären Fall trägt also nur noch die Diffusion der Kaliumionen zum Strom bei. Alle anderen Ionen befinden sich im Gleichgewicht, wie man aus Gleichung 2.28 sehen kann:

$$V_J^{stat} = V_{J0}^i \quad i \neq K^+ \quad (2.32)$$

Nachdem die Partial-Leitfähigkeit der Kaliumionen $G_J^{K^+}$ im stationären Fall trotz der erhöhten Konzentration ($c^{K^+} \approx 15mM$) nach wie vor einen Faktor 15 kleiner ist als die Gesamtleitfähigkeit $\sum_i G_J^i$, scheint es zunächst erstaunlich, daß die Spannung V_J^{stat} im stationären Fall kleiner ist als direkt nach dem elektrischen Anstieg.

Für ein verschwindendes Nernstpotential $V_{J0}^{K^+}$ sollte V_J^{stat} vielmehr einen Faktor 15 grösser als V_J^{peak} sein. Für den Sonderfall der natriumfreien Lösung kann der Spannungseinbruch verdeutlicht werden. Da die Ladungstrennung im Spalt sehr klein ist, gilt im stationären Fall $V_{J0}^{K^+} \approx -V_{J0}^{Cl^-} = -V_J^{stat}$. Aus Gleichung 2.30 und 2.31 lässt sich damit der Quotient V_J^{stat}/V_J^{peak} für kleine Membranleitfähigkeiten $G_{JM}^{K^+}$ bestimmen:

$$\frac{V_J^{stat}}{V_J^{peak}} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{G_J^{Cl^-}}{G_J^{K^+}} \right) e^{\frac{-e_0 V_J^{stat}}{k_B T}} \approx e^{\frac{-e_0 V_J^{stat}}{k_B T}} < 1 \quad (2.33)$$

Im Falle von natriumfreier Lösung kann also der Spannungseinbruch abgeschätzt werden.

2.2.3 Erweiterungen zum Punktkontaktmodell der Elektrodifffusion

In diesem Abschnitt sollen noch einige Erweiterungen des Punktkontaktmodells der Elektrodifffusion eingeführt werden, die für das Verständnis der physikalischen Vorgänge nicht nötig waren, für die Modellierung der experimentellen Ergebnisse jedoch wichtig sind.

Puffergleichgewicht und Elektrodifffusion der Protonen im Spalt

Um das Überleben der Zellen während der Experimente zu gewährleisten, wurde der pH des Badelektrolyten auf 7.4 eingestellt. Hierfür wurde der Lösung der Puffer HEPES [Goo66] zugesetzt, dessen pK -Wert 7.55 nahe an diesem biologisch günstigen pH-Wert liegt. Das Verhältnis des protonierten zu dem deprotonierten Puffer stellt sich entsprechend der Gleichgewichtskonstante des Puffers ein:

$$K_B = \frac{[H^+][B^-]}{[BH]} = \frac{[H^+][B^-]}{[B_{total}] - [B^-]} \quad (2.34)$$

Bei Zugabe des Puffers in die Lösung stellt sich zunächst ein niedrigerer pH-Wert ein als gewünscht. Dieser wird dann durch Titrierung mit einer starken Lauge auf den pH-Wert von 7.4 gebracht. Der anfängliche pH-Wert $pH_{initial}$ hängt von der Konzentration des gelösten Puffers ab:

$$pH_{initial} = \frac{pK_B - \text{Log}[B_{total}]}{2} \quad (2.35)$$

Bei einer Pufferkonzentration $HEPES_{total}$ von 5 mM und einem pK_B -Wert von 7.55 ist $pH_{initial}$ gleich 4.93, die Konzentration von BH_0 ist gleich 4.98 mM und B_0^- ist gleich 0.02 mM. Bei der Titrierung mit der starken Lauge NaOH erniedrigt sich die Protonenkonzentration entsprechend der zugegebenen Menge an Lauge:

$$pH_{end} = pK_B - \text{Log} \frac{[BH_0 - OH^-]}{B_0^- + OH^-} \quad (2.36)$$

Mit dem eingestellten pH-Wert von 7.4 ist demnach die zugegebene Menge an OH^- gleich Na^+ gleich 2.06 mM. Diese zusätzliche Natriumkonzentration muß besonders bei Messungen in Niedrigsalz-Lösungen beachtet werden. Die Konzentration des protonierten Puffers B ist gleich 2.92 mM, die des deprotonierten Puffers B^- ist gleich 2.08 mM.

Nun soll zum Elektrodifffusionsmodell noch die Diffusion der Pufferionen und der Protonen hinzugefügt werden. Die Diffusion des Puffers und der Protonen ist allerdings nicht unabhängig, sondern alle drei Teile müssen im Gleichgewicht entsprechend Gleichung 2.34 stehen:

$$\begin{aligned} \tau_B \frac{\partial}{\partial t} c_J^B &= -c_J^B - \frac{c_J^{B^-} \cdot c_J^{H^+}}{K_B} \\ \tau_B \frac{\partial}{\partial t} c_J^{B^-} &= -c_J^B - \frac{c_J^{B^-} \cdot c_J^{H^+}}{K_B} \\ \tau_B \frac{\partial}{\partial t} c_J^{H^+} &= c_J^B - \frac{c_J^{B^-} \cdot c_J^{H^+}}{K_B} \end{aligned} \quad (2.37)$$

Die Zeitkonstante der Gleichgewichtsreaktion τ_B ist wesentlich schneller als die Zeitkonstante der Diffusion im Spalt. Für den Puffer HEPES/HEPES⁻ wurde die Diffusionskonstante in freier Lösung ($D_{HEPES} = 0.79 \frac{\mu m^2}{ms}$) gewählt [Kov00], die Diffusionskonstante der Protonen ist $D_{H^+} = 9.1 \frac{\mu m^2}{ms}$ [Van01]. Die zeitliche Änderung der Protonenkonzentration c_{H^+} sowie des protonierten/deprotonierten Puffers c_B und c_{B^-} werden als Quellterme in Gleichung 2.28 hinzugefügt.

Bei dem ungeladenen protonierten Puffer wird nur die reine Diffusion in Betracht gezogen. Die Konzentrationsänderungen Δc_B verursacht durch die Puffergleichgewichtsreaktion sind jedoch so gering, daß die Konzentration des protonierten Puffers im Spalt konstant bleibt.

Die Dynamik der Diffusion der Protonen H^+ und des deprotonierten Puffers B^- wird durch die langsamere Elektrodifusion des Reaktionspartners B^- bestimmt. Für das stationäre Gleichgewicht gilt der gleiche Zusammenhang zwischen Spaltspannung und Nernstpotential im Spalt wie bei den restlichen passiven Ionensorten:

$$V_J^{stat} = V_{J0}^i \quad i \in \{H^+, B^-\} \quad (2.38)$$

Die Konzentrationsänderungen sind daher in elektrophysiologischer Lösung sehr gering ($V_J^{stat} \approx 1mV$), die deprotonierte Pufferkonzentration ändert sich um 4 %, der pH-Wert geht von pH 7.40 auf 7.42. In hochohmigen Nidrigsalzlösungen ($V_J^{stat} \approx 10mV$) spielt die Änderung des pH eine grössere Rolle, hier ändert sich der pH von 7.40 auf 7.55.

Elektrodifusion der zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium

Um die Elektrodifusion im Spalt einfach zu halten, wurden bis jetzt die zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium vernachlässigt. Die elektrophysiologische Lösung, die für die Experimente verwendet wurde, enthält jedoch zusätzlich zu 135 mM Natriumchlorid und 5 mM Kaliumchlorid noch 1.8 mM Calciumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid. Beide Ionensorten besitzen die gleiche Diffusionskonstante ($D_{Ca^{++}} = 0.79 \frac{\mu m^2}{ms}$, $D_{Mg^{++}} = 0.79 \frac{\mu m^2}{ms}$) und die gleichen Bindungseigenschaften an die Siliziumoxid-Oberfläche (siehe dazu Abschnitt 3.2.2). Daher wird in dieser Arbeit Magnesiumchlorid und Calciumchlorid als 2.8 mM Calciumchlorid zusammengefasst. Die Elektrodifusion der zweiwertigen Ionen ($z_i = +2$) ist in Gleichung 2.28 bereits enthalten. Gleichung 2.38 gilt im stationären Fall auch für die zweiwertigen Ionen, wegen der Zweiwertigkeit ist die Konzentrationsänderung aber einen Faktor $\ln 2$ höher.

2.3 Spannungs- und Ionensensitivität des Feldeffekttransistors

In diesem Abschnitt soll nun der Einfluss der Spannung V_J und der Konzentrationsänderungen Δc_j^i im Spalt auf die Änderung des Source-Drain-Stroms im FET untersucht werden.

2.3. SPANNUNGS- UND IONENSENSITIVITÄT DES FELDEFFEKTTRANSISTORS

2.3.1 Verschiebung der Gate- und Thresholdspannung des Feldeffekttransistors

Der Source-Drain-Strom I_D eines Feldeffekttransistors mit einem offen liegenden Gate-Oxid in einem Elektrolyten hängt von der Spannungsdifferenz V_{ESi} zwischen dem Elektrolyten und dem Siliziumsubstrat und der Source-Drain-Spannung V_{SD} ab. V_{ESi} entspricht dabei der Gatespannung eines konventionellen MOSFETs. Im linearen Bereich wird der Strom $I_D(V_{ESi})$ durch eine lineare Beziehung entsprechend Formel 2.39 beschrieben, dabei ist $\partial I_D / \partial V_{ESi}$ die Steilheit (Transconductance) bei einer konstanten Source-Drain-Spannung und V_{ESi}^0 entspricht der Threshold-Spannung des FET:

$$I_D = \left. \frac{\partial I_D}{\partial V_{ESi}} \right|_{V_{SD}} \cdot (V_{ESi} - V_{ESi}^0) \quad (2.39)$$

Liegt eine Zelle auf der Gateregion eines Transistors (Abbildung 2.11 a)), so kann diese den Source-Drain-Strom I_D bei einer konstanten Spannung V_{ESi} modulieren. Die isolierende Doppel-Lipidschicht der adhärenierten Zellmembran ist von der Gate-Oxidoberfläche durch eine Elektrolytschicht mit einer Dicke von 50-100 nm getrennt [Fro03]. Dieser Abstand ist wesentlich größer als die Dicke der elektrischen Doppelschicht über dem Oxid mit etwa 1 nm bei elektrophysiologischer Lösung.

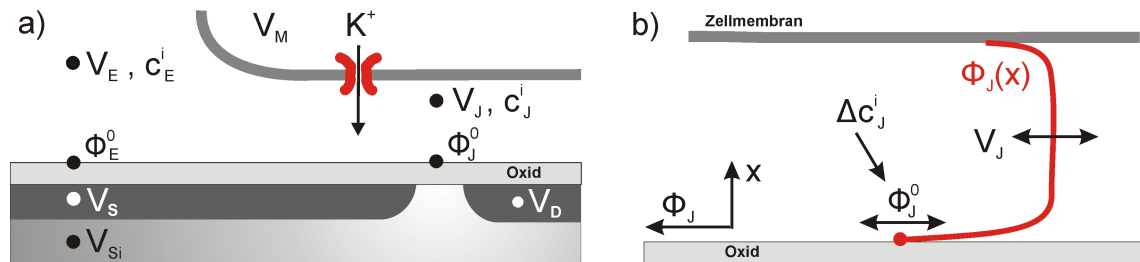


Abbildung 2.11: Spannungs- und Ionensensitivität des Feldeffekttransistors. Während die Spannungsdifferenz $V_J - V_E$ die Gatespannung verändert, führen Konzentrationsänderungen Δc_J^i im Spalt zu einer Veränderung des Oberflächenpotentials $\Delta \Phi_J^0$ an der Oxidoberfläche der Gateregion verbunden mit einer Verschiebung der Threshold-Spannung.

Der Einstrom der Kaliumionen in den Spalt hat zwei Effekte, die in Abbildung 2.11 b) illustriert sind:

- Die Umladung der Kapazität des Spaltes (bestehend aus Membran- und Oxidkapazität) führt zu einer Änderung der lokalen Spannung V_J im Elektrolyten über dem Gate im Vergleich zu der Spannung V_E im Badelektrolyten.
- Die Ionen wechselwirken mit den dissoziierten Silanolgruppen an der Oxidoberfläche des Gates und verändern den Potentialabfall Φ_J^0 in der elektrischen Doppelschicht gegenüber dem ursprünglichen Wert Φ_E^0 . Die Oberflächenpotentialänderung entspricht einer Änderung der lokalen Threshold-Spannung des Transistors.

Die gesamte Änderung der Spannung ΔV_{FET} zwischen Gate-Oxid und Badelektrolyt ist eine Superposition der Potentialänderung $\Phi_J^0 - \Phi_E^0$ in der elektrischen Doppelschicht

und einer Spannungsdifferenz $V_J - V_E$ zwischen dem Spalt und dem Bad entsprechend Formel 2.40.

$$\Delta V_{FET} = (V_J - V_E) + (\Phi_J^0 - \Phi_E^0) \quad (2.40)$$

Die Spannungsänderung ΔV_{FET} verändert den Source-Drain-Strom bei einer konstant gehaltenen Badspannung V_{ESi} entsprechend Formel 2.41.

$$I_D = \left. \frac{\partial I_D}{\partial V_{ESi}} \right|_{V_{SD}} \cdot (V_{ESi} - V_{ESi}^0 + \Delta V_{FET}) \quad (2.41)$$

Für die Auswertung der Zell-Transistor-Experimente wird entsprechend Formel 2.41 die Änderung des Source-Drain-Stroms ΔI_D durch die effektive Spannungsänderung ΔV_{FET} bei konstanter Vorspannung des Gates V_{ESi} und bekannter Steilheit der Transistorkennlinie an dem eingestellten Arbeitspunkt ausgedrückt.

Im folgenden soll näher auf die Änderung des Oberflächenpotentials durch Konzentrationsänderungen des Elektrolyten sowie durch die Absättigung der Oberflächenladung durch spezifische Bindung der einzelnen Ionensorten an die Oxidoberfläche eingegangen werden. Im letzten Teil wird die Gültigkeit der Superposition von Spannung und Oberflächenpotentialänderung, die in Formel 2.40 verwendet wurde, theoretisch begründet.

2.3.2 Oberflächenpotential an der Oxidoberfläche, Graham-Gleichung

Die Oberfläche des Siliziumoxids ist aufgrund dissoziierter Silanolgruppen negativ geladen. Es bildet sich im Elektrolyten ein Potentialverlauf $\Phi_E(x)$ senkrecht zur Oberfläche verbunden mit einer Raumladungszone, der sogenannten diffusiven Doppelschicht, aus [Ver48]. Die Konzentrationen der einwertigen Anionen c_- und der ein- bzw. zweiwertigen Kationen c_+ und c_{++} folgen einer Boltzmannverteilung und führen zu einer Nettoladungsdichte ρ :

$$\rho = e_0(c_+ e^{-\frac{e\Phi_E}{kT}} - c_- e^{\frac{e\Phi_E}{kT}} + c_{++} 2e^{-2\frac{e\Phi_E}{kT}}) \quad (2.42)$$

Der Potentialverlauf im Elektrolyten ($\epsilon_r = 80$) wird mit Hilfe der Poissongleichung gelöst:

$$\frac{d^2 \Phi_E}{dx^2} = -\frac{\rho(\Phi_E)}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (2.43)$$

Als 1. Randbedingung für das Potential Φ_E im Unendlichen gilt:

$$\Phi_E \Big|_{x=\infty} = \frac{d\Phi_E}{dx} \Big|_{x=\infty} = 0 \quad (2.44)$$

An der Oberfläche wird ein elektrisches Feld durch die negativ geladene Oberfläche mit der Oberflächenladung σ erzeugt, dies liefert die 2. Randbedingung:

$$\frac{d\Phi_E}{dx} \Big|_{x=0} = -\frac{\sigma}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (2.45)$$

Hiermit ist das Differentialgleichungssystem vollständig bestimmt und kann gelöst werden. Dies ist in Abbildung 2.12 für eine einwertige Salzkonzentration von 10 mM und eine Oberflächenladung von $1.5 e_0/nm^2$ gezeigt. Die Konzentration der Kationen an der

2.3. SPANNUNGS- UND IONENSENSITIVITÄT DES FELDEFFEKTTRANSISTORS

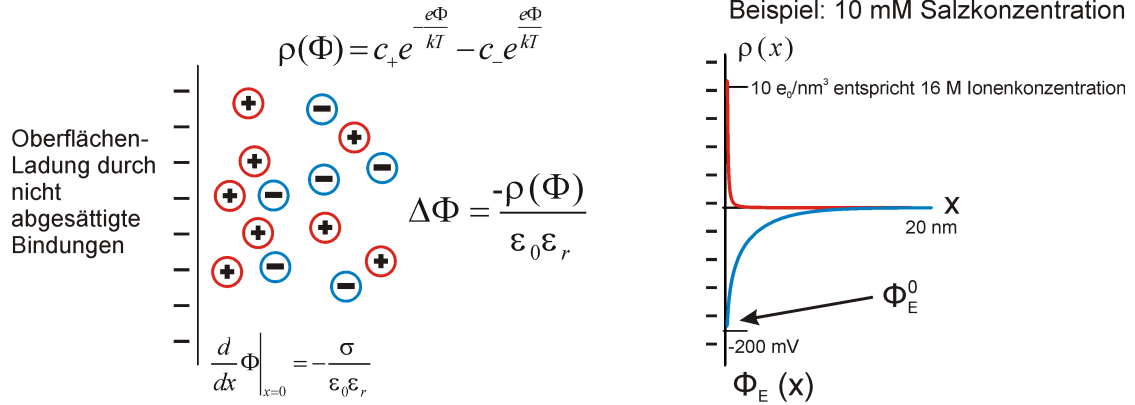


Abbildung 2.12: Modellierung des Potentials $\Phi_E(x)$ bei einer festen Oberflächenladung σ . Die Oberfläche ist aufgrund dissoziierter Silanolgruppen negativ geladen. Hierdurch bildet sich ein elektrisches Feld an der Oberfläche, das durch den umgebenden Elektrolyten abgeschirmt wird, es bildet sich die sogenannte diffusive Doppelschicht. Rechts ist ein Beispiel für den räumlichen Verlauf der Nettoladungsdichte $\rho(x)$ sowie des Potentials $\Phi_E(x)$ für eine einwertige Salzkonzentration von 10 mM und eine Oberflächenladung von $1.5 \text{ e}_0/\text{nm}^2$ gezeigt.

Oberfläche erzeugt durch das Oberflächenpotential Φ_E^0 ist sehr hoch und entspricht etwa 16 M. Das Oberflächenpotential Φ_E^0 beträgt etwa -200 mV.

Im folgenden soll eine analytische Beziehung zwischen der Salzkonzentration und dem Verlauf des Potentials $\Phi_E(x)$ hergestellt werden. Dazu werden beide Seiten von Gleichung 2.43 mit $2 \cdot \frac{d\Phi_E}{dx}$ erweitert:

$$2 \cdot \frac{d^2\Phi_E}{dx^2} \frac{d\Phi_E}{dx} = \frac{-2\rho(\Phi_E)}{\epsilon_0\epsilon_r} \frac{d\Phi_E}{dx} \quad (2.46)$$

Die Integration beider Seiten liefert:

$$\left(\frac{d\Phi_E}{dx} \right)^2 \Big|_{x=\infty} - \left(\frac{d\Phi_E}{dx} \right)^2 = \int_{\Phi_E(x)}^{\Phi_E(\infty)} \frac{-2\rho(\Phi_E)}{\epsilon_0\epsilon_r} d\Phi_E \quad (2.47)$$

Mit Gleichung 2.42 und der 1. Randbedingung in 2.44 erhält man bis auf Quadratur $\Phi_E(x)$:

$$\frac{d\Phi_E(x)}{dx} = \sqrt{\frac{2kT}{\epsilon_0\epsilon_r} (c_+(e^{-\frac{e\Phi_E(x)}{kT}} - 1) + c_-(e^{\frac{e\Phi_E(x)}{kT}} - 1) + c_{++}(e^{-2\frac{e\Phi_E(x)}{kT}} - 1))} \quad (2.48)$$

Nun soll eine Beziehung zwischen Oberflächenpotential Φ_E^0 und der Oberflächenladung σ sowie der Konzentration der Ionen bestimmt werden. Das Gleichsetzen von Gleichung 2.48 und der 2. Randbedingung in Gleichung 2.45 an der Oberfläche ($x=0$) führt zu einer impliziten Gleichung, der sogenannten Graham-Gleichung:

$$\frac{\sigma^2}{2\epsilon_0\epsilon_r kT} = c_+(e^{-\frac{e\Phi_E^0}{kT}} - 1) + c_-(e^{\frac{e\Phi_E^0}{kT}} - 1) + c_{++}(e^{-2\frac{e\Phi_E^0}{kT}} - 1) \quad (2.49)$$

Diese implizite Gleichung kann durch Substitution der Exponentialterme in eine kubische Gleichung umgeformt und analytisch nach $\Phi_E^0(\sigma, c_i)$ aufgelöst werden.

Wird nur eine Ionensorte (ein- oder zweiwertig) betrachtet und sind die Konzentrationen wesentlich kleiner als die Konzentration der Nettoladungsdichte an der Oberfläche $\frac{\rho_0}{z_i e_0}$ (≈ 16 M), gilt folgende Näherung unter Vernachlässigung der Anionen:

$$\frac{\rho_0}{z_i e_0} \approx \frac{\sigma^2}{2\epsilon\epsilon_r kT} \quad (2.50)$$

Bei diesen Konzentrationen vereinfacht sich die Graham-Gleichung 2.49 zu:

$$\Phi_E^0 = \frac{k_B T}{z_i e_0} \ln \left(\frac{e_0 z_i c^i}{\rho_0} \right) \quad (2.51)$$

Das Oberflächenpotential kann also als ein Nernstpotential zwischen Badkonzentration und Oberflächenkonzentration verstanden werden. Die Steigung von Φ_E^0 pro Dekade an Konzentrationsänderung ist somit:

$$\frac{d}{d(\log c_+)} \Phi_E^0 = (\ln 10) \cdot \frac{k_B T}{e_0} \quad \frac{d}{d(\log c_{++})} \Phi_E^0 = (\ln 10) \cdot \frac{k_B T}{2e_0} \quad (2.52)$$

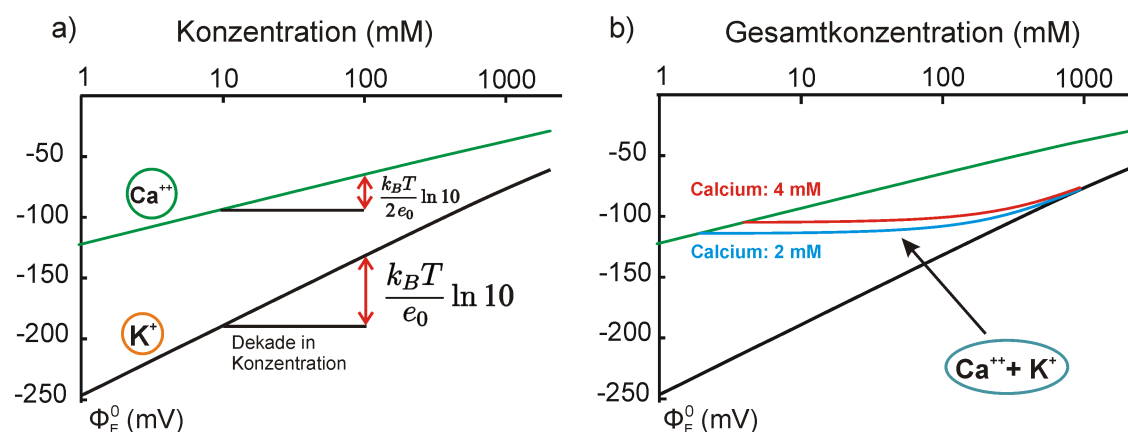


Abbildung 2.13: Lösung der Graham-Gleichung für ein- und zweiwertige Ionenkonzentrationen. a) Oberflächenpotentialverlauf für nicht gemischte Lösung. Die Steigung von Φ_E^0 pro Dekade an Konzentrationsänderung ist unabhängig von σ und gleich $(\ln 10) \frac{k_B T}{e_0}$ für einwertige Ionen und $(\ln 10) \frac{k_B T}{2e_0}$ für zweiwertige Ionen. b) Im Falle von Mischlösungen zeigt sich die starke Dominanz der zweiwertigen Ionen, geringe Konzentrationsänderungen dieser Ionensorte führen aufgrund der starken Abschirmung zu starken Veränderungen und unterdrücken den Einfluß der einwertigen Ionen.

In Abbildung 2.13 a) ist der Verlauf des Oberflächenpotentials Φ_E^0 für nicht gemischte einwertige und zweiwertige Ionen dargestellt. Betrachtet man jedoch das Verhalten bei Mischlösungen, so sieht man die starke Dominanz der zweiwertigen Ionen bei der Einstellung eines Oberflächenpotentials (Abbildung 2.13 b)). Dargestellt ist der Verlauf von Φ_E^0 bei einer festen Konzentration eines zweiwertigen Ions (z.B. Calcium) unter Veränderung der Konzentration eines einwertigen Ions (z.B. Kalium) von 0 mM bis 1000 mM. Geringe Konzentrationsänderungen von Kalium verändern das Oberflächenpotential kaum, während die Veränderung von Calcium von 4 mM auf 2 mM Φ_E^0 stark beeinflusst. In Anwesenheit von zweiwertigen Ionen in der Elektrolytlösung wird der Wert des Oberflächenpotential aufgrund der hohen Abschirmfähigkeit durch diese Ionen bestimmt.

2.3.3 Bindung der Ionen an die Oberfläche: stationäres Gleichgewicht

Die Graham-Gleichung 2.49 liefert den Wert des Oberflächenpotentials in Abhängigkeit von den Ionenkonzentrationen und von der Oberflächenladung. Bis jetzt wurde die Oberflächenladung als konstant angesehen. Diese Annahme entspricht jedoch nicht den beobachteten Messungen an Oxidoberflächen. Daher wurde die Graham-Gleichung um die Bindung von Ionen an die Oberfläche erweitert [Ste24]. Der einfachste Ansatz für die Bindung wird durch eine Langmuir-Isotherme mit den Bindungskonstanten K_S^i an der Oberfläche beschrieben.

$$\sigma = \frac{\sigma_0}{1 + \sum^i \frac{c_S^i}{K_S^i}} \quad (2.53)$$

Die Konzentration der bindenden Ionen an der Oberfläche c_S^i ist aufgrund des Oberflächenpotentials entsprechend ihrer Ladung entweder an- oder abgereichert:

$$c_S^i = c_0^i \cdot e^{-\frac{z_i e_0 \Phi_E^0}{kT}} \quad (2.54)$$

Da die Oberfläche negativ geladen ist, können Bindungsprozesse von Anionen an die Oberfläche vernachlässigt werden. In Abbildung 2.14 ist der starke Einfluß einer Änderung der Oberflächenladung σ demonstriert. Im Gouy-Chapman-Modell führt eine kleine relative Konzentrationsänderung (wie dies auch bei den durchgeführten Messungen für die Konzentrationen im Spalt der Fall ist) zu geringen Änderungen des Oberflächenpotentials. Im Falle einer Absättigung der Oberflächenladung durch Bindungsvorgänge an die Oberfläche hat dies jedoch drastische Auswirkung auf das Oberflächenpotential.

Die Bindungsvorgänge von Protonen an die Oberfläche sind aus der Literatur gut be-

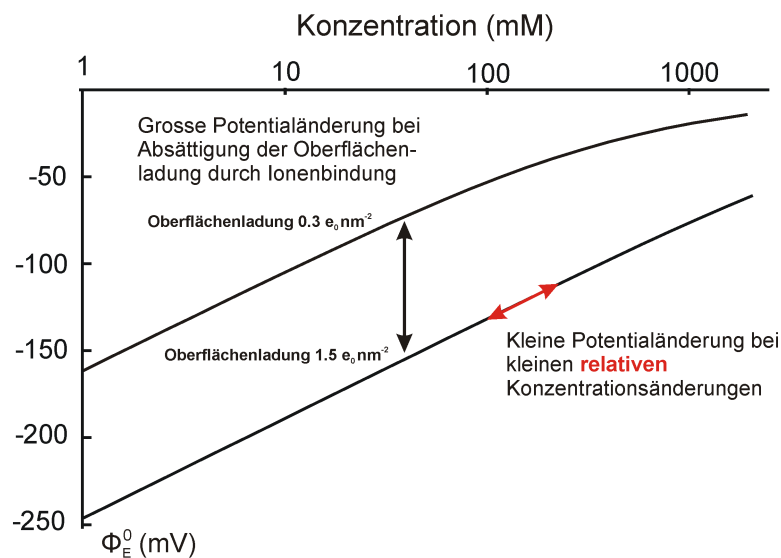


Abbildung 2.14: Einfluß der Oberflächenladung auf das Oberflächenpotential.

kannt und bilden die Grundlage für die Site-Binding-Theorie [Yat74, Dav78, Fun86]. Auf dieser Basis werden Feldeffekttransistoren als sogenannte Ionensensitive FETs (ISFETs)

als pH-Sensoren verwendet. Die starke Antwort auf Änderungen der geringen Protonenkonzentration (pH 7 entspricht $0.1 \mu\text{M}$) in Anwesenheit einer Salzkonzentration im mM-Bereich kann aufgrund der Gouy-Chapman-Theorie nicht erklärt werden. In Abbildung 2.15 a) wird daher die Graham-Gleichung um die Absättigung der Oberflächenladung durch die Protonen erweitert. Der Wert für die Bindungskonstante der Protonen an die Oberfläche $K_S^{H^+}$ wurde in Anlehnung an die Literatur [Sca92] gleich $1.58 \mu\text{M}$ ($\text{p}K^{H^+}=5.8$) gesetzt. Der pH ist gleich 7.4. Bei einer Konzentration der einwertigen Ionen von 1 mM ist 85 % der Oberfläche von Protonen besetzt, die freie Oberflächenladung ist damit nur noch $0.22 e_0/\text{nm}^2$. Bei den zweiwertigen Ionen ist aufgrund der hohen Abschirmung die Bindung der Protonen an die Oberfläche nicht so stark ausgeprägt, hier sind bei 1 mM Konzentration nur 58 % der Oberfläche abgesättigt. Mit Zunahme der Ionenkonzentrationen nimmt die Bindung durch die Reduzierung der Oberflächenkonzentration der Protonen ab, der Verlauf des Oberflächenpotentials geht hier in die Gouy-Chapman-Theorie ohne Protonenbindung über.

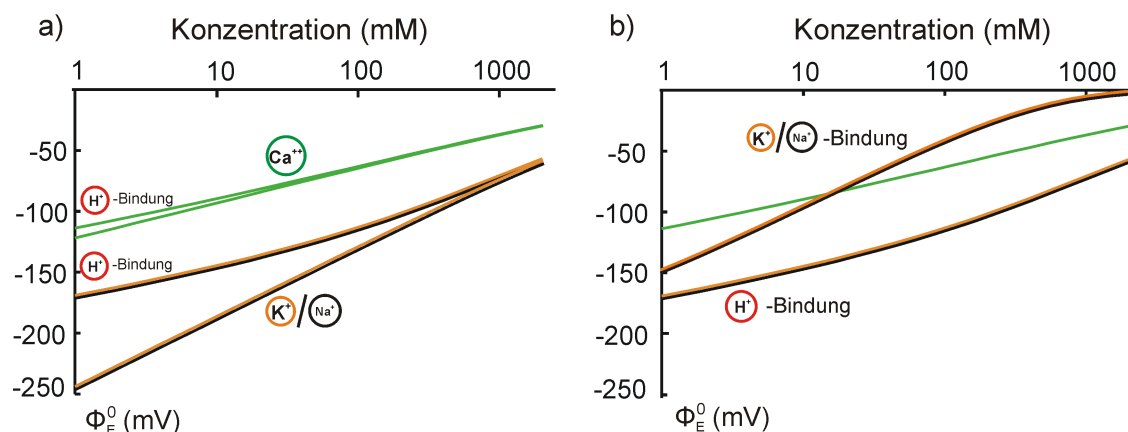


Abbildung 2.15: a) Die Protonierung der Oberfläche ($\text{p}K^{H^+}=5.8$) führt zu einer Absenkung des Oberflächenpotentials im Vergleich zur Gouy-Chapman-Theorie.

b) Wird zusätzlich zu den Protonen eine Bindung von Natrium und Kalium an die Oberfläche ($\text{p}K_S=1$) eingeführt, für die zweiwertigen Ionen jedoch vernachlässigt, so führt dies zu einem Kreuzen des Oberflächenpotentialverlaufs bei gleicher Erhöhung der Konzentration der einwertigen und zweiwertigen Ionen.

In Abbildung 2.15 b) ist zusätzlich eine Bindung der einwertigen Ionen (Kalium und Natrium) an die Oberfläche berücksichtigt. Als Beispiel sei hier für beide Ionen eine Bindungskonstante K_S von 100 mM ($\text{p}K_S=1$) angenommen [Bou83]. Für den Fall, daß die zweiwertigen Ionen keine Bindung an die Oberfläche zeigen, schneiden sich beide Verläufe des Oberflächenpotentials.

Oberflächenpotential bei Mischung einzelner Konzentrationen

Als letzter Fall soll angenommen werden, daß Kalium stärker an die Oberfläche bindet als Natrium. Der $\text{p}K$ von Kalium sei für diesen Fall gleich 2, der von Natrium 0.5. Für Calcium sei angenommen, daß es keine Bindung an die Oberfläche zeigt. Dies ist in Abbildung 2.16 a) dargestellt. Durch die unterschiedlichen Bindungskonstanten ist der Verlauf des Oberflächenpotentials bei einer Variation der Natriumkonzentration gegen den Verlauf

2.3. SPANNUNGS- UND IONENSENSITIVITÄT DES FELDEFFEKTTRANSISTORS

bei Kalium verschoben. Die Steigung ist in beiden Fällen vergleichbar. Die unterschiedlichen Bindungskonstanten machen sich jedoch bei der Betrachtung von Mischlösungen drastisch bemerkbar.

In Abb. 2.16 b) wurde die Natriumkonzentration bei 10 mM sowie bei 100 mM konstant gehalten und die Kaliumkonzentration von 0-1000 mM variiert, dabei spiegelt der Fall von 100 mM Natrium am besten die Situation in elektrophysiologischer Lösung wieder. Das Oberflächenpotential bildet bei einer Erhöhung der Kaliumkonzentration von dem jeweiligen Startpunkt des Oberflächenpotentials von Natrium ohne Kalium einen Ast aus, der schliesslich in den Verlauf des Oberflächenpotentials ohne Natrium übergeht. Es zeigt sich ganz deutlich, dass eine kleine Konzentrationsänderung von Kalium das Oberflächenpotential stark verändert, ein Effekt, der mit einer blossen Veränderung der Gesamtkonzentration nicht erklärt werden kann.

In Abb. 2.16 c) ist nun eine Erhöhung der Natriumkonzentration bei konstanter Kaliumkonzentration gezeigt. Durch die Anwesenheit von 10 mM Kaliumchlorid wird der Einfluß der Natriumkonzentrationsänderung auf das Oberflächenpotential abgeschwächt.

Abb. 2.16 d) zeigt nun eine Erhöhung der Kaliumkonzentration bei konstanten Calciumkonzentrationen von 2 mM und 4 mM. Während in Abb. 2.13 b) eine Konzentrationsänderung von Kalium bei kleinen Konzentrationen fast keinen Einfluß auf das Oberflächenpotential hatte, ist nun durch die Bindung von Kalium an die Oberfläche der Effekt wesentlich stärker.

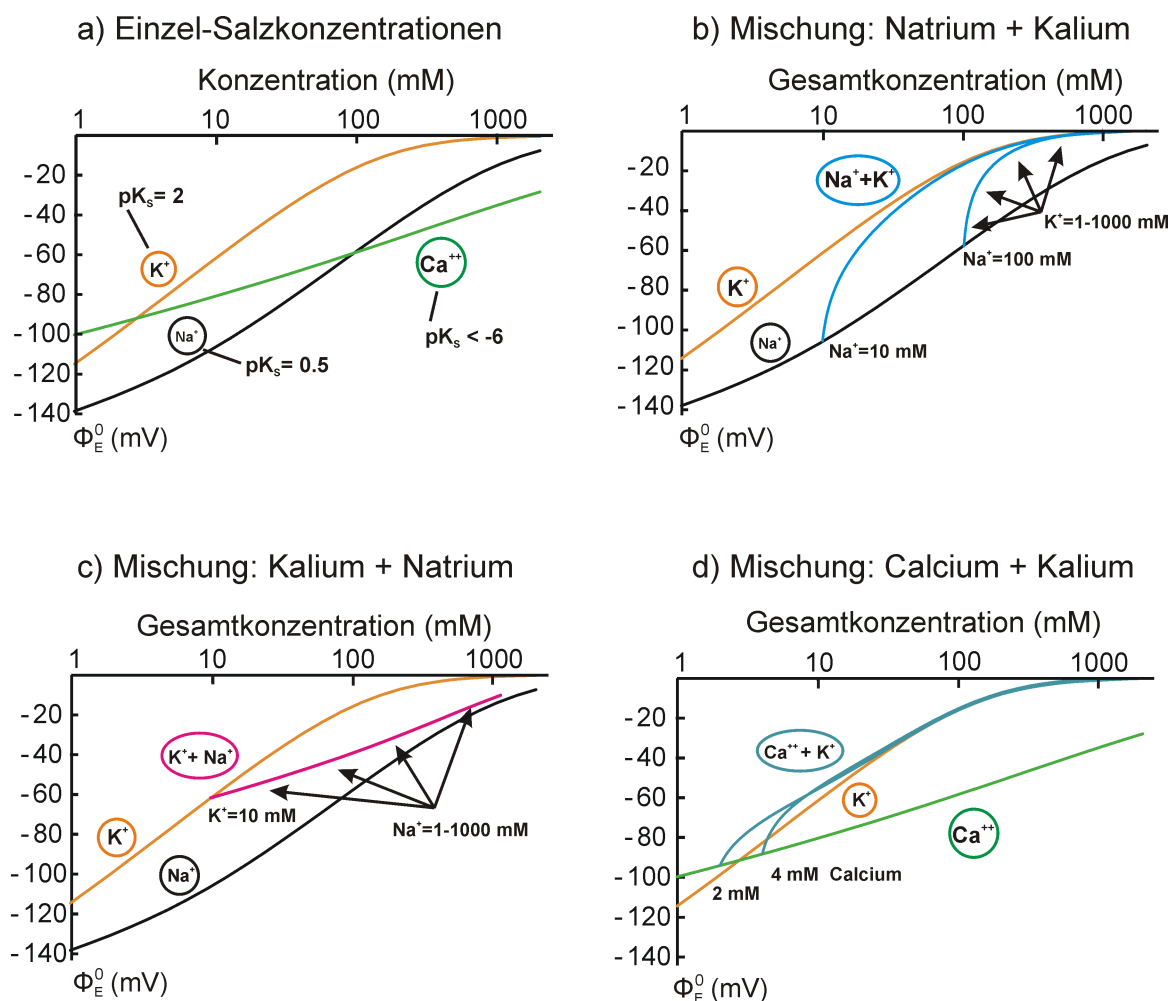


Abbildung 2.16:

a) Verlauf des Oberflächenpotentials bei Variation der Konzentration der einzelnen Ionensorten. Das Bindungsverhalten der Ionen ist nun unterschiedlich gewählt, so ist die Kaliumbindung an die Oberfläche ($pK_s=2$) bevorzugt gegenüber der Natriumbindung ($pK_s=0.5$), Calcium bindet nicht an die Oberfläche.

b) Um die Auswirkung unterschiedlicher Bindungskonstanten von Kalium und Natrium zu verdeutlichen, wurden die Potentialänderungen bei Variation der Kaliumkonzentration ausgehend von fixen Natriumkonzentrationen (10 mM und 100 mM) mit eingezeichnet. Als Konzentration wurde hier die Gesamtkonzentration von Natrium und Kalium gewählt. Es bilden sich Äste, die bei Erhöhung der Kaliumkonzentration in die Einzelsalz-Kurve der Kaliumionen übergehen. Trotz kleiner relativer Konzentrationsänderungen hat nun eine Erhöhung der Kaliumkonzentration starke Auswirkung auf das Oberflächenpotential.

c) Die Anwesenheit von Kalium (10 mM) erniedrigt die Steigung des Oberflächenpotentials bei Erhöhung der Natriumkonzentration.

d) Während im Bild der Gouy-Chapman-Theorie die Anwesenheit von zweiwertigen Ionen die Oberflächenpotentialänderung bei Konzentrationsänderungen einwertiger Ionen unterdrückt (Abb. 2.13, b), tritt dieser Effekt durch die Bindung von Kalium an die Oberfläche nicht mehr auf.

2.3.4 Bindung der Ionen an die Oberfläche: Dynamik

Bis jetzt wurde die Absättigung der Oberflächenladung nur im stationären Gleichgewicht durch Gleichung 2.53 beschrieben. Um die Dynamik der Bindung an die Oberfläche zu beschreiben, werden Ratengleichungen mit den Ratenkonstanten k_d für die Desorption sowie mit k_a für die Adsorption an die Oberfläche angesetzt. Dies ergibt folgendes Differentialgleichungssystem für die von den einzelnen Ionensorten besetzten Bindungsplätze $n_i = \frac{\sigma_i}{\sigma_0}$:

$$\frac{d}{dt}n_i = -k_d^i \cdot n_i + k_a^i \cdot c_S^i \cdot \left(1 - \sum_i n_i\right) \quad (2.55)$$

Dieses System ist ein lineares, gekoppeltes Differentialgleichungssystem, das im folgenden genauer charakterisiert werden soll.

Spezialfall: nur eine Ionensorte bindet

Falls nur eine Ionensorte an die Oberfläche bindet, vereinfacht sich Gleichung 2.55 zu:

$$\frac{d}{dt}n(t) = -(k_d + k_a \cdot c_S(t)) \cdot n(t) + k_a \cdot c_S(t) \quad (2.56)$$

Die allgemeine Lösung lautet mit $A(t) = \int_0^t (k_d + k_a \cdot c_S(\xi)) d\xi$:

$$n(t) = e^{-A(t)} \left(n_0 + \int_0^t e^{A(\xi)} (k_a \cdot c_S(\xi)) d\xi \right) \quad (2.57)$$

Nimmt man an, daß die Bindungsvorgänge wesentlich langsamer ablaufen als die Konzentrationsänderung, so lautet die Lösung der Gleichung 2.57 bei einem Konzentrationsprung von c_S^0 auf c_S^∞ :

$$n(t) = (n_0 - n_\infty) \cdot e^{-\kappa t} + n_\infty \quad (2.58)$$

Dabei sind mit $K_S = \frac{k_d}{k_a}$:

$$n_{0/\infty} = \frac{k_a \cdot c_S^{0/\infty}}{k_d + k_a \cdot c_S^{0/\infty}} = \frac{c_S^{0/\infty} / K_S}{1 + \frac{c_S^{0/\infty}}{K_S}} \quad \kappa = k_d + k_a \cdot c_S^\infty \quad (2.59)$$

Bei schnellen Konzentrationsänderungen ist also die Zeitkonstante $\tau = 1/\kappa$ unter dieser Annahme unabhängig von der Startkonzentration.

Gekoppelte Bindung von Kalium und Natrium

Nun soll die Bindungsdynamik auf zwei Ionensorten erweitert werden, als Beispiel sei hier die Bindung von Natrium und Kalium gewählt. Durch die unterschiedlichen Bindungskonstanten von Natrium und Kalium kommt es bei einer Erhöhung der Kaliumkonzentration zu einer Verdrängung der Natriumionen von der Oberfläche. Dies soll mit dem gekoppelten Differentialgleichungssystem 2.55 für zwei Ionen gelöst werden. Dabei soll wieder das Verhalten bei schnellen Konzentrationsprüngen analysiert werden. Die stationären Lösungen für die besetzten Bindungsplätze n_i^∞ sowie die reziproken Zeitkonstanten κ_i von Natrium und Kalium sind:

$$\kappa_i = k_d^i + k_a^i \cdot c_S^{i,\infty} \quad n_i^\infty = \frac{c_S^{i,\infty} / K_S^i}{1 + \sum_j \frac{c_S^{j,\infty}}{K_S^j}} \quad (2.60)$$

Um das Gleichungssystem 2.55 in diese Grössen umzuschreiben, wird die folgende Identität benutzt:

$$k_a^i \cdot c_S^{i,\infty} = \frac{n_i^\infty}{1 - n_j^\infty} \quad (2.61)$$

Damit lautet das Gleichungssystem für die gekoppelte Bindung von Natrium und Kalium:

$$\begin{pmatrix} \frac{d}{dt} n_K \\ \frac{d}{dt} n_{Na} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\kappa_K & \frac{-\kappa_K \cdot n_K^\infty}{1 - n_{Na}^\infty} \\ \frac{-\kappa_{Na} \cdot n_{Na}^\infty}{1 - n_K^\infty} & -\kappa_{Na} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} n_K \\ n_{Na} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \frac{n_K^\infty}{1 - n_{Na}^\infty} \\ \frac{n_{Na}^\infty}{1 - n_K^\infty} \end{pmatrix} \quad (2.62)$$

Dieses inhomogene lineare Differentialgleichungssystem besitzt die Lösung:

$$n_i = A_i^1 e^{-\kappa_1 t} + A_i^2 e^{-\kappa_2 t} + n_i^\infty \quad (2.63)$$

Die besetzten Zustände n_i^0 im Anfangszustand gehen mit zwei reziproken Zeitkonstanten $\kappa_{1/2}$ zu dem Endzustand n_i^∞ über. Dabei ist $\kappa_{1/2}$:

$$\kappa_{1/2} = \frac{1}{2} (\kappa_K + \kappa_{Na} \pm \kappa_{eff}) \quad (2.64)$$

$$\kappa_{eff} = \sqrt{(\kappa_K + \kappa_{Na})^2 - 4\kappa_K \kappa_{Na} \frac{1 - n_{Na}^\infty - n_K^\infty}{(1 - n_{Na}^\infty)(1 - n_K^\infty)}}$$

Mit den Anfangswerten n_i^0 erhält man die vollständige Lösung mit den konstanten Vorfaktoren A_i^1 und A_i^2 :

$$A_K^{1/2} = \frac{(n_K^0 - n_K^\infty)(1 \mp \frac{\kappa_{Na}}{\kappa_{eff}}) \pm \frac{\kappa_K}{\kappa_{eff}} (n_K^0 - n_K^\infty \cdot \frac{1 + n_{Na}^\infty - 2n_{Na}^0}{1 - n_{Na}^\infty})}{2} \quad (2.65)$$

$$A_{Na}^{1/2} = \frac{(n_{Na}^0 - n_{Na}^\infty)(1 \mp \frac{\kappa_K}{\kappa_{eff}}) \pm \frac{\kappa_{Na}}{\kappa_{eff}} (n_{Na}^0 - n_{Na}^\infty \cdot \frac{1 + n_K^\infty - 2n_K^0}{1 - n_K^\infty})}{2}$$

Beispiel I: Bindung von Kalium in natriumfreier Lösung

Für den einfachen Fall, daß nur Kalium an die Oberfläche bindet, kann die Lösung sofort aus Gleichung 2.58 abgeleitet werden:

$$n_K(t) = (n_K^0 - n_K^\infty) \cdot e^{-\kappa_K t} + n_K^\infty \tag{2.66}$$

Es soll nun ein instantaner Konzentrationsanstieg des Kaliums von 5 mM auf 15 mM untersucht werden. Die Oberflächenkonzentration ist stark abhängig vom Oberflächenpotential (Gleichung 2.54) und muß bei einer numerischen Simulation berücksichtigt werden. Um die Zeitkonstante der Bindung zu bestimmen, ist jedoch nur der Endwert des Oberflächenpotentials (bei $c_K = 15mM$) von Interesse. Dieser liegt bei einer natriumfreien Lösung bei -45 mV. In diesem Fall ist die Oberflächenkonzentration etwa einen Faktor 6 höher als die Konzentration im Elektrolyten. Die Bindungskonstante an der Oberfläche für Kalium K_S^K soll aus dem vorhergehenden Abschnitt ($pK_S^K = 2, K_S^K = 10mM$) übernommen werden. Die reziproke Zeitkonstante der Bindung ist gleich:

$$\kappa_K = k_d^K + k_a^K \cdot c_S^{K,\infty}$$

Dabei ist das Verhältnis k_d^K/k_a^K durch die Bindungskonstante K_S^K bestimmt. Um eine dynamische Beschreibung der Bindung zu erhalten, wird der Wert der Adsorptionskonstante gleich $k_a^K = 3000M^{-1}s^{-1}$ gesetzt (siehe hierzu Abschnitt 6.1.3). Dies liefert die reziproke Zeitkonstante für die Kaliumbindung an die Oberfläche:

$$\kappa_K = 0.3ms^{-1}$$

Die Dynamik der freien, nicht abgesättigten Stellen kann folgendermassen beschrieben werden:

$$n_{frei} = 1 - n_K = (n_{frei}^0 - n_{frei}^\infty) \cdot e^{-\kappa_K t} + n_{frei}^\infty \tag{2.67}$$

$$n_{frei}^0 = \frac{1}{1 + \frac{c_S^{K,0}}{K_S^K}} \quad n_{frei}^\infty = \frac{1}{1 + \frac{c_S^{K,\infty}}{K_S^K}}$$

Für die korrekte Berechnung der Anfangs- und Endzustände müssen die exakten Oberflächenpotentiale mit eingerechnet werden, die Dynamik ist für diesen vereinfachten Fall nur vom Endzustand abhängig.

Beispiel II: gekoppelte Bindung in elektrophysiologischer Lösung

Da die Vorfaktoren der vollständigen Lösung der gekoppelten Bindung in Gleichung 2.65 wenig aussagekräftig sind, sollen die Gleichungen nun für das konkrete Beispiel der elektrophysiologischen Lösung vereinfacht werden. Dazu soll die gekoppelte Bindung bei einer instantanen Konzentrationsänderung von Kalium (von 5 mM auf 15 mM) in Gegenwart von 135 mM Natrium untersucht werden. Als erste Vereinfachung sei angenommen, daß sich die Natriumkonzentration bei Veränderung der Kaliumkonzentration nicht ändert.

Diese Annahme kann anhand des Elektrodifusionsmodells (Gleichung 2.32) gerechtfertigt werden. Bei unveränderter Natriumkonzentration gilt die folgende Identität:

$$(n_{Na}^0 - n_{Na}^\infty \cdot \frac{1 + n_K^\infty - 2n_K^0}{1 - n_K^\infty}) \stackrel{(c_S^{Na,0} = c_S^{Na,\infty})}{=} - (n_{Na}^0 - n_{Na}^\infty) \quad (2.68)$$

Desweiteren soll angenommen werden, daß die Bindungszeitkonstante $1/\kappa_{Na}$ von Natrium wesentlich kleiner ist als die von Kalium. Mit einer gemeinsamen Adsorptionskonstante $k_a^{Na} = k_a^K = 3000M^{-1}s^{-1}$ ist dies erfüllt. Die Bindungskonstanten an der Oberfläche K_S^i sollen aus dem vorhergehenden Abschnitt ($pK_S^K = 2, pK_S^{Na} = 0.5$) übernommen werden. Die Oberflächenkonzentrationen sind bei einem konstantem Oberflächenpotential (eine weitere Vereinfachung) von -35 mV etwa einen Faktor 4 höher als die Konzentrationen im Elektrolyten. Mit diesen Grössen ergeben sich folgende reziproke Zeitkonstanten κ^i :

$$\kappa_{Na} = 2.56ms^{-1} \quad \kappa_K = 0.21ms^{-1} \quad \kappa_{eff} = 2.59ms^{-1} \quad (2.69)$$

$$\kappa_1 = \frac{\kappa_{Na} + \kappa_K + \kappa_{eff}}{2} = 2.68ms^{-1} \quad \kappa_2 = \frac{\kappa_{Na} + \kappa_K - \kappa_{eff}}{2} = 0.09ms^{-1}$$

Mit der Näherung $\frac{\kappa_{Na}}{\kappa_{eff}} \approx 1$ und $\frac{\kappa_K}{\kappa_{eff}} \approx 0$ und der Identität 2.68 werden die Vorfaktoren der ersten Zeitkonstante A_i^1 gleich Null und die Lösung des Problems vereinfacht sich zu:

$$n_i = (n_i^0 - n_i^\infty)e^{-\kappa_2 t} + n_i^\infty \quad (2.70)$$

Die Zeitkonstante der gekoppelten Bindung von Natrium und Kalium liegt also bei 11 ms. Im Gegensatz dazu wären die Bindungsvorgänge von Natrium alleine ($\tau = 400\mu s$) und Kalium alleine ($\tau = 4.7ms$) wesentlich schneller.

Die Dynamik der freien, nichtabgesättigten Stellen kann beschrieben werden:

$$n_{frei} = 1 - \sum_i n_i = (n_{frei}^0 - n_{frei}^\infty)e^{-\kappa_2 t} + n_{frei}^\infty \quad (2.71)$$

$$n_{frei}^0 = \frac{1}{1 + \sum_i \frac{c_S^{i,0}}{K_S^i}} \quad n_{frei}^\infty = \frac{1}{1 + \sum_i \frac{c_S^{i,\infty}}{K_S^i}}$$

Für den speziellen Fall, daß die Natriumkonzentration unverändert bleibt und die Zeitkonstante der Natriumbindung wesentlich kleiner als die der Kaliumbindung ist, kann die Dynamik der freien Bindungsstellen wie in Gleichung 2.67 beschrieben werden, der einzige Unterschied ist die neue, langsamere Zeitkonstante κ_2^{-1} .

Für den adiabatischen Grenzfall, daß die Bindungsvorgänge von Natrium unendlich schnell ablaufen, gilt ebenfalls Gleichung 2.71, lediglich die reziproke Zeitkonstante κ_2 vereinfacht sich zu:

$$\kappa_2 = \kappa_K \frac{1 - n_{Na}^\infty - n_K^\infty}{(1 - n_{Na}^\infty)(1 - n_K^\infty)} \quad (2.72)$$

Dies bedeutet, daß auch bei unendlich schneller Natriumbindung die Anwesenheit von Natrium in der Lösung die Bindung von Kalium an die Oberfläche verlangsamt. Mit den verwendeten Parametern würde sich die Zeitkonstante der Kaliumbindung durch die Anwesenheit von Natrium von 4.8 ms auf 9.7 ms erhöhen.

Beispiel III: Übergang zu natriumfreier Lösung

Zuletzt soll noch der Übergang von elektrophysiologischer Lösung zu natriumfreier Lösung betrachtet werden. In diesem Fall sind jedoch eine Reihe von Vereinfachungen nicht mehr gültig. So bleibt bei niedrigen Natriumkonzentrationen diese nicht mehr konstant und das Oberflächenpotential spielt eine wesentliche Rolle für die Anfangs- und Endzustände der gebundenen Stellen.

Um jedoch die Tendenz der Dynamik bei einer Verringerung der Natriumkonzentration zu erlangen, soll die Dynamik aus Beispiel II bei einer Abnahme der Natriumkonzentration berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.17 dargestellt.

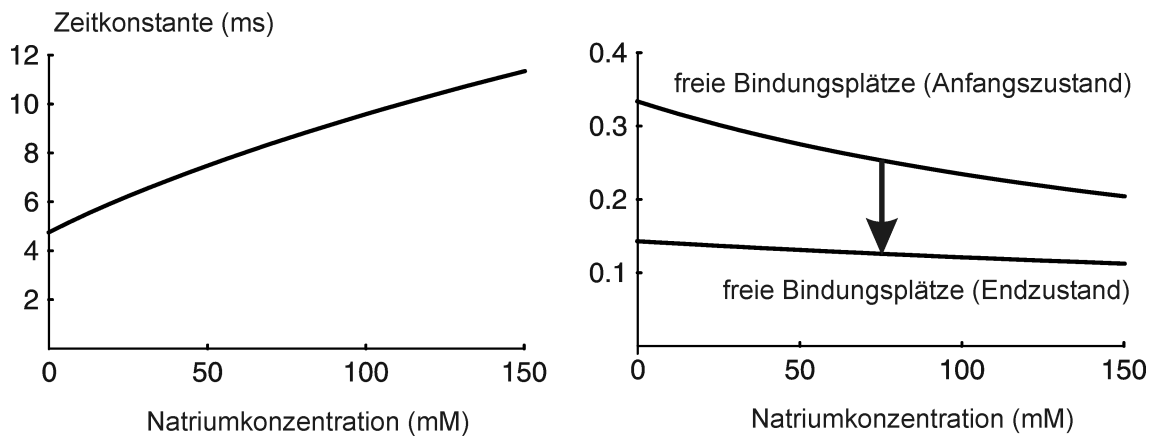


Abbildung 2.17: Durch Absenken der Natriumkonzentration verringert sich die Zeitkonstante des dynamischen Bindungsprozesses gekoppelt aus Natrium- und Kaliumbindung. Ausserdem erhöht sich die Differenz zwischen freien Bindungsplätzen vor dem Konzentrationssprung der Kaliumkonzentration und dem Endzustand. Dies hat eine Erhöhung der Oberflächenpotentialänderung bei Reduktion der Natriumkonzentration zur Folge.

Zwei wesentliche Aspekte können hieraus abgelesen werden.

- Die Zeitkonstante der gekoppelten Bindung nimmt bei Verringerung der Natriumkonzentration ab und geht bei 0 mM Natrium in die Zeitkonstante der Bindung von Kalium über (die Zeitkonstante ist etwas zu hoch, da die Anreicherung der Oberflächenkonzentration konstant gehalten wurde)
- Der Unterschied zwischen Anfangszustand und Endzustand der abgesättigten Bindungsstellen nimmt bei Abnahme der Natriumkonzentration zu. Daher ist ein zunehmendes chemisches Transistorsignal bei Erniedrigung der Natriumkonzentration zu erwarten.

2.3.5 Superposition von Spaltspannung und Oberflächenpotentialänderung des Transistors

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die Ausbildung eines Oberflächenpotentials an der Siliziumoxidoberfläche und dessen Verhalten bei Konzentrationsänderungen beschrieben. Nun sollen die Auswirkungen der Oberflächenpotentialänderungen auf die Spannungssensitivität des Transistors untersucht werden. Hier stellen sich zwei Fragen:

- Wird die Oberflächenkapazität durch die diffuse Doppelschicht verändert?
- Verändert die diffuse Doppelschicht die Leitfähigkeit des Spaltes?

Kapazität der diffusiven Doppelschicht

Die Debye-Länge der diffusiven Doppelschicht ist:

$$\kappa_{Debye}^{-1} = \sqrt{\epsilon\epsilon_r k_B T / 2e_0^2 I_E} \quad (2.73)$$

Dabei ist $I_E = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_E^i$ die Ionenstärke der Elektrolytkonzentration. Bei einer Ionenstärke in elektrophysiologischer Lösung von etwa 150 mM beträgt die Dicke der diffusiven Doppelschicht κ_{Debye}^{-1} etwa 0.8 nm. Die spezifische Kapazität c_{DDS} der diffusiven Doppelschicht lässt sich durch den Vergleich mit einem planaren Kondensator abschätzen:

$$c_{DDS} = \frac{\epsilon\epsilon_r}{\kappa_{Debye}} \quad (2.74)$$

Die spezifische Kapazität bei diesen Ionenstärken liegt bei $90 \frac{\mu F}{cm^2}$. Bei Natriumsalzlösungen ($I_E = 10mM$) ist die Debye-Länge gleich 3 nm und die spezifische Kapazität gleich $23 \frac{\mu F}{cm^2}$. Ein Vergleich mit der spezifischen Oxidkapazität von $0.3 \frac{\mu F}{cm^2}$ zeigt, daß die Kapazität der diffusiven Doppelschicht aufgrund der Serienschaltung der beiden Kapazitäten keinen Einfluß auf die Gesamtkapazität der Oberfläche hat.

Veränderung der Spaltleitfähigkeit durch die diffuse Doppelschicht

Nun soll untersucht werden, ob die Leitfähigkeit der diffusiven Doppelschicht die Leitfähigkeit des Spaltes beeinflusst. Als Spaltdicke wird 70 nm gewählt. In Abbildung 2.18 a) befindet sich im Spalt eine Konzentration von 5 mM Kalium und 10 mM Natrium, durch die Oberflächenladung (bereits durch Bindung abgesättigt) bildet sich ein Potentialverlauf durch den Spalt aus. Dieses Potential führt zu einer Abreicherung der Anionen und einer Anreicherung der Kationen. Dies führt zu einer Erhöhung der spezifischen Elektrolytleitfähigkeit um einen Faktor 6.5 an der Siliziumoxid-Oberfläche. Aufgrund der geringen Dicke der diffusen Doppelschicht verändert diese die Gesamtleitfähigkeit des Spaltes jedoch nur um 6 %. Geht man zu höheren Natriumkonzentrationen (Kalium bleibt unverändert) und berechnet man den Spaltwiderstand mit bzw. ohne Einbeziehung der diffusen Doppelschicht (2.18 b)), so sieht man, daß die erhöhte Leitfähigkeit der diffusen Doppelschicht keine Rolle mehr spielt. Dieser Ansatz ist natürlich stark vereinfacht (die Beweglichkeit der Ionen an der Oberfläche ist z.B. in Wirklichkeit gleich Null), es sollte jedoch lediglich der Einfluß der diffusiven Doppelschicht auf die Gesamtleitfähigkeit abgeschätzt werden sollte. Eine detailliertere Beschreibung hierzu findet sich bei [Net03].

Aus dieser Abschätzung lässt sich schlussfolgern, daß Veränderungen des Oberflächenpotentials keine Auswirkungen auf die Spannungsmessung des Transistors haben.

Die Änderungen des Oberflächenpotentials können also mit der Spannung im Spalt überlagert werden.

2.3. SPANNUNGS- UND IONENSENSITIVITÄT DES FELDEFFEKTTRANSISTORS

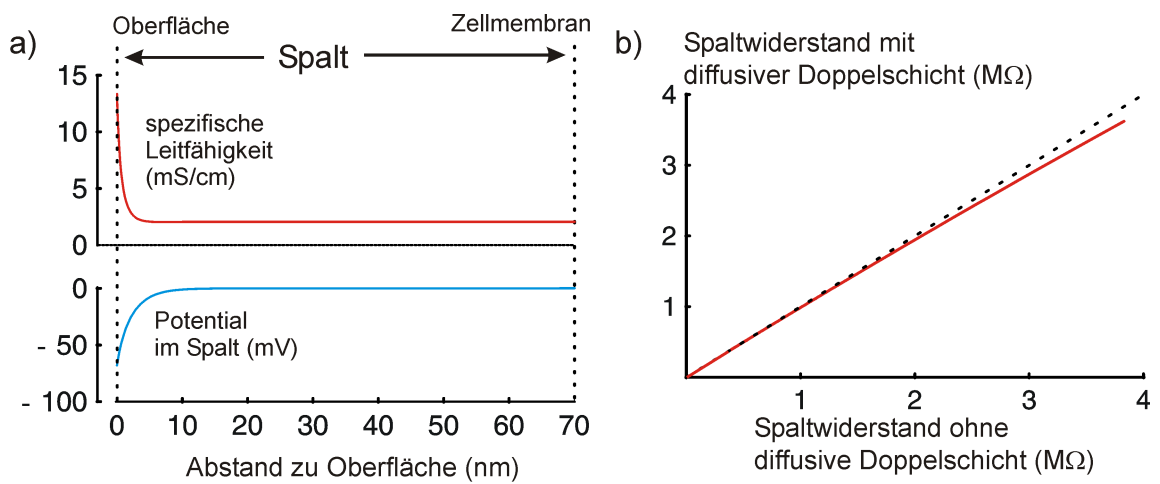


Abbildung 2.18: a) Diffuse Doppelschicht im Spalt zwischen Zelle und Oxidoberfläche bei 10 mM Natriumchlorid und 5 mM Kaliumchlorid in der Lösung. Die Anreicherung der Kationen an der Oberfläche führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. b) Bei Mittelung der Leitfähigkeit über die gesamte Spaltdicke können die Spaltwiderstände mit und ohne Berücksichtigung der diffusen Doppelschicht verglichen werden. Der Unterschied spielt nur für geringe Salzkonzentrationen eine Rolle, liegt jedoch nur bei 6 %.

Kapitel 3

Transistoren und Zellen

In diesem Kapitel soll das experimentelle System aus Zelle und Transistor vorgestellt werden. Zunächst wird der verwendete Messaufbau erläutert. Der zweite Teil geht auf die Spannungs- und Ionensensitivität des Transistors ein. Der letzte Teil beschäftigt sich mit dem Zellsystem, dem Zell-Substrat-Abstand und der Patch-Clamp-Technik.

3.1 Messaufbau

In Abbildung 3.1 ist eine Skizze des verwendeten Messaufbaus gezeigt.

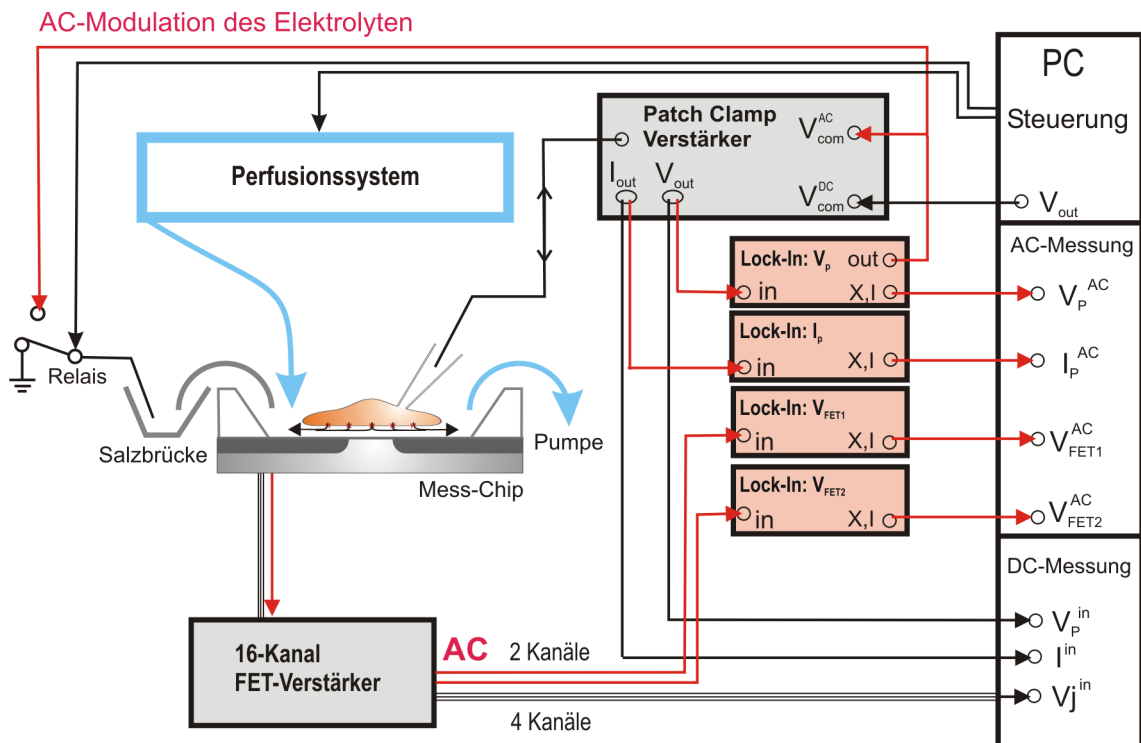


Abbildung 3.1: Schematische Skizze des Messaufbaus



Abbildung 3.2: Photos vom Messaufbau. Rechts oben: In der Mitte befindet sich der Messchip unter dem Mikroskop. Links davon ist der Mikromanipulator angebracht, mit dem die Zellen über eine Pipette kontaktiert werden. Rechts befindet sich der FET-Verstärker, im oberen Teil ist der Ausgang der Messkarte sowie das Perfusionssystem mit 10 verschiedenen Lösungsbehältern zu sehen. Links oben: In der Mitte befindet sich der Patch-Clamp-Verstärker, darunter und darüber die Lock-In-Verstärker. Links und rechts unten: Der Messchip mit der Patchpipette, dem Zu- und Abfluß des Perfusionssystems sowie der Salzbrücke und Badelektrode.

Die Aufgabe des Messaufbaus bestand in folgenden Punkten:

- Kontrolle der spannungsabhängigen Kanäle in der Zellmembran
- Bestimmung der passiven Zellparameter (Impedanz und Adhäsionsfläche der Zelle, Flächenverhältnis von freier Membran zu Adhäsionsmembran)
- schonender Austausch von verschiedenen Elektrolyten, um das Transistorsignal einer Zelle bei verschiedenen Salzkonzentrationen zu testen
- AC-Modulation des Elektrolyten, um einerseits eine Spannungskalibrierung der Transistoren zu ermöglichen und andererseits eine Methode für nichtinvasive Biosensorik zu testen

Die Verwirklichung dieser Aufgaben soll nun anhand der einzelnen Komponenten und Geräte erklärt werden.

Mikroskop und Mikromanipulator

Für die Kontaktierung der Zellen wurde ein Mikromanipulator (PatchMan, Eppendorf) und ein Mikroskop (AxioskopII FS, Carl Zeiss) mit einem 40fach Wasserobjektiv (NA 0.8, Arbeitsabstand 3.6 mm) verwendet.

Patch Clamp Verstärker

Da in dieser Arbeit das Verhalten von spannungsabhängigen Kaliumkanälen untersucht wurde, ist es nötig, die Spannung des Zellinneren auf vorgegebene Werte zu klemmen, um die Kanäle kontrolliert öffnen zu können. Dies wurde mit der sogenannten Patch-Clamp-Technik erreicht, die noch in einem eigenen Abschnitt beschrieben wird. Für die Messungen wurden zwei Typen von Verstärkern verwendet, der SEC 10L der Firma npi electronics und der Axopatch 200B der Firma Axoclamp. In beiden Fällen wurden keine Kompensationsmechanismen des Verstärkers verwendet, sondern die Parameter des Pipette-Zell-Chip-Systems über Wechsellspannungsmessung bestimmt und anschließend in die Messungen mit eingerechnet. Da die Zellströme bei transfizierten Zellen im Bereich von 20 nA liegen, wurde für die Stromverstärkung ein Verstärkungsfaktor von $0.1 \frac{V}{nA}$ gewählt. Bei der Messung der Gatingkurven wurde bei 10 kHz gefiltert, bei den Wechsellspannungsmessungen bei 100 kHz.

FET Verstärker

Der FET-Verstärker musste zwei Aufgaben gerecht werden. Zunächst sollte der Verstärker die Änderungen des Source-Drain-Stroms bis zu hohen Frequenzen linear verstärken. Der verwendete FET-Verstärker (Eigenbau) zeigt eine lineare Übertragungsfunktion in Betrag und Phase bis zu 30 kHz [Str01]. Diese Grenzfrequenz des Verstärkers ist ausreichend, da die charakteristischen Frequenzen des Zell-Chip-Systems unterhalb dieser Frequenz liegen. Die Verstärkungsfaktoren des Strom-Spannungswandlers im FET-Verstärker konnten zwischen $10 \frac{mV}{\mu A}$ (Messung der Kennlinie) und $1 \frac{V}{\mu A}$ (Messung der Source-Drain-Strom-Änderung bei einem eingestellten Arbeitspunkt) umgestellt werden. Die Offset-Spannungen der verstärkten Source-Drain-Ströme im zweiten Fall wurden durch einen 16-fach DAC-Wandler, der durch eine eigene Messkarte (6DAC/24DIO-Steuerkarte CIO-DDA06/Jr/16 Plug-In Electronic GmbH) angesteuert wurde, abgezogen und konstant gehalten. Der Arbeitspunkt wurde über regelbare Batteriespannungen eingestellt.

Lock-In Technik

Für die Wechsellspannungsmessungen (Impedanzmessungen an der Zelle, komplexe Übertragungsfunktion Zelle-Transistor) wurden Lock-In Verstärker (SR 830 bzw. SR 850, Stanford Research Systems) benutzt. Für die Bestimmung der Impedanz der Zelle wurde mit einer Steuerspannung von 10 mV über den Patch Clamp Verstärker die Spannung in der Zelle bei geschlossenen Kanälen moduliert und Betrag und Phase der Spannung sowie des Stroms in der Zelle aufgenommen. Hierfür wurde in einer logarithmischen Skala die

Frequenz von 5 Hz bis 15 kHz in 30 Schritten variiert. Um die Übertragungsfunktion in den Feldeffekttransistor zu bestimmen, wurde die Frequenz von 200 Hz bis 1.5 kHz in 30 linearen Schritten von 100 Hz erhöht und Betrag und Phase der Zellimpedanz sowie des Transistorsignals V_{FET} mit der darauf liegenden Zelle gemessen.

Lösungstausch

Für Messungen an einer bereits kontaktierten Zelle bei bis zu 10 verschiedenen Salzkonzentrationen ist ein schonender Austausch der Lösungen unerlässlich. Der manuelle Austausch führte oft zu einer Zerstörung des Pipetten-Zell-Kontakts (Seal) und kostete zu viel Zeit, um sowohl Wechsellspannungsmessungen als auch das Gatingverhalten der Zelle auf dem Chip zu testen. Durch ein automatisiertes Perfusionssystem (Eigenbau) konnten diese Schwierigkeiten überwunden werden. Dieses System ermöglichte den Austausch von bis zu 10 Lösungen. Der Lösungsfluß wurde durch Schwerkraft erzeugt, ein deutlicher Vorteil gegenüber einem gepulsten Lösungstausch mit Hilfe einer Schlauchradpumpe. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 10 ml/min, die Zeit des Lösungsaustausch betrug bei den Experimenten eine halbe Minute, in dieser Zeit konnte die Lösung vollständig ausgetauscht werden. Da bei den verschiedenen Salzlösungen die Konzentration der potentialbestimmenden Chloridionen verändert wurde, was zu einer Potentialänderung an der Silber/Silberchlorid-Elektrode führt, wurde zur Vermeidung dieses Effekts eine Salzbrücke (3M KCl, Agarose) verwendet.

Datenaufnahme und Steuerung durch den PC

Die Ansteuerung bzw. Datenaufnahme erfolgte durch die graphische Programmiersprache Labview (National Instruments) über eine Messkarte (64AD/8DIO/2DAC-Messkarte AT-MIO-64E-3 National Instruments). Für die geänderten Anforderungen (Automatisierung von Messung und Lösungstausch, Zell-Transistor-Kopplung bei äußerer Badanregung) wurde ein bereits existierendes Programm [Str01] modifiziert.

3.2 Transistoren

Für die Messungen wurden p-dotierte Feld-Effekt-Transistoren mit einem metallfreien Gate verwendet. Die Transistor-Chips wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Paolo Bonifazi hergestellt und sind dort beschrieben [Bon02, Zec01]. Die Oxiddicke betrug 10 nm, die Länge und Breite der Gate-Region war $3 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$. Die Transistoren wurden durch lokale Oxidation (LOCOS) voneinander elektrisch isoliert. Auf einem Transistor-Chip befinden sich je nach Bautyp 62 oder 58 Transistoren, die durch Stimulationsfelder (in dieser Arbeit nicht kontaktiert) voneinander getrennt sind (Abb. 3.3, Mitte). Der Chip wurde in einen Keramiksockel geklebt und die Zuleitungen mittels Aluminium-Bonddrähten verbunden. Um eine Kultur der Zellen auf den Chips zu ermöglichen, wurden Plexiglaswannen mit einem zellkulturgetesteten Silikonkleber (MK3) auf die Chipoberfläche geklebt (Abb. 3.3, Links).

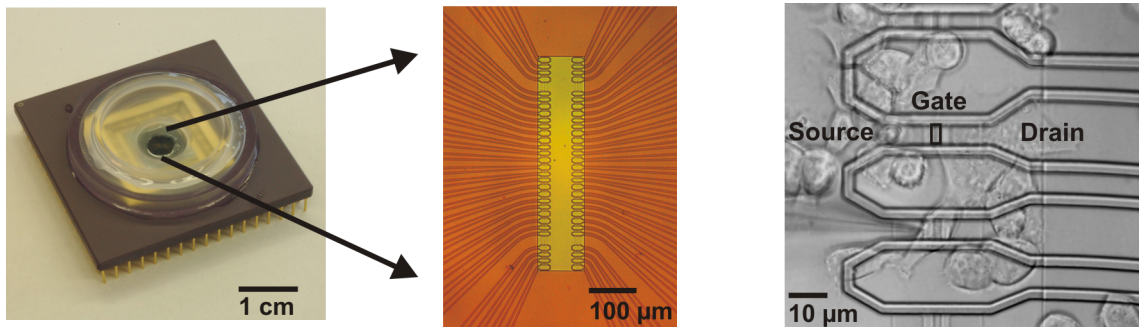


Abbildung 3.3: Aufsicht auf einen verwendeten Messchip. Für die Kultur der Zellen auf den Chips wurde eine Plexiglaswanne aufgeklebt. Eine vergrößerte Aufnahme zeigt die Anordnung der 62 Feldeffekttransistoren in zwei Reihen, links und rechts sind die Drain-Leitungen zu sehen, die von einer gemeinsamen Source-Zuleitung in der Mitte versorgt werden. Auf der rechten Seite ist die Messsituation mit einer kontaktierten Zelle, die auf der Gate-Region eines FET liegt, dargestellt.

3.2.1 Kennlinie des Transistors

Abbildung 3.4 zeigt ein Kennlinienfeld des Source-Drain-Stroms I_{SD} der verwendeten Transistoren in Abhängigkeit der Source-Drain-Spannung V_{SD} und der Source-Gate-Spannung V_{SG} . Source und Bulk des Transistors liegen auf gleichem Potential. Die Transistoren werden im Sättigungsbereich betrieben, der Arbeitspunkt war bei allen Messungen $V_{SG} = 3.0V$, $V_{SD} = 2.9V$ und $V_{SB} = 0V$. Dort beträgt die Steilheit:

$$g_m = \left. \frac{\partial I_{SD}}{\partial V_{ESi}} \right|_{V_{SD}} = \frac{Z \mu_n \epsilon_0 \epsilon_{Si}}{L d_{ox}} (V_{ESi} - V_{ESi}^0) \quad (3.1)$$

Die Steilheit ist im Sättigungsbereich abhängig von der Gate- und Thresholdspannung, in erster Näherung kann dies aber vernachlässigt werden, da die Auslenkungen der Gate- und Thresholdspannung im mV-Bereich liegen. Der Wert der Steilheit bei den verwendeten Transistoren und diesem Arbeitspunkt lag bei $100 \mu\text{A}/V$, der genaue Wert wurde vor jeder Messung ermittelt, wobei der Elektrolyt durch eine sinusförmige Modulation mit 4 mV (RMS-Wert) angeregt und die resultierenden Änderungen des Source-Drain-Stroms mit einem Lock In-Verstärker gemessen wurden.

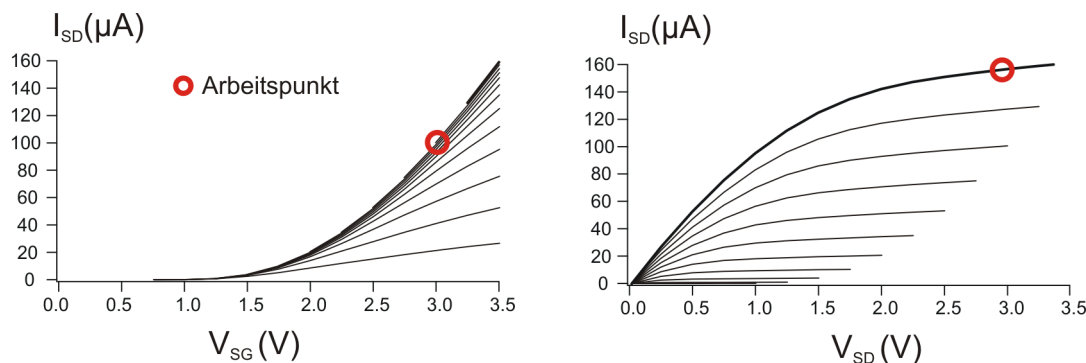


Abbildung 3.4: Transistorkennlinie in Abhängigkeit der Source-Drain-Spannung V_{SD} und der Source-Gate-Spannung V_{SG} . Source und Bulk des Transistors liegen auf gleichem Potential.

3.2.2 Ionensensitivität des FETs

Neben der Gatespannung hat auch eine Veränderung der Ionenkonzentration im Elektrolyten Einfluß auf den gemessenen Source-Drain-Strom des Transistors [Ber70, Ber88]. Diese Ionensensitivität des FET wird in Form eines Sensors (ISFET) benutzt, um den pH eines Elektrolyten zu bestimmen [Ber03]. Bei diesen Sensoren wird jedoch der Einfluß der restlichen Ionenkonzentration durch einen zweiten, baugleichen Transistor (REFET), der keine Protonensensitivität zeigt, ausgeglichen. In der Biosensorik werden diese ISFETs verwendet, um eine Veränderung des pH-Wertes in Zellkultur zu messen und damit Rückschlüsse auf die Stoffwechsellätigkeit der Zellen zu erlangen [Bau99].

In dem Fall der Zell-Transistor-Kopplung spielt jedoch die Änderung des pH-Wertes keine Rolle (siehe dazu Kapitel 2.2.3, Gleichung 2.38). Daher soll nur der Einfluß einer Änderung der ein- und zweiwertigen Kationenkonzentration (K^+ , Na^+ , Ca^{++} und Mg^{++}) auf den Source-Drain-Strom des Transistors bei konstantem pH 7.4 gemessen werden. Der pH der Elektrolytkonzentrationen wurde mittels des Puffers HEPES [Goo66] konstant gehalten. Die Pufferkonzentration betrug 5 mM, die titrierte Menge an NaOH war 2 mM. Um eine Verfälschung der Messdaten durch eine Konzentrationsänderung der potentialbestimmenden Chloridionen zu vermeiden, wurde für die Titrationsmessungen eine KCl-Salzbrücke (3M KCl, Agarose) verwendet. Außerdem wurden die Titrationsexperimente der einzelnen Ionensorten nicht unabhängig voneinander durchgeführt, sondern relative Änderungen des Transistorsignals bei Tausch der Ionensorte mit berücksichtigt. Daher sind die Titrationsdaten einzelner Ionensorten zueinander fix, der Nullpunkt kann jedoch nicht bestimmt werden und ist in der Interpretation der Daten an die Theorie angepasst.

In Abbildung 3.5 sind die Titrationsdaten eines für die Messungen verwendeten Transistors dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Ionensorten wurden auf 2^i mM ($i=0-10$) titriert. Zusätzlich wurde bei 3 verschiedenen Konzentrationen (8 mM, 128 mM und 512 mM) die Ionen gegenseitig ausgetauscht, um eine Verschiebung des Transistorsignals bei Austausch der Ionensorte und gleichbleibender Konzentration zu messen. Alle Ionen zeigten im Bereich zwischen 10 mM und 100 mM ein annähernd lineares Verhalten (Natrium 34 mV/Dekade, Kalium 46 mV/Dekade, Calcium und Magnesium 19 mV/Dekade).

Diese Steigung ist jedoch nicht entscheidend, sondern die Potentialverschiebung der einzelnen Ionensorten zueinander bei gleicher Konzentration. So bewirkt z.B. ein Austausch von

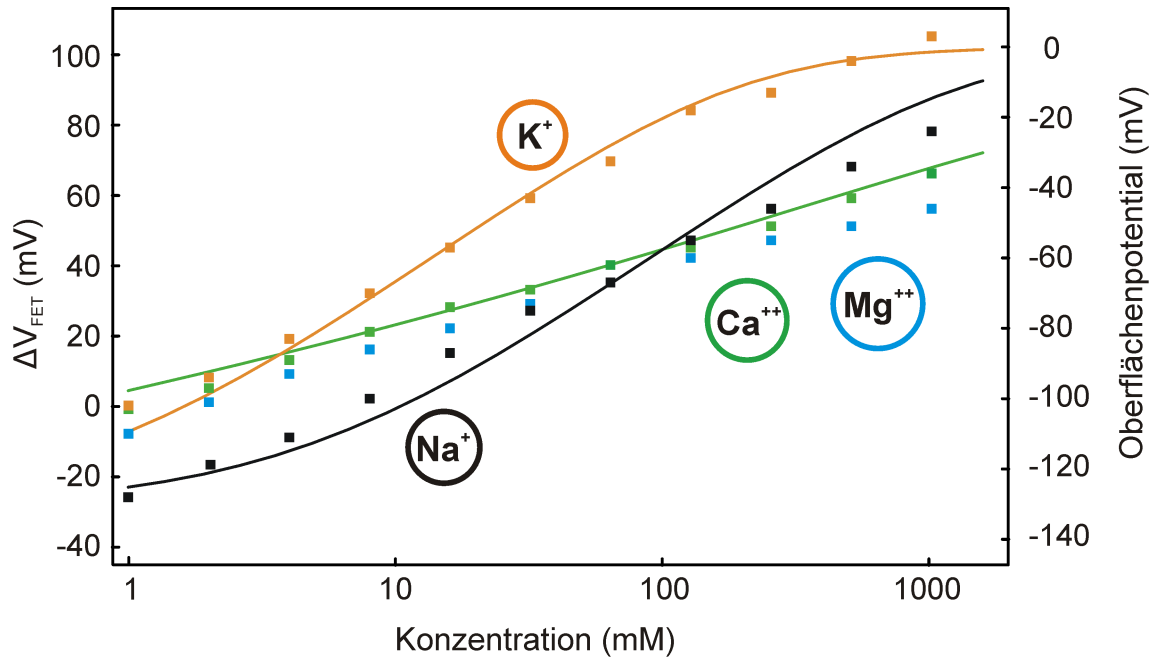


Abbildung 3.5: Kalibrierung der Ionensensitivität der Feldeffekttransistoren. Hierzu wurden die Konzentrationen der einzelnen Ionensorten auf 2^i mM ($i=0-10$) titriert und die Änderung der Äquivalentenspannung ΔV_{FET} (linke Skala) ausgehend von 1 mM Kaliumchlorid aufgezeichnet. Zusätzlich wurde der Potentialunterschied der Einzelsalz-Messreihen zueinander bestimmt. Da der Nullpunkt des gefitteten Oberflächenpotentials nicht bestimmt werden kann, wurde dieser an die theoretische Beschreibung angepasst (rechte Skala).

Natrium durch Kalium bei einer gleichbleibenden Konzentration von 128 mM eine Verschiebung des Transistorsignals von 37 mV, während der gleiche Austausch mit Calcium keine Auswirkung zeigt. Dieser Effekt kann mit einer Absättigung der Oberflächenladung durch Bindung an die Oberfläche erklärt werden.

Um die Titrationsdaten zu modellieren, wurde die Gouy Chapman Theorie um die Bindung der Ionen an die Oberfläche erweitert (siehe dazu Kapitel 2.3.3) und die einzelnen Bindungskonstanten sowie die freie Oberflächenladung den Messdaten angepasst. Die Siliziumoxid-Oberfläche trägt amphotere Silanolgruppen, die je nach Protonenkonzentration im Elektrolyten neutral (SiOH), positiv (SiOH_2^+) oder negativ (SiO^-) geladen sind. Die Werte für die Bindungskonstanten der Protonen an die Oberfläche wurde aus der Literatur übernommen [Sca92] und finden sich in der folgenden Tabelle. Hierbei sind K_+ und K_- die Dissoziationskonstanten für die Protonierung und die Deprotonierung der Silanolgruppen. Bei einem pH von etwa 3 ist die Oberfläche neutral (entspricht pH_{pzc} oder Point of zero charge). Im Falle eines pH-Wertes von 7.4 ist die Oberfläche stark deprotoniert, hier muss nur noch die Dissoziationskonstante K_- berücksichtigt werden.

Protonenbindung

an Oxidoberfläche [Sca92]:

pK_+	pK_-	$\text{pH}_{pzc} = \frac{1}{2} (\text{pK}_+ + \text{pK}_-)$
-0.2	5.8	2.8

Als freie Oberflächenladung erhält man bei Fit der Daten einen Wert von $\sigma = 1.5 e_0/nm^2$. Dieser Wert ist niedriger als der aus der Literatur bekannte Wert von $5 e_0/nm^2$ [Rai98], kann jedoch durch die Vorbehandlung des Chips (Silanisierung und Reinigung) erklärt werden.

Die zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium zeigten unter Berücksichtigung der Protonenbindung keine Bindungseffekte an die Oberfläche (die Verschiebung von Magnesium und Calcium soll hier nicht berücksichtigt werden). In der folgenden Tabelle sind nun alle Parameter zusammengestellt:

Bindungskonstanten

und Oberflächenladung:

σ	pK_H	pK_K	pK_{Na}	$pK_{Ca,Mg}$
$1.5 e_0/nm^2$	5.8	1.8	0.5	<-6

Kalium bindet in diesem Modell wesentlich stärker an die Oberfläche als Natrium und die zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium. Diese intrinsische, bevorzugte Kaliumbindung konnte auch an anderen Transistortypen [Che86, Haj00] sowie in Silika-Gelen [Tad68] beobachtet werden. Diese Sensitivität kann durch Beschichtung der Transistoroberfläche mit PVC [Mos01] oder durch eine chemische Behandlung des Oxides [Elb99] noch verstärkt oder zugunsten der Natriumsensitivität verschoben werden [Bac96].

Um zu überprüfen, ob die Oberflächentheorie auch auf Mischlösungen angewandt werden kann, wurde die Konzentration von Natrium (siehe Abb. 3.6 a)) und Calcium (siehe Abb. 3.6 b)) bei 1 mM, 10 mM, 100 mM und 1 M konstant gehalten und die zugemischte Kaliumkonzentration von 1 mM bis 1 M in Dekaden variiert. Die aufgetragene Konzentration ist nun die Gesamtkonzentration des Elektrolyten. Hier zeigt sich nun der wesentliche Unterschied zu der Beschreibung durch eine reine Abschirmung der Oberflächenladung durch einen Elektrolyten im Gouy Chapman Modell. Durch die bevorzugte Bindung von Kalium an die Oberfläche zeigt der Transistor auch bei einer Hintergrundkonzentration von beispielsweise 100 mM Natrium (Abb. 3.6 a), blauer Ast) eine starke Antwort trotz geringer relativer Konzentrationsänderung.

Bei hohen Gesamtkonzentrationen ($> 1 M$) kann das Verhalten der Oberflächenladung nicht mehr mit dieser einfachen Theorie beschrieben werden. Es soll an dieser Stelle betont werden, daß eine vollständige theoretische Beschreibung des Übergangs von einem Elektrolyten zu einer Oxidoberfläche weitaus komplexer wäre als dieses einfache Modell. Das Hauptmerkmal, die spezifische Antwort auf geringe Änderungen der Kaliumkonzentration bei einem starken Hintergrund an restlicher Salzkonzentration wird durch das Modell jedoch sehr gut wiedergegeben.

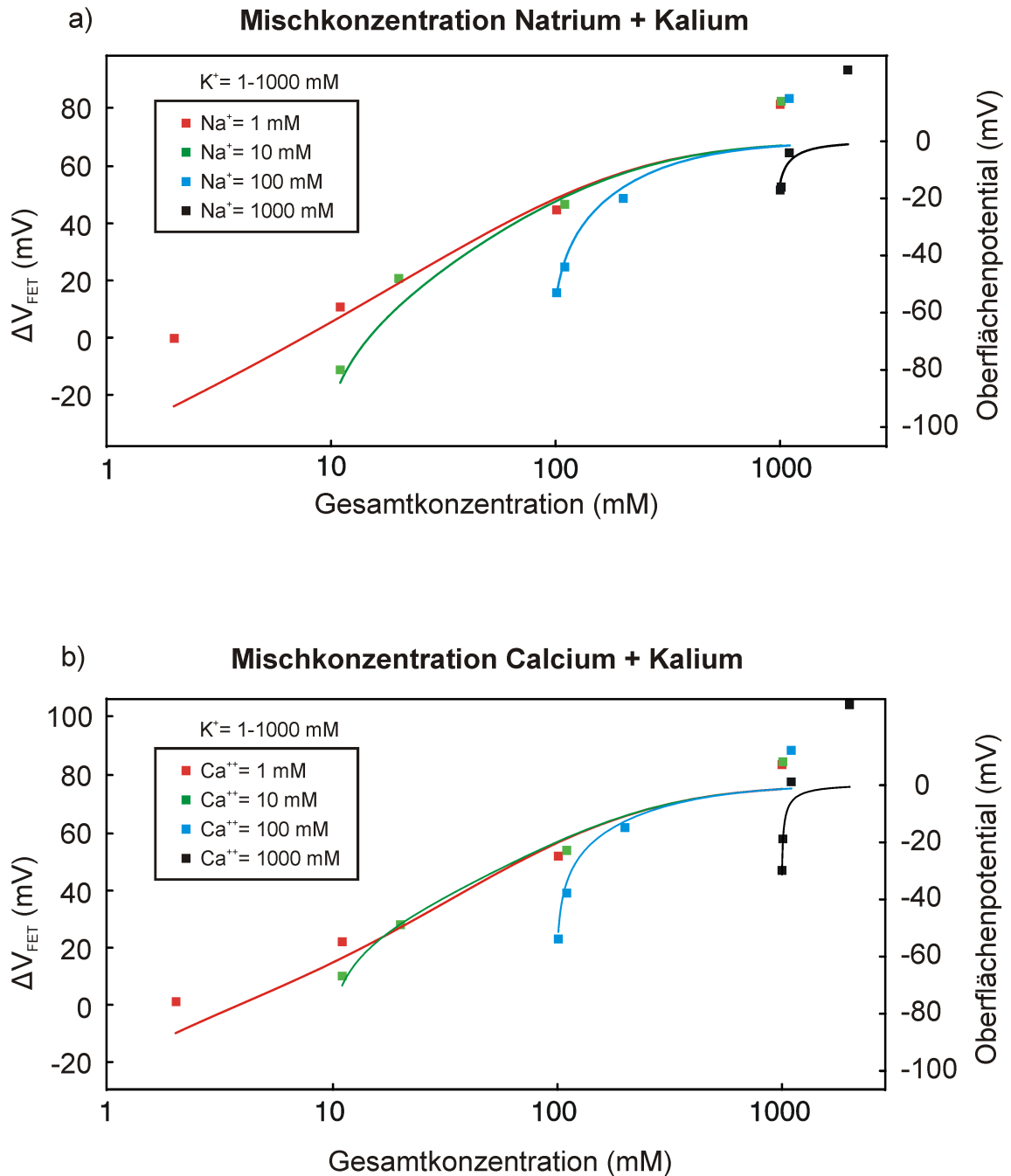


Abbildung 3.6: Potentialunterschiede bei Mischlösungen aus Kalium/Natrium und Kalium/Calcium. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration führt in beiden Fällen zu starken Potentialänderungen, die nur durch eine Reduktion der Oberflächenladung, verursacht durch Bindung von Kalium an die Oberfläche, erklärt werden kann. Die Parameter für die theoretischen Kurven wurden aus dem Fit der Einzelsalz-Titration übernommen. Bei hohen Salzkonzentrationen (1 M) ist dieses einfache theoretische Modell nicht mehr gültig.

3.3 Zellen und Ionenkanäle

3.3.1 Zellkultur

Für die Untersuchung der Zell-Chip-Kopplung ist es wichtig, Zellen zu verwenden, die einerseits leicht zu handhaben sind und andererseits selbst keine oder nur wenige endogene Ionenkanäle in der Zellmembran tragen. Diese Anforderungen werden von den verwendeten HEK293-Zellen erfüllt. Diese Zelllinie von menschlichen embryonalen Nierenzellen (Human Embryonic Kidney) wurde durch einen Adenovirus Typ 5 [Har77, Gra77] zu krebsartigen Zellen umgewandelt und besitzt ein unbegrenztes Wachstum. Zudem ist die natürliche Expression an Ionenkanälen sehr gering [Zhu98]. Daher ist es möglich, durch gentechnische Verfahren einen spezifischen Ionenkanal in diesen Zellen zu exprimieren und ohne störende Einflüsse anderer Kanalsorten zu untersuchen. Die Zellen werden in Plastik Kulturschalen (Falcon) in einem Brutschrank (37°C , $5\% \text{CO}_2$) kultiviert und bei einer Dichte von 70-80 % in einem Verhältnis von 1:4 umgesetzt. Als Kulturmedium wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), angereichert mit 1 mg/ml Glucose, 10% (vol/vol) FBS (fetal bovine serum) und 1% (vol/vol) Glutamax I (Gibco) verwendet. Eine Licht- sowie eine Elektronenmikroskopaufnahme ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Der durchschnittliche Durchmesser dieser Zellen liegt bei etwa $10 \mu\text{m}$.

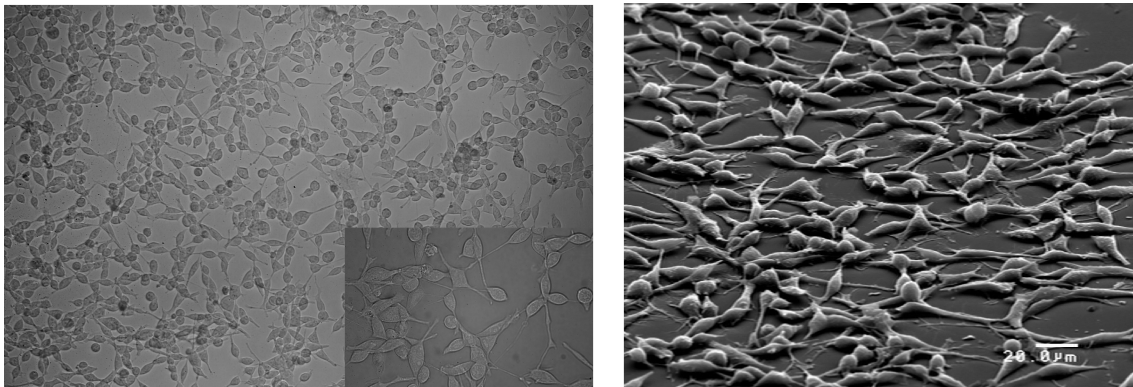


Abbildung 3.7: HEK293-Zellen in Kultur. Links ist eine Lichtmikroskopaufnahme mit einem 10fachen Objektiv und eine Aufnahme mit einem 40fachen Wasserobjektiv (kleines Bild) zu sehen. Rechts ist eine Elektronenmikroskopische Aufnahme abgebildet.

3.3.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Membranproteine, die einen selektiven Ionenaustausch zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Elektrolyten ermöglichen. Welche Ionenkanalsorte in der Zelle hergestellt wird, hängt von der Aufgabe ab, die die Zelle im Gesamtorganismus zu erfüllen hat.

Man unterscheidet mehrere Gruppen von Ionenkanälen: Einerseits können Ionenkanäle durch eine Änderung der Membranspannung geöffnet und geschlossen werden. Diese spannungsgesteuerten Kanäle können selektiv den Kalium-, Natrium- oder Calciumstrom in die Zelle oder aus der Zelle regulieren und sind bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen beteiligt. Für die Ausbildung eines Aktionspotentials spielt das Zusammenspiel von Natrium- und Kaliumkanälen eine wichtige Rolle, während Calciumkanäle

für chemische Signalprozesse innerhalb der Zelle und für die Signalübertragung in chemischen Synapsen verantwortlich sind.

Die zweite Gruppe der Ionenkanäle bilden die ligandengesteuerten Kanäle. Diese Kanalsorte ist in den chemischen Synapsen an der Auslösung eines Aktionspotentials beteiligt, kann jedoch auch durch das Binden von regulierenden Liganden Aktionspotentiale unterdrücken. Zusätzlich gibt es noch weitere Arten von Ionenkanälen wie z.B. mechanosensitive Kanäle.

In dieser Arbeit wurde der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3 untersucht. Dieser Kanal besitzt neben der Beteiligung an Aktionspotentialen in Nervenzellen noch weitere wichtige Funktionen. So ist er in T-Lymphozyten für die Regulierung des Ruhepotentials verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer chronischen Aktivierung dieser Zellen (Krankheitsbild der multiplen Sklerose) dieser Kanal überexprimiert wird, eine selektive Blockierung konnte die Ausbildung der Krankheit *in vitro* unterdrücken [Bee01]. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle bei der Regulierung in olfaktorischen Zellen [Fad03] und bei der Stoffwechselfähigkeit [Xu03]. Experimente mit Kv1.3-Knockout-Mäusen zeigten, daß diese Tiere im Vergleich zum Wildtyp besser riechen können und weniger zu Fettleibigkeit neigen.

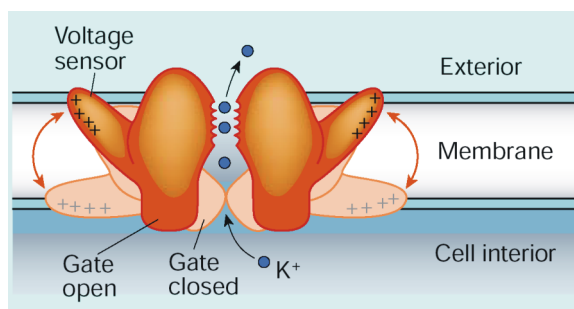


Abbildung 3.8: Modell des Gating-mechanismus für spannungsabhängige Kaliumkanäle. Die Depolarisierung der Zellmembran führt zu einer Drehung der S4-Segmente, die eine Konformationsänderung des gesamten Tetramers hervorrufen und somit den Kanal öffnen. (Abbildung aus [Sig03])

Der Kv1.3-Kanal gehört zu der Unterfamilie 1 der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv1.1 bis Kv1.7) und ist Teil der Shaker-Familie. Diese Kanäle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen, die jeweils 6 Transmembransegmente (S1-S6) besitzen. Die Spannungsabhängigkeit des Kanals wird durch eine Drehung des S4-Segments und eine damit verbundene Konformationsänderung des gesamten Tetramers hervorgerufen. Diese Annahme konnte durch die Strukturaufklärung des K⁺-Ionenkanals KvAP von Jiang et al. [Jia03] bestätigt werden.

Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt 12-14 pS, die Ionenselektivität des Kanals für Kalium im Vergleich zu Natrium ist sehr hoch, so ist der Quotient der Durchlässigkeit zwischen Na⁺ und K⁺ kleiner 3 % [Con99].

Transfektion der Zelle

Um den Kv1.3-Kanal in den verwendeten HEK293-Zellen zu exprimieren, wurde die kodierende Sequenz dieses Kanals mittels eines Plasmids in die Zellen eingeschleust. Das Plasmid pcDNA3.1 trägt neben der Sequenz des Kanals (rKv1.3 der Ratte *Rattus norvegicus*) [Stü89] noch Sequenzen für eine Erhöhung der Expressionsrate und für die Resistenz gegen das Säugetier-Antibiotikum G418. Das Plasmid (siehe Abb. 3.9) wurde von Jürgen

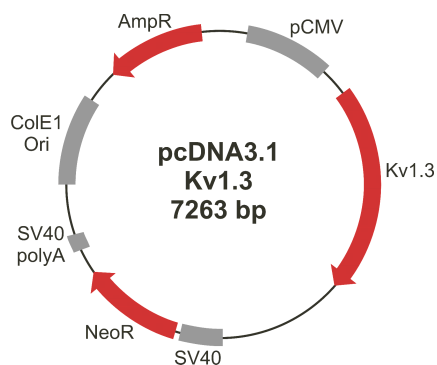


Abbildung 3.9: Die DNA für den Kv1.3-Kanal wurde in das pcDNA3.1-Plasmid integriert. Rot: codierende Sequenzen für den Kanal und zwei Antibiotikaresistenzen. Grau: nicht codierende Bereiche (Ursprung für die Plasmidvermehrung, Promotoren u.ä.).

Kupper hergestellt [Kup98], die cDNA der Kanalsequenz wurde uns freundlicherweise von Len Kacmarek und Mark Tanouye überlassen.

Die Zellen wurden stabil transfiziert, dabei wurde zuerst die Zellen unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert und nach einem Tag die Zellen, die die Gensequenz in ihr Erbgut übernommen haben, durch die Zugabe von 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 (Geneticin) selektiert. Nachdem die stabil transfizierten Zellen gegen dieses Säugetier-Antibiotikum resistent sind, bleiben einzelne Klone übrig, von denen einer ausgewählt und dann weiter unter einem Selektionsdruck von 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 kultiviert wird.

Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in der Zellmembran

In Abbildung 3.10 ist das spannungsabhängige Gatingverhalten der Kanäle bei intrazellulären Spannungspulsen $V_M(t)$ mit einer Dauer von 50 ms ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV auf Spannungen bis zu +40 mV (in 10 mV-Schritten) dargestellt. Die theoretische Beschreibung erfolgt unter Verwendung des Modells von Hodgkin und Huxley [Hod52] für vier unabhängige geöffnete Zustände n des Kanals unter Vernachlässigung der inaktivierten Zustände. Die spannungsabhängige Leitfähigkeit $G(V_M, t)$ der Zellmembran ist:

$$G(V_M, t) = G_0 \cdot n(V_M, t)^4 \quad (3.2)$$

Dabei ist G_0 die Gesamtleitfähigkeit der Zelle, wenn alle Kanäle in der Membran geöffnet sind. Die Dynamik der Kanäle wird durch Ratengleichungen mit den spannungsabhängigen Ratenkonstanten $\alpha_n(V_M)$ und $\beta_n(V_M)$ beschrieben:

$$\frac{d}{dt}n(V_M, t) = \alpha_n(V_M) \cdot (1 - n(V_M, t)) - \beta_n(V_M) \cdot n(V_M, t) \quad (3.3)$$

Der stationäre Zustand n_∞ und die Zeitkonstante τ_n sind dabei über die Ratenkonstanten festgelegt:

$$n_\infty(V_M) = \frac{\alpha_n(V_M)}{\alpha_n(V_M) + \beta_n(V_M)} \quad \tau_n(V_M) = \frac{1}{\alpha_n(V_M) + \beta_n(V_M)} \quad (3.4)$$

Die spannungsabhängigen Ratenkonstanten besitzen im Hodgkin-Huxley-Modell die folgende Form:

$$\alpha_n(V_M) = \frac{A \cdot (V_M + V_a)}{1 - e^{-(V_M + V_a)/S_a}} \quad \beta_n(V_M) = B \cdot e^{-V_M/S_b} \quad (3.5)$$

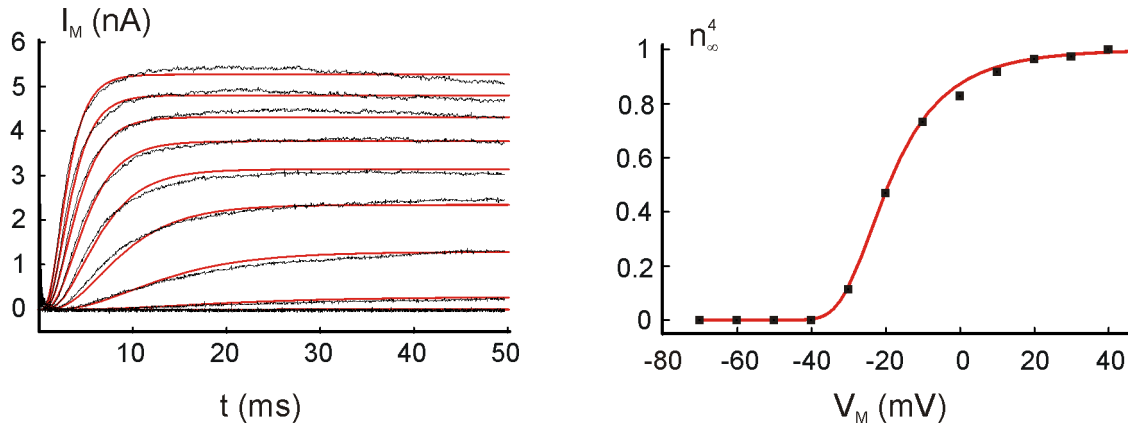


Abbildung 3.10: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in HEK293-Zellen.

Die roten Theoriekurven in Abbildung 3.10 wurden entsprechend diesem Modell an die Messung angepasst. Hierfür wurden als Parameter $A = 0.009 \text{ mV}^{-1} \text{ ms}^{-1}$, $B = 0.01 \text{ ms}^{-1}$, $V_a = 32 \text{ mV}$, $S_a = 5.2 \text{ mV}$ und $S_b = 22 \text{ mV}$ gewählt. Die maximale Membranleitfähigkeit G_0 bei dieser Messung beträgt 43 nS . Die gewählten Parameter befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Max Ulbrich [Ul03]. Da in dieser Arbeit das Verständnis der Zell-Transistor-Kopplung im Vordergrund steht, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Kanäle mit hohen Spannungspulsen geöffnet ($+100 \text{ mV}$). In diesem Bereich ist die Dynamik der Kanäle im Vergleich zu diffusiven Effekten im Spalt sehr schnell (ca. 1 ms), daher kann das Öffnen als instantan angesehen werden. In Abschnitt 6.3 wird jedoch die Zell-Transistor-Kopplung bei einem dynamischen Öffnen der Kanäle untersucht. Hier wird nochmals auf die Modellierung der Kanaldynamik zurückgegriffen werden.

3.3.3 Kultur der Zellen auf den Chips

Um die Zellen auf den Chips zu kultivieren, müssen die Chips vor der Kultur gereinigt und beschichtet werden. Für die Beschichtung der Oxidoberfläche wurde das Glykoprotein Fibronectin (Molekulargewicht 440 kDa) verwendet. Eine optimale Beschichtung wurde durch eine vorhergehende Hydrophobisierung der Oberfläche erreicht. Da in dieser Arbeit die Kopplung von Einzelzellen an Transistoren untersucht werden, ist es wichtig, beim Aufbringen der Zellen auf die Chips keine Zellanhäufungen zu erzeugen. Daher ist dieser Schritt etwas aufwendiger. Im folgenden sind nun die einzelnen Schritte der Chipbehandlung und der Zellkultur auf der Chipoberfläche beschrieben:

- Mechanische Reinigung der Chips mit 80°C heissem Tickopur
- Silanisieren der Chipoberfläche (30 Minuten) durch Bedampfen mit einer gesättigten HMDS/Stickstoff-Atmosphäre (HMDS=Hexamethyldisilazan).
- Sterilisation der Chips durch 30 minütige UV-Bestrahlung
- Beschichtung (5 Stunden) der Chips mit Fibronectin ($250 \mu\text{l}$ -Portionen pro Chip, Konzentration $15 \mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS (Phosphate Buffered Saline).

- Zellkultur: 2 mal Spülen der Chips mit PBS, Ablösen und Vereinzeln der HEK293-Zellen aus dem Zellkulturschälchen, Verdünnung von 200 μl Zellsuspension in 10 ml Kulturmedium (DMEM) ohne Zusatz von Genetizin in einem konischen 10ml-Tubus (Falcon), Absaugen der PBS-Lösung von den Chips und seitliches Einspritzen von 1 ml Zelllösung in die Kulturkammern der Chips (bei einem direkten Einspritzen in die Mitte der Chips ist die Zelldichte in der Mitte der Chipoberfläche und damit auf den Transistoren zu hoch)
- Nach etwa 20-30 Stunden können die Zellen, die auf den Transistoren liegen, gemessen werden. Dabei wird das Zellkulturmedium durch eine definierte Messlösung (2 maliges Spülen) ersetzt.

3.4 Zell-Chip-Abstand

Die Kopplung der Zelle an den Transistor wird bestimmt durch die physikalischen Vorgänge im Spalt zwischen der Adhäsionsmembran und der darunterliegenden Siliziumoxidoberfläche. Um diese modellieren zu können, ist ein wesentlicher Parameter die Dicke des Spaltes d_j .

3.4.1 Fluoreszenz Interferenz Kontrast Mikroskopie (FLIC)

Dieser Parameter lässt sich durch die FLIC-Methode [Lam96, Bra97, Lam02] bestimmen. In Abbildung 3.11 wird das Prinzip dieser Methode schematisch erklärt.

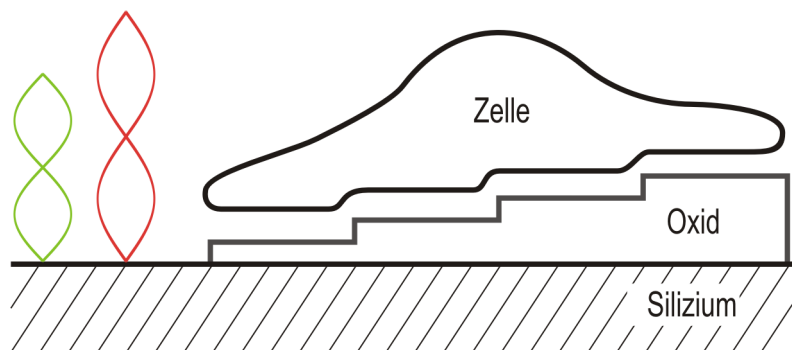


Abbildung 3.11: Veranschaulichung der FLIC-Methode. Die Zelle wird auf einem Siliziumsubstrat mit unterschiedlichen Oxiddicken (in diesem Schema überhöht dargestellt) gewachsen und die aufgrund Interferenzeffekten unterschiedliche Photolumineszenzintensität der Farbstoffe in der Adhäsionsmembran ausgewertet. Mit der Annahme, daß der Zell-Substrat-Abstand über die gesamte Zellfläche identisch ist, kann dieser Abstand bestimmt werden.

In die Zellmembran wird ein Fluoreszenzfarbstoff ($\text{DiIC}_{18}(3)$) eingebracht und dieser Farbstoff über eine monochromatische Beleuchtung durch ein Mikroskop angeregt. Auf dem darunterliegenden Siliziumsubstrat befindet sich ein Muster mit Quadraten unterschiedlicher Oxiddicken (ca. 10, 50, 100 und 150 nm). Dabei dient bei diesen Wellenlängen in erster Näherung das Siliziumsubstrat als Reflektionsfläche und die verschieden dicken Oxidschichten als nicht absorbierende Abstandshalter für die Adhäsionsmembran. Da sich an der Siliziumoberfläche stehende Wellen ausbilden, hängt sowohl die Anregungswahrscheinlichkeit sowie die Emissionswahrscheinlichkeit des Farbstoffs vom Abstand zur Oberfläche

ab. Durch eine Modellierung aller Parameter kann der Abstand zwischen der Oxidoberfläche und der Adhäsionsmembran (bei allen Oxidschichtdicken gleich) bestimmt werden.

3.4.2 Zell-Substrat-Abstand in verschiedenen Elektrolyten

Um zu überprüfen, ob sich bei einer Änderung der Salzkonzentration des Bades der Zell-Substrat-Abstand verändert, wurden Austauschexperimente an einer Zelle mit elektrophysiologischer Lösung und natriumfreier Lösung durchgeführt. Der Chip wurde mit Fibronectin beschichtet. Der systematische Fehler bei der Messung des Membranabstands beträgt etwa 1 nm [Bra97].

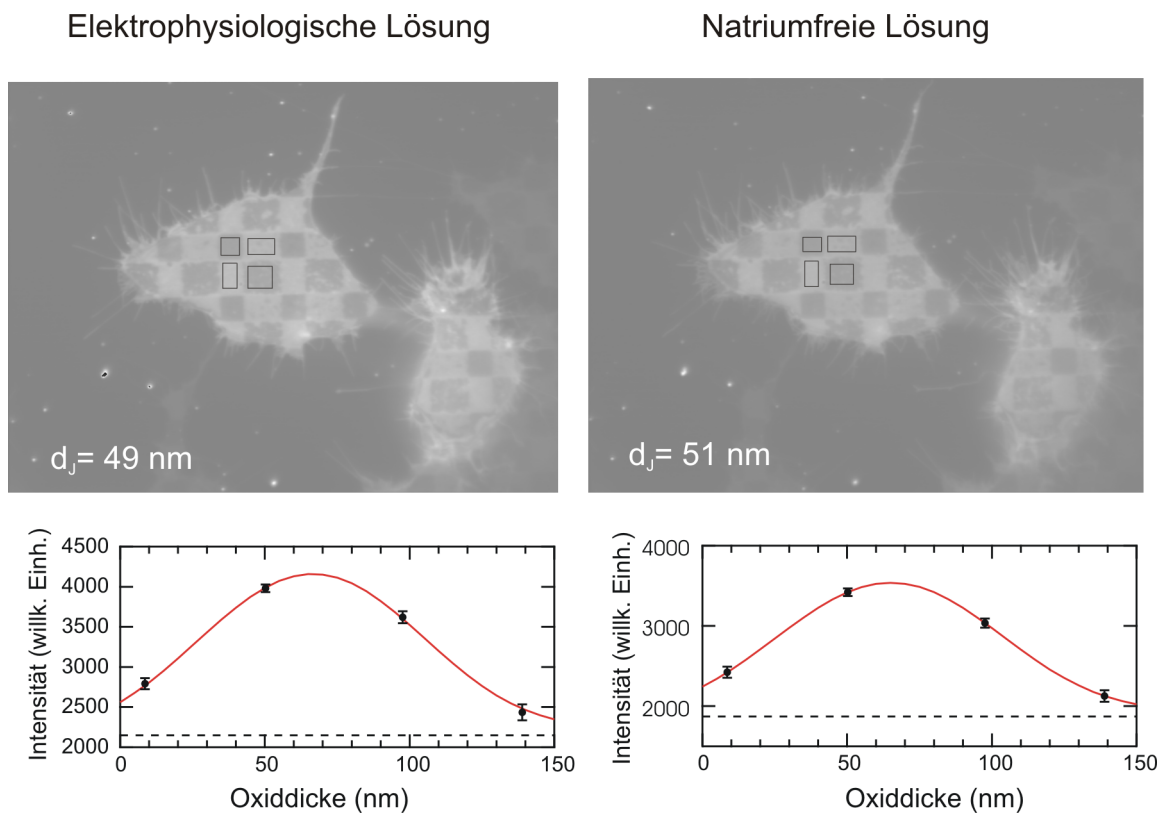


Abbildung 3.12: FLIC-Messung an einer Zelle bei Austausch des Elektrolyten. Es konnten keine Veränderungen des Zell-Substrat-Abstands bei einem Übergang von elektrophysiologischer Lösung zu natriumfreier Lösung festgestellt werden. Für die Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes wurden die Photolumineszenz-Intensitäten bei den verschiedenen Oxiddicken (schwarze Kästchen in Bild) gemittelt und gegen die Oxiddicke aufgetragen. Ein Fit durch die FLIC-Theorie liefert den Zell-Substrat-Abstand.

In Abbildung 3.12 sind zwei FLIC-Messungen vor und nach Austausch des Elektrolyten gezeigt. Die unterschiedlichen Helligkeiten der verschiedenen Oxidschichten wurden gemittelt (schwarze Kästchen) und die Intensität gegen die Oxiddicken (bestimmt durch ein Ellipsometer an Referenzpunkten des Chips) aufgetragen. Die vier Oxiddicken waren (in nm): 8.6 ± 1.6 , 50.2 ± 1.2 , 97.6 ± 0.8 , 138.9 ± 0.4 . Der Fit durch die Theorie ergab für den Zell-Substrat-Abstand in elektrophysiologischer Lösung bei dieser Zelle einen Wert von 49 ± 1 nm. Tauscht man nun die elektrophysiologische Lösung gegen eine natriumfreie

Lösung aus und wiederholt das Experiment, so verändert sich im Bereich der Messgenauigkeit der Zell-Substrat-Abstand d_J nur unwesentlich zu 51 nm. In Abbildung 3.13 ist das gesamte Experiment gezeigt. Die Abstände der Zelle von der Oberfläche sind hier gegen die Zeit aufgetragen. Hier wurde 2 Minuten nach Beginn des Experiments die Lösung ausgetauscht und 10 Minuten später die natriumfreie Lösung wieder durch elektrophysiologische Lösung ersetzt. Es konnten keine wesentlichen Veränderungen bei Austausch der Lösungen festgestellt werden.

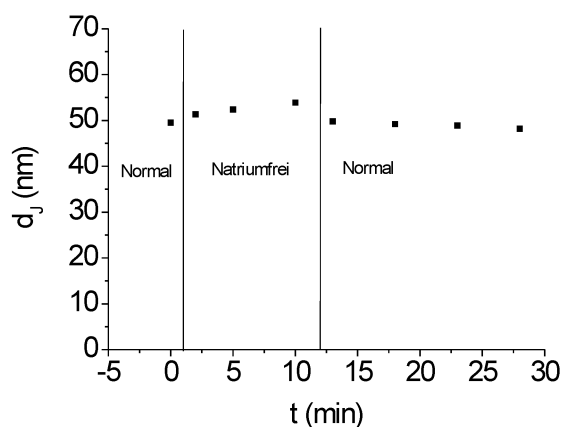


Abbildung 3.13: Gesamtes Austausch-Experiment der FLIC-Messung an einer Zelle. Der Zell-Substrat-Abstand d_J wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der Austausch der Lösungen zeigte keine signifikante Auswirkung auf d_J .

Gemeinsam mit Raimund Gleixner wurde zusätzlich eine statistische Auswertung von Zell-Substrat-Abständen in elektrophysiologischer Lösung ($n=28$, Mittelwert 64 nm, Standardabweichung 8 nm) und Abständen in hochohmiger Lösung ($n=23$, Mittelwert 59 nm, Standardabweichung 8 nm) vorgenommen (Abbildung 3.14). Innerhalb der Standardabweichung konnte keine Veränderung des Abstands bei Veränderung der umgebenden Badlösung festgestellt werden.

Aus diesen Experimenten kann somit der Schluss gezogen werden, daß für die Modellierung der Zell-Transistor-Kopplung bei Austausch von Lösungen der Zell-Substrat-Abstand als konstant angesehen werden kann.

Eine eingehende Untersuchung des Zell-Substrat-Abstandes mit einer Anzahl von 70 Messungen bei HEK293-Zellen in einem elektrophysiologischen Elektrolyten auf mit Fibronectin beschichteten FLIC-Chips ergab einen Abstand von 70 ± 9 nm [Gle03]. Dieser Wert ist etwas höher als die Messwerte des Austauschexperiments und der vorgestellten Statistik. Die Ursache hierfür kann sein, daß für die gezeigten Messungen neu prozessierte FLIC-Chips verwendet wurden, die noch kaum Reinigungsschritte durchlaufen hatten [Gle03]. Daher wird in dieser Arbeit ein Wert von 70 nm für den Zell-Substrat-Abstand verwendet, da er erstens statistisch signifikanter ist und zweitens näher an den Messungen, die mit vorbehandelten Chips durchgeführt wurden, liegt.

3.5 Patch-Clamp-Technik

Um die Eigenschaften der spannungsabhängigen Kanäle in der Zellmembran untersuchen zu können, muß eine elektrische Verbindung zu dem Zellinneren hergestellt werden. Hierfür

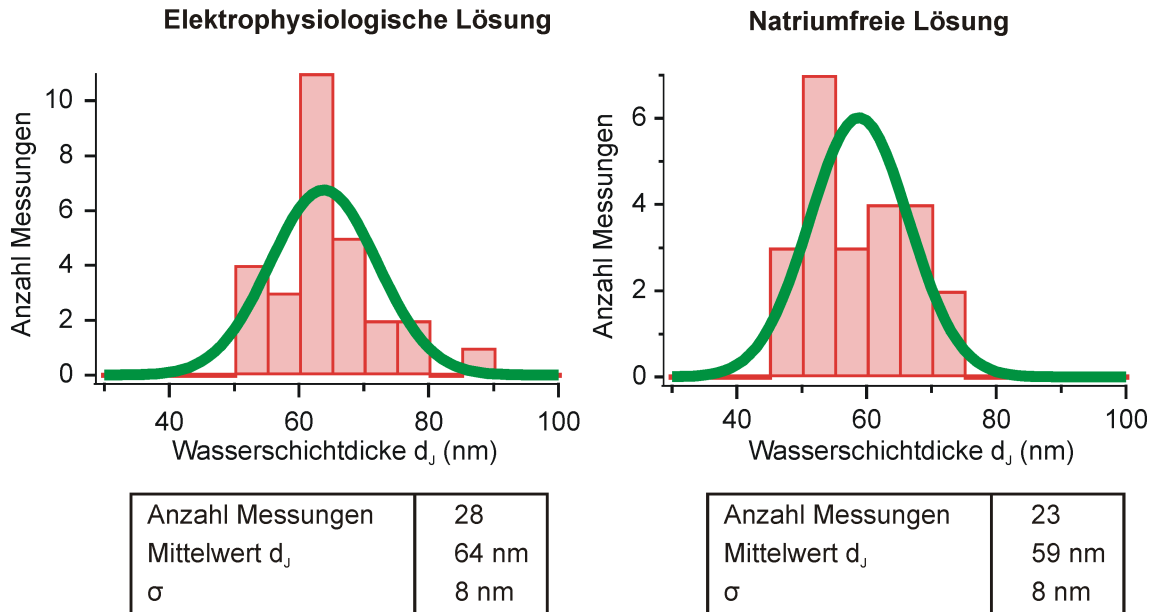


Abbildung 3.14: Histogramm der Spaltdicke bei verschiedenen Extrazellulärlösungen. Die Messungen wurden innerhalb eines Tages an Zellen einer gleichen Passage durchgeführt.

werden Glaspipetten verwendet, deren Inneres mit einem Elektrolyten gefüllt ist und das über eine Silber/Silberchlorid-Elektrode elektrisch kontaktiert wird. Der Durchmesser der Pipettenöffnung ($1\text{-}5\ \mu\text{m}$) liegt in der Größenordnung des Durchmessers der verwendeten Zellen. Im folgenden wird die Methode beschrieben, mit der diese Zellen kontaktiert werden können.

3.5.1 Methode

Die Patch-Clamp-Methode wurde 1976 von Neher und Sakman entwickelt, um das Öffnen und Schliessen einzelner Ionenkanäle detektieren zu können. Hierfür war ein hoher Abschlusswiderstand („Seal“) zwischen Membran und Pipette von Nöten, der im $G\Omega$ -Bereich liegen musste. Erste Versuche durch reines Andrücken der Pipette an die Zellmembran konnte diese Abschlußwiderstände nicht erzeugen, daher wurde die Pipette an die Membran angesaugt. In diesem Zustand („cell attached“-Konfiguration) konnte der kleine Membranbereich elektrisch untersucht und dabei die Existenz von Ionenkanälen in der Zellmembran experimentell nachgewiesen werden [Neh76].

Will man mit dieser Methode das Zellinnere kontaktieren, so wird durch einen weiteren Saugimpuls das in der Pipettenöffnung liegende Membranstück aufgerissen [Ham81] („whole cell“-Konfiguration). Diese Methode ermöglicht eine Kontaktierung der Zelle mit geringem Zugangswiderstand ($R_A \approx 3M\Omega$) bei gleichzeitig hohem Leckwiderstand ($R_L \approx 1G\Omega$).

In dieser Konfiguration werden zwei Arten der elektrischen Zell-Charakterisierung unterschieden. Es kann ein konstanter Strom in die Zelle injiziert werden (Current Clamp) oder die intrazelluläre Spannung auf einen vorgegebenen Wert geklemmt werden (Voltage Clamp). Für die Regelung werden eigens zu diesem Zweck konzipierte Verstärker verwen-

det. Eine ausführliche Beschreibung der Technik findet sich bei [SG93]. In dieser Arbeit wurde ausschliesslich im „Voltage Clamp“-Modus gearbeitet.

3.5.2 Ersatzschaltbild der kontaktierten Zelle

Die Kontaktierung der Zelle bedeutet einen apparativen Eingriff in das Ersatzschaltbild des Zell-Transistor-Systems. Im Theorieteil wurden dies vernachlässigt und angenommen, daß die Zelle auf vorgegebene Spannungen gesetzt wird (siehe Ersatzschaltbild 2.6). Das Ersatzschaltbild für eine Messung in Patch-Clamp-Technik ist jedoch komplexer, wie Abb. 3.15 zeigt. So besitzt der Patch-Clamp-Verstärker eine innere Streukapazität $C_{S,Amp}$, die Pipette eine Streukapazität $C_{S,Pip}$ und die Pipettenspitze einen Zugangswiderstand in das Zellinnere R_A sowie einen Leckwiderstand R_L . Gleich- und Wechselspannungsmessungen

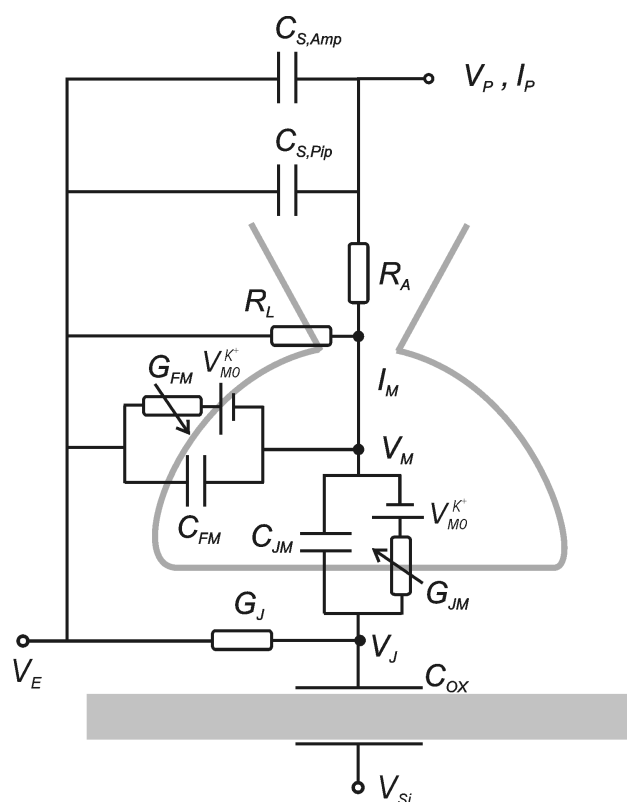


Abbildung 3.15: Ersatzschaltbild der durch Patch Clamp Technik kontaktierten Zelle

an HEK293-Zellen mit hoher Expressionsrate von Ionenkanälen sind aus zwei Gründen messtechnisch schwierig.

Die hohe Expressionsrate der Kanäle in der Zelle führt zu hohen Leitfähigkeiten ($G_M \approx 250nS$) mit Zellströmen bis zu 30 nA, daher verursacht ein fehlerhafter Zugangswiderstand in die Zelle falsch gemessene Spannungen in der Zelle. Der Strom I_M in die Zelle entspricht in der Regel dem vom Verstärker gemessenen Strom I_P , da die Leckströme des Pipetten-Zell-Kontakts im Vergleich zu den Strömen, die durch die Zellmembran bei geöffneten Kanälen fließen, sehr gering sind.

Bei Wechselspannungsmessungen sind die kapazitiven Ströme in das Zellinnere gering (Admittanz der Zelle $\approx 30 nS$), daher entspricht die Spannung V_P in diesem Fall der Spannung

in der Zelle V_M . Problematisch ist der kapazitive Strom in die Zelle. Durch die geringe Grösse der verwendeten Zellen liegt die Zellkapazität in der gleichen Grössenordnung wie die Streukapazität des Verstärkerausgangs und der Pipette. Daher geht eine fehlerhafte Bestimmung der apparativen Grössen direkt in die Bestimmung der Zellkapazität ein. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde wie schon in vorhergehenden Arbeiten keine Abgleichsmechanismen des Verstärkers genutzt [Str01, Wei96]. Dies hat zur Folge, daß der Verstärker lediglich das Pipetteninnere auf die vorgegebene Spannung V_P klemmt und die gemessenen Grössen V_P und I_P in die interessierenden Grössen V_M und I_M umgerechnet werden müssen (siehe dazu Abschnitt 3.5.4). Hierzu müssen jedoch die Parameter, die für die Verfälschung der Messgrössen verantwortlich sind, nämlich der Zugangswiderstand R_A und die Streukapazität C_S , bestimmt werden (Abschnitt 3.5.3).

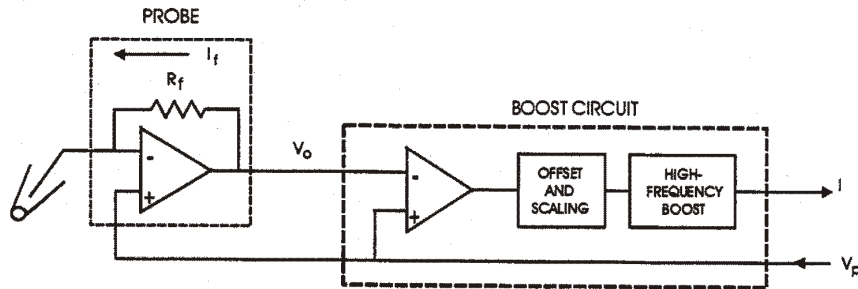


Abbildung 3.16: Ersatzschaltbild des Patch-Clamp-Verstärkers Axopatch 200B. Die an der Pipette anliegende Spannung V_P wird über einen Operationsverstärker mit Hilfe eines Feedbackwiderstandes R_F geklemmt (Skizze aus Handbuch des Verstärkers).

Für die Messungen wurden zwei Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch200B und npi SEC 10L) gewählt. Eine detaillierte Beschreibung des npi SEC 10L findet sich bei [Str01]. Das Ersatzschaltbild des Axopatch200B-Verstärkers ist in Abb. 3.16 dargestellt. Die Spannung am Verstärkerausgang wird durch einen Operationsverstärker durch Strominjektion über einen Feedback-Widerstand R_F auf die Sollspannung V_P geregelt. Da für ein geringes Rauschen des Verstärkers ein möglichst hoher Feedback-Widerstand ($R_F \approx 500 M\Omega$) verwendet wird, ist die Bandbreite des Verstärkers begrenzt. Daher wird diese durch einen zusätzlichen Schaltkreis (Boost Circuit) künstlich erhöht. Der Verstärkereingang besitzt eine innere Streukapazität, die mittels eines Zellmodells zu 4 pF bestimmt wurde. Die innere Streukapazität des SEC 10L-Verstärkers beträgt 10 pF. Bei allen Experimenten wurden die Pipetten nicht beschichtet, um konstante Pipettenstreukapazitäten zu erlangen. Diese wurde einerseits durch Impedanzmessungen an zugeschmolzenen Pipetten wie auch in „cell attached“-Konfiguration bestimmt und lag bei 14 pF. Der Zugangswiderstand lag je nach Qualität des Durchbruchs in das Zellinnere im Bereich zwischen 3 M Ω und 15 M Ω . Hierbei wurden jedoch lediglich Messungen mit einem Zugangswiderstand kleiner 5 M Ω ausgewertet. Der Leckwiderstand nach dem Durchbruch lag im Bereich zwischen 3 G Ω und 500 M Ω .

3.5.3 Bestimmung der Zugangsgrößen $C_{S,Amp}$, $C_{S,Pip}$, R_L und R_A

Bestimmung der Pipettenkapazität $C_{S,Pip}$ und der inneren Verstärkerkapazität $C_{S,Amp}$

Die Pipettenstreu­kapazität kann auf zwei Methoden ermittelt werden. Einerseits über eine Impedanzmessung an einer zugeschmolzenen Pipette im Bad, andererseits über eine Impedanzmessung der die Zelle berührenden Pipette vor dem Durchbruch in die gesamte Zelle ("cell-attached"). Der Leckwiderstand ist im ersten Fall unendlich und im zweiten Fall eine uninteressante Größe, da sich R_L nach dem Durchbruch in die Zelle ändert.

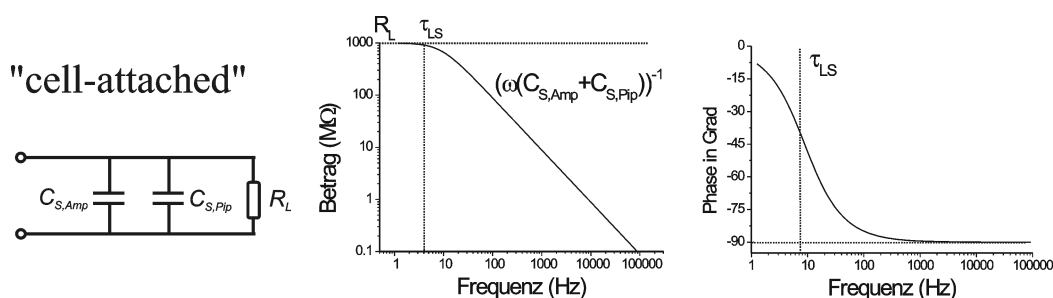


Abbildung 3.17: Bestimmung der Streukapazität C_S in einer "cell-attached"-Messung. Die Modellparameter sind $R_L = 1G\Omega$, $C_{S,Amp} = 4pF$ und $C_{S,Pip} = 14pF$. Die charakteristische Zeitkonstante ist $\tau_{LS} = R_L(C_{S,Amp} + C_{S,Pip})$. Die Streukapazität wird im Bereich $\omega\tau_{LS} \gg 1$ gemessen.

Abb. 3.17 zeigt das Ersatzschaltbild sowie den Betrag und die Phase der Impedanz:

$$|Z| = \frac{R_L}{\sqrt{1 + (\omega\tau_{LS})^2}} \quad \text{mit} \quad \tau_{LS} = R_L(C_{S,Pip} + C_{S,Amp}) \quad (3.6)$$

Ab der Frequenz $\nu_{LS} = \frac{1}{2\pi R_L(C_{S,Amp} + C_{S,Pip})}$ ist der Betrag der Impedanz proportional zu $\frac{1}{\omega(C_{S,Amp} + C_{S,Pip})}$.

Um die innere Kapazität des Verstärkers zu ermitteln, wird an den Verstärkerausgang ein hoher Widerstand (z.B. $R_L = 500 M\Omega$) gegen Masse gelegt. Das Schaltbild ist analog Abb. 3.17 mit fehlender Streukapazität der Pipette $C_{S,Pip}$. Der Betrag der Impedanz ist ab der Frequenz $\nu_{LS,Amp} = \frac{1}{2\pi R_L C_{S,Amp}}$ proportional zu $\frac{1}{\omega C_{S,Amp}}$.

Bestimmung des Leckwiderstandes R_L

Nach dem Durchbruch ("whole-cell") ist das Zellinnere mit der Pipette verbunden und es gilt nun das Schaltbild in Abb.3.18. Bei geschlossenen Kanälen und niedrigen Spaltwiderständen kann das komplexe Ersatzschaltbild der Zelle auf dem Chip (Abb. 3.15) durch die Membrankapazität $C_M = C_{FM} + C_{JM}$ ersetzt werden. Dies ist gerechtfertigt, da der Spaltwiderstand bei den gemessenen Frequenzen im Vergleich zum adhären­ten Membranwiderstand $\frac{1}{i\omega C_{JM}}$ der Zelle noch keine Rolle spielt. Die Streukapazität $C_{S,Amp} + C_{S,Pip}$ wird zu C_S zusammengefasst.

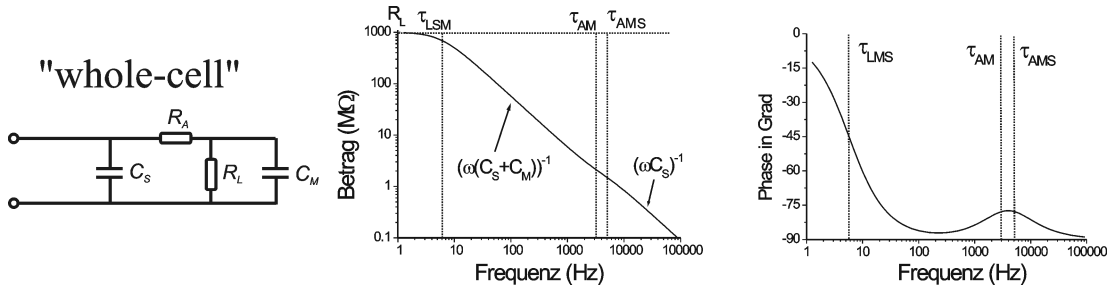


Abbildung 3.18: Bestimmung der restlichen Parameter R_L , C_M und R_A in einer "whole-cell"-Messung. Die Modellparameter sind $R_L = 1G\Omega$, $R_A = 5M\Omega$ und $C_M = 10pF$.

Der Betrag der Impedanz ist bei niedrigen Frequenzen unter Vernachlässigung von R_A :

$$|Z| = \frac{R_L}{\sqrt{1 + (\omega\tau_{LSM})^2}} \quad \text{mit} \quad \tau_{LSM} = R_L(C_S + C_M) \quad (3.7)$$

Unterhalb der Frequenz $\nu_{LSM} = \frac{1}{2\pi\tau_{LSM}}$ kann also R_L bestimmt werden.

Bestimmung der Membrankapazität C_M

Die Membrankapazität C_M ist zwar keine Zugangsgröße, jedoch für die AC-Übertragungsfunktion auf den Transistor eine wichtige Größe. Gleichung 3.7 kann umgeschrieben werden zu:

$$|Z| = \frac{1}{\omega(C_S + C_M)} \cdot \frac{\omega\tau_{LSM}}{\sqrt{1 + (\omega\tau_{LSM})^2}} \quad (3.8)$$

Ab $\omega\tau_{LSM} \gg 1$ ist der Betrag der Impedanz proportional zu $\frac{1}{\omega(C_S + C_M)}$. Mit Kenntnis von C_S kann somit C_M gemessen werden.

Bestimmung des Zugangswiderstandes R_A

Bei hohen Frequenzen kann der Leckwiderstand R_L vernachlässigt werden. Der Betrag der Impedanz ist in diesem Bereich:

$$|Z| = \frac{1}{\omega(C_S + C_M)} \cdot \frac{\sqrt{1 + (\omega\tau_{AM})^2}}{\sqrt{1 + (\omega\tau_{ASM})^2}} \quad (3.9)$$

$$\text{mit} \quad \tau_{AM} = R_A C_M \quad \text{und} \quad \tau_{ASM} = R_A \frac{C_S C_M}{C_S + C_M}$$

Die charakteristische Frequenz ν_{AM} markiert den Anstieg und die charakteristische Frequenz ν_{ASM} den Abstieg der Phase der Impedanz in Abb. 3.18. Für $\omega\tau_{ASM} \gg 1$ geht der Betrag der Impedanz über in:

$$|Z| = \frac{1}{\omega C_S} \quad (3.10)$$

Der Zugangswiderstand R_A kann nur durch Bestimmung der Zeitkonstanten errechnet werden, diese Größe ist demnach am höchsten fehlerbehaftet.

3.5.4 Berechnung von V_M und I_M aus V_P und I_P

Nachdem nun die Zugangsgrößen bestimmt sind, soll nun eine Methode zur Berechnung von V_M, I_M aus V_P, I_P bei Gleich- und Wechselspannung erläutert werden. Das Ersatzschaltbild in Abb. 3.15 wird reduziert, indem die Impedanz der Zelle als Z_{cell} zusammengefasst wird (siehe Abb.3.19).

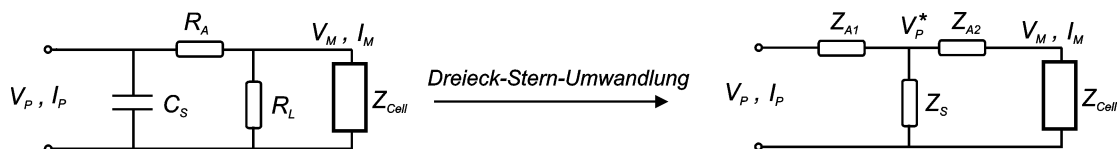


Abbildung 3.19: Vereinfachung des Netzwerkes der Messapparatur

Durch eine Umwandlung der π -Schaltung aus den Größen C_S, R_A und R_L in eine T-Schaltung zu den neuen Größen Z_{A1}, Z_S und Z_{A2} wird das Netzwerk um einen Knotenpunkt reduziert. Unter der Voraussetzung $R_A \ll R_L$ und mit der charakteristischen Zeitkonstante $\tau_{LS} = R_L C_S$ sind:

$$Z_{A1} = R_A \cdot \frac{1-i(\omega\tau_{LS})}{1+(\omega\tau_{LS})^2}$$

$$Z_S = R_L \cdot \frac{1-i(\omega\tau_{LS})}{1+(\omega\tau_{LS})^2}$$

$$Z_{A2} = R_A \cdot \frac{(\omega\tau_{LS})^2+i(\omega\tau_{LS})}{1+(\omega\tau_{LS})^2}$$

Abb. 3.20 zeigt ein Beispiel mit typischen Parametern ($R_L = 1 \text{ G}\Omega$, $R_A = 5 \text{ M}\Omega$ und $C_S = 10 \text{ pF}$). Z_S entspricht bei niedrigen Frequenzen dem Leckwiderstand R_L und geht bei

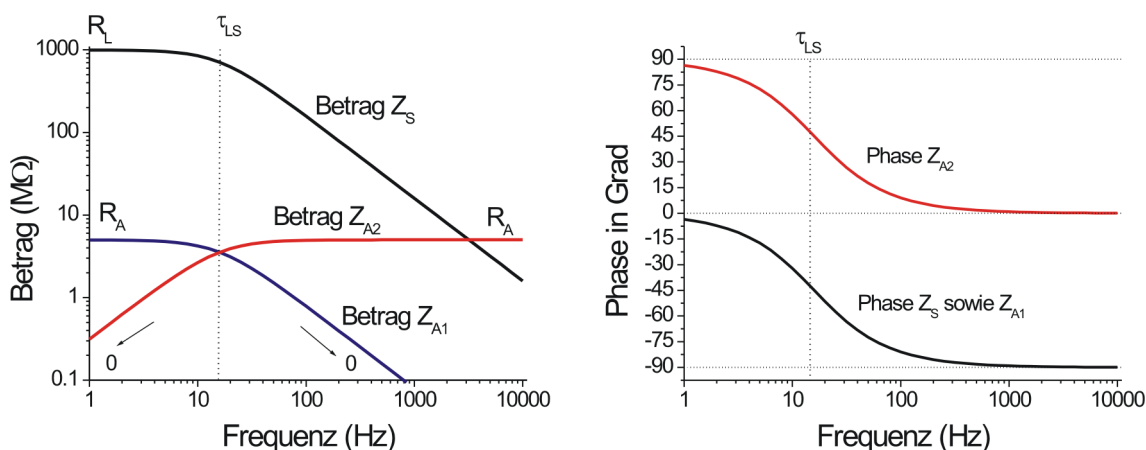


Abbildung 3.20: Betrag und Phase der Impedanzen Z_{A1}, Z_S und Z_{A2}

hohen Frequenzen über in die reine Streukapazität $\frac{1}{i\omega C_S}$. Die Zugangswiderstände Z_{A1} und Z_{A2} ändern bei der Frequenz ν_{LS} ihren Betrag wechselseitig von R_A zu Null, damit liegt bei niedrigen Frequenzen der Zugangswiderstand R_A vor der Streuimpedanz Z_S , bei hohen Frequenzen verschiebt sich R_A zwischen die Streuimpedanz Z_S und der Zellimpedanz Z_{cell} .

Unter Verwendung der in Abb. 3.19 eingeführten virtuellen Spannung V_P^* können V_P und I_P zu V_M und I_M korrigiert werden:

$$V_P^* = V_P - Z_{A1} \cdot I_P \quad (3.11)$$

$$I_M = I_P - \frac{V_P^*}{Z_S}$$

$$V_M = V_P^* - Z_{A2} \cdot I_M$$

Grenzfall $\omega=0$

Im Gleichspannungsfall vereinfacht sich die Korrektur zu ($V_P^* = V_M$):

$$I_M^{DC} = I_P^{DC} - \frac{V_M^{DC}}{R_L} \quad (3.12)$$

$$V_M^{DC} = V_P^{DC} - R_A \cdot I_P^{DC}$$

Grenzfall $\omega\tau_{LS} \gg 1$

Bei hohen Frequenzen vereinfachen sich die Gleichungen in Formel 3.11 zu ($V_P^* = V_P$):

$$I_M^{AC} = I_P^{AC} - V_P^{AC} \cdot i\omega C_S \quad (3.13)$$

$$V_M^{AC} = V_P^{AC} - R_A \cdot I_M^{AC}$$

Sonderfall $1/\tau_{LS} \ll \omega \ll 1/\tau_{AM}$

Bei kleinen Spaltwiderständen kann die Impedanz der Zelle Z_{cell} durch die Membrankapazität $\frac{1}{i\omega C_M}$ ersetzt werden. Im Bereich $1/\tau_{LS} \ll \omega \ll 1/\tau_{AM}$, in dem Formel 3.8 gültig ist, ist die gemessene Impedanz des gesamten Systems gleich

$$\frac{V_P}{I_P} = \frac{1}{i\omega(C_S + C_M)}$$

Unter der Voraussetzung, daß der Zugangswiderstand vernachlässigt werden kann, gelten dann die einfachen Beziehungen für V_M und I_M :

$$V_M = V_P \quad (3.14)$$

$$I_M = i\omega(C_S + C_M)V_P - i\omega C_S V_P = i\omega C_M V_P$$

Da in diesem Bereich I_P , der Streustrom $V_P^{AC} \cdot i\omega C_S$ und I_M phasengleich sind, gilt für

die Beträge:

$$|V_M| = |V_P| \tag{3.15}$$

$$|I_M| = |I_P| - |\omega C_S|$$

Bei den Messungen wurde darauf geachtet, daß sowohl der Leckwiderstand R_L gross genug als auch der Zugangswiderstand R_A klein genug war, um den letzten Sonderfall zu erfüllen.

Kapitel 4

Zell-Transistor-Kopplung

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse im Hinblick auf die Kopplung von HEK293-Zellen, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 exprimieren, mit einem Feldeffekttransistor mit nichtmetallisierter Gate-Oberfläche vorgestellt.

Die Zellen wurden mittels Patch-Clamp-Technik kontaktiert und auf vorgegebene intrazelluläre Spannungen geklemmt. Durch eine Depolarisation der Zelle wurden die Kanäle geöffnet und ein resultierender Strom in die Zelle sowie ein damit verbundenes Transistorsignal aufgezeichnet.

Ausserdem wurde die Kopplung der Zelle an den Transistor in der Umgebung von verschiedenen Badelektrolyten untersucht, um einen Parametersatz an gemessenen Signalen zu gewinnen und damit den Einfluß der Salzkonzentration auf das Transistorsignal besser zu verstehen. Daher wurde die Natriumkonzentration im Bad verändert, wobei sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Kaliumkonzentration konstant gehalten wurde, um den Einfluß einer sich ändernden Triebkraft über die Zellmembran auf das Transistorsignal weitgehend auszuschliessen.

4.1 Transistorsignal in elektrophysiologischer Lösung

Zunächst sollen HEK293-Zellen in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden. Die Zusammensetzung der elektrophysiologischen Badlösung betrug 5 mM Kaliumchlorid, 135 mM Natriumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid. Der pH wurde auf 7.4 mit Natronlauge abgeglichen. Zellen, die auf der Gate-Region eines Transistors lagen, wurden mit einer Patch-Pipette im „whole-cell“-Modus verbunden. Die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung war 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA (Calciumpuffer) und 5 mM HEPES (pH 7.4), somit war das Nernstpotential für die Kaliumionen $V_{M0}^{K^+} = -84$ mV.

Abb. 4.1 zeigt drei Beispiele von HEK293-Zellen mit Kv1.3 Ionenkanälen auf einer nichtmetallisierten Gateregion (weißes Kästchen) eines p-Kanal-Feldeffekttransistors. Sowohl die Grösse als auch die Lage dieser Zellen auf der Gateregion des Transistors sind unterschiedlich. Bei $t=0$ ms wurde für eine Dauer von 50 ms ein depolarisierender Spannungspuls von 170 mV angelegt und der resultierende Zellstrom sowie das Transistorsignal aufgezeichnet. Das Öffnen der Kanäle führt nach dem Abklingen der kapazitiven Transienten zu einem schnellen Anstieg des Stroms in die Zelle I_M , der abhängig von der Zellgrösse und dem

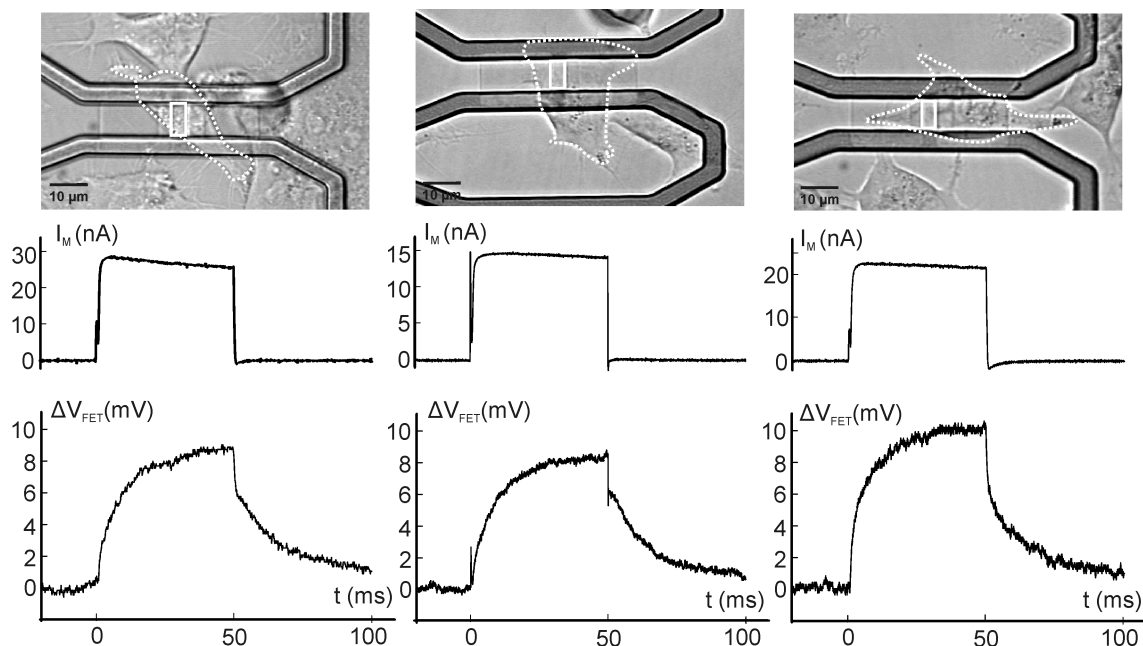


Abbildung 4.1: Drei Beispiele von HEK293-Zellen in elektrophysiologischer Lösung auf Feldefekttransistoren. Die Zellen wurden auf +100 mV depolarisiert und der Strom sowie das Transistorsignal aufgenommen.

Transfektionsgrad der Zellen im Bereich zwischen 15 nA und 30 nA lag.

Trotz unterschiedlicher Zellströme und Lage der Zellen ist in allen drei Fällen die Höhe sowie die Form des Transistorsignals ähnlich. Auf einen schnellen Anstieg des Signals folgt eine langsame Signalkomponente mit einer Zeitkonstante von etwa 10 ms. Eine Rückkehr des Spannungspulses auf -70 mV führt wiederum auf einen schnellen Spannungssprung, gefolgt von einer langsamen Relaxation auf das Ausgangssignal.

Bei einer Hyperpolarisation der Zelle auf -100 mV wurden lediglich kapazitive Transienten als Antwort auf die schnelle Spannungsänderung in der Zelle sowohl im Zellstrom als auch im Transistorsignal beobachtet. Daraus kann der Schluss gezogen werden, daß das Öffnen der Kaliumkanäle in der unteren Membran der Zelle verantwortlich für die oben gezeigten Transistorsignale ist.

Die typische Signalform des Transistorsignals wurde bei einer Vielzahl von Messungen ($n=30$) beobachtet. Die charakteristischen Eigenschaften wie das Amplitudenverhältnis zwischen langsamer und schneller Signalkomponente sowie die Zeitkonstante des langsamen Signalanstiegs werden in der Diskussion der Messdaten (Kapitel 6) noch weiter behandelt werden.

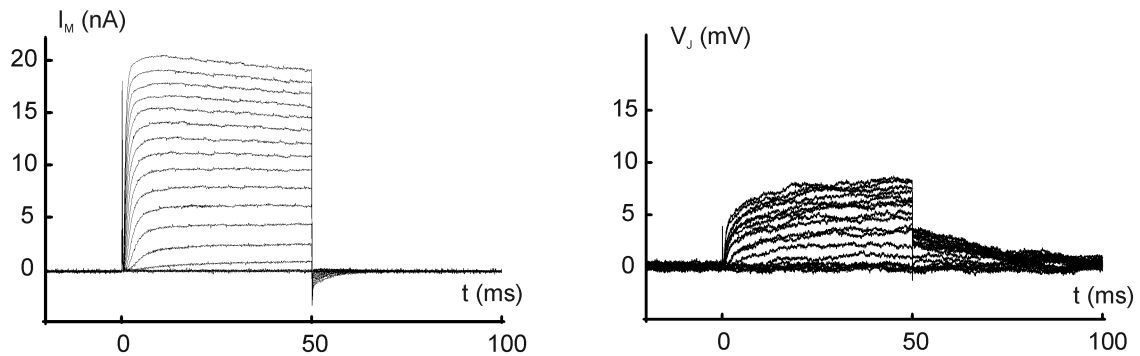
4.2 Gatingverhalten der Ionenkanäle in elektrophysiologischer und natriumfreier Lösung

Für ein tieferes Verständnis der Kopplungseigenschaften der Ionenkanäle an den Transistor wurde die Zelle in 10 mV-Schritten von -70 mV auf +100 mV depolarisiert, um die Gatingeigenschaften der Kanäle und das daraus resultierende Transistorsignal zu un-

4.2. GATINGVERHALTEN DER IONENKANÄLE IN ELEKTROPHYSIOLOGISCHER UND NATRIUMFREIER LÖSUNG

tersuchen. Eine eingehende Diskussion findet sich im nächsten Kapitel. In Abbildung 4.2

Elektrophysiologische Lösung



Natriumfreie Lösung

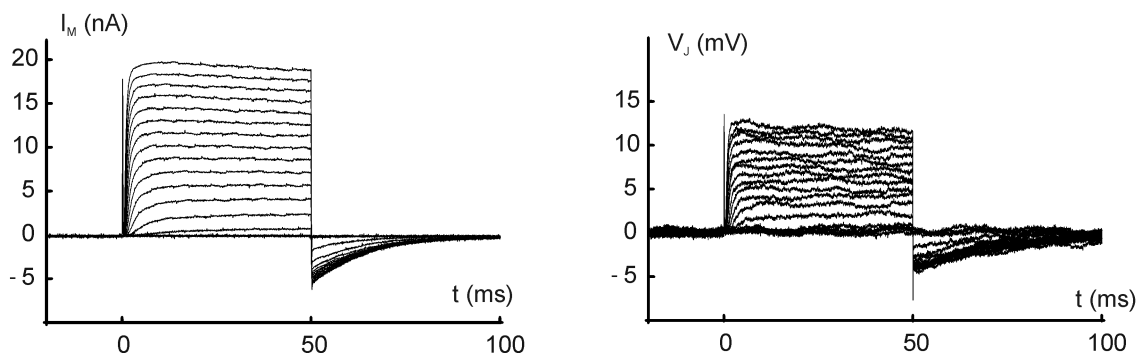


Abbildung 4.2: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in HEK293-Zellen bei zwei verschiedenen Bad-elektrolyten.

sind auf der linken Seite die resultierenden Ströme in die Zelle dargestellt. Hierbei wurde an einer Zelle das Gatingverhalten der Kanäle bei zwei verschiedenen extrazellulären Lösungen untersucht. Der Übergang von elektrophysiologischer Lösung zu einer natriumfreien Lösung (gleiche Zusammensetzung, nur ohne Natriumchlorid, die Osmolalität wurde durch vermehrte Zugabe von Glukose konstant gehalten) zeigte keine Auswirkung auf das Öffnungsverhalten der Kanäle in der Membran (die verstärkten negativen Ströme („Tail Currents“) bei der Rückkehr der intrazellulären Spannung auf -70 mV in natriumfreier Lösung waren nicht signifikant für diese Art der Lösung).

Das Transistorsignal ändert sich jedoch deutlich bei Austausch der Lösung. Einerseits führt das Entfernen von Natriumchlorid aus der Lösung zu einem erwarteten erhöhten schnellen Signalabfall am Ende des Spannungspulses, andererseits verändert sich ebenfalls die Signalform im Vergleich zum Signal in elektrophysiologischer Lösung deutlich. Bis auf kleine Unterschiede gleicht die Form des Transistorsignals der zeitabhängigen Amplitude des intrazellulären Stroms. Vergleicht man die Gesamtamplitude der beiden Signale in den unterschiedlichen Lösungen, so ist der Unterschied nicht so drastisch wie erwartet. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß die Kopplung nicht nur von elektrischer Natur ist (siehe dazu Kapitel 6 sowie den Theorieteil).

4.3 Variation der extrazellulären Natriumkonzentration

Für die Untersuchung der sich ändernden Signalform bei einem Übergang von elektro-physiologischer zu natriumfreier Lösung ist es sinnvoll, den Zellstrom konstant zu halten, um vergleichbare Signale zu erhalten. Daher wurden in dieser Arbeit Experimente durchgeführt, bei denen eine Zelle gleichbleibend mit 170 mV ausgehend von -70 mV depolarisiert und das Transistorsignal sowie der Zellstrom bei einer graduellen Reduzierung der Natriumkonzentration gemessen wurde. Um eine Verschiebung des Elektrodenpotentials der Silber/Silberchlorid-Elektrode zu vermeiden, wurde bei Lösungsaustausch-Messungen eine Salzbrücke verwendet. In Abbildung 4.3 ist ein Beispiel für diese Art der Messung

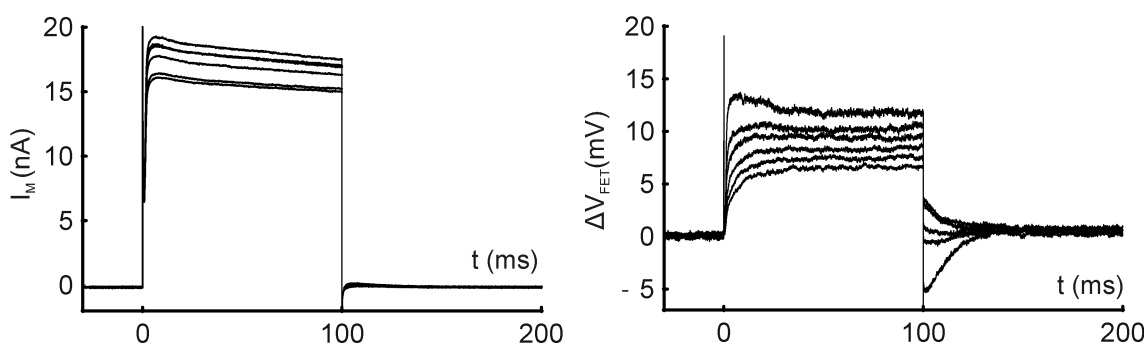


Abbildung 4.3: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in HEK293-Zellen bei einer Variation der Salzkonzentration.

gezeigt. Hier wird der Einfluß der Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration (in mM: 80, 60, 40, 20, 10, 0) auf das Transistorsignal deutlich. Der Signaltyp bei hoher Natriumkonzentration (80 mM) ähnelt den Signalen, die in elektro-physiologischer Lösung gemessen wurden. Ab einer Natriumkonzentration von 20 mM verändert sich jedoch die Form der Transistorantwort signifikant. So verschwindet der langsame Anstieg des Signals bei Öffnen der Ionenkanäle und geht über in eine schnelle Signalantwort verbunden mit einem langsamen Signaleinbruch. Auffallend ist auch, daß im Gegensatz zum Strom in die Zelle I_M das Transistorsignal V_{FET} am Ende des Spannungspulses nicht auf das Ausgangssignal zurückkehrt, sondern zunächst invertiert und danach langsam auf die Nulllinie relaxiert.

4.4 Variation der extrazellulären Natriumkonzentration ohne zweiwertige Ionen

Da die natriumfreie Lösung in den vorhergehenden Abschnitten nach wie vor Calcium- sowie Magnesiumchlorid beinhaltet, wurden schliesslich Experimente durchgeführt, bei denen die extrazelluläre Lösung nur noch Kaliumchlorid (5 mM) und eine variable Natriumkonzentration enthält, um den Einfluss der zweiwertigen Ionen auf das Transistorsignal aufzuklären. In Abbildung 4.4 ist eine Messung gezeigt, bei der die Natriumkonzentration schrittweise (in mM: 120, 100, 80, 60, 40, 20, 10) reduziert wurde. Der Zellstrom I_M blieb bei Austausch der Lösungen nahezu konstant. Der Vergleich zu der in Abbildung 4.3 gezeigten Messung zeigt deutliche Unterschiede. So bleibt der langsame Signalanstieg mit der

4.4. VARIATION DER EXTRAZELLULÄREN NATRIUMKONZENTRATION OHNE ZWEIWERDIGE IONEN

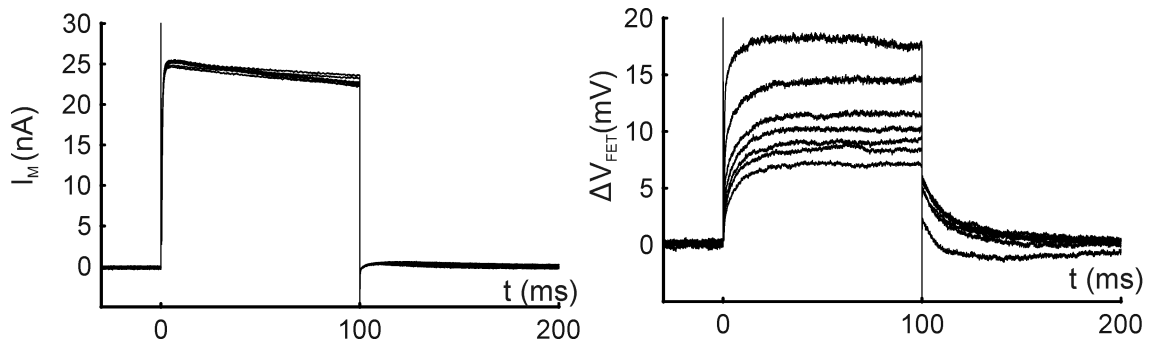


Abbildung 4.4: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in HEK293-Zellen bei einer Variation der Salzkonzentration.

Abnahme von Natriumchlorid weiter erhalten, lediglich die Anstiegszeit des Transistorsignals wird etwas kürzer. Zusätzlich ist kein Unterschwingen des Signals bei der Rückkehr der intrazellulären Spannung auf das Haltepotential von -70 mV zu beobachten. Es zeigt sich also ganz deutlich, daß der Einfluß der zweiwertigen Ionen auf das Transistorsignal bei natriumarmen Lösungen nicht zu vernachlässigen ist.

Die vorgestellten Beispielmessungen sollen nun in den zwei folgenden Kapiteln diskutiert werden, dabei werden zunächst nur die schnellen Signalsprünge am Ende des intrazellulären Spannungspulses, die einer elektrischen Kopplung zugeschrieben werden, untersucht. Darauf folgend wird der langsame Signalanstieg, der als Reaktion der Transistoroberfläche auf Konzentrationsänderungen gedeutet wird, genauer diskutiert werden.

Kapitel 5

Elektrische Zell-Transistor-Kopplung

In diesem Kapitel soll die reine elektrische Zell-Transistor-Kopplung diskutiert werden. Wie in Abschnitt 2.1.3 gezeigt wurde, kann für die Beschreibung der elektrischen Kopplung ein Ersatzschaltbild aus Kapazitäten und Widerständen verwendet werden. In diesem Modell wird die Kopplungsfläche auf einen Punkt reduziert.

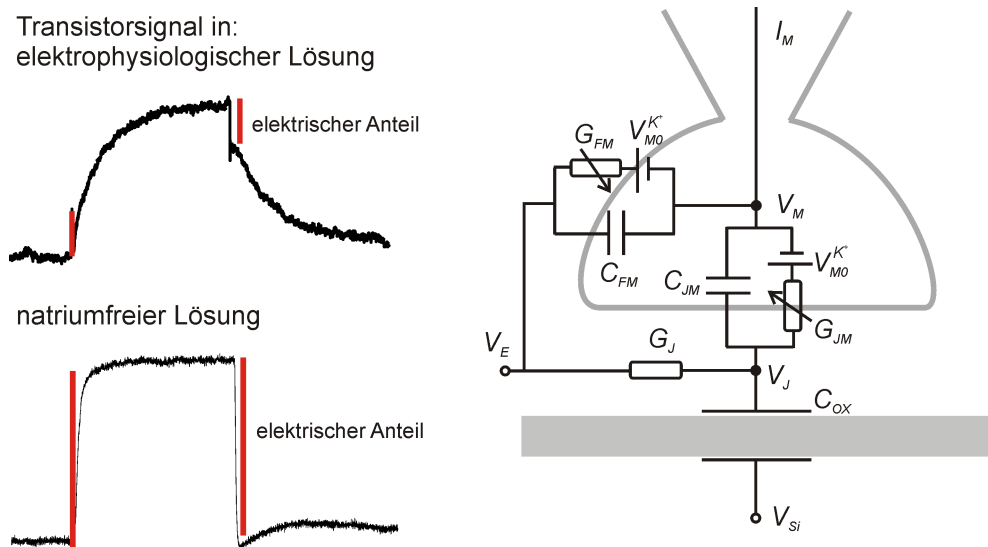
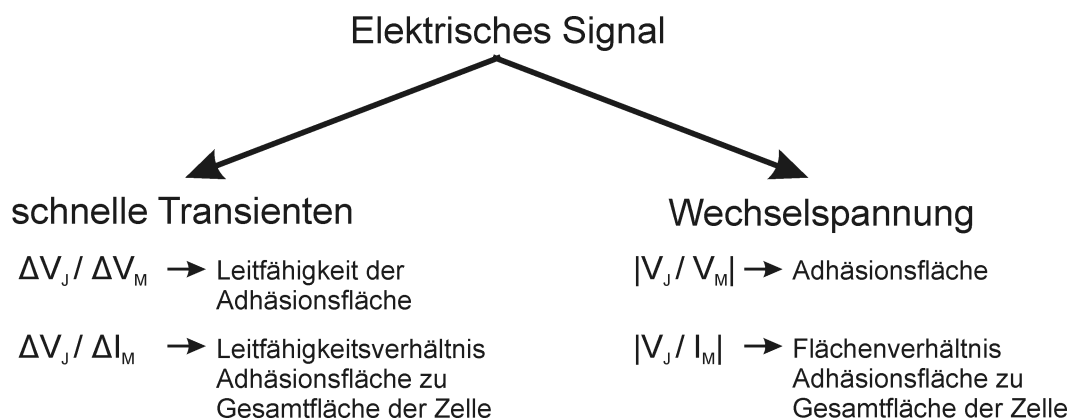


Abbildung 5.1: Die elektrische Zell-Transistor-Kopplung kann durch ein Ersatzschaltbild aus Membrankapazitäten und Membranleitfähigkeiten beschrieben werden. Die Kopplung erfolgt durch einen Spannungsabfall über den Spaltwiderstand G_J^{-1} . Für die Auswertung der Daten wurde der Sprung des Zellstroms mit dem des Transistorsignals (rote Balken) verglichen.

In Abbildung 5.1 ist das Ersatzschaltbild und zwei Typen von Transistorsignalen dargestellt. Während in elektrophysiologischer Lösung das Signal aus einer langsamen und schnellen Komponente zusammengesetzt ist, scheint das Signal in natriumfreier Lösung aus einem rein elektrischen Signal (roter Balken) zu bestehen. Die Ursache für die unterschiedliche Signalform wird im nächsten Kapitel behandelt werden, zunächst soll nur der schnelle elektrische Anteil Gegenstand der Untersuchung sein. Die Reduktion auf das

Punktkontaktmodell führt zu einer Beschreibung in absoluten Grössen, dabei ist $C_{OX} + C_{JM}$ die Gesamtkapazität des Spaltes, $C_{JM} + C_{FM}$ die Gesamtkapazität der Zelle und G_{JM} und G_{FM} ist die Gesamtleitfähigkeit der Adhäsionsmembran sowie der freien Membran. Eine wichtige Konsequenz dieses Modells ist, daß die Leitfähigkeit des Spaltes G_J unabhängig von der Adhäsionsfläche ist. Dies hat zur Folge, daß bei einer konstanten spezifischen Membranleitfähigkeit die Kopplungsstärke bei einer Erhöhung der Kopplungsfläche zunimmt.

Das Schaubild zeigt die verschiedenen Aspekte, die mit der elektrischen Zell-Transistor-Kopplung untersucht werden können. Hierzu wurden zwei Arten der Kopplung verwendet, die Messung von schnellen Spannungs-/Stromtransienten bei Öffnen und Schliessen der Ionenkanäle und Wechselspannungsmessungen bei geschlossenen Kanälen.



- Einerseits können durch Spannungspulse die Kanäle geöffnet werden und damit die Leitfähigkeiten der Kanäle in der Gesamtmembran sowie in der unteren Membran, die zum Transistorsignal beitragen, bestimmt werden.
- Bei Wechselspannungsmessungen können durch kapazitive Ströme über die Membran bei geschlossenen Kanälen die Kapazitäten der Gesamt- und Adhäsionsmembran gemessen werden. Da die spezifische Kapazität der Zellmembran bekannt ist, können die Kapazitäten direkt in Flächen umgerechnet werden.
- Durch die Kombination beider Messverfahren können somit einerseits die absoluten Zellparameter vollständig bestimmt werden als auch Fragestellungen bzgl. spezifischer Grössen wie z.B. Bestimmung der spezifischen Membranleitfähigkeit beantwortet werden.
- Durch Veränderung der Salzkonzentration (Reduktion der Natriumkonzentration) konnte einerseits die Kopplungsstärke sowie das Signal/Rausch-Verhältnis stark erhöht werden als auch der Spaltwiderstand als Parameter variiert werden.

5.1 Umrechnung der Messgrößen mit Hilfe des Spaltwiderstandes

Aus Gleichung 2.9 können die Spaltleitfähigkeiten der verwendeten Lösungen errechnet werden. Als Zell-Substrat-Abstand wird 70 nm verwendet [Gle03]. Die spezifische Leitfähigkeit der natriumfreien Lösung betrug 1.364 mS/cm, die der elektrophysiologischen Lösung war 15.2 mS/cm. Somit ergeben sich die Spaltwiderstände $R_J = 5.76 \text{ M}\Omega$ bzw. $R_J = 520 \text{ k}\Omega$. Mit diesen Werten können nun die gemessenen Daten in die entsprechenden Leitfähigkeiten und Flächen umgewandelt werden.

Aus den gemessenen Größen I_M , V_M und V_J (AC sowie DC) können entsprechend Kapitel 2 die interessierenden Größen G_M , G_{JM} , A_M und A_{JM} berechnet werden.

Berechnung der Flächen

Im Falle der Wechsellspannungsanregung können V_J und V_M direkt gemessen werden, I_M erhält man nach Abzug des Streustroms der Pipette ($C_S = 18 \text{ pF}$). Die Flächen erhält man nach Umformung der Gleichungen 2.18 und 2.22:

$$A_{JM} = \left| \frac{V_J}{V_M} \right| \cdot \frac{G_J}{\omega c_M} \quad A_M = \left| \frac{I_M}{V_M} \right| \cdot \frac{1}{\omega c_M} \quad \frac{A_{JM}}{A_M} = \left| \frac{V_J}{I_M} \right| \cdot G_J \quad (5.1)$$

Die spezifische Membrankapazität c_M ist gleich $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, somit kann durch einen linearen Fit über die Frequenz die Adhäsionsfläche bestimmt werden. Für das Verhältnis der Flächen wird die Frequenz als Parameter verwendet und die Steigung des Stroms gegen die Spaltspannung linear gefittet.

Berechnung der Leitfähigkeiten

Durch die Auswertung der Spannungs- sowie der Stromsprünge ΔV_M , ΔV_J und ΔI_M bei Depolarisationsexperimenten können die Membranleitfähigkeiten bei geöffneten Kanälen bestimmt werden. In diesem Fall sind ΔV_J und ΔI_M gute Messgrößen, die Spannungsdifferenz ΔV_M erhält man durch Einrechnung des Spannungsabfalls über den Pipettenzugangswiderstand R_A bei dem jeweils gemessenen Strom I_M .

Die Werte für die Leitfähigkeiten im allgemeinen Fall erhält man aus Umformung der Gleichungen 2.10 und 2.12:

$$G_{JM} = \frac{\Delta V_J}{\Delta V_M - \Delta V_J} \cdot G_J \quad G_M = \frac{\Delta I_M}{\Delta V_M} + \frac{\Delta V_J}{\Delta V_M} \cdot \frac{\Delta V_J}{\Delta V_M - \Delta V_J} \cdot G_J \quad (5.2)$$

Will man aus dem Quotienten $\frac{\Delta V_J}{\Delta I_M}$ das Leitfähigkeitsverhältnis $\frac{G_{JM}}{G_M}$ berechnen, so erfolgt dies mit Hilfe der folgenden Formel:

$$\frac{G_{JM}}{G_M} = \frac{(G_M - \frac{\Delta I_M}{\Delta V_J}) + \sqrt{(G_M - \frac{\Delta I_M}{\Delta V_J})^2 + 4 \cdot G_M \cdot G_J}}{2 \cdot G_M} \quad (5.3)$$

Bei Verwendung einer elektrophysiologischen Lösung gilt $\Delta V_M \gg \Delta V_J$, damit vereinfachen sich die Gleichungen zu:

$$G_{JM} = \frac{\Delta V_J}{\Delta V_M} \cdot G_J \quad G_M = \frac{\Delta I_M}{\Delta V_M} \quad \frac{G_{JM}}{G_M} = \frac{\Delta V_J}{\Delta I_M} \cdot G_J \quad (5.4)$$

5.2 Gating der Kanäle in elektrophysiologischer und natriumfreier Lösung

In diesem Abschnitt soll nun durch eine Kombination von Wechselspannungsmessungen und Depolarisationsmessungen der Zelle die Eigenschaften des Zell-FET-Systems untersucht werden. Dazu wurden Experimente in zwei verschiedenen Elektrolyten durchgeführt, einer elektrophysiologischen Lösung (5 mM Kaliumchlorid, 135 mM Natriumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 5 mM HEPES, pH 7.4) und einer natriumfreien Lösung (gleiche Zusammensetzung ohne Natriumchlorid, Osmolalität durch Glukose ausgeglichen).

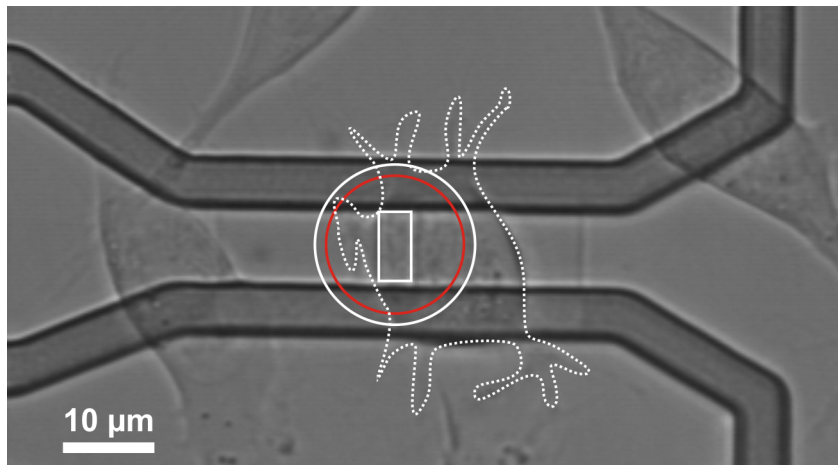


Abbildung 5.2: HEK293-Zelle auf der Gate-Region eines FET, deren Messung in diesem Abschnitt beschrieben wird. Das Bild wurde vor der Kontaktierung durch eine Patch-Pipette aufgenommen.

In Abbildung 5.2 ist eine Zelle bevor der Kontaktierung gezeigt, auf deren Messung im folgenden eingegangen wird. Die Gate-Region des Feldeffekttransistors ist weiß hervorgehoben. Durch Wechselspannungsmessungen wurde die Kopplungsfläche bestimmt und als weißer (elektrophysiologische Lösung) sowie als roter (natriumfreie Lösung) eingezeichnet.

Die Zelle wurde nach der Kontaktierung durch eine Patchpipette zunächst in elektrophysiologischer Lösung durch Spannungspulse von -70 mV auf stufenweise +100 mV in 10 mV-Schritten depolarisiert. Die Zeitdauer des Spannungspulses betrug 50 ms. Nach Abschluss der Wechselspannungsmessungen wurde die Lösung gegen eine natriumfreie Lösung ausgetauscht und das Experiment wiederholt.

5.2.1 Elektrophysiologische Lösung

Zunächst soll das Gatingverhalten der Ionenkanäle in natürlicher Umgebung untersucht werden. Wie schon am Anfang des Kapitels beschrieben, führt das Öffnen der Kanäle in der Adhäsionsmembran zu einem Transistorsignal mit einer langsamen und schnellen Signalkomponente. Um den Gesamtstrom in die Zelle mit der Antwort des FET vergleichen zu können, soll das schnelle Signal am Ende des Spannungspulses und die Zellstromdifferenz miteinander verglichen werden. Zieht man nur die Differenzen des Stroms und der Spaltspannung in Betracht, so können die Leitfähigkeiten ohne Miteinrechnung des Umkehrpotentials der Kaliumionen ermittelt werden, da dieses während des schnellen Spannungssprungs unverändert bleibt.

Gating der Kanäle in der Adhäsionsmembran und der gesamten Membran

In Abbildung 5.3 ist nun der Zellstrom sowie das FET-Signal gegen die Zeit aufgetragen. Die Gatingkurven wurden entsprechend den Gleichungen 5.4 in die entsprechenden Leitfähigkeiten umgerechnet. Die Spannungen V_M in der Zelle wurden über die angelegten Spannungen an die Pipette (-70 mV bis +100 mV) durch Korrektur des Spannungsabfalls über den Zugangswiderstand ($R_A = 3 \text{ M}\Omega$) berechnet. Die Gatingkurve der Kanäle in

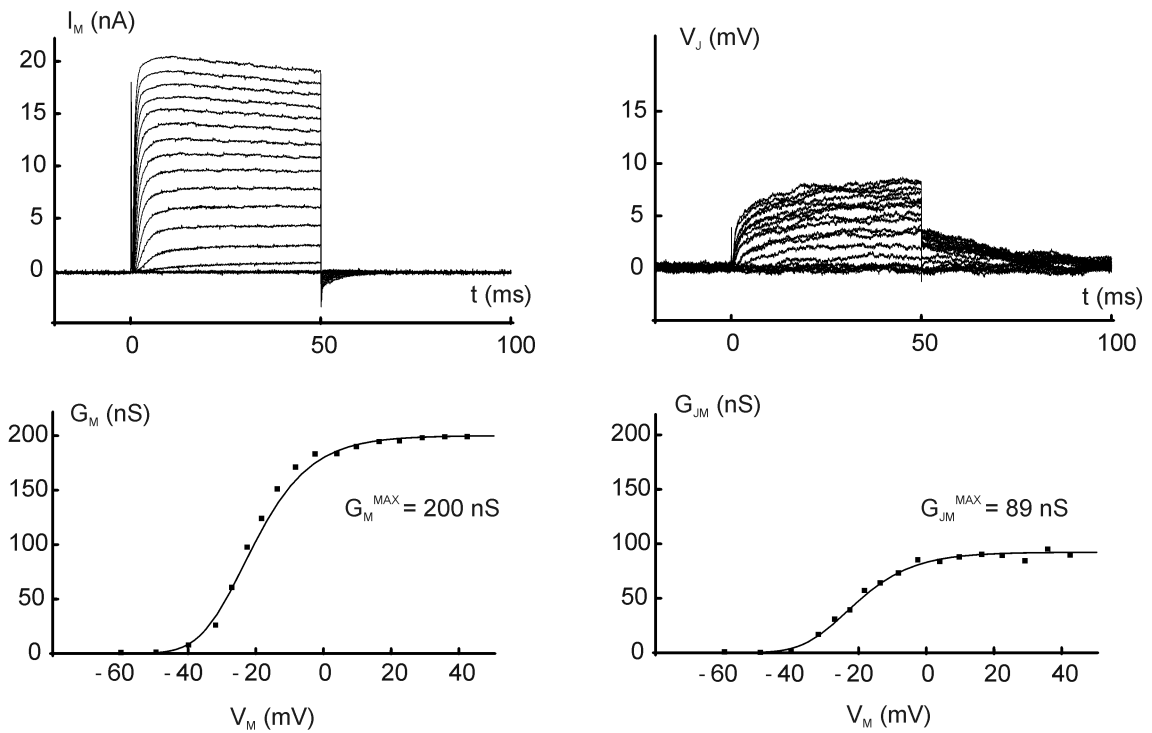


Abbildung 5.3: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in elektrophysiologischer Lösung. Die Auswertung der schnellen Signalantwort am Ende des intrazellulären Spannungspulses führt zu den Leitfähigkeiten in der Gesamtmembran G_M sowie in der Adhäsionsmembran G_{JM} .

der Gesamtmembran und der Adhäsionsmembran wurde entsprechend Gleichung 3.2 ohne Berücksichtigung der Inaktivierung gefittet:

$$G_{M,JM}(V_M) = G_{M,JM}^{\text{max}} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-(V_M + 38 \text{ mV})/10.5 \text{ mV}}} \right)^4 \quad (5.5)$$

Die maximale absolute Leitfähigkeit betrug 200 nS für die Gesamtmembran und 89 nS für die Adhäsionsmembran. Es konnte kein unterschiedliches Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in der Adhäsionsmembran im Vergleich zur Gesamtmembran festgestellt werden. Die gleiche Beobachtung wurde bei hSlo-Kanälen in HEK293-Zellen gemacht [Str01].

Adhäsionsfläche und Flächenverhältnis

Will man die absolut gemessenen Leitfähigkeiten in spezifische Größen umrechnen, so müssen die zugehörigen Flächen bestimmt werden. Dies kann über eine Wechselspannungsmessung bei geschlossenen Kanälen, bei der die Kopplung rein über kapazitive Ströme erfolgt, gemessen werden. Die Anregungsspannung δV_M im Zellinneren war 10 mV, die Frequenz wurde in linearen Schritten von 200 Hz bis 1200 Hz variiert. Um die Gesamtfläche A_M zu berechnen, wird die Admittanz der Zelle $\left| \frac{I_M}{V_M} \right|$ gegen die Frequenz aufgetragen. Für die Ermittlung der Kopplungsfläche A_{JM} wird die Übertragungsfunktion $\left| \frac{V_J}{V_M} \right|$ gegen die Frequenz linear gefittet. Diese Kopplungsfläche von $270 \mu\text{m}^2$ wurde in Abbildung 5.2 als weißer Kreis um die Gateregion des FET eingezeichnet. Hier zeigt sich, daß die Kopplungsfläche nicht immer die gesamte Adhäsionsfläche der Zelle abdeckt, sondern die effektive Fläche darstellt, die an den Transistor koppelt. Dies ist in Abbildung 5.4 abgebildet. Die

Flächenbestimmung durch Wechselspannung bei geschlossenen Kanälen

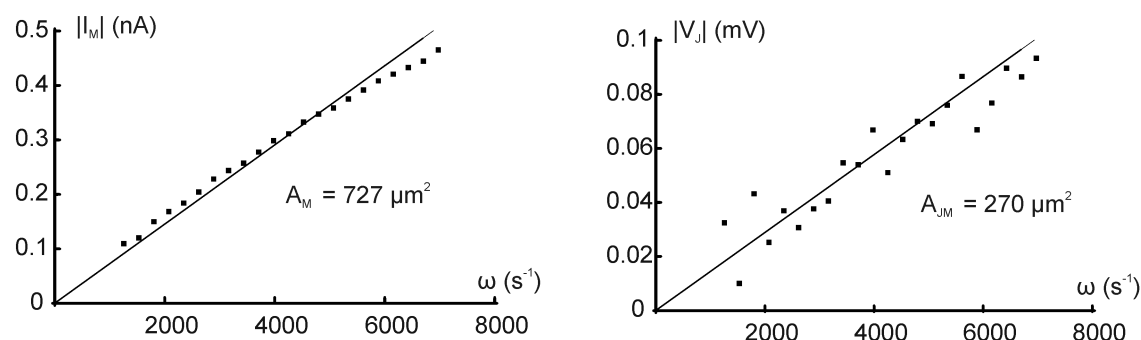


Abbildung 5.4: Bestimmung der Flächen der Gesamtmembran sowie der Adhäsionsmembran in elektrophysiologischer Lösung durch sinusförmige Modulation der intrazellulären Spannung ($\delta V_M = 10\text{mV}$) um das Haltepotential (-70mV). Die Kanäle sind bei dieser Spannung geschlossen, daher fließen nur kapazitive Ströme über die Membran.

Normierung der Leitfähigkeiten G_M und G_{JM} auf spezifische Leitfähigkeiten g_M und g_{JM} ergibt demnach:

$$g_M = 28\text{mS/cm}^2 \quad g_{JM} = 33\text{mS/cm}^2$$

Im Rahmen der Messgenauigkeit kann also keine signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit in der Kopplungsfläche A_{JM} festgestellt werden. Einen direkten Vergleich zwischen Flächen- und Leitfähigkeitsverhältnis liefern die beiden Graphen in Abbildung 5.5. Dabei ist auf der linken Seite der Sprung der Spaltspannung ΔV_J gegen den Sprung des Zellstroms ΔI_M aufgetragen, als freier Parameter wurde die Zellspannung variiert. In gleicher Skalierung auf der rechten Seite findet sich die Wechselspannungsmessung. Ein direkter Vergleich der Steigungen zeigt, daß Flächenverhältnis und Leitfähigkeitsverhältnis fast gleich sind.

Vergleich der Verhältnisse der Leitfähigkeiten und der Flächen

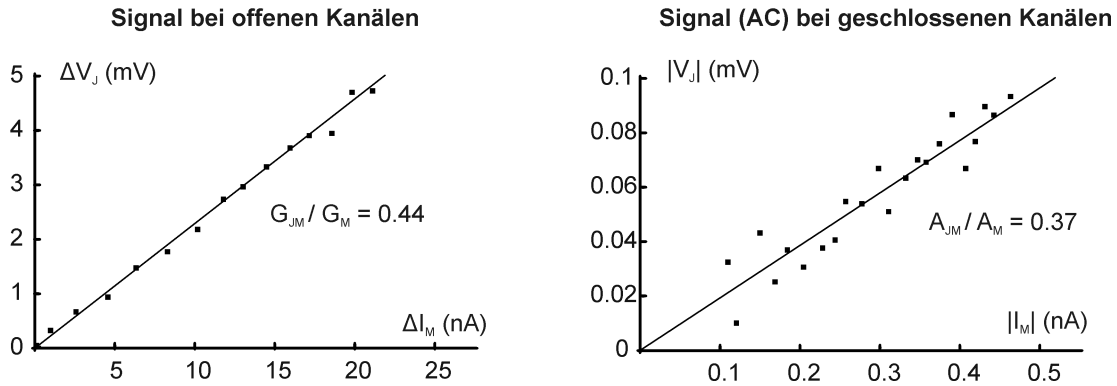


Abbildung 5.5: Durch Vergleich der V_J - I_M -Geraden bei offenen und geschlossenen Kanälen (Wechselspannungsmessung) kann direkt das Verhältnis der Leitfähigkeiten der Adhäsionsmembran und der Gesamtmembran G_{JM}/G_M mit dem Flächenverhältnis A_{JM}/A_M verglichen werden.

5.2.2 Natriumfreie Lösung

Nach der Messung in elektrophysiologischer Lösung wurde die Badlösung durch eine hochohmige, natriumfreie Lösung ersetzt. Um eine Verschiebung des Badelektrodenpotentials aufgrund einer Änderung der Chloridkonzentration zu vermeiden, wurde das Bad über eine Salzbrücke mit der Silber/Silberchlorid-Elektrode kontaktiert.

Gating der Kanäle in der Adhäsionsmembran und der gesamten Membran

In Abbildung 5.6 ist wiederum das Gatingverhalten der Kanäle gegen die Zeit aufgetragen. Der Maximalstrom der Zelle blieb annähernd unverändert, es traten jedoch am Ende des Pulses sogenannte „Tail Currents“ auf, die sich ebenfalls im Transistorsignal widerspiegeln. Das Auftreten dieses Effekts ist jedoch nicht spezifisch für die verwendeten hochohmigen Lösungen, sondern trat vereinzelt auch für elektrophysiologische Lösungen auf. Die Ursache hierfür ist unklar. Das Gatingverhalten in natriumfreier Lösung zeigt im wesentlichen keine Unterschiede zu elektrophysiologischer Umgebung, lediglich die Steilheit der Gatingkurve ist etwas höher, wie die folgenden Fitparameter zeigen:

$$G_{M,JM}(V_M) = G_{M,JM}^{max} \cdot \left(\frac{1}{1 + e^{-(V_M + 38mV)/6mV}} \right)^4 \quad (5.6)$$

Wiederum ist das Gatingverhalten der Kanäle in der freien sowie der Adhäsionsmembran identisch. Da der Einfluß des hohen Spaltwiderstandes und dem damit verbundenen hohen Spannungsabfall nicht mehr vernachlässigt werden kann, wurden die Leitfähigkeiten entsprechend Formel 5.2 errechnet. Hier zeigt sich ein drastischer Unterschied zu der Messung in der niederohmigen Lösung. Das Einrechnen des Spaltwiderstandes führt zu einer geringeren absoluten Leitfähigkeit der Adhäsionsmembran G_{JM} von maximal 40 nS, dies ist etwa die Hälfte des Wertes, der in elektrophysiologischer Lösung bestimmt wurde. Die Ursache hierfür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Reduktion des Spaltwiderstandes aufgrund diffusiver Effekte im Spalt. Der Ausstrom der Kaliumionen in den Spalt führt zu einer Anreicherung der Ionenkonzentrationen und damit zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit des Spaltes.

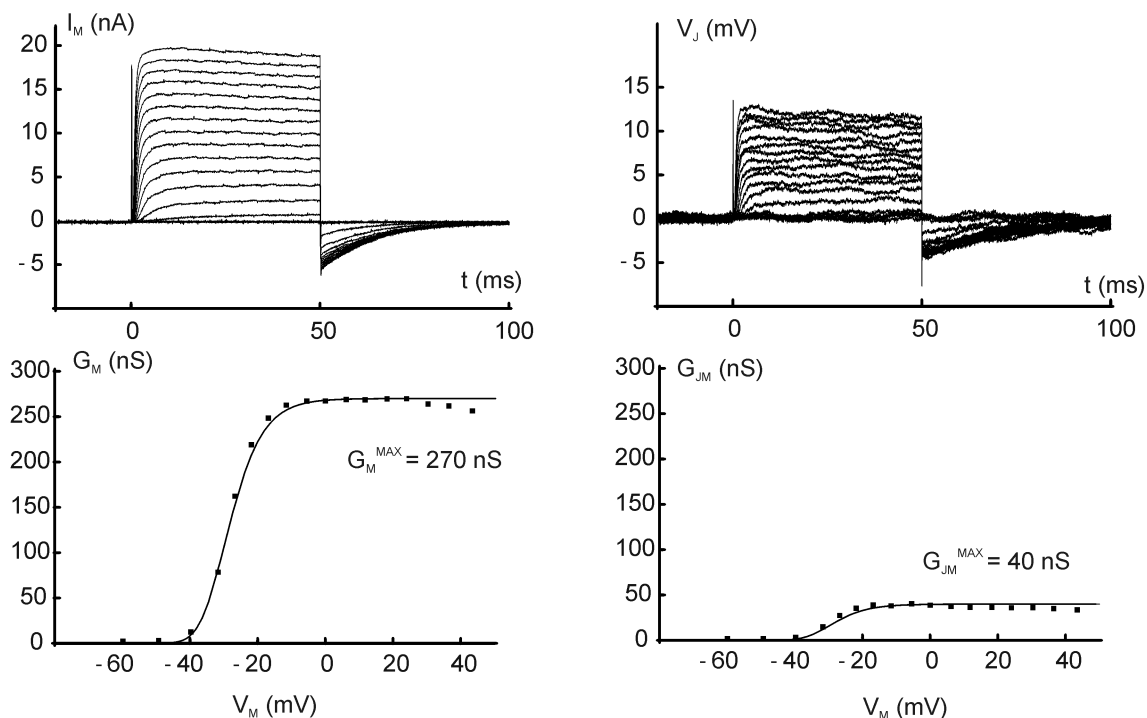


Abbildung 5.6: Gatingverhalten der Kv1.3-Kanäle in natriumfreier Lösung. Die Auswertung der Leitfähigkeit der Adhäsionsmembran ist im Vergleich zur elektrophysiologischen Lösung wesentlich kleiner. Hier zeigen sich die Grenzen des rein elektrischen Modells auf, da durch den Einstrom der Kaliumionen der Spaltwiderstand verändert wird.

Adhäsionsfläche und Flächenverhältnis

Flächenbestimmung durch Wechselspannung bei geschlossenen Kanälen

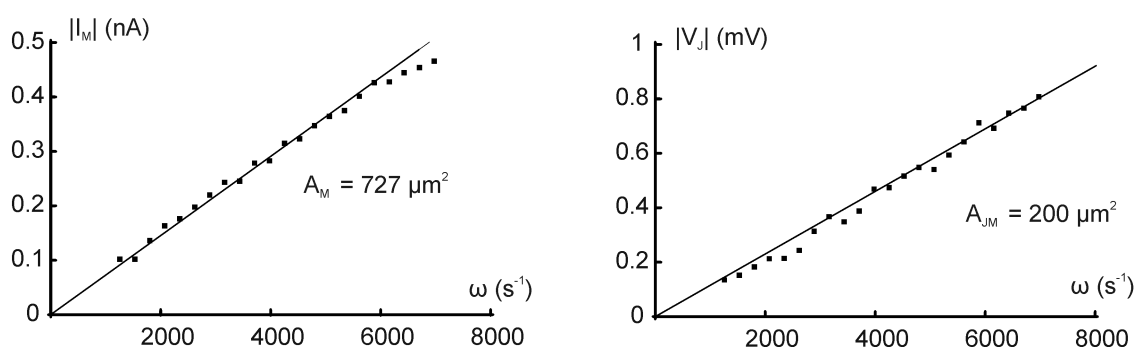


Abbildung 5.7: Bestimmung der Flächen der Gesamtmembran sowie der Adhäsionsmembran in natriumfreier Lösung

Die Admittanz der Zelle und die damit verbundene Gesamtzellfläche bleibt unverändert gleich $727 \mu\text{m}^2$. Die Kopplungsfläche ist gleich $200 \mu\text{m}^2$. Diese Fläche ist als roter Kreis in Abbildung 5.2 eingezeichnet. Ein Vergleich mit der errechneten Kopplungsfläche in elektrophysiologischer Lösung zeigt nur geringe Unterschiede. Dies bedeutet, daß die Wechselspannungskopplung proportional mit der Erhöhung des Spaltwiderstandes steigt. Dies be-

findet sich in Übereinstimmung mit der Arbeit von Raimund Gleixner [Gle03]. Im nächsten Abschnitt (Variation des Spaltwiderstandes) wird dies noch genauer untersucht werden.

Der direkte Vergleich von Leitfähigkeits- und Flächenverhältnis durch Gegenüberstellung der V_J - I_M -Graphen bei Depolarisationsexperiment und Wechselfspannungsexperiment zeigt eine scheinbare Abreicherung der Kanäle in der Adhäsionsmembran. Dies ist jedoch durch die Verwendung eines zu hohen Spaltwiderstandes in der Umrechnung auf $\frac{G_{JM}}{G_M}$ durch Formel 5.3 zu begründen.

Vergleich der Verhältnisse der Leitfähigkeiten und der Flächen

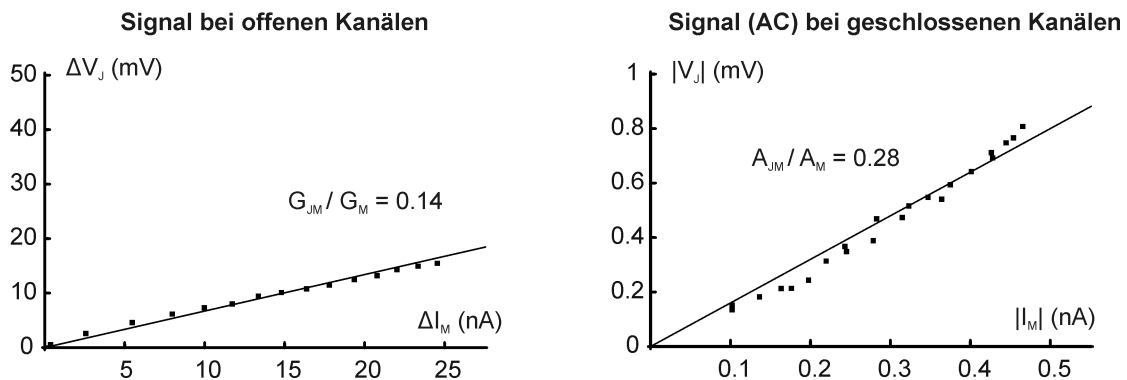


Abbildung 5.8: Vergleich der Verhältnisse der Leitfähigkeiten und der Flächen in natriumfreier Lösung

5.3 Variation des Spaltwiderstandes

Um die Abhängigkeit der elektrischen Kopplung von dem Spaltwiderstand zu untersuchen, wurden Depolarisationsexperimente an Zellen bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen durchgeführt. Dabei wurde bei gleicher Zusammensetzung des vorher beschriebenen Elektrolyten die Natriumkonzentration (in mM: 80, 60, 40, 20, 10, 0) variiert. Die zugehörigen Spaltwiderstände der verschiedenen Lösungen sind:

Natriumkonzentration (in mM)	80	60	40	20	10	0
spez. Leitfähigkeit (in mS/cm)	9.48	7.72	5.60	3.51	2.41	1.36
Spaltwiderstand R_J (in $M\Omega$)	0.83	1.02	1.40	2.24	3.26	5.78

Um die Gesamtdauer des Experiments klein zu halten, wurde auf die Aufnahme einer Gatingkurve bei jeder Lösung verzichtet. Die Zelle wurde mittels eines einzigen Spannungspulses von -70 mV auf +100 mV depolarisiert und der resultierende Zellstrom sowie das Transistorsignal aufgenommen. Bei jeder Lösung wurde zusätzlich die AC-Übertragungsfunktion gemessen. In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse dieses Experimentes zusammengefasst. Während die Antwort des Zellstroms auf den Spannungspuls nahezu unverändert bleibt, zeigen sich deutliche Unterschiede in Form und Amplitude des Transistorsignals.

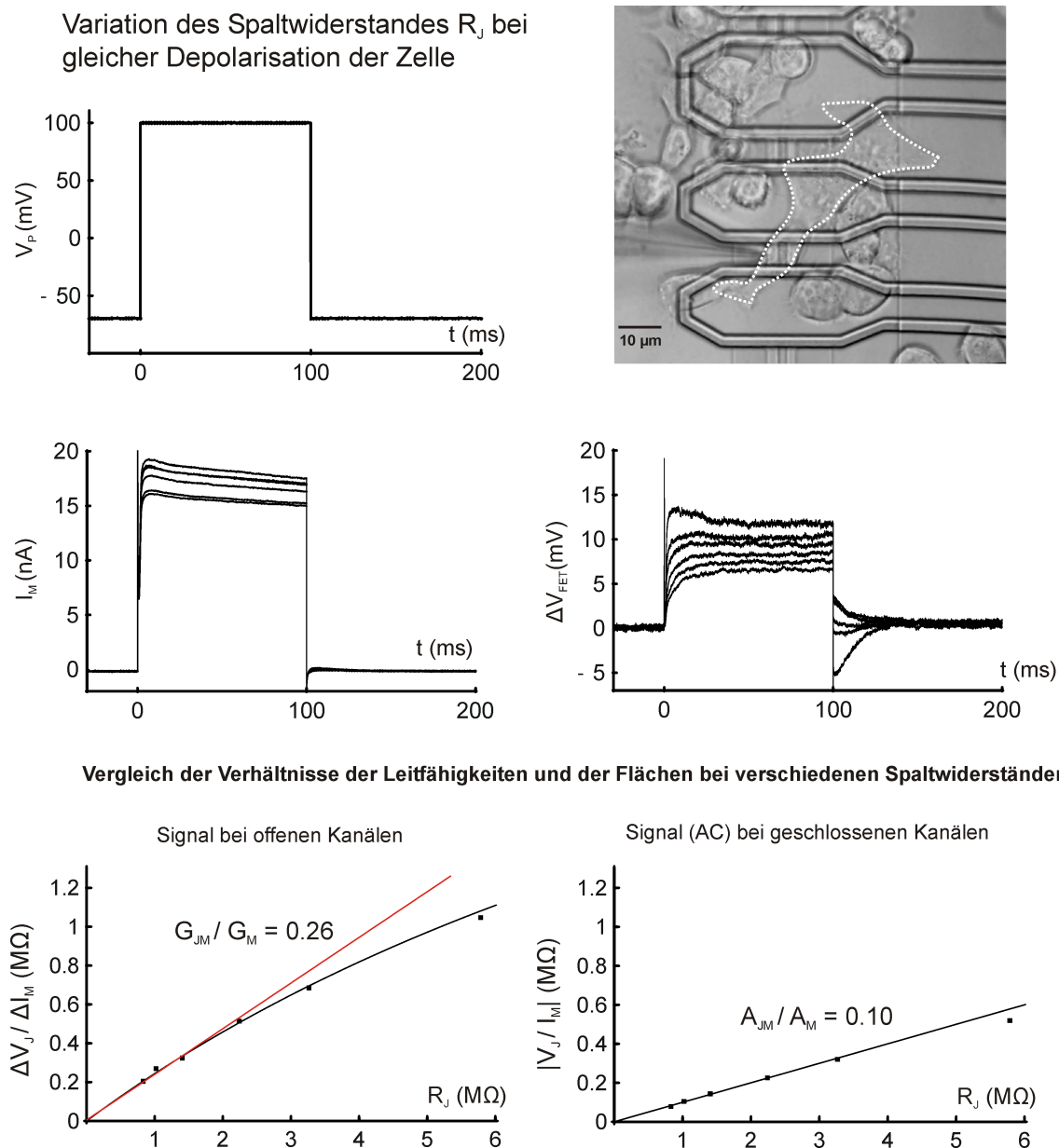


Abbildung 5.9: Messung an einer Zelle in verschiedenen Salzkonzentrationen bei gleichbleibender intrazellulärer Depolarisation. Die Stromantwort auf den Spannungspuls blieb nahezu unverändert, Form und Signalhöhe des Transistorsignals veränderten sich jedoch signifikant. Durch Reduzierung der Natriumkonzentration wurde der Spaltwiderstand von $830 \text{ k}\Omega$ auf $5.78 \text{ M}\Omega$ erhöht. Während die Wechselspannungskopplung $\left| \frac{V_J}{I_M} \right|$ linear mit der Erhöhung des Spaltwiderstandes R_J steigt, kann die Kopplung $\frac{\Delta V_J}{\Delta I_M}$ bei Öffnen der Kanäle nicht beliebig gesteigert werden. Hierfür sind einerseits die Einbeziehung der freien Membranleitfähigkeit entsprechend Formel 2.14 sowie die Reduzierung des Spaltwiderstandes durch diffusive Effekte im Spalt verantwortlich.

Trägt man nun den Quotienten aus Transistorsignal und Strom $\frac{\Delta V_J}{\Delta I_M}$ gegen den errechneten Spaltwiderstand auf, so weicht dieser bei hohen Spaltwiderständen von einem linearen Zusammenhang ab. Entsprechend Formel 2.14 geht in diesen Zusammenhang noch die

Leitfähigkeit der freien Membran ein:

$$\frac{\Delta V_J}{\Delta I_M} = \frac{\frac{G_{JM}}{G_M} \cdot R_J}{1 + \frac{G_{JM} G_{FM}}{G_M} \cdot R_J} \quad (5.7)$$

Bei niedrigen Spaltwiderständen ist diese Beziehung linear, daraus kann das Leitfähigkeitsverhältnis $\frac{G_{JM}}{G_M} = 0.26$ bestimmt werden. Setzt man für die freie Membran eine Leitfähigkeit von $G_{JM} = 260nS$ ein, so kann das Kopplungsverhalten gefittet werden. Da in diesem Fall jedoch eine Leitfähigkeitsveränderung des Spaltes aufgrund diffusiver Effekte vernachlässigt wird, ist dieser Wert als reiner Fitparameter zu betrachten.

Der lineare Fit der Wechsellspannungskopplung $\left| \frac{V_J}{I_M} \right|$ führt auf ein Flächenverhältnis von $\frac{A_{JM}}{A_M} = 0.1$. Dieses Beispiel zeigt deutlich die Grenzen auf, bei denen noch Aussagen über das Verhältnis spezifischer Leitfähigkeiten getroffen werden kann. In diesem Fall könnte auf eine Anreicherung von Kanälen in der Adhäsionsmembran geschlossen werden, hier ist jedoch unklar, inwiefern Ausläufer der Zelle am Rand (siehe Bild) noch zur Membranleitfähigkeit beitragen. Daher macht diese Aussage keinen Sinn mehr.

5.4 Statistik der Kopplungseigenschaften

5.4.1 Zell- und Kopplungsflächen

Mittels Admittanzmessungen an Zellen kann über die spezifische Kapazität der Zellmembran die Gesamtfläche der Zelle bestimmt werden. Diese Methode wird nun mit einer optischen Auswertung der gemessenen Zellen verglichen. Dabei wurde die Adhäsionsfläche bestimmt (schwarze Flächen in Abbildung 5.10) und über ein abgeschätztes Flächenverhältnis $\beta = \frac{A_{JM}}{A_{FM}}$ zwischen Adhäsionsmembran und freier Membran in eine Gesamtfläche umgerechnet. In der Regel wurde eher Zellen mit abgeflachten Zellgeometrien gemessen. Bei diesen Zellen wurde durch Messungen mit einem Laserscanmikroskop das Verhältnis β zu 0.85 bestimmt [Ul03], dieser Faktor wurde für diese Arbeit übernommen. Die optische Auswertung der Adhäsionsfläche wurde durch eine Flächennormierung mittels eines Objektmikrometers und anschließender Umrechnung der Pixelzahl der schwarzen Bildflächen in echte Flächen erreicht. Der Vergleich mit den Kapazitätsmessungen zeigt eine gute Übereinstimmung mit den optisch ausgewerteten Zellflächen.

Als Beispiel wurden zwei Zellen verwendet, an denen die Messwerte veranschaulicht werden sollen. Bei Zelle A findet sich eine gute Übereinstimmung zwischen realer und kapazitiv gemessener Zellfläche. Durch das Punktkontaktmodell der elektrischen Kopplung kann die Kopplungsfläche der Zelle an den Transistor bestimmt werden. Die Berechnung führt zu einer relativ geringen Kopplungsfläche von $72 \mu m^2$. Im Gegensatz dazu kann eine starke Kopplung bei Zelle B ($A_{JM} = 413 \mu m^2$) gemessen werden. Das Flächenverhältnis zwischen Kopplungs- und Gesamtfläche der Zellen variierte zwischen 1/2.5 bis zu 1/35.

Bei der Gesamtfläche von Zelle B ist eine Abweichung von der optisch ausgewerteten Zellfläche zu beobachten. Eine Ursache hierfür könnte einerseits ein noch höherer β -Faktor von fast 1 sein. Außerdem könnte die Impedanzmessung von der links benachbarten Zelle verfälscht worden sein. Für die Modellierung der Zell-Transistor-Kopplung ist es daher wichtig, nur Messungen an Zellen auszuwählen, die einzeln und getrennt von benachbarten Zellen auf der Gate-Region des Transistors liegen.

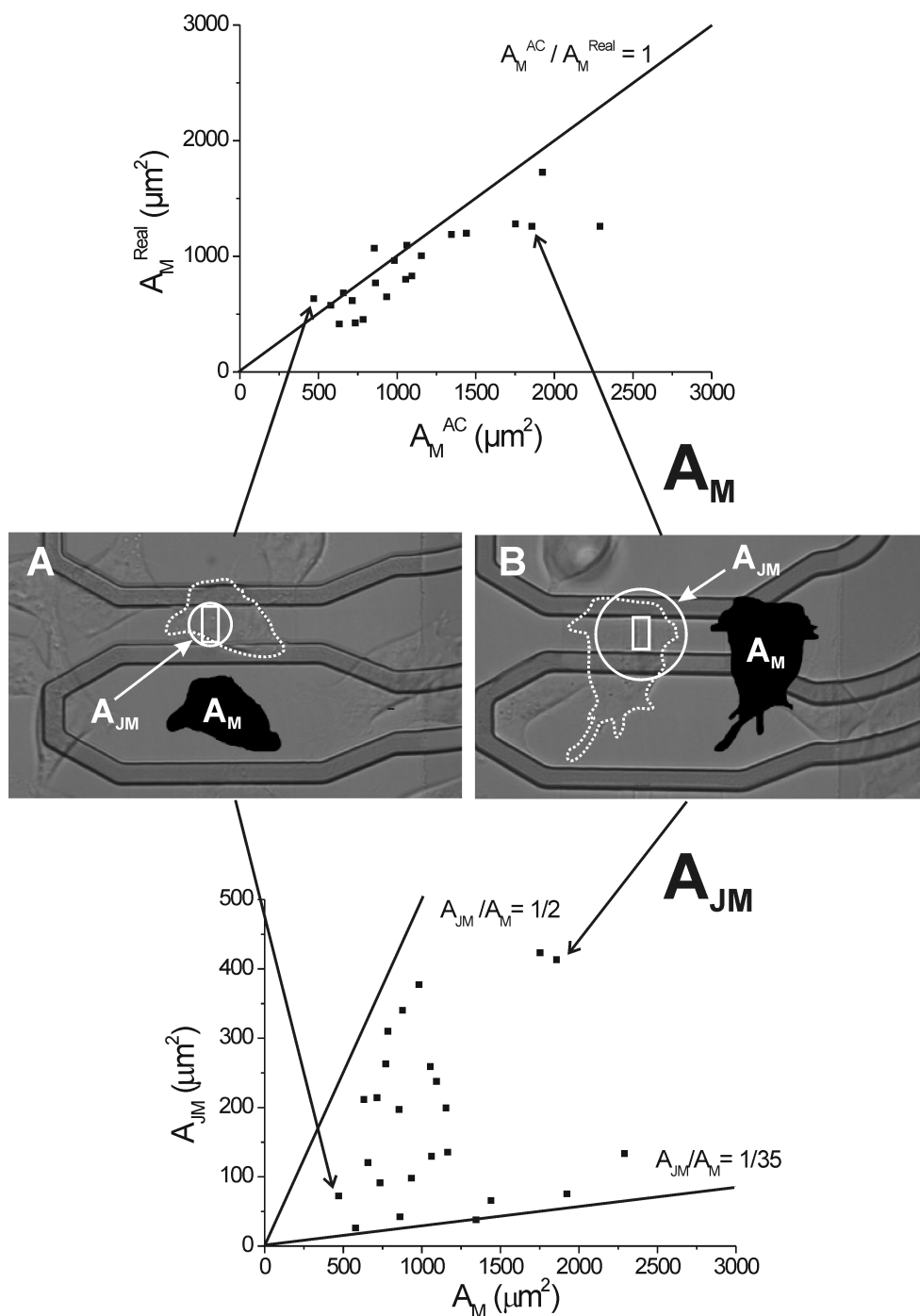


Abbildung 5.10: Durch Wechselspannungsmessungen können durch Umrechnung über den Spaltwiderstand die Kopplungsflächen abgeschätzt werden. Der Vergleich von echter Zellfläche (optische Bestimmung der Adhäsionsmembran und Umrechnung in die Gesamtfläche der Zelle mit einem Faktor $\beta = \frac{A_{JM}}{A_{FM}} = 0.85$) und der Zellfläche bestimmt durch die Zelladmittanz zeigen gute Übereinstimmung.

5.4.2 Verteilung der Ionenkanäle in der Zellmembran

In diesem Abschnitt sind nun die Verhältnisse der Leitfähigkeiten und der Flächen aller Messungen gegeneinander aufgetragen. Für die Auswertung wurden nur Einzelzellmessungen verwendet. Bei einem hohen Flächenverhältnis von Kopplungsfläche zu Gesamtfläche nähert sich die Kopplungsfläche der echten Adhäsionsfläche der Zelle an. Hier sind die Aussagen über die Kanalverteilung in der Zellmembran am aussagekräftigsten. Statistisch konnte keine signifikante Ungleichverteilung der Kanäle in der Membran gefunden werden. Für den Fall eines nicht-invasiven Zelltransistors, der ein Signal rein durch das Öffnen der Kanäle in der Membran detektieren soll, bedeutet dies, daß kein Signal detektiert werden kann, da ein Spannungsabfall im Spalt nur durch Umladeströme der Zellmembran generiert werden kann. Bei Gleichverteilung der Leitfähigkeiten der oberen und der unteren Membran würden keine Ausgleichsströme fließen. In Kapitel 7 soll daher ein Verfahren vorgeschlagen werden, das dieses Problem löst.

Statistik der Verhältnisse der Leitfähigkeiten und der Flächen

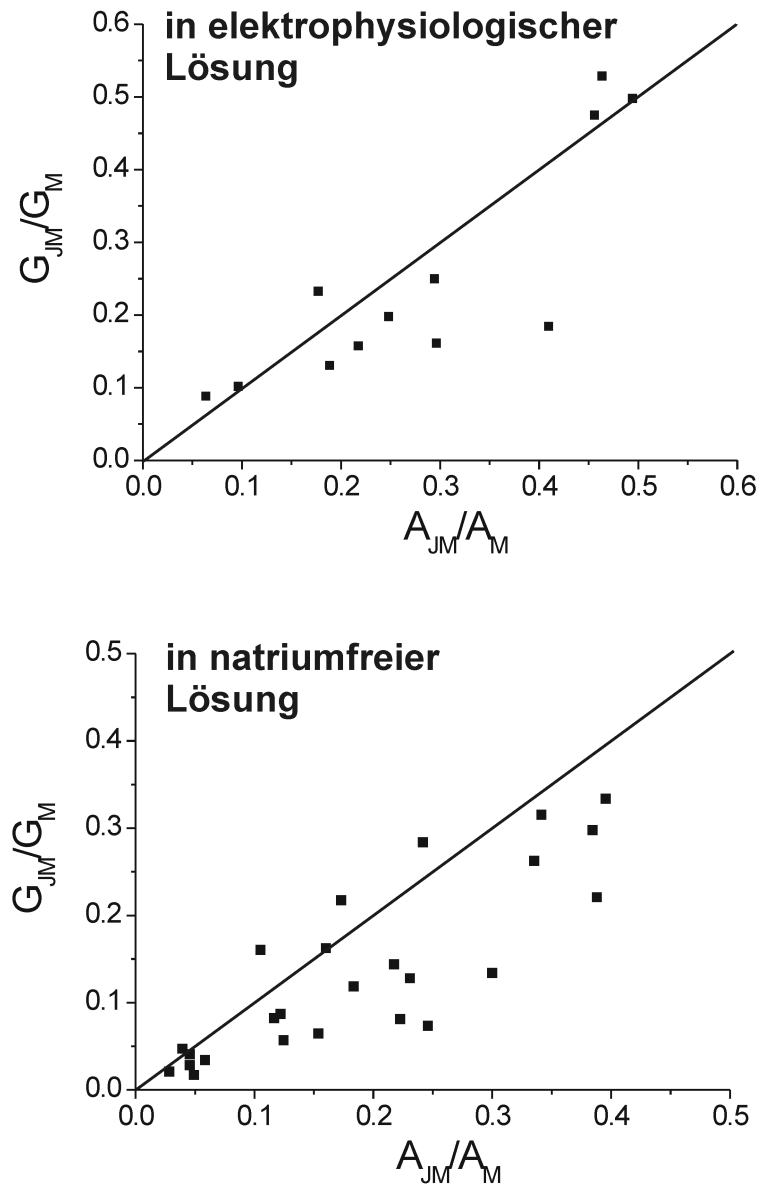


Abbildung 5.11: Verhältnisse der Membranleitfähigkeiten von Gesamt- und Adhäsionsmembran aufgetragen gegen die Flächenverhältnisse. Bei Messungen, die auf der eingezeichneten Gerade liegen, sind die Kanäle in der freien und der Kopplungsmembran gleichverteilt. Bei hohen Flächenverhältnissen entspricht die Kopplungsfläche der echten Adhäsionsfläche der Zellmembran.

Kapitel 6

Elektrische und Chemische Zell-Transistor-Kopplung

Im vorhergehenden Kapitel wurde nur der elektrische Anteil der Zell-Transistor-Kopplung untersucht. Dieses Modell ist jedoch nur gültig, wenn Konzentrationsänderungen der Ionen im Spalt vernachlässigt werden können. Für die Modellierung der Kopplung von Nervenzellen an den Chip ist dieses Modell ausreichend, da die Dauer der Aktionspotentiale unter 5 ms liegt. Bei der Untersuchung der Zell-Transistor-Kopplung, die über diese Dauer hinausgeht, kann dieses einfache Modell jedoch nicht mehr angewandt werden. In diesem Kapitel soll deshalb die gesamte Natur der Langzeitkopplung diskutiert werden.

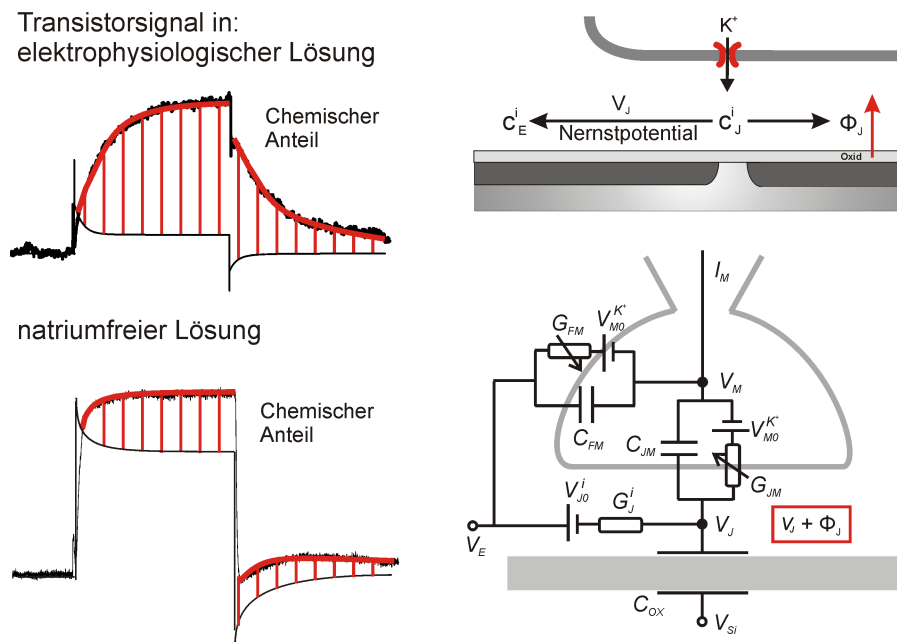


Abbildung 6.1: Das gemessene Transistorsignal ist eine Überlagerung aus einem Spannungsabfall im Spalt V_J und der Änderung des Oberflächenpotentials an der Oxidoberfläche. Die Modellierung des Transistorsignals erfolgt mittels eines Elektrodifusionsmodells in Kombination mit einer Gouy-Chapman-Theorie, die durch die Bindung der Ionen an die Oberfläche erweitert wurde.

Der Ausstrom der Kaliumionen in die Spaltregion verursacht drei Effekte:

- eine elektrische Antwort aufgrund der Umladung der Membran- und der Oxidkapazität im Bereich von $1 \mu\text{s}$
- eine Änderung der Konzentration von Kalium sowie der beteiligten Ionen im Spalt im Bereich von 5 ms
- eine Änderung des Oberflächenpotentials aufgrund von Konzentrationsänderungen und Bindung der Ionen an die Oberfläche. Dieser Effekt führt zu einer dritten Zeitkonstante, die im Bereich von 10 ms liegt.

Diese drei Effekte wurden in einer Theorie vereint, mit der nun die gemessenen Daten modelliert werden sollen. Begonnen werden soll mit einer Simulation des Transistorsignals, das in elektrophysiologischer Lösung beobachtet wurde. Darauffolgend werden Messungen in verschiedenen Zusammensetzungen des umgebenden Elektrolyten diskutiert, um die aufgestellte Theorie der Kopplung zu überprüfen.

6.1 Transistorsignal in elektrophysiologischer Lösung

Die Zusammensetzung der elektrophysiologischen Badlösung ist 5 mM Kaliumchlorid, 135 mM Natriumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt wurde, ist der Abstand der Zellen von der Substratoberfläche gleich 70 nm unabhängig von der Badlösung. Dieser Spalt weist die gleichen Eigenschaften (spezifische Leitfähigkeit, Diffusionskonstanten) auf wie der umgebende Elektrolyt [Gle03]. Abb. 6.2 zeigt nochmals zur Erinnerung das mittlere Beispiel der drei HEK293-Zellen

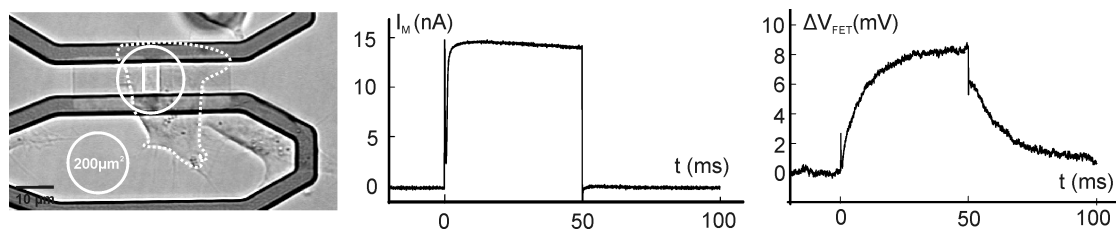


Abbildung 6.2: Beispiel einer HEK293-Zelle in elektrophysiologischer Lösung auf einem Feldeffekttransistor. Die Zelle wurde ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV auf $+100 \text{ mV}$ depolarisiert und der Strom I_M sowie das Transistorsignal V_{FET} aufgenommen.

mit Kv1.3 Ionenkanälen auf einer nichtmetallisierten Gateregion (weißes Kästchen) eines p-Kanal-Feldeffekttransistors aus dem Ergebnisteil. Der weiße Kreis zeigt die effektive Kopplungsfläche ($280 \mu\text{m}^2$) an, die mittels Wechselspannungsmessung bestimmt wurde. Der Mittelwert aller gemessenen Flächen ($n=30$) liegt bei $200 \mu\text{m}^2$ (Weißer Kreis unterhalb der Zelle). Diese Fläche soll der nun folgenden Modellierung zugrunde gelegt werden. Das Transistorsignal aller durchgeführten Messungen kann durch die Amplitude des schnellen und langsamen Signals sowie der Zeitkonstante des langsamen Signals vollständig charakterisiert werden (siehe Abb. 6.5 und Abb. 6.6) und soll im folgenden als Vergleich zwischen Messung und Theorie herangezogen werden.

6.1.1 Elektrodifusion im Spalt

Für die folgende Modellierung wird das Punktkontaktmodell der Elektrodifusion verwendet, das in Abschnitt 2.2.2 eingeführt wurde. Um das Modell einfach zu halten, wird die Gatingdynamik der Ionenkanäle vernachlässigt und durch eine Stufenfunktion mit einer spezifischen Membranleitfähigkeit von $20 \frac{mS}{cm^2}$ ersetzt. Als Adhäsionsfläche wird eine Fläche von $200 \mu m^2$ verwendet, die Leitfähigkeit der Adhäsionsmembran ist damit $40 nS$. Bei einem Spannungspuls von $-70 mV$ auf $+50 mV$ beträgt damit der resultierende Strom in den Spalt etwa $5 nA$. Die spezifische Membran- und Oxidkapazität beträgt $1 \frac{\mu F}{cm^2}$ bzw. $0.3 \frac{\mu F}{cm^2}$, somit ist die Kapazität des Zell-Transistor-Kontakts gleich $2.6 pF$. Die Leitfähigkeit G_J des Spaltes beträgt $2.43 \mu S$. Ein Öffnen der Kanäle führt zu einem Spannungsabfall V_J

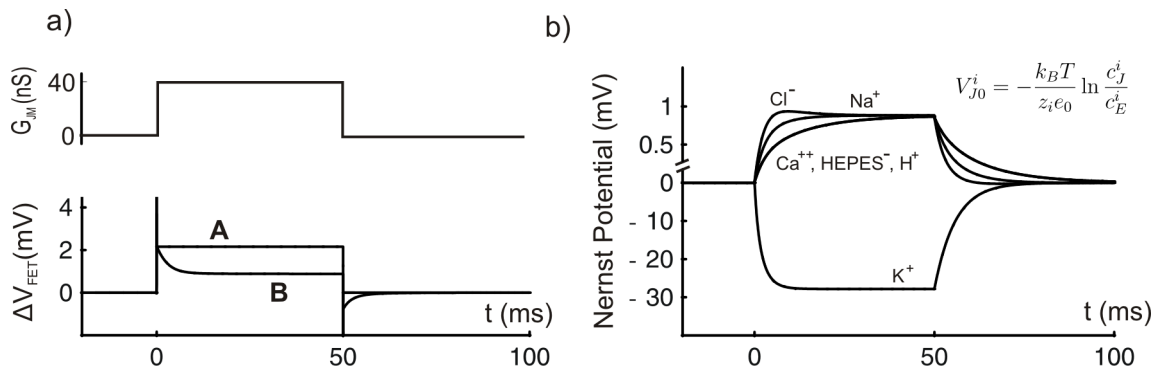


Abbildung 6.3: Elektrodifusion im Spalt bei schnellem Öffnen der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran. Der Zufluß von Kaliumionen in den Spalt führt zu einer Veränderung der Spannung sowie der Konzentrationen im Spalt. a) Spannung im Spalt im elektrischen (Kurve A) und Elektrodifusionsmodell (Kurve B). b) Änderung der Konzentrationen im Spalt ausgedrückt durch die Nernstpotentiale V_{J0}^i zwischen Spalt- und Badkonzentration.

zwischen Spalt und Bad von etwa $2 mV$. Im elektrischen Modell bleiben die Konzentrationen und die Leitfähigkeit des Spaltes konstant, der Transistor zeigt damit eine ohmsche Antwort auf den einfließenden Kaliumstrom (Abb. 6.3, a) Kurve A).

Im Elektrodifusionsmodell werden die Partialströme der einzelnen Ionensorten betrachtet, wobei die Partialleitfähigkeiten G_J^i proportional zur jeweiligen Konzentration c_J^i im Spalt sind. Als Erweiterung zum elektrischen Modell kommt als treibende Kraft zur Spannung im Spalt V_J noch die einzelnen Nernstpotentiale V_{J0}^i zwischen Spaltkonzentration und Badkonzentration hinzu (Abb. 6.3, b)). Nach einem schnellen Anstieg geht die Spannung V_J auf einen erniedrigten Wert von etwa $1 mV$ (Abb. 6.3, b) Kurve B) und befindet sich im stationären Gleichgewicht mit den Nernstpotentialen der passiven Ionen (alle Ionen ausser Kalium). Dies entspricht einer Konzentrationsänderung dieser Ionen von lediglich 4 Prozent. Da Magnesium und Calcium die gleichen Eigenschaften (gleiche Diffusionskonstante, keine Bindung an die Oberfläche) besitzen, wurden sie zu $2.8 mM$ Calcium zusammengefasst. Die Konzentration der Protonen steht im Gleichgewicht mit den Pufferionen und folgt daher der langsamen Dynamik des negativ geladenen HEPES-Ions. Der pH-Wert im Spalt geht aufgrund der Elektrodifusion von 7.40 auf 7.42 . pH-Effekte spielen also in diesem System keine wesentliche Rolle.

Anders verhält es sich jedoch mit der Kaliumkonzentration. Diese ändert sich von $5 mM$ auf

15 mM. Die Triebkraft der Diffusion ist um ein Vielfaches höher als die Spannung im Spalt, der Strom der Kaliumionen aus dem Spalt in das Bad ist also ein reiner Diffusionsstrom.

6.1.2 Änderung des Oberflächenpotentials

Durch das Elektrodifusionsmodell konnte sowohl der zeitliche Verlauf der Spannung V_J als auch der Konzentrationen c_J^i im Spalt gewonnen werden. Ein Blick auf die gemessenen Daten (Abb. 4.1) zeigt jedoch, daß der Feldeffekttransistor nicht nur die Spannung V_J misst. Das Transistorsignal ΔV_{FET} ist vielmehr eine Überlagerung aus Spannungsmessung und Änderung des Oberflächenpotentials $\Delta\Phi_J^0$ an der Gateoberfläche.

Mit den Konzentrationsänderungen aus dem Elektrodifusionsmodell kann der Verlauf des Oberflächenpotentials berechnet werden (siehe dazu Abschnitt 2.3.3). Aus Titrationsmessungen an einem unbeschichteten Transistor wurden die Bindungskonstanten der Ionen an die Oberfläche K_S^i ($K_S^K=16$ mM, $K_S^{Na}=316$ mM, $K_S^H=1.58$ μ M, Calcium und Magnesium zeigten keine Bindung) sowie die Oberflächenladung ($1.5 \frac{e_0}{nm^2}$) bestimmt (siehe dazu Abschnitt 3.2.2). Zunächst wird angenommen, daß die Bindungsvorgänge an die Oberfläche wesentlich schneller sind als die Konzentrationsänderungen im Spalt und sich das Oberflächenpotential instantan einstellt.

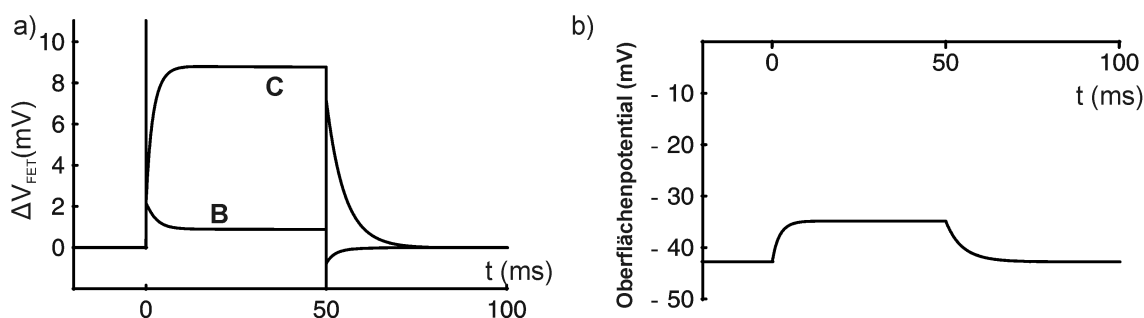


Abbildung 6.4: Superposition der Spannung im Spalt und der Änderung des Oberflächenpotentials

In Abb. 6.4 b) ist der simulierte zeitliche Verlauf des Oberflächenpotentials dargestellt. Vor dem Öffnen der Kanäle sind die Konzentrationen im Spalt gleich der im Bad. Das Oberflächenpotential liegt bei -43 mV, wobei nur 19 % der Oberflächenladungen unbesetzt sind, die restliche Ladung wird von den Ionen neutralisiert (Anteil der gebundenen Ionen zur Gesamtzahl der Bindungsstellen: Kalium 33 %, Natrium 45 %, Protonen 3 %). Durch den Zustrom von Kalium ändert sich die Kaliumkonzentration im Spalt und damit das Verteilungsgleichgewicht der Bindung an die Oberfläche. Da Kalium stärker an die Oberfläche bindet, werden die Natriumionen von diesen verdrängt (Kalium 57 %, Natrium 25 %), die Protonenbindung bleibt nahezu unverändert. Die freie Oberflächenladung wird auf 15 % reduziert. Diese Ladungsänderung ist verantwortlich für den starken Anstieg des Oberflächenpotentials um 8 mV. Die Gesamtkonzentration aller Ionen im Spalt ändert sich lediglich um 4 %, dieser Effekt wäre also mit der reinen Gouy-Chapman-Theorie nicht zu beschreiben.

In Abb. 6.4 a) Kurve C ist nun die Überlagerung von $\Delta\Phi_J^0$ und der Spannung V_J abgebildet. Nach einer schnellen elektrischen Antwort geht das Gesamtsignal ΔV_{FET} auf +9 mV.

Ein Vergleich mit der Messung (Abb. 6.2) zeigt, daß die Signalhöhe im stationären Zustand sehr schön wiedergegeben wird. Hierbei soll betont werden, daß die Simulation keine freien Parameter enthält, es wurden nur Literaturwerte (Diffusionskonstanten, spezifische Membran- und Oxidkapazität) und Werte, die aus anderen Messungen gewonnen wurden (Abstand der Zelle vom Substrat, Adhäsionsfläche der Zelle, Titrationsmessung am Feldeffekttransistor) benutzt.

Bei einem genaueren Vergleich mit der Messung fällt jedoch auf, daß das Verhältnis zwischen chemischer und elektrischer Signalantwort tendenziell zu groß ist. In Abb. 6.5 wurde deshalb die elektrische gegen die chemische Antwort aller Messungen aufgetragen. Die Messpunkte streuen sehr stark, das Verhältnis von chemischen zu elektrischen Signal variiert zwischen einem Faktor 5 bis zu 0.5. Es stellt sich die Frage, woher diese starke Schwankung kommt. Dies soll mit Hilfe der Theorie erläutert werden. Über eine Variation

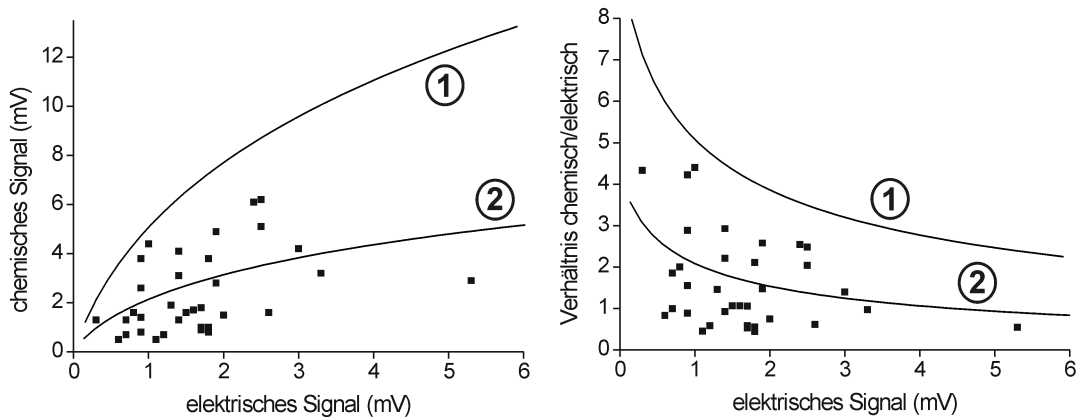


Abbildung 6.5: gemessene Verhältnisse von chemischen zu elektrischen Signal. Die Theoriekurve (1) zeigt das Ergebnis der verwendeten Theorie, wobei die Oberflächenladung von $1.5 \frac{e_0}{nm^2}$ aus der Titrationsmessung eines unbeschichteten Transistors verwendet wurde. In Kurve (2) wurde diese um einen Faktor 10 erniedrigt. Änderungen der Oberflächenladung durch Reinigung und Beschichtung der realen Transistoroberflächen können als Ursache für die Schwankung und für das im Vergleich zu Theorie zu kleine Verhältnis von chemisch/elektrischer Signalantwort gewertet werden.

der Membranleitfähigkeit kann die Beziehung zwischen elektrischer und chemischer Antwort gewonnen werden. Dies zeigt Kurve (1), die Membranleitfähigkeit wurde von 2 nS bis 100 nS variiert. Zunächst soll betont werden, daß auch im theoretischen Modell das chemisch/elektrische Verhältnis nicht konstant ist. Die Messpunkte zeigen eine ähnliche Tendenz wie der Kurvenverlauf der Theorie. Bei kleinen elektrischen Signalen überwiegt der chemische Anteil, Oberflächeneffekte spielen also auch bei geringem Zustrom von Kalium eine wichtige Rolle (Voraussetzung ist jedoch die Erlangung eines diffusiven Gleichgewichtes).

In Kurve (2) wurde im theoretischen Modell die Oberflächenladung von $1.5 \frac{e_0}{nm^2}$ auf $0.15 \frac{e_0}{nm^2}$ reduziert. Dies ist eine realistische Annahme, da die Oberfläche der Transistoren einerseits durch Reinigungsprozesse verändert wird als auch die Beschichtung der Transistoren die Oberflächenladung reduziert. Diese Schwankung der Oberflächenladung würde die starke Streuung der Messpunkte erklären.

Im weiteren Verlauf soll jedoch die Theorie mit der Oberflächenladung eines nichtmodifizierten Transistors weiterverwendet werden, da ein Anpassen der Theorie an die Messdaten das einfache Modell der Zell-Transistor-Kopplung überstrapazieren würde.

6.1.3 Bindungsdynamik

Im bisherigen Modell wurde eine instantane Reaktion der Oberfläche auf die Konzentrationsänderungen im Spalt angenommen. Vergleicht man jedoch die Simulation in Abb. 6.4 a) mit den Beispielmessungen (Abb. 4.1), so verläuft der Anstieg des chemischen Signals in der Messung wesentlich langsamer als in der Simulation. Wollte man diese Anstiegszeit über die Elektrodifffusion im Spalt erklären, müssten Adhäsionsflächen im Bereich von $1000 \mu\text{m}^2$ angenommen werden. Diese Fläche übersteigt die Kopplungsfläche der Zellen bei weitem.

Außerdem sollte in diesem Modell die Zeitkonstante des Signals abhängig von der Kopplungsfläche sein. In Abb. 6.6 wurden die Zeitkonstanten aller Messungen gegen die aus der Wechselspannungsmessung ermittelten Kopplungsflächen aufgetragen. Die gemessenen Zeitkonstanten zeigen keine Abhängigkeit von der gemessenen Kopplungsfläche.

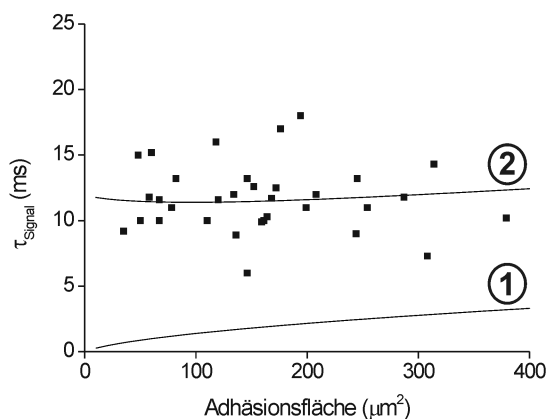


Abbildung 6.6: Die Zeitkonstanten der Messungen gegen die gemessene Fläche aufgetragen.

(1) Zeitkonstante bei instantaner Antwort der Transistoroberfläche auf die Konzentrationsänderung im Spalt.

(2) Miteinbeziehung der Bindungsdynamik der Ionen an die Oberfläche.

Kurve (1) zeigt die Zeitkonstanten des simulierten Signals bei einer instantanen Oberflächenreaktion. Hierfür wurde bei konstanter spezifischer Leitfähigkeit ($20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$) die Kopplungsfläche variiert und ein exponentieller Verlauf an die Theoriekurve gefittet. Die Kurve zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Kopplungsfläche (durch die Umrechnung der Konzentrationsänderung in das Oberflächenpotential und durch die Änderung des Zustroms in den Spalt wird die Zeitkonstante der reinen Diffusion um etwa einen Faktor 3 kleiner). Sowohl die Tendenz als auch die Größe der Zeitkonstante in diesem Modell stimmen mit den Messungen nicht überein.

Um die Vorgänge an der Oberfläche korrekt zu beschreiben, muß eine Bindungsdynamik der Ionen an die Oberfläche eingeführt werden. Nachdem die pH-Änderung in diesem System keine Rolle spielt, soll nur die Natrium- und Kaliumbindung berücksichtigt werden. Die Dynamik der Oberflächenbindung wird beschrieben durch chemische Raten-gleichungen mit den Assoziationskonstanten $k_{A,S}^\alpha$ und den Dissoziationskonstanten $k_{D,S}^\alpha$ ($\alpha = K^+, Na^+$). Diese sind jedoch nicht voneinander unabhängig. Wählt man die Assoziationskonstanten als freien Parameter, so werden die Dissoziationskonstanten über die

6.2. TRANSISTORSIGNAL BEI VARIATION DER NATRIUMKONZENTRATION

Bindungskonstanten im stationären Gleichgewicht bestimmt ($k_{D,S}^\alpha = K_S^\alpha \cdot k_{A,S}^\alpha$). Es sei darauf hingewiesen, daß die Bindungsdynamik der Natrium- und Kaliumionen gekoppelt ist, da beide um unspezifische Bindungsstellen konkurrieren. Eine ausführliche Beschreibung befindet sich in Abschnitt 2.3.4. Da aus der Literatur keine Daten zur Bindungskinetik vorlagen, wurde als erster Ansatz zur Beschreibung die Assoziationskonstante für Kalium und Natrium gleichgesetzt und an die gemessenen Daten angepasst (Abb. 6.6, Kurve (2)). Hieraus ergab sich ein Wert von $k_{D,S}^{Na^+,K^+} = 3000 M^{-1} s^{-1}$. Die Kinetik des Transistorsignals ist damit unabhängig von der Kopplungsfläche.

Durch eine Superposition von V_J und den neuen zeitlichen Verlauf der Oberflächenpotentialänderung (Abb. 6.7 b)) kann das Transistorsignal (Abb. 6.7 a) Kurve D) berechnet werden.

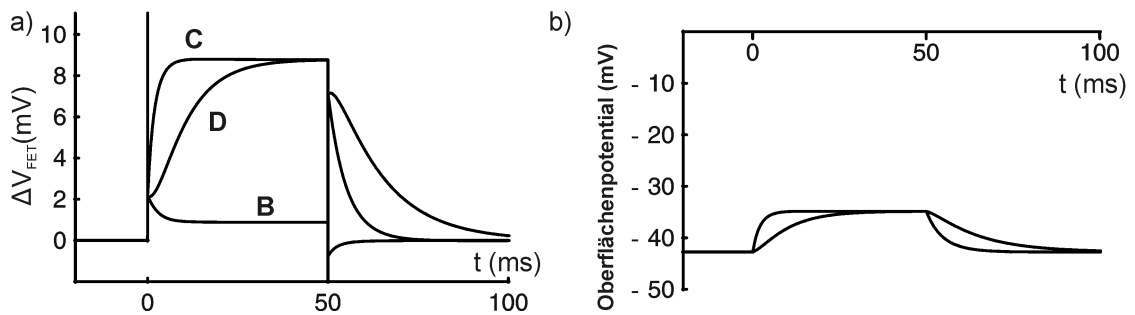


Abbildung 6.7: Superposition der Spannung im Spalt und der Änderung des Oberflächenpotentials unter Einbeziehung der Bindungsdynamik der Ionen an die Oberfläche

Die Simulation ergibt eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment (In Abb. 6.2 bleibt nach dem schnellen Signalabfall das Signal kurz auf einem konstanten Wert und fällt zunächst linear, danach exponentiell ab, beides findet sich in der Simulation wieder).

Es sei an dieser Stelle betont, daß die Modellierung des Transistorsignals so einfach wie möglich gehalten wurde (Elektrodiffusion, Gouy-Chapman-Stern-Theorie, Bindungsdynamik mit chemischen Ratengleichungen) und bis auf die Assoziationskonstante, die an die Messungen angepasst wurde, keine freien Parameter enthält. Die gute Übereinstimmung mit der Messung lässt den Schluß zu, daß im wesentlichen die physikalischen Vorgänge der Zell-Transistor-Kopplung erfasst sind [Bri04].

In den folgenden Abschnitten soll als Parameter die Natriumkonzentration variiert werden, um das Kopplungsmodell zu überprüfen.

6.2 Transistorsignal bei Variation der Natriumkonzentration

Bei der Simulation des Transistorsignals in elektrophysiologischer Lösung musste sowohl die Elektrodiffusion als auch die Oberflächenreaktion eines komplexen Lösungsgemisches im Spalt analysiert werden. Um jedoch das Modell zu testen, ist es sinnvoll, die zu simulierende Messung möglichst einfach zu halten. Daher wurde bei der folgenden Messung Calcium- sowie Magnesiumchlorid aus der Badlösung entfernt. Die Kaliumkonzentration wurde unverändert bei 5 mM belassen. Als Testparameter wurde Natrium gewählt, die Konzentration wurde hierbei von einer nahezu elektrophysiologischen Konzentration von 120 mM auf 10 mM in den Schritten 120 mM, 100 mM, 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM abgesenkt. Um vergleichbare Signale zu erhalten, wurde bei jeder Konzentration die Zelle jeweils auf +100 mV depolarisiert, um identische Zellströme zu erlangen. Die

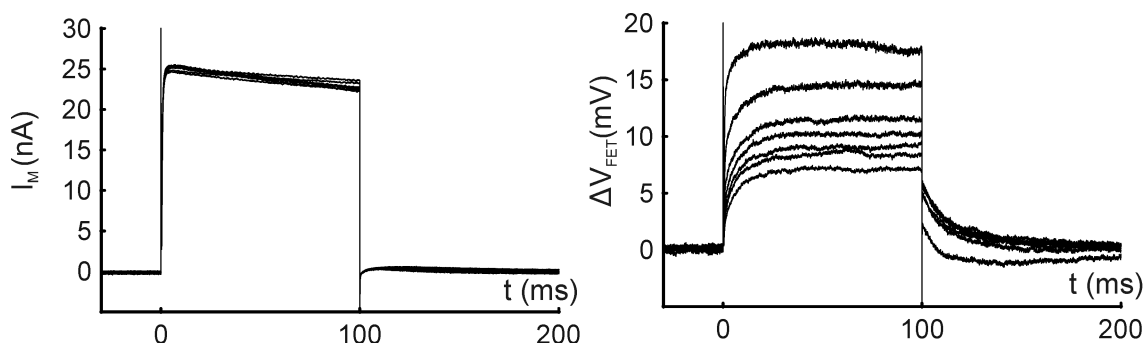


Abbildung 6.8: Variation der Natriumkonzentration von 120 mM zu 10 mM in 20 mM-Schritten. Die Messung wurde an einer Zelle aufgenommen.

Messung ist in Abb. 6.8 gezeigt. Die Zelle wurde für 100 ms depolarisiert, der resultierende Strom lag bei 25 nA und blieb bei allen Lösungen unverändert. Mittels Wechselspannungsmessung wurde die Kopplungsfläche zu $230 \mu\text{m}^2$ bestimmt. Das Leitfähigkeitsverhältnis zwischen der gesamten Zelle zu der Adhäsionsmembran war $1/5$. Damit beträgt der Strom in den Spalt etwa 5 nA.

Dieser Strom in den Spalt wird in der Modellierung aus einer Leitfähigkeit der Kopplungsmembran von 50 nS bei einer intrazellulären Spannung von +16 mV (Gesamttriebkraft für die Kaliumionen am Anfang des Pulses gleich 100 mV) zusammengesetzt, als Kopplungsfläche wird die aus der AC-Messung bekannte Fläche verwendet. Die Simulation (Abbildung 6.9) des gemessenen Transistorsignals setzt sich aus der Komponente der Spaltspannung V_J und der Änderung des Oberflächenpotentials zusammen. Durch die Veränderung der Salzkonzentration im Bad erhöht sich das Oberflächenpotential von -46 mV bei 120 mM Natriumchlorid auf -72 mV bei 10 mM Natriumchlorid. Der Zustrom der Kaliumionen führt zu einer Erhöhung der Kaliumkonzentration im Spalt, die zu einer Verschiebung des Oberflächenpotentials führt. Die Konzentration der Kaliumionen geht annähernd unabhängig von der übrigen Salzkonzentration von einer Anfangskonzentration von 5 mM auf eine stationäre Gleichgewichtskonzentration von etwa 14 mM. Wie im Theorieteil (Abb. 2.17) bereits analytisch abgeschätzt wurde, führt die Reduktion der Natriumkonzentration aufgrund der gekoppelten Bindung an die Oberfläche zu einer Erniedrigung der Zeitkonstante sowie zu einer Erhöhung der Oberflächenpotentialänderung. Beide Effekte können ebenfalls in der Messung beobachtet werden. Vergleicht man das simulierte Signal mit den Messdaten, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung sowohl in der Signalform als auch in der Amplitude. Da jedoch der Spannungseinbruch von V_J in der Berechnung im Punktkontaktmodell der Elektrodifffusion im Vergleich zu der Berechnung im Flächenkontaktmodell etwas überhöht ist und die errechnete Oberflächenpotentialänderung tendenziell zu stark ist, kompensieren sich hier zwei Ungenauigkeiten des verwendeten einfachen Modells.

Nun soll das Modell an dem etwas komplizierteren Fall einer Messung in einem Elektrolyten mit Calcium- und Magnesiumchlorid überprüft werden. Die Zusammensetzung des Elektrolyten unterscheidet sich zu der elektrophysiologischen Lösung lediglich in einer Reduktion der Natriumkonzentration. In Abbildung 6.10 sind die Stromantwort sowie das gemessene Transistorsignal bei einer Depolarisation der Zelle mit einem Span-

6.2. TRANSISTORSIGNAL BEI VARIATION DER NATRIUMKONZENTRATION

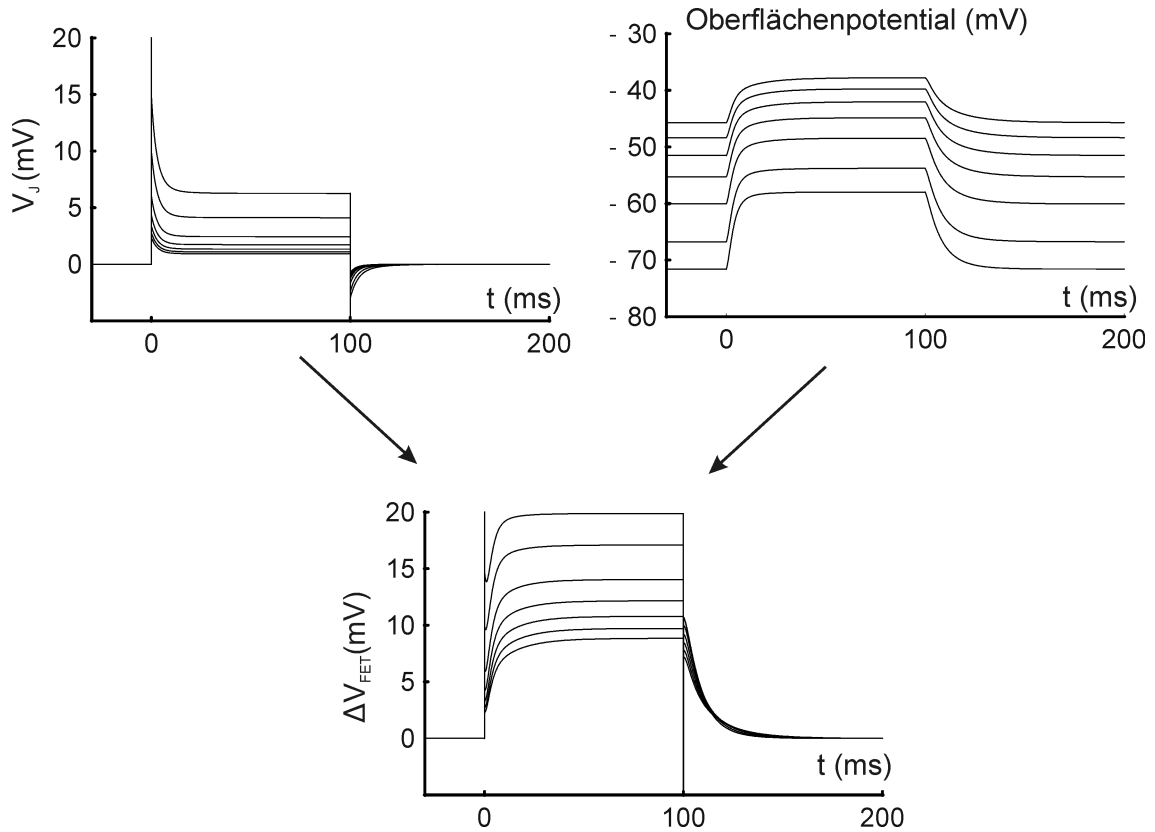


Abbildung 6.9: Modellierung des Austauschexperimentes bei Variation der Natriumkonzentration von 120 mM zu 10 mM in 20 mM-Schritten.

nungspuls von +100 mV gezeigt. Die Natriumkonzentration ist ausgehend von 80 mM in 20 mM-Schritten bis zu 0 mM reduziert. Die Kopplungsfläche der Zelle war $170 \mu m^2$, das Leitfähigkeitsverhältnis zwischen der gesamten Zelle zu der Adhäsionsmembran war $1/4$. Daher wurde für die Simulation der Messung ein Strom in den Spalt von etwa 4 nA gewählt, der sich wiederum aus einer anfänglichen Gesamttriebkraft für die Kaliumionen von 100 mV und einer Membranleitfähigkeit der Kopplungsfläche von 40 nS zusammensetzt.

Bei der Messung ohne Calcium- und Magnesiumchlorid blieb die Signalform bei Reduktion der Natriumkonzentration weitgehend unverändert. Die Erhöhung des Spaltwiderstandes führte zu einer Vergrößerung der Gesamtamplitude der Spaltspannung, auf die die fast gleichbleibende chemische Antwort der Oberflächenpotentialänderung addiert wurde. Befinden sich jedoch zweiwertige Ionen in der Lösung, so ergibt sich bei Abwesenheit von Natrium ein neuer Signaltyp, bei dem nach einem schnellen Anstieg des Signals ein langsamer Abfall gemessen wird. Die dargestellte Signalform bei dieser Elektrolytzusammensetzung konnte auch bei anderen Messungen ($n=20$) beobachtet werden. Außerdem kehrt das Transistorsignal bei der Rückkehr der Zellspannung auf das Haltepotential sein Vorzeichen um und relaxiert langsam wieder auf den Ausgangszustand. Diese Vorzeichenumkehr war nicht so signifikant wie der beobachtete Signaleinbruch, einige FET-Messungen ($n=7$) zeigten vielmehr eine quasi-ohmsche Antwort des FET-Signals auf den Ionenstrom in den Spalt.

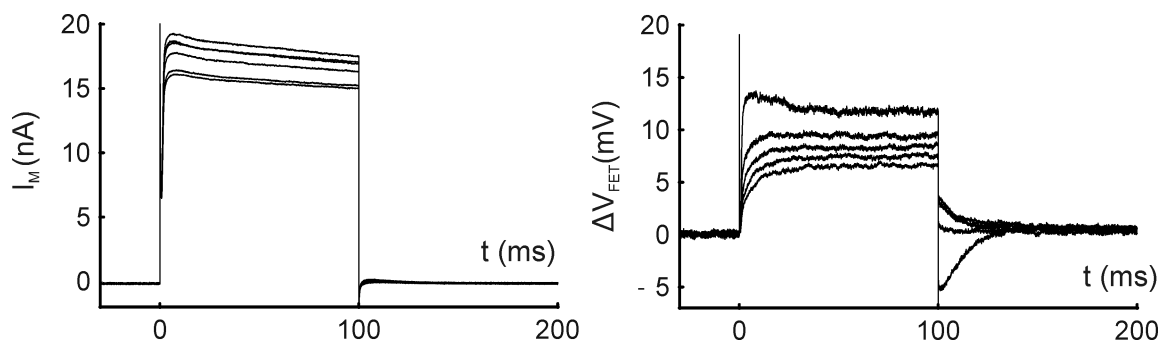


Abbildung 6.10: Variation der Natriumkonzentration von 80 mM zu 0 mM in 20 mM-Schritten. Die Lösung enthält zusätzlich Calcium- und Magnesiumchlorid.

Die Ursachen hierfür sind unverstanden, in diesem Fall addiert sich wahrscheinlich die Überlagerung des komplexen elektrischen und chemischen Signals zu einer scheinbar ohmschen Signalantwort. Ein Beispiel für diesen Signaltyp findet sich im nächsten Abschnitt.

In Abbildung 6.11 ist die theoretische Modellierung des Signals dargestellt. Ein Vergleich mit der Messung ohne zweiwertigen Ionen zeigt, daß diese Ionensorte für die Veränderung des Signaltyps verantwortlich sind. Da in der Lösung ohne Natrium etwa 40% der Kationen aus zweiwertigen Ionen bestehen, ist der Einfluß einer Konzentrationsänderung auf das Oberflächenpotential wesentlich stärker als in einer salzreichen Lösung. Der Einstrom der Kaliumionen führt zu einer Verdrängung dieser Ionen von anfangs 2.8 mM auf 1.7 mM, während bei einer Konzentration von 80 mM Natriumchlorid die Konzentration nur auf 2.6 mM abfällt. Da die für die Theorie wichtigen Eigenschaften (Diffusion und Oberflächenabschirmung) von Magnesium und Calcium identisch sind, wurden diese zu einer Konzentration zusammengefasst. In Abbildung 6.11 sind die resultierenden Veränderungen der Oberflächenpotentiale dargestellt. Im Gegensatz zur calciumfreien Lösung steigt die Oberflächenpotentialänderung bei Reduktion der Natriumkonzentration nicht mehr an. Bei natriumfreier Lösung wird der Einfluß des Kaliums auf die Oberfläche durch Bindungseffekte durch die Abnahme der Abschirmung der Oberflächenladung bei Verringerung der Calciumkonzentration abgeschwächt. Dies bedeutet, daß die Abnahme der Calciumkonzentration im Spalt der Zunahme der Kaliumkonzentration im Bezug auf die Oberflächenpotentialänderung entgegenwirkt. Durch die unterschiedlichen Zeitkonstanten dieser Effekte kann in der Simulation wie in der Messung ein Überschwingen des Signals beobachtet werden.

Die Überlagerung aus elektrischem und chemischem Signal führt zu dem simulierten Transistorsignal. Die Vorzeichenumkehr des gemessenen Signals bei der Rückkehr des Zellstroms auf Null kann durch die Theorie nicht simuliert werden. Dies kann zwei Gründe haben. Einerseits könnte der Einfluß der zweiwertigen Ionen auf das Oberflächenpotential stärker sein. Andererseits könnte die Oberflächenpotentialänderung verursacht durch die Bindung der Kaliumionen an die Oberfläche geringer sein als simuliert. Da die Fitparameter für die Theorie aus einer Titrationsmessung der Transistoren stammen, die im Vergleich zu den gemessenen Signalen im mV-Bereich relativ ungenau ist, würde die Bestrebung, das gemessenen Signal vollständig durch eine Simulation wiedergeben zu können, die Theorie überstrapazieren.

6.3. DYNAMISCHES GATINGVERHALTEN DER IONENKANÄLE IN DER ADHÄSIONSMEMBRAN

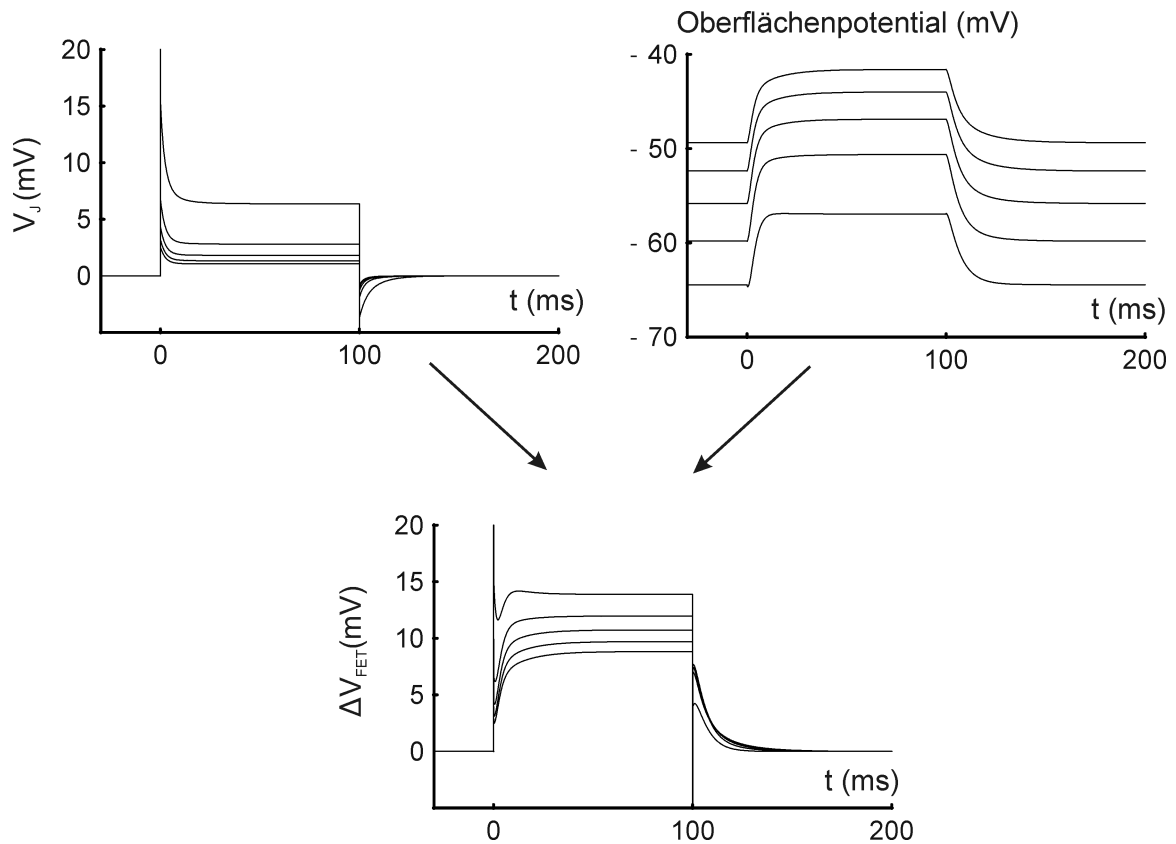


Abbildung 6.11: Modellierung des Austauschexperimentes bei Variation der Natriumkonzentration von 80 mM zu 0 mM in 20 mM-Schritten mit zusätzlicher Calcium- und Magnesiumchloridkonzentration.

Die wesentlichen physikalischen Effekte können jedoch durch die Simulation wiedergegeben werden:

- Verringerung der Signal-Zeitkonstante bei Reduktion der Natriumkonzentration
- gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment bei Variation der Natriumkonzentration ohne zweiwertige Ionen
- Abschätzung des Einflusses der zweiwertigen Ionen auf die Zell-Transistor-Kopplung bei geringen Natriumkonzentrationen

6.3 Dynamisches Gatingverhalten der Ionenkanäle in der Adhäsionsmembran

Im vorhergehenden Abschnitt konnte experimentell wie theoretisch beobachtet werden, daß die Abwesenheit von Natriumchlorid in einer elektrophysiologischen Lösung zu einer quasi-ohmschen Antwort des Transistorsignals auf ein Öffnen der Kaliumkanäle in der Adhäsionsmembran führt. Diese Tatsache soll benutzt werden, um das dynamische

Gatingverhalten der Ionenkanäle im FET zu detektieren. In Abbildung 6.12 ist das dynamische Gatingverhalten der Kanäle, das sich in unterschiedlichen Zeitkonstanten des Anstiegs des Zellstroms I_M widerspiegelt, gezeigt. Die Zelle wurde ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV mit Spannungspulsen (50 ms) in 10 mV-Schritten bis auf $+20$ mV depolarisiert. Das Transistorsignal in elektrophysiologischer Lösung zeigt das typische Verhalten, hier kann das elektrische Signal des dynamischen Gatingverhaltens der Kanäle nicht mehr von Oberflächeneffekten des FET getrennt werden, da das Öffnen der Kanäle nicht instantan erfolgt, sondern die Öffnungszeitkonstante im Bereich der Diffusionszeit der Ionen im Spalt liegt. Im Falle der natriumfreien Lösung (gleiches Messprotokoll

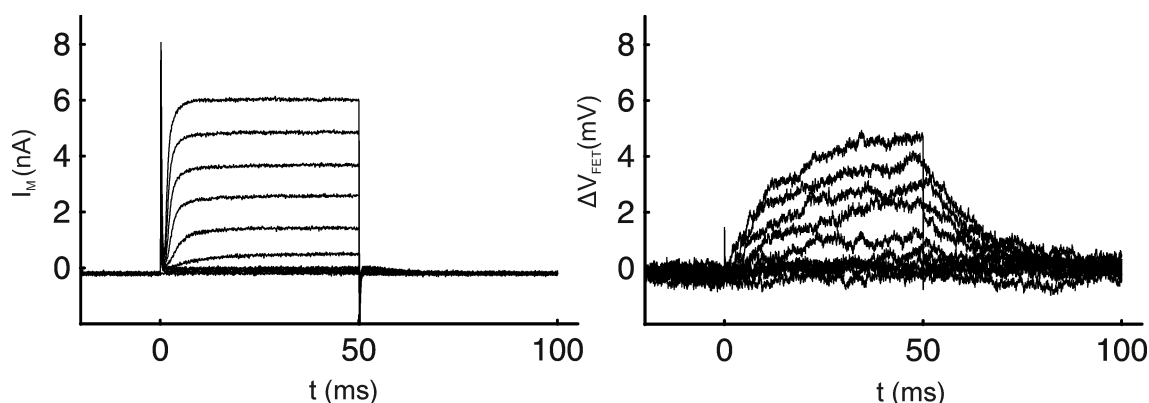


Abbildung 6.12: Gatingdynamik der Kv1.3-Kanäle in elektrophysiologischer Lösung. Das Transistorsignal ist dominiert von Oberflächeneffekten.

wie bei der elektrophysiologischen Lösung) kann das dynamische Gatingverhalten der Kaliumkanäle aufgelöst werden (Abbildung 6.13). Das Transistorsignal ist nach wie vor eine Überlagerung aus elektrischer und chemischer Antwort, der elektrische Anteil der Kopplung ist allerdings wesentlich höher. Daher durchläuft das Transistorssignal direkt nach der elektrischen Antwort noch eine ansteigende Flanke, die sich im Zellstrom nicht wiederfindet. An dieser Messung lässt sich deutlich zeigen, daß das Öffnungsverhalten der Kanäle in der Adhäsionsmembran identisch mit den Kanälen in der restlichen Membran ist. Der

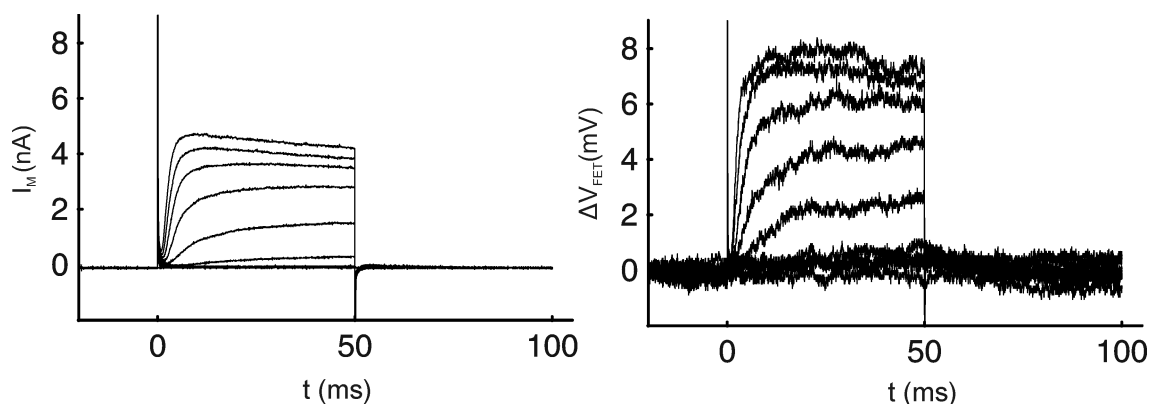


Abbildung 6.13: Gatingdynamik der Kv1.3-Kanäle in natriumfreier Lösung (mit Calcium und Magnesium). Das Transistorsignal in der hochohmigen Lösung zeigt die Gatingdynamik der Kanäle in der Adhäsionsmembran.

6.3. DYNAMISCHES GATINGVERHALTEN DER IONENKANÄLE IN DER ADHÄSIONSMEMBRAN

Unterschied der beiden Signaltypen bei Verwendung der beiden verschiedenen Lösungen verdeutlicht sich auch bei einer theoretischen Simulation.

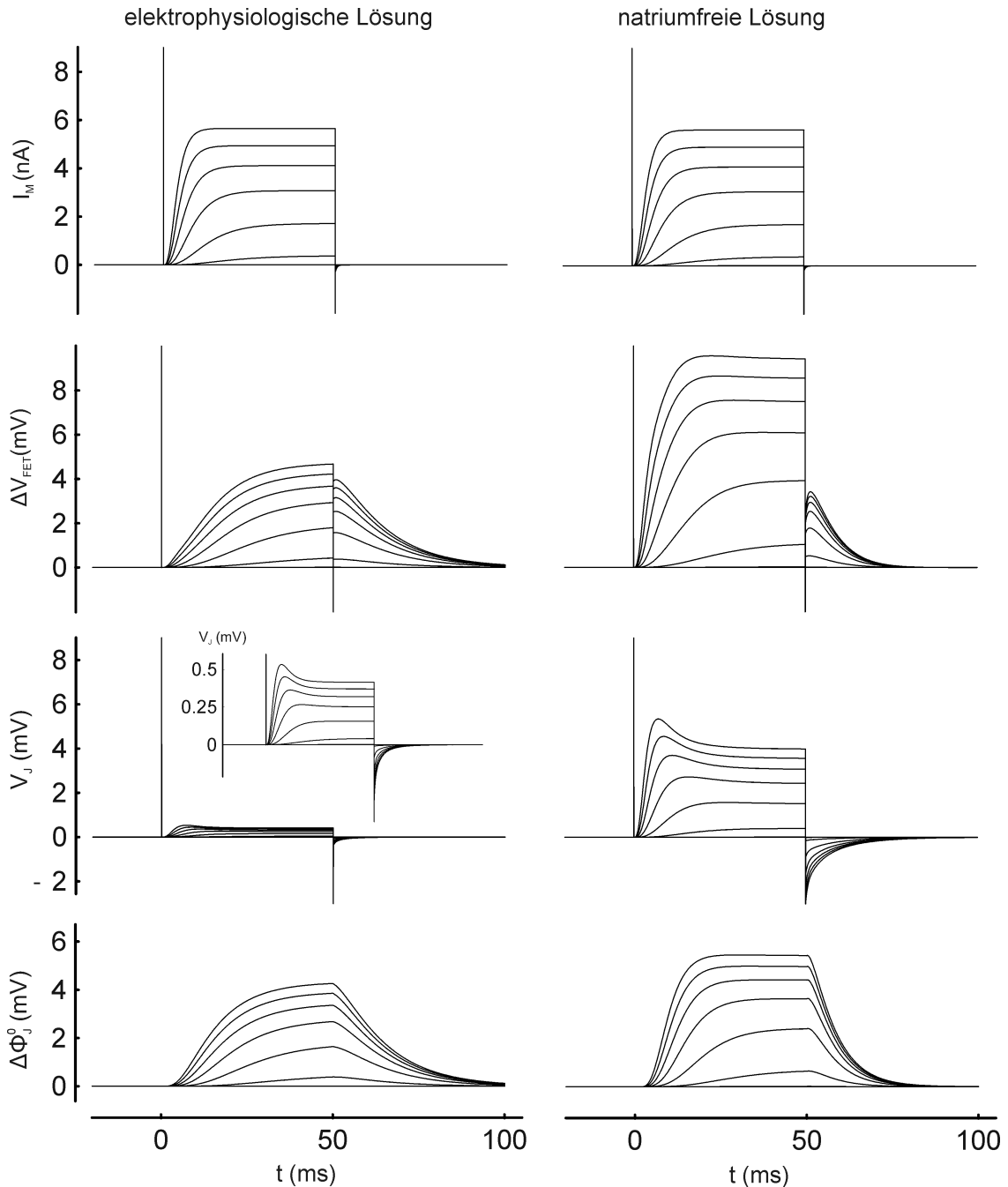


Abbildung 6.14: Simulation des dynamischen Gatingverhaltens der Ionenkanäle und das resultierende Transistorsignal bei elektrophysiologischer und natriumfreier Lösung

Hierbei wurde in das Differentialgleichungssystem des Elektrodifusionsmodells noch die Ratengleichungen für die Kanaldynamik eingesetzt. Die Ratenkonstanten wurden aus Abschnitt 3.3.2 übernommen, die Leitfähigkeit der Adhäsionsmembran ist 20 nS, die der freien Membran 40 nS und die Kopplungsfläche ist gleich $200 \mu m^2$. Das Ergebnis ist in

KAPITEL 6. ELEKTRISCHE UND CHEMISCHE ZELL-TRANSISTOR-KOPPLUNG

Abbildung 6.14 dargestellt.

In der Simulation des FET-Signals in elektrophysiologischer Lösung unterscheidet sich, wie auch in der Messung beobachtet, das Transistorsignal gravierend vom Zellstrom. In diesem Falle ist es unmöglich, aus dem gemessenen Signal auf die Öffnungscharakteristik der Kanäle zurückzuschliessen. Dies ist anders bei natriumfreier Lösung, hier ist die Ähnlichkeit des FET-Signals mit der des Zellstroms sehr hoch. Trotzdem gibt es Abweichungen durch chemische Effekte, die sich sowohl in der Simulation als auch in der Messung wiederfinden.

Im folgenden Kapitel soll nun noch ein weiterer Vorteil der Verwendung von hochohmigen Lösungen aufgezeigt werden.

Kapitel 7

Wege zur Biosensorik

In diesem Kapitel sollen Wege für eine Verwirklichung eines Ionenkanal-Biosensors aufgezeigt werden. Dieser Biosensor soll nichtinvasiv das Öffnen und Schliessen der Ionenkanäle in einer Zellmembran detektieren. Die Expression der Ionenkanäle in die Zellmembran erfolgt über eine stabile Transfektion einer einfach zu handhabenden Zelllinie wie z.B. HEK293, HELA oder MDCK-Zellen. Als Ionenkanalsorte könnten ligandengesteuerte Kanäle (empfindlich z.B. auf NMDA, GABA oder Acetylcholin) verwendet werden. Nachdem bei diesem Zelltypus durch das Öffnen der Kanäle keine Aktionspotentiale ausgelöst werden, kann nur das rein elektrische (oder evtl. chemische) Signal, verursacht durch Umladeströme durch den Spalt von der Adhäsionsmembran zu der freien Membran, gemessen werden. Dies setzt eine Ungleichverteilung der Ionenkanäle in der Membran voraus. Bei Gleichverteilung der Kanäle in der Membran (wie z.B. in Abschnitt 5.4.2 bei Kv1.3-Kanälen in HEK293-Zellen festgestellt wurde) kann kein Signal detektiert werden.

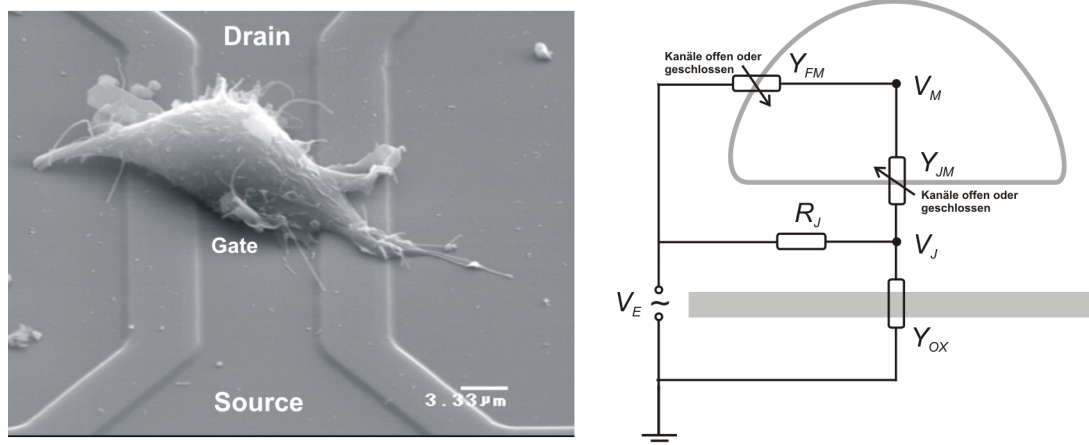


Abbildung 7.1: Mögliche Anordnung eines nichtinvasiven Ionenkanal-Biosensors. Das Ersatzschaltbild auf der rechten Seite zeigt die verwendete Messmethode. Durch eine elektrische Modulation des umgebenden Elektrolyten kann eine Leitfähigkeitsveränderung des komplexen Membranwiderstands (bestehend aus Membrankapazität und Membranleitfähigkeit) durch eine Veränderung der frequenzabhängigen Übertragungsfunktion $h = \frac{V_J}{V_E}(\omega)$ gemessen werden.

Daher müssen andere Wege eingeschlagen werden, um den offenen bzw. geschlossenen Zustand der Kanäle zu detektieren. Ein Weg hierzu wäre eine elektrische Badmodulation

von V_E (bisher konstant auf Masse gehalten) und das Messen einer frequenzabhängigen Übertragungsfunktion $\frac{V_I}{V_E}$ in den Transistor. Diese Methode misst eine Veränderung der Membranleitfähigkeit und wäre damit unabhängig von dynamischen Umladevorgängen der Zelle. Dies soll im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

7.1 nichtinvasive Detektion von geöffneten Kanälen

In Abbildung 7.1 ist auf der rechten Seite das Messprinzip dargestellt. Die Übertragungsfunktion $h = \frac{V_I}{V_E}(\omega)$ lässt sich durch die Admittanzen der freien Membran Y_{FM} und der Adhäsionsmembran Y_{JM} beschreiben:

$$h(\omega) = \frac{Y_{FM} + Y_{JM} + R_J Y_{FM} Y_{JM}}{Y_{FM} + Y_{JM} + R_J Y_{FM} Y_{JM} + R_J (Y_{FM} + Y_{JM}) Y_{OX}} \quad (7.1)$$

Die Admittanzen Y_{FM} und Y_{JM} unterscheiden sich bei offenen und geschlossenen Kanälen durch ihre unterschiedlichen Membranleitfähigkeiten $G_{FM}^{offen,geschlossen}$ und $G_{JM}^{offen,geschlossen}$:

$$\begin{aligned} Y_{FM}^{offen,geschlossen} &= i\omega C_{FM} + G_{FM}^{offen,geschlossen} \\ Y_{JM}^{offen,geschlossen} &= i\omega C_{JM} + G_{JM}^{offen,geschlossen} \\ Y_{OX} &= 0.3 \cdot i\omega C_{JM} \end{aligned} \quad (7.2)$$

Im Grenzfall niedriger Frequenzen ist die Übertragungsfunktion unabhängig von der Membranleitfähigkeit gleich 1. Bei hohen Frequenzen dominiert der kapazitive Strom über die Membrankapazitäten, hier ist der Grenzfall ebenfalls unabhängig von der Leitfähigkeit sowie von der Leitfähigkeit des Spaltes:

$$h(\omega \rightarrow \infty) = \frac{1}{1 + \frac{C_M C_{OX}}{C_{JM} C_{FM}}} \quad (7.3)$$

Der Übergang zwischen beiden Grenzfällen ist abhängig von der Leitfähigkeit des Spaltes und der Membranleitfähigkeit und kann daher bei bekanntem Spaltwiderstand zur Messung von geöffneten Kanälen in der Membran benutzt werden.

Dieses Prinzip wurde bereits von Volker Kiessling angewendet, um eine Leitfähigkeitsveränderung einer Lipidmembran verursacht durch Zugabe von Gramicidin bei Riesenvesikeln auf Transistorchips zu messen [Kie99]. Außerdem konnte durch Impedanzmessungen mittels Metallelektroden der Bedeckungsgrad der Oberfläche von fibroblastischen Zellen [Gia91] sowie ein Aufbrechen der Tight-Junctions zwischen Epithelzellen [Weg00] gemessen werden.

Allen drei Verfahren ist ein hoher Bedeckungsgrad der spannungssensitiven Elektrode gemeinsam. Will man dieses Prinzip für vereinzelte Zellen wie z.B. HEK293-Zellen verwenden, stellt sich das Problem, daß der Spaltwiderstand R_J zu klein ist, um eine signifikante Änderung der Membranleitfähigkeit messen zu können. Der Übergang zu einem salzarmen Elektrolyten kann dieses Problem lösen [Fro02]. An dieser Stelle soll betont werden, daß die Anteile der Ionensorten in der Zusammensetzung der Lösung keine Rolle spielt, da nur der elektrische Widerstand der Kanäle in der Membran gemessen wird, es muß also lediglich die Ionensorte im Elektrolyten enthalten sein, die den Kanal passieren kann.

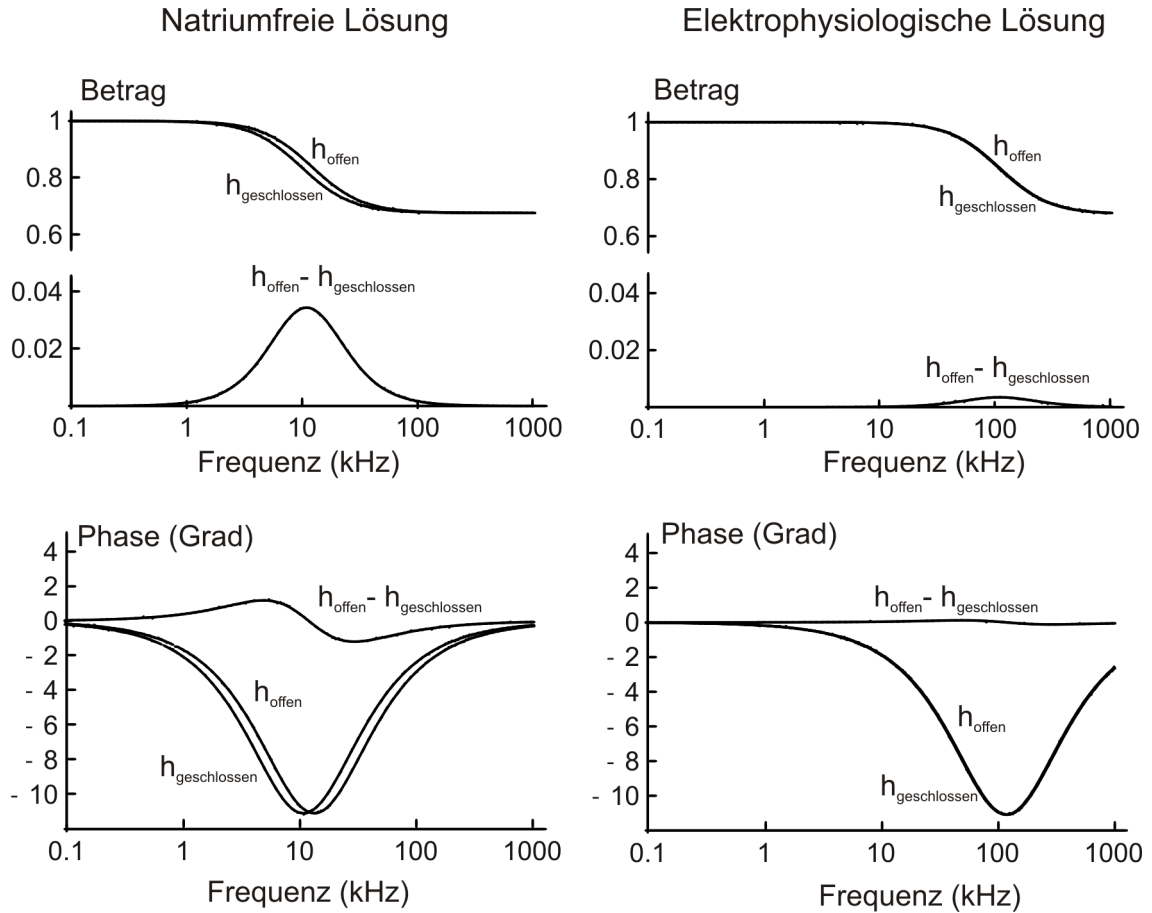


Abbildung 7.2: Theoretische Abschätzung für die nichtinvasive Detektion von geöffneten Kanälen durch elektrische Modulation des Elektrolyten. Es wurden für HEK293-Zellen typische Zellparameter (Adhäsionsfläche gleich $300 \mu\text{m}^2$, Gesamtzellfläche $1000 \mu\text{m}^2$, spezifische Membranleitfähigkeit bei offenen Kanälen $20 \text{ mS}/\text{cm}^2$) gewählt. Während sich in elektrophysiologischer Lösung ($R_J = 520 \text{ k}\Omega$) die Messung als messtechnisch äußerst schwierig erweist, könnte ein Übergang zu einer salzarmen Lösung (in diesem Fall eine natriumfreie Lösung mit $R_J = 5.76 \text{ M}\Omega$) dieses Problem lösen.

In Abbildung 7.2 ist der Unterschied zwischen elektrophysiologischer Lösung ($R_J = 520 \text{ k}\Omega$) und natriumfreier Lösung ($R_J = 5.76 \text{ M}\Omega$) dargestellt. Dabei sind die unterschiedlichen Übertragungsfunktionen $h_{\text{offen,geschlossen}}$ sowie die Differenz $h_{\text{offen}} - h_{\text{geschlossen}}$ in Betrag und Phase gegen die Frequenz aufgetragen. Es wurden für HEK293-Zellen typische Zellparameter (Adhäsionsfläche gleich $300 \mu\text{m}^2$, Gesamtzellfläche $1000 \mu\text{m}^2$, spezifische Membranleitfähigkeit bei offenen Kanälen $20 \text{ mS}/\text{cm}^2$) gewählt. In elektrophysiologischer Lösung kann erst bei sehr hohen Frequenzen ($\nu = 100 \text{ kHz}$) ein maximaler Unterschied der Übertragungsfunktionen von 0.4% detektiert werden. In natriumfreier Lösung liegt dagegen die charakteristische Frequenz bereits bei 10 kHz , ausserdem ist die Differenz der Übertragungsfunktionen wesentlich höher und liegt bei etwa 4% . Während sich also die Detektion von geöffneten Ionenkanälen bei vereinzelt Zellen auf Transistoren in elektrophysiologischer Lösung messtechnisch als äußerst schwierig erweist, könnten Messungen in salzarmen Lösungen dieses Problem lösen. Voraussetzung für diese Art der Messung

ist jedoch eine ausreichend lange Öffnungszeit der Kanäle, da die Genauigkeit der Messgröße von der Integrationszeit der Wechsellspannungsmessung abhängt. Daher wäre das bevorzugte Ziel genetisch modifizierte nicht-inaktivierende Kanäle. Zudem sollte die Expressionsrate der Kanäle stark erhöht werden, damit die Leitfähigkeit der Membran im Bereich der Spaltleitfähigkeit liegt.

Da in dieser Arbeit spannungsabhängige Kanäle untersucht wurden, müssen diese nach wie vor durch eine Veränderung der intrazellulären Spannung geöffnet werden. Dieses Vorgehen ist invasiv, kann jedoch Aufschluss über die Machbarkeit der erläuterten Methode geben.

7.2 Detektion von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen

Durch die Kontaktierung der Zellen mittels Patch-Clamp-Technik können durch Depolarisierung der Zelle die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle kontrolliert geöffnet und geschlossen werden.

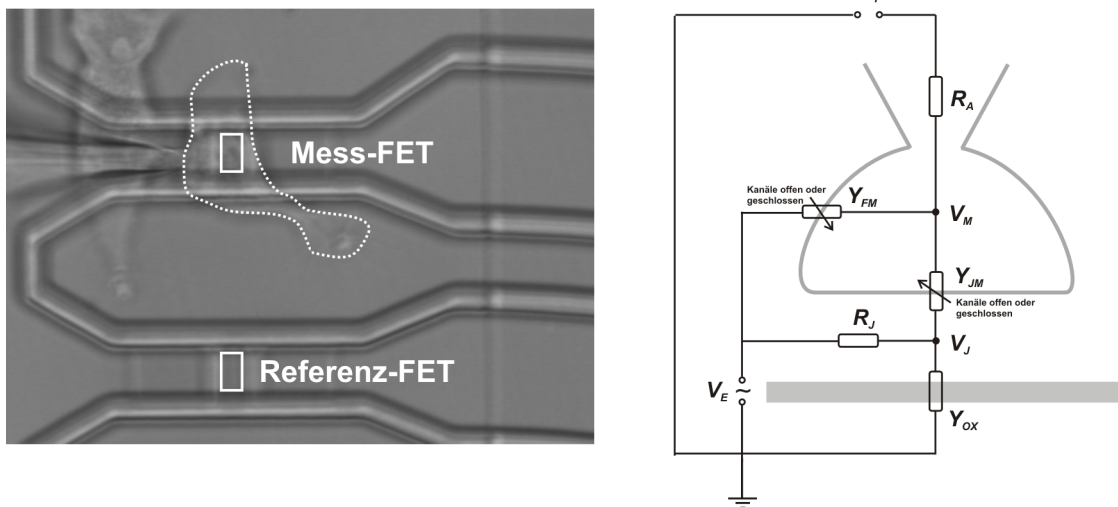


Abbildung 7.3: Links: Mittels Patch-Clamp-Technik kontaktierte HEK293-Zelle auf der Gate-Region eines Transistors. Die spannungsgesteuerten Kv1.3-Kanäle werden durch Depolarisation der Zelle geöffnet. Rechts: Ersatzschaltbild der Messsituation. Im Unterschied zur nicht-invasiven Detektion ist die kontaktierende Pipette für AC-Messungen geerdet und koppelt so zusätzlich in die Zelle ein.

In Abbildung 7.3 ist auf der linken Seite eine kontaktierte HEK293-Zelle auf der Gate-Region eines Transistors abgebildet. Das Ersatzschaltbild unterscheidet sich von der nichtinvasiven Messung durch eine "Quasi"-Erdung der Pipette für AC-Messungen, da die Spannung im Pipetteninneren auf einen konstanten Wert geregelt wird. Die Zelle ist durch einen Zugangswiderstand in die Zelle mit der Pipette verbunden. Im Grenzfall hoher Zugangswiderstände geht dieses Modell in den nichtinvasiven Fall über.

Die neue Übertragungsfunktion $h(\omega) = \frac{V_J}{V_E}(\omega)$ lässt sich wieder durch die Admittanzen der freien Membran Y_{FM} und der Adhäsionsmembran Y_{JM} beschreiben:

$$h(\omega) = \frac{1 + R_A(Y_{FM} + Y_{JM} + R_J Y_{FM} Y_{JM})}{1 + R_J(Y_{JM} + Y_{OX}) + R_A(Y_{FM} + Y_{JM} + R_J Y_{FM} Y_{JM} + R_J(Y_{FM} + Y_{JM})Y_{OX})} \quad (7.4)$$

Bei endlichem Zugangswiderstand ist der Grenzfall für hohe Frequenzen identisch mit dem nichtinvasiven Fall (Gleichung 7.3), bei verschwindendem Zugangswiderstand geht die Übertragungsfunktion gegen Null. Im folgenden soll das Modell mit einem Zugangswiderstand von $R_A = 3M\Omega$ untersucht werden. Der wesentliche Unterschied zur nichtinvasiven Messung besteht im unterschiedlichen Grenzfall bei niedrigen Frequenzen. In diesem Fall ist die Übertragungsfunktion:

$$h(\omega = 0) = \frac{1}{1 + \frac{R_J G_{JM}}{1 + R_A(G_M + R_J G_{JM} G_{FM})}} \quad (7.5)$$

Daher ergibt sich ein unterschiedlicher Wert bei geöffneten bzw. geschlossenen Kanälen bereits bei niedrigen Frequenzen.

In Abbildung 7.4 ist nun die theoretische Modellierung für das kontaktierte ($R_A = 3M\Omega$), sonst jedoch gleiche Zell-Chip-System wie beim nicht-invasiven Fall dargestellt. Es zeigen sich erneut drastische Unterschiede bei verschiedener Wahl der Elektrolyten. Während wie schon beim nicht-invasiven Fall die Messung in elektrophysiologischer Lösung erst bei hohen Frequenzen äußerst kleine Betragsunterschiede der Übertragungsfunktion durch Öffnen der Ionenkanäle ergeben, sagt das Modell in hochohmiger Lösung wesentlich höhere Unterschiede bei Frequenzen unterhalb von 10 kHz voraus.

7.3 Messung von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen

Im folgenden Abschnitt soll nun eine Messung an HEK293-Zellen bei geöffneten und geschlossenen Kv1.3-Kanälen untersucht werden. Die auf der Gate-Region liegende Zelle ist in Abbildung 7.3 dargestellt. Um eine Verfälschung der Daten durch apparative Größen auszuschliessen, wurde die Übertragungsfunktion h als Quotient des Signals aus Mess-FET und Referenz-FET (siehe Abb. 7.3) gebildet. Die Zelle wurde kontaktiert und mittels eines 100 ms langen Spannungspulses von -70 mV auf +100 mV depolarisiert.

In Abbildung 7.5 ist der resultierende Strom sowie das Transistorsignal ohne elektrische Anregung des Bades sowie bei einer Modulation der Badspannung mit einer Amplitude von 4 mV (RMS) und einer Frequenz von 90 Hz gezeigt. In weiteren 10 Schritten wurde die Frequenz in logarithmisch äquidistanten Schritten (in Hz: 150, 240, 390, 620, 990, 1580, 2500, 3970, 6300, 10000) auf 10 kHz erhöht. Die Abtastfrequenz der Messkarte lag bei 30 kHz, daher wurde, um Aliasing-Effekte zu vermeiden, nur bis 10 kHz gemessen.

Bei der Messung wurden zwei verschiedene Elektrolyte ausgetauscht, eine hochohmige Lösung (Zusammensetzung: 5 mM Kaliumchlorid, 1.8 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 5 mM HEPES, pH 7.4) und eine niederohmige Lösung (Zusammensetzung: 5 mM Kaliumchlorid, 120 mM Natriumchlorid, 5 mM HEPES, pH 7.4). Die spezifische

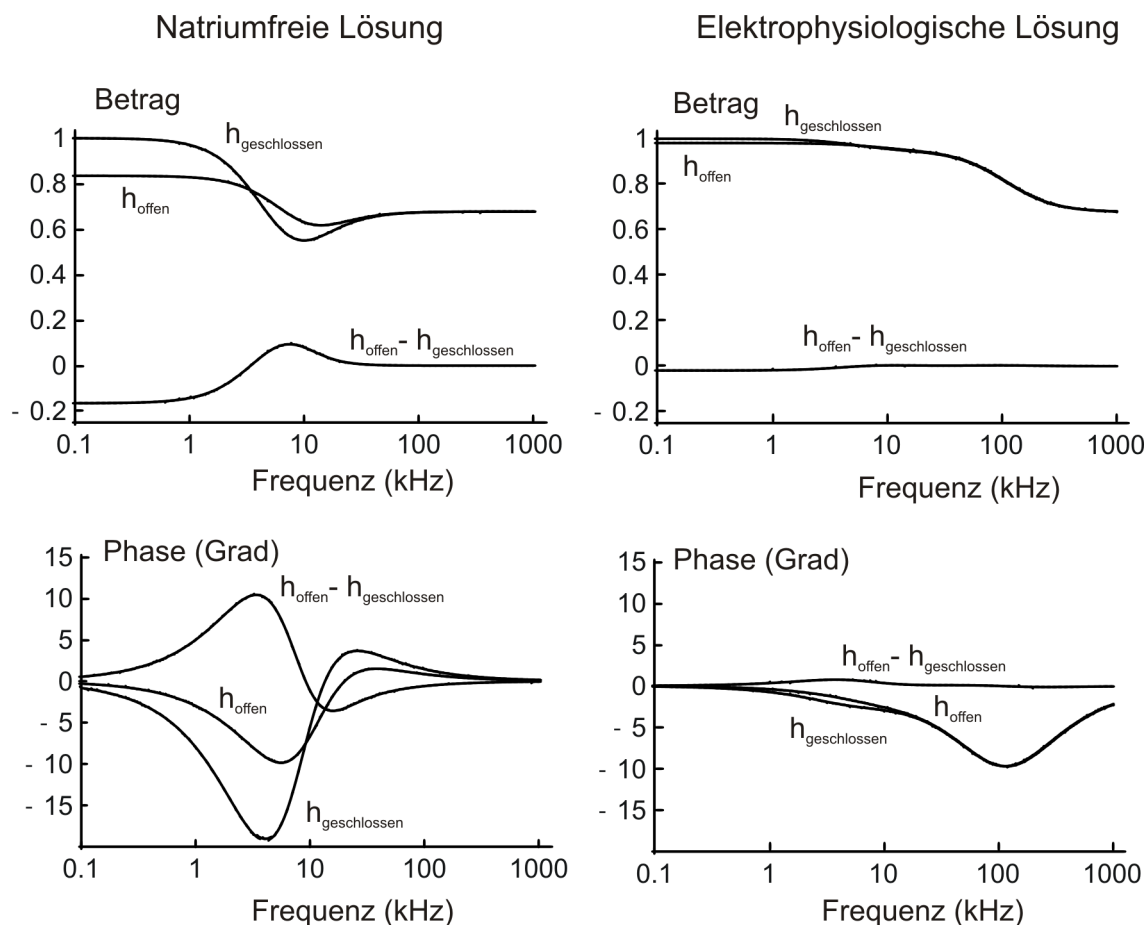


Abbildung 7.4: Theoretische Abschätzung für eine Detektion von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen durch elektrische Modulation des Elektrolyten. Als Zellparameter wurde die gleichen Werte wie bei der nicht-invasiven Detektion, als Zugangswiderstand wurde $R_A = 3M\Omega$ gewählt. Wiederum ist nur der Fall in hochohmiger Lösung messtechnisch interessant. Im Unterschied zum nichtkontaktierten Fall ist die Übertragungsfunktion bei geöffneten Kanälen im Grenzfall kleiner Frequenzen kleiner 1. Die Differenz der Übertragungsfunktionen ist daher kleiner 0, wird jedoch bei einer charakteristischen Frequenz wieder positiv.

Leitfähigkeit der Elektrolyten betrug 1.37 mS/cm^2 bzw. 12.97 mS/cm^2 , die errechneten Spaltwiderstände (bei einem Zell-Substrat-Abstand von 70 nm) sind damit $5.76 \text{ M}\Omega$ bzw. $606 \text{ k}\Omega$.

Für die Auswertung der gemessenen Signale wurde der Anteil des Mess-FET-Signals bis 100 ms für die geschlossenen Kanäle fouriertransformiert und Betrag und Phase im Bezug auf das Signal des Referenz-FETs berechnet. Für den Anteil der offenen Kanäle wurde der Zeitbereich zwischen 100 ms und 200 ms gewählt. In Abbildung 7.5 und 7.6 sind die unterschiedlichen Übertragungsfunktionen $h_{\text{offen,geschlossen}}$ sowie die Differenz $h_{\text{offen}} - h_{\text{geschlossen}}$ in Betrag und Phase gegen die Frequenz aufgetragen. Da bei der Auswertung der Differenz der Übertragungsfunktionen (offen/geschlossen) Unterschiede im Prozentbereich gemessen werden, wurde als Kontrolle die Messung an dem gleichen System aus Mess-FET ohne Zelle und Referenz-FET wiederholt und die Datenpunkte rot eingezeichnet.

Elektrische Badmodulation in Natriumfreier Lösung

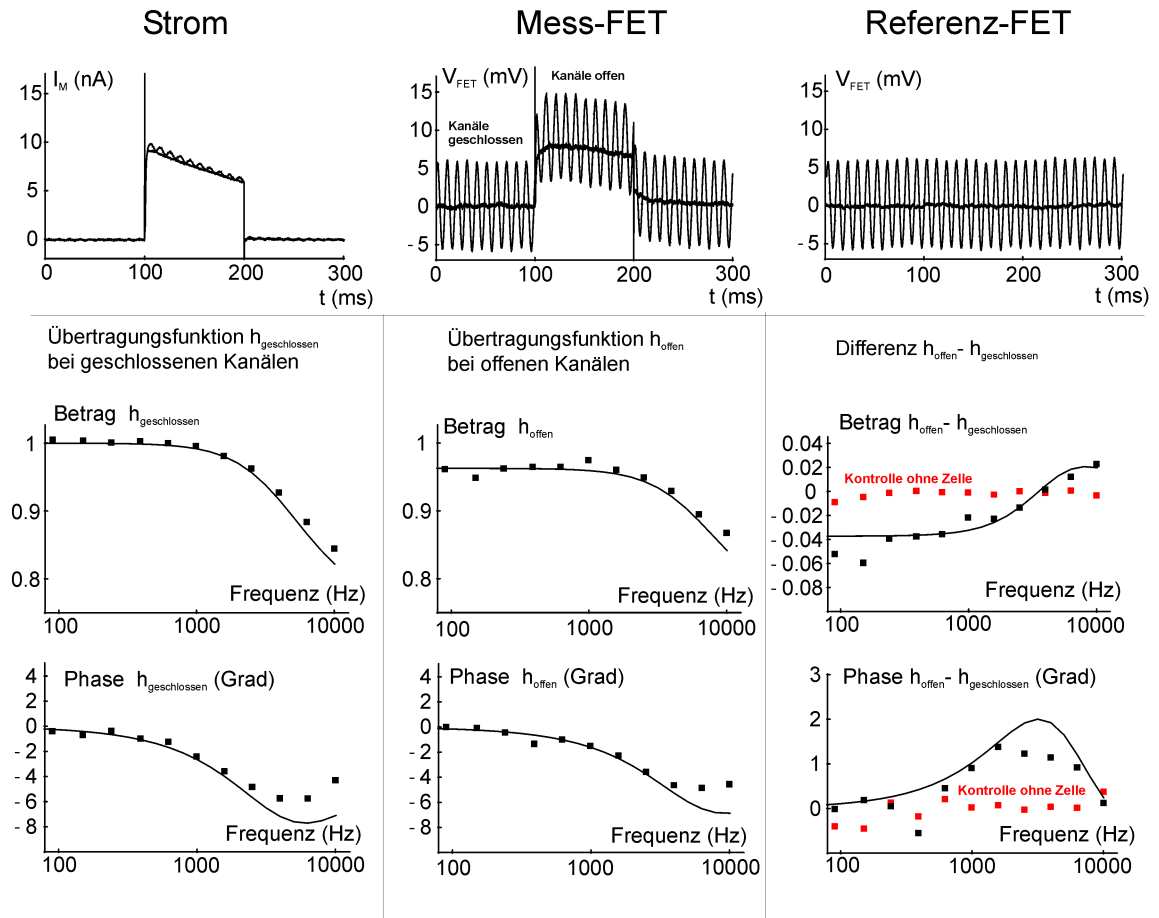


Abbildung 7.5: Detektion von geöffneten Kanälen in kontaktierten Zellen durch elektrische Modulation des Elektrolyten. Die Messung wurde in einer hochohmigen Lösung ohne Natriumchlorid durchgeführt. Die Erhöhung der Leitfähigkeit in der Zellmembran führt zu einer Verschiebung der charakteristischen Frequenz der Übertragungsfunktion $h(\omega)$.

net.

Da durch diese Messung lediglich die prinzipielle Machbarkeit dieser Art von Messung gezeigt werden soll, wurden als Theorieparameter runde Größen gewählt, die in etwa das Zell-Transistor-System wiedergeben. Dabei wurde für die Kopplungsfläche ($A_{JM} = 100\mu\text{m}^2$) die spezifische Leitfähigkeit von 10 mS/cm^2 und für die freie Membranfläche ($A_{FM} = 1000\mu\text{m}^2$) eine spezifische Leitfähigkeit von 14 mS/cm^2 angenommen. Für die unterschiedlichen Spaltwiderstände wurden die theoretisch berechneten verwendet. Als Zugangswiderstand wurde $R_A = 3\text{M}\Omega$ eingesetzt.

Der Vergleich zwischen der Messung in hoch- und niederohmiger Lösung zeigt, daß erst der Übergang zu einer salzarmen Lösung signifikante Ergebnisse liefert. Bei dieser Lösung kann die theoretische Vorhersage einer Vorzeichenumkehr verbunden mit einem Maximum in der Phase bei der Differenz aus Übertragungsfunktion mit offenen und geschlossenen

Badmodulation in elektrophysiologischer Lösung

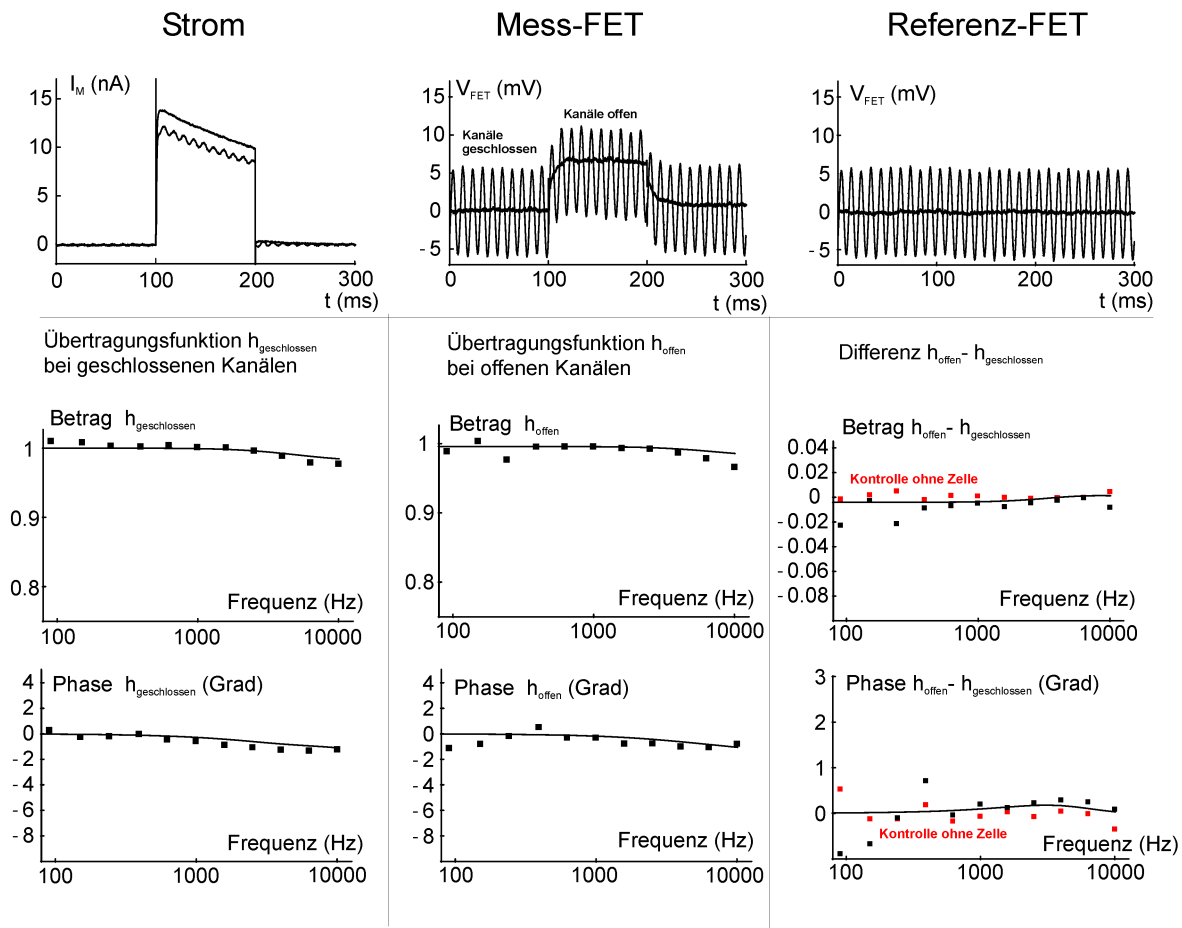


Abbildung 7.6: Bei einer Wiederholung der Messung in niederohmiger Lösung kann kein Unterschied in der frequenzabhängigen Übertragungsfunktion $h(\omega)$ bei offenen oder geschlossenen Kanälen festgestellt werden.

Kanälen experimentell bestätigt werden.

Da die gemessenen Größen in der gleichen Größenordnung wie die theoretisch vorhergesagten bei einer nicht-invasiven Messung liegen, scheint eine Verwirklichung eines auf dieser Basis arbeitenden Biosensors unter Zuhilfenahme einer hochohmigen Extrazellulärlösung machbar.

Kapitel 8

Ergebnisse

- In dieser Arbeit wurde die Kopplung von Kaliumkanälen an Feldeffekttransistoren untersucht. Durch Kontaktierung der Zellen durch Patch-Clamp-Technik wurde hierfür ein Zell-Transistor-System geschaffen, in dem die spannungsabhängigen Kanäle kontrolliert geöffnet und geschlossen werden konnten. Das resultierende Transistorsignal bei der Öffnung der Kanäle war bezüglich der langsamen Signalkomponente weitgehend unverstanden. Daher wurde durch Variation der Salzkonzentration des Badelektrolyten experimentell ein Satz an verschiedenen Signaltypen erzeugt, die mit der theoretischen Modellierung verglichen wurden.
- Das theoretische Verständnis der Zell-Transistor-Kopplung basiert auf der Modellierung der physikalischen Vorgänge im Spalt zwischen Zelle und Transistor. Durch den Einstrom von Kaliumionen in den Spalt wird einerseits eine elektrische sowie eine chemische Signalantwort des FET generiert. Durch die Anwendung eines Elektrodifusionsmodells konnte diese elektrische Antwort sowie die Konzentrationsänderungen abgeschätzt werden. Wird die Veränderung des Oberflächenpotentials aufgrund von dynamischen Bindungsprozessen an die Oberfläche aufgrund der Konzentrationsänderungen in die Modellierung mit einbezogen, so kann die Form sowie die Amplitude des Transistorsignal in verschiedenen Zusammensetzungen des Badelektrolyten verstanden werden.
- Durch die Reduktion der Natriumkonzentration des die Zelle umgebenden Elektrolyten konnte die Kopplungsstärke erhöht werden. In einer natriumfreien Lösung konnte das dynamische Gatingverhalten der Kaliumkanäle in der Adhäsionsmembran aufgelöst werden. Durch die Erhöhung des Spaltwiderstandes konnte zudem ein Verfahren für nicht-invasive Ionenkanal-Sensorik getestet werden.

Anhang A

Verwendete Materialien

A.1 Geräte

Computer:

Synchron PC, AMD Athlon XP, 2.4 GHz

Messkarten:

64AD/8DIO/2DAC-Messkarte AT-MIO-64E-3, National Instruments

6DAC/24DIO-Steuerkarte CIO-DDA06/Jr/16, Plug-In Electronic GmbH
PCI-GPIB, National Instruments

Software:

Betriebssystem Windows 2000

Labview 5.1, National Instruments

Mathematica 4.2, Wolfram Research

Mikroskop:

Axioskop 2 FS (Auflicht), Carl Zeiss

Objektiv 40×/0.80 W

Objektiv 32×/0.40 Ph2

Lock In Verstärker:

SR 830 bzw. SR 850, Stanford Research Systems

Patch-Clamp-Verstärker:

Axopatch200B, Axoclamp

SEC-10L, npi electronics, 71732 Tamm

Mikromanipulator:

Patchman, Eppendorf, 22331 Hamburg

Puller für Mikropipetten:

DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instruments, 81377 München

Anlage für Wasserreinigung (für Lösungen):

Milli-RO und Milli-Q

Millipore GmbH, 65824 Schwalbach

A.2 Lösungen

Extrazelluläre elektrophysiologische Lösung:

Angaben in mM

KCl 5, NaCl 135, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 5

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit NaOH)

Osmolalität mit Glukose (≈ 40 mM) auf 330 mOsmol/kg abgeglichen

Extrazelluläre Lösung, Na⁺-frei:

Angaben in mM

KCl 5, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 5

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit NaOH)

Osmolalität mit Glukose (≈ 290 mM) auf 330 mOsmol/kg abgeglichen

Extrazelluläre Lösung, Na⁺ variiert:

Angaben in mM

KCl 5; NaCl 0, 10, 20, 40, 60, 80; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 1; HEPES 5

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit NaOH)

Osmolalität jeweils mit Glukose auf 330 mOsmol/kg abgeglichen

Extrazelluläre Lösung, Na⁺ variiert, ohne zweiwertige Ionen:

Angaben in mM

KCl 5; NaCl 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120; HEPES 5

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit NaOH)

Osmolalität jeweils mit Glukose auf 330 mOsmol/kg abgeglichen

Intrazelluläre Lösung:

Angaben in mM

KCl 140, HEPES 5, EGTA 1

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit KOH)

Osmolalität mit Glukose auf 330 mOsmol/kg abgeglichen

Stammlösung Fibronectin:

1 mg Fibronectin F-2006 (Sigma)

aufgelöst in 4 ml sterilem H₂O (30 min, 37 °C)

aliquotiert in 120 μ l

Aufbewahrung bei 4 °C (bis 1 Jahr)

Verdünnung bei der Anwendung mit 2 ml PBS

Kulturmedium:

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, Sodium Pyruvate, Glucose, Pyridoxine
Cat. No. 21885-025, GibcoTM, Invitrogen Corp.

Zusatz: 10% FKS, GibcoTM 40F6414K (30 min hitzeinaktiviert bei 56 °C)

Für transfizierte Zellen zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes:

zusätzlich 100 μ g/ml G418 (Geneticin)

Puffermedium PBS:

PBS Dulbecco's, Cat. No. 14040-091

GibcoTM, Invitrogen Corp.

A.3 Bezugsquellen

HEK-Zellen:

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH),
38124 Braunschweig

Kulturschalen:

Falcon™ 35-3001
BD Biosciences, 69126 Heidelberg

Kleber für Chips:

medizinischer Kleber MK3, Fa. Sulzer Osypka, 79618 Rheinfelden-Herten
(identisch mit Elastosil E43, Wacker, 84489 Burghausen)

Mikropipetten:

VITREX von Modulohm A/S, DK-2730 Herlev
1.050 – 1.50 x 100 mm
zu beziehen über
Science Products GmbH, 65719 Hofheim
Produktname GB150–T10

Badelektroden:

EP05, Electrode Ag/AgCl 0.5 mm dia
World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL 34240-9258 USA

Reinigungslösung für Chips:

Tickopur RP100, Bandelin, 12207 Berlin

Farbstoffe DiIC₁₈(3):

Molecular Probes, 2333 AA Leiden, Niederlande
Best.-Nr. D-282, H-110

Sonstige Chemikalien:

Sigma, 89552 Steinheim
Merck, 64271 Darmstadt

Literaturverzeichnis

- [Bac96] Z. M. Bacchar, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H. Jaffrezic, G. Marest, A. Plantier. Sodium microsensors based on ISFET/REFET prepared through an ion-implantation process fully compatible with a standard silicon technology. *Sensor Actuat. B*, 32:101–105, 1996.
- [Bau99] W. H. Baumann, M. Lehmann, A. Schwinde, R. Ehret, M. Brischwein, B. Wolf. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensor Actuat. B*, 55:77–89, 1999.
- [Bee01] C. Beeton, H. Wulff, J. Barbaria, O. Clot-Faybesse, M. Pennington, D. Bernard, M. D. Cahalan, K. G. Chandy, E. Beraud. Selective blockade of T lymphocyte K^+ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(24):13942—13947, 2001.
- [Ber70] P. Bergveld. Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 17:70–71, 1970.
- [Ber88] P. Bergveld, A. Sibbald. *Analytical and biomedical applications of ion-selective field-effect transistors*. Elsevier, 1988.
- [Ber03] P. Bergveld. Thirty years of ISFETOLOGY What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensor Actuat. B*, 88:1–20, 2003.
- [Bon02] P. Bonifazi, P. Fromherz. Silicon Chip for Electronic Communication Between Nerve Cells by Non-invasive Interfacing and Analog-Digital Processing. *Adv. Mater.*, 14(17), 2002.
- [Bou83] L. Bousse, N. F. De Rooij, P. Bergveld. The influence of counter-ion adsorption on the ψ_0 /pH characteristics of insulator surfaces. *Surf. Sci.*, 135(1-3):479–496, 1983.
- [Bra97] D. Braun, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*, 65(4–5):341–348, 1997.
- [Bra00] D. Braun. *Capacitive stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes*. Dissertation, Technische Universität München, 2000.

- [Bra04] D. Braun, P. Fromherz. Imaging neuronal seal resistance on silicon chip using fluorescent voltage-sensitive dye. *Biophysical Journal*, 87:1351–1359, 2004.
- [Bri04] M. Brittinger, P. Fromherz. Cell-Transistor Chip with Ion Channels: Fast and Slow Response by Electrical and Chemical Interactions. *J. Phys. Chem. B*, *submitted*, 2004.
- [Che86] S.C. Chen, Yan-Kuin Su, J.S. Tzeng. The fabrication and characterisation of ion-sensitive field-effect transistors with a silicon dioxide gate. *J. Phys. D.*, 19:1951–1956, 1986.
- [Con99] E. C. Conley, W. J. Brammar. *The Ion Channel Facts Book*, Einträge 48-33, 48-34, 48-41. Academic Press, 1999.
- [Dav78] J.A Davis, R.O. James, J.O Leckie. Surface Ionization and Complexation at Oxide-Water Interface. 1. Computation of Electrical Double-Layer Properties in simple electrolytes. *J. Colloid Interf. Sci.*, 63(3), 1978.
- [Elb99] Z. Elbhiri, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, Y. Chevalier. Chemically grafted field effect transistors for the detection of potassium ions. *Sensor Actuat. B*, 58:491–496, 1999.
- [Fad03] D.A. Fadool, K. Tucker, G. Richards, L. Kaczmarek. Kv1.3-null mice have altered electrophysiological properties and olfactory-related behaviors. *Biophys. J.*, 84(2):413a, 2003.
- [Fer02] N. Fertig, R.H. Blick, J.C. Behrends. Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip. *Biophys. J.*, 82:3056–3062, 2002.
- [Fro99] P. Fromherz. Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane. *Eur. Biophys. J.*, 28:254–258, 1999.
- [Fro02] P. Fromherz, M. Brittinger. *Messvorrichtung und -verfahren für ein Screening bei auf Elektroden immobilisierten Zellen*. Patentanmeldung, DE 102 43 599 A1, EP 03 021 229.4, US 10,666,530, 2002.
- [Fro03] P. Fromherz. *in: Nanoelectronics and Information Technology*. pp781-810, Ed. R. Waser, Wiley-VCH, Berlin, 2003.
- [Fun86] C.D. Fung, P.W. Cheung, W.H. Ko. A Generalized Theory of an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Field-Effect-Transistor. *IEEE Trans. Electron. Devices*, 33:8–18, 1986.
- [Gia91] I. Giaever, C.R. Keese. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 88:7896–7900, 1991.
- [Gle03] R. J. Gleixner. *Floureszenzspektroskopische Messung des spezifischen Elektrolyt-widerstandes in der Adhäsionsregion des Neuron-Silizium-Kontakts*. Dissertation, Technische Universität München, 2003.
- [Goo66] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, 5(2):467–477, 1966.

- [Gra77] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type-5. *Journal of General Virology*, 36(1):59–72, 1977.
- [Haj00] B. Hajji, P. Temple-Boyer, J. Launay, T. do Conto, A. Martinez. pH, pK and pNa detection properties of SiO₂/Si₃N₄ ISFET chemical sensors. *Microelectron. Reliab.*, 40:783–786, 2000.
- [Ham81] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391(2):85–100, 1981.
- [Har77] T. Harrison, F. Graham, J. Williams. Host-range mutants of adenovirus type-5 defective for growth in HeLa-cells. *Virology*, 77(1):319–329, 1977.
- [Hod52] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its applications to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4):500–544, 1952.
- [Jia03] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423:33–41, 2003.
- [Kie99] V. Kiessling. *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazellulärer angelegten Wechselspannungen*. Dissertation, Technische Universität München, 1999.
- [Kle02] K.G. Klemic, J.F. Klemic, M.A. Reed, F.J. Sigworth. Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells. *Biosens. Bioelectron.*, 17:597–604, 2002.
- [Kov00] O.N. Kovbasnjuk, P.M. Bungay, K.R. Spring. Diffusion of Small Solutes in the Lateral Intercellular Spaces of MDCK Cell Epithelium Grown on Permeable Supports. *J. Membrane Biol.*, 175:9–16, 2000.
- [Kup98] J. Kupper. Functional expression of GFP-tagged Kv1.3 and Kv1.4 channels in HEK 293 cells. *Eur. J. Neurosci.*, 10:3908–3912, 1998.
- [Lam96] A. Lambacher, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*, 63(3):207–216, 1996.
- [Lam02] A. Lambacher, P. Fromherz. Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes. *Journal of the Optical Society of America B – Optical Physics*, 19(6):1435–1453, 2002.
- [Mos01] E. A. Moschou, N. A. Chaniotakis. Potassium selective CHEMFET based on an ion-partitioning membrane. *Analytica Chimica Acta*, 445:183–190, 2001.
- [Neh76] E. Neher, B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.

- [Net03] R. R. Netz. Electrofriction and Dynamic Stern Layers at Planar Charged Surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 91(13):138101, 2003.
- [Qui89] N. Quian, T.J. Sejnowsky. An Electro-Diffusion Model for Computing Membrane Potentials and Ionic Concentrations in Branching Dendrites, Spines and Axons. *Biol. Cybern.*, 62:1–15, 1989.
- [Rai98] R. Raiteri, B. Margesin, M. Grattarola. An atomic force microscope estimation of the point of zero charge of silicon insulators. *Sensor Actuat. B*, 46:126–132, 1998.
- [Sca92] P. J. Scales, F. Grieser, T. W. Healy. Electrokinetics of the Silica-Solution Interface: A Flat Plate Streaming Potential Study. *Langmuir*, 8:965–974, 1992.
- [Sch00] C. Schmidt, M. Mayer, H. Vogel. A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 39:3137–3140, 2000.
- [SG93] R. Sherman-Gold, editor. *The Axon Guide*. Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA, 1993.
- [Sig03] F. J. Sigworth. Life's transistors. *Nature*, 423(6935), 2003.
- [Stü89] W. Stühmer, J. P. Ruppersberg, K. H. Schröter, B. Sakmann, M. Stocker, K. P. Giese, A. Porschke, A. Baumann, O. Pongs. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO Journal*, 8(11):3235–3244, 1989.
- [Ste24] O. Stern. Zur Theorie der elektrischen Doppelschicht. *Z. Elektrochem.*, 30:508–516, 1924.
- [Ste03] A. Stett, C. Burkhardt, U. Weber, P. van Stiphout, T. Knott. CYTOCENTRING: A Novel Technique Enabling Automated Cell-by-Cell Patch Clamping with the CYTOPATCH Chip. *Receptor Channel*, 9:59–66, 2003.
- [Str01] B. Straub. *Kopplung von Feldeffekttransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen*. Dissertation, Technische Universität München, 2001.
- [Tad68] Th. F. Tadros, J. Lyklema. Adsorption of potential-determining ions at the silica-aqueous electrolyte interface and the role of some cations. *J. Electroanal. Chem.*, 17:267–275, 1968.
- [Ulb03] M. Ulbrich. *Öffnen von Ionenkanälen durch kapazitive Kopplung in Zellmembranen auf Siliziumchips*. Dissertation, Technische Universität München, 2003.
- [Van01] P. Vanysek. *In: The Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 82th edition, 2001.
- [Ver48] E.J.W. Verwey, J.T.G. Overbeek. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier Publishing Company, Inc., 1948.
- [Weg00] J. Wegener, A. Hakvoort, H.J. Galla. Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. *Brain Research*, 853:115–124, 2000.

- [Wei96] R. Weis, B. Müller, P. Fromherz. Neuron Adhesion on a Silicon Chip Probed by an Array of Field-Effect Transistors. *P. Phys. Rev. Lett.*, 76(2):327–330, 1996.
- [Wei97] R. Weis, P. Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E*, 55(1):877–889, 1997.
- [Xu03] J. Xu, P. A. Koni, P. Wang, G. Li, L. Kaczmarek, Y. Wu, Y. Li, R. A. Flavell, G. V. Desir. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human Molecular Genetics*, 12(25):551–559, 2003.
- [Yat74] D.E Yates, S. Levine, T.W. Healy. Site-binding Model of the Electrical Double Layer at the Oxide/Water Interface. *J. Chem. Soc. Farad. Trans. I*, 70:1807–1818, 1974.
- [Zec01] G. Zeck, P. Fromherz. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 98(18), 2001.
- [Zhu98] G. Zhu, Y. Zhang, H. Xu, C.J. Jiang. Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *Neurosci. Meth.*, 81:73–83, 1998.

LITERATURVERZEICHNIS

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. P. Fromherz für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft,

Raimund Gleixner für seine Hilfe bei den FLIC-Messungen und für viele fruchtbare Diskussionen,

Max Ulbrich und Janosch Lichtenberger für die Hilfsbereitschaft bei experimentellen und Diskussionsbereitschaft bei theoretischen Problemen,

Raimund Gleixner für das Korrekturlesen der Arbeit,

den Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut für Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre,

meinen Eltern für ihre finanzielle und mentale Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit,

und natürlich Ursi für ihre liebevolle Unterstützung während der Doktorarbeit.