

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

**Extrazelluläre Stimulation
von Ionenkanälen und Nervenzellen
mittels Elektrolyt/Oxid/Silizium-Kondensatoren**

Ingmar Schön

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. J. Leo van Hemmen
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief

Die Dissertation wurde am 6.11.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 13.12.2006 angenommen.

Zusammenfassung

Die elektrische Stimulation von Nervenzellen mit extrazellulären Elektroden spielt eine wichtige Rolle in der Hirnforschung und der Neuroprothetik. Ihr Grundgedanke ist, dass der elektrische Strom einer Elektrode das Potenzial in der Umgebung eines Neurons so beeinflusst, dass ein Aktionspotential ausgelöst wird. Der angestrebte Mechanismus für eine minimalinvasive Wechselwirkung ist ein rein kapazitiver Strom zwischen Elektrode und Elektrolyt und das reversible Öffnen von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Zellmembran.

In dieser Arbeit wird die extrazelluläre Stimulation einer auf einem planaren Elektrolyt/Oxid/Silizium-Kondensator adhärierten Zelle studiert. Als Oxide kommen HfO_2 und TiO_2 mit einer hohen Dielektrizitätskonstante zum Einsatz. Zur Analyse und Kontrolle der Membranströme und der intrazellulären Spannung wird die Patch-Clamp-Technik verwendet.

Eine definierte Spannungsänderung am Kondensator bewirkt einen Stromfluss durch den Spalt zwischen unterer Zellmembran und Substrat und erzeugt dort eine lokal begrenzte, extrazelluläre Spannung. Die Wirkung dieser Spannung auf die Polarisation der oberen und unteren Zellmembran und auf das Verhalten der Ionenkanäle wird anhand identifizierter Neurone aus *Lymnaea stagnalis* untersucht. Kombinierte Messungen im Voltage- und Current-Clamp belegen, dass der Mechanismus der Reizung auf dem Öffnen von Natriumkanälen beruht und wesentlich vom Vorzeichen der extrazellulären Spannung abhängt.

Eine periodische Stimulation ermöglicht das Reizen von Säugetierzellen unter physiologischen Bedingungen. Anhand eines Modellsystems aus HEK-Zellen mit rekombinanten Natriumkanälen wird gezeigt, dass die Summation der unterschwelligen Antworten einzelner Perioden zu einem überschwelligem Reiz führt, in Analogie zum sogenannten Gildemeister-Effekt. Auf dieser Basis werden hippocampale Rattenneurone in dissoziierten Zellkulturen erfolgreich stimuliert. Die Ergebnisse werden vor dem Hintergrund der Zellgeometrie und der lokalen Modulation der Elektrolytspannung diskutiert. Der Reizmechanismus bei Rattenneuronen konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Abstract

Electrical stimulation of nerve cells with extracellular electrodes is a classical technique in brain research and a fundamental tool in neuroprosthesis. Electrical current that originates from an electrode creates a gradient of extracellular electrical potential around the neuron such that an action potential may be elicited. The desired mechanism for a truly non-invasive interaction is a purely capacitive coupling between electrode and electrolyte and a reversible activation of voltage-gated ion channels in the cell membrane.

In this work we study the extracellular stimulation of individual cells in the situation of cell adhesion on a planar electrolyte-oxide-silicon (EOS) capacitor. The insulating material was HfO_2 or TiO_2 with a high dielectric constant. Membrane current and intracellular voltage were measured or controlled using the patch-clamp technique.

A defined voltage change at the capacitor led to a current flow along the cleft between attached cell membrane and substrate and produced a local extracellular voltage there. Its impact on the polarization of attached and free membrane domains and on the reaction of ion channels was studied with identified neurons from *Lymnaea stagnalis*. Combined measurements under voltage and current-clamp revealed that the stimulation mechanism relied on the activation of sodium channels and strongly depended on the polarity of the extracellular voltage.

Periodic stimulation enabled the excitation of mammalian cells under physiological conditions. Within a model system consisting of HEK cells with recombinant sodium channels it could be shown that summation of sub-threshold responses of individual pulses led to supra-threshold excitation, in analogy to the Gildemeister effect. On this basis, also rat neurons were successfully stimulated. The results are discussed in the context of cell geometry and of the local modulation of bath voltage. However, the mechanism of stimulation with rat neurons remained dubious.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Extrazelluläre Stimulation von Nervenzellen	2
1.3	Konzeptionelle Ausrichtung	4
1.4	Gliederung dieser Arbeit	4
2	Theoretische Beschreibung des Systems	5
2.1	Elektrische Eigenschaften von Nervenzellen	5
2.1.1	Grundlagen	5
2.1.2	Hodgkin-Huxley Formalismus	7
2.2	Ionenkanäle	9
2.2.1	Aufbau und Funktion	10
2.2.2	Ionenkanäle in <i>Lymnaea stagnalis</i>	11
2.2.3	Der Natriumkanal Nav1.4	12
2.2.4	Ionenkanäle in <i>Rattus norvegicus</i>	12
2.3	Kopplung Zelle-Chip	14
2.3.1	Flächenkontaktmodell	14
2.3.2	Zwei-Domänen-Modell	15
2.3.3	Gültigkeits- und Anwendungsbereiche	17
2.3.4	Zusammenhang der Modelle	18
3	Charakterisierung der Komponenten	21
3.1	Stimulationschip	21
3.1.1	EOS Konfiguration	21
3.1.2	Chipherstellung	22
3.1.3	Oxidkapazität	22
3.1.4	Leckströme durch das Oxid	24
3.1.5	Zugangswiderstand des Elektrolyten	25
3.1.6	Kapazitiver Strom	27
3.2	Zellen	29
3.2.1	Identifizierte Neurone aus <i>Lymnaea stagnalis</i>	29
3.2.2	HEK-Zellen mit Natriumkanälen	31

3.2.3	Hippocampale Neurone aus <i>Rattus norvegicus</i>	32
3.3	Geometrie des Zell-Chip-Kontaktes	33
3.3.1	Adhäsionsfläche	33
3.3.2	Zell-Substrat-Abstand	35
3.4	Leitfähigkeit im Spalt	38
3.4.1	Experimentelle Bestimmung	38
3.4.2	Theoretische Diskussion	42
3.5	Elektrophysiologie	46
3.5.1	Die Patch-Clamp Technik	46
3.5.2	Voltage-Clamp	48
3.5.3	Current-Clamp	49
3.5.4	Messungen	50
3.6	Messaufbau	53
4	Mechanismus der Extrazellulären Stimulation	55
4.1	Grundzüge der Stimulation	55
4.1.1	Spannungsverlauf im Spalt	55
4.1.2	Transmembranspannungen und -ströme	57
4.1.3	Aktive Antwort mit Ionenkanälen	58
4.2	Passive Polarisierung	60
4.2.1	Passive Antwort im Current-Clamp	60
4.2.2	Supercharging	62
4.2.3	Passive Antwort im Voltage-Clamp	63
4.3	Kapazitive Aktivierung der Ionenkanäle	63
4.3.1	Elimination des kapazitiven Stroms	63
4.3.2	Adressierung der Ionenkanaldynamik	64
4.3.3	Ionenströme durch adhärenzte und ganze Membran	65
4.3.4	Eichung der extrazellulären Spannung	66
4.4	Aktionspotenziale	67
4.4.1	Ansteigende Rampen	67
4.4.2	Fallende Rampen	70
4.4.3	Physiologische Bedingungen	73
4.4.4	Zusammenfassung	73
5	Periodische Stimulation bei schwacher Kopplung	77
5.1	Vorüberlegungen	77
5.1.1	Problemstellung	77
5.1.2	Grundgedanke der periodischen Stimulation	79
5.1.3	Quantitatives Modell	80
5.2	Aktivierung der Natriumkanäle	80
5.2.1	Experimente unter unphysiologischen Bedingungen	80
5.2.2	Extrapolation auf physiologische Bedingungen	81

5.3	Pumpen der intrazellulären Spannung	82
5.3.1	Einzelpulse	82
5.3.2	Pulsanzahl	84
5.3.3	Pulsform	86
5.3.4	Haltespannung	88
5.4	Diskussion	91
5.4.1	Zusammenfassung	91
5.4.2	Literaturbezug	91
6	Stimulation von Rattenneuronen	93
6.1	Ergebnisse	93
6.1.1	Erfolgreiche Implementation	93
6.1.2	Spike-Analyse	96
6.1.3	Sekundärerregung	98
6.2	Diskussion	99
6.2.1	Einfluss der Zellgeometrie	99
6.2.2	Zusammenfassung	102
6.2.3	Experimenteller Ausblick	102
7	Ergebnisse und Ausblick	105
A	Ergänzungen	107
A.1	Ausarbeitung des Flächenkontaktmodells	107
A.1.1	Analytische Lösung für kapazitive Stimulation	107
A.1.2	Berücksichtigung der Membranleitfähigkeiten	110
A.2	Quasi-stationäres Modell der periodischen Stimulation	112
A.2.1	Grundlagen	112
A.2.2	Definition des Modells	113
A.2.3	Konsequenzen und Vorhersagen	115
A.3	Elektronische Schaltungen	117
A.3.1	Spannungsaddierer	117
A.3.2	Entkopplung Chipsignal	118
A.4	Verwendete Materialien	118
A.4.1	Software	118
A.4.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	118
A.4.3	Lösungen	120
A.4.4	Chemikalien	121
A.5	Abkürzungen	122

Aus dieser Arbeit gingen die folgenden Publikationen hervor:

I. Schoen and P. Fromherz. Activation of Na⁺ channels in cell membrane by capacitive stimulation with silicon chip. *Applied Physics Letters*, 87:193901, 2005.

I. Schoen and P. Fromherz. The mechanism of extracellular stimulation of nerve cells on an electrolyte-oxide-semiconductor capacitor. *Biophysical Journal*, 92(3): im Druck, 2007.

Kapitel 1

Einführung

1.1 Motivation

Informationen werden im Gehirn mithilfe kurzer elektrischer Signale, den *Aktionspotentialen*, verarbeitet und weitergeleitet. Die eigentliche Kodierung und Speicherung der Information findet hingegen in den chemischen Synapsen statt [Cohe02]. Eine Veränderung der Synapsenstärke, d.h. der erregenden oder hemmenden Wirkung präsynaptischer Aktivität auf die postsynaptische Zelle, ist die Grundlage der *Plastizität* neuronaler Netzwerke. Sowohl eine langanhaltende Stärkung (LTP) als auch Schwächung (LTD) kann durch ein spezielles zeitliches Muster der elektrischen Aktivität der beteiligten Zellen erreicht werden und wird als „Spike-Timing Dependent Plasticity“ (STDP) bezeichnet [Dan06].

Zur Untersuchung neuronaler Netzwerkaktivität werden häufig dissoziierte Zellkulturen als Modellsystem verwendet [Bank98]. In einem frühen Entwicklungsstadium isolierte Nervenzellen wachsen auf der kompatiblen Oberfläche einer Kulturschale heran und bilden funktionelle Verbindungen untereinander aus, wobei Wachstumsrichtung und Konnektivität in Maßen durch konditionierende Faktoren beeinflusst werden können [Clar93][Dean06]. Die wesentlichen Eigenschaften der Zell-Zell-Kontakte *in vitro* sind mit denen *in vivo* vergleichbar, insbesondere ist die Plastizität der chemischen Synapsen erhalten [Bi98].

Um das Verhalten des Netzwerkes detailliert und über einen längeren Zeitraum studieren zu können, wird eine Methode benötigt, die auf der Ebene einzelner Zellen eine bidirektionale, nicht-invasive Schnittstelle bereitstellt (Abb. 1.1). Die zweidimensionale Struktur der Kulturen eröffnet die Möglichkeit, die dafür notwendigen Bauelemente im Substrat zu integrieren und sowohl Messung als auch Reizung extrazellulär vorzunehmen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Vorgänge bei der Stimulation.

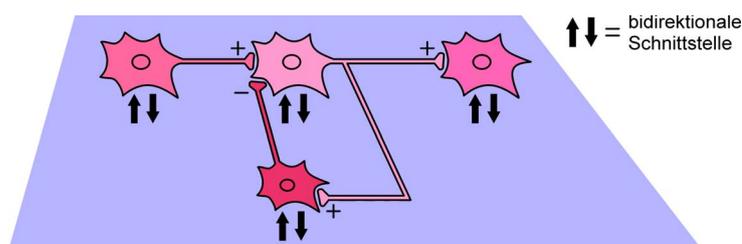


Abbildung 1.1: Vision einer bidirektionalen Schnittstelle zur Kontrolle und Analyse neuronaler Netzwerke.

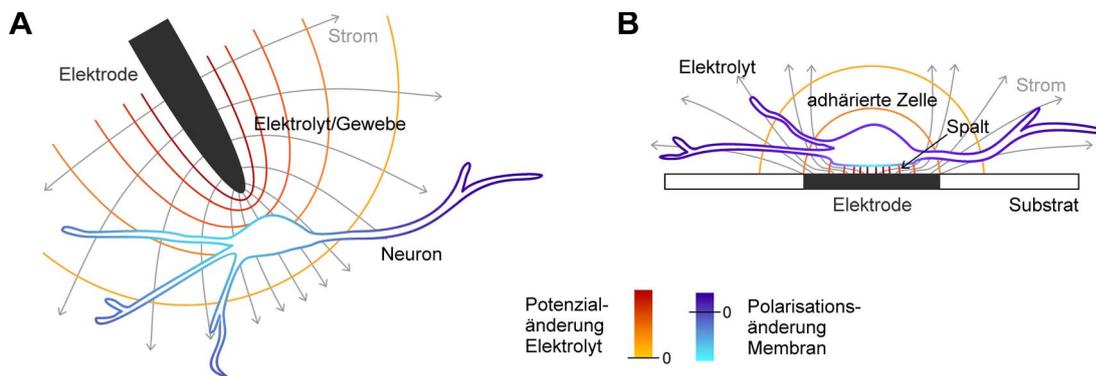


Abbildung 1.2: Prinzip der extrazellulären Stimulation **A** einer Nervenzelle im Gewebe oder **B** einer adhärenzten Zelle auf einer planaren Elektrode. Schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu.

1.2 Extrazelluläre Stimulation von Nervenzellen

Die elektrische Stimulation erregbarer Zellen mithilfe extrazellulärer Elektroden hat eine lange Tradition und war in den Anfangsjahren der Elektrophysiologie ohne Alternative. Mit der Einführung und stetigen Verbesserung intrazellulärer Messmethoden in den vergangenen sechzig Jahren wurde eine Kontrolle der Zellaktivität von unübertroffener Präzision möglich, die ganz wesentlich zur Aufklärung der heute bekannten Mechanismen beigetragen hat. Nachdem diese Methoden jedoch meist in das intrazelluläre Gleichgewicht der Zelle eingreifen, ist die Messdauer auf wenige Stunden begrenzt. In Langzeitanwendungen wie etwa der Prothetik kommen deshalb weiterhin überwiegend extrazelluläre Elektroden zum Einsatz, z.B. in Cochlea-Implantaten [Shep93], bei der Hirnstimulation (DBS) bei Parkinsonpatienten [Garc05] oder in Neuromotorprothesen [Hoch06].

Grundprinzip

Das Grundprinzip der extrazellulären Stimulation ist in Abbildung 1.2 A dargestellt. Der Strom einer Elektrode erzeugt ein Feldpotential in der Umgebung der Zelle, das elektrodennahe und -ferne Bereiche der Zelle gegensinnig polarisiert [Ranc75]. Kathodischer Strom depolarisiert den Bereich nahe der Elektrode, während weiter entfernte Bereiche der Zelle hyperpolarisiert werden; anodischer Strom hat den gegenteiligen Effekt. Ist die Amplitude und räumliche Ausdehnung der jeweiligen Depolarisation ausreichend, so führt das Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle zu einer Anhebung der intrazellulären Spannung und schließlich zur Auslösung eines Aktionspotenzials.

Dissoziierte Nervenzellen auf planaren Elektroden unterscheiden sich von der Situation im Gewebe aufgrund ihrer besonderen Adhäsionsgeometrie (Abb. 1.2 B). Der zwischen der unteren Membran des Zellkörpers und dem Substrat verbleibende, mit Elektrolyt gefüllte Spalt führt zu einer hochohmigen Abdichtung der bedeckten Elektrodenfläche vom restlichen Badelektrolyt, die eine Konzentration des elektrischen Feldes in diesem Bereich bewirkt. Diese lokal begrenzte, extrazelluläre Potenzialänderung polarisiert die adhärenzte Zellmembran gegensinnig zur und um ein Vielfaches stärker als die übrige Membran; fasst man die adhärenzte Membran als „elektrodennah“ auf, gilt für das Vorzeichen der Polarisation die Aussage des vorherigen Abschnitts.

In der Praxis ist die Elektrodenfläche meist größer als das Soma und kleiner als der Dendritenbaum des Neurons. Als elektrodennahe und -ferne Bereiche der Zelle unterscheidet man deshalb (i) eine adhärenzte vs. eine nicht-adhärenzte Membrandomäne und (ii) Zellkompartimente auf vs. neben der Elektrode. Die Superposition der mit dieser Einteilung verbundenen Polarisationsänderungen bestimmt das Gesamtverhalten der Zelle.

Stand der Literatur

Mit der Aufklärung der Vorgänge bei der Stimulation im Gewebe befassen sich viele experimentelle Arbeiten, deren frühe im hervorragenden Übersichtsartikel von James Ranck zusammengefasst sind [Ranc75]. Spätere Artikel weisen sowohl experimentell [Gust76] als auch theoretisch [McIn99] nach, dass das Aktionspotenzial im Axon, wahrscheinlich an dem (den) ersten Ranvierschen Schnürring(en) initiiert wird, übereinstimmend mit der Initiation bei synaptischer Stimulation [Stua97]. Über diese Arbeiten hinaus sind insbesondere die Untersuchungen zum sogenannten Gildemeister-Effekt [Gild44] zu nennen, der bei der Nervenreizung durch Wechselströme mit Frequenzen im niedrigen kHz-Bereich auftritt [Brom66b][Kuma66].

Die Stimulation mit planaren Elektroden wird seit ihrer ersten Erwähnung [Pine80] inzwischen routinemäßig eingesetzt. Dennoch sind nur selten gleichzeitige intrazelluläre Messungen dokumentiert [Jimb92][Brec95][Buit02], die zur Aufklärung des Mechanismus beitragen könnten; der einzig ambitionierte theoretische Erklärungsversuch stützt sich auf eine numerische Simulation [Buit02]. Die Polarität des Elektrodenstroms wurde von Wagenaar et.al. [Wage04] ausschließlich im Kontext der Stimulationseffizienz untersucht. Die Stimulation mit kapazitiven Transienten [From95] beruht wahrscheinlich auf Elektroporation.

Nach dem Stand der zugänglichen Literatur sind die Vorgänge bei der Stimulation eines adhärenzten Neurons weitestgehend unbekannt. Ein prinzipielles Defizit bisheriger Untersuchungen ist, dass überwiegend nur Aktionspotenziale nachgewiesen werden und deren Ausbreitung studiert wird, nicht aber die Polarisationsänderung der Membran, die der Initiation zugrunde liegt, oder sogar das Öffnen der verantwortlichen Ionenkanäle selbst. Die Diskussionen über den Mechanismus bleiben deshalb überwiegend spekulativ.

Elektrodenmaterial

Elektroden zur Stimulation werden meistens aus Metallen gefertigt. Bei planaren Elektroden wurden überwiegend Gold [Pine80][Klau03], platinisiertes Gold [Brec95][Mahe99] und Indium-Zinn-Oxid (ITO) [Rege89][Jimb92] verwendet. In frühen klinischen Anwendungen wurde rostfreier Stahl eingesetzt, während heutzutage Platin der Standard ist [Heid98].

Metalle bilden im Kontakt mit einem Elektrolyt eine dielektrische Doppelschicht hoher Kapazität aus, die hohe Stromdichten bei der Stimulation ermöglicht. Ein großes Problem ist jedoch die Vermeidung Faradayscher Ströme, die bei der Überschreitung der Schwelle für die Elektrolyse des Wassers einsetzen. Die damit einhergehenden elektrochemischen Reaktionen an der Elektrolyt/Elektroden-Grenzfläche beeinträchtigen die Stabilität der Elektrode durch Korrosion [Brec95], verursachen lokale Änderungen des pH [Klau03] und des Sauerstoffpartialdrucks [Blac84] und führen zu einer Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen [Huan98] bis hin zum Zelltod [Mahe99]. Zudem kann eine stimulierende Wirkung der reaktiven Nebenprodukte nicht ausgeschlossen werden [Blac84].

Ein wohldefiniertes System zum ungestörten Studium der elektrischen Stimulation muss deshalb auf rein kapazitivem Elektrodenstrom basieren. Zu diesem Zweck wurden dünne Oxidschichten auf Siliziumsubstraten eingeführt; in den bisherigen Arbeiten der Abteilung Fromherz wurden SiO_2 [From95], TiO_2 [Ulbr05][Wall06a] und HfO_2 [Scho05] verwendet. Diese verhalten sich in einem weiten Spannungsbereich als gute Isolatoren. Siliziumwafer mit bloßem thermischen Oxid, die bei der „Photoconductive Stimulation“ benutzt werden [Goda06], zeigen hingegen klare dc- und Photoströme [Star05] und sind deshalb ungeeignet.

1.3 Konzeptionelle Ausrichtung

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Dissertation von Maximilian Ulbrich, in der er an HEK-Zellen mit rekombinanten Kaliumkanälen zeigen konnte, dass eine extrazelluläre Spannung im Spalt Ionenkanäle in der adhären Membran zu öffnen vermag [Ulbr03]. Die Kanalöffnung wurde in Voltage-Clamp Messungen des Membranstroms nachgewiesen. Allerdings wurde dafür eine unphysiologische Elektrolytzusammensetzung verwendet.

Die vorliegende Arbeit macht sich diesen Ansatz zu eigen und setzt vier Schwerpunkte:

- Der Fokus liegt auf Natriumkanälen wegen ihrer Relevanz für die neuronale Erregung.
- Induzierte Membranpolarisation und Aktivierung der Ionenkanäle werden für sowohl adhären als auch nicht-adhären Domänen der Zellmembran untersucht.
- Der Mechanismus der Stimulation des Zellkörpers wird anhand wohldefinierter Modellsysteme erarbeitet, als Grundlage für das Verständnis der gleichzeitigen Stimulation von Soma und Neuriten in ausgewachsenen Nervenzellen.
- In Hinblick auf die Anwendung werden die Experimente (soweit möglich) unter physiologischen Elektrolytbedingungen durchgeführt.

1.4 Gliederung dieser Arbeit

Das folgende **Kapitel 2** gibt eine Einführung in die elektrischen Eigenschaften von Nervenzellen und stellt zwei mathematische Modelle zur Beschreibung einer auf einem Isolator adhären Zelle vor.

In **Kapitel 3** werden die einzelnen Komponenten des Versuchsaufbaus beschrieben, angefangen bei ihrer Herstellung/Gewinnung, über Methoden zur Untersuchung ihrer Eigenschaften bis hin zu ihrer experimentellen Charakterisierung.

In **Kapitel 4** wird das Stimulationsverhalten eines isolierten Zellkörpers anhand identifizierter Neurone aus *Lymnaea stagnalis* detailliert untersucht und durch direkte Messungen der zugrundeliegenden Membranströme erklärt.

Kapitel 5 überträgt die Erkenntnisse des vorherigen Kapitels auf die Stimulation unter schwachen Kopplungsbedingungen und propagiert eine periodische Form der Stimulation, die anhand von HEK-Zellen mit rekombinanten Natriumkanälen ausgearbeitet wird.

In **Kapitel 6** wird die periodische Reizung schließlich auf Nervenzellen aus *Rattus norvegicus* angewendet.

Kapitel 7 schließt mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse und einem kurzen experimentellen Ausblick.

Kapitel 2

Theoretische Beschreibung des Systems

In diesem Kapitel werden die elektrischen Eigenschaften von Nervenzellen und die diesen zugrunde liegenden Ionenkanäle vorgestellt. Für die spezielle Situation einer auf einem Kondensator adhärenen Zelle werden zwei mathematische Modelle eingeführt, mit deren Hilfe in späteren Kapiteln die experimentellen Ergebnisse beschrieben werden.

2.1 Elektrische Eigenschaften von Nervenzellen

Nervenzellen kommunizieren chemisch über in Synapsen ausgeschüttete Botenstoffe, während die Signalverarbeitung und -weiterleitung in der Zelle elektrisch mit Hilfe sogenannter Aktionspotenziale vonstatten geht. Dieser Abschnitt schildert die Grundlagen für die elektrische Aktivität und gibt eine phänomenologische Beschreibung der Vorgänge während eines Aktionspotenzials.

2.1.1 Grundlagen

Ionen in Wasser

Die Beweglichkeit u eines Ions in Wasser bestimmt seine Geschwindigkeit v unter Einwirkung einer äußeren Kraft F gemäß $v = u \cdot F$. Sie wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung mit dem Ionenradius R und dem Reibungskoeffizienten η beschrieben

$$u = (6\pi R\eta)^{-1} \tag{2.1}$$

und meist in Form des Diffusionskoeffizienten $D = k_B T u$ angegeben, wobei k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur bezeichnet [Eins05].

Ionen in Wasser unterliegen Diffusion und Drift. Die Diffusion beruht auf der Brownschen Bewegung der Ionen und sorgt für eine räumlich einheitliche Ionenkonzentration innerhalb eines zusammenhängenden Bereiches oder für einen Ionenfluss entlang eines Konzentrationsgradienten ∇c . Die Drift beschreibt die Bewegung aufgrund der Ladung ze_0 des Ions

in einem elektrischen Feld $E = \nabla V$, wobei z die Valenz des Ions und e_0 die Elementarladung sind. Der sich aus beiden Effekten ergebende Teilchenstrom j wird durch die Nernst-Planck-Gleichung 2.2 beschrieben.

$$j = -D \left(\nabla c + \frac{ze_0 c}{k_B T} \cdot \nabla V \right) \quad (2.2)$$

Lipidmembran

Die Zellmembran basiert auf einer Lipiddoppelschicht. Lipide sind amphiphile Moleküle bestehend aus zwei veresterten Fettsäuren und einer polaren Kopfgruppe. Lipide lagern sich in Wasser aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung in einem Selbstorganisationsprozess zusammen und bilden u.a. doppelschichtige Membranen aus.

Eine Lipidmembran besitzt eine mittlere dielektrische Konstante von $\varepsilon \approx 2$, die des sie umgebenden Wassers beträgt $\varepsilon = 78.5$. Für eine Ladung, die von einer Seite der Membran auf die andere gebracht werden soll, stellt sie gemäß Born eine Energiebarriere von etwa $50k_B T$ dar (siehe Abschnitt 3.4.2). Vereinfacht betrachtet ist sie also nahezu undurchlässig für Ionen und ermöglicht die Aufrechterhaltung unterschiedlicher Ionenkonzentration zu beiden Seiten.

Aufgrund der zweidimensionalen Struktur der Membran gleicht ihre Kapazität der eines Plattenkondensators der Dicke d_M .

$$c = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{d_M} \quad (2.3)$$

Die Dicke einer Lipiddoppelschicht beträgt $d_M = 5\text{nm}$ und ihre spezifische Kapazität ergibt sich zu $c = 0.35\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Experimentell findet man bei der Plasmamembran von Nervenzellen einen höheren Wert $c_M = 1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Hill01], der eine dünnere oder polarere Membranstruktur impliziert.

Bringt man Ladungen auf einen Teil der Membran auf, so sorgt die Minimierung der Feldenergie des Kondensators für eine Ausbreitung der Ladung. Dieser Prozess liegt der passiven Ausbreitung eines elektrischen Signals in Nervenzellen zugrunde.

Umkehrpotenzial

In einer Zelle sorgen Ionenpumpen in der Zellmembran für die Aufrechterhaltung von Konzentrationsunterschieden zwischen dem Zellinneren c_{in} und dem Außenraum c_0 . Ist die Membran für eine bestimmte Ionensorte permeabel und der Spannungsverlauf $V(x)$ über die Membran bekannt, so beschreibt die Nernst-Planck-Gleichung 2.2 den Stromfluss $j(V_M)$ im Gleichgewicht, mit der Spannung V_M zwischen Zellinnerem/-äußeren.

Unter der einfachen Goldman-Annahme $dV/dx = V_M/d_M$ erhält man eine nicht-lineare Strom-Spannungs-Charakteristik mit zwei wesentlichen Eigenschaften: (i) einem gleichrichtenden Effekt für unterschiedliche Ionenkonzentrationen $c_{\text{in}}/c_0 \neq 1$ und (ii) einen Vorzeichenwechsel des Stroms an der Umkehrspannung V_0 gemäß der Nernst'schen Gleichung.

$$V_0 = -\frac{k_B T}{ze_0} \ln \frac{c_{\text{in}}}{c_0} \quad (2.4)$$

2.1.2 Hodgkin-Huxley Formalismus

Die erste direkte Messung von Membranströmen wurde von Alan Hodgkin und Andrew Huxley am Axon des Tintenfisches durchgeführt und in Form spannungsabhängiger Änderungen der Membranleitfähigkeiten interpretiert [Hodg52]. Die dabei für die Messungen verwendete Voltage-Clamp-Methode wird im Abschnitt 3.5.2 beschrieben.

Membranströme

Der Strom pro Einheitsfläche der Membran setzt sich aus einem kapazitiven Anteil und Ionenströmen für Natrium-, Kalium- und andere Ionen gemäß Gleichung 2.5 zusammen.

$$i_M = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_k i_M^k, \quad k \in \{\text{Na}, \text{K}, \text{L}\} \quad (2.5)$$

In linearer ohmscher Näherung werden die Ionenströme mithilfe der spezifischen Leitfähigkeiten g_M^k und der Umkehrspannung V_0^k der jeweiligen Ionensorte als der chemischen Komponente der treibenden Kraft beschrieben.

$$i_M^k = g_M^k (V_M - V_0^k) \quad (2.6)$$

Eine Veranschaulichung der Strombilanz bietet das elektrische Ersatzschaltbild in Abbildung 2.1 A.

Aus diesem Ansatz folgt direkt, dass die Membranspannung sich immer zwischen den Umkehrspannungen von Kalium und Natrium $V_0^K < V_M < V_0^{\text{Na}}$ befindet und ihre Lage im Gleichgewicht von der größeren Membranleitfähigkeit bestimmt wird.

Kinetik und Spannungsabhängigkeit

Die Kinetik des Kalium- und Natriumstroms nach einem Spannungssprung wird mithilfe statistisch unabhängiger, dimensionsloser Hilfsvariablen $n, m, h \in [0, 1]$ angenähert

$$g^K = n^4 \cdot g_{\max}^K, \quad g^{\text{Na}} = m^3 \cdot h \cdot g_{\max}^{\text{Na}} \quad (2.7)$$

mit g_{\max}^k als der maximalen spezifischen Leitfähigkeit der jeweiligen Ionensorte. Die Variablen n, m beschreiben die Aktivierung und Deaktivierung der Ströme, die Variable h die Inaktivierung des Natriumstroms.

Jede Hilfsvariable gehorcht einer Differenzialgleichung der Form

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_\infty - p}{\tau_p}, \quad p \in \{n, m, h\} \quad (2.8)$$

mit dem stationären Wert $p_\infty(V)$, der durch eine exponentielle Relaxation mit der Zeitkonstante $\tau_p(V)$ erreicht wird. Beide Größen lassen sich aus einem einfachen Zweizustandsmodell herleiten, in dem p die Besetzungswahrscheinlichkeit des „offenen“ Zustands beschreibt und die Übergänge mit spannungsabhängigen Raten $\alpha_p(V), \beta_p(V)$ erfolgen. Die hier gewählte Darstellung bietet eine äquivalente Formulierung auf der Basis der beiden experimentell zugänglichen Größen.

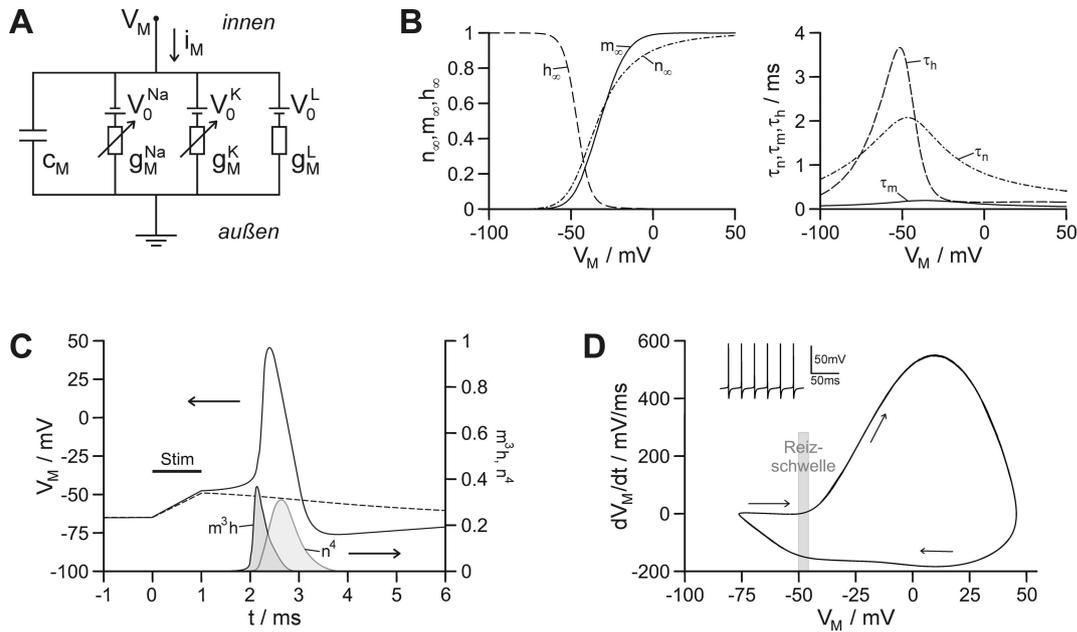


Abbildung 2.1: Das Hodgkin-Huxley-Modell. **A** Elektrisches Ersatzschaltbild der Membran. **B** Spannungsabhängige Parameter. **C** Simulierter Verlauf der Membranspannung (linke Achse) und Öffnungszustand der Natrium- und Kaliumkanäle (rechts) nach einem überschwelligen Stromstimulus von 1ms Dauer. Gestrichelt: unterschwellige Antwort. Modellparameter aus B. **D** Dynamik des Aktionspotenzials in der Phasenraumdarstellung $\partial_t V_M$ vs. V_M und stabiler Grenzzyklus bei kontinuierlicher Stimulation. Inset: zugehöriger Spike-Train. Simulationsparameter aus [Dest99].

Abbildung 2.1 B veranschaulicht die Spannungsabhängigkeit des stationären Wertes und der Zeitkonstanten der drei Hilfsvariablen n , m , h . Eine Depolarisation erhöht n_∞ und m_∞ und erniedrigt h_∞ ; der Übergang von Null auf Eins erfolgt innerhalb weniger 10mV. Die Zeitkonstanten der Relaxation sind im Bereich des Ruhepotenzials maximal und fallen zu beiden Seiten stark ab. Die Zeitkonstante der Natriumaktivierung τ_m ist um eine Größenordnung kleiner als die im Millisekundenbereich angesiedelten Zeitkonstanten für Kalium τ_n und für die Inaktivierung des Natriumstroms τ_h .

Aktionspotenzial

Führt ein externer Stimulus zu einer Anhebung der Membranspannung, so nimmt die Leitfähigkeit für Natrium mit ansteigendem m zu und der Einstrom der Natriumionen hebt die Membranspannung weiter an. Ist dieser positive Feedback stark genug, wird ein Aktionspotenzial ausgelöst.

Bei hoher Membranspannung versiegt die Natriumleitfähigkeit durch die Abnahme des Parameters h , der aufgrund der größeren Zeitkonstante (Abb. 2.1 B) langsamer reagiert als der Aktivierungsparameter m . Ebenfalls zeitversetzt erhöht sich die Leitfähigkeit des Kaliums durch Zunahme von n und der Kaliumausstrom führt zu einer Repolarisation der Membran. Insgesamt ergibt sich ein charakteristischer Verlauf bestehend aus einem schnellen Anstieg gefolgt von einem negativen Überschwinger unter die Ausgangsspannung (Abb. 2.1 C).

Das Aktionspotenzial ist ein Alles-oder-Nichts-Prozess: wird der Schwellwert der Membranspannung überschritten, treibt der selbstverstärkende Natriumeinstrom das Aktionspotenzial; erreicht die Spannung den notwendigen Schwellwert nicht, klingt die Störung wieder ab (gestrichelte Linie in Abb. 2.1 C).

Bei kontinuierlicher Stimulation wird eine ganze Reihe von Aktionspotenzialen ausgelöst, auch Burst oder Spike-Train genannt. Die Frequenz dieser Oszillation ist proportional zur Stärke des Stimulus aber nach oben durch die Zeit begrenzt, die der Parameter h zur Aufhebung der Inaktivierung benötigt (Refraktärzeit). Abbildung 2.1 D zeigt die Phasenraumdarstellung der Oszillation und ihren stabilen Grenzzyklus.

Erweiterungen

Das Gesamtkonzept des Hodgkin-Huxley-Modells hat durch die Entdeckung der Ionenkanäle als den molekularen Trägern des ionischen Stroms starke Bestätigung erfahren. In den vergangenen Jahren gab es Verbesserungen und Korrekturen in folgenden Punkten:

- Die Natriumkanaldynamik in Säugetierneuronen lässt sich nur schlecht durch drei unabhängige Aktivierungsparameter m^3 beschreiben; sie setzt in Wirklichkeit recht abrupt ein [Bara06], wodurch das Aktionspotenzial an der Reizschwelle sehr schnell ansteigt (siehe auch den irigen Artikel von Naundorf et.al. [Naun06]).
- Die Inaktivierung des Natriumstroms ist nicht unabhängig vom Öffnungszustand des Kanals [Arms77].
- Realistischere Ionenkanalmodelle wurden basierend auf strukturellen Erkenntnissen entwickelt, die eine Vielzahl an Zuständen und Übergängen berücksichtigen (siehe z.B. [Scho98]).
- Zur Beschreibung der Nichtlinearität der Ca^{2+} -Ströme sollte die Goldman-Hodgkin-Katz-Stromgleichung benutzt werden [Hill01].

Im folgenden Unterkapitel wird ausführlich auf die Ionenkanäle eingegangen, deren wesentliche Eigenschaften bereits in der Arbeit von Hodgkin und Huxley vorweggenommen wurden.

2.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die dem passiven Transport von Ionen von einer Membranseite auf die andere dienen. Sie sind meist hochselektiv für eine bestimmte Ionensorte und besitzen einen offenen (leitfähigen) und einen geschlossenen Zustand. Der Übergang zwischen den Zuständen erfolgt statistisch und die Wahrscheinlichkeit, dass sich der Kanal in einem bestimmten Zustand befindet, hängt von der Transmembranspannung und/oder der Konzentration eines Liganden ab. Für die Erzeugung und Weiterleitung von Nervensignalen sind vor allem die spannungsabhängigen Ionenkanäle entscheidend.

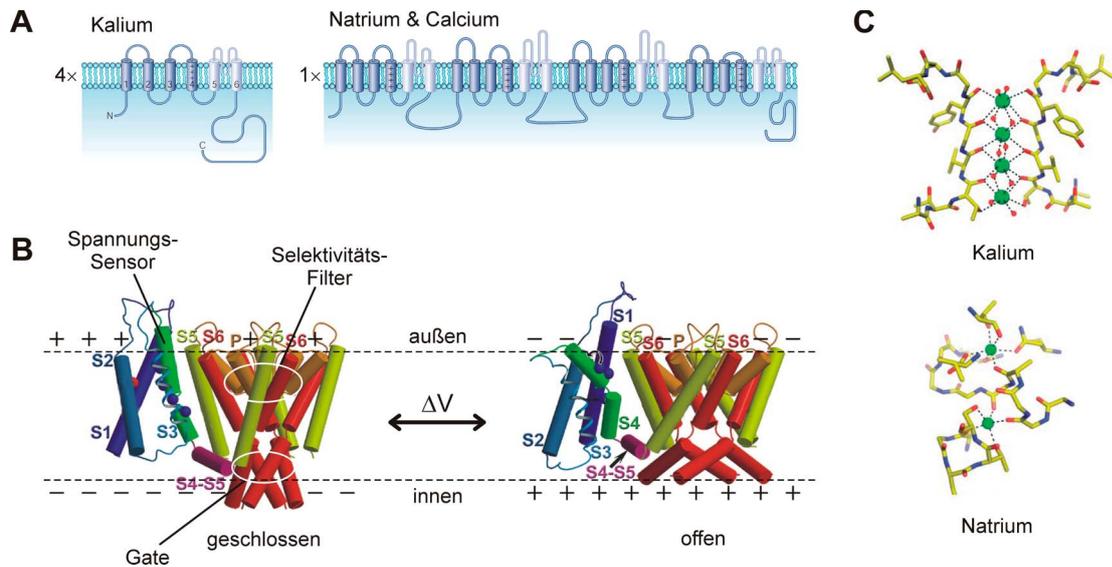


Abbildung 2.2: Aufbau und Funktion von Ionenkanälen.

A Sekundärstruktur. Kaliumkanäle setzen sich aus vier identischen α -UE mit je sechs Transmembransegmenten zusammen, bei Natrium- und Calciumkanälen sind die homologen Regionen zu einem Monomer verknüpft. Entnommen aus [Swar04].

B Transmembranstruktur in Abhängigkeit des äußeren elektrischen Feldes. Zylindermodell des $K_V1.2$ mit den porenbildenden S5/S6-Helizes; aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine der vier Spannungssensordomänen S1-S4 dargestellt. Modifiziert nach [Yaro06].

C Ionenbindungsstellen in Transmembrantransportern. oben: vier K^+ -Bindungsstellen im Selektivitätsfilter des KscA Kaliumkanals; unten: zwei Na^+ -Bindungsstellen im LeuT Transporter. Aus [Goua05].

2.2.1 Aufbau und Funktion

Ionenkanäle sind Komplexe aus mehreren Untereinheiten (UE). Man unterscheidet eine porenbildende α -UE und mehrere damit assoziierte, optionale Untereinheiten (α_2 , β , γ , δ). Die α -UE besitzt die wesentlichen Eigenschaften der Ionenselektivität, des Gatings (Öffnen und Schließen) und der Spannungssensitivität; ihre alleinige Expression führt bereits zu einem funktionstüchtigen Kanal. Die assoziierten Hilfsuntereinheiten modulieren u.a. die Öffnungskinetik, die Inaktivierungseigenschaften und sind für die Lokalisation („Sorting“) des Kanals von Bedeutung [Lai06]. Die drei für die Nervenleitung wichtigsten Familien der spannungsabhängigen Ionenkanäle werden gemäß ihrer Ionenselektivität mit Na_V , Ca_V und K_V bezeichnet [Yu05].

Die grundlegende α -UE besteht bei Natrium- und Calciumkanälen aus vier homologen Domänen, im Fall der Kaliumkanäle lagern sich vier identische α -UE entsprechend den vier Domänen zu einem Tetramer zusammen (siehe Abb. 2.2 A). Jede Domäne umfasst sechs mutmaßliche Transmembran- α -Helizes S1-S6 und eine ebenfalls membraninterne Schleife („Loop“) zwischen den Segmenten S5-S6. Das S4-Segment besitzt vier Aminosäuren mit positiv geladenen Seitengruppen.

Das zentrale Proteinrückgrat wird von den Segmenten S5 und S6 der vier Domänen gebildet (Abb. 2.2 B). Während die eigentliche Porenregion relativ starr ist, regulieren die sich kreuzenden S6-Elemente den intrazellulären Zugang („Gate“) zu einem internen, wasser-

gefüllten Käfig und der sich anschließenden Pore. Die genaue mechanische Grundlage für diesen Vorgang ist noch unklar.

Die für die Ionenselektivität verantwortliche Pore wird von den Seitengruppen des S5/S6-Loops ausgekleidet. Abbildung 2.2 C zeigt, dass die Koordination z.B. der K^+ -Ionen in der Pore den Wasserstoffbindungen der Hydrathülle entspricht, die das Ion beim Durchgang durch die Pore abstreifen muss. Diese Konfiguration entspricht einer energetisch flachen Barriere im Gegensatz zu einer energetisch kostspieligen Dehydratation und erlaubt eine hohe Durchflussrate. Gleichsam ermöglicht diese Anordnung die Unterscheidung zwischen Na^+ und K^+ Ionen, deren Durchmesser mit 0.95\AA bzw. 1.33\AA ähnlich sind, deren innere Hydrathülle jedoch unterschiedlich viele (6 vs. 8) Wassermoleküle umfasst [Kuyu94]. Die Ionenselektivität beruht also auf den lokalen chemischen Eigenschaften der Pore.

Die Segmente S1-S4 ragen seitlich in die Lipidmembran und sind für die spannungsabhängige Konformationsänderung verantwortlich (Abb. 2.2 B). Während dieser werden die Ladungen des S4-Segments in Richtung des äußeren elektrischen Feldes senkrecht zur Membran verschoben. Der genaue Mechanismus ist umstritten: entweder (i) vollführt das Segment eine relativ große ($\sim 15\text{\AA}$) Bewegung, oder (ii) nur eine kleine Bewegung ($\sim 4\text{\AA}$) in einem lokal fokussierten E-Feld [Tomb05].

Insbesondere Natriumkanäle weisen als weitere Eigenschaft eine Inaktivierung auf, wodurch die Öffnung der Kanäle nur transient ist. Es gibt mehrere unterschiedliche Mechanismen für die Inaktivierung, deren bekannteste das Binden einer intrazellulären Schleife in der Gate-Region („Ball and Chain“-Modell) sein dürfte. Durch eine anhaltende Hyperpolarisation wird die Inaktivierung in der Regel wieder aufgehoben. Zusätzlich zu dieser intrinsischen Modulation beeinflussen Toxine die Leitfähigkeit oder die kinetischen Eigenschaften der Kanäle durch Bindung an unterschiedliche Stellen der α -UE [Gutm05] [Catt05a][Catt05b].

2.2.2 Ionenkanäle in *Lymnaea stagnalis*

Nervenzellen aus dem A-Cluster der Pedal-Ganglien von *Lymnaea stagnalis* besitzen eine Vielzahl an Ionenkanälen. Anhand der Ionenströme unterscheidet man mindestens sechs verschiedene Kanalsorten:

- Bei niedrigen Membranspannungen ($< -50\text{mV}$) aktivieren die sog. Low Voltage Activated (LVA) Kanäle. Man unterscheidet transiente Kalium- und Calciumströme. Bei -60mV sind die Kaliumkanäle nahezu vollständig inaktiviert.
- Zwischen $-40 \dots -20\text{mV}$ setzt ein transienter Natriumstrom ein. Seine Dynamik liegt im ms-Bereich; er lässt sich erst bei extrem hohen Konzentrationen und nur unzureichend mit TTX blocken.
- Oberhalb von -20mV kommen verzögerte Kalium- und HVA-Calciumströme hinzu. Ihre Aktivierungszeitkonstante beträgt mehrere ms. Die Calciumströme sind für die charakteristische Schulter im Aktionspotenzial verantwortlich [Winl82]; sie lassen sich durch Cd^{2+} bei einer Konzentration von 0.1mM blocken. Die Kaliumströme können durch Tetraethylammonium⁺ (TEA) bei einer Konzentration von $\sim 20\text{mM}$ (extrazellulär) unterdrückt werden.

- Zusätzlich gibt es noch Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle und Protonenströme, über deren Spannungsabhängigkeit jedoch wenig bekannt ist.

Für die Untersuchung des Mechanismus bei der extrazellulären Stimulation ist ein möglichst einfaches Modellneuron erwünscht. Deshalb werden folgende Maßnahmen ergriffen: (i) ein Haltepotenzial von -60mV sorgt für eine stationäre Inaktivierung der transienten Kaliumkanäle; (ii) 0.2mM Cd^{2+} in der Messlösung blockt die HVA Ca^{2+} -Kanäle; (iii) eine Ca^{2+} -freie Messlösung unterdrückt die LVA Ca^{2+} -Ströme. Unter diesen Bedingungen wird das Zellverhalten nahezu allein von den transienten Natriumkanälen und den verzögerten Kaliumkanälen bestimmt.

2.2.3 Der Natriumkanal $\text{Na}_V1.4$

Die Bezeichnung $\text{Na}_V1.4$ steht für einen Natriumkanal, der sich im Skelettmuskel von Säugetieren findet. Frühere Bezeichnungen sind SkM1 oder $\mu1$ [Catt05a]. Er wurde 1989 erstmals von Jim Trimmer geklont und charakterisiert [Trim89] und liegt der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen im Skelettmuskel zugrunde.

Die kinetischen Eigenschaften des $\text{Na}_V1.4$ sind vom Expressionssystem abhängig, der Grund dafür ist unbekannt und nicht durch endogene β -UE zu erklären [Mora03]. In HEK-Zellen wurde der Kanal vielfach charakterisiert, z.B. durch [Ukom92][Shee99][ORei99][Zhan03]. Ein kinetisches Modell zur Beschreibung der Dynamik ist in der Literatur jedoch nicht dokumentiert.

α -Skorpion-Toxine beeinflussen die Inaktivierung des Kanals und haben einen EC_{50} -Wert im nM-Bereich. So verlangsamt das Gift Lqh α IT den Zeitverlauf der Inaktivierung um etwa eine Größenordnung, hebt etwa 20% der stationären Inaktivierung auf und verschiebt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung um -13mV [Chen00]. Einen vollständigen Block der Kanalströme erhält man mit dem Na^+ -spezifischen, aber Kanalisiform-unspezifischen Gift Tetrodotoxin (TTX) bei einer Konzentration von etwa 100nM [Ukom92].

Der Kanal $\text{rNa}_V1.4$ wurde für die vorliegende Arbeit ausgewählt, da seine Eigenschaften mit neuronalen Natriumkanälen vergleichbar sind. Seine Expression in HEK-Zellen ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

2.2.4 Ionenkanäle in *Rattus norvegicus*

Eine prototypische Nervenzelle des zentralen Nervensystems umfasst einen über mehrere hundert μm ausgedehnten und stark verzweigten Dendritenbaum, einen Zellkörper (Soma) von etwa $30\mu\text{m}$ Durchmesser und ein langgestrecktes Axon mit sich anschließenden präsynaptischen Nervenenden. Die unterschiedlichen Kompartimente besitzen hoch spezialisierte Eigenschaften, denen eine stark inhomogene und wohl-lokalisierte Verteilung verschiedenster Ionenkanäle zugrunde liegt. Beispielhaft wird im Folgenden die Verteilung bei Pyramidalzellen der CA1-Region des Hippocampus beschrieben; eine ausführliche und allgemeine Übersicht findet sich in [Lai06].

Verteilung

Natriumkanäle treiben das Aktionspotenzial. Das AP entsteht im sogenannten Axon Initial Segment (AIS), etwa $50 - 100\mu\text{m}$ vom Zellkörper entfernt, und wird entlang des myelinisierten Axons und der Ranvierschen Schnürringe saltatorisch weitergeleitet. Entsprechend ist der Natriumkanal $\text{Nav}1.6$ hauptsächlich im AIS, den Ranvierschen Schnürringen und den präsynaptischen Nervenenden anzufinden, teilweise unterstützt von $\text{Nav}1.2$ im AIS und im unmyelinisierten Axon, während $\text{Nav}1.1$ im somatodendritischen Bereich für die aktive, rückwärtsgewandte Ausbreitung („Backpropagation“) von Aktionspotenzialen verantwortlich ist [Nova01].

Kaliumkanäle erfüllen zweierlei Aufgaben: (i) sie stellen das Ruhepotenzial nach einem AP wieder her und (ii) beeinflussen die Erregbarkeit der Zelle. In den ersten Bereich fallen sowohl $\text{Kv}1.1$, $\text{Kv}1.2$ und $\text{Kv}1.4$, die häufigsten Kaliumkanäle in Neuronen, die am Rand der Ranvierschen Schnürringe („juxtaparanodal“) und in präsynaptischen Nervenenden lokalisiert sind, als auch KCNQ2/3 und $\text{Kv}3.1b$, die im AIS und (letzterer ausschließlich) in den Ranvierschen Schnürringen anzufinden sind. Dem zweiten Bereich gehören $\text{Kv}2$, $\text{Kv}3$ und $\text{Kv}4.3$ im somatodendritischen Bereich, $\text{Kv}4.2$ in Synapsen und vor allem HCN (hyperpolarized activated, cyclic nucleotide gated) Kaliumkanäle im distalen Dendritenbereich an.

Calciumkanäle modulieren die elektrische Erregbarkeit der Zelle und sind Ausgangspunkt biochemischer Signalkaskaden. Dementsprechend finden sich $\text{Cav}2.1$, $\text{Cav}2.2$ und $\text{Cav}2.3$ vor allem in proximalen Dendriten und präsynaptischen Nervenenden.

Ströme

Bei Messungen der Membranströme in der whole-cell Konfiguration (siehe Kapitel 3.5.1) ist eine präzise Kontrolle der Membranspannung in den peripheren Neuriten aufgrund des intrazellulären Zugangswiderstandes nicht möglich. Aus diesem Grund tragen bevorzugt die Ionenkanäle des Zellkörpers und der proximalen Neuriten zum gemessenen Strom bei, die auch bei der Stimulation eine bevorzugte Rolle spielen.

Natriumkanäle [Mart97] öffnen ab ca. -50mV , aktivieren in Bruchteilen einer Millisekunde (0.15ms Anstiegszeit bei 20mV) und inaktivieren auf einer ähnlichen Zeitskala. Bei -70mV befinden sich etwa 35% der Kanäle in der stationären Inaktivierung. Eine Unterscheidung zwischen der Kinetik verschiedener Kanalisotope ist anhand der Ströme allein nicht möglich. Der Strom wird vollständig durch 100nM TTX geblockt.

Der Kaliumstrom [Mart98] setzt ebenfalls ab ca. -50mV ein, jedoch mit einer langsameren Kinetik (1ms Anstiegszeit). Er setzt sich aus drei Strömen unterschiedlicher Charakteristik und Pharmakologie zusammen, von denen ein transienter, TEA-insensitiver Strom mit etwa 60% dominiert (Ausgangsspannung -70mV).

Bei Calciumströmen [Taka91][Faas96] lassen sich drei ungefähr gleich starke Anteile unterscheiden: ein transienter LVA-Strom, der bei -80mV einsetzt, sowie ein transienter und ein anhaltender HVA-Strom, die beide bei -40mV aktivieren. Die stationäre Inaktivierung des transienten HVA-Stroms beträgt bei -70mV etwa 40%, die des LVA-Stroms 90%. Die Aktivierungskinetik aller Kanäle liegt im Bereich von typischerweise 2ms , die Inaktivierung ist mehr als zehnmal langsamer. Aufgrund ihrer im Vergleich zu Na^+/K^+ -Kanälen langsamen Kinetik und ihrer geringen Expression (ca. 1nA Gesamtzellstrom) nehmen die Calciumkanäle bei der Stimulation eine untergeordnete Rolle ein.

2.3 Kopplung Zelle-Chip

Biokompatible Oberflächen zeichnen sich dadurch aus, dass Zellen auf ihnen adhären (Abbildung 2.3). Die Adhäsion wird durch spezifische (Rezeptor-Ligand) oder unspezifische (z.B. elektrostatische) Wechselwirkungen vermittelt und ist auf einen Teil der Plasmamembran der Zelle beschränkt. Zwischen Adhäsionsmembran und Oberfläche befindet sich ein dünner, im Wesentlichen mit Elektrolyt gefüllter Spalt.

2.3.1 Flächenkontaktmodell

Die Kopplung zwischen Zelle und Kondensator wird durch die elektrischen Eigenschaften des Oxids, des Spalts und der Zellmembran bestimmt, die sich aus der Geometrie der Adhäsion und flächenspezifischen Parametern ableiten lassen.

Geometrie

Die Zellmembran mit der Gesamtfläche A_M wird unterteilt in die freie Membran (Index „FM“) und die adhären Membran (Index „JM“). Die Adhäsionsfläche A_J bestimmt die laterale Ausdehnung des Spaltes. Ihre Grenzen seien dadurch festgelegt, dass die Werte der Spannung und der Ionenkonzentrationen am Rand des Spaltes mit denen des Badelektrolyten übereinstimmen. Der dimensionslose Faktor $\alpha_{JM} = A_J/A_M$ bezeichnet den Anteil der Adhäsions- an der Gesamtmembranfläche. Der mittlere Abstand zwischen Adhäsionsmembran und Chipoberfläche sei d_J .

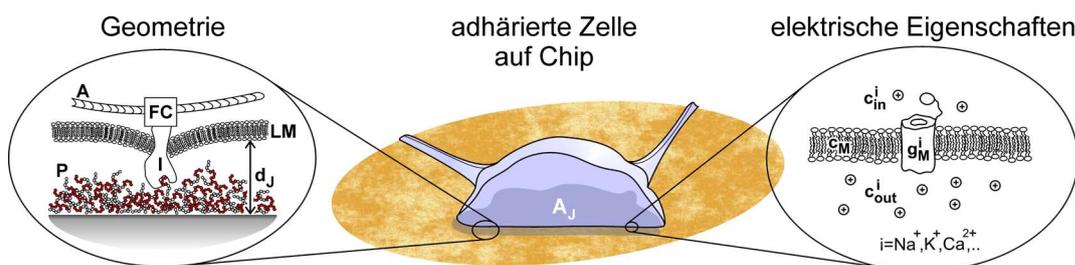


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einer adhären Zelle auf der Chipoberfläche.

links: vergrößerter Querschnitt durch den Spalt. Integrine (I) und weitere Komponenten des Fokalen Komplexes (FC) vermitteln die Bindung zwischen dem Beschichtungspeptid (P) und Aktinfilamenten (A) des Cytoskeletts der Zelle. Der mittlere Abstand zwischen Lipidmembran (LM) und Chipoberfläche beträgt d_J , die Ausdehnung der Adhäsionsfläche A_J .

rechts: vergrößerter Querschnitt durch die Zellmembran. Die elektrischen Eigenschaften der Membran sind gekennzeichnet durch die isolierende Lipidmembran mit der Kapazität c_M und von Ionenkanälen mit den Leitfähigkeiten g_M^i für Ionensorten i mit den Konzentrationen c_{in}^i, c_{out}^i zu beiden Seiten der Membran.

Parameter

Die elektrischen Eigenschaften der Komponenten werden in flächenspezifischen Größen angegeben. So bezeichnen c_S, c_M die spezifische Kapazität des Oxids bzw. der Zellmembran und g_M^i die Membranleitfähigkeit für die Ionensorte i . Deren Konzentration beträgt c_{in}^i, c_0^i, c_J^i im Zellinneren, im Bad bzw. im Spalt. Der Konzentrationsunterschied zwischen Zellinnerem und Bad konstituiert eine chemische Triebkraft äquivalent dem Nernstpotenzial gemäß Gleichung 2.4.

Der spezifische Widerstand ρ_E, ρ_J des Badelektrolyten bzw. des Spaltes berechnet sich gemäß

$$\rho_E^{-1} = \sum_i \frac{(z^i e_0)^2}{k_B T} D_0^i c_0^i \quad \text{bzw.} \quad \rho_J^{-1} = \sum_i \frac{(z^i e_0)^2}{k_B T} D_J^i c_J^i \quad (2.9)$$

mit D^i dem jeweiligen Diffusionskoeffizient und c^i der zugehörigen Konzentration. Mit dem spezifischen Widerstand des Spaltes ρ_J und dessen Dicke d_J ergibt sich sein Schichtwiderstand zu $r_J = \rho_J/d_J$.

Differenzialgleichungen

Die Spannungen V_M in der Zelle, V_J im Spalt, V_E im Elektrolyten nahe der Zelle und V_S an der Rückseite des Oxids werden auf das Potenzial der Badelektrode (\equiv Masse) bezogen. Ihre Dynamik wird durch die Strombilanz in der Zelle, im Spalt und im Bad bestimmt. Die Spannung im Spalt ist ortsabhängig und wird an jedem Punkt beschrieben durch Gleichung 2.10.

$$\nabla \left(\frac{1}{r_J} \nabla (V_J - V_E) \right) + c_M \cdot \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + c_S \cdot \frac{d(V_S - V_J)}{dt} + \sum_i g_{JM}^i \cdot (V_M - V_0^i - V_J) = 0 \quad (2.10)$$

Im Allgemeinen sind die Membraneigenschaften räumlich inhomogen, ihre Leitfähigkeiten sind sowohl spannungs- als auch zeitabhängig. Auch die Konzentration der Ionen im Spalt ist veränderlich und unterliegt Diffusion und Drift. Die Lösung der vielfach orts- und zeitabhängigen Differenzialgleichungen erfordert den Einsatz numerischer Methoden, wodurch sie viel von ihrer Anschaulichkeit und Übertragbarkeit auf andere Probleme verliert. Eine vereinfachte Beschreibung des Systems zum Treffen qualitativer Aussagen ist deshalb äußerst wünschenswert.

2.3.2 Zwei-Domänen-Modell

Das Zellverhalten ergibt sich aus der Summe aller Ein- und Auswärtsströme. Strom ist immer eine Funktion aus Membraneigenschaft (Kapazität, Leitfähigkeit) mal Transmembranspannung (zeitl. Änderung, Amplitude). Den Strom über einen Bereich erhält man durch Integration bzw. Mittelung. Sie vereinfacht sich, wenn einer der beiden Multiplikatoren räumlich konstant ist, denn dann gilt $\langle g \cdot V \rangle = \langle g \rangle \cdot \langle V \rangle$. Dies macht man sich zunutze, um den Übergang $V_J(x, y, t) \rightarrow V_J(t)$ zu vollziehen.

$$c_S \frac{d(V_E - V_S)}{dt} + g_E V_E = 0, \quad a_J \ll a_S. \quad (2.13)$$

Sofern die Kinetik der Ionenkanäle $g(V, t)$ bekannt ist, bilden die zugehörigen Ratengleichungen und Gleichungen 2.11 bis 2.13 ein vollständiges Differenzialgleichungssystem zur Beschreibung der Dynamik aller Systemvariablen.

2.3.3 Gültigkeits- und Anwendungsbereiche

Sowohl das Zwei-Domänen-Modell (oder „Punktkontaktmodell“) als auch das Flächenkontaktmodell haben Stärken und Schwächen:

- Sind die Membraneigenschaften rein passiv und die Zellgeometrie sehr einfach, so lässt sich ein *analytischer* Zusammenhang zwischen den beiden Modellen herstellen. Die im Zwei-Domänen-Modell resultierenden Werte für stationäre Parameter sind exakt und die für dynamische Parameter in guter Näherung gültig; eine geschlossene Beschreibung der gesamten Dynamik ist jedoch nicht möglich. Der Übergang wird für den Fall der Stimulation in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.
- Der aus den passiven Eigenschaften abgeleitete Bezug zum Flächenkontaktmodell bleibt in erster Näherung auch bei Einführung der bezüglich der Spannung nicht-linearen ionischen Leitfähigkeiten gültig, wobei die Zellantwort als die Summe aus dem passiven Verhalten und einer Störung aufgrund der veränderlichen Leitfähigkeiten aufgefasst werden kann. Das Modell versagt jedoch quantitativ, wenn es um schwellenwertartige Prozesse der adhären Membran geht (siehe Kapitel A.2.1).
- Das Gesamtverhalten der Zelle ist selbst bei stark inhomogenen Membraneigenschaften und komplizierter Adhäsionsgeometrie immer *integrativ*. Lokale Details gehen durch diese intrinsische Mittelung meist verloren.
- Echt zweidimensionale Vorhersagen im Adhäsionsbereich erlaubt natürlich nur das Flächenkontaktmodell. Zur Interpretation lokaler Signalformen aus zweidimensionalen Messungen ist jedoch oft bereits das einfache Modell geeignet [Scha98].
- Beide Modelle vernachlässigen intrazelluläre Zugangswiderstände. Für eine angemessene Beschreibung des Neuritenverhaltens müssten die Modelle um weitere Kompartimente ergänzt werden. In grober Näherung vernachlässigt man die peripheren Bereiche, indem man die Neuriten gedanklich etwa $400\mu\text{m}$ entfernt vom Soma abschneidet und versiegelt.

Das Zwei-Domänen-Modell ist aufgrund der überschaubaren Anzahl an Parametern und seines intuitiv verständlichen Ersatzschaltbildes ein wertvolles Instrument zur Interpretation des Verhaltens einer adhären Zelle. Kapitel 4 bedient sich seiner Argumentationsweise, um die wesentlichen Eigenschaften der Stimulation klar und einfach verständlich herauszuarbeiten.

Das Flächenkontaktmodell gibt Details des Adhäsionsbereichs korrekt wider und findet in diesem Bereich seine Anwendung. Auf seiner Basis wird im Anhang A.2 ein Modell zur periodischen Stimulation von Säugetierzellen vor- und dieses den Messungen aus Kapitel 5 zur Seite gestellt.

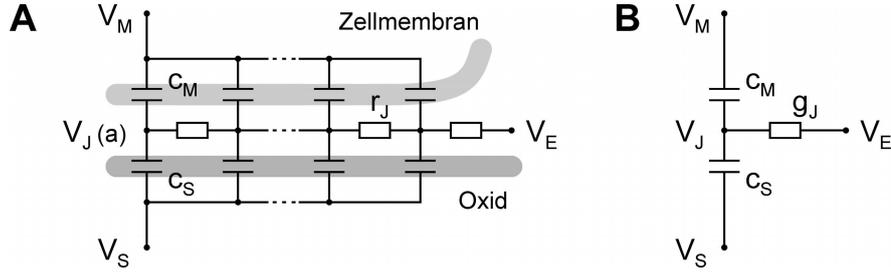


Abbildung 2.5: Ersatzschaltbild des Spaltes **A** im Flächenkontakt- und **B** im Zwei-Domänen-Modell für den Fall ohne Membranleitfähigkeiten.

2.3.4 Zusammenhang der Modelle

In diesem letzten Abschnitt soll die Verbindung zwischen dem Zwei-Domänen-Modell und dem zugrundeliegenden Flächenkontaktmodell für den Fall der kapazitiven Stimulation hergestellt werden. Es wird gezeigt, dass für rein passive Membranparameter beide Modelle vergleichbare Vorhersagen liefern.

Allgemeine Beziehung

Ausgehend vom allgemeinen Flächenkontaktmodell (Gl. 2.10) ist es in vielen Fällen möglich, vereinfachende Annahmen über das System zu machen. So werden die Membraneigenschaften meist als räumlich homogen betrachtet und die Konzentrationsänderungen der Ionen im Spalt sowie der Spannungsabfall im Elektrolyt vernachlässigt. Die einzig verbleibende ortsabhängige Variable ist die Spaltspannung $V_J \equiv V_J(x, y)$. Es ist naheliegend, auch diese durch eine räumlich konstante Größe zu ersetzen.

Betrachtet werde exemplarisch der einfache Fall verschwindender Membranleitfähigkeiten $g_M^i = 0$ und konstanter intrazellulärer Spannung ($dV_M/dt = 0$). Abbildung 2.5 zeigt das Ersatzschaltbild des Kernmantelleiters (Teil A) und sein nulldimensionales Pendant (Teil B). Unter Vernachlässigung der Elektrolytspannung $V_E \equiv 0$ lauten die entsprechenden Differenzialgleichungen für die Spaltspannung:

$$(c_M + c_S) \frac{\partial V_J}{\partial t} - \frac{1}{r_J} \nabla^2 V_J = c_S \frac{dV_S}{dt} \quad (2.14)$$

$$(c_M + c_S) \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J = c_S \frac{dV_S}{dt} \quad (2.15)$$

Der Übergang zwischen den beiden Modellen wird durch die Substitution $-r_J^{-1} \nabla^2 V_J \Rightarrow g_J V_J$ bewerkstelligt. Dementsprechend gilt es, einen Zusammenhang der Form

$$g_J A_J = \eta_J r_J^{-1} \quad (2.16)$$

zu finden. Für den einfachen Fall einer kreisförmigen Adhäsionsfläche A_J kann der dimensionslose Geometriefaktor η_J analytisch berechnet werden. Er nimmt je nach Fragestellung Werte zwischen 4π und 8π an [Brau04][Schm06][Scho03], unter manchen (extremen) Bedingungen jedoch auch größere Werte [Scho03].

Im Fall der Stimulation wird für den Vergleich der Modelle der Strom über die adhärierte Membran herangezogen; da die Membraneigenschaften unter obiger Annahme homogen sind, ergibt die Integration unmittelbar die Identifikation der repräsentativen Spaltspannung V_J des Zwei-Domänen-Modells mit ihrem Mittelwert $\langle V_J \rangle$ im Flächenkontaktmodell.

Stationärer Fall

Wir betrachten eine stationäre Spannungsrampe $dV_S/dt = \Delta V_S/\Delta t_S$ am Kondensator. Im Voltage-Clamp ist das Profil der extrazellulären Spannung entlang der radialen Koordinate a durch Gleichung 2.17 gegeben, sein Mittelwert durch Gleichung 2.18.

$$V_J(a) = \left(1 - \frac{a^2}{a_J^2}\right) \frac{A_J r_J c_S}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \quad (2.17)$$

$$\langle V_J \rangle = \frac{A_J r_J c_S}{8\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \quad (2.18)$$

Im Zwei-Domänen-Modell erhält man für dieselbe Spannungsrampe eine extrazelluläre Spannung V_J^∞ gemäß Gleichung 2.19.

$$V_J^\infty = \frac{c_S}{g_J} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \quad (2.19)$$

Ein Vergleich führt zu $g_J = 8\pi/A_J r_J$ und einem Geometriefaktor

$$\eta_J = 8\pi. \quad (2.20)$$

Relaxation

Appliziert man eine Spannungsstufe ΔV_S^0 zum Zeitpunkt $t = 0$, so entspricht dies einem instantanen Verschiebungsstrom $c_S \Delta V_S^0 \delta(t)$. Die zeitliche Entwicklung der Spaltspannung im Flächenkontaktmodell wird in diesem Fall durch eine unendliche Reihe von Besselfunktionen widergegeben [Cars59], siehe Gleichung 2.21. Die dabei auftretenden Exponentialfunktionen haben Zeitkonstanten τ_n , wobei x_n die n -te Nullstelle der Besselfunktion J_0 bezeichnet.

$$V_J(a, t) = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_M + c_S} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2J_0(x_n a/a_J)}{x_n J_1(x_n)} \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right), \quad \tau_n = \frac{(c_M + c_S) r_J a_J^2}{x_n^2} \quad (2.21)$$

Die langsamste Zeitkonstante τ_1 bestimmt die Form des Profils nach der Anfangsphase des Zerfalls, das demnach proportional zu J_0 ist und seine Form nicht mehr ändert. Aus mathematischer Sicht muss die Spaltspannung V_J dafür eine Funktionalgleichung der Form $dV_J/dt = -V_J$ erfüllen. Tatsächlich gilt $\nabla^2 J_0(a) = -J_0(a)$, wie sich mit Hilfe der Rekursionformeln für Besselfunktionen¹ leicht zeigen lässt, und zusammen mit Gleichung 2.14 ergibt sich die geforderte Äquivalenz.

¹siehe [Wats44], Abschnitt 3.2

Der Mittelwert der extrazellulären Spannung ist durch Gleichung 2.22 gegeben.

$$\langle V_J \rangle (t) = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_M + c_S} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{x_n^2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (2.22)$$

Im Zwei-Domänen-Modell erhält man den Verlauf

$$V_J(t) = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_M + c_S} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right), \quad \tau_J = \frac{c_M + c_S}{g_J}. \quad (2.23)$$

Wir identifizieren die Zeitkonstante τ_J aus dem Zwei-Domänen-Modell (Gl. 2.23) mit der langsamsten Zeitkonstante τ_1 des Zerfalls im Kernmantelleiter und erhalten die Bedingung $g_J = 5.78\pi/A_J r_J$. Der Geometriefaktor beträgt in diesem Fall

$$\eta_J = 5.78\pi. \quad (2.24)$$

Diskussion

Für stationäre Störungen ergibt sich der Wert $\eta_J = 8\pi$, für die Relaxation einer Störung der Wert $\eta_J = 5.78\pi$. Demnach wird die *Amplitude* der Spaltspannung im Gleichgewicht durch den ersten, ihr *Zeitverlauf* hingegen durch den zweiten Wert bestimmt. Eine konsistente Beschreibung des *gesamten* Systemverhaltens ist im Zwei-Domänen-Modell also nicht möglich. Eine weitergehende Diskussion und die vollständige analytische Lösung des Flächenkontaktmodells findet sich in Anhang A.1.

Die gemachte Herleitung ist nicht auf den rein kapazitiven Kernmantelleiter beschränkt, auch für endliche, homogene Membranleitfähigkeiten g_M^i kann problemlos ein Ausdruck für das Spannungsprofil hergeleitet und die Identifikation durchgeführt werden (siehe Anhang A.1.2 und [Scho03]). Eine analoge Herleitung für den Fall des Current-Clamp ist hingegen nur möglich, wenn die lokale Näherung $c_M \rightarrow \tilde{c}_M$, $g_M^i \rightarrow \tilde{g}_M^i$ gemacht wird, d.h. die obere Membran auf die untere projiziert wird.

Kapitel 3

Charakterisierung der Komponenten

In diesem Kapitel werden die einzelnen Bestandteile des Versuchsaufbaus beschrieben, Messungen zu ihrer Charakterisierung durchgeführt und ergänzende theoretische Erklärungen gegeben.

3.1 Stimulationschip

Für die Stimulation wird eine Elektrode benötigt, die zweierlei Anforderungen erfüllen soll: (i) keine Faraday'schen Ströme im Kontakt mit einem Elektrolyt zur Vermeidung der Elektrochemie und (ii) eine hohe Polarisierbarkeit für eine effektive Strominjektion. Metallelektroden bieten diese hohe Polarisierbarkeit bei gleichzeitig unvermeidbaren dc-Strömen; Oxidschichten auf Halbleitern sind gute Isolatoren, jedoch auf Kosten einer erheblich geringeren Kapazität. Um den Stimulationsmechanismus von Nervenzellen unter Ausschluss der Elektrochemie studieren zu können, wurde letztere Herangehensweise gewählt.

3.1.1 EOS Konfiguration

Das Elektrolyt/Oxid/Silizium (EOS)-Schichtsystem ist in Abbildung 3.1 A dargestellt. Das leitende Substrat aus hoch p^+ -dotiertem Silizium dient als elektrischer Zugang zu einer

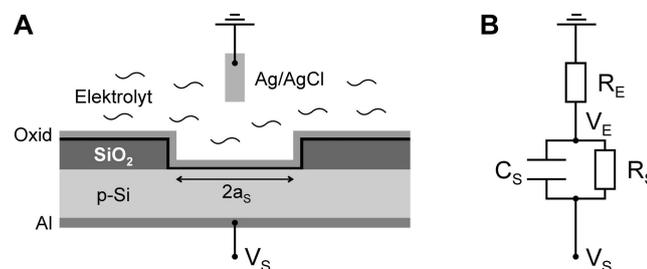


Abbildung 3.1: Elektrolyt/Oxid/Silizium (EOS)-Konfiguration. **A** Schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu. **B** Elektrisches Ersatzschaltbild. Die Größen C_S , R_S , R_E werden im Text erläutert.

dünnen Oxidschicht im Bereich der Elektrodenfläche (Radius a_S), die übrige Oberfläche des Chips ist durch ein Feldoxid passiviert. Der Elektrolyt wird durch eine Ag/AgCl-Elektrode kontaktiert, auf die entsprechend der Tradition in der Elektrophysiologie alle Spannungen referenziert werden.

Legt man ein Spannungssignal V_S an die Rückseite des Kondensators an, so wird der Stromfluss bestimmt durch die Kapazität C_S und den Widerstand R_S der Elektrode und den Zugangswiderstand des Elektrolyten R_E . Umgekehrt können Phase und Amplitude des gemessenen Stroms anhand des Ersatzschaltbildes (Abb. 3.1 B) ausgewertet und die Größen bestimmt werden.

In dieser Arbeit kommen dünne Schichten von TiO_2 und HfO_2 zum Einsatz, die sich durch eine hohe Dielektrische Konstante (DK) auszeichnen. Die Schichten wurden von Frank Wallrapp in unserer Abteilung hergestellt und charakterisiert [Wall06b], wie im Folgenden beschrieben wird.

3.1.2 Chipherstellung

Die Herstellung der Materialien wird an anderer Stelle [Wall06b] beschrieben und hier nur kurz rekapituliert.

Als Substrat dienen Wafer aus hoch p^+ -dotiertem Silizium mit einem spezifischen Widerstand von $0.006\text{--}0.01\Omega\text{cm}$. Ein $1\mu\text{m}$ dickes SiO_2 Feldoxid wird durch nasse Oxidation aufgebracht und in einem kreisförmigen Bereich mit Durchmesser $2a_S$ durch einen Ätzschritt vollständig entfernt. Eine dünne Pufferschicht Si_3Ni_4 wird durch rasche thermische Prozessierung bei 700°C in NH_3 aufgewachsen. Sie soll die Bildung einer SiO_2 Zwischenschicht verhindern und den Gitterübergang zwischen Substrat und Oxid verbessern. Das Oxid wird mit einer Variante des Atomic Layer Deposition (ALD)-Verfahrens aufgebracht. Abwechselnde Applikation von HfCl_4 oder TiCl_4 als Kationen-Precursor und H_2O als Sauerstoff-Precursor ergibt wohldefinierte, atomare Schichten. Zur Kontaktierung des Siliziums wird eine Aluminiumschicht auf der Rückseite des Wafers aufgedampft und dieser in quadratische ($4\times 4\text{mm}$) oder achteckige Chips mit jeweils einem Kondensator zersägt.

Abb. 3.2 A zeigt Querschnitte der Chips aufgenommen mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM). Die Dicke der TiO_2 und HfO_2 Schicht ist in diesem Fall 10.5nm bzw. 9.5nm , die der Zwischenschicht aus Si_3N_4 beträgt etwa 1.5nm . Die Messung der Oxidschichtdicke erfolgt normalerweise mit einem Ellipsometer, wobei in der Regel leicht abweichende Werte gefunden werden. Dennoch werden diese Werte der Berechnung der DK zugrunde gelegt, der dadurch entstehende Fehler wird in Kauf genommen.

Für die weitere Verwendung werden die Chips zunächst für 7min in ein Ultraschallbad mit Aceton gegeben, anschließend in Isopropanol und Millipore geschwenkt und mit Stickstoff trockengeblasen. Für die Zellkultur wird jeder Chip in ein Falcon-Schälchen mit einer zentralen Aussparung, die die rückseitige Kontaktierung mit einer Goldfeder ermöglicht, eingeklebt.

3.1.3 Oxidkapazität

Die Messung der Oxidkapazität in EOS-Konfiguration wird in einem 3-Elektroden-Aufbau mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und einer Pt-Arbeitslektrode mittels eines Potentiostat durchgeführt. Die Auswertung erfolgt gemäß dem Schaltbild in Abb. 3.1 B.

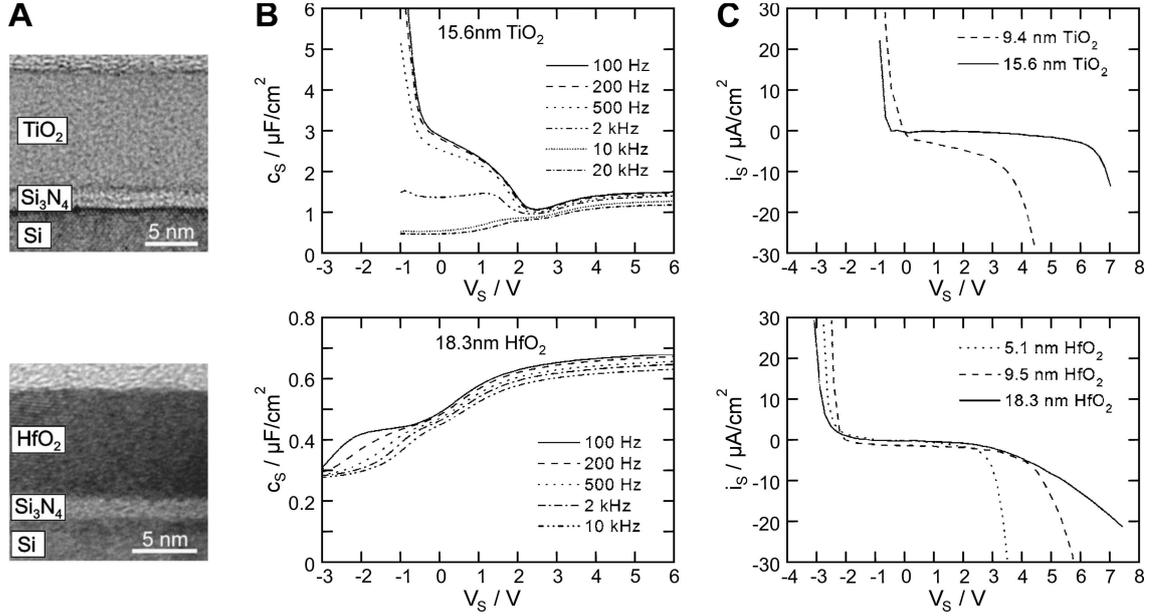


Abbildung 3.2: Charakterisierung der Schichten aus TiO_2 (oben) und HfO_2 (unten). **A** Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme, **B** spezifische Kapazität der EOS-Konfiguration in Abhängigkeit von Spannung und Frequenz, **C** dc-Leckströme. Modifizierte Darstellung nach [Wall06b].

Sättigungswert

Die Sättigungskapazität c_{sat} des EOS-Kondensators im Akkumulationsbereich des p -Siliziums bei positiven Spannungen setzt sich aus den in Serie geschalteten Kapazitäten (i) der elektrischen Doppelschicht im Elektrolyten c_{dl} , (ii) der Si_3N_4 -Zwischenschicht c_{il} , (iii) der Anreicherungszone im Silizium c_{acc} und (iv) des Oxids $\epsilon_0\epsilon_S/d_S$ mit der relativen DK ϵ_S , der elektrischen Feldkonstanten ϵ_0 und der Schichtdicke d_S zusammen.

$$\frac{1}{c_{sat}} = \left(\frac{1}{c_{dl}} + \frac{1}{c_{il}} + \frac{1}{c_{acc}} \right) + \frac{d_S}{\epsilon_0\epsilon_S} \quad (3.1)$$

Die Kapazität der elektrischen Doppelschicht ist mit etwa $10\text{--}100\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Butt06] erheblich größer als die übrigen Kapazitäten und trägt kaum zur Gesamtkapazität bei. Die Kapazität der Zwischenschicht aus Si_3N_4 kann aus ihrer Dicke aus dem TEM Bild und der DK $\epsilon = 7.5$ [Sze81] abgeschätzt werden, man erhält $c_{il} = 4.4\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dieser Wert stimmt recht gut mit dem Achsenabschnitt der Äquivalenzoxiddicke (Fig. 6 in [Wall06b]) von 0.5nm überein, der einer Kapazität von ca. $6.9\mu\text{F}/\text{cm}^2$ entspricht und die Restkapazität für verschwindende Oxiddicke $d_S = 0$ darstellt.

Aus den Messungen mit unterschiedlichen Oxiddicken erhält man die Dielektrische Konstante $\epsilon_S = 33.9 \pm 1.6$ (TiO_2) bzw. $\epsilon_S = 15.4 \pm 0.4$ (HfO_2). Dies entspricht einer um den Faktor 9 bzw. 4 größeren Kapazität bei gleicher Schichtdicke im Vergleich zu herkömmlichem Siliziumdioxid ($\epsilon_S = 3.9$ [Sze81]).

Spannungs- und Frequenzabhängigkeit

Die spezifische Kapazität für die beiden Oxide ist in Abb. 3.2 B in Abhängigkeit der angelegten Spannung für verschiedene Frequenzen dargestellt. Ausgehend von der Sättigungs-

kapazität bei positiven Spannungen nimmt die Kapazität in Richtung negativer Spannungen gemäß der klassischen Schottky-Mott-Beziehung ab. Die Akkumulation von Löchern an der Si/Oxid-Grenzfläche wird abgebaut und es bildet sich eine Verarmungszone im *p*-Silizium aus, die die Gesamtkapazität reduziert.

Für TiO₂ steigt die Kapazität jedoch nach kurzem Abfall in zwei Schritten stark an, sogar weit über den Wert der Sättigungskapazität hinaus. Der Anstieg wird mit der Anwesenheit von Elektronen im Oxid erklärt, die je nach angelegter Spannung eine leitende Schicht an der Si/Oxid- oder der Oxid/Elektrolyt-Grenzfläche ausbilden [Wall06b]. Diese Schicht reduziert die effektive Dicke des Oxids und erhöht damit seine Kapazität. Für hohe Frequenzen ab ca. 10kHz können die Elektronen dem Wechselfeld nicht mehr folgen und ihr Einfluss auf die Kapazität verschwindet, so dass sich der klassische Schottky-Mott-Verlauf einstellt.

Aus einem Fit mit der Schottky-Mott-Relation erhält man die Flachbandspannung der EOS-Konfiguration, die Aufschluss gibt über die festen Ladungen an der Oberfläche. Oxidoberflächen in Wasser sind geladen aufgrund dissoziativer Gruppen, die in Abhängigkeit des pH der Lösung ein Proton aufnehmen oder abgeben. Bei niedrigem pH sind Oxide deshalb meistens positiv geladen. Die Literaturwerte für den sog. Point of Zero Charge (PZC), an dem die Oberfläche ungeladen ist, bewegen sich für TiO₂ im Bereich pH=4–5.5 [Kosm02] und für HfO₂ um pH=7.4 [Kosm97]. Der aus den Messungen bei pH=5.9 ermittelte Offset des Vakuumniveaus zwischen Silizium und Ag/AgCl-Elektrode von –0.44V (0.19V) für TiO₂ (HfO₂) entspricht einer negativen (positiven) Oberflächenladung, in guter Übereinstimmung mit den Erwartungen.

3.1.4 Leckströme durch das Oxid

Die Abwesenheit von dc-Strömen ist essenziell für die Vermeidung von elektrochemischen Reaktionen an der Elektrolyt/Oxid-Grenzfläche. Abbildung 3.2 C zeigt dc-Ströme durch TiO₂ für Schichtdicken von 9.4 und 15.6nm und Ströme durch HfO₂ der Dicke 5.1, 9.5 und 18.3nm.

Beiden Materialien gemeinsam ist ein intermediärer Bereich, in dem der Leckstrom klein ist und die Schichten sich wie gute Isolatoren verhalten. Bei negativen Spannungen um die –1V (TiO₂) bzw. –3V (HfO₂) setzt ein Leckstrom ein, der weitestgehend unabhängig von der Oxiddicke zu sein scheint. Der Mechanismus hierfür ist unklar. Bei positiven Spannungen ist das Einsetzen des dc-Stroms abhängig von der Oxiddicke und vom Material. Der Strom ließe sich durch das Tunneln von Elektronen durch das Oxid erklären.

Die Leckströme begrenzen den Arbeitsbereich des EOS-Kondensators. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips und ihre jeweiligen Arbeitsbereiche sind (Werte aus [Wall06b]):

Wafer B1	HfO ₂	$d_S = 9.5\text{nm}$	$c_{sat} = 1.22\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$V_S = -2 \dots 4\text{V}$
Wafer H7	TiO ₂	$d_S = 15.6\text{nm}$	$c_{sat} = 1.48\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$V_S = 0 \dots 6\text{V}$

Nachdem eine konstante Kapazität die Auswertung der Stimulationsexperimente erheblich vereinfacht, wurden die Chips soweit möglich im Sättigungsbereich der Kapazität bei positiven Spannungen betrieben.

3.1.5 Zugangswiderstand des Elektrolyten

Der Widerstand des Elektrolyten R_E ist erheblich kleiner als der Widerstand der Elektrode und kann nur sehr ungenau direkt aus den Impedanzmessungen bestimmt werden, weshalb sein Einfluss hier theoretisch abgeschätzt wird.

Ein Stromfluss von der Reizelektrode ins Bad erzeugt aufgrund der endlichen Elektrolytleitfähigkeit einen Spannungsabfall in unmittelbarer Nähe des Kondensators, analog zum sogenannten Streuwiderstand („spreading resistance“) bei elektrischen Bauteilen. Im folgenden Abschnitt wird das zugehörige Spannungsprofil $V_E(a, z)$ für den zylindersymmetrischen Spezialfall berechnet.

Herleitung

Betrachtet werde der Halbraum $z \geq 0$ mit spezifischem Widerstand ρ_E und verschwindender Spannung im Unendlichen $V_E(a, z \rightarrow \infty) = 0$. Es gilt die Laplacegleichung

$$\frac{\partial^2 V_E}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial V_E}{\partial a} + \frac{\partial V_E}{\partial z} = 0. \quad (3.2)$$

Der Quellstrom $i_S = c_S dV_S/dt$ sei räumlich sowie zeitlich konstant und auf die kreisförmige Fläche $0 \leq a < a_S$ in der Ebene $z = 0$ begrenzt [From02]:

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial V_E}{\partial z} \Big|_{z=+0} &= -i_S \rho_E, & 0 \leq a < a_S, \\ &= 0, & a > a_S. \end{aligned} \right\} \quad (3.3)$$

Diese Randbedingung wird durch die stationäre Lösung

$$V_E(a, z) = i_S \rho_E a_S \int_0^\infty \exp(-\lambda z) J_0(\lambda a) J_1(\lambda a_S) \frac{d\lambda}{\lambda} \quad (3.4)$$

mit den Besselfunktionen J_0, J_1 nullter bzw. erster Ordnung befriedigt [Cars59].

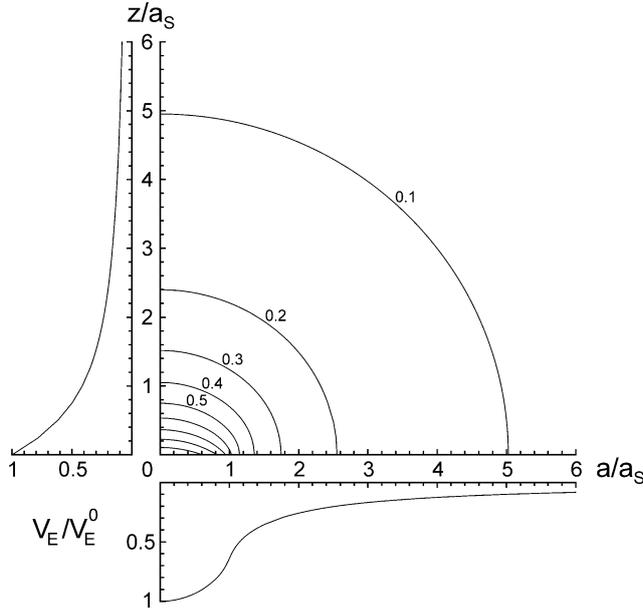
Lösungsverlauf

Das Spannungsprofil hat sein Maximum $V_E^0 := V_E(0, 0) = i_S \rho_E a_S$ am Ursprung und fällt entlang der z -Achse gemäß¹

$$V_E(0, z) = V_E^0 \left(\sqrt{\frac{z^2}{a_S^2} + 1} - \frac{z}{a_S} \right) \quad (3.5)$$

ab. In der Ebene $z = 0$ zerfällt die Lösung in die Abschnitte inner- und außerhalb der Elektrode

$$V_E(a, 0) = \frac{2}{\pi} V_E^0 \cdot \begin{cases} E\left(\frac{a^2}{a_S^2}\right), & 0 \leq a < a_S, \\ \frac{a}{a_S} E\left(\frac{a_S^2}{a^2}\right) + \left(\frac{a_S}{a} - \frac{a}{a_S}\right) K\left(\frac{a_S^2}{a^2}\right), & a > a_S, \end{cases} \quad (3.6)$$


Abbildung 3.3:

Spannungsverlauf im Elektrolyt bei konstantem Einstrom durch die Fläche $0 \leq a < a_S$. Normierte Auftragung in Einheiten der Maximalspannung V_E^0 und des Elektrodenradius a_S .

Der Großteil des Badwiderstandes ist in der unmittelbaren Nähe der Elektrode konzentriert. Die Vergrößerungen illustrieren den Verlauf entlang der Oberfläche (unten) und entlang der z -Achse (links).

mit den vollständigen elliptischen Funktionen K , E erster bzw. zweiter Art [Bron99]. Die Equipotenziallinien des Spannungsprofils und seine Achsenverläufe sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die Maximalspannung V_E^0 ist direkt proportional zum Elektrodenradius, zur Elektrolytleitfähigkeit und zur Quellstromdichte. Im Falle der Schneckenexperimente, bei denen aufgrund der guten Kopplung nur geringe Stromdichten benötigt werden, beträgt die Spannung höchstens 1mV und wird vernachlässigt. Bei den Experimenten mit HEK-Zellen und Rattenneuronen hingegen wird explizit auf sie eingegangen (vgl. Kapitel 5.1.1).

Widerstand

Mit der über die Reizelektrode gemittelten Spannung $V_E^{\text{av}} = 8/(3\pi)V_E^0$ berechnet sich der Streuwiderstand des Bades zu

$$R_E = \frac{V_E^{\text{av}}}{i_S \pi a_S^2} = \frac{8\rho_E}{3\pi^2 a_S} \approx \frac{\rho_E}{3.7 a_S}. \quad (3.7)$$

Er ist indirekt proportional zum Radius a_S der Elektrode und beträgt üblicherweise 1–5k Ω . Er ist damit deutlich größer als der Übergangswiderstand an der Ag/AgCl-Elektrode ($< 50\Omega$, EP05-Pellet, Potentiostat-Messung).

Im Hinblick auf eine hochfrequente Stimulation, wie sie von Max Ulbrich vorgeschlagen wurde [Ulbr03], wirkt das RC-Glied aus Badwiderstand R_E und Chipkapazität C_S wie ein Tiefpassfilter auf den angelegten Spannungsverlauf. Die Zeitkonstante der Filterung

$$\tau_{RC} \approx \frac{\rho_E}{3.7} c_S \pi a_S \quad (3.8)$$

hängt wiederum linear vom Elektrodenradius ab und beträgt für $\rho_E = 65\Omega\text{cm}$, $c_S = 1.5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und $a_S = 125\mu\text{m}$ in etwa 1 μs .

¹[Wats44] §13.2, Formel (7)

Unter Verwendung einer Treiberschaltung (siehe Abschnitt A.3.1), die das Aufladen der Kapazität beschleunigt, und durch Abkleben des Feldoxids mit MK3-Kleber zur Verringerung der parallelen Kapazität lässt sich die Aufladezeit auf ca. 250ns verkürzen. Aus dieser Sicht steht der Verwendung von Frequenzen von bis zu 200kHz nichts im Wege.

3.1.6 Kapazitiver Strom

Aufgrund der komplizierten Spannungsabhängigkeit des Oxids ist die Chipspannung V_S keine geeignete Vergleichsgröße bei der Stimulation. Vielmehr sollte der spezifische Oxidstrom i_S betrachtet werden, der der Polarisierung der Zelle zugrunde liegt. Im Folgenden wird der Verlauf der Oxidströme für HfO_2 und TiO_2 beim Anlegen von Rampen an das Substrat ermittelt. Der dazu verwendete Funktionsgenerator wird über das Messprogramm angesteuert und getriggert. Der Strom wird aus dem Spannungsabfall über einen in Serie geschalteten 50Ω Widerstand ermittelt und auf die Oxidfläche² normiert.

HfO₂

Bei Experimenten mit Schneckenzellen sind die benötigten Stromdichten aufgrund der großen Kopplungsfläche klein. Die geringere Spannungsabhängigkeit des HfO_2 bietet hier den Vorteil, dass mit Rampen konstanter Steilheit näherungsweise konstante Ströme erzielt werden. In Abbildung 3.4 A werden ansteigende und fallende Rampen der Steilheit $dV_S/dt = 125, 250 \dots 625\text{mV/ms}$ oberhalb der Spannung $V_S = 1.5\text{V}$ angelegt.

Es sind keine dc-Ströme sichtbar vor dem Puls. Der Strom beginnt mit Beginn der Rampe und endet an ihrem Ende. Er weist eine leichte Änderung während der Rampe auf, die der Spannungsabhängigkeit der Kapazität in diesem Bereich entspricht (vgl. Abb. 3.2 B). Das langsame Abklingen der Ströme nach der Rampe bis zum Erreichen des Ausgangswertes ist kein Hinweis auf Leckströme. Wahrscheinlich ist es auf langsame Relaxationsprozesse an der Elektrolyt/Oxid-Grenzfläche zurückzuführen.

Die Amplitude der Ströme nimmt mit zunehmender Steilheit der Spannungsrampen zu. Anhand der Beziehung $i_S = c_S dV_S/dt$ errechnet man eine durchschnittliche Oxidkapazität von $c_S \approx 1.2\mu\text{F/cm}^2$ im untersuchten Spannungsbereich von $V_S = 1.5 \dots 4\text{V}$. Diese liegt nur knapp unterhalb der aus den Potentiostat-Messungen bestimmten Sättigungskapazität von $c_{sat} = 1.22\mu\text{F/cm}^2$.

TiO₂

Für Rattenneurone und HEK-Zellen werden aufgrund der kleinen Kopplungsfläche hohe Stromdichten benötigt. Der Einsatz von TiO_2 mit seiner höheren DK verspricht hier einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem HfO_2 . Um maximale Stromdichten zu erzielen, wird der Arbeitsbereich des Chips bei den Experimenten nahezu voll ausgeschöpft. Eine Erhöhung der Rampensteilheit geht also mit einer gleichzeitigen Verkürzung der Rampendauer einher.

Abbildung 3.4 B zeigt Dreieckspulse bestehend aus einer fallenden Rampe von $V_S = 6\text{V}$ auf 1V und einer dazu symmetrischen, ansteigenden Rampe. In diesem Kontext wird der Begriff des Abtastverhältnisses $dc = \Delta t_1/T$ (englisch „duty cycle“) verwendet, der

²Spotdurchmesser $250\mu\text{m}$, Feldoxid mit MK3 abgeklebt.

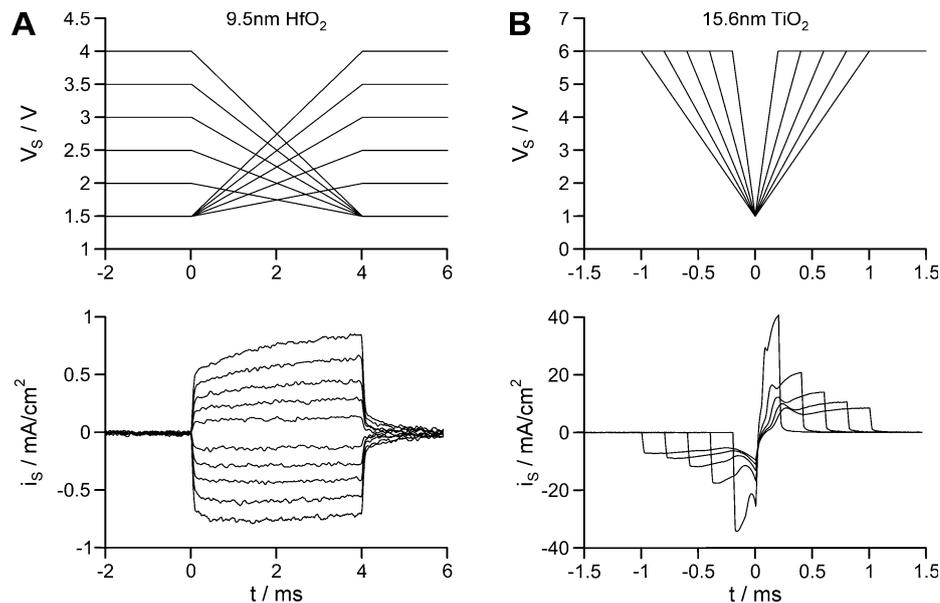


Abbildung 3.4: Spezifischer Oxidstrom (unten) für Rampen der Chipspannung V_S (oben). **A** HfO₂. Rampen unterschiedlicher Steilheit und derselben Länge ergeben einen annähernd stufenförmigen Stromverlauf. **B** TiO₂. Rampen mit unterschiedlicher Steilheit und derselben Amplitude zur vollen Nutzung des Arbeitsbereiches ergeben Stromverläufe veränderlicher Form.

die Dauer der fallenden Rampe Δt_1 bei gegebener Gesamtdauer des Pulses T festlegt. Dementsprechend haben die Pulse ein Abtastverhältnis von $dc = 0.5$, ihre Dauer beträgt 2.0, 1.6, 1.2, 0.8 und 0.4ms.

Ausgehend von der Spannungsabhängigkeit der Kapazität des TiO₂ (vgl. Abb. 3.2 B) erwartet man einen zum Ursprung punktsymmetrischen Verlauf. Der gemessene Strom unterscheidet sich jedoch für eine bestimmte Rampensteilheit in seinen beiden Phasen sowohl der Form nach als teilweise auch in seiner Amplitude. Zudem ändert sich die Form mit zunehmender Rampensteilheit; der beim längsten Puls deutlich sichtbare Anstieg vor Erreichen des Umkehrpunktes bei $V_S = 1V$ ist beim kürzesten Puls nur noch sehr schwach ausgeprägt. Entsprechend dem vorherigen Abschnitt kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Artefakt der Bad-Chip-Filterung (vgl. Gl. 3.8) handelt. Vielmehr sind die Frequenzabhängigkeit der Oxidkapazität und die damit verbundenen Relaxationsprozesse für den Verlauf verantwortlich.

Ausblick

Eine Kontrolle der Spannung ist unerlässlich, um Schäden am Oxid und Elektrochemie an der Oberfläche zu vermeiden. Eine Kontrolle des Stroms wäre wünschenswert und würde die Auswertung der Messungen vereinfachen. Versuche, durch eine Anpassung der Pulsform einen konstanten Stromverlauf zu erzielen, lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Für diese Arbeit wurde auf den Aufbau einer echten Stromregelung verzichtet; falls für spätere Arbeiten diese verwirklicht werden soll, so muss die auftretende Spannung gemessen und auf eine strikte Einhaltung des Arbeitsbereichs geachtet werden.

3.2 Zellen

Ziel dieser Arbeit ist die Stimulation von Säugetierneuronen, im Speziellen von Rattenneuronen. Auf dem Weg dahin werden zwei wohl definierte Modellsysteme benutzt: (i) große Schneckenneurone zur Aufklärung des grundlegenden Mechanismus und (ii) rekombinante Natriumkanäle in kleinen Zellen zum Studium der Stimulation unter schwachen Kopplungsbedingungen. In diesem Unterkapitel werden alle drei Systeme kurz vorgestellt und ihre Zellkultur auf den Stimulationschips beschrieben. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen findet sich im Anhang.

3.2.1 Identifizierte Neurone aus *Lymnaea stagnalis*

Nervenzellen aus Invertebraten sind beliebt bei Modell-Studien auf planaren Elektroden [Rege89][From91][Wils94][Brec95]. Sie sind etwa 2–10 mal größer als Säugetierneurone, dadurch gut zu handhaben und garantieren aufgrund ihrer großen Abdichtungsfläche ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis bei extrazellulären Messungen.

Identifizierte Zellen aus dem A-Cluster der Pedalganglien von *Lymnaea stagnalis* bieten außerdem den Vorteil, dass man aus einem einzigen Tier theoretisch bis zu sechzig Zellen gewinnen kann, die sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften nur wenig unterscheiden [Syed89]. Ihr Somadurchmesser liegt im Bereich von 40–80 μm , für die Experimente wurden Zellen zwischen 50–70 μm ausgewählt. Alles Wissenswerte rund um die Tierhaltung und die Präparation wird detailliert in der Dissertation von Alexander Kaul abgehandelt [Kaul07].

Chipreinigung und -beschichtung

Die HfO₂-Chips werden mit Millipore vorgespült und mit 70°C heißer Spülmittellösung (5% Tickopur R36) und einem zusammengefalteten Kosmetiktuch mechanisch gründlich gereinigt. Danach werden sie in reichlich Millipore 2 \times geschwenkt, mit der Wasserhochdruckpistole (2bar) abgespritzt und mit Stickstoff trockengeblasen. Zum Schluss werden sie für 20min unter UV-Licht in der FlowBox sterilisiert.

Für die Beschichtung wird eines der beiden Lamininfragmente YIGSR [Iwam87] oder IKVAV [Tash89] verwendet. Diese Sequenzen befinden sich an verschiedenen Positionen im Laminin [Tash94], binden an unterschiedliche Integrin-Untereinheiten [Colo00] und vermitteln Zelladhäsion bzw. Zelladhäsion und Neuritenwachstum. Einen Überblick über die verwirrende Nomenklatur des Laminin geben Burgeson [Burg94] und Aumailley [Auma05]. Die Beschichtungsprozedur folgt der Beschreibung von Nomizu et.al. [Nomi95]. Das Peptid wird in 10%iger Essigsäure zu 0.5mg/ml gelöst und ein 5 μl Tropfen davon direkt auf den Chip gegeben. Nach 2h wird der eingetrocknete Chip 2 \times mit Aqua ad gespült und das Kulturschälchen anschließend mit 2ml DM befüllt.

Präparation

Die Vorgehensweise folgt der Beschreibung von Syed [Syed99] und entspricht dem Abteilungsstandard [Kaul07]. Vor Beginn wird das Besteck mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Arbeiten im Anschluss an die Anästhesie werden unter sterilen Bedingungen in einer FlowBox bei ca. 20°C durchgeführt.

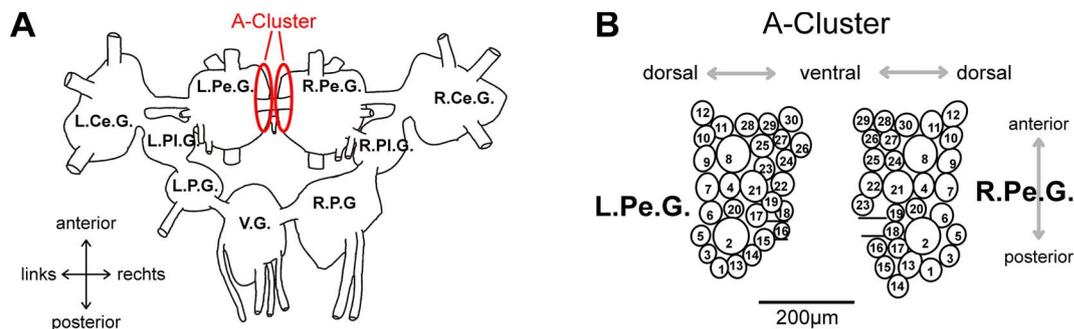


Abbildung 3.5: Identifizierte Neurone aus *Lymnaea stagnalis*. **A** Dorsale Ansicht des zentralen Nervensystems und Lokalisation der beiden A-Cluster (rot). G=Ganglion, Pe=Pedal, Ce=Cerebral, Pl=Pleural, P=Parietal, V=Visceral, nach [Syed90]. **B** Seitliche Ansicht der A-Cluster mit den identifizierten Neuronen A1-A30 (modifiziert nach [Syed89]).

Etwa drei Monate alte Jungtiere (Gehäuselänge 1.5cm) werden mit einer Pinzette von ihrem Gehäuse befreit und in 10–25%iger Listerine-Lösung für 10min betäubt. Der Körper wird in einer Schale mit Sylgardboden festgepinnt, am Rücken geöffnet, der Ganglienring freigelegt und die Cerebral-Kommissur durchtrennt. Das Gewebe im PeA-Bereich wird im Hinblick auf den späteren Enzymverdau besonders gründlich entfernt. Abschließend werden alle Nervenstränge bündig abgeschnitten und das Gehirn in eine Schale mit ABS überführt.

Die Gehirne werden mehrfach gewaschen ($3 \times 10\text{min}$ in ABS) und das übrige äußere Gewebe mit Trypsin enzymatisch anverdaut (6mg/3ml ABS, Dauer: 20–23min). Anschließendes Baden in Trypsin-Inhibitor (6mg/3ml ABS, 10min) stoppt den Verdau. Die Gehirne werden in eine Schale mit HODM transferiert und mittels Minutien kreuzförmig aufgespannt. Abbildung 3.5 A zeigt schematisch das Gehirn zu diesem Zeitpunkt und beschreibt die Lage der Ganglien.

Nach 15min wird vorsichtig das Gewebe, das die Pedal-Ganglien umspannt, mit sehr feinen Pinzetten aufgerissen. Nachdem viele Zellen des A-Cluster Projektionen in andere Ganglien haben, erleichtert ein kräftiger Kniff mit der Pinzette in die Kommissuren die spätere Entnahme. Für eine bessere Zugänglichkeit der Zellen im A-Cluster empfiehlt es sich, die Pedal-Kommissur vollständig zu durchtrennen und die beiden Ganglien leicht nach außen/oben gedreht festzupinnen, so dass man direkt auf den PeA-Bereich blickt (Abb. 3.5 B).

Die Entnahme erfolgt mithilfe einer Glaspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. $70\mu\text{m}$. Diese ist durch einen Schlauch mit einer μl -Spritze verbunden, alles mit HODM befüllt, und wird über einen mechanischen Mikromanipulator bewegt. Durch Saugen wird ein Zellkörper aus dem Ganglion und in die Pipette gezogen, bis das Axon abreißt. Die Zellen können vor dem Aufsetzen auf den Chip über Nacht in einem BSA-beschichteten Falcon-Schälchen (Adsorption aus 3%iger Lösung für 2h, $2 \times$ gespült mit ABS) in DM zwischengelagert werden. Während der Aufbewahrung bildet sich das Axon zurück, die Zellen sind danach annähernd kugelförmig und wachsen nach dem Aufsetzen meist kreisrund aus. Sie werden dazu in der FlowBox belassen.

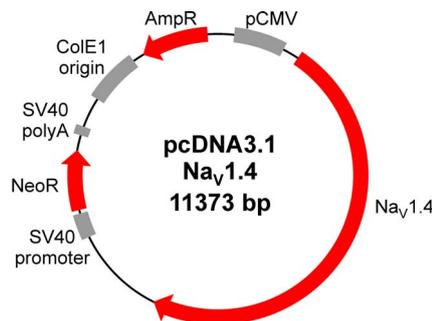


Abbildung 3.6: Das Plasmid pcDNA3.1 mit der DNA des rNa_v1.4 als Insert (Schemazeichnung). Rot: kodierende Sequenzen des Natriumkanals (5.5 kbp) und der Ampicillin- und Neomycinresistenz. Grau: nicht kodierende Bereiche (Promotoren, polyA-site,...).

3.2.2 HEK-Zellen mit Natriumkanälen

Um die Aktivierung von Natriumkanälen unter definierten Bedingungen zu studieren, wird der Natriumkanal rNa_v1.4 heterolog in Zellen der Zelllinie HEK293 exprimiert.

Expressionssystem

Die Zelllinie HEK293 entstammt der menschlichen, embryonalen Niere (engl. Human Embryonic Kidney). Sie ist genetisch so verändert, dass die Zellen sich kontinuierlich und theoretisch sogar unbegrenzt oft teilen [Grah77].

HEK-Zellen besitzen nur wenige endogene Ionenkanäle [Zhu98]. Um einen exogenen Ionenkanal in der Zelle zu exprimieren, wird eine für diesen Kanal kodierende DNA-Sequenz in die Zelle eingeschleust. Sie bewirkt die Herstellung des Proteins und seine Integration in die Zellmembran. Wählt man einen für die Expression optimierten Promotor z.B. mit der sog. Kozak-Sequenz [Koza89], so wird der Ionenkanal *überexprimiert* und dominiert die ionischen Membranströme.

Im Allgemeinen wird die DNA nach einiger Zeit wieder aus dem Zellkern entfernt, so dass die Expression des Ionenkanals endet (*transiente* Transfektion). In seltenen Fällen wird die DNA dauerhaft in das Erbgut der Zelle integriert; durch Selektion auf eine gleichzeitig mit eingeschleuste Antibiotikaresistenz kann man eine *stabile* Zelllinie isolieren, von der jede Zelle den gewünschten Ionenkanal exprimiert.

Molekularbiologie

Die Transfektion der Zellen erfolgt mit Hilfe des Plasmids pcDNA3.1 (Abb. 3.6). Ein Plasmid ist ein doppelsträngiger DNA-Ring, der u.a. Sequenzen für die Vermehrung in der Wirtszelle, für Antibiotikaresistenzen und Schnittstellen zum Einbau der gewünschten Sequenz enthält. Verglichen mit Einzelstrang-DNA und RNA zeichnet er sich durch eine hohe mechanische und thermische Stabilität aus. Die DNA des Natriumkanals wurde von Jürgen Kupper aus unserer Abteilung in das Plasmid kloniert. Die stabile Transfektion der HEK-Zellen mit dem Plasmid wurde von Markus Schmidtner in unserer Abteilung durchgeführt [Schm06].

Chipreinigung und -beschichtung

Die Reinigung der TiO₂-Chips erfolgt vollkommen analog zu dem im vorherigen Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Vorgehen.

Die Chips werden für die Stimulationsexperimente mit Fibronectin beschichtet. Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix und bindet an bestimmte Untereinheiten der zelleigenen Integrine [Flie01]. Es wird in PBS gelöst (10µg/ml) und 2.5ml der Lösung für 2h auf dem (abgedeckten) Chip belassen. Danach wird 2× mit PBS gespült, mit 2ml DMEM aufgefüllt und der Chip für mindestens 15min in den Brutschrank gestellt.

Zellkultur

Die HEK-Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM:F12-S aufbewahrt. Zweimal pro Woche werden sie umgesetzt bzw. aufgeteilt, indem man sie mit 2ml frischem Medium mit der Pipette vom Boden abspült und je 250–300µl in eine neues Schälchen mit wiederum 2ml Medium gibt. Das Medium ist auf 37°C vortemperiert und idealerweise auf den CO₂-Gehalt des Brutschranks eingestellt.

Für das Aufbringen der Zellen auf die Chips wird dieselbe Prozedur befolgt, aber das serumfreie Medium DMEM verwendet (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Messungen werden zwischen ca. 4–30h nach dem Umsetzen durchgeführt.

3.2.3 Hippocampale Neurone aus *Rattus norvegicus*

Der Hippocampus der Ratte ist Quelle für eine relativ homogene Population an Nervenzellen mit wohldefinierten Eigenschaften, die prototypisch für Neurone des zentralen Nervensystems (CNS) im Allgemeinen sind [Gosl98]. Den überwiegenden Anteil an hippocampalen Neuronen machen die Pyramidalzellen aus, doch auch Neurone anderer Morphologie [Krie83] besitzen *in vitro* sehr ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften [Buch91]. In Kultur bilden die Zellen zudem eine Vielzahl chemischer Synapsen untereinander aus, was die Netzwerke besonders interessant für Studien zur synaptischen Plastizität macht.

Chipreinigung und -beschichtung

Die Reinigung der TiO₂-Chips folgt der Beschreibung im vorherigen Abschnitt 3.2.1 mit folgenden wichtigen Ergänzungen: (i) vor der gesamten Putzprozedur werden die Chips für 2h in 70%igem Ethanol zur Desinfektion eingelegt; (ii) die UV-Behandlung wird auf 40min ausgedehnt.

Als Beschichtung für die Stimulationsexperimente wird Poly-L-Lysin verwendet. Das Polypeptid ist mehrfach positiv geladen. Die unspezifische Zelladhäsion wird durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt [Jaco77].

Poly-L-Lysin Hydrobromid mit einem Molekulargewicht von 70.000–150.000kDa wird zu 0.1mg/ml in Aqua ad gelöst und durch einen 0.22µm-Filter filtriert. Je 2.5ml der Lösung werden in die Kulturschale gegeben. Nach 1h wird die Lösung abgenommen und mindestens 2× gründlich mit Aqua ad gespült. Zuletzt werden 3ml Leibovitz L-15 Medium zugegeben und die Kulturschale für 15min in den Brutschrank gestellt.

Präparation

Die Präparation der Zellen wurde von Doris Eckerlein durchgeführt. Sie folgt der Beschreibung von Banker [Bank77] und ist in früheren Arbeiten der Abteilung dokumentiert, siehe z.B. [Vass97].

Eine Wistar-Ratte wird am 18. Trächtigkeitstag mit CO₂ betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Föten werden entnommen und dekapitiert. Die Hippocampi werden aus den Hirnen isoliert, in 5ml D-PBS (mit 1% BSA) überführt und bei 36.4°C für 15min mit dem Enzym Papain (0.1mg/ml) anverdaut. Das Gewebe wird in 1ml D-MEM-S mit einer 2ml-Pipette dispergiert und für 10min bei 300g zentrifugiert. Das Pellet wird in 1ml auf 4°C vorgekühltem D-MEM-S erneut gelöst.

Zur Verminderung des Glia-Anteils in der Kultur wird die Zellsuspension in einer unbehandelten Zellkulturschale (Ø92mm) mit 10ml D-MEM-S präplattiert und für 1h im Brutschrank kultiviert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und für 10min bei 300g abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 1ml D-MEM-S resuspendiert und die Zelldichte mittels einer Zählkammer bestimmt. Die Zelldichte wird mit D-MEM-S auf 250.000–300.000ml⁻¹ eingestellt und die Lösung anschließend anteilig im Verhältnis 1 : 2 mit L-15-S verdünnt. Je 3ml werden in die Kulturschale mit dem Chip gegeben, so dass die Zelldichte im Schälchen etwa 260–310mm⁻² beträgt, was nominell einer Zelle pro 60×60µm² entspricht. Nach 1h im Brutschrank wird das vorläufige Nährmedium gegen serumfreies Neurobasal-Medium ausgetauscht.

Kultur

Die Zellen werden bis zum Experiment im Brutschrank bei 36.4°C mit 10% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Wöchentlich werden 0.4ml Neurobasal-Medium zugesetzt, um den Schwund durch Verdunstung auszugleichen. Der Ausschuss durch Kontamination der Chips lag nach 4 Wochen bei etwa 20–25%.

3.3 Geometrie des Zell-Chip-Kontaktes

Die elektrischen Eigenschaften des Kontaktes zwischen Zelle und Substrat werden maßgeblich von der Geometrie der Adhäsion bestimmt. Im Folgenden werden die Ausdehnung der Adhäsion sowie der Abstand zwischen adhärierter Membran und Substrat mit optischen Methoden gemessen.

3.3.1 Adhäsionsfläche

Zur besseren Darstellung von Phasenobjekten in einem Mikroskop wurde vor 50 Jahren das Prinzip des Differenz-Interferenz-Kontrastes (DIC) von Nomarski [Noma52] eingeführt, das besonders gut für biologische Materialien geeignet ist.

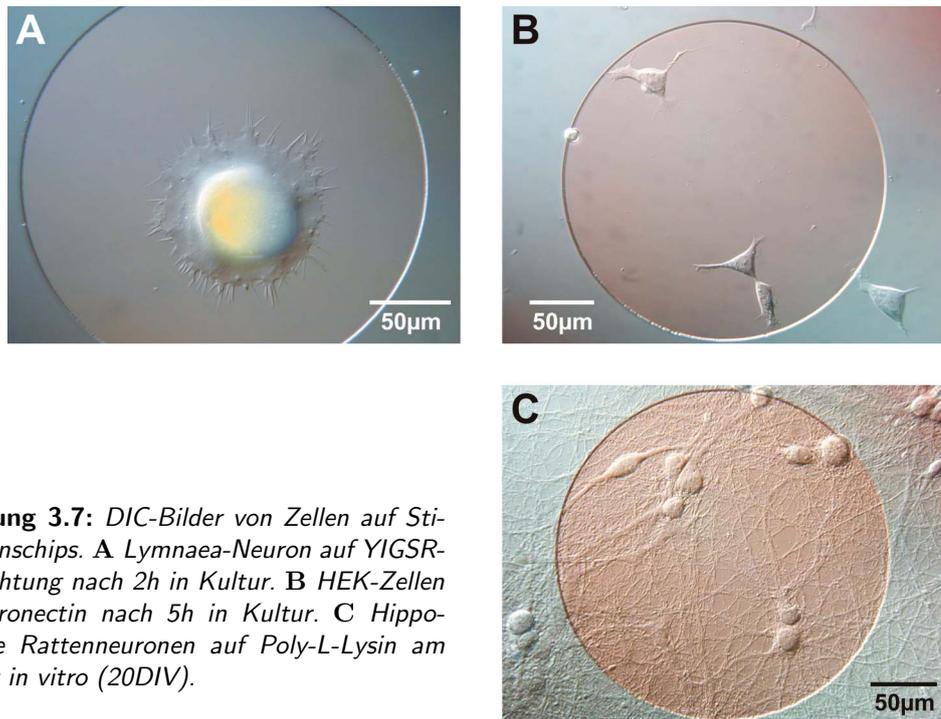


Abbildung 3.7: DIC-Bilder von Zellen auf Stimulationschips. **A** *Lymnaea*-Neuron auf YIGSR-Beschichtung nach 2h in Kultur. **B** HEK-Zellen auf Fibronectin nach 5h in Kultur. **C** Hippocampale Rattenneuronen auf Poly-L-Lysin am 20. Tag *in vitro* (20DIV).

Methode

Ein Strahl linear polarisierten Lichtes wird durch ein modifiziertes Wollaston-Prisma in zwei Strahlen aufgespalten, die orthogonal zueinander polarisiert und in der Bildebene linear um wenige 100nm versetzt sind. Ändert sich der Brechungsindex oder die Dicke des Objektes über diesen Abstand, so werden die beiden Strahlen phasenverschoben. Durch ein weiteres Prisma werden die beiden Strahlen zur Interferenz gebracht und durch einen Analysator die unveränderten Komponenten ausgeblendet. Die Intensität des Bildes ist somit eine Funktion des räumlichen Gradienten der optischen Weglänge der Probe in Richtung des Versatzes der aufgeteilten Strahlen.

Mikroskopische Aufnahmen

Abbildung 3.7 zeigt DIC-Aufnahmen der verschiedenen Zellen auf Stimulationschips aus HfO_2 und TiO_2 . Der detektierbare Phasengradient verläuft von links oben nach rechts unten.

Feinste Details wie Filopodien der Schneckenzelle oder flache Gliazellen in der Rattenkultur sind gut zu erkennen. Insbesondere lässt sich der Umriss der Adhäsion bei Schnecken und HEK-Zellen bestimmen; auch die nach dem Abreißen der Zelle verbleibende Adhäsionsmembran von Schneckenneuronen erzeugt ausreichend Kontrast, um erkannt zu werden (nicht gezeigt). Dagegen ist eine verlässliche Abschätzung der Adhäsionsfläche bei Rattenzellen aufgrund des dichten dendritischen Wachstums und des höheren Zellkörpers oft nicht möglich.

Man beachte den deutlichen Größenunterschied zwischen Invertebraten- und Säugetierneuronen. HEK-Zellen hingegen sind etwa so groß wie die Zellkörper der Rattenneurone und eignen sich deshalb gut als Modellsystem für schwache Kopplungsbedingungen.

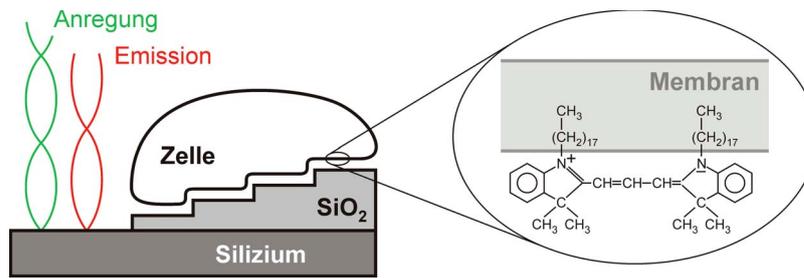


Abbildung 3.8: Prinzip der FLIC-Methode. Die Zellmembran ist mit dem Farbstoff $DiI_{18}(3)$ (siehe Inset) angefärbt. Durch die unterschiedlichen Stufenhöhen des Oxids befindet sich der Farbstoff in Knoten oder Bäuchen der anregenden bzw. abgestrahlten stehenden Welle. Aus dem entstehenden Interferenzmuster und den bekannten Stufenhöhen lässt sich der Abstand der adhärirten Membran vom Substrat bestimmen.

3.3.2 Zell-Substrat-Abstand

Der Abstand d_J zwischen adhärirter Zellmembran und Substratoberfläche geht direkt in den Schichtwiderstand ein. Zu seiner Bestimmung wird die in der Abteilung Fromherz entwickelte Methode der Fluoreszenzinterferenzkontrast(FLIC)-Mikroskopie [Lamb02] genutzt.

Methode

Einfallendes Licht bildet vor einer spiegelnden Grenzfläche eine stehende Welle aus. Bringt man einen Dipol in die Nähe der Grenzfläche, so ist die Absorptionswahrscheinlichkeit abhängig von seinem Abstand zur Oberfläche und proportional zur Intensität der stehenden Welle an diesem Ort. Auch die Emission des Dipols ist abstandsabhängig, wobei hierbei die längere Wellenlänge des abgestrahlten Lichtes eingeht. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist also das Produkt der Intensitäten der anregenden und emittierten stehenden Welle.

Dieses Prinzip wird bei der FLIC-Mikroskopie ausgenutzt (Abb. 3.8). Durch geeignete Prozessierung eines Siliziumchips wird ein regelmäßiges Schachbrettmuster aus je vier Quadranten unterschiedlicher Oxiddicke erzeugt. Kultiviert man eine Zelle auf diesem Substrat, so wird der Abstand zwischen adhärirter Membran und spiegelnder Si/SiO₂-Grenzfläche bestimmt (i) vom unbekanntem Abstand zwischen Membran und Oxidoberfläche und (ii) von der Oxiddicke. Färbt man die Zellmembran mit dem Fluoreszenzfarbstoff $DiI_{18}(3)$ an, so variiert die detektierte Fluoreszenzintensität der unteren Membran auf den vier Stufen gemäß dem Abstand zur spiegelnden Grenzfläche. Der Abstand zwischen Zelle und Substrat stellt dabei eine Verschiebung der Intensitätskurve auf der z-Achse dar und kann aus einem Fit der Theoriekurve an die Messpunkte ermittelt werden.

Durchführung

Die FLIC-Chips werden gemäß der Protokolle in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 gereinigt. Die Beschichtung mit Fibronectin erfolgt wie beschrieben. Bei der Beschichtung mit einem der Lamininfragmente werden 200 μ l des gelösten Fragments auf der gesamten

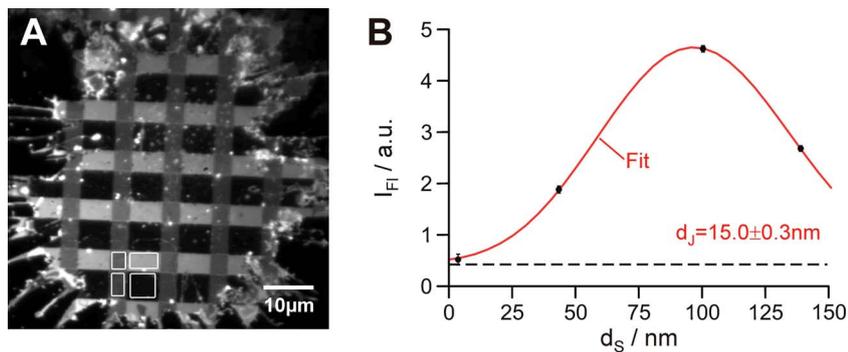


Abbildung 3.9: FLIC-Mikroskopie an Schneckenzellen. **A** Fluoreszenzbild der angefärbten Adhäsionsmembran nach Abreißen der Zelle. Das schachbrettartige Muster korreliert mit den vier unterschiedlichen Stufenhöhen der SiO_2 -Terrassen. **B** Fluoreszenzintensität der vier markierten Bereiche in A aufgetragen gegen die Dicke der Oxidschicht. Ein Fit mit der FLIC-Theorie ergibt einen Adhäsionsabstand von $d_J = 15.0 \pm 0.3 \text{ nm}$.

FLIC-Chipoberfläche ($10 \times 30 \text{ mm}$) verteilt, so dass diese vollständig benetzt ist, und nach 2h dreimal mit PBS gespült.

Das Aufbringen der HEK-Zellen oder der Schneckenneurone erfolgt wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben. Bei den Messungen an HEK-Zellen in Medium ohne Serum (DMEM) wird das serumhaltige Kulturmedium zunächst gegen dieses ausgetauscht, die Zellen für 1h zurück in den Brutschrank gestellt und der gesamte Umsetzungsvorgang anschließend ebenfalls mit DMEM durchgeführt. Auf FLIC-Messungen an Rattenzellen wurde verzichtet, da Literaturwerte für die gewählten Kulturbedingungen vorhanden sind [Glei06].

Der Farbstoff $\text{DiI}_{18}(3)$ wird in 100% Ethanol zu 5mM gelöst. Die Anfärbung der HEK-Zellen folgt der Beschreibung in der Arbeit von Raimund Gleixner [Glei06]. Die Anfärbung der Schneckenneurone wurde wie folgt durchgeführt: Für den Medien austausch wird das Kulturmedium bis auf 1ml abpipettiert, damit die Zellen nicht vollständig trocken fallen. Der Rest wird vorsichtig durch zweimaliges Zu- und Abpipettieren von je 3ml PBS am Rand der Schale ausgetauscht und abschließend mit PBS auf 3ml aufgefüllt. Alle weiteren Schritte erfolgen im Dunkeln. Die Zellen werden durch Zugabe von $25 \mu\text{l}$ der Farbstofflösung für 10min angefärbt. Anschließend wird der Medien austausch wie oben beschrieben wiederholt.

Geringer Abstand bei Schneckenneuronen

Abbildung 3.9 A zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der adhären Membran eines Schneckenneurons nach Abspülen der Zelle. Die Helligkeit von vier ausgewählten Bereichen ist in Teil B der Abbildung gegen die Stufenhöhe der zugehörigen Oxidterrassen aufgetragen. Ein Fit mit der FLIC-Theorie ergibt einen Abstand von $d_J = 15.0 \pm 0.3 \text{ nm}$.

Die Messung eines Schneckenneurons vor dem Abreißen gestaltet sich oft schwierig; im Bereich des Zellsomas ist die Fluoreszenz oft stark vermindert und durch intrazelluläre Anfärbungen beeinträchtigt, bei flachen Ausläufern hat man immer einen unbekannt Hintergrund durch die obere Membran (siehe [Kaul07]). Für $n=4$ Zellen wurde ein Vergleich zwischen Messungen vor und nach dem Abspülen der Zelle durchgeführt. Die Werte

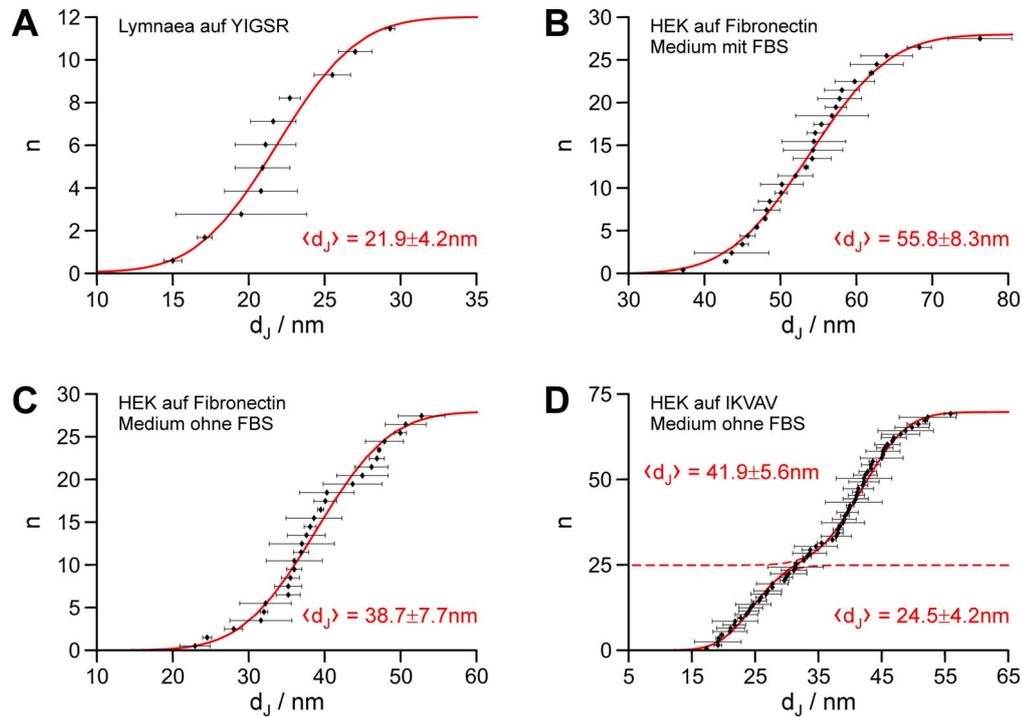


Abbildung 3.10: Statistik der Abstandsmessungen. **A** Lymnaea-Neurone auf YIGSR-Beschichtung; **B** HEK-Zellen in serumhaltigem Medium auf Fibronectin; **C** HEK-Zellen in serumfreiem Medium auf Fibronectin; **D** HEK-Zellen in serumfreiem Medium auf IKVAV-Beschichtung.

mit Soma lagen durchschnittlich um $\Delta d_J = 4.6 \pm 5.3 \text{ nm}$ über den Werten nach dem Abspülen. Diese Abweichung liegt im normalen Schwankungsbereich verschiedener Messungen an ein und derselben Zelle. Für eine statistische Auswertung mehrerer Zellen werden deshalb nur Membranflecken herangezogen; die Messwerte und ihre Unsicherheit sind in Abbildung 3.10 A aufgetragen. Der Mittelwert aus $n=11$ Messungen beträgt $\langle d_J \rangle = 21.9 \pm 4.2 \text{ nm}$. Der gefundene Wert ist deutlich niedriger als der Abstand, der von Günther Zeck bei Lymnaea-Neuronen auf Poly-L-Lysin gemessen wurde [Zeck03]. Wahrscheinlich ist der größere Abstand auf die damals durchgeführte Co-Kultur von Schneckenhirnen zurückzuführen, die dafür bekannt sind, dass sie Wachstumsfaktoren absondern, die auf dem Substrat adhären [Wong81]. Ein direkter Einfluss der Beschichtung mit dem YIGSR-Fragment ist möglich, wurde jedoch nicht untersucht.

Einfluss des Serums bei HEK-Zellen

Die Messungen an HEK-Zellen sind unkompliziert. Die Ergebnisse für unterschiedliche Bedingungen sind in Abbildung 3.10 B bis D aufgetragen.

Zunächst wurden Messungen unter vergleichbaren Bedingungen wie in der Arbeit von Raimund Gleixner gemacht. Die Abstände (Abb. 3.10 B) ergeben einen Mittelwert von $\langle d_J \rangle = 55.8 \pm 8.3 \text{ nm}$ ($n=28$). Dieser Wert ist um fast 20 nm kleiner als in [Glei06]. Die Diskrepanz stammt möglicherweise (i) von der Reinigungsmethode: ein Indiz hierfür ist, dass bei Erstbenutzung der FLIC-Chips ebenfalls ein geringerer Abstand beobachtet wird; oder

(ii) von der Auswahl der Zellen, die hier auf pfannkuchenartige bzw. pyramidale Formen beschränkt war, während R.G. auch Zellen mit kleiner Adhäsionsfläche (z.B. spindelförmige) in die Auswertung miteinbezog.

Darüberhinaus wurde der Einfluss des Serums im Kulturmedium untersucht. Die Abstände in serumfreiem Medium sind in Abbildung 3.10 C aufgetragen und ergeben einen Mittelwert $\langle d_J \rangle = 38.7 \pm 7.7\text{nm}$ ($n=28$), sind also um ca. 15nm kleiner als im Fall mit FBS im Medium. Wie schon bei Schneckenzellen wird davon ausgegangen, dass das Serum an die Oberfläche des Chips bindet und damit den Abstand erhöht.

Um zu klären, ob ähnlich geringe Abstände erreicht werden können wie bei Schneckenzellen, wurde die Beschichtung mit dem Laminin-Fragment IKVAV getestet. Die Abstände (Abb. 3.10 D) liegen im weiten Bereich zwischen 15...55nm und lassen sich nur schlecht durch eine einfache Normalverteilung beschreiben. Ein Fit mit zwei Normalverteilungen lässt zwei Fraktionen erkennen: (i) etwa 1/3 aller Zellen hat einen geringen Abstand $\langle d_J \rangle = 24.5 \pm 4.2\text{nm}$ ($n=25$), wohingegen (ii) die Mehrheit der Zellen ($n=45$) mit dem Mittelwert $\langle d_J \rangle = 41.9 \pm 5.6\text{nm}$ im Bereich der Fibronectin-Beschichtung liegt. Die Ursache und Signifikanz dieser Aufteilung ist vollkommen unklar.

Für die Stimulationsexperimente werden Zellen auf Fibronectin ohne Serum im Medium kultiviert. Der für den Schichtwiderstand relevante Abstand liegt somit bei $d_J \approx 40\text{nm}$.

3.4 Leitfähigkeit im Spalt

Der Schichtwiderstand $r_J = \rho_J/d_J$ bestimmt die Stärke der Kopplung zwischen Zelle und Substrat. Er ist umso größer je kleiner der Abstand d_J und je größer der spezifische Widerstand im Spalt ρ_J ist. Dieser ist im einfachsten Fall gleich dem spezifischen Widerstand des Elektrolyten ρ_E („BRICA“-Modell) [Glei06]. Für kleine Abstände $d_J < 30\text{nm}$ wurde jedoch eine Erhöhung des spezifischen Spaltwiderstandes beobachtet [Kies00][Brau04].

HEK-Zellen und Rattenneurone fallen unter die erste Rubrik: ihr Adhäsionsabstand beträgt rund 35nm bzw. 50nm und es wurde experimentell keine signifikante Erhöhung des Schichtwiderstandes beobachtet [Glei06]. Schneckenneurone hingegen sind unter den beschriebenen Kulturbedingungen nur etwa 20nm vom Substrat entfernt und es gibt keine verfügbaren Daten für eine vergleichbare Situation. In diesem Unterkapitel wird der Schichtwiderstand bei Schneckenzellen experimentell bestimmt. Die gefundene Erhöhung des spezifischen Elektrolytwiderstandes im Spalt wird vor dem Hintergrund elektrostatischer und hydrodynamischer Effekte diskutiert.

3.4.1 Experimentelle Bestimmung

Der Schichtwiderstand kann auf mehrerlei Arten experimentell bestimmt werden: (i) aus Transistormessungen der lokalen Spannung im Spalt bei gleichzeitiger Modulation der Badspannung [Kies99] oder der intrazellulären Spannung [Schm06]; (ii) aus Transistormessungen der spektralen Rauschleistungsdichte des Abdichtwiderstandes [Voel05]; (iii) durch optische Messungen der Transmembranspannung mit spannungsabhängigen Farbstoffen bei gleichzeitiger Anregung mit stufenförmigen [Brau01] oder sinusförmigen [Brau04] Substratspannungen. Zusammen mit dem durch FLIC-Messungen ermittelten Abstand kann man auf den spezifischen Elektrolytwiderstand im Spalt zurückschließen.

Aus Zeitgründen beschränkt sich diese Arbeit auf zweitgenannte Methode. Eine Bestätigung der hier präsentierten Ergebnisse durch eine der Alternativmethoden steht noch aus.

Messprinzip

Jeder Widerstand, ganz gleich welcher Art, zeigt ein thermisches Spannungsrauschen, auch Johnson-Rauschen oder Nyquist-Rauschen genannt, dessen Leistungsdichte $S_V = 4k_BTR$ proportional zum Wert des Widerstandes R und unabhängig von der Frequenz f ist [Nyqu28]. Auch der mit Elektrolyt gefüllte Spalt der Adhäsion besitzt einen Schichtwiderstand, so dass die Spannung zwischen einem Punkt im Spalt und dem Bad fluktuiert.

Ein Transistor unter einer Zelle misst die lokale Spannung im Spalt, genauer formuliert den Mittelwert der Spaltspannung im Bereich der Gatefläche A_g . Wenn das Rauschen der Gatespannung das Eigenrauschen des Transistors inklusive Messverstärker dominiert, so kann man aus dem gemessenen Rauschen zurückschließen auf den Wert des Schichtwiderstandes.

Beschreibung des Abdichtungsrauschens

Zur Quantifizierung des Rauschens der zeitlich veränderlichen Gatespannung $V_g(t)$ wird die spektrale Leistungsdichte S_{V_g} verwendet. Sie ist definiert als

$$S_{V_g}(f) := \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \left| \int_{-T}^T V_g(t) \exp(i2\pi ft) dt \right|^2 \quad (3.9)$$

und entspricht im Wesentlichen einer Fouriertransformation des Zeitverlaufs der Messgröße im Zeitraum $2T$. Durch Subtraktion der Beiträge von Transistor, Verstärker und Zugangswiderstand des Bades erhält man den durch die Abdichtung hinzugekommenen Anteil des Spektrums.

Für den analytisch zugänglichen Fall einer eindimensionalen, unendlich ausgedehnten Adhäsionsfläche hängt der Frequenzverlauf des Abdichtungsrauschens ab von

- dem Verhältnis der Gatelänge L zur Längskonstante des Spaltes λ

$$\lambda = (g_{JM}r_J + i2\pi fr_J(c_S + c_M))^{-1/2}, \quad (3.10)$$

die den typischen Bereich, der zur Rauschleistung beiträgt, kennzeichnet;

- dem Verhältnis der Frequenz f zur Eckfrequenz f_0

$$f_0 = (2\pi r_J A_g (c_S + c_M))^{-1}, \quad (3.11)$$

unterhalb derer die Längskonstante sich kaum noch ändert und deshalb der Frequenzverlauf konstant ist.

Er hat im Allgemeinen einen sehr komplizierten Verlauf³. Nur in besonderen Grenzfällen kann er in Bereichen durch einfache Beziehungen wie z.B. dem Verlauf $S_{V_g} \propto f^{-2}$ eines einfachen RC-Gliedes [Voel06] ausgedrückt werden. Die Berechnung des Schichtwiderstandes aus dem Frequenzverlauf ist ebenfalls nur unter sehr speziellen Bedingungen möglich.

Im Falle einer endlichen Adhäsionsfläche wird der rauschaktive Bereich nicht nur durch die Längskonstante λ sondern auch von der Position des Transistors bezüglich der Ränder des Adhäsionsbereichs beeinflusst. Für allgemeine Geometrien ist deshalb die Auswertung des Schichtwiderstandes nur über den Umweg der numerischen Simulation eines der Geometrie angepassten, zweidimensionalen Ersatzschaltbildes mit händischer Anpassung der Simulationsparameter möglich.

Messergebnisse

Die Messungen wurden am Setup von und unter maßgeblicher Anleitung durch Moritz Völker durchgeführt. Der verwendete Chip enthält p -Kanal-FETs mit einer Gategröße von $6 \times 7 \mu\text{m}^2$ und ist bedeckt von 3nm SiO_2 mit einer spezifischen Kapazität von $0.95 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die Rauschspektren sind aus jeweils 262144 Datenpunkten bei einer Bandbreite von 1MHz errechnet und 200fach gemittelt. Die Chipreinigung und Präparation der Schneckenzellen entspricht der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Für die Chipbeschichtung wurde das Lamininfragment YIGSR verwendet. Die Messungen wurden bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ im Dunkeln durchgeführt.

Abbildung 3.11 A zeigt ein DIC-Mikroskopbild eines auf dem linearen Transistorarray platzierten Schneckenneurons nach etwa 2h in Kultur. Die Ränder der Adhäsionsfläche sind deutlich erkennbar und bereits über die Kontur des Zellsomas hinausgewachsen.

Teil B der Abbildung zeigt das Rauschspektrum eines Transistors unter der Zelle. Da beim Abspülen der Zelle nach der Messung Membranreste auf dem Chip verbleiben und eine Messung desselben Transistors ohne Zelle deshalb nicht möglich ist, wird das Spektrum mit einem unbedeckten Transistor neben der Zelle verglichen. Das Rauschen unter der Zelle ist über den gesamten dargestellten Frequenzbereich deutlich erhöht. Die Störung bei 50kHz ist auf das Netzgerät des Verstärkers zurückzuführen.

Um das reine Abdichtungsrauschen zu erhalten, subtrahieren wir das Spektrum des unbedeckten Transistors vom Spektrum mit Zelle (Abb. 3.11 C). Die Differenzrauschleistung fällt monoton aber mit unregelmäßiger Steilheit in den dargestellten Frequenzdekaden ab. Der Verlauf unterhalb 0.1kHz weist stärkere Schwankungen auf; für eine präzisere Darstellung im niedrigen Frequenzbereich müsste eine größere Anzahl an Datenpunkten verwendet werden.

Ermittlung des Schichtwiderstandes

Um aus dem gemessenen Spektrum auf den Schichtwiderstand des Spaltes zurückzuschließen, wird eine numerische Simulation durchgeführt. Die Geometrie der Zelladhäsion und der Gatefläche wird anhand des Mikroskopbildes gerendert und in ein Gitter eines zweidimensionalen Kernmantelleiters zerlegt. Die numerische Simulation des so gewonnenen Ersatzschaltbildes erfolgt mit dem Simulationsprogramm SPICE. Die Leckleitfähigkeit der

³siehe Formel 3-90 in [Voel05]

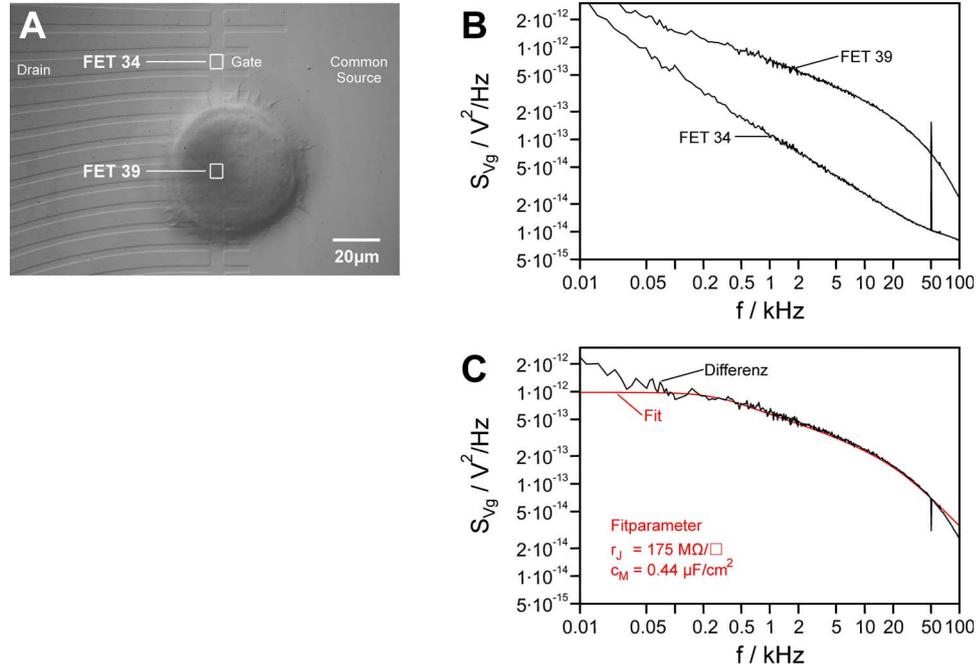


Abbildung 3.11: Bestimmung des Schichtwiderstandes. **A** Schneckenneuron auf einem Chip mit rauscharmen Transistoren. Links sind die gebogenen Drain-Zuleitungen zu sehen, rechts die Common Source und mittig die Gates mit einer Fläche von $6 \times 7 \mu\text{m}^2$. **B** Spektrale Leistungsdichte S_{V_g} des Gatespannungsrauschens. Der Transistor unter der Zelle (FET 39) zeigt ein über den gesamten Frequenzbereich erhöhtes Rauschen im Vergleich zu dem unbedeckten Transistor (FET 34). **C** Spektrale Leistungsdichte des Spannungsrauschens der Adhäsion (schwarz) gewonnen durch Subtraktion der beiden Spektren in B. Rot: numerische Simulation des Systems mit den angegebenen Parametern.

Membran wird dabei festgesetzt auf $g_{JM} = 0.02 \text{ mS}/\text{cm}^2$. Die Parameter für den Schichtwiderstand r_J und die spezifische Membrankapazität c_M werden von Hand variiert.

Eine gute Übereinstimmung des simulierten Verlaufs (Abb. 3.11 C, rote Linie) mit den Messdaten wird für die Parameter $r_J = 175 \text{ M}\Omega/\square$ und $c_M = 0.44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ erzielt. Die Abweichung vom erwarteten Plateau-Wert für niedrige Frequenzen resultiert aus einem zu knapp bemessenen Zeitfenster der Messung und fand sich nur bei etwa der Hälfte der Messungen. Für das Abknicken oberhalb von 50 kHz sind Nicht-Idealitäten des Verstärkers verantwortlich.

Das gemessene Spektrum verändert sich über den Verlauf von mehreren Stunden. Eine Messung an derselben Zelle wie in Abb. 3.11 aber erst 3.5h nach dem Aufsetzen liefert einen reduzierten Schichtwiderstand von $r_J = 165 \text{ M}\Omega/\square$ bei unveränderter Kapazität. Eine analoge Abnahme wurde bei weiteren Zellen beobachtet. Wahrscheinlich ist diese Abnahme auf die Verdunstung des Mediums im Zeitraum zwischen den Messungen zurückzuführen, wodurch die Leitfähigkeit des Elektrolyten zunimmt.

Der Mittelwert des Schichtwiderstandes für $n=3$ Zellen jeweils etwa 2h nach dem Aufsetzen beträgt $r_J = 150 \pm 28 \text{ M}\Omega/\square$, der Mittelwert der spezifischen Membrankapazität $c_M = 0.43 \pm 0.02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Diskussion

Die spezifische Leitfähigkeit des verwendeten Mediums beträgt $\rho_E = 142\Omega\text{cm}$, der durchschnittliche Adhäsionsabstand aus FLIC-Messungen ist $d_J = 22\text{nm}$ (Abschnitt 3.3.2). Hat der Elektrolyt im Spalt dieselbe Leitfähigkeit wie im Bad, so erwartet man einen Schichtwiderstand von $r_J = \rho_E/d_J = 65\text{M}\Omega/\square$.

Die aus den Messungen gewonnenen Werte für den Schichtwiderstand sind 2–3mal größer als erwartet. Die numerische Simulation ist diesbezüglich verlässlich, da keine der gemachten Annahmen z.B. über die Leckleitfähigkeit der Membran den ermittelten Wert merklich beeinflusst. Deshalb ist der erhöhte Wert ein eindeutiges Indiz dafür, dass der Elektrolyt im Spalt nicht dieselbe Zusammensetzung besitzt wie im Bad. Mögliche Gründe hierfür werden im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

Die spezifische Kapazität, die sich aus der Auswertung ergibt, liegt deutlich unter den Literaturwerten, die zwischen $0.7\text{--}1.0\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Wan95] und $1.5\text{--}2.5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [Prin03] variieren. Da nicht ganz klar ist, wie die serielle Kapazität der Verarmungszone des Transistors in der Simulation berücksichtigt werden muss, die den Wert für c_M direkt beeinflusst, wird diese Abweichung jedoch hier nicht weiter diskutiert. Verlässliche Werte für die Membrankapazität werden letztlich erst die optischen Messungen mit spannungssensitiven Farbstoffen erbringen.

Aus den ermittelten Werten lassen sich die charakteristische Eckfrequenz f_0 und die Längskonstante des Spaltes λ abschätzen. Aus Gleichung 3.11 erhält man für die Eckfrequenz $f_0 = 1.8\text{kHz}$. Bei dieser Frequenz beträgt die Längskonstante des Spaltes (Gl. 3.10) etwa $\lambda(f_0) \approx 6.5\mu\text{m}$ und ist damit gleich der Kantenlänge L des Transistors. Wie aus der Theorie hervorgeht, findet genau in diesem Bereich der Übergang des Kurvenverlaufs von der Form $S_{V_g} \propto f^{-2}$ hin zum Grenzfall $S_{V_g} \propto f^{-3/2}$ statt. Tatsächlich wird der Frequenzverlauf für hohe Frequenzen $f \gg f_0$ besser durch einen Fit mit dem Exponenten $-3/2$ beschrieben (nicht gezeigt).

3.4.2 Theoretische Diskussion

In diesem Abschnitt werden mögliche Ursachen für die gefundene Erhöhung des spezifischen Widerstandes im Spalt theoretisch diskutiert. Der erste Ansatz beschäftigt sich mit elektrostatischen, der zweite mehr mit hydrodynamischen Aspekten des Problems. Aufgrund der Überlegungen sollten hydrodynamische Effekte eine größere Rolle spielen; eine experimentelle Klärung der Ursache steht jedoch aus.

Reduzierte Ionenkonzentration

Wir zerlegen das Schichtsystem Oxid-Spalt-Membran gedanklich in die zwei Grenzflächen Oxid-Spalt und Spalt-Membran und behandeln exemplarisch eine davon. Die Grenzfläche teilt den Raum in den Bereich $z > 0$ (Medium 1, dielektrische Konstante ε_1) und den Bereich $z < 0$ (Medium 2, dielektrische Konstante ε_2). Die potentielle Energie des Ions bei $z = \infty$ sei Null. Die freie Energie des Ions im Medium 2 weit entfernt von der Grenzfläche beträgt gemäß Born

$$w(-\infty) = \frac{q_0}{r_I} \left(\frac{1}{\varepsilon_2} - \frac{1}{\varepsilon_1} \right) \quad q_0 = \frac{z_I^2 e_0^2}{2k_B T}, \quad (3.12)$$

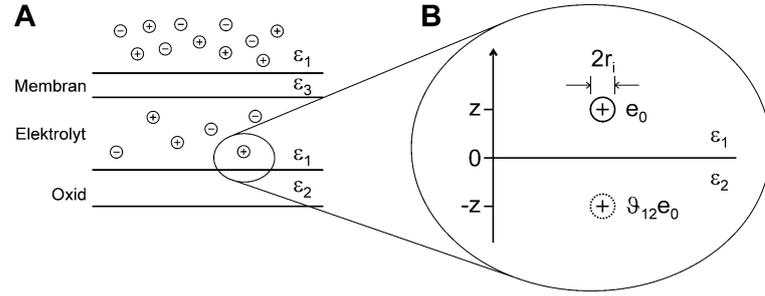


Abbildung 3.12: Elektrostatische Effekte in der Nähe von Grenzflächen. **A** Schichtsystem aus Oxid, Spalt und Membran. **B** Ion vor Grenzfläche: Induktion einer Spiegelladung aufgrund der unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten ε_1 von Wasser und ε_2 des Oxids. Die durch die Wechselwirkung vermittelte Abstoßung führt zu einer Abreicherung der Ionen nahe der Oberfläche.

wobei z_I die Valenz und r_I der Radius des Ions, e_0 die Elementarladung und $k_B T$ die thermischen Energie ist.

In der Nähe der Grenzfläche wird das elektrische Feld des Ions durch die im anderen Medium induzierte virtuelle Spiegelladung gestört (Abb. 3.12). Die zugehörige Wechselwirkungsenergie ist abhängig vom Abstand zur Grenzfläche und erhöht die Eigenenergie des Ions

$$w(z) = \frac{q_0 \vartheta_{12}}{\varepsilon_1 z} \quad r_I < z < \infty, \quad (3.13)$$

wobei $\vartheta_{12} = (\varepsilon_1 - \varepsilon_2)/(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)$.

Befindet sich das Ion in der Nähe zweier Grenzflächen, so induzieren die Spiegelladungen wiederum neue Spiegelladungen und die Energie des Ions wird durch eine unendliche Reihe von Wechselwirkungstermen bestimmt [Neum69]⁴. In erster Näherung erhält man die Energie durch Superposition der zwei Lösungen für unabhängige Grenzflächen mit jeweils nur einer Spiegelladung. Gemäß Boltzmann gilt für die Gleichgewichtskonzentration des Ions an der Stelle z im Spalt der Dicke d_J dann Gleichung 3.14.

$$c(z) = c_0 \exp \left[-\frac{q_0}{2\varepsilon_1} \left(\frac{\vartheta_{12}}{z} + \frac{\vartheta_{13}}{d_J - z} \right) \right] \quad (3.14)$$

Die mittlere Ionenkonzentration im Spalt ergibt sich unter der Annahme, dass die adsorbierten Ionen der inneren Helmholtzschichten an den Grenzflächen nicht zur Leitfähigkeit beitragen, zu

$$\langle c \rangle = \frac{1}{d_J} \int_{r_I}^{d_J - r_I} c(z) dz. \quad (3.15)$$

Mit den Dielektrizitätskonstanten $\varepsilon_1 = 78.5$, $\varepsilon_2 = 20$ und $\varepsilon_3 = 2$ von Wasser, Hafniumdioxid und Lipidmembran und dem Radius $r_I \approx 0.2 \text{ nm}$ eines hydratisierten Ions ergeben sich folgende Werte:

⁴Durch die endliche Ausdehnung der Membran und des Oxids kämen weitere Grenzflächen hinzu, die in ebensolcher Weise zu behandeln wären. Die Dicke der äußeren Schichten hat jedoch nur einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf den Potenzialverlauf im Elektrolyt [Neum69] und wird deshalb hier nicht berücksichtigt.

d_J	5nm	10nm	20nm	50nm
$\langle c/c_0 \rangle$	0.76	0.86	0.92	0.96

Für einen Abstand von 50nm weicht die Konzentration kaum vom Wert im Bad ab; für geringere Abstände findet man eine Abreicherung der Ionen um 5–25%. Diese Abnahme liefert jedoch keine hinreichende Erklärung für den stark erhöhten spezifischen Widerstand im Spalt.

Der Spalt als Poly-Elektrolyt-Gel

Der Chip wird mit einem Oligopeptid beschichtet, das an die Oberfläche adsorbiert und dort ein Polyelektrolytgel (PEG) ausbildet. Der Volumenanteil ϕ des Polymers am Gel und seine Ladungsdichte c_f beeinflussen die Konzentration und Beweglichkeit der Ionen im Gel durch sterische, hydrodynamische und elektrostatische Wechselwirkungen. Eine kurze Abschätzung soll die Relevanz dieser Effekte für die Leitfähigkeit des Spaltes herausstreichen.

Das 9-mer CDPGYIGSR wird gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.2.1 gelöst und aufgetragen. Mit einer Beschichtungsfläche von $4\pi\text{mm}^2$ und einer Effizienz von 0.5 bis 3% [Nomi95] ergibt sich eine effektive Oberflächenkonzentration von $1 \dots 6 \cdot 10^{-21}\text{g nm}^{-2}$. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 967g mol^{-1} etwa 1–6 Molekülen pro nm^2 . Das Molekülvolumen kann anhand der Sequenz und Literaturdaten [Zamy84] berechnet werden und beträgt 1.1nm^3 . Der Volumenanteil des Oligopeptids an einem Spalt von 20nm Dicke ergibt sich somit zu $\phi = 0.05 \dots 0.33$.

Ungeladenes Gel. Mit zunehmendem Volumenanteil ϕ nimmt die Leitfähigkeit eines ungeladenen Gels ab, und zwar stärker, als es der Reduktion des zugänglichen Volumens entspricht. Eine gute Übersicht über die Vielzahl theoretischer Beschreibungsversuche des Problems wird in den Reviewartikeln von Muhr [Muhr82] und Masaro [Masa99] vermittelt. Eine anschauliche Erklärung bietet der sogenannte „obstruction effect“: ein diffundierender Partikel, der sich entlang eines Feldgradienten bewegt, muss einen Umweg aufgrund der undurchdringlichen Hindernisse in Kauf nehmen. In der Theorie von Mackie und Meares [Mack55] schlägt sich die Gewundenheit des Weges θ (Verhältnis Weglänge mit Hindernissen zu Weglänge ohne Hindernisse) quadratisch in der Mobilität des Teilchens nieder

$$\frac{u}{u_0} = \frac{1}{\theta^2}, \quad (3.16)$$

da der Feldgradient um denselben Faktor θ reduziert wird, um den der zurückgelegte Weg anwächst. Anhand eines einfachen Gittermodells wird eine Beziehung zwischen der Gewundenheit und dem Volumenanteil des Polymers hergestellt,

$$\theta = \frac{1 + \phi}{1 - \phi} \quad (3.17)$$

womit Gleichung 3.16 die Gestalt

$$\frac{u}{u_0} = \left(\frac{1 - \phi}{1 + \phi} \right)^2 \quad (3.18)$$

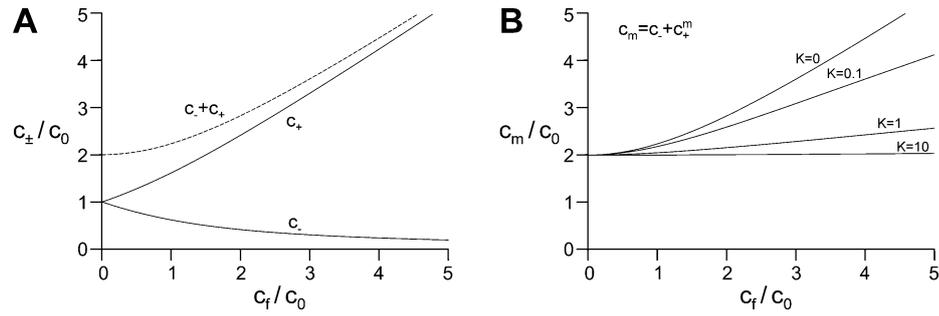


Abbildung 3.13: Ionenkonzentrationen in einem geladenen Polyelektrolytgel. **A** Anreicherung der Anionen c_+ und Abreicherung der Kationen c_- mit zunehmender Konzentration fixierter Ladungen im Gel c_f (alle Konzentrationen in Einheiten der Bulkonzentration c_0). Die Nettoladungsdichte (gestrichelt) nimmt zu. **B** Gesamtkonzentration beweglicher Ladungsträger unter Berücksichtigung der Bindung von Anionen an die fixierten Ladungen des Gels für Gleichgewichtskonstanten $K = k_a/k_d$ zwischen $K=0$ (keine Bindung) und $K=10$ (starke Bindung).

erhält. Obwohl die Herleitung der Gleichung 3.18 gravierende Vereinfachungen enthält, beschreibt sie die Abnahme der Leitfähigkeit von Gelen für kleine Diffusionspartikel in einem weiten Bereich $\phi < 0.6$ erstaunlich gut [Muhr82]. Insbesondere sei darauf hingewiesen, dass die experimentell gefundene, lineare Beziehung $u/u_0 = 1 - 3.6\phi$ für NaCl in einem Poly(Ethylene Glykol)-Gel [Elwo72] im untersuchten Bereich geringer Dichte nahezu ununterscheidbar vom Verlauf der Gleichung 3.18 ist.

Für einen Volumenanteil der Peptide im Spalt von $\phi = 0.05 \dots 0.33$ sagt die Theorie von Mackie und Mearse eine Abnahme der Leitfähigkeit um 20...75% voraus.

Ladungen im Gel. Trägt das Peptid eine Ladung, z.B. durch eine dissoziierte Seitengruppe, so entspricht die zuvor bestimmte Moleküldichte einer lokalen Ladungskonzentration von 80...500mM, die sich auf die Ionenkonzentrationen im Spalt wie folgt auswirkt.

Sei die Konzentration der Anionen (Kationen) im Spalt mit c_+ (c_-) bezeichnet und die des Bades mit c_0 . Die festen Ladungen des Gels seien negativ und besitzen die Konzentration c_f . Im chemischen Gleichgewicht und unter Wahrung der Elektroneutralität gilt [Barr96]

$$c_+c_- = c_0^2 \quad \text{und} \quad c_+ = c_- + c_f. \quad (3.19)$$

Für die relative Konzentration der Anionen (Kationen) im Spalt erhält man

$$\frac{c_{\pm}}{c_0} = \frac{1}{2} \left(\sqrt{\left(\frac{c_f}{c_0}\right)^2 + 4} \pm \frac{c_f}{c_0} \right). \quad (3.20)$$

Abbildung 3.13 A zeigt, dass mit zunehmender Ladung des Gels Anionen an- und Kationen abgereichert werden. Die Gesamtkonzentration der frei beweglichen Ionen im Gel nimmt zu, die Leitfähigkeit ist also größer als die des ungeladenen Gels.

Lässt man die Bindung von Gegenionen an fixierte Ladungen des Gels zu, so gilt für die Änderung der Konzentration frei beweglicher Anionen c_+^m

$$\frac{dc_+^m}{dt} = -k_a(c_f - c_+^a) + k_d c_+^a \quad (3.21)$$

mit Raten k_a (k_d) für die Adsorption (Desorption) der Anionen und c_+^a der Konzentration adsorbierter Anionen. In das chemische Gleichgewicht und die Elektroneutralitätsbedingung gehen nur die mobilen Anionen und die unbesetzten Bindungsstellen ein, so dass Gleichung 3.19 umgeschrieben werden muss zu

$$c_+^m c_- = c_0^2 \quad \text{und} \quad c_+^m = c_- + c_f - c_+^a. \quad (3.22)$$

Im Gleichgewicht ($dc_+^m/dt = 0$) ist der Anteil $1/(1 + K)$ der Bindungsstellen durch assoziierte Anionen neutralisiert und die effektive Ladung des Gels beträgt $\tilde{c}_f = c_f/(1 + K)$, wobei $K = k_a/k_d$ die Gleichgewichtskonstante der Bindung bezeichnet. Die Konzentration der frei beweglichen Ionen wird durch eine zu Gleichung 3.20 analoge Beziehung, bei der die fixierten Ladungen c_f durch die frei zugänglichen \tilde{c}_f substituiert werden müssen, beschrieben. Sie nimmt demnach langsamer zu als für den Fall ohne Bindung (Abb. 3.13 B). Ob mit oder ohne Gegenionenbindung, die Leitfähigkeit eines geladenen Gels wäre in beiden Fällen erhöht. Dies ist unwahrscheinlich, da eine Analyse der Aminosäuresequenz des 9-mers ergibt, dass sich dieses bei pH 7 neutral verhalten sollte. Interessant wäre ein Vergleich mit dem IKVAV-Peptid, das in diesem pH-Bereich zweifach positiv geladen ist.

3.5 Elektrophysiologie

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit klassischen Methoden zur Charakterisierung und Kontrolle der elektrischen Eigenschaften von Zellen, die anschließend auf die untersuchten Systeme angewendet werden.

3.5.1 Die Patch-Clamp Technik

Die Plasmamembran der Zelle bestimmt deren elektrischen Eigenschaften und trennt das Zellinnere vom umgebenden Medium. Mithilfe der Patch-Clamp Methode erhält man elektrischen Zugang zum Zellinneren oder kann sogar einzelne Membranflecken untersuchen. Die Methode wurde in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sakmann erfunden und ermöglichte die erstmalige Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle [Nehe76]. Spätere Verbesserungen und Erweiterungen [Hami81][Horn88] machten sie zur Standardmethode für eine Vielzahl von Fragestellungen in der Elektrophysiologie.

Vorgehensweise

Eine Glaspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. $2-3\mu\text{m}$ wird mit einem Elektrolyten befüllt und in einem Elektrodenhalter montiert, der mittels eines chlorierten Silberdrahtes elektrischen Kontakt zur Pipettenlösung herstellt und eine Kontrolle des Drucks in der Pipette ermöglicht. Unter leichtem Überdruck wird die Pipette der Zelle angenähert, bis sich die Membran durch den Lösungsausstrom leicht einwölbt. Bei Lösen des Drucks

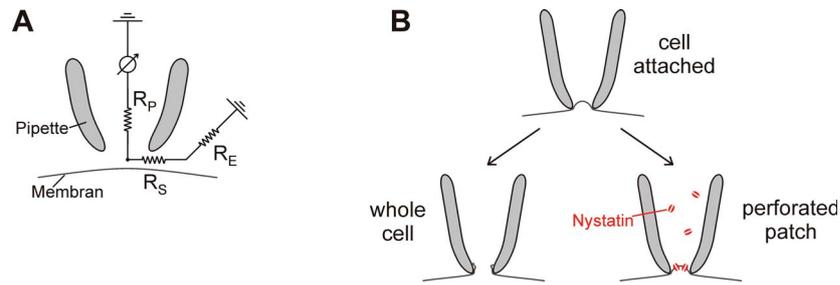


Abbildung 3.14: Die Patch-Clamp Methode. **A** Elektrisches Ersatzschaltbild der Pipette beim Annähern an die Membran. R_P , R_S , R_E : Widerstand der Pipette, der Abdichtung und des Elektrolyten. **B** Zugang zum Zellinneren ausgehend von der „cell attached“-Konfiguration durch Penetration (links) oder Perforation (rechts) des gepatchten Membranstücks.

oder sogar leichtem Saugen schmiegt sich die Membran an die Innenwand der Pipettenöffnung an, oft einhergehend mit der Bildung eines Lipidbläschens [Milt90], wodurch der elektrische Zugangswiderstand zwischen Pipetteninnerem und Bad stark und oft sprunghaft ansteigt (Abb. 3.14 A). Der Abdichtwiderstand (engl. „seal“) in diesem sog. „cell attached“-Modus beträgt bis zu mehreren Gigaohm und reduziert das Hintergrundrauschen soweit, dass Membranströme im pA-Bereich aufgelöst werden können.

Um Zugang zum Zellinneren zu erhalten, gibt es zwei Möglichkeiten (Abb. 3.14 B):

- Durch kurzes, kräftiges Saugen oder einen kurzen, hohen Spannungspuls reißt die sich in der Pipette befindliche Membran auf. Der elektrische Zugangswiderstand in dieser sog. „whole cell“-Konfiguration wird vom Pipettenwiderstand dominiert und beträgt typischerweise nur wenige $M\Omega$. Zusätzlich kommt es durch Diffusion zu einem Austausch der Intrazellulärlösung gegen die Pipettenlösung, die somit die Zusammensetzung der „neuen“ Intrazellulärlösung bestimmt.
- Durch Applikation eines Porenbildners wie z.B. Nystatin in der Pipette wird das eingesaugte Membranstück durchlöchert. Diese „perforated patch“-Methode vermeidet das Auswaschen cytosolischer Substanzen, ist jedoch mit einem höheren Zugangswiderstand verbunden.

Patchen vs. Stechen

Alternativ zur Patch-Clamp Technik werden zur Kontaktierung des Zellinneren auch Anstechelektroden verwendet. Die Glaspipetten besitzen in diesem Fall eine erheblich kleinere Öffnung, sind mit hochkonzentrierter KCl-Lösung befüllt und weisen typische Widerstände im Bereich von $30 \dots 100 M\Omega$ auf. Der Abdichtwiderstand nach Penetration der Zelle beträgt nur wenige $100 M\Omega$, der diffusive Austausch zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem geschieht verhältnismäßig langsam.

Aus o.g. Gründen werden Anstechpipetten nur für große Zellen verwendet, bei denen die Leckleitfähigkeit der Membran größer als die der Abdichtung ist. Dort bilden sie eine Alternative zur „perforated patch“-Methode, insbesondere dann, wenn die Sealbildung Probleme bereitet.

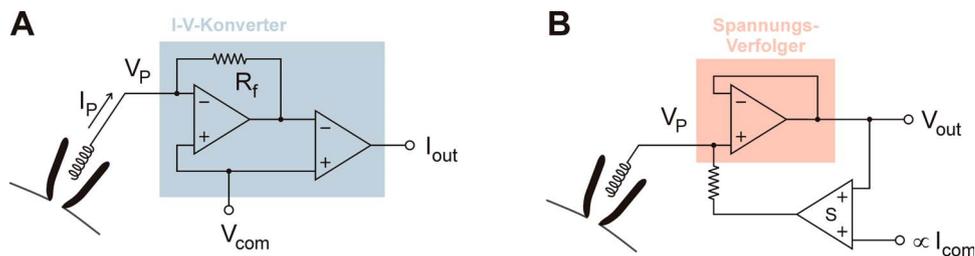


Abbildung 3.15: Funktionsprinzip der Messmethoden. **A** Voltage-Clamp. Ein Operationsverstärker regelt die Pipettenspannung V_P über den Feedbackwiderstand R_f auf den vorgegebenen Wert V_{com} , der Pipettenstrom wird mittels eines Strom-Spannungs-Wandlers detektiert. **B** Current-Clamp. Der Operationsverstärker stabilisiert die gemessene Spannung, über den Spannungsaddierer (S) und einen Widerstand kann ein Strom I_{com} eingespeist werden.

3.5.2 Voltage-Clamp

Die spannungsabhängigen Membraneigenschaften, insbesondere die Dynamik der Ionenkanäle, werden im sog. Voltage-Clamp („Spannungsklammer“) untersucht. Dabei wird der intrazellulären Spannung ein bestimmter Verlauf aufgezwungen und der resultierende Membranstrom gemessen.

Funktionsweise

Die grundlegenden Bestandteile der Spannungsregelung sind in Abbildung 3.15 A dargestellt. Weicht die Pipettenspannung V_P von der Sollspannung V_{com} ab, regelt der Operationsverstärker seine Ausgangsspannung so nach, dass der Ausgleichsstrom über den Feedbackwiderstand R_f in die Pipette den Sollwert wieder herstellt. Der dafür benötigte Strom spiegelt den Membranstrom wider, der der ursprünglichen Spannungsänderung zugrunde lag. Er kann mittels der zu ihm direkt proportionalen Spannungsdifferenz zwischen OPV-Ausgang und Sollwert $\Delta V = R_f I_P$ gemessen werden.

Die Kontrolle der intrazellulären Spannung ist unvollständig aufgrund des Zugangswiderstandes der Pipette, der zweierlei Auswirkungen hat: (i) das Aufladen der Membrankapazität wird verlangsamt; (ii) die intrazelluläre Spannung weicht um den Wert $\Delta V = R_P I_P$ von der geregelten Spannung ab. Zur Kompensation beider Effekte wird ein zum gemessenen Strom proportionales Spannungssignal zur Sollspannung addiert. Durch diesen positiven Feedback kann das System instabil werden und oszillieren, weshalb die Kompensation niemals vollständig sein kann.

Eine weitere Beschleunigung des Aufladens der Membrankapazität bei Spannungsstufen wird erzielt, indem über einen zusätzlichen Kondensator geeignete Stromtransienten direkt in die Pipette injiziert werden. Diese Prozedur wird „Supercharging“ genannt und entlastet den Feedbackloop, da der zusätzliche Strom an diesem vorbei fließt. Dementsprechend muss er jedoch im Nachhinein zum gemessenen Signal hinzu addiert werden.

Abgleichprozedur

Für die Voltage-Clamp Messungen in dieser Arbeit kamen zwei Patchverstärker zum Einsatz: (i) der EPC8 bei den Messungen an Schneckenzellen und (ii) dessen Nachfolger,

der EPC10, bei Messungen an HEK- und Rattenzellen. Die Vorgehensweise bei beiden Verstärkern ist weitestgehend analog und wie im Folgenden beschrieben.

Patchpipetten werden mit einem Puller in drei Schritten aus Borosilikat-Glaskapillaren mit 1.5mm Außendurchmesser gezogen und anschließend feuerpoliert. Für die Messungen mit dem EPC8 erfolgte eine Beschichtung mit Sylgard zur Verminderung der Kapazität. Die Pipettenwiderstände lagen im Bereich 1.7...2.2M Ω für Schneckenzellen und zwischen 2.5...3.2M Ω für Säugetierzellen, die Kapazität der unbeschichteten Pipetten bei 8–10pF und die der beschichteten um die 5pF.

Bei $V_{\text{com}} = 0$ wird die Pipette ins Bad eingebracht, der Offset der Liquid-Junction Potenziale abgeglichen und die Pipette der Zelle angenähert. Nach dem Abstellen des Pipettenüberdrucks wird eine Spannung $V_{\text{com}} = -80\text{mV}$ vorgegeben und das Anwachsen des Abdichtwiderstandes durch kurze 2mV-Spannungspulse beobachtet. Bei Schneckenzellen wurde die Sealbildung durch einen konstanten Unterdruck (ca. 20cm Wassersäule) unterstützt und damit Widerstände bis zu 1.5G Ω erreicht. Bei den Säugetierzellen war die Sealbildung ein spontaner Alles-oder-nichts-Prozess und ergab typische Widerstände von 3–5 Gigaohm bei Rattenneuronen bzw. 4–10 Gigaohm bei HEK-Zellen.

Im „cell attached“-Modus wird die Pipettenkapazität und -zeitkonstante abgeglichen. Nach dem Durchbruch durch kurzes Saugen werden bei Pulsen von -10mV Amplitude die Membrankapazität und der Zugangswiderstand durch Elimination der Transienten ermittelt und letzterer zu etwa 70% beim EPC8 bzw. zu 80% beim EPC10 durch Aktivierung des Feedbackloops kompensiert. Die Ströme werden bei 8.4kHz für HEK-Zellen und Rattenneurone bzw. bei 3kHz für Schneckenneurone gefiltert.

3.5.3 Current-Clamp

Im Current-Clamp wird ein definierter Strom durch die Pipette in die Zelle injiziert und die Antwort der intrazellulären Spannung gemessen. Der wichtigste Spezialfall ist $I_P = 0$, bei dem das ungestörte Zellverhalten beobachtet wird.

Funktionsweise

Das Funktionsprinzip der Spannungsdetektion und Strominjektion ist in Abbildung 3.15 B dargestellt. Der Eingangs-OPV stabilisiert die gemessene Pipettenspannung. Über einen Spannungsaddierer und einen Widerstand kann am Operationsverstärker vorbei Strom in die Zelle injiziert werden.

Fließt kein Strom, so wird die intrazelluläre Spannung fehlerfrei gemessen. Bei Stromfluss sorgt der Zugangswiderstand der Pipette für einen Spannungsabfall; ist der Widerstandswert jedoch bekannt, so kann die gemessene Spannung problemlos korrigiert werden.

Verstärker

Für die Messungen kamen drei Verstärker zum Einsatz: (i) der Brückenverstärker BA-1S, (ii) der Patch-Clamp-Verstärker EPC8 und (iii) der EPC10. In ihrer Funktionsweise gibt es einen eklatanten Unterschied: während die Verstärker (i) und (iii) wie oben beschrieben arbeiten, „simuliert“ der EPC8 nur einen Current-Clamp Betrieb. Tatsächlich wird der

Ausgang des I-V-Konverters (Abb. 3.15 A) nur mit dem gewünschten Stromsignal verglichen und die Differenz über den Sollspannungseingang wieder eingespeist [Magi96]. Diese Schaltung stellt für die Zelle eine zusätzliche kapazitive Last dar, so dass das Zellverhalten vom Verstärker beeinflusst wird und mit Abweichungen gerechnet werden muss [Magi98]. Dieses Problem wurde inzwischen von den Herstellern ernst genommen, so dass aktuelle Verstärker meist beide Schaltungen in ihrer Headstage integriert haben.

Der Brückenverstärker wurde in Verbindung mit Anstechpipetten für die Messungen an Schneckenzellen unter physiologischen Bedingungen genutzt. Die Pipetten werden aus Borosilikat-Glaskapillaren in einem einzigen Schritt gezogen und von hinten mit gesättigter K_2SO_4 -Lösung befüllt. Nach Eintauchen ins Bad wird der Spannungsoffset behoben, Pipettenkapazität und Pipettenwiderstand, der etwa $35 \dots 60 M\Omega$ beträgt, bei Strompulsen von $0.1 nA$ abgeglichen und die Pipette der Zelle angenähert. Der Durchbruch erfolgt vorzugsweise mit einem Spannungs-Buzz oder behelfsweise mechanisch. Die intrazelluläre Spannung wird durch einen geeigneten, konstanten Haltestrom in etwa auf das Ruhepotential der Zellen eingestellt.

Die Patch-Clamp-Verstärker wurden mit Patch-Pipetten betrieben und die Zellen im Voltage-Clamp, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, kontaktiert. Das Umschalten in den Current-Clamp geschieht direkt am Verstärker. Vorsicht ist beim EPC8 geboten, der sich vor dem Moduswechsel im mittleren Gainbereich befinden muss. Beim EPC10 sollte der Wert der Pipettenkapazität nach dem Umschalten von Hand auf Null gesetzt werden, da sonst eine Verzerrung der gemessenen Spannung während der extrazellulären Stimulation beobachtet wird.

3.5.4 Messungen

Abbildung 3.16 zeigt Patch-Clamp-Messungen im Voltage-Clamp und im Current-Clamp für alle drei verwendeten Zellsysteme.

Schneckenneurone

Die Messungen werden in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung NS-Ca(-) gemacht. Die in Abbildung 3.16 A verwendete Zelle hatte eine Kapazität von $150 pF$, der Zugangswiderstand von $2.8 M\Omega$ war zu 80% abgeglichen.

Im Voltage-Clamp Modus werden ausgehend von einer Haltespannung $V_M = -80 mV$ depolarisierende Spannungsstufen von $15 ms$ Dauer angelegt. Der Ionenstrom nach Subtraktion mit einem P/4-Protokoll [Arms77] besteht aus transienten Einwärtsströmen von maximal $10 nA$ und anhaltenden Auswärtsströmen von ähnlicher Größe (*links*).

Eine Auftragung der Stromminima gegen die Membranspannung zeigt die für Natriumkanäle typische Glockenform mit einer extrapolierten Umkehrspannung von etwa $+60 mV$ (*Mitte*). Der Auswärtsstrom am Ende des Pulses weist zwei Komponenten auf: einen bei niedrigen Spannungen unterhalb von $-40 mV$ aktivierenden schwachen Anteil, und einen dominanten, stärker verzögerten Ausstrom oberhalb von $-30 mV$. Diese Ströme entsprechen den LVA- und den Delayed-Kalium Strömen, die typisch für *L. stagnalis* sind (siehe Kapitel 2.2.2). Bei einer Haltespannung von $-60 mV$ verschwinden die LVA-Kaliumströme gänzlich.

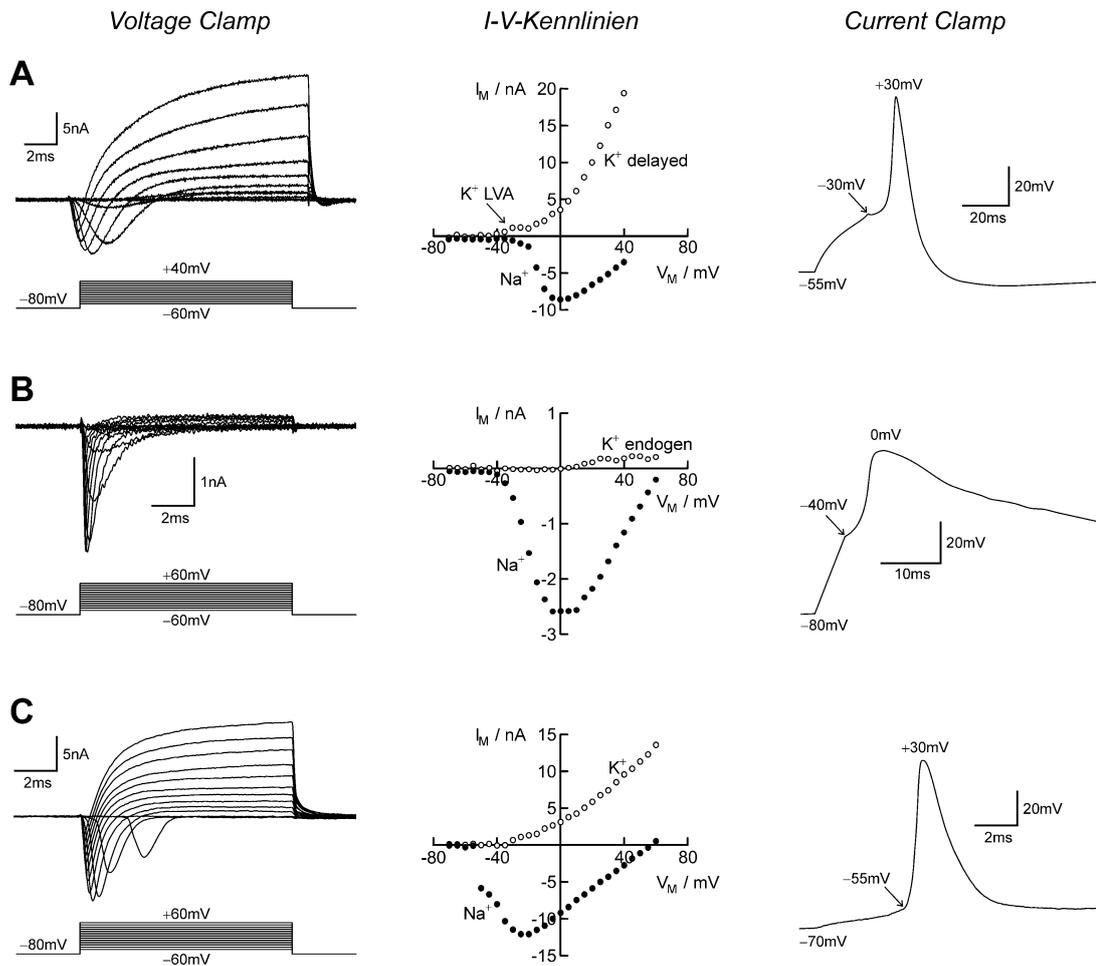


Abbildung 3.16: Elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen für **A** Schneckenneuron, **B** HEK-Zellen mit $\text{Na}_V 1.4$ und **C** Rattenneuron. links: Ionenströme im Voltage-Clamp mit jeweiligem Spannungsprotokoll. Mitte: zugehörige Strom-Spannungs-Kennlinien der Natrium-Peakströme (●) und der Kaliumströme (○) am Ende des Pulses. rechts: Aktionspotential im Current-Clamp mit Werten für Ruhe-, Schwellen- und Peakspannung.

Die Ruhespannung im Current-Clamp (*rechts*) schwankt um -55mV . Durch eine pulsartige Strominjektion wird oberhalb des Schwellwertes von ca. -30mV ein AP ausgelöst. Sein Maximum erreicht $+30\text{mV}$, seine Halbwertsbreite beträgt ca. 10ms . Aufgrund der geblockten Ca^{2+} -Kanäle fehlt die für A-Cluster-Neurone typische Calcium-Schulter.

HEK-Zellen

Die Messungen werden unter Standardbedingungen (ICM und ECM) vergleichbar zu den Rattenexperimenten durchgeführt. Die in Abb. 3.16 B dargestellten Ergebnisse gehören zu einer stereotypischen Zelle mit einer Membrankapazität von 11.9pF und einem Gesamtzellwiderstand von ca. $5\text{G}\Omega$. Der Zugangswiderstand von $4.3\text{M}\Omega$ war in diesem Fall zu 83% kompensiert.

Spannungssprünge im Voltage-Clamp rufen transiente Einwärtsströme von bis zu 3nA und vergleichsweise geringe Auswärtsströme hervor (*links*). Die Strom-Spannungs-Charakteristik der Einwärtsströme (*Mitte*) ist typisch für den Skelettmuskelkanal $\text{Na}_v1.4$ unter den gewählten Bedingungen (siehe Kapitel 2.2.3). Die bei etwa 0mV einsetzenden Auswärtsströme werden durch 20mM KF in der Pipettenlösung geblockt (nicht gezeigt) und lassen sich auf endogene Kaliumkanäle der HEK-Zellen zurückführen [Zhu98].

Stellt man die Ruhespannung im Current-Clamp auf -80mV ein und appliziert einen Strompuls, so kann das Öffnen der Natriumkanäle zu einer selbstverstärkenden Depolarisation der Zelle führen (*rechts*). Die Repolarisation erfolgt nur sehr langsam und wird von der Zeitkonstante aus Membrankapazität und Gesamtzellwiderstand, die etwa 60ms beträgt, bestimmt. Dieses „Pseudo-Aktionspotenzial“ wurde so ähnlich auch bei sogenannten synthetischen Neuronen, die durch Klonierung von Natrium- und Kaliumkanälen in CHO-Zellen entstanden, beobachtet [Hsu93]. Die Ähnlichkeit der Dynamik der ansteigenden Flanke des Pseudo-Aktionspotenzials zu der bei Rattenneuronen und die vergleichbare Zellgröße rechtfertigt die Wahl der HEK-Zellen als Modellsystem für die Stimulation von Rattenneuronen.

Rattenneurone

Die Messungen werden unter denselben Bedingungen wie bei HEK-Zellen mit den Standardlösungen ICM und ECM durchgeführt. Das in Abb. 3.16 C gemessene Neuron (20 DIV) hatte eine Membrankapazität von 22pF und einen Gesamtzellwiderstand von $91\text{M}\Omega$. Der Zugangswiderstand von $8.9\text{M}\Omega$ konnte bedingt durch die ausdifferenzierte Geometrie des Neurons nur zu 58% abgeglichen werden.

Der imperfekte Abgleich der Zelle wirkt sich auf die Dynamik der Ströme im Voltage-Clamp aus (*links*). Es ist ein scharfer Knick bei der Aktivierung des Natriumeinstroms als Ausdruck einer unzureichenden Spannungskontrolle zu sehen, der auch die Strom-Spannungs-Kennlinie im Bereich des Kanalöffnens verzerrt und nach links verschiebt (*Mitte*). Auch für die Kaliumausströme ist ein Spannungsfehler von bis zu 30mV zu erwarten, die Ströme wären unter Idealbedingungen also deutlich größer.

Das Aktionspotenzial im Current-Clamp (*rechts*) hat eine Halbwertsbreite von weniger als 2ms und einen niedrigen Schwellwert zwischen $-50 \dots -60\text{mV}$. Die Repolarisation ist meistens verhältnismäßig schwach, ohne den typischen Überschwinger des Hodgkin-Huxley-Modells.

Im Allgemeinen hängt die Amplitude der Ströme stark von der Kulturdauer ab [Para01]. Die Natriumströme steigern sich von $3 \dots 5\text{nA}$ nach 5–7 Tagen auf $7 \dots 15\text{nA}$ nach drei Wochen, und scheinen erst nach vier Wochen bei ca. $15 \dots 20\text{nA}$ zu stagnieren. Die Kaliumströme entwickeln sich entsprechend, auch die Zellkapazität nimmt stark zu. Gleichzeitig nimmt der Gesamtzellwiderstand drastisch ab, von anfänglich $0.5 \dots 1\text{G}\Omega$ auf unter 100 Megaohm; dies ist wohl der hervorstechendste Unterschied zur Elektrophysiologie von HEK-Zellen, wo er im Gigaohm-Bereich liegt.

3.6 Messaufbau

Abbildung 3.17 zeigt den Versuchsaufbau und seine Komponenten. Der Chip wird mittels einer Halterung auf dem Objektivträger eines Mikroskops befestigt. Für die DIC-Aufnahmen wird eine Digitalkamera benutzt. Der Elektrolyt wird mit der Badelektrode, die Zelle mit einer Pipette kontaktiert, die über einen elektrisch angesteuerten Mikromanipulator positioniert werden kann.

Ein handelsüblicher PC übernimmt die Ansteuerung des Funktionsgenerators und des Elektrophysiologie-Verstärkers, die über eine Messkarte im PC synchronisiert sind. Das Stimulationssignal wird über einen Spannungsaddierer (siehe Anhang A.3.1) aus den Ausgangssignalen des Funktionsgenerators und der Messkarte zusammengesetzt und an den rückseitigen Kontakt des Chips angelegt. Das Eingangssignal des Elektrophysiologie-Verstärkers wird gleichfalls von der Messkarte vorgegeben, die Datenaquisition erfolgt über ebendiese Schnittstelle.

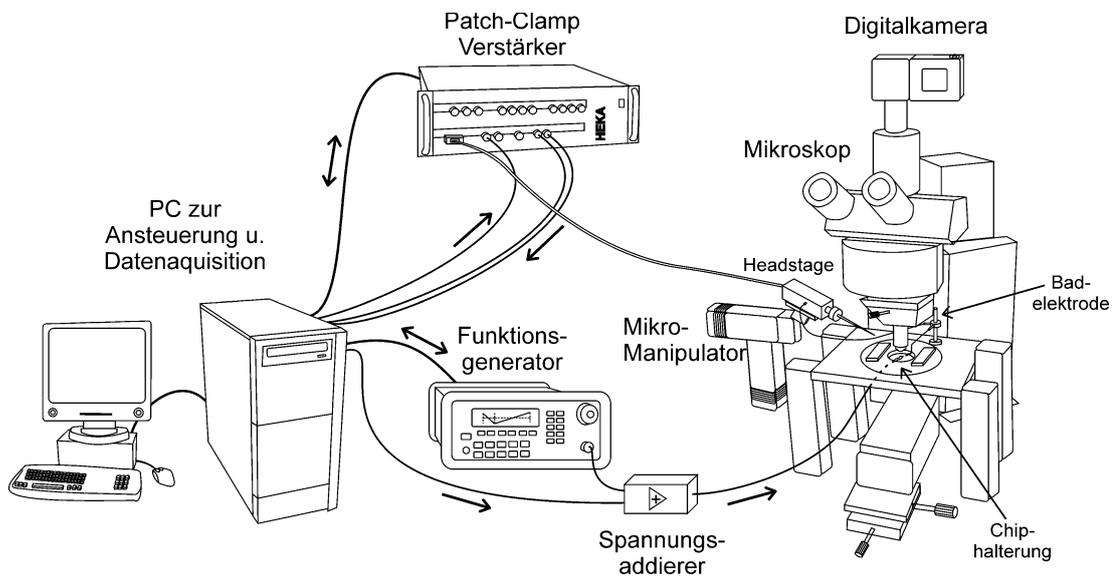


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des Messaufbaus und seiner Komponenten.

Kapitel 4

Mechanismus der Extrazellulären Stimulation

In diesem Kapitel wird der grundlegende Mechanismus der kapazitiven Stimulation einzelner Nervenzellen mithilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht. Für die Experimente werden Nervenzellen aus *Lymnaea stagnalis* und EOS-Kondensatoren mit HfO_2 verwendet, um eine ausreichende Kopplungsstärke und einen wohldefinierten Verlauf der Oxidströme zu gewährleisten.

Die Vorgehensweise wird zunächst in einem einleitenden Theorieabschnitt vorgestellt. Unter wohldefinierten Bedingungen wird dann experimentell die passive Zellpolarisation im Current-Clamp beschrieben und die Aktivierung von Ionenkanälen in der Adhäsionsmembran durch fallende Rampen im Voltage-Clamp studiert. Anschließend werden Aktionspotenziale sowohl mit ansteigenden als auch mit fallenden Rampen ausgelöst. Der Unterschied zwischen den zwei Mechanismen wird auf der Grundlage der vorherigen Abschnitte erklärt und abschließend unter physiologischen Bedingungen bestätigt.

4.1 Grundzüge der Stimulation

Das Zwei-Domänen-Modell erlaubt es, einfache Ausdrücke für die Spannungen über die adhärenzte und die freie Membran herzuleiten, wenn veränderliche Spannungen an den Kondensator angelegt werden.

4.1.1 Spannungsverlauf im Spalt

Eine veränderliche Spannung $V_S(t)$ am Kondensator bewirkt einen kapazitiven Verschiebungsstrom über das Oxid. Dieser Strom wird vom kapazitiven Strom über die Membran und dem Stromfluss entlang des Spaltes, der dort eine lokale Spannungsänderung bewirkt, ausgeglichen.

Wir setzen im Folgenden die Spannung des Elektrolyten $V_E = 0$ und vernachlässigen die Leitfähigkeit der Zellmembran $g_M^i = 0$. Bei konstanter Intrazellulärspannung $V_M = \text{const.}$ erhalten wir für die Strombilanz im Spalt

$$(c_M + c_S) \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J = c_S \frac{dV_S}{dt}. \quad (4.1)$$

Spannungsstufe

Wird eine Spannungsstufe der Höhe ΔV_S^0 zum Zeitpunkt $t = 0$ angelegt, so wird ein kapazitiver Ladungspuls $c_M \Delta V_S^0 \delta(t)$ in den Spalt injiziert. Der kapazitive Spannungsteiler aus Oxid und Membran führt zu einer extrazellulären Spannung $V_J^0 = \Delta V_S^0 c_S / (c_M + c_S)$, die mit der Zeitkonstante τ_J des Spaltes gemäß Gleichung 4.2 zerfällt.

$$V_J(t) = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_M + c_S} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right), \quad \tau_J = \frac{c_M + c_S}{g_J^{(5.78\pi)}}. \quad (4.2)$$

Spannungsrampe

Legt man eine stationäre Rampe mit der Steigung $dV_S/dt = \Delta V_S/\Delta t_S$ an den Kondensator an, so stellt sich im Gleichgewicht eine stationäre Spaltspannung $V_J^\infty = c_S/g_J \cdot \Delta V_S/\Delta t_S$ ein. Beginnt die Rampe zum Zeitpunkt $t = 0$, so lautet der Spannungsverlauf

$$V_J(t) = \frac{c_S}{g_J} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right)\right] \quad (4.3)$$

mit der Zeitkonstante des Spaltes wie oben. Endet die Rampe zum Zeitpunkt $t = 0$, so zerfällt die Spannung gemäß

$$V_J(t) = \frac{c_S}{g_J} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right). \quad (4.4)$$

Supercharging

Man kann das Auf- und Entladen der Spaltspannung während einer Spannungsrampe beschleunigen, indem man zu Beginn und Ende der Rampe mittels eines Strompulses Ladung injiziert [Ulbr03]. Wählt man den Strompuls geeignet, lässt sich der stationäre Wert sogar instantan erreichen. Um die nötige Stufenhöhe zu ermitteln, setzen wir den Ansatz $V_J(t) = V_J^\infty \Theta(t)$ mit der Heaviside-Funktion $\Theta(t)$ in Gl. 4.1 ein, integrieren und erhalten nach Auflösen nach der Sprunghöhe

$$\Delta V_S^0 = \pm \frac{c_M + c_S}{g_J^{(8\pi)}} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S}. \quad (4.5)$$

Die optimale Sprunghöhe ist proportional zur Rampensteilheit mit der modifizierten Zeitkonstante des Spaltes als Proportionalitätsfaktor (vgl. Kapitel 2.3.4). Durch die Anpassung der Stufenhöhe an die Rampe kann man einen rechteckigen Verlauf der extrazellulären Spannung im Spalt für beliebige Rampensteilheiten erreichen.

Unterschied zum Current-Clamp

Im Current-Clamp sind die Kapazitäten der unteren Membran c_M und die der oberen $c_M(1 - \alpha_{JM})/\alpha_{JM}$ (siehe Gl. 2.12) in Serie geschaltet und die effektive Membrankapazität beträgt $\tilde{c}_M = (1 - \alpha_{JM})c_M$. Damit ergibt sich für die Strombilanz im Current-Clamp

$$(\tilde{c}_M + c_S) \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J = c_S \frac{dV_S}{dt}. \quad (4.6)$$

Die Behandlung des Current-Clamp verläuft also analog zum Voltage-Clamp. Die gewonnenen Ergebnisse können durch die Substitution $c_M \rightarrow \tilde{c}_M$ auf den Current-Clamp übertragen werden.

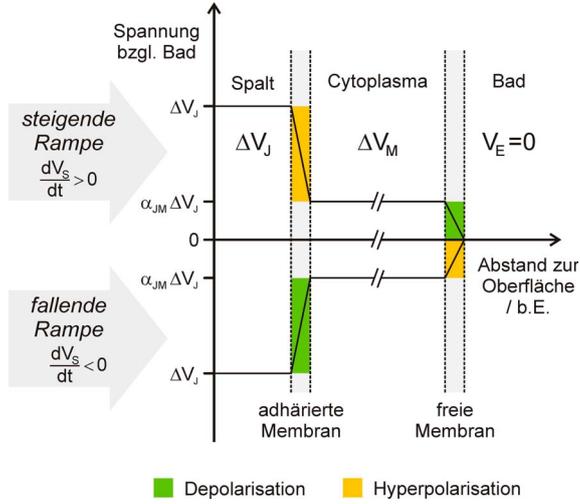


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Polarisation der beiden Membrandomänen. Die Transmembranspannungen unterscheiden sich gemäß dem Flächenverhältnis α_{JM} in ihrer Amplitude und aufgrund ihrer Definition im Vorzeichen. Steigende Rampen depolarisieren die freie, fallende Rampen die adhären Membran.

4.1.2 Transmembranspannungen und -ströme

In diesem Abschnitt wird betrachtet, wie sich der Verlauf $V_J(t)$ der extrazellulären Spannung im Spalt den beiden Membrandomänen aufprägt. Diese passive Polarisation, die durch kapazitive Ströme vermittelt wird, ist die Grundlage jeder aktiven Zellantwort auf die extrazelluläre Stimulation.

Passives Verhalten im Current-Clamp

Im Current-Clamp sind die Kapazitäten der oberen und unteren Membran in Reihe geschaltet, sie bilden einen Spannungsteiler zwischen der Spaltspannung und dem Bad. Die Transmembranspannungen unterscheiden sich in ihrem Vorzeichen und in ihrer Amplitude gemäß Gleichungen 4.7 und 4.8.

$$\frac{dV_{FM}}{dt} = \alpha_{JM} \frac{dV_J}{dt}, \quad \Delta V_{FM} = \alpha_{JM} V_J \quad (4.7)$$

$$\frac{dV_{JM}}{dt} = -(1 - \alpha_{JM}) \frac{dV_J}{dt}, \quad \Delta V_{JM} = -(1 - \alpha_{JM}) V_J \quad (4.8)$$

Der größere Teil der Spannung fällt mit umgekehrtem Vorzeichen über die kleinere Adhäsionsmembran ab. Die Spannung über die freie Membran folgt dem Verlauf der Spaltspannung, ihre Amplitude wird bestimmt durch das Flächenverhältnis α_{JM} von unterer zu totaler Membran. Abbildung 4.1 veranschaulicht diesen Sachverhalt.

Beginn und Ende einer Rampe (Gln. 4.3 und 4.4) werden von kapazitiven Stromtransienten über die Adhäsionsmembran begleitet, mit negativem Vorzeichen für den Beginn und positivem für das Ende.

$$i_{JM}^{cap}(t) = \mp \tilde{c}_M \frac{c_S}{\tilde{c}_M + c_S} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \exp\left(-\frac{t}{\tilde{\tau}_J}\right) \quad (4.9)$$

Beispiel: Bei einer ansteigenden Rampe erzeugt der Einwärtsstrom $i_{JM} < 0$ zum Rampenstart eine Depolarisation der freien Membran, die nach dem Ende der Rampe aufgrund des Auswärtsstroms $i_{JM} > 0$ wieder verschwindet.

Passives Verhalten im Voltage-Clamp

Im Voltage-Clamp ist die intrazelluläre Spannung konstant. Somit ändert sich auch die Spannung über die freie Membran nicht, siehe Gleichung 4.10. Die Änderung der Spannung über die adhärenzte Membran folgt exakt der Spaltspannung, jedoch aufgrund der Definition $V_{JM} = (V_M - V_J)$ mit umgekehrtem Vorzeichen (Gl. 4.11).

$$\frac{dV_{FM}}{dt} = 0, \quad \Delta V_{FM} = 0 \quad (4.10)$$

$$\frac{dV_{JM}}{dt} = -\frac{dV_J}{dt}, \quad \Delta V_{JM} = -V_J \quad (4.11)$$

Auch in diesem Fall fließen zu Beginn und Ende der Rampe kapazitive Ströme über die Adhäsionsmembran

$$i_{JM}^{cap}(t) = \mp c_M \frac{c_S}{c_M + c_S} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right), \quad (4.12)$$

die als Pipettenströme gemessen werden und mit einer Hyper-/Depolarisation für die Dauer der Rampe einhergehen.

4.1.3 Aktive Antwort mit Ionenkanälen

Ionenkanäle sind im Ruhezustand der Zelle weitestgehend geschlossen, die Membranleitfähigkeit daher klein. Die primäre Antwort der Zelle ist durch ihre passive Polarisation bestimmt, die im vergangenen Abschnitt vorgestellt wurde. Im Folgenden wird diskutiert, wie durch die passive Polarisation Ionenkanäle aktiviert werden.

Aktives Verhalten im Voltage-Clamp

Eine fallende Rampe hat einen depolarisierenden Effekt $\Delta V_{JM} > 0$ auf die Adhäsionsmembran. Dieser ist eventuell geeignet, Ionenkanäle in diesem Membranbereich zu aktivieren, während die Ionenkanäle der oberen Membran bei der Spannung $V_M = \text{const.}$ in ihrer Deaktivierung verharren.

Der Gesamtstrom durch die adhärenzte Membran hat einen kapazitiven und einen ionischen Anteil mit

$$i_{JM} = c_M \frac{dV_{JM}}{dt} + \sum_i g_{JM}^i \cdot (V_{JM} - V_0^i). \quad (4.13)$$

Der kapazitive Strom hat für eine Rampe die in Gleichung 4.12 angegebene Form. Nach Subtraktion vom Gesamtstrom erhält man den reinen Ionenstrom durch die untere Membran.

$$i_{JM}^{ion} = \sum_i g_{JM}^i(V_{JM}) \cdot [V_{JM} - V_0^i] \quad (4.14)$$

Ist dieser Ionenstrom sehr viel kleiner als der Leckstrom $g_J V_J$ entlang des Spaltes, so hat er nur einen geringen Einfluss auf die Transmembranspannung V_{JM} . In diesem Fall wird ihre Dynamik allein von der passiven Antwort auf den Stimulus (Gl. 4.11) bestimmt, die

man durch eine geeignete Wahl der Signalform nach Wunsch beeinflussen kann. Man kann in diesem Zusammenhang von einer Art „extrazellulärem Voltage-Clamp“ sprechen.

Ein Vergleich mit dem Ionenstrom bei klassischer, intrazellulärer Depolarisation ist nahelegend und wird durch die folgenden beiden Gleichungen beschrieben.

$$I_{JM}^{ion} = A_J \sum_i g_{JM}^i(V_{JM}) \cdot [V_{JM} - V_0^i] \quad (4.15)$$

$$I_M^{ion} = A_M \sum_i g_M^i(V_M) \cdot [V_M - V_0^i] \quad (4.16)$$

Die Ströme durch die adhärierte (Gl. 4.15) und durch die gesamte Membran (Gl. 4.16) sind proportional zueinander mit dem Faktor $\alpha_{JM} = A_J/A_M$, wenn die durch eine Rampe hervorgerufene Depolarisation ΔV_{JM} der intrazellulären Depolarisation ΔV_M gleich ist, vorausgesetzt die spannungsabhängigen Leitfähigkeiten sind identisch. Diese Proportionalität wird in den späteren Messungen zur Überprüfung der Eichung der extrazellulären Spannung verwendet.

Aktives Verhalten im Current-Clamp

Fallende Rampen haben eine stark depolarisierende Wirkung auf die adhärierte Membran, während ansteigende Rampen eine geringe depolarisierende Wirkung auf die obere Membran ausüben. Prinzipiell können beide Arten der Stimulation zu einem Aktionspotenzial führen.

Bei einer ansteigenden Rampe wird die Adhäsionsmembran stark hyperpolarisiert, ohne dass Ionenkanäle dort öffnen. Sie wirkt wie ein passives Kopplungselement, das die Injektion kapazitiven Stroms (Gl. 4.9) zu Beginn und Ende der Rampe vermittelt. Die freie Membran reagiert auf diese Strominjektion gemäß Gleichung 4.17. Ein Aktionspotenzial wird ausgelöst, wenn der depolarisierende Einstrom zu Beginn der Rampe einen gewissen Schwellwert ΔV_M überschreitet.

$$(A_M - A_J) \cdot \left[c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i) \right] \approx -A_J i_{JM}^{cap}(t) \quad (4.17)$$

Es wird eine relativ große Steilheit der Rampe benötigt, da der kapazitive Injektionsstrom mit dem Flächenverhältnis $A_J/(A_M - A_J)$ von adhärierter zu freier Membran gewichtet ist.

Grundsätzlich anders gestaltet sich die Stimulation mit einer fallenden Rampe. Die Depolarisation der adhärierten Membran führt zu einem Öffnen der Ionenkanäle, während der hyperpolarisierten freien Membran die Rolle einer passiven Last zukommt. Die erste Phase der Stimulation wird durch Gleichung 4.18 beschrieben.

$$(A_M - A_J) \cdot c_M \frac{dV_M}{dt} + A_J \sum_i g_{JM}^i \cdot (V_{JM} - V_0^i) \approx -A_J i_{JM}^{cap}(t) \quad (4.18)$$

Die große Kapazität der freien Membran unterdrückt eventuell die Dynamik eines lokalen Aktionspotenzials in der kleinen aktivierten Adhäsionsmembran. Deshalb muss der Stimulationsmechanismus in zwei Schritten erfolgen: die primäre Depolarisation der adhärierten Membran erzeugt einen ionischen Einstrom. In einer zweiten Phase depolarisiert dieser die

gesamte Zelle, so dass die Hyperpolarisation der freien Membran überwunden und dort ein Aktionspotenzial ausgelöst wird. Das Verhalten wird durch Gleichung 4.19 beschrieben, in der die primäre Hyperpolarisation der freien Membran vernachlässigt ist und der Ionenstrom dem des Voltage-Clamp gemäß Gleichung 4.14 entspricht.

$$(A_M - A_J) \cdot \left[c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i) \right] \approx -A_J i_{JM}^{ion}(t) \quad (4.19)$$

Die Adhäsionsmembran spielt in diesem Fall die Rolle eines aktiven Kopplungselements, das ionischen Strom während der gesamten Dauer der Rampe injeziert. Die Aktivierung der Ionenkanäle in der unteren Membran erfolgt bereits bei einer verhältnismäßig geringen Rampensteilheit. Da der Einstrom wiederum mit dem Flächenverhältnis $A_J/(A_M - A_J)$ gewichtet ist, kann es sich aber als schwierig erweisen, die Schwelle für ein AP zu erreichen.

4.2 Passive Polarisation

In diesem Abschnitt wird die Antwort einer Nervenzelle auf kapazitive Stimuli unter Bedingungen studiert, bei denen keine Ionenkanäle aktiviert werden. Im Current-Clamp Modus des Whole-Cell Patch-Clamp wird die Änderung der intrazellulären Spannung ΔV_M beobachtet, die der Polarisation der freien Membran entspricht. Im Voltage-Clamp Modus wird der kapazitive Strom I_{JM} durch die adhärenierte Membran gemessen. Die Ergebnisse in diesem Abschnitt sind für ein Neuron mit einer Adhäsionsfläche von etwa $2500 \mu\text{m}^2$ gezeigt.

4.2.1 Passive Antwort im Current-Clamp

Wir stellen die intrazelluläre Spannung durch geeignete Strominjektion auf ca. $V_M = -95\text{mV}$ ein und legen eine ansteigende Rampe mit einer Steilheit von 100mV/ms und einer Dauer von 10ms an den Kondensator an. Die intrazelluläre Spannung steigt innerhalb von ca. 2ms um etwa 7mV an und fällt nach der Rampe innerhalb von 2ms wieder ab, wie in Abb. 4.2 (unterste Kurve) gezeigt. Der langsame Anstieg im Laufe der Rampe ist auf die Zunahme des kapazitiven Stroms (Abb. 3.4 A) aufgrund der veränderlichen Chipkapazität zurückzuführen.

Vergleich mit Zwei-Domänen-Modell

Die Dynamik des Anstieg und Abfalls der intrazellulären Spannung zu Beginn und Ende der Rampe ist langsamer als die des kapazitiven Stroms (Abb. 3.4 A). Sie wird durch das Auf- und Entladen des Zell-Chip-Kontaktes bestimmt, das im Zwei-Domänen-Modell durch einen exponentiellen Verlauf gemäß den Gln. 4.3 und 4.4 beschrieben wird. Aus einem Fit der Amplitude und des Abfalls der gemessenen Relaxationskurve erhält man die Amplitude $\Delta V_M^\infty \approx 7\text{mV}$ und die Zeitkonstante $\tilde{\tau}_J \approx 0.8\text{ms}$. Mithilfe der Beziehungen

$$\tilde{\tau}_J = \frac{\tilde{c}_M + c_S}{g_J^{(5.78\pi)}} \quad \text{und} \quad \Delta V_M^\infty = \alpha_{JM} \frac{c_S}{g_J^{(8\pi)}} \cdot \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \quad (4.20)$$

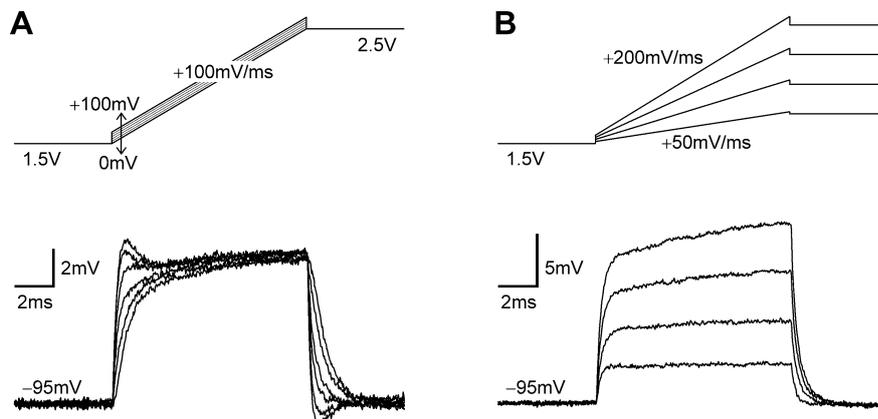


Abbildung 4.2: Passive Polarisation im Current-Clamp ausgehend von einer intrazellulären Spannung von -95mV (untere Reihe) für Pulse der Chipspannung (oben). **A** Ansteigende Rampen mit einer Steilheit von 100mV/ms und überlagerten Spannungsstufen von $0,20, \dots, 100\text{mV}$. **B** Spannungsrampen mit Steilheiten von $50, 100, 150, 200\text{mV/ms}$ und angepassten Stufenhöhen.

und der Werte $c_S = 1.2\mu\text{F/cm}^2$ und $c_M = 1\mu\text{F/cm}^2$ kann man das Flächenverhältnis α_{JM} und die Spaltleitfähigkeit g_J bestimmen. Dabei müssen die unterschiedlichen Geometrieparameter für stationäre Bedingungen $\eta_J = 8\pi$ und Relaxation $\eta_J = 5.78\pi$ in der Spaltleitfähigkeit wie angedeutet berücksichtigt werden (vgl. Kapitel 2.3.4). Man erhält ein Flächenverhältnis von $\alpha_{JM} = 0.15$ und eine spezifische Spaltleitfähigkeit von $g_J^{(8\pi)} = 2.6\text{mS/cm}^2$.

Flächenverhältnis

Geht man von einer idealisierten Adhäsionsgeometrie aus, bei der die runde Adhäsionsfläche des Neurons denselben Radius a_J wie der ursprünglich kugelförmige Zellkörper besitzt, so erwartet man gemäß dem Verhältnis der Adhäsionsfläche $A_J = a_J^2\pi$ zur Oberfläche der Zelle $A_M = 4a_J^2\pi$ einen Wert $\alpha_{JM} = 0.25$. Der aus der Messung für diese spezielle Zelle ermittelte Wert α_{JM} ist deutlich niedriger; vor dem Hintergrund weiterer Messungen, bei denen das Flächenverhältnis in etwa den Erwartungen entsprach, ist dies als eine Ausnahme anzusehen.

Das Flächenverhältnis α_{JM} bestimmt die Aufteilung der Spaltspannung V_J auf die adhärenierte und die freie Domäne der Zellmembran (vgl. Abb. 4.1). Aus der beobachteten Depolarisation $\Delta V_M^\infty \approx 7\text{mV}$ der freien Membran schließt man auf eine Spaltspannung $V_J^\infty = \alpha_{JM}^{-1} \Delta V_M^\infty$ von $+47\text{mV}$. Der größte Teil der Spaltspannung fällt als Hyperpolarisation $\Delta V_{JM} = (1 - \alpha_{JM})V_J$ über die adhärenierte Membran ab, in diesem Fall beträgt die Hyperpolarisation -40mV .

Spaltleitfähigkeit

Die spezifische Spaltleitfähigkeit ist ein Maß für die Kopplungsstärke zwischen Zelle und Substrat. Sie bestimmt gemäß Gleichung 4.3 den stationären Wert der Spaltspannung für einen bestimmten spezifischen Elektrodenstrom $i_S = c_S \Delta V_S / \Delta t_S$. Ein für Schnecken-neurone typischer Wert im Bereich von nur wenigen mS/cm^2 ermöglicht zusammen mit

den optimierten EOS-Kondensatoren die Aufrechterhaltung einer extrazellulären Spannung von z.B. 100mV über einen ausgedehnten Zeitraum von mehr als 10ms. Nachdem die Spaltleitfähigkeit direkt von der Adhäsionsfläche abhängt, ist dies für kleine Zellen wie beispielsweise Rattenneurone aufgrund der um Größenordnungen geringeren Kopplungsstärke nicht möglich.

Die spezifische Spaltleitfähigkeit $g_J = \eta_J / (A_J r_J)$ erlaubt die Bestimmung des Schichtwiderstandes $r_J = \rho_E / d_J$ des Zell-Chip-Kontaktes. Aus dem Wert $g_J^{(8\pi)} = 2.6\text{mS}/\text{cm}^2$ und der aus einem DIC-Bild abgeschätzten Fläche von $A_J = 2500\mu\text{m}^2$ erhält man $r_J = 385\text{M}\Omega/\square$. Dieser Wert ist $5\times$ größer als der erwartete Wert $r_J = 75\text{M}\Omega/\square$, den man aus dem Elektrolytwiderstand $\rho_E = 164\Omega\text{cm}$ und dem Abstand $d_J = 22\text{nm}$ aus FLIC-Messungen (siehe Kapitel 3.3.2) errechnet.

Die beobachtete Diskrepanz wird durch die Ergebnisse aus Kapitel 3.4.1, die eine Erhöhung des Schichtwiderstandes um den Faktor 2–3 bei Messungen des Abdichtungsrauschens ergaben, in ihrer Tendenz bestätigt. Es sei angemerkt, dass die Berechnung der spezifischen Spaltleitfähigkeit sehr sensibel auf kleine Änderungen der Zeitkonstante $\tilde{\tau}_J$ reagiert. Somit stellt der ermittelte Wert für r_J nur eine grobe Abschätzung für den Schichtwiderstand dar, der sich verlässlicher durch die in Kapitel 3.4 beschriebenen Verfahren bestimmen lässt.

4.2.2 Supercharging

Die extra- und intrazellulären Spannungen stellen sich mit der Zeitkonstante des Zell-Chip-Kontaktes ein. Der langsame Anstieg und Abfall lässt sich durch überlagerte Spannungsstufen beschleunigen, die instantan den Zell-Chip-Kontakt auf- und entladen. Die optimale Amplitude der Spannungsstufen ΔV_S^0 skaliert mit der Steilheit der Rampe gemäß der Beziehung $\Delta V_S^0 = \pm \tilde{\tau}_J \Delta V_S / \Delta t_S$ (vgl. Gl. 4.5).

Abbildung 3.4 A zeigt Current-Clamp Experimente für Rampen mit einheitlicher Steigung und Dauer mit überlagerten Spannungsstufen $\Delta V_S^0 = \pm 0, 20, \dots, 100\text{mV}$. Mit größer werdender Stufenhöhe wird das Auf- und Entladen zunehmend beschleunigt. Für eine Stufenhöhe von $\Delta V_S^0 = \pm 60\text{mV}$ spiegelt die intrazelluläre Spannung den Zeitverlauf des kapazitiven Stroms wider (vgl. Abb. 3.4 A). Dieses Optimum entspricht einer Zeitkonstante von $\tilde{\tau}_J = 0.6\text{ms}$.

Variiert man die Steilheit der Rampe im Bereich $50 \dots 200\text{mV}/\text{ms}$ und skaliert die Stufenhöhe $\Delta V_S^0 = \pm 0.6\text{ms} \cdot \Delta V_S / \Delta t_S$ entsprechend dem gefundenen Optimum, so erreicht man intrazelluläre Depolarisationen innerhalb Bruchteilen einer Millisekunde, wie in Abbildung 3.4 B gezeigt. Die Amplitude der Depolarisation skaliert dabei mit der Rampensteilheit entsprechend Gleichung 4.20.

Der empirisch gefundene Faktor $\tilde{\tau}_J = 0.6\text{ms}$ weicht von der Zeitkonstante der Relaxation $\tilde{\tau}_J \approx 0.8\text{ms}$ ab. Diese Abweichung ist auf die Inkonsistenz des Zwei-Domänen-Modells in der Beschreibung von stationären und transienten Störungen zurückzuführen (Kapitel 2.3.4). Erwartungsgemäß gibt das Verhältnis der unterschiedlichen Zeitkonstanten $\tilde{\tau}_J$ das Verhältnis der Geometrieparameter η_J wider, die über die spezifische Spaltleitfähigkeit in die jeweilige Zeitkonstante eingehen. Die Übereinstimmung ist mit $0.6\text{ms}/0.8\text{ms} \approx 5.78\pi/8\pi$ recht offensichtlich.

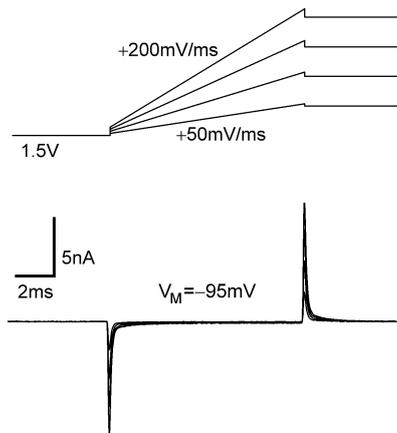


Abbildung 4.3: *Passives Zellverhalten im Voltage-Clamp: kapazitive Ströme über die adhärte Membran bei Spannungsrampen mit Steilheiten von 50,100,150,200mV/ms und angepassten Stufenhöhen.*

4.2.3 Passive Antwort im Voltage-Clamp

Bei einer konstanten intrazellulären Spannung von $V_M = -95\text{mV}$ wird der kapazitive Strom für ein Set von Spannungsrampen mit überlagerten Superchargingstufen gemessen. Da sich die Spannung über die freie Membran nicht ändert, ist der gemessene Pipettenstrom gleich dem Strom über die adhärte Membran.

Abbildung 4.3 zeigt scharfe Transienten des Membranstroms zu Beginn und Ende der Rampe. Diese entsprechen den theoretisch erwarteten Transienten (Gl. 4.12) mit einer gewissen Beschleunigung aufgrund der überlagerten Spannungsstufen. Der Beginn der ansteigenden Rampen ist mit einem Einwärts-, ihr Ende mit einem Auswärtsstrom verbunden. Während der Rampe fließt kein Strom durch die adhärte Membran. In dieser stationären Phase fließt der kapazitive Stimulationsstrom entlang des Spaltes und hält die extrazelluläre Spannung aufrecht.

4.3 Kapazitive Aktivierung der Ionenkanäle

Um die Aktivierung von Ionenkanälen zu studieren, halten wir die Zelle auf einer Spannung, bei der die Kanäle deaktiviert sind. Fallende Rampen aktivieren Ionenkanäle in der adhärten Membran, ihr Öffnen wird durch den gemessenen Pipettenstrom verfolgt. Eine analoge Studie der kapazitiven Stimulation der Ionenkanäle in der freien Membran ist hingegen nicht möglich. Zum Vergleich führen wir konventionelle Voltage-Clamp Experimente durch Variation der intrazellulären Spannung durch, um Ionenkanäle in der gesamten Membran zu aktivieren. Zur Erleichterung der Auswertung werden alle Experimente unter den in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Bedingungen ohne Ca^{2+} durchgeführt.

4.3.1 Elimination des kapazitiven Stroms

Der Strom durch die adhärte Membran I_{JM} hat einen kapazitiven und einen ionischen Anteil (Gl. 4.13). Zuerst demonstrieren wir, wie die kapazitive Komponente eliminiert werden kann.

Abbildung 4.4 zeigt ein Beispiel, in dem eine fallende Rampe der Steilheit -50mV/ms und einer Dauer von 20ms appliziert wird. Der Membranstrom bei einer intrazellulären Spannung von $V_M = -60\text{mV}$ zeigt eine schnelle positive Transiente zu Beginn, eine langsame

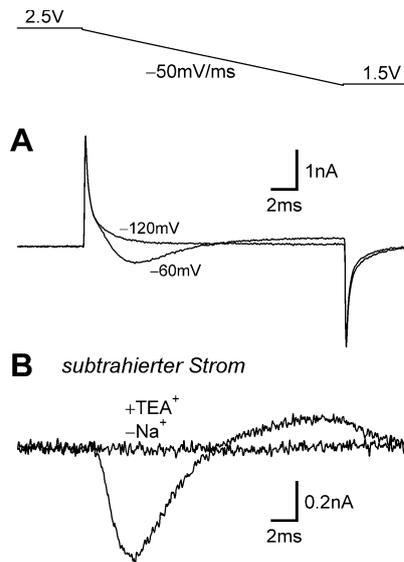


Abbildung 4.4: Aktivierung von Ionenkanälen durch eine fallende Rampe und Elimination des kapazitiven Stroms. **A** Membranströme bei intrazellulären Spannungen -60mV und -120mV . **B** Ionenströme nach Subtraktion der Membranströme bei -60mV und -120mV für eine normale Extrazellulärlösung und eine Lösung mit TEA^+ anstelle von Na^+ .

Antwort während und eine schnelle negative Transiente am Ende der Rampe (Abb. 4.4 A). Anschließend halten wir die intrazelluläre Spannung auf -120mV . Bei der Wiederholung desselben Stimulus zeigt der Pipettenstrom erneut schnelle Transienten zu Beginn und Ende der Rampe, während das langsame Signal während der Rampe verschwunden ist.

Wir ordnen die schnellen Transienten bei beiden intrazellulären Spannungen den kapazitiven Strömen durch die adhärierte Membran zu (vgl. Abb. 4.3). Wir erhalten den Netto-Ionenstrom durch Subtraktion des Pipettenstroms bei -120mV vom Strom bei -60mV , wie in Abbildung 4.4 B gezeigt.

Zur Kontrolle tauschen wir die normale Extrazellulärlösung gegen die Lösung NS-TEA der gleichen Leitfähigkeit aus, in der Na^+ durch Tetraethylammonium⁺ ersetzt ist, was eine Beseitigung der Natriumströme und einen Block der Kaliumkanäle zur Folge hat [Herm81]. Mit demselben Protokoll wie in Abbildung 4.4 A finden wir identische Transienten zu Beginn und Ende der Rampe (Daten nicht gezeigt). Nach Subtraktion der Pipettensignale ist kein Netto-Ionenstrom verblieben (Abb. 4.4 B). Wir folgern (i) dass das langsame Signal während der Rampe in normaler Badlösung auf Na^+ und K^+ Ströme zurückzuführen ist und (ii) das Subtraktionsprotokoll geeignet ist, die kapazitiven Ströme zu eliminieren.

4.3.2 Adressierung der Ionenkanaldynamik

Gemäß dem Hodgkin-Huxley Modell besitzen Natriumkanäle eine schnelle Aktivierung und Deaktivierung, während ihre Inaktivierung auf der Zeitskala des Öffnen und Schließens der Kaliumkanäle stattfindet. Dadurch ergibt sich die charakteristische Abfolge eines transienten Einstroms gefolgt von einem verzögerten und anhaltenden Ausstrom nach einem depolarisierenden Spannungssprung (vgl. Abb. 3.16). Durch Variation der Rampenlänge bei der kapazitiven Stimulation können die unterschiedlichen Phasen der Stromcharakteristik adressiert werden.

Abbildung 4.5 zeigt den Netto-Ionenstrom für Rampen von unterschiedlicher Dauer mit einer einheitlichen Steilheit von -100mV/ms . Bei der kürzesten Rampe von 2ms Dauer werden ausschließlich Natriumkanäle aktiviert, die nach dem Ende des Pulses schnell deaktivieren. Bei 5ms Rampenlänge ist die Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle

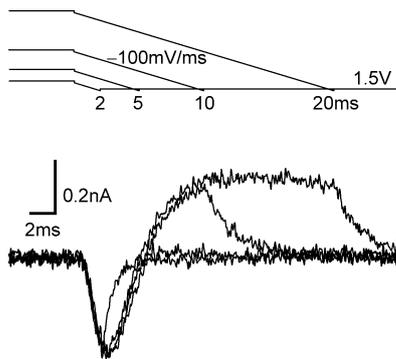


Abbildung 4.5: Variation der Rampendauer bei gleichbleibender Rampensteilheit zur Adressierung der Aktivierung, der Deaktivierung und der Inaktivierung der Natrium- und Kaliumströme.

bereits abgeschlossen. Bei längeren Pulsen werden zusätzlich Kaliumströme aktiviert, die nach dem Ende der Pulse langsam deaktivieren.

Die Zeitverläufe der Ionenströme vor dem Ende der Rampen fallen für die vier verschiedenen langen Pulse zusammen. Bedingung dafür ist, dass die extrazelluläre Spannung bei den vier Pulsen denselben Verlauf nimmt und die gleiche Amplitude hat. Dies lässt den Umkehrschluss zu, dass die Chipkapazität im durchlaufenen Spannungsbereich näherungsweise konstant ist und der kapazitive Oxidstrom nur von der Rampensteilheit abhängt, wie bereits aus Abbildung 3.4 deutlich wurde.

4.3.3 Ionenströme durch adhärierte und ganze Membran

Wir studieren das Öffnen der Ionenkanäle in der adhärierten Membran bei konstanter intrazellulärer Spannung $V_M = -60\text{mV}$ durch fallende Rampen mit den Steilheiten $-20 \dots -70\text{mV}$ und einer Dauer von 20ms. Die reinen Ionenströme durch die adhärierte Membran nach Subtraktion des kapazitiven Stroms sind in Abbildung 4.6 A dargestellt. Die transienten Einwärtsströme werden schneller und kürzer mit zunehmender Rampensteilheit und die Amplitude der verzögerten Auswärtsströme nimmt zu.

Zum Vergleich legen wir intrazellulär ein Set depolarisierender Spannungsstufen $\Delta V_M > 0$ ausgehend von $V_M = -60\text{mV}$ an. Abbildung 4.6 B zeigt die Ionenströme der gesamten Zelle nach Subtraktion der kapazitiven Ströme und Leckströme durch ein P/4-Protokoll. Der Verlauf ist typisch für die Neurone aus *L. stagnalis* unter den gewählten Bedingungen mit einer schnellen Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle und einem verzögerten Öffnen der Kaliumkanäle (vgl. Abb. 3.16) [Star02].

Ganz offensichtlich ähnelt der Zeitverlauf der Ionenströme bei der kapazitiven Stimulation durch fallende Rampen den Ionenströmen bei der intrazellulären Depolarisation. Folglich sind fallende Rampen in der Lage, Na^+ - und K^+ -Kanäle in der adhärierten Membran durch eine Depolarisation $\Delta V_{JM} > 0$ zu aktivieren, analog zu dem Effekt einer intrazellulären Depolarisation $\Delta V_M > 0$ auf die gesamte Membran. Sind die Ionenströme durch die adhärierte Membran klein im Vergleich zum Strom entlang des extrazellulären Spalts, wird die Spannung ΔV_{JM} durch die fallende Rampe bestimmt und kaum vom ionischen Membranstrom beeinflusst (vgl. Gl. 4.14). In diesem Fall ähnelt die Situation einem „extrazellulären Voltage-Clamp“.

Dennoch gibt es einige Unterschiede zwischen den durch extra- und intrazelluläre Stimulation hervorgerufenen Strömen: (i) Die Aktivierung der Na^+ -Kanäle ist bei der extrazellulären Stimulation um etwa 1ms verzögert. (ii) Die Aktivierungsdynamik der Na^+ -Ströme

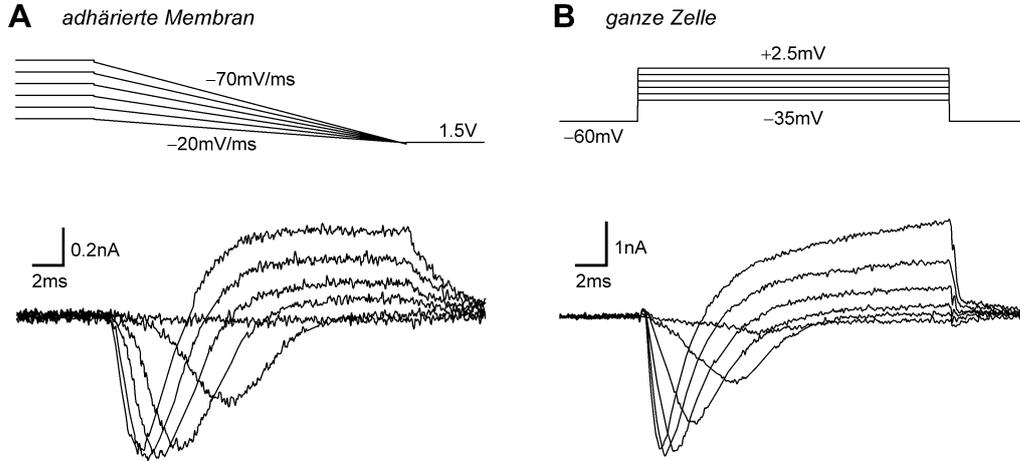


Abbildung 4.6: Öffnen der Ionenkanäle durch extra- und intrazelluläre Stimulation im Voltage-Clamp. **A** Kapazitive Stimulation mit fallenden Rampen mit Steilheiten $-20, -30, \dots, -70 \text{ mV/ms}$ bei einer intrazellulären Spannung von $V_M = -60 \text{ mV}$ und Ionenströme durch die adhärenierte Membran. **B** Depolarisierende Pulse der intrazellulären Spannung mit $\Delta V_M = 25.0, 32.5, \dots, 62.5 \text{ mV}$ beginnend bei $V_M = -60 \text{ mV}$ und Ionenströme durch die ganze Zellmembran.

ist heterogen. (iii) Der langsame Anstieg der Kaliumstroms fehlt. (iv) Es gibt deutliche Tail-Ströme nach dem Stimulus. Der erste und vierte Effekt sind ein Artefakt des Voltage-Clamp: für die kapazitive Stimulation mit Supercharging muss der Verstärker unterkompensiert werden, um Oszillationen zu vermeiden, weshalb sich die konstante Spannung nicht instantan einstellt. Der zweite Effekt ist eine Folge des nicht-einheitlichen Profils der Spaltspannung während des Voltage-Clamps (Gl. 2.17), das im Zwei-Domänen-Modell vernachlässigt wird. Der dritte Effekt wird versuchsweise auf eine Akkumulation von K^+ Ionen im Spalt zurückgeführt, die eine Verringerung der Triebkraft für den Kaliumstrom während der Rampe zur Folge hätte [Brit05].

4.3.4 Eichung der extrazellulären Spannung

Die ähnlichen Verläufe der Ionenströme bei der extra- und intrazellulären Stimulation implizieren eine ähnliche Dynamik der Ionenkanäle in der adhärenierten und der gesamten Zellmembran gemäß den Gleichungen 4.15 und 4.16.

$$I_{JM}^{ion} = A_J \sum_i g_{JM}^i(V_{JM}) \cdot [V_{JM} - V_0^i]$$

$$I_M^{ion} = A_M \sum_i g_M^i(V_M) \cdot [V_M - V_0^i]$$

Die extrazelluläre Stimulation erregt die adhärenierte Membran mit ihren spezifischen ionischen Leitfähigkeiten $A_J g_{JM}^i$, die vom Spannungsunterschied zwischen Zelle und Spalt $V_{JM} = V_M - V_J$ betroffen sind. Die intrazelluläre Stimulation hingegen betrifft die ionischen Leitfähigkeiten $A_M g_M^i$ mit der intrazellulären Spannung V_M .

Trotz der bestehenden Abweichungen in den Zeitverläufen kann man die beiden Stromsets aufeinander abbilden, um eine Skalierung der Spannung über die adhärenierte Membran

$\Delta V_{JM} = -(c_S/g_J) \cdot \Delta V_S / \Delta t_S$ in Abhängigkeit der Rampensteilheit zu erhalten. Der Fit der zwei Datensätze liefert $c_S/g_J = 1.1\text{ms}$ und $\alpha_{JM} = 0.27$. Mit der spezifischen Oxidkapazität $c_S = 1.2\mu\text{F}/\text{cm}^2$ erhält man die spezifische Spaltleitfähigkeit $g_J = 1.1\text{mS}/\text{cm}^2$.

Diese Parameter stehen den Werten $\alpha_{JM} = 0.26$ und $g_J = 1.8\text{mS}/\text{cm}^2$ gegenüber, die aus der Auswertung der passiven Antwort derselben Zelle im Current-Clamp hervorgehen. Die Übereinstimmung für das Flächenverhältnis α_{JM} ist hervorragend, während die Werte für die Spaltleitfähigkeit deutlich voneinander abweichen. Dies ist wahrscheinlich eine direkte Folge des vereinfachten Zwei-Domänen-Modells: die Annahme einer mittleren Spaltspannung unterschätzt die Amplitude der Depolarisation im Zentrum der Adhäsionsmembran (vgl. Anhang A.2.1), so dass Kanäle in Teilen der Membran früher aktiviert werden als vom Modell vorhergesagt. Dies führt bei der Auswertung zu einer Überschätzung der Abdichtung und somit zu einem zu kleinen Wert für g_J .

Trotz der quantitativen Abweichungen wird das Konzept eines extrazellulären „Quasi-Voltage-Clamp“ qualitativ bestätigt, bei dem die kapazitive Stimulation eine Depolarisation der adhären Membran bewirkt, deren Amplitude durch die Rampensteilheit, die Chipkapazität und die Spaltleitfähigkeit bestimmt wird und die den gleichen Effekt hat wie eine intrazelluläre Depolarisation.

4.4 Aktionspotenziale

Die Experimente im Voltage-Clamp zeigen, wie Ionenkanäle in der adhären und der gesamten Zellmembran auf Depolarisationen reagieren, und dass eine Äquivalenz zwischen fallenden Rampen am EOS-Kondensator und intrazellulären Spannungssprüngen besteht. Auch im Current-Clamp haben fallende Rampen eine depolarisierende Wirkung auf die adhären Membran und wir erwarten eine Aktivierung der dortigen Ionenkanäle. Ansteigende Rampen depolarisieren die freie Zellmembran und sollten zu einer Aktivierung der Kanäle in dieser Membrandomäne führen.

Im Folgenden wird sowohl mit fallenden als auch mit ansteigenden Rampen versucht, ein Aktionspotenzial auszulösen. Die Experimente werden im Whole-Cell Current-Clamp unter den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt. Vor dem Beginn der Stimulation wird die intrazelluläre Spannung jeweils auf $V_M = -60 \pm 1\text{mV}$ eingestellt.

4.4.1 Ansteigende Rampen

Wir legen ansteigende Rampen mit Steilheiten $140 \dots 190\text{mV}/\text{ms}$ beginnend bei 1.5V und einer Dauer von 10ms an den Kondensator an. Der Verlauf der intrazellulären Spannung $V_M(t)$ während der einzelnen Rampen ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

Die schwächste Rampe mit $140\text{mV}/\text{ms}$ bewirkt eine vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Spannung. Diese steigt auf einen Plateauwert von ca. $\Delta V_M \approx 25\text{mV}$ an und klingt nach dem Stimulus wieder ab. Sie entspricht einer kapazitiven Depolarisation der freien Membran, die durch die hyperpolarisierte adhären Membran vermittelt wird, analog zu Abbildung 4.2.

Erhöht man die Rampensteilheit in Schritten von $10\text{mV}/\text{ms}$, so nimmt die Polarisation zu. Zum Vergleich ist in Grau die passive Antwort eingezeichnet, die man aus dem Verlauf bei $140\text{mV}/\text{ms}$ erhält, indem man diesen entsprechend der jeweiligen Rampensteilheit skaliert.

KAPITEL 4. MECHANISMUS DER EXTRAZELLULÄREN STIMULATION

Der kapazitiven Polarisation ist eine exponentielle Depolarisation während der Rampe und ein langanhaltendes Signal nach der Rampe überlagert (150...170mV/ms).

Oberhalb einer bestimmten Schwelle wird ein Aktionspotenzial ausgelöst. Bei 180mV/ms erscheint es nach dem Ende des Pulses, bei 190mV/ms durchläuft es sein Maximum bereits während des Pulses und sein Abfall ist dem kapazitiven Abklingen der Polarisation überlagert.

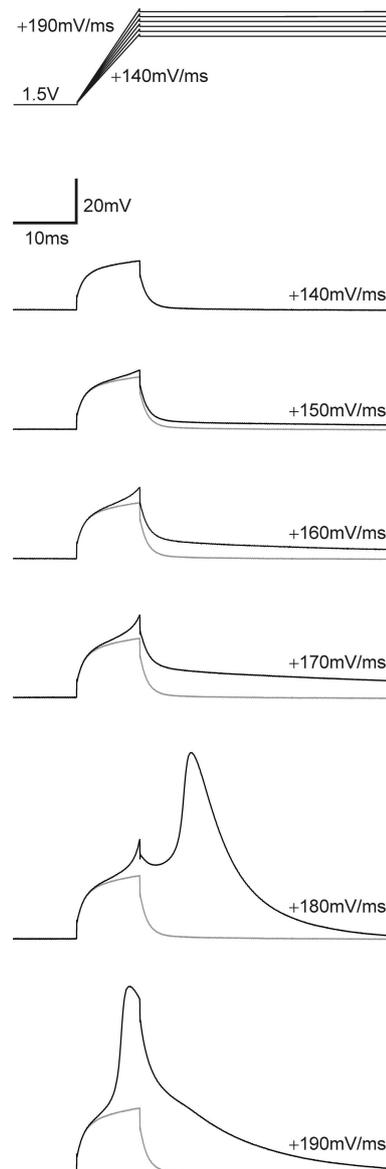


Abbildung 4.7: Kapazitive Stimulation mit ansteigenden Rampen. In Grau: erwartete passive Polarisation aus der Skalierung der Antwort bei 140mV/ms entsprechend der jeweiligen Rampensteilheit.

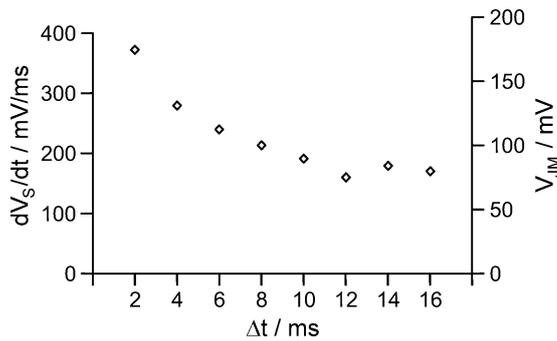


Abbildung 4.8: Schwellwert des Aktionspotenzials bei ansteigenden Rampen in Abhängigkeit der Pulslänge. Auftragung der nötigen Rampensteilheit (links) und der errechneten Spannung über die adhärrierte Membran (rechts).

Schwellwert

Aktionspotenziale können mit Rampen unterschiedlicher Dauer ausgelöst werden. Der Schwellwert der Rampensteilheit, bei der etwa 50% der Pulse erfolgreich sind, ist in Abbildung 4.8 gegen die Rampendauer aufgetragen.

Für lange Pulse erreicht der Schwellwert eine untere Grenze bei etwa 160mV/ms. Für kurze Rampen muss die Rampensteilheit erhöht werden, um eine AP auszulösen. Bei einer Dauer von 2ms ist eine Steilheit von ca. 400mV/ms nötig.

Mechanismus

Im Voltage-Clamp werden Ionenkanäle durch eine intrazelluläre Depolarisation aktiviert, wie in Abbildung 4.6 B gezeigt. Im Current-Clamp wird die freie Membran durch einen kapazitiven Einwärtsstrom zu Beginn der Rampe gemäß Gleichung 4.9 depolarisiert. Die einsetzende Aktivierung von Natriumkanälen in der freien Membran setzt die selbstverstärkende Dynamik eines Aktionspotenzials gemäß Gleichung 4.17 in Gang.

Abbildung 4.8 offenbart einen unteren Schwellwert von 160mV/ms für lange Stimuli. Mit einem Flächenverhältnis $\alpha_{JM} = 0.22$ von adhärrierter zu ganzer Membran und dem Parameter $c_S/g_J = 0.6$ ms, die beide aus der passiven Antwort dieser Zelle ermittelt wurden, erhält man mit Gleichung 4.20 ein Depolarisation von $\Delta V_M = 21$ mV als dem minimalen Schwellwert bei langen Rampendauern.

Wenn die zu Beginn des Pulses induzierte Ladung durch den kapazitiven Auswärtsstrom am Ende der Rampe zu früh zurückgenommen wird, wird die Ausbildung eines Aktionspotenzials unterdrückt. Diese Inhibierung wird umgangen, wenn die Dynamik der Kanäle durch eine erhöhte Rampensteilheit mit einem größeren depolarisierenden Einstrom zu Beginn des Pulses beschleunigt wird (Abb. 4.8).

Bei Verwendung sehr kurzer Rampen muss auf die Gefahr der Elektroporation geachtet werden. Die adhärrierte Membran wird aufgrund ihrer kleineren Fläche deutlich stärker polarisiert als die freie Membran. Gemäß den Gleichungen 4.7 und 4.8 ist die Hyperpolarisation um einen Faktor $\Delta V_{JM}/\Delta V_{FM} = 1 - \alpha_{JM}^{-1}$ größer als die Depolarisation der freien Membran. Mit $\alpha_{JM} = 0.22$ beträgt die geschätzte Spannungsänderung $\Delta V_{JM} = 75$ mV im Grenzfall langer Rampendauern. Bei kurzen Rampen steigt die Transmembranspannung auf bis zu 200mV an, wie auf der rechten Achse in Abbildung 4.8 angedeutet. Nachdem die Spannung im Zentrum der Membran 2–3mal größer ist als dieser Mittelwert (vgl. Anhang A.2.1), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pulse dieser Steilheit Elektroporation bewirken [Wall06a].

4.4.2 Fallende Rampen

Nach Einstellen der intrazellulären Spannung auf -60mV legen wir fallende Rampen mit Steilheiten $-25 \dots -75\text{mV/ms}$ endend bei 1.5V und mit einer Dauer von 10ms an. Der Verlauf der intrazellulären Spannung $V_M(t)$ ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

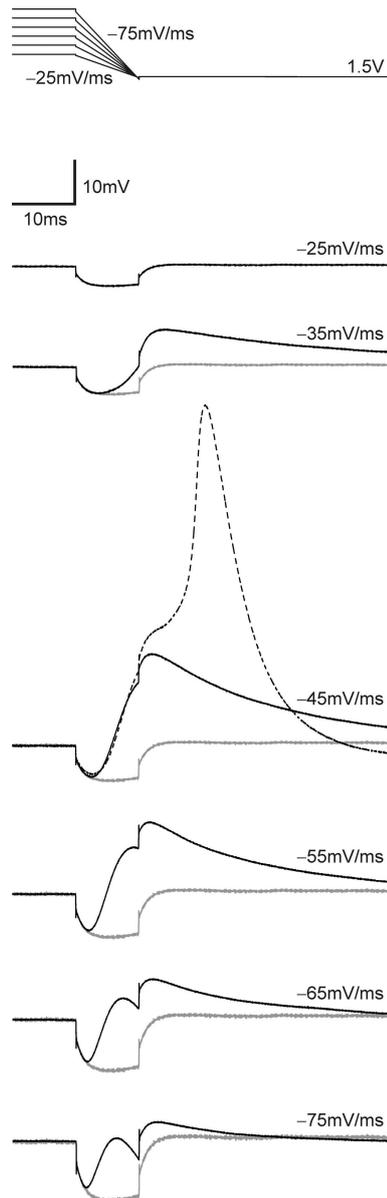


Abbildung 4.9: Kapazitive Stimulation mit fallenden Rampen. Grau: hypothetische passive Antwort.

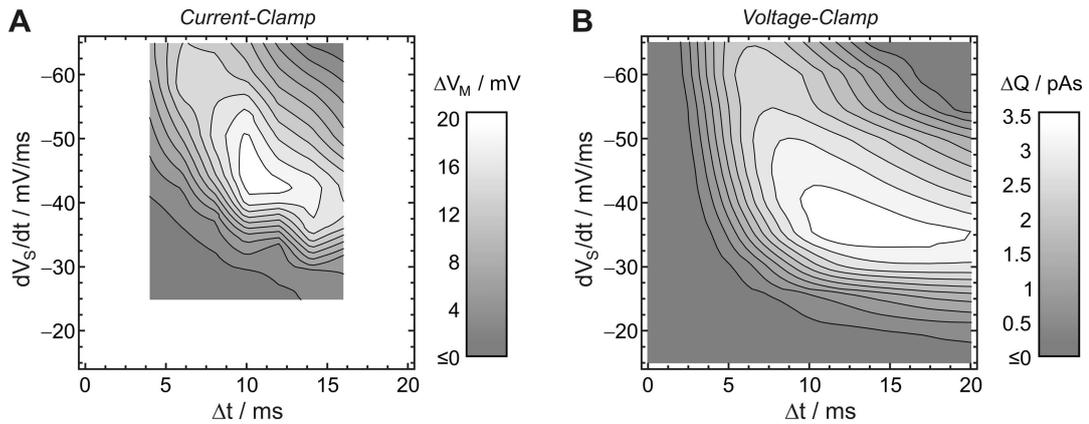


Abbildung 4.10: Kapazitive Stimulation mit fallenden Rampen. **A** Depolarisation am Ende der Rampe im Current-Clamp. **B** Ladungseinstrom während der Rampe im Voltage-Clamp.

Die schwächste Rampe mit einer Steilheit von -25 mV führt zu einer kapazitiven Hyperpolarisation der freien Membran um etwa $\Delta V_M \approx -6$ mV. Wenn die Steilheit der Rampe auf -35 mV/ms erhöht wird, nimmt die Hyperpolarisation zu. Zum Vergleich ist in Grau die erwartete, entsprechend der Rampensteilheit skalierte, passive Antwort eingezeichnet. Man erkennt zusätzlich zur passiven Antwort ein depolarisierendes Signal während der Rampe und ein langanhaltendes Signal nach der kapazitiven Relaxation.

Für größere Steilheiten schlägt die ursprüngliche kapazitive Hyperpolarisation in eine Depolarisation um, die gelegentlich die Schwelle für ein Aktionspotenzial überwindet (gestrichelte Linie bei -45 mV/ms). Wird die Rampensteilheit weiter erhöht, nimmt die Depolarisation wieder ab (Steilheiten $-55 \dots -75$ mV/ms) und es kommt nicht zu einem Aktionspotenzial.

Depolarisation

Als ein Maß für die Effizienz der Stimuli tragen wir die Depolarisation ΔV_M am Ende der fallenden Rampen für eine Serie ohne Aktionspotenziale auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10 A als Konturdarstellung nach Interpolation der Werte für unterschiedliche Rampendauern gezeigt.

Für eine bestimmte Rampendauer, z.B. 10 ms, nimmt die Depolarisation mit zunehmender Steilheit zunächst zu und dann wieder ab. Gleiches gilt für eine bestimmte Rampensteilheit, beispielsweise bei -45 mV/ms, mit zunehmender Dauer der Rampe. Je kürzer die Rampen, desto größer wird die nötige Steilheit, um eine bestimmte Depolarisation zu erreichen. Es gibt ein Maximum von etwa $\Delta V_M = +20$ mV, das bei ca. 10 ms und -45 mV/ms liegt. Das Neuron wird nur dann erregt, wenn dieses Maximum über der Schwelle für ein Aktionspotenzial liegt.

Mechanismus

Fallende Rampen depolarisieren die adhärenzte Membran und aktivieren die dortigen Ionenkanäle analog zum Voltage-Clamp (Abb. 4.6 A). Die kleine Fläche der adhärenzten Membran hat dabei zweierlei Auswirkungen:

- Ionenkanäle werden bei niedrigeren Rampensteilheiten aktiviert verglichen mit dem Effekt von ansteigenden Rampen auf die freie Membran, da der größere Teil der Spaltspannung über die adhärierte Membran abfällt (vgl. Abb. 4.1). Abbildung 4.9 zeigt einen deutlichen depolarisierenden Effekt bereits bei einer Rampensteilheit von -35mV/ms . Unter Verwendung von Gl. 4.8 und mit $\alpha_{JM} = 0.27$ und $c_S/g_J = 1.1\text{mV/ms}$ aus der Skalierung im Voltage-Clamp (selbe Zelle wie in Abb. 4.6) erhalten wir als Abschätzung eine Depolarisation von $\Delta V_{JM} = 28\text{mV}$.
- Prinzipiell könnte ein Aktionspotenzial in der adhärierten Membran analog zur kapazitiven Stimulation der freien Membran ausgelöst werden. Solch eine lokale Erregung wird jedoch von der kapazitiven Last der großen freien Membran gemäß Gleichung 4.18 unterdrückt.

Die Dynamik der intrazellulären Spannung in Abbildung 4.9 impliziert einen anderen Mechanismus: in einem ersten Schritt erzeugt die Depolarisation der adhärierten Membran einen Einwärtsstrom durch aktivierte Ionenkanäle. In einem zweiten Schritt führt dieser ionische Einstrom zu einer Depolarisation der gesamten Membran, die die ursprüngliche Hyperpolarisation überwindet und gegebenenfalls die Schwelle für ein AP erreicht. Die Dynamik wird durch Gleichung 4.19 beschrieben. Dieser Mechanismus wurde bereits von Buitenweg et.al. [Buit02] auf der Basis von numerischen Simulationen vorgeschlagen. Wir überprüfen dieses Konzept der indirekten, ionischen Stimulation durch einen Vergleich der experimentellen Daten aus Current- und Voltage-Clamp.

Validierung durch Voltage-Clamp

Zunächst betrachten wir den Ladungseinstrom durch die adhärierte Membran im Voltage-Clamp (Abb. 4.6 A). Für eine gewisse Steilheit wächst die eingebrachte Ladung mit der Zeit aufgrund des Na^+ -Einstroms an. Sie nimmt ab, sobald die Na^+ -Kanäle inaktiviert sind und der K^+ -Ausstrom dominiert (vgl. auch Abb. 4.5). Mit größer werdender Rampensteilheit wird auch die Ladung aufgrund der schnelleren Dynamik der Natriumkanäle zunächst größer. Sie nimmt ab, wenn die treibende Kraft für den Na^+ -Strom schwindet. Der integrierte Ladungseinstrom ist in Abbildung 4.10 B als Funktion der Rampensteilheit und -dauer in Form eines Konturplots nach Interpolation dargestellt. Es zeigt sich ein Maximum des Ladungseinstroms im Bereich einer Rampendauer von etwa 12ms und einer Steilheit von -35mV/ms .

In einem zweiten Schritt vergleichen wir den Ladungseinstrom im Voltage-Clamp mit der Depolarisation im Current-Clamp aus Abbildung 4.10 A. Das Maximum von 3.5pAs für den Ladungseinstrom korreliert mit dem Maximum der Depolarisation von 20mV . Aus diesen beiden Werten errechnet sich die Gesamtzellkapazität zu 0.175nF , was einem Zelldurchmesser von $75\mu\text{m}$ entspricht und in guter Übereinstimmung mit dem DIC-Bild steht (siehe Fig. 2 A in [Scho06]).

Die Lage des Maximums im Current-Clamp ist verglichen zu der im Voltage-Clamp zu größeren Steilheiten verschoben, von etwa -35mV/ms hin zu -45mV/ms . Dies ist eine direkte Konsequenz der in Serie geschalteten Kapazität der freien Membran, über die etwa ein Viertel der Spaltspannung abfällt. Dementprechend muss die Rampensteilheit im Current-Clamp um den Faktor $(1 - \alpha_{JM})^{-1}$ erhöht werden. Im betrachteten Beispiel mit $\alpha_{JM} = 0.27$ bedeutet dies eine Anhebung von -35mV/ms auf -48mV/ms , erneut in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten.

4.4.3 Physiologische Bedingungen

Für einen direkten Vergleich der beiden Stimulationsmechanismen unter physiologischen Bedingungen werden Messungen im normalen Nährmedium DM unter Verwendung von Stechpipetten und einem konventionellen Brückenverstärker durchgeführt. Für jede Zelle legen wir sowohl ansteigende als auch fallende Rampen an den Kondensator an.

Abbildung 4.11 zeigt eine Messung an einem Schneckenneuron, in der Rampen mit Steilheiten $\pm 25 \dots 95 \text{mV/ms}$ in Schritten von 10mV/ms und mit einer Dauer von 10ms appliziert werden. Sowohl mit ansteigenden als auch mit fallenden Rampen können Aktionspotenziale mit der für A-Cluster Neurone typischen Ca^{2+} -Schulter ausgelöst werden. Für ansteigende Rampen (Abb. 4.11 A) erkennt man eine kleine kapazitive Depolarisation bei niedrigen Rampensteilheiten ($25 \dots 65 \text{mV/ms}$). Steilere Rampen oberhalb von 75mV/ms lösen ein Aktionspotenzial aus, das mit zunehmender Steilheit immer früher auftritt. Bei fallenden Rampen (Abb. 4.11 B) führt die schwächste zu einer kapazitiven Hyperpolarisation der freien Membran. Ein Aktionspotenzial wird zwischen -35mV/ms und -65mV/ms ausgelöst. Danach nimmt die Depolarisation erneut ab und schlägt schließlich sogar in eine Hyperpolarisation um.

Die wesentlichen Merkmale der kapazitiven Stimulation unter physiologischen Bedingungen decken sich mit den Patch-Clamp Experimenten des vorherigen Abschnitts. Ansteigende Rampen führen zu Aktionspotenzialen oberhalb eines relativ hohen Schwellenwertes der Steigung. Fallende Rampen erregen die Zelle bei niedrigeren Steilheiten, aber nur in einem begrenzten Fenster. Die Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen führt zu einem verlängerten Ladungseinstrom, der die Depolarisation der oberen Membran unterstützt und den Schwellenwert für ein AP erniedrigt. Insgesamt ist die kapazitive Stimulation auf einen größeren Bereich der Stimulationsparameter ausgeweitet.

Unter physiologischen Bedingungen wird schließlich die Effizienz der Stimulation mit ansteigenden und fallenden Rampen untersucht und verglichen. Während ansteigende Rampen verlässlich Aktionspotenziale auslösen, konnten nur etwa 30% der Zellen ($n=12$) mit fallenden Rampen stimuliert werden. In den übrigen Fällen war die Depolarisation nicht ausreichend, um die Schwelle für ein AP zu überwinden.

4.4.4 Zusammenfassung

Auf den ersten Blick scheint die kapazitive Stimulation mit fallenden und ansteigenden Rampen nur eine Frage des Vorzeichens zu sein. Dass die Nervenzelle sich für unterschiedliche Polarität jedoch vollkommen unterschiedlich verhält, ist eine direkte Konsequenz aus der Asymmetrie des Systems.

Asymmetrie

Wir unterscheiden zwei Aspekte der Asymmetrie, bedingt (i) durch die Adhäsionsgeometrie und (ii) durch die Art der Messung. Einerseits steht eine kleine adhärierte Membran einer viel größeren freien Membran gegenüber. Diese strukturelle Asymmetrie führt zu unterschiedlichen Vorzeichen und Amplituden der Polarisation, die der aktiven Antwort zugrunde liegen. Andererseits wird für beiderlei Rampen immer die Polarisation der freien Membran gemessen. Diese spiegelt für ansteigende Rampen direkt die Depolarisation und Aktivierung von Ionenkanälen der freien Membran wider, während sie bei fallenden

KAPITEL 4. MECHANISMUS DER EXTRAZELLULÄREN STIMULATION

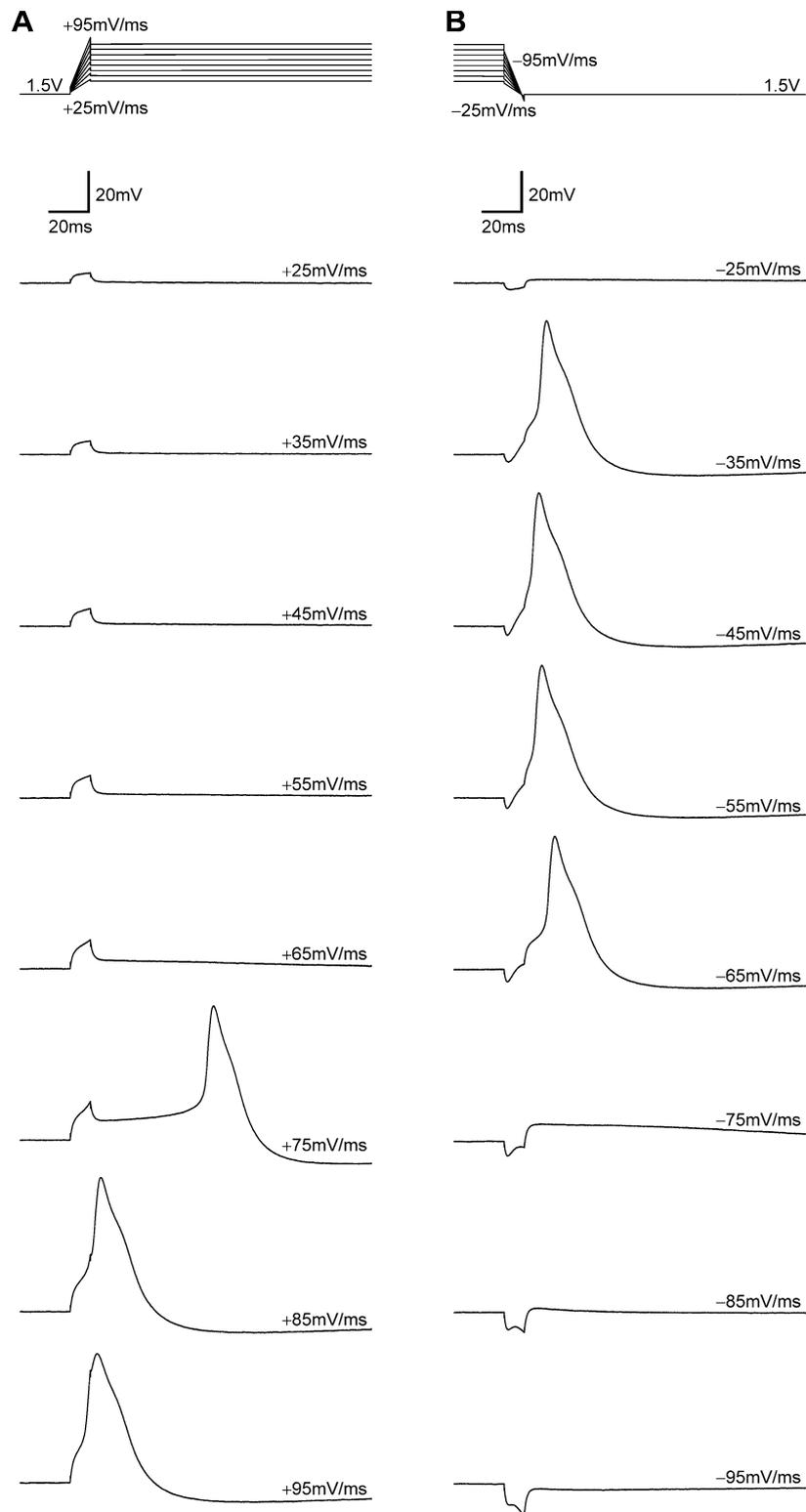


Abbildung 4.11: Stimulation unter physiologischen Bedingungen. Vergleich von **A** ansteigenden Rampen und **B** fallenden Rampen.

Rampen neben der Hyperpolarisation der freien Membran eine sekundäre Depolarisation aufgrund des Ionenstroms durch die adhärierte Membran beschreibt.

Vorteile und Nachteile

Sowohl bei ansteigenden als auch bei fallenden Rampen vermittelt die adhärierte Membran zwischen dem EOS-Kondensator und der freien Membran. Bei ansteigenden Rampen dient sie der Injektion des depolarisierenden kapazitiven Stroms, während sie bei fallenden Rampen einen depolarisierenden Ionenstrom trägt.

Bei ansteigenden Rampen wird die Stimulation durch den kapazitiven Einwärtsstrom zu Beginn der Rampe erreicht. Die Stimulation wird bei kurzen Rampen durch den kapazitiven Ausstrom am Ende der Rampe be- oder sogar verhindert. Man kann eine Erregung der Zelle für eine bestimmte Dauer der Rampe erzwingen, wenn man die Steilheit nur groß genug wählt. Dabei ist jedoch Vorsicht geboten, um eine Elektroporation der adhärierten Membran zu vermeiden und den Arbeitsbereich des EOS-Kondensators nicht zu verlassen, außerhalb dessen Faradaysche Ströme einsetzen und zu elektrochemischen Reaktionen an der Oberfläche führen.

Mit fallenden Rampen wird die Stimulation durch den Ioneneinstrom während der gesamten Dauer der Rampe erreicht. Nachdem der Einstrom bereits bei relativ geringen Rampensteilheiten aktiviert wird, ist diese Art der Stimulation schonender als mit ansteigenden Rampen. Sie kann jedoch vollkommen fehlschlagen, ohne dass die Schwelle für ein AP erreicht wird, wenn der ionische Einstrom durch die adhärierte Membran zu klein ist aufgrund einer zu kleinen Fläche oder einer zu geringen Ionenkanaldichte in der Adhäsionsmembran.

Kapitel 5

Periodische Stimulation bei schwacher Kopplung

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Mechanismus der kapazitiven Stimulation einer adhärennten Zelle mithilfe von Messungen an großen Schneckenneuronen beschrieben. Das erarbeitete Konzept ist grundsätzlich übertragbar auf die Stimulation von kleinen Säugerzellen. Aufgrund der schwachen Kopplungsbedingungen und der Beschränkung des Reizstromes durch den endlichen Arbeitsbereich des EOS-Kondensators muss es jedoch erweitert werden.

In diesem Kapitel werden Experimente an HEK-Zellen mit rekombinanten Natriumkanälen, die als Modellsystem für Säugetierneurone dienen, vorgestellt. In Voltage-Clamp und Current-Clamp Messungen wird deutlich, dass Einzelpulse aufgrund oben genannter Einschränkungen nicht mehr in der Lage sind, die Zelle überschwellig zu erregen. Dennoch kann die Zelle durch eine periodische Stimulation, die Gemeinsamkeiten mit dem sogenannten „Gildemeister-Effekt“ aufweist, erfolgreich gereizt werden. Es wird ausführlich auf den diesem Effekt zugrunde liegenden Mechanismus und die sich ergebenden, charakteristischen Stimulationseigenschaften eingegangen.

5.1 Vorüberlegungen

In Vorbereitung auf die Experimente erklärt dieser Abschnitt die Problematik schwacher Kopplungsbedingungen und stellt die Idee einer periodischen Stimulation als möglichen Ausweg vor.

5.1.1 Problemstellung

Abschätzung der Kopplungsstärke

Die durch die Spaltspannung induzierte Polarisation der Zellmembran liegt der Aktivierung von Ionenkanälen zugrunde. Der stationäre Wert der Spannung V_J im Spalt für eine Spannungsrampe mit der Steilheit $\Delta V_S/\Delta t_S$ ist im Zwei-Domänen-Modell gemäß Kapitel 4.1.1 gegeben durch

$$V_J^\infty = \frac{c_S}{g_J} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \quad \text{mit} \quad g_J = \frac{\eta_J d_J}{\rho_J A_J}. \quad (5.1)$$

Für HEK-Zellen beträgt die Kontaktfläche etwa $A_J = 400\mu\text{m}^2$, der Substratabstand $d_J = 40\text{nm}$ (Kapitel 3.3.2) und der spezifische Elektrolytwiderstand im Spalt ist gleich dem des physiologischen Elektrolyten $\rho_E = 65\Omega\text{cm}$ [Glei06]. Mit dem Geometrieparameter $\eta_J = 8\pi$ ergibt sich die spezifische Spaltleitfähigkeit zu $g_J = 387\text{mS}/\text{cm}^2$.

Dieser Wert ist um das 40–200fache größer als bei Schneckenneuronen. Um eine bestimmte extrazelluläre Spannung zu erzeugen, muss die Rampensteilheit gemäß Gleichung 5.1 um ebendiesen Faktor gesteigert werden. Dies hat direkte Konsequenzen sowohl für die Stimulation selbst als auch für die intrazelluläre Messung.

Verminderter Ionenstrom aufgrund kürzerer Rampen

Der Arbeitsbereich der EOS-Kondensatoren ist auf wenige Volt beschränkt. Eine Rampe mit einer bestimmten Steilheit kann deshalb nur für eine beschränkte Zeitdauer angelegt werden, ohne dass der Arbeitsbereich verlassen wird. Anhand von Gleichung 5.1 schätzen wir ab, wie lange eine Spannung von $V_J = -50\text{mV}$ aufrechterhalten werden kann. Mit einer Oxidkapazität $c_S = 1.5\mu\text{F}/\text{cm}^2$ für TiO_2 und dessen Arbeitsbereich von $\Delta V_S = -5\text{V}$ beträgt die maximale Rampendauer $\Delta t_S = 390\mu\text{s}$.

Die Aktivierung der Natriumströme im relevanten Spannungsbereich erfolgt innerhalb von $0.5 \dots 1\text{ms}$ (vgl. Abb. 3.16 B). Bei einer kürzeren Dauer der Depolarisation öffnet nur ein Bruchteil der Kanäle und der Einstrom von Na^+ -Ionen während des Pulses ist stark vermindert. Aus den Experimenten mit Schneckenzellen geht hervor, dass die Anhebung der Intrazellulärspannung unter solchen Bedingungen gering ist und meist unerschwellig bleibt (vgl. Abb. 4.10). Eine direkte Reizung der Säugetierzellen mit einzelnen Rampen ist somit aller Wahrscheinlichkeit nach nicht möglich.

Verfälschung der Messung durch die Elektrolytspannung

Der kapazitive Stromfluss $i_S = c_S dV_S/dt$ von der Elektrode ins Bad moduliert die Elektrolytspannung V_E in der Umgebung der Zelle einheitlich gemäß

$$V_E = R_E \cdot a_S^2 \pi \cdot i_S \quad \text{mit} \quad R_E = \frac{8\rho_E}{3\pi^2 a_S} \quad (5.2)$$

mit a_S dem Elektrodenradius und R_E dem in Kapitel 3.1.5 hergeleiteten Elektrolytwiderstand¹. Die erhöhte Rampensteilheit schlägt sich demnach direkt in der Elektrolytspannung nieder; mit $a_S = 125\mu\text{m}$ und den Werten aus obigem Beispiel erhält man $V_E \approx 13\text{mV}$. Der Spannungsabfall über den Badwiderstand geht additiv sowohl in die Spannung der Zelle V_M als auch in die des Spaltes V_J ein, so dass er *keinen direkten Einfluss* auf die Transmembranspannungen und das freie Verhalten der Zelle hat. Er geht jedoch direkt in die Messung der Intrazellulärspannung $V_M = V_{FM} + V_E$ ein, die deshalb keinen unmittelbaren Aufschluss mehr über die Spannungsänderung der freien Membran gibt. Darüberhinaus ist Letztere im Voltage-Clamp nicht mehr konstant sondern ändert sich mit der Elektrolytspannung $\Delta V_{FM} = -V_E$. In beiden Fällen verlangt die Auswertung der Messungen besondere Aufmerksamkeit.

¹Diesen Spannungsabfall kann man mit einer Pipette, die über der Elektrodenoberfläche positioniert wird, im Current-Clamp Modus messen. Die gemessenen Amplituden stimmen gut mit der theoretischen Abschätzung überein, mit kleinen Abweichungen bei unterschiedlicher Positionierung der Badelektrode und variablem Füllstand der Kammer.

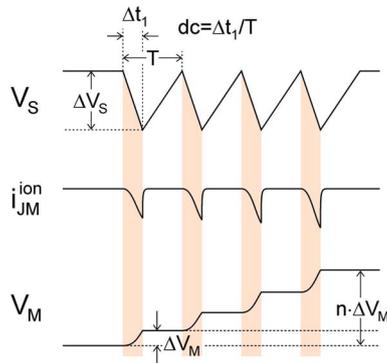


Abbildung 5.1: Grundidee der periodischen Stimulation. Wiederholte Applikation fallender Rampen und der ionische Einstrom durch die adhärenzte Membran erhöhen schrittweise die intrazelluläre Spannung.

5.1.2 Grundgedanke der periodischen Stimulation

Bei schwacher Zell-Chip-Kopplung hebt der mit einer fallenden Rampe verbundene Natriumeinstrom die intrazelluläre Spannung nur um wenige Millivolt an. Eine ansteigende Rampe ist bei gleicher Steilheit sogar weitaus ineffizienter, da die Polarisierung der freien Membran deutlich geringer ausfällt (vgl. Abb. 4.1).

Prinzip

Einen Ausweg bietet die periodische Stimulation. Ihre Grundidee ist es, durch wiederholtes Stimulieren der adhärenzten Membran und dem damit einhergehenden gepulsten Ladungseinstrom die intrazelluläre Spannung stückweise soweit anzuheben, dass schließlich auch die obere Membran und damit die ganze Zelle erregt wird. Abbildung 5.1 zeigt, wie durch Kombination von fallenden und ansteigenden Rampen dieses Ziel erreichen werden soll.

Ein Puls mit der Länge T und der Amplitude ΔV_S umfasst zwei Abschnitte: (i) eine fallende Rampe der Dauer $\Delta t_1 = dc \cdot T$ mit dem Tastverhältnis dc und (ii) eine ansteigende Rampe der Dauer $(1 - dc)T$. Die Steilheit der fallenden Rampe ist ausreichend, um einen Bruchteil der Ionenkanäle in der adhärenzten Membran zu aktivieren. Die ansteigende Rampe hat zunächst keinen aktivierenden Effekt auf Ionenkanäle und dient allein der Rückführung der Chipspannung auf ihren Ausgangswert.

Die intrazelluläre Spannung wird durch einen Puls um den Betrag ΔV_M angehoben. Bei n direkt aufeinanderfolgenden Pulsen addiert sich der depolarisierende Effekt. Bleibt der Einstrom von Puls zu Puls konstant, erfolgt die Steigerung der Spannung mit der durchschnittlichen Rate $dV_M/dt = \Delta V_M/T$.

Wäre dieses einfache Konzept streng gültig, würde die intrazelluläre Spannung in jedem Fall nach ausreichend vielen Perioden den Schwellwert für ein AP erreichen. In der Praxis ist dies aus den folgenden Gründen nicht so.

Einschränkungen

Natriumkanäle inaktivieren in Abhängigkeit der Membranspannung innerhalb weniger oder mehrerer Millisekunden. Ist die Steigerungsrate bei der periodischen Stimulation langsam, so setzt die Inaktivierung bereits in deren Verlauf ein und der verfügbare Anteil der Kanäle nimmt ab. Dadurch wird wiederum der Natriumeinstrom reduziert, die

Steigerungsrate kleiner und die Inaktivierung weiter begünstigt. Dieser sich selbst abschwächende Mechanismus geht immer weiter, bis der Einstrom nahezu völlig versiegt.

Dem Einstrom durch geöffnete Natriumkanäle wirkt zudem ein Ausstrom entgegen, der durch die spezifische Leckleitfähigkeit der Zellmembran und deren Umkehrspannung bestimmt wird. Im Normalfall ist die Leckleitfähigkeit bei HEK-Zellen klein gegenüber der Natrium-Leitfähigkeit. Durch das Einsetzen der Inaktivierung bei langanhaltender Stimulation werden die Amplituden von Aus- und Einstrom jedoch vergleichbar. Im Gleichgewicht heben sich die Ströme gegenseitig auf und die intrazelluläre Spannung oszilliert um einen festen Durchschnittswert.

Die Inaktivierung der Natriumkanäle und der Leckstrom setzen der periodischen Stimulation somit Grenzen. Ein wichtiges Kriterium für den Erfolg der Stimulation ist die Steigerungsrate, d.h. der Netto-Ladungseinstrom pro Pulsperiode. Ist sie zu klein, bleibt die Erregung unterschwellig.

5.1.3 Quantitatives Modell

Die Argumentation im vorherigen Abschnitt ist an das einfache Zwei-Domänen-Modell angelehnt. Zur Beschreibung des dynamischen Systemverhaltens könnte damit eine numerische Simulation durchgeführt werden. An dieser Stelle wird bewusst auf eine Simulation verzichtet und die Ergebnisse dieses Kapitels werden durchgängig rein qualitativ diskutiert.

Für eine quantitative Beschreibung der periodischen Stimulation wird im Anhang A.2 ein analytisches, nulldimensionales Modell eingeführt, das teilweise über das Zwei-Domänen-Modell hinausgeht. Es berücksichtigt wesentliche Merkmale der stationären Lösung des passiven Flächenkontaktmodells, reduziert die kontinuierliche Gatingkurve der Natriumkanäle auf zwei diskrete Zustände und subsummiert deren Kinetik in einem einzigen Korrekturfaktor. Trotz dieser radikalen Beschränkungen gibt es alle wesentlichen Merkmale der Messungen wider und stellt eine intuitiv zugängliche Alternative zu numerischen Simulationen dar.

5.2 Aktivierung der Natriumkanäle

Wie bereits in den Stimulationsexperimenten mit einzelnen Rampen an Schneckenzellen soll die Aktivierung von Natriumkanälen die periodische Stimulation vermitteln. In diesem Unterkapitel wird die Kanalöffnung direkt in Voltage-Clamp Experimenten studiert. Aus historischen Gründen kamen hierbei EOS-Kondensatoren mit HfO_2 und einem Durchmesser von $100\mu\text{m}$ zum Einsatz.

5.2.1 Experimente unter unphysiologischen Bedingungen

Um das Öffnen des Natriumkanals $\text{Na}_v1.4$ in der Adhäsionsmembran experimentell zu studieren, wird auf eine Extrazellulärlösung mit verminderter Leitfähigkeit zurückgegriffen, die die Kopplung verstärkt [Ulbr05][Scho05]. Die Lösung ECM-50 enthält nur 50mM NaCl und hat einen spezifischen Widerstand von $\rho_E = 155\Omega\text{cm}$. Die zugehörige Intrazellulärlösung ICM-50 belässt das Umkehrpotenzial für Natrium bei $V_0^{\text{Na}} = +58\text{mV}$ und blockt endogene Kaliumkanäle durch 135mM CsF (siehe Anhang A.4.3).

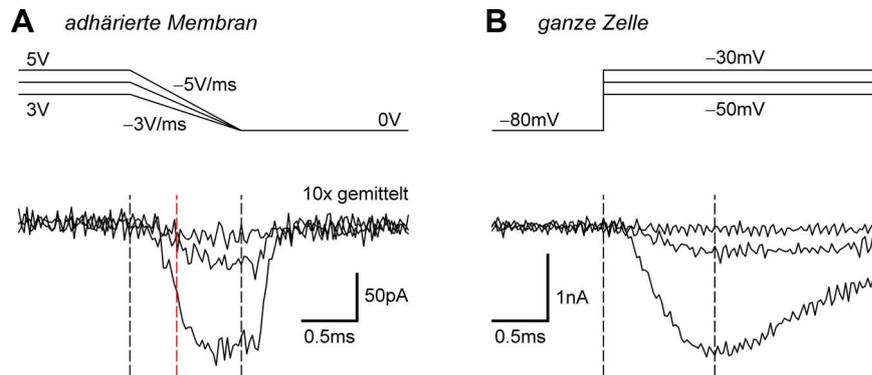


Abbildung 5.2: Gating des $\text{Na}_V 1.4$ in HEK-Zellen. Voltage-Clamp Experimente in einem Elektrolyt mit verminderter Leitfähigkeit. **A** Kapazitive Stimulation mit einem HfO_2 -Kondensator bei $V_M = -80\text{mV}$ und Ionenstrom durch die adhärrierte Membran. **B** Intrazelluläre Depolarisation und Ionenstrom durch die gesamte Membran.

Wir halten die HEK-Zelle im Whole-Cell Voltage-Clamp Modus auf einer intrazellulären Spannung $V_M = -80\text{mV}$ und legen fallende Rampen mit den Steilheiten $-3, -4, -5\text{V/ms}$ an den Kondensator an. Abbildung 5.2 A zeigt den Ionenstrom durch die adhärrierte Membran nach Subtraktion der passiven Antwort bei $V_M = -160\text{mV}$. Die schwächste Rampe hat keinen Einfluss auf die Ionenkanäle. Bei steileren Rampen aktivieren Natriumkanäle zwischen Anfang und Ende der Rampe (gestrichelte Linien) und deaktivieren nach ihrem Ende.

In weiteren Experimenten wurde durch pharmakologische Kontrollen bewiesen, dass der Strom von Natriumkanälen herrührt. Die Ergebnisse hierzu finden sich in der Veröffentlichung [Scho05]. Der Spannungsfehler des Voltage-Clamp aufgrund der Badmodulation berechnet sich gemäß Gleichung 5.2 zu maximal 4mV .

Gemäß Gleichung 5.1 für die Spaltspannung und unter Berücksichtigung der durch den höheren Elektrolytwiderstand reduzierten spezifischen Leitfähigkeit $g_J = 160\text{mS/cm}^2$ des Spaltes erwarten wir für die steilste Rampe mit -5V/ms eine Depolarisation der Adhäsionsmembran um $\Delta V_{JM} = 40\text{mV}$. Zum Vergleich aktivieren wir Ionenkanäle in der gesamten Membran durch intrazelluläre Spannungssprünge $\Delta V_M = 30, 40, 50\text{mV}$. Das Ergebnis nach Subtraktion der kapazitiven Ströme durch ein P/4-Protokoll ist in Abbildung 5.2 B gezeigt. Der schwächste Puls hat keinen Einfluss, während bei stärkerer Depolarisation Natriumkanäle aktivieren und inaktivieren. Die Zeitverläufe innerhalb der ersten Millisekunde (gestrichelte Linien) ähneln denen der kapazitiven Stimulation, die Amplitude der Ströme ist jedoch um einen Faktor 15 verschieden. Daraus folgern wir (i) dass die extra- und intrazellulären Spannungsänderungen einander ähnlich sind und (ii) nicht alle Ionenkanäle der Adhäsionsmembran, die typischerweise $\alpha_{JM} = 1/3$ der gesamten Zellmembran ausmacht, zum Strom beitragen. Diese Diskrepanz zum Zwei-Domänen-Modell wird vom erweiterten Modell (Anhang A.2) korrekt wiedergegeben.

5.2.2 Extrapolation auf physiologische Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen ist die Kopplung um den Faktor $65/155$ entsprechend dem Verhältnis der spezifischen Elektrolytwiderstände schwächer als in obigem Experi-

ment. Um dieselbe extrazelluläre Spannung zu erzeugen, muss die Rampensteilheit folglich um das 2.5fache erhöht und die Rampendauer entsprechend auf $\Delta t_S = 0.4\text{ms}$ gekürzt werden, wie in Abbildung 5.2 A durch die rote gestrichelte Linie angedeutet. Unter diesen Umständen würde nur noch ein Bruchteil der Ionenkanäle aktivieren und der Einstrom von Na^+ wäre sehr gering. Rechnet man mit einem durchschnittlichen Einstrom von 30pA und einer Gesamtzellkapazität von 12pF , würde die intrazelluläre Spannung durch den Natriumeinstrom während der Rampe um ca. $\Delta V_M = 1\text{mV}$ angehoben.

Zwischen der Ruhespannung einer Zelle und dem Schwellwert für ein Aktionspotenzial liegen typischerweise $\Delta V_M = 20\text{mV}$ (vgl. Abb. 3.16). Die mit einer fallenden Rampe erzielbare Depolarisation reicht also bei Weitem nicht aus, um ein AP auszulösen. Nachdem der Schwellwert der Rampensteilheit für ansteigende Rampen nochmals deutlich höher liegt als für fallende Rampen, wie aus den Experimenten mit Schneckenneuronen in Kapitel 4.4.3 hervorgeht, sind diese ebenfalls nicht in der Lage, die Zelle zu erregen.

Die Voltage-Clamp Experimente an HEK-Zellen demonstrieren die kapazitive Aktivierung von rekombinanten Natriumkanälen der adhären Membran durch fallende Rampen. Sie zeigen jedoch auch eindrücklich die Problematik der schwachen Zell-Chip-Kopplung auf und untermauern die Notwendigkeit, bei der Stimulation von Säugetierzellen einen anderen Weg als in den Schneckenexperimenten einzuschlagen.

5.3 Pumpen der intrazellulären Spannung

Im Current-Clamp wird das freie Verhalten einer HEK-Zelle mit $\text{Na}_V1.4$ Natriumkanälen bei der periodischen Stimulation untersucht. Die Daten der Abbildungen 5.3 bis 5.9 gehören zu derselben Zelle wie im Elektrophysiologie-Abschnitt (vgl. Abb. 3.16 B). Die Ergebnisse wurden durch Messungen an $n=5$ weiteren Zellen überprüft und bestätigt.

Die wichtigsten Membranparameter der verwendeten Zelle wurden mithilfe des Patch-Verstärkers zu $C_M = 11.9\text{pF}$ und $R_M = 5.2\text{G}\Omega$ bestimmt, was einer Membranfläche von $A_M \approx 1200\mu\text{m}^2$ und einer Leckleitfähigkeit von $g_M^L = 0.02\text{mS}/\text{cm}^2$ entspricht. Zusammen mit dem Peak-Natriumeinstrom im Voltage-Clamp von -2.5nA bei $V_M = 0\text{mV}$ ergibt sich die maximale spezifische Na^+ -Leitfähigkeit zu $\bar{g}_M^{\text{Na}} \approx 3.5\text{mS}/\text{cm}^2$.

In allen folgenden Experimente wurden Chips mit TiO_2 -Beschichtung verwendet und ihr Arbeitsbereich wurde voll ausgeschöpft, um eine größtmögliche Stromdichte und Pulsdauer zu garantieren.

5.3.1 Einzelpulse

Die Voltage-Clamp Experimente des Abschnitts 5.2.1 haben gezeigt, dass eine fallende Rampe imstande ist, einen Teil der Natriumkanäle der adhären Membran zu öffnen. In diesem Abschnitt soll die Anhebung ΔV_M der intrazellulären Spannung durch diesen Natriumeinstrom untersucht werden.

Aufgrund der Notwendigkeit, die Chipspannung wieder auf ihren Ausgangswert zurückzuführen, um weitere Pulse anlegen zu können, werden nicht isolierte fallende Rampen, sondern einzelne Dreieckspulse verwendet (vgl. Abb. 5.1). Es wird jedoch angenommen, dass die ansteigende Rampe keinen wesentlichen Einfluss hat, was durch die Messungen in Abschnitt 5.3.3 später bestätigt wird.

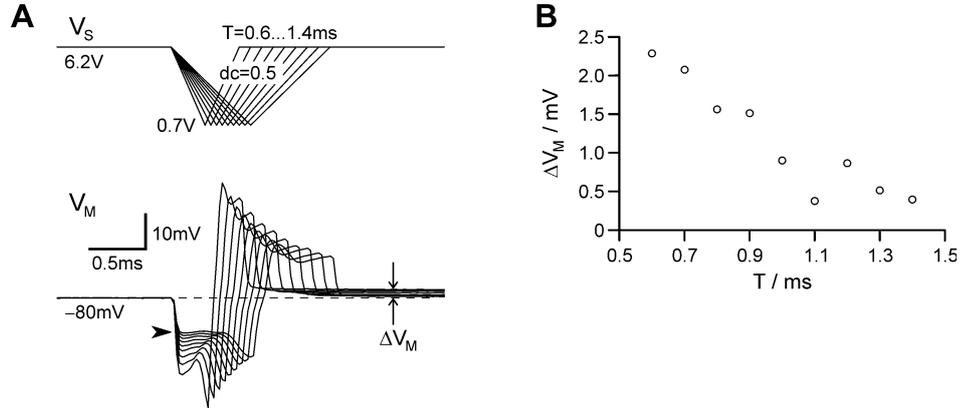


Abbildung 5.3: Einfluss der Rampensteilheit auf die reaktive Depolarisation. Chip mit TiO_2 . **A** Verlauf der Chipspannung (oben) und kapazitive Antwort der intrazellulären Spannung (unten) ausgehend von $V_M = -80mV$. **B** Verbleibende Depolarisation ΔV_M nach Pulsende (siehe Bild A) in Abhängigkeit der Pulsdauer T .

Spannungsverlauf

Die intrazelluläre Spannung wird vor Beginn der Stimulation im Current-Clamp auf etwa $V_M^0 = -80mV$ eingestellt. Ein symmetrischer Dreieckspuls mit einer Amplitude von $\Delta V_S = 5.5V$ und einer Dauer $T = 1.4ms$ wird an das Substrat angelegt und die Änderung der Intrazellulärspannung beobachtet (Abb. 5.3 A, längster Puls).

Der Spannungsverlauf entspricht dem Verlauf des Oxidstroms bei der gewählten Pulsform (vgl. Abb. 3.4 B). Das Aufladen des Zell-Chip-Kontaktes erfolgt aufgrund der kleinen Kontaktfläche innerhalb weniger Mikrosekunden (nicht sichtbar) und ist im Gegensatz zu den Schneckenexperimenten vernachlässigbar, weshalb auf eine zusätzliche Spannungsstufe für das Supercharging verzichtet wurde.

Induzierte Polarisation

Die Amplitude der Spannungsänderung am Beginn des Pulses beträgt $\Delta V_M = -11mV$ (Pfeilkopf). Sie setzt sich gemäß Abschnitt 5.1.1 aus der Elektrolytspannung und der Spannungsänderung über die freie Membran zusammen. Wir schätzen Ersterer anhand von Gleichung 5.2 ab; mit den Parametern $\rho_E = 65\Omega cm$, $a_S = 125\mu m$, $c_S = 1.5\mu F/cm^2$ und der Rampensteilheit von $dV_S/dt = -5.5V/0.7ms$ ergibt sich der Wert $V_E \approx -8mV$.

Aus der errechneten Elektrolytspannung und der gemessenen Änderung der Intrazellulärspannung erhält man die effektive Spannungsänderung der freien Membran zu $\Delta V_{FM} = \Delta V_M - V_E = -3mV$. Mithilfe der Gleichungen 4.7 und 5.1 kann die Polarisationsänderung der freien Membran in Abhängigkeit des Flächenverhältnisses α_{JM} von adhärierter zu gesamter Membran gemäß

$$\Delta V_{FM} = \alpha_{JM}^2 \frac{A_M \rho_J}{8\pi d_J} c_S \frac{dV_S}{dt} \quad (5.3)$$

ausgedrückt werden. Da die übrigen Werte auf der rechten Seite der Gleichung bekannt sind, kann man aus der Spannungsänderung von $-3mV$ das Flächenverhältnis α_{JM} bestimmen. Mit den bereits oben verwendeten Werten für ρ_J , c_S und dV_S/dt sowie $A_M =$

$1200\mu\text{m}^2$ und $d_J = 40\text{nm}$ ergibt sich der Wert $\alpha_{JM} = 0.18$. Dieser Wert liegt unterhalb des in einer früheren Untersuchung gefundenen Bereichs $\alpha_{JM} = 0.2 \dots 0.45$ [Schm06]. Wäre die Spannungsänderung ΔV_{FM} größer als abgeschätzt, läge der Wert im Bereich $\alpha_{JM} = 0.18 \dots 0.33$.

Das Verhältnis der Transmembranspannung ΔV_{FM} zur Elektrolytspannung V_E ist gemäß den Gleichungen 5.2 und 5.3 konstant. Es ist insbesondere unabhängig von der angelegten Rampensteilheit und gilt demnach für alle denkbaren Pulse. Der Anteil der Transmembranspannung an der gemessenen Änderung der Intrazellulärspannung beträgt nur etwa 27%. Nachdem obige Herleitung nur näherungsweise gültig ist, ist jegliche Auswertung des intrazellulären Spannungsverlaufs während der Stimulation mit großen Fehlern behaftet und mit großer Vorsicht zu genießen.

Netto-Depolarisation nach Pulsende

Wir variieren die Dauer des Pulses im Bereich $T = 0.6 \dots 1.4\text{ms}$ in Schritten von 0.1ms . Mit kürzer werdenden Pulsen wächst die passive Polarisation der Zelle in beiden Phasen des Pulses an und die intrazelluläre Spannung kehrt nicht mehr vollständig auf ihren Ausgangswert zurück (Abb. 5.3 A). Die Amplitude der nach dem Pulsende verbleibenden, anhaltenden Depolarisation ΔV_M ist in Abbildung 5.3 B gegen die jeweilige Pulslänge aufgetragen. Sie ist gering für lange Pulse und wächst für kurze Pulse auf etwa 2mV ($T = 0.7\text{ms}$) an.

Der Ursprung dieser Depolarisation ist nicht direkt erkennbar. Die maximale, um die Elektrolytspannung korrigierte Depolarisation der freien Membran während eines Pulses mit $T = 1.0\text{ms}$ beträgt nur etwa 5mV und hat keine aktivierende Wirkung auf die dortigen Ionenkanäle. Die gleichzeitige maximale Polarisation der unteren Membran in deren Zentrum ist jedoch gemäß Abbildung A.2 A um den Faktor $\Delta V_{JM}^0 / \Delta V_{FM} = 1 - 2/\alpha_{JM}$ stärker als die Polarisation der freien Membran. Mit dem Flächenverhältnis $\alpha_{JM} = 0.18$ ergibt sich ein Wert von 50mV , so dass eine Aktivierung von Ionenkanälen im mittigen Bereich der unteren Membran und ein Einstrom von Na^+ -Ionen während der ersten, depolarisierenden Phase des Pulses erwartet werden kann. Eine Elektroporation der Membran kann aufgrund dieser Abschätzung mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Der Zuwachs der intrazellulären Spannung von etwa $1\text{--}2\text{mV}$ für die kürzeren Pulse befindet sich in guter Übereinstimmung mit der Abschätzung, die im Abschnitt 5.2.2 auf der Grundlage der Voltage-Clamp Experimente gemacht wurde. Ist die Rampensteilheit jedoch gering, so dass keine Natriumkanäle aktiviert werden, so sollte die intrazelluläre Spannung vor Beginn und nach Ende des Pulses gleich sein und ihre Änderung $\Delta V_M = 0$ verschwinden. Warum dies in Abbildung 5.3 bei langen Pulsen nicht der Fall ist, ist unklar. Ein Einfluss des Messverstärkers kann nicht ausgeschlossen werden.

5.3.2 Pulsanzahl

Bei Wiederholung des biphasischen Pulses erwarten wir eine Summation des depolarisierenden Netto-Effekts der Einzelpulse. Wir halten im Folgenden die Pulsdauer $T = 0.7\text{ms}$ konstant und kombinieren $n = 1 \dots 30$ unmittelbar aufeinander folgende Einzelpulse zu einer Pulsfolge. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.4 A dargestellt.

5.3. PUMPEN DER INTRAZELLULÄREN SPANNUNG

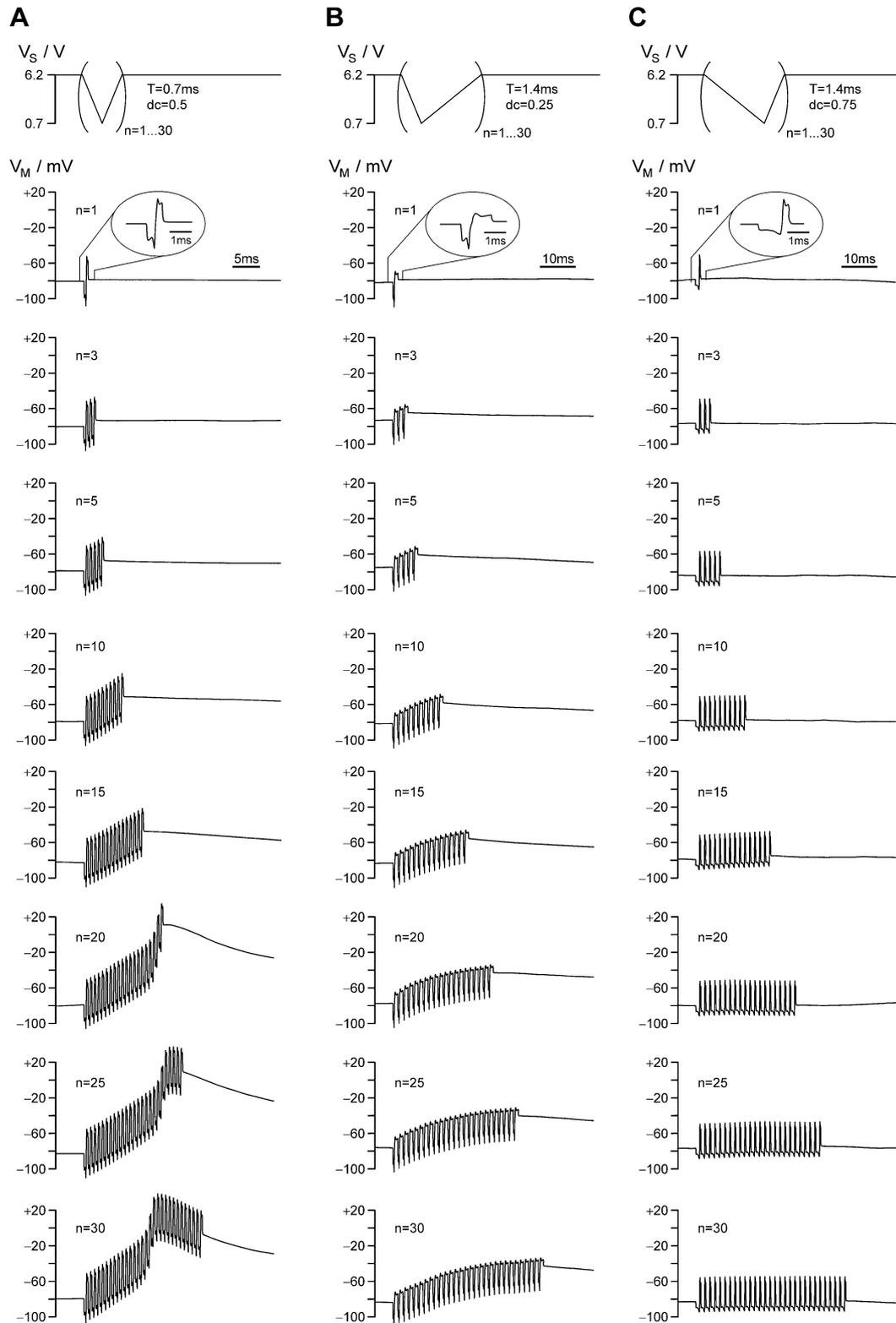


Abbildung 5.4: Periodische Stimulation mit Pulsfolgen aus $n=1\dots30$ direkt aufeinander folgender Pulse. A Symmetrische Pulse ($dc=0.5$) mit $\Delta V_S=5.5\text{V}$ Amplitude und einer Dauer von $T=0.7\text{ms}$. B,C Asymmetrische Pulse mit Tastverhältnis $dc=0.25$ bzw. $dc=0.75$ und $T=1.4\text{ms}$ Dauer.

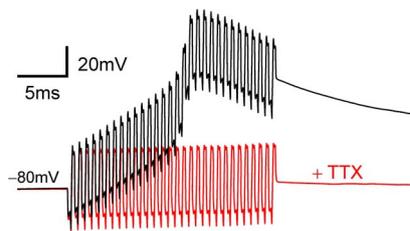


Abbildung 5.5: *Pharmakologische Kontrolle. Die Zugabe von $0.1\mu\text{M}$ des Na^+ -Kanalblockers Tetrodotoxin beseitigt die depolarisierende Wirkung der Stimulation. Stimulationsparameter: $\Delta V_S = 5.5\text{V}$, $T = 0.7\text{ms}$, $dc = 0.5$, $n = 30$.*

Ein Einzelpuls bewirkt die bereits aus Abbildung 5.3 bekannte, biphasische Antwort und hinterlässt eine kleine Depolarisation (Inset). Bei drei aufeinander folgenden Pulsen wird die intrazelluläre Spannung deutlich angehoben. Erhöht man die Pulsanzahl weiter auf bis zu $n = 15$, wächst die effektive Depolarisation kontinuierlich an. Ab einer Pulsfolgenlänge von ca. $n = 17$ Pulsen erreicht die Anhebung der intrazellulären Spannung den Schwellwert für ein Pseudo-Aktionspotenzial (vgl. Abb. 3.16 B). Bei längeren Pulsfolgen (z.B. $n = 30$) tritt dieses überlagert von der kapazitiven, biphasischen Modulation auf.

Pharmakologische Kontrolle

Eine Pulsfolge von ausreichend vielen Einzelpulsen führt zuverlässig zu einem Pseudo-Aktionspotenzial (Abb. 5.4 A). Um die Ursache der Depolarisation zu klären und einen Einfluss des Messverstärkers auszuschließen, applizieren wir eine Pulsfolge von $n = 30$ Pulsen vor und nach der Zugabe des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX). Der Verlauf der intrazellulären Spannung für beide Fälle ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

Ausgehend von einer intrazellulären Spannung von etwa $V_M = -80\text{mV}$ zeigt die Pulsfolge unter normalen Bedingungen (schwarz) den bekannten Anstieg und ein Pseudo-AP nach etwa 15 Pulsen. Nach der TTX-Zugabe (rot) bleibt die kapazitive Modulation der Spannung unverändert, während die depolarisierende Wirkung nahezu vollständig getilgt ist. Wir folgern, dass die spezifische Aktivierung von Natriumkanälen für die Anhebung der Spannung verantwortlich ist.

5.3.3 Pulsform

Um zu klären, welche Rolle der fallenden und der ansteigenden Phase der Pulse bei der Stimulation zukommt, verändern wir die Form der Einzelpulse in zweierlei Weise: (i) Bei einem Tastverhältnis von $dc = 0.25$ und einer Pulsdauer von $T = 1.4\text{ms}$ bleibt die fallende Phase in Steigung und Dauer unverändert, während die Steigung der ansteigenden Phase um den Faktor 3 abgeschwächt und ihre Dauer um denselben Faktor verlängert wird. (ii) Mit einem Tastverhältnis $dc = 0.75$ und einer ebenfalls verdoppelten Pulsdauer von $T = 1.4\text{ms}$ verhält es sich genau umgekehrt zum ersten Fall. Der Verlauf der intrazellulären Spannung für Pulsfolgen aus $n = 1 \dots 30$ Pulsen ist in Abbildung 5.4 B und C den Ergebnissen des symmetrischen Falls $dc = 0.5$ gegenübergestellt.

Qualitatives Verhalten

Ein Einzelpuls mit einem Tastverhältnis von $dc = 0.25$ (Abb. 5.4 B) bewirkt in seiner fallenden Phase eine Hyperpolarisation analog zum symmetrischen Fall, wohingegen die Depolarisation während der ansteigenden Rampe in ihrer Amplitude um den Faktor 3

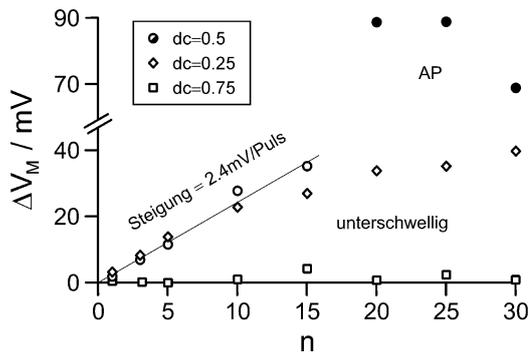


Abbildung 5.6: Intrazelluläre Depolarisation ΔV_M nach Ende des Pulses ausgehend von $V_M = -80\text{mV}$ in Abhängigkeit der Pulsanzahl n . Die Werte sind den drei Stimulationsserien aus Abbildung 5.4 entnommen mit den Tastverhältnissen $dc=0.5$ (\circ), $dc=0.25$ (\diamond) und $dc=0.75$ (\square). Leere Symbole kennzeichnen unterschwellige, gefüllte Symbole überschwellige Spannungsverläufe.

gestaucht und in ihrer Dauer dreimal so lang erscheint (Inset). Mit steigender Pulsanzahl wird die intrazelluläre Spannung im Verlauf der Pulsfolge zunehmend angehoben. Der Anstieg sättigt bei längeren Pulsfolgen ab ca. $n = 20$, ohne dass der Schwellwert für ein Pseudo-AP erreicht wird.

Bei Pulsfolgen aus Einzelpulsen mit einem Tastverhältnis von $dc = 0.75$ (Abb. 5.4 C) entspricht die zweite Phase der kapazitiven Modulation der des symmetrischen Falles, während die erste Phase zeitlich gedehnt und in ihrer Wirkung abgeschwächt wird (Inset). Ungeachtet der Steigerung der Pulsanzahl analog zu den beiden anderen Tastverhältnissen ist keine depolarisierende Wirkung erkennbar.

Aus diesem Ergebnis schließen wir, dass im Wesentlichen die fallende Phase der Einzelpulse der Anhebung der intrazellulären Spannung während der Stimulation zugrunde liegt.

Quantifizierung

Zur Präzisierung der Stimulationseffizienz bei unterschiedlichen Tastverhältnissen tragen wir für die drei Stimulationsserien aus Abbildung 5.4 die erreichte Depolarisation nach Pulsende ΔV_M gegen die Anzahl der Pulse n auf. Abbildung 5.6 verdeutlicht, dass der Anstieg der intrazellulären Spannung bei symmetrischen Pulsen ($dc=0.5$) im unterschwelligen Bereich annähernd linear mit der Pulsanzahl skaliert. Aus einem linearen Fit ergibt sich die durchschnittliche Steigerung zu $\Delta V_M = 2.4\text{mV}$ pro Puls. Der Anstieg bei links-lastiger Pulsform ($dc=0.25$) folgt für $n < 10$ Pulse dem Verlauf der symmetrischen Pulse mit vergleichbarer Rate, bevor er einen Plateauwert von etwa 35mV erreicht. Die rechts-lastigen Pulse ($dc=0.75$) haben keinen nennenswerten Effekt.

Gemäß den Überlegungen zur periodischen Stimulation wird die Anhebung der intrazellulären Spannung zunächst allein von den fallenden Rampen einer Pulsfolge bestimmt. Nachdem die fallenden Phasen der Pulse mit den beiden Tastverhältnissen $dc = 0.5$ und $dc = 0.25$ per definitionem in Steigung und Dauer übereinstimmen, erwartet man für beide Fälle dieselbe Steigerungsrate. Die gute Übereinstimmung in der Anfangsphase des Experiments unterstreicht, dass die ansteigenden Phasen, die sich in Länge und Steilheit unterscheiden, keinen (oder zumindest einen vergleichbaren) Effekt bei der Stimulation haben. Das Abweichen der Depolarisation bei Stimulation mit links-lastigen Pulsen für $n > 10$ ist wahrscheinlich bedingt durch die stationäre Inaktivierung der Natriumkanäle, die aufgrund der doppelt so langen Stimulationsdauer verglichen mit symmetrischen Pulsen bei gleicher Pulsanzahl weiter fortgeschritten ist und zu einer Reduktion des Natriumeinstroms führt.

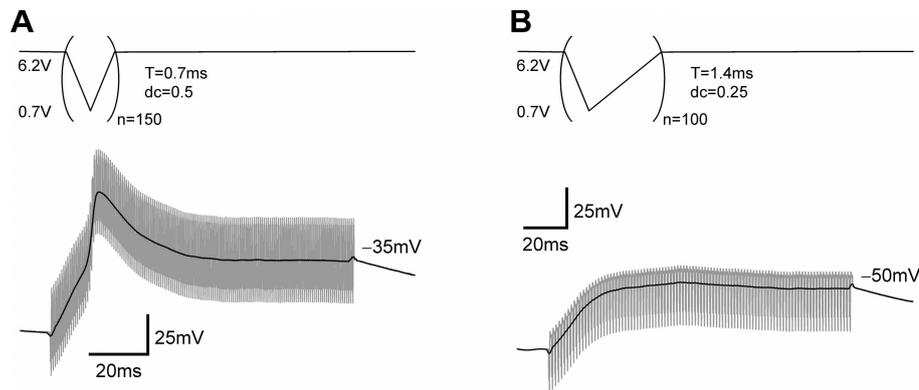


Abbildung 5.7: Sättigungsverhalten der intrazellulären Spannung bei anhaltender Stimulation mit **A** symmetrischen und **B** asymmetrischen ($dc=0.25$) Pulsen.

Sättigungsverhalten

Das Verhalten bei ununterbrochener Stimulation wird mithilfe langer Pulsfolgen untersucht. Abbildung 5.7 zeigt die intrazelluläre Spannung (grau) bei Stimulation mit symmetrischen (Teil A) bzw. links-lastigen (Teil B) Pulsen. Unabhängig vom Stimulationsverlauf während der ersten 50 Pulse verharrt die Spannung in beiden Fällen im weiteren Verlauf auf einem Plateauwert, um den herum sie gemäß der kapazitiven Kopplung moduliert. Für eine verbesserte Darstellung ist zusätzlich eine tiefpassgefilterte Version der Spannungsverläufe (schwarz) abgebildet, die diese Beobachtung unterstreicht.

Geht man davon aus, dass die stationäre Inaktivierung der Natriumkanäle bei langanhaltender Stimulation dem Mittelwert der Intrazellulärspannung entspricht, so wird sich im Gleichgewicht zwischen den Ein- und Ausströmen während einer Periode ein stationärer Endzustand V_M^∞ einstellen. Dieser wird wesentlich vom Tastverhältnis dc beeinflusst: ist dieses groß ($dc=0.5$), trägt die freie Membran zum stationären Einstrom bei; ist es gering ($dc=0.25$), fällt auch der stationäre Wert des Endzustands geringer aus. Die beobachteten Werte von $V_M^\infty = -35\text{mV}$ für symmetrische und $V_M^\infty = -50\text{mV}$ für links-lastige Pulse stimmen tendenziell mit dieser Sichtweise überein.

5.3.4 Haltespannung

Der Einstrom durch die untere Membran bei der periodischen Stimulation sollte aufgrund der Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle von der intrazellulären Spannung V_M abhängen. Insbesondere sagt die Theorie eine untere Schranke voraus, unterhalb derer die Depolarisation der unteren Membran nicht mehr ausreicht, um Natriumkanäle zu aktivieren. Wir untersuchen diese Spannungsabhängigkeit, indem wir mit einer gleichbleibenden Pulsfolge stimulieren und die Haltespannung V_M^0 schrittweise verändern.

Qualitatives Verhalten

Abbildung 5.8 A zeigt die Ergebnisse für symmetrische Pulsfolgen mit $n = 30$ Perioden mit den bereits bewährten Stimulationsparametern. Ausgehend von $V_M^0 = -80\text{mV}$ führte diese Pulsfolge bereits nach etwa 15 Pulsen zur Auslösung eines Pseudo-APs (vgl. Abb. 5.8 A,

5.3. PUMPEN DER INTRAZELLULÄREN SPANNUNG

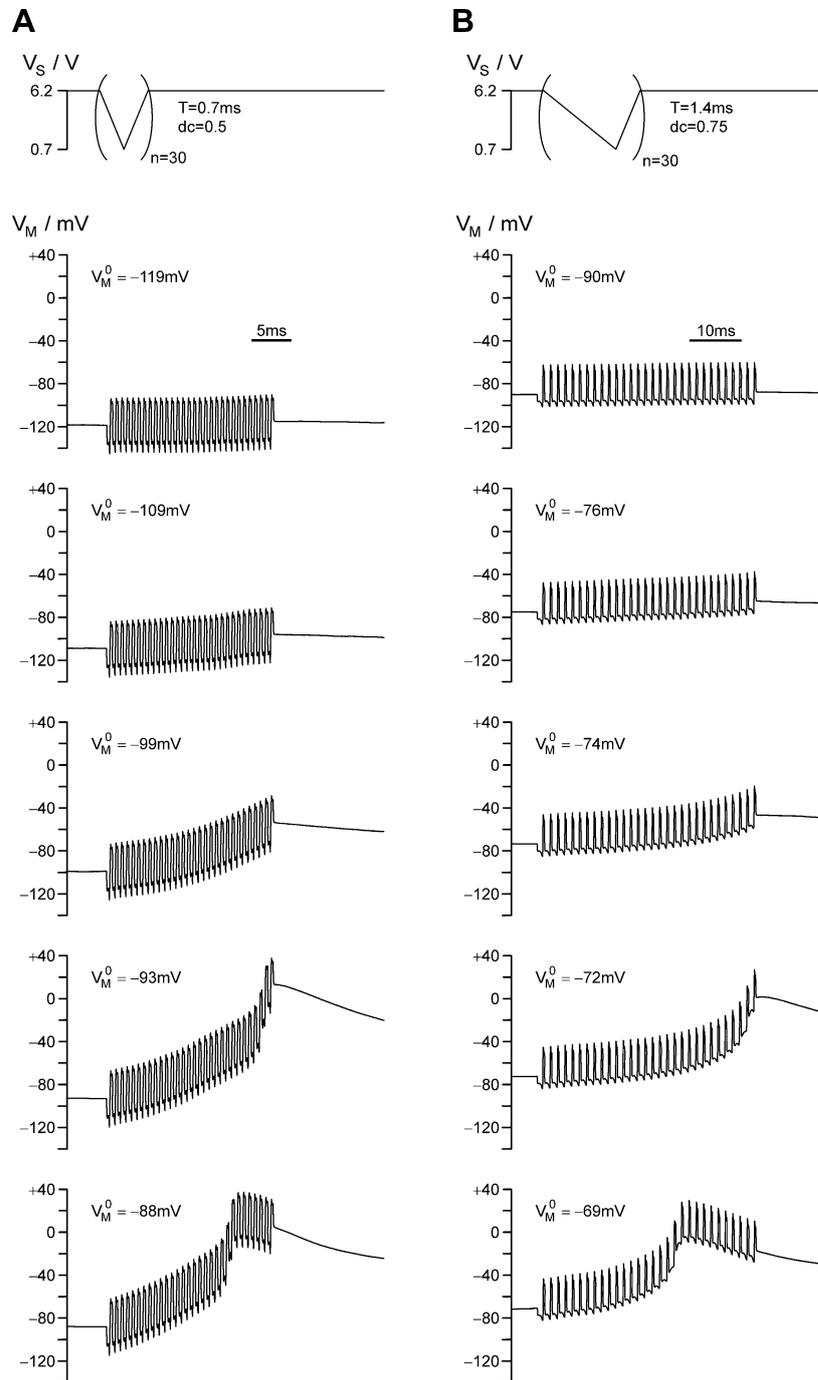


Abbildung 5.8: Einfluss der intrazellulären Ausgangsspannung V_M^0 auf die periodische Stimulation. **A** Symmetrische Pulse mit Tastverhältnis $dc=0.5$ und einer Dauer von $T=0.7\text{ms}$. **B** Asymmetrische Pulse mit Tastverhältnis $dc=0.75$ und einer Dauer von $T=1.4\text{ms}$.

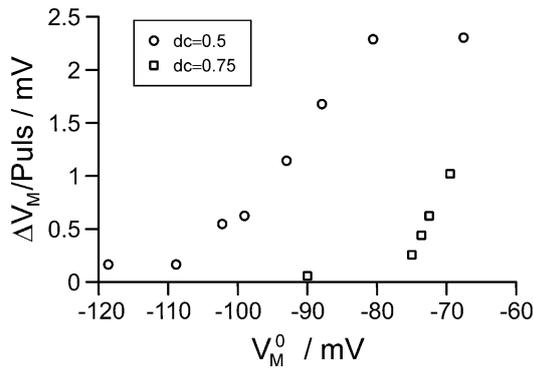


Abbildung 5.9: Effektive Depolarisation ΔV_M pro Puls zu Beginn der Pulsfolge in Abhängigkeit der Ausgangsspannung V_M^0 . Die Werte sind zwei zu Abbildung 5.8 analogen Stimulationsserien entnommen mit Tastverhältnissen $dc=0.5$ (○) und $dc=0.75$ (□).

letztes Bild). Senkt man die Haltespannung auf $V_M^0 = -88\text{mV}$ ab, benötigt man etwa 20 Pulse bis zum Aktionspotential, bei $V_M^0 = -93\text{mV}$ sind es bereits mehr als 25 Pulse. Bei noch niedrigerer Haltespannung $V_M^0 < -95\text{mV}$ reichen die 30 Pulse der Pulsfolge nicht mehr aus, um ein Pseudo-AP auszulösen.

Analog untersuchen wir die Spannungsabhängigkeit für die rechts-lastige Pulsfolge mit dem Tastverhältnis $dc = 0.75$ (Abb. 5.8 B), die ausgehend von $V_M^0 = -80\text{mV}$ nicht in der Lage ist, die Zelle zu erregen. Erhöht man das Haltepotenzial um wenige Millivolt, entwickelt sich eine deutliche Netto-Depolarisation. Bei $V_M^0 = -72\text{mV}$ reicht die Pulsfolge zur Auslösung eines Pseudo-APs aus, von $V_M^0 = -69\text{mV}$ ausgehend wird dieses bereits nach etwa 15 Pulsen erreicht.

Quantifizierung

Parallel zur Absenkung der Haltespannung beobachtet man eine kontinuierliche Abnahme der Steigerungsrate der intrazellulären Spannung während der ersten Pulse. In Abbildung 5.9 ist der mittlere Spannungshub ΔV_M pro Puls ermittelt aus der Steigerung während der ersten drei Pulse einer Serie gegen die Ausgangsspannung V_M^0 aufgetragen.

Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Aktivierungsschwelle von etwa -110mV für symmetrische und -75mV für rechts-lastige Pulse. Die Steigerungsrate wächst bis $V_M^0 = -70\text{mV}$ auf etwa $\Delta V_M = 2.4\text{mV}$ bzw. 1.0mV an.

Das Verhalten bei unterschiedlichen Ausgangsspannungen und unterschiedlicher Steilheit der fallenden Phase entspricht qualitativ den Erwartungen. Die Schwellwerte liegen allerdings bei weitem niedriger, als selbst mutige Abschätzungen anhand des Zwei-Domänen-Modells vorhersagen. Der Mittelwert der Membranspannung ist in diesem Fall ein zu grobes Maß für die Aktivierung der Natriumkanäle in der unteren Membran, vielmehr bestimmt ihr Maximalwert die Aktivierungsschwelle. Dieser Umstand kann im Zwei-Domänen-Modell nicht vollständig berücksichtigt werden². Das diesbezüglich erweiterte Modell in Anhang A.2 trägt ihm hingegen Rechnung.

²Die Wahl des Geometriefaktors $\eta_J = 4\pi$ liefert zwar den Maximalwert V_J^0 der Spaltspannung, diese wird jedoch gemäß dem Flächenverhältnis α_{JM} aufgeteilt, so dass weder Mittel- noch Maximalwert der Polarisation der adhären Membran richtig beschrieben werden, siehe auch Anhang A.2.1.

5.4 Diskussion

5.4.1 Zusammenfassung

Der periodischen Stimulation im Modellsystem liegt die Aktivierung von Natriumkanälen in der Adhäsionsmembran während der fallenden Rampe der Stimulationspulse zugrunde. Die einfache Aktivierung des Natriumeinstroms führt zu einer unterschwelligen Anhebung der intrazellulären Spannung. Die ansteigende Phase hat aufgrund der schwächeren Polarisierung der freien Membran und der stark nichtlinearen Spannungsabhängigkeit der Kanäle zunächst keinen Effekt.

Bei wiederholter Stimulation mit einer Pulsfolge summieren sich die unterschwelligen Antworten. Ab einem gewissen Schwellwert wird ein Aktionspotenzial ausgelöst, für das die Aktivierung der Natriumkanäle in der freien Zellmembran erforderlich ist. Die Stimulation schlägt fehl, wenn (i) die induzierte Depolarisation der adhären Membran an keiner Stelle den Schwellwert für die Aktivierung der Natriumkanäle überschreitet, (ii) deren Öffnungskinetik zu langsam oder (iii) die Steigerungsrate langsamer als die Ausbildung der stationären Inaktivierung ist.

5.4.2 Literaturbezug

Einige der obigen Ergebnisse weisen Ähnlichkeit mit Untersuchungen der Reizung von Nervenfasern und der Leitfähigkeit der Haut in den 30er bis 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts auf.

- Die unvollständige Aktivierung der adhären Membran findet ihre Entsprechung in dem Konzept des sogenannten „non-conducted response“ [Katz37], der die lokale, aber unterschwellige Reizung einer Nervenfasern beschreibt, die die Stimulation mit einem weiteren Puls begünstigt. Ausgehend von diesem Ergebnis postuliert Katz eine Mindestlänge der Erregung, ab der ein propagierter Nervenimpuls „ausgeklinkt“ wird.
- Die Summation unterschwelliger Pulse zu einer überschwelliger Antwort während der Stimulation mit mittel- bis hochfrequenten Wechselspannungen wurde von Martin Gildemeister bei Untersuchungen der Leitfähigkeit der Haut beschrieben [Gild19] [Gild28]. Er beobachtete eine bestimmte „Nutzzeit“ gleichbedeutend mit einer Mindestanzahl an Pulsperioden, die verstreichen musste, bis sich der Reizerfolg einstellte. Als Mechanismus vermutete er einen gleichrichtenden Effekt der Haut. Auch in analogen Untersuchungen der Neurostimulation wurde dieses später als „Gildemeister-Effekt“ bezeichnete Phänomen beobachtet [Brom66b].
- Die Arretierung der intrazellulären Spannung bei anhaltender Stimulation mit mittelfrequenten Wechselpulsen wurde von Kumazawa bei der transversalen Stimulation einer Muskelfaser gefunden [Kuma66]. Möglicherweise existiert ein direkter Bezug zur Wirkungsweise der „Deep Brain Stimulation“ bei Parkinsonpatienten, die ebenfalls mit hochfrequenten Wechselpulsen erfolgt; auch hier wird eine hemmende Wirkung der Stimulation durch einen „depolarisierenden Block“ beobachtet, der auf die Inaktivierung von Natrium- und Calciumkanälen zurückgeführt wird [Garc05].

- *Nomenklatur.* Die unterschwellige Antwort eines Pulses wird gelegentlich als „reaktive“ Depolarisation in Abgrenzung zur „induzierten“ (passiven) Depolarisation während einer Pulsphase bezeichnet [Wyss67]. Die Definition der Begriffe „hochfrequent“ bzw. „mittelfrequent“ in der Literatur ist inkonsistent und überlappend; im Allgemeinen sind Pulse im niedrigen Kilohertz-Bereich von 0.1 . . . 10kHz gemeint. Es wurden sowohl Rechteckpulse als auch sinusförmige Pulse und sowohl monopolare als auch bipolare Elektrodenanordnungen getestet.

Andererseits sind die hier vorgestellten Ergebnisse deutlich abzugrenzen von der Art der periodischen Stimulation, die in der Arbeit von Maximilian Ulbrich [Ulbr03] theoretisch vorgeschlagen wurde. Die genannte Theorie betrachtet das Verhalten eines Ionenkanals beim periodischen Anlegen asymmetrischer Spannungspulse mit Frequenzen im mittleren bis oberen kHz-Bereich. Sie basiert auf der Idee eines „Ratchet“-Mechanismus [Astu02], der die *Besetzungswahrscheinlichkeit* für den offenen Zustand des Kanals bei geeigneten Stimulationsparametern über viele Perioden „pumpt“ bzw. erhöht.

Dies ist in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall, da der hyperpolarisierende Teilabschnitt des Pulses so lang ist, dass der Natriumstrom vollständig deaktiviert, d.h. der offene Zustand weitestgehend entvölkert wird. Es wird also ausschließlich die Intrazellulärspannung gepumpt, nicht die Besetzungswahrscheinlichkeit des offenen Kanalzustands, wenn auch deren Mittelwert über eine Pulsperiode erhöht ist verglichen mit derjenigen, die der durchschnittlichen Membranspannung entspricht.

Kapitel 6

Stimulation von Rattenneuronen

Die Somata von Nervenzellen der Ratte sind von vergleichbarer Größe wie HEK-Zellen, so dass die Kopplungseigenschaften ähnlich sind. Auf dieser Grundlage sollen die Ergebnisse des vorherigen Kapitels auf die Stimulation von Rattenneuronen übertragen werden. Es wird gezeigt, dass eine Stimulation der Rattenneurone mit hochfrequenten Wechselfeldern möglich ist. Eine ausführliche theoretische Diskussion macht jedoch deutlich, dass es schwierig ist, anhand der Messungen zwischen zwei möglichen Mechanismen der Stimulation zu unterscheiden.

6.1 Ergebnisse

Für die Experimente wurden zwei bis vier Wochen alte, dissoziierte Rattenkulturen verwendet. Die Zelle wird am Soma mit der Patch-Pipette kontaktiert; es wurden ausschließlich Zellen gemessen, deren Zellkörper auf dem Reizspot lag.

6.1.1 Erfolgreiche Implementation

Die Daten der Abbildungen 6.1 bis 6.3 gehören zu einem Neuron (28 DIV) mit geringer Eigenaktivität. Der Zellkörper bedeckte eine Fläche von etwa $A_J \approx 400\mu\text{m}^2$. Die Gesamtzellkapazität betrug aufgrund der weit verzweigten Neuriten mehr als $C_M > 30\text{pF}$, der Widerstand der Zellmembran war in der Größenordnung von $R_M = 100\text{M}\Omega$. Die intrazelluläre Spannung im Ruhezustand der Zelle schwankte im Bereich $V_M^0 = -60 \dots -70\text{mV}$. Die passiven Eigenschaften der Zelle haben für die Stimulation zwei direkte Konsequenzen:

- Die Neuriten sind aufgrund ihrer vernachlässigbaren Abdichtung der freien Membran zuzurechnen und das Flächenverhältnis der adhärenierten zur gesamten Membran ist folglich klein ($\alpha_{JM} < 0.15$). Dementsprechend wird die Stimulation erschwert, da der für die reaktive Depolarisation verantwortliche Einstrom mit diesem Flächenverhältnis gewichtet wird.
- Die höhere Grundleitfähigkeit der Membran von $g_L \approx 0.3\text{mS}/\text{cm}^2$ erschwert ebenfalls die Stimulation, da der Leckstrom gegen den für die reaktive Depolarisation verantwortlichen Na^+ -Einstrom arbeitet und jede instantan erzeugte Spannungsänderung mit der Zeitkonstante $\tau_M \approx 3\text{ms}$ zerfällt.

Beide Effekte werden an gegebener Stelle im Kontext der Messungen diskutiert.

Qualitativer Verlauf

Ein symmetrischer Dreieckspuls mit einer Amplitude von $\Delta V_S = 5.2V$ und einer Dauer von $T = 0.4ms$ hinterlässt eine geringfügige Depolarisation (Abb. 6.1 A, erstes Bild). Bei längerer Dauer hatte der Puls keinen oder einen geringeren Effekt (nicht gezeigt). Steigert man die Pulszahl, nimmt die reaktive Depolarisation nach Pulsende stetig zu. Bei 25 Pulsen in Folge wird ein Aktionspotenzial ausgelöst, bei längeren Pulsfolgen erscheint es an ähnlicher Position überlagert von der passiven Modulation.

In Abbildung 6.1 B wird die Ausgangsspannung durch eine konstante Strominjektion durch die Pipette künstlich verändert. Die Applikation einer Pulsfolge mit $n = 30$ Pulsen bei $V_M^0 = -60mV$ führt zu einem Aktionspotenzial nach etwa 15 Pulsen. Eine Erniedrigung der Ausgangsspannung verschiebt die Position des APs nach hinten. Bei einer Ausgangsspannung $V_M^0 < -75mV$ wird die Schwelle für ein Aktionspotenzial nicht mehr erreicht und die effektive Depolarisation nimmt ab, bis sie bei etwa $-100mV$ fast vollends verschwindet.

Quantifizierung

Zur Beurteilung der Stimulationseffizienz tragen wir (i) die Netto-Depolarisation nach Pulsende für die Stimulationsserie aus Abbildung 6.1 A gegen die Pulsanzahl und (ii) die Steigerung der Intrazellulärspannung pro Puls zu Beginn der Pulsfolge für die Stimulationsserie aus Abbildung 6.1 B gegen die Ausgangsspannung auf. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.2 zu sehen.

Teil A der Abbildung verdeutlicht, dass der Anstieg der intrazellulären Spannung im unterschweligen Bereich annähernd linear mit der Pulsanzahl skaliert. Aus einem linearen Fit für $n < 10$ ergibt sich die durchschnittliche Steigerung zu $\Delta V_M = 0.7mV$ pro Puls.

Die Auswertung gemäß Teil B der Abbildung legt eine höhere Steigerungsrate während der ersten Perioden der Pulsfolgen nahe, die bei einer vergleichbaren Ausgangsspannung eine Rate von $\Delta V_M = 1.1mV$ pro Puls ergibt. Dies stimmt mit dem subjektiven Eindruck, dass die Spannungsverläufe in Abbildung 6.1 nach wenigen Pulsen flacher werden, überein. Mögliche Gründe hierfür sind der größere Leckstrom und die damit kleinere Zeitkonstante der Zelle oder ein Effekt des Verstärkers bei kürzeren Pulsen, jeweils verglichen mit den Experimenten an HEK-Zellen.

Kann ein Effekt des Verstärkers ausgeschlossen werden, ist eine Extrapolation der Steigerungsrate aus Abbildung 6.2 B zu niedrigeren Spannungen hin zulässig. Nimmt man einen linearen Verlauf an, so würde der Na^+ -Einstrom bei einer intrazellulären Spannung von $V_M^0 = -125mV$ einsetzen. Dieser Wert ist niedriger als bei den Experimenten an HEK-Zellen (Abb. 5.9), in Übereinstimmung mit der erhöhten Rampensteilheit der Pulse und der damit erhöhten Spaltspannung $\langle V_J \rangle$ sowie dem kleineren Flächenverhältnis α_{JM} .

Effizienz

Bei 6 der 9 gemessenen Nervenzellen reichte die durch die Stimulation erreichbare, reaktive Depolarisation nicht für die Auslösung eines Aktionspotenzials aus. Insbesondere von den Zellen, die weniger als drei Wochen in Kultur waren, konnte keine direkt erregt werden. Bei den erfolgreichen Versuchen lag die Steigerungsrate (vgl. Abb. 6.2) deutlich unter der bei HEK-Zellen und es waren höhere Rampensteilheiten dazu nötig.

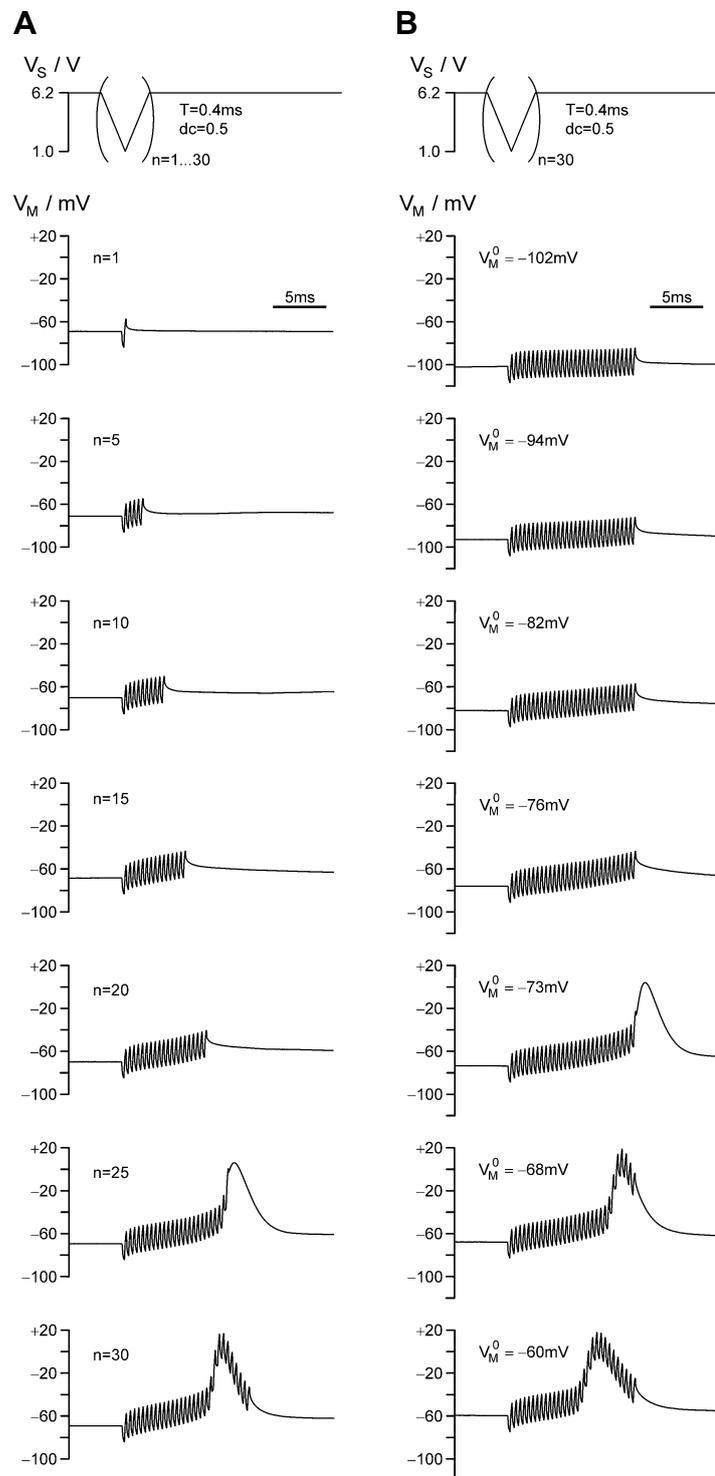


Abbildung 6.1: Periodische Stimulation eines Rattenneurons. **A** Variation der Pulsanzahl. **B** Variation der Ausgangsspannung. Die Pulsparameter sind jeweils oben angegeben.

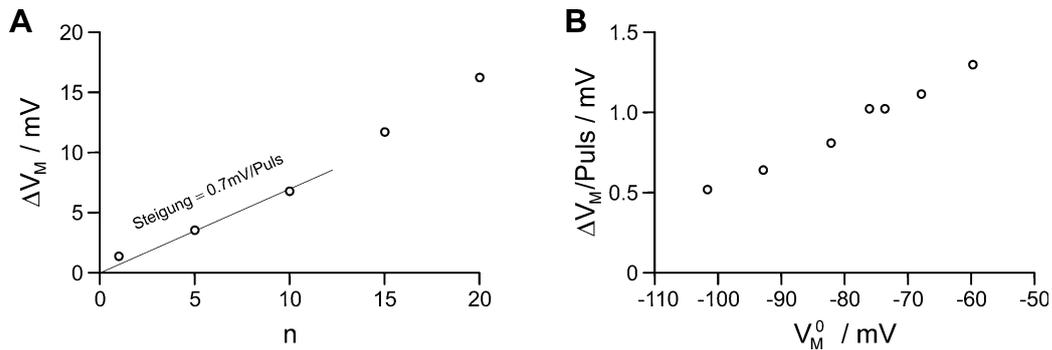


Abbildung 6.2: Depolarisierende Wirkung der periodischen Stimulation. **A** Reaktive Depolarisation in Abhängigkeit der Pulsanzahl und **B** Steigerungsrate in Abhängigkeit der Haltespannung. Die Daten sind den Serien aus Abbildung 6.1 entnommen.

Wir vermuten zwei unterschiedliche Ursachen für dieses Verhalten:

- *Passive Zelleigenschaften.* Obwohl die Somafläche zwischen zweiter und vierter Woche in Kultur noch deutlich zunimmt und die Zell-Chip-Kopplung damit stärker wird, bleibt das ungünstig kleine Flächenverhältnis $\alpha_{JM} < 0.15$ von adhärierter zu gesamter Zellmembran erhalten und sorgt für eine Verringerung des flächenspezifischen Natriumeinstroms.
- *Aktive Zelleigenschaften.* Die Natriumkanaldichte nimmt während der ersten Wochen in Kultur stetig zu [Para01], wodurch ältere Zellen leichter erregbar sind. Die Kanaldichte am Soma ist jedoch auf etwa 10 mS/cm^2 beschränkt und erreicht nicht die um mehr als eine Größenordnungen höheren Werte in anderen, v.a. axonalen Bereichen [Dest99].

6.1.2 Spike-Analyse

Die Effizienz des kapazitiven Stimulationsverfahrens wird für die Zelle aus Abbildung 6.1 getestet, indem eine Pulsfolge zweieinhalb Minuten lang mit einer Frequenz von 4Hz wiederholt wird. Die Parameter der applizierten Pulsfolge sind $\Delta V_S = 5.2 \text{ V}$, $T = 0.4 \text{ ms}$, $dc = 0.5$ und $n = 30$.

Zuverlässigkeit

Zur Erkennung eines Aktionspotenzials wird der gemessene Verlauf der intrazellulären Spannung tiefpassgefiltert (vgl. Abb. 5.7) und eine Detektionsschwelle von -20 mV festgelegt (Abb. 6.3 A). Jedes überschwellige Ereignis im Zeitfenster von 20ms ab Beginn der Pulsfolge wird als erfolgreiche Stimulation eines APs gewertet.

In 566 von insgesamt 600 direkt aufeinander folgenden Versuchen war die Stimulation erfolgreich, was einer Häufigkeit von 94% entspricht (Abb. 6.3 B). Im unstimulierten Fall beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein AP im Detektionsfenster liegt, nur 4% (errechnet aus der beobachteten spontanen Aktivität von durchschnittlich zwei APs pro Sekunde). Wir folgern, dass in mehr als 90% der Fälle die externe Stimulation die alleinige Ursache der Erregung war.

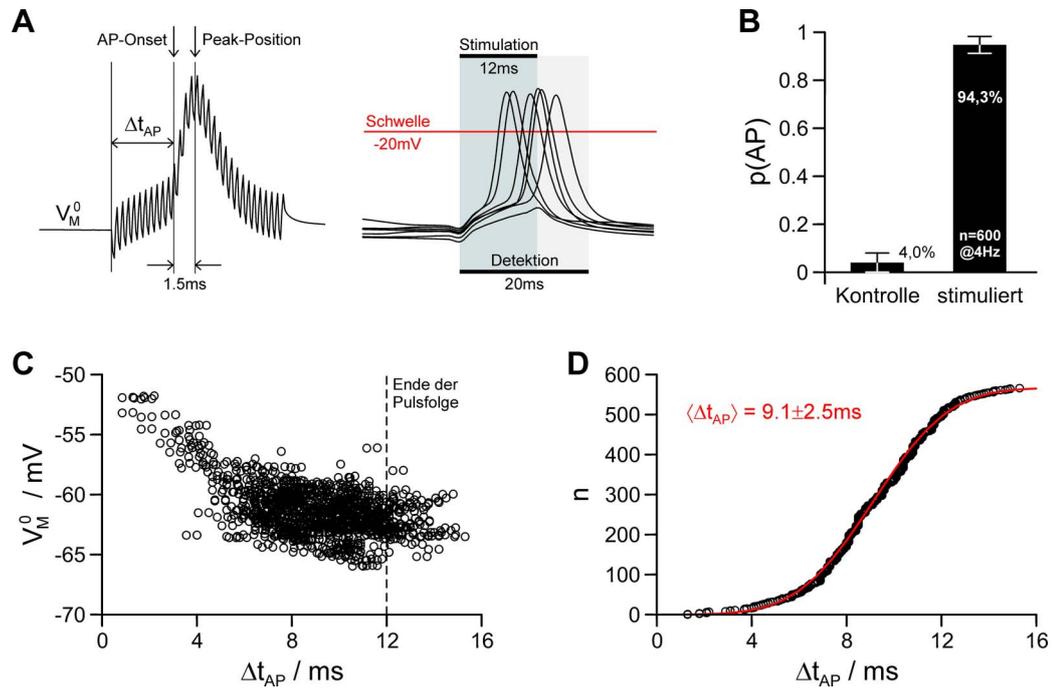


Abbildung 6.3: Stimulationseffizienz bei einer ausgewählten Zelle. **A** Definition der Latenzzeit Δt_{AP} zwischen Stimulations- und Aktionspotenzialanfang (links) sowie Detektionskriterium anhand gefilterter Pulse (rechts). Parameter der Pulsfolge wie in Abbildung 6.1 B. **B** Auftretswahrscheinlichkeit eines APs innerhalb des Detektionsfensters von 20ms mit und ohne kapazitive Stimulation. **C** Abhängigkeit der Latenzzeit Δt_{AP} von der Ausgangsspannung V_M^0 . **D** Statistik der Latenzzeit.

Latenzzeit

Für eine detailliertere Analyse ziehen wir die Latenzzeit Δt_{AP} und die Intrazellulärspannung vor Beginn der Stimulation V_M^0 heran. Die Latenzzeit sei definiert als die Zeit zwischen Stimulationsbeginn und dem Onset des APs als dem Punkt, an dem die Schwelle für die selbstverstärkende Dynamik des Natriumeinstroms überwunden wird. Nachdem Letzterer sich experimentell nicht eindeutig bestimmen lässt, wird behelfsweise die Position des Aktionspotenzialmaximums aus dem gefilterten Spannungsverlauf bestimmt und der Onset einheitlich auf den Zeitpunkt 1.5ms vor dem Maximum festgesetzt (Abb. 6.3 A).

Abbildung 6.3 C zeigt eine Auftragung der Ausgangsspannung gegen die Latenzzeit für die erfolgreichen Stimulationsversuche. Rund um die Ruhespannung von -61mV setzt das Aktionspotenzial etwa $6 \dots 12\text{ms}$ nach Beginn der Stimulation ein. Bei deutlich erhöhter Ausgangsspannung ist die Latenzzeit kürzer; eine lineare Extrapolation der Datenpunkte mit $\Delta t_{AP} < 6\text{ms}$ hin zum Zeitpunkt Null ergibt $V_M = -48\text{mV}$ als Schwellenspannung für die Auslösung des Nervenpulses, in guter Übereinstimmung mit der intrazellulären Stimulation.

Für eine statistische Auswertung ist die Verteilung der beobachteten Latenzzeiten in Abbildung 6.3 D aufgetragen. Die Datenpunkte lassen sich hervorragend durch eine Normalverteilung mit $\langle \Delta t_{AP} \rangle = 9.1 \pm 2.5\text{ms}$ (MW \pm StD) beschreiben. Es müssen also im

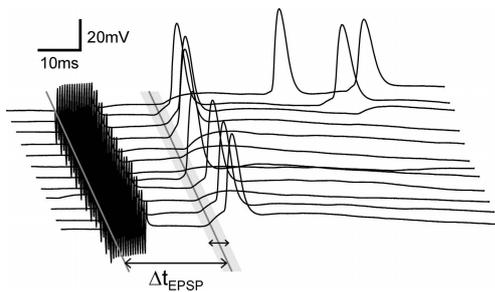


Abbildung 6.4: Indirekte Stimulation mittels Sekundärerregung durch eine weitere Zelle. Ein EPSP erreicht die Zelle zur Zeit Δt_{EPSP} nach Stimulationsbeginn. Dargestellt sind 12 aufeinander folgende Messungen. Die Parameter der Pulsfolge waren $\Delta V_S=5V$, $T=0.5ms$, $dc=0.5$, $n=15$.

Durchschnitt etwa 23 Perioden der Pulsfolge verstreichen, bis die Summation der unter-schwelligeren Antworten eine überschwellige Antwort ergibt.

Das Timing der periodischen Stimulation ist in obigem Fall relativ ungenau. Die große Varianz ist durch die langsame Steigerungsrate der Intrazellulärspannung während der Pulse bedingt. Möchte man das Timing verbessern, so muss eine Möglichkeit gefunden werden, den Natriumeinstrom während der Stimulation zu steigern, zum Beispiel durch eine gezielte Aktivierung von Bereichen mit erhöhter Kanaldichte. Ob eine solche axonale Erregung jedoch erreicht werden kann, ist ungewiss.

6.1.3 Sekundärerregung

Ergänzend zu den bisherigen Ergebnissen wurde bei drei Zellen ein abweichendes Verhalten beobachtet, das hier exemplarisch geschildert werden soll.

Abbildung 6.4 zeigt zwölf aufeinander folgende Messungen eines Neurons, bei denen eine Pulsfolge von 7.5ms Dauer zur Stimulation verwendet wurde. Die reaktive Depolarisation nach Pulsende beträgt jeweils weniger als 5mV. Dennoch wird in etwa 60% der Fälle mehr als 10 Sekunden nach Ende der Stimulation ein Aktionspotenzial detektiert. Aufgrund dieser Merkmale kann eine direkte Stimulation der Zelle, wie sie im vorangegangenen Abschnitt besprochen wurde, ausgeschlossen werden.

Unmittelbar vor dem AP erkennt man eine transiente Anhebung der intrazellulären Spannung als Auslöser der Erregung. Auch in den erfolglosen Versuchen wird im selben Zeitfenster ein wellenförmiges Signal mit einer Amplitude von mehreren Millivolt beobachtet. Wir identifizieren diese Depolarisation mit einem exzitatorischen postsynaptischen Potenzial (EPSP): eine von der Stimulation direkt erregte Zelle feuert ein AP, das bei Erreichen der präsynaptischen Nervenenden zur Ausschüttung von Neurotransmittern führt. Diese binden an und öffnen ligandengesteuerte Ionenkanäle der postsynaptischen Membran und aktivieren einen lokalen Ioneneinstrom. Die Fortpflanzung des entstehenden Spannungssignals über den distalen Dendritenbaum begründet die typische Form des postsynaptischen Signals.

Das EPSP erreicht die gemessene Zelle nach einer Latenzzeit von $\Delta t_{EPSP} = 20 \pm 2ms$ nach Stimulationsbeginn. Nachdem die Primärerregung bis drei Millisekunden nach Stimulationsende abgeschlossen sein müsste (vgl. Latenzzeiten in Abb. 6.3 C), beträgt die Verzögerung der Impulsübertragung rund 10ms. Verzögerungen ähnlicher Größenordnung wurden in Patch-Clamp-Experimenten bei Raumtemperatur an Zellpaaren in dissoziierten Kulturen gefunden [Bi99].

6.2 Diskussion

In diesem letzten Abschnitt werden die gezeigten Ergebnisse intensiv hinterfragt. Aus den Schlussfolgerungen wird schließlich ein Leitfaden für weitere Stimulationsexperimente an Rattenneuronen abgeleitet.

6.2.1 Einfluss der Zellgeometrie

Die wesentlichen Merkmale der periodischen Stimulation wie Spannungsabhängigkeit und Additivität, die anhand des Modellsystems in Kapitel 5 herausgearbeitet wurden, finden sich bei der Stimulation von Rattenneuronen wieder. Eine eingehende Analyse muss jedoch die komplizierte Zellgeometrie berücksichtigen, in der sich Rattenneurone ganz wesentlich vom Modellsystem unterscheiden.

Kabelgleichung des Axons

Eine ausgewachsene Nervenzelle besitzt Verästelungen, die sich über mehrere hundert Mikrometer erstrecken und deren Abdichtung zum Substrat im Folgenden vernachlässigt wird. Die intrazelluläre Spannung V_M entlang z.B. eines Axons mit Radius a_{ax} kann in jedem Segment dx unter der vereinfachenden Annahme $V_M^0 \equiv 0$ durch eine homogene partielle Differenzialgleichung der Form

$$-\lambda^2 \frac{\partial V_M}{\partial x^2} + \tau_M \frac{\partial V_M}{\partial t} + V_M = \tau_M \frac{\partial V_E}{\partial t} + V_E \quad (6.1)$$

beschrieben werden [Rubi88]. Dabei ist $\lambda = (2\pi a_{\text{ax}} g_M \cdot r_{\text{ax}})^{-1/2}$ die Längskonstante des Axons mit dem Längswiderstand $r_{\text{ax}} = \rho_{\text{ax}} / (a_{\text{ax}}^2 \pi)$ und $\tau_M = c_M / g_M$ die Zeitkonstante der Membran, wobei g_M und c_M ihre übliche Bedeutung haben. Für eine Definition der Gleichungsgrößen siehe Abbildung 6.5 A.

Instantane Antwort

Die Extrazellulärspannung besitze den räumlich-zeitlichen Verlauf $V_E(x, t) = V_E(x) \cdot \Theta(t)$ mit einem beliebigen Profil $V_E(x)$ entlang des Axons. Zum Einschaltzeitpunkt $t = 0$ koppelt die Extrazellulärspannung kapazitiv direkt auf die Intrazellulärspannung, so dass überall $V_M(x, t=0) = V_E(x)$ gilt. Gemäß Gleichung 6.1 ist die unmittelbar einsetzende Änderung der Intrazellulärspannung proportional zu ihrer Krümmung

$$\partial_t V_M = \lambda^2 \tau_M^{-1} \cdot \partial_x^2 V_M \quad (6.2)$$

und damit zunächst auch zur Krümmung des extrazellulären Spannungsprofils. Aufgrund dieser Tatsache wird die Funktion $f = \partial_x^2 V_E$ auch als „aktivierende Funktion“ der Stimulation bezeichnet [Ratt86]. Bereiche positiver Krümmung $f > 0$ werden depolarisiert, Bereiche negativer Krümmung $f < 0$ hingegen hyperpolarisiert.

Vereinfachend wird im Folgenden die Annahme gemacht, dass das Axon mittig über die Reizelektrode verlaufe und die Abdichtung vernachlässigbar ist, so dass an jedem Ort x eine einheitliche Elektrolytspannung rund um die Nervenfasern herrsche. Das analytische Spannungsprofil $V_E(x, z=0)$ an der Oberfläche gemäß Gleichung 3.6 weist in seiner zweiten

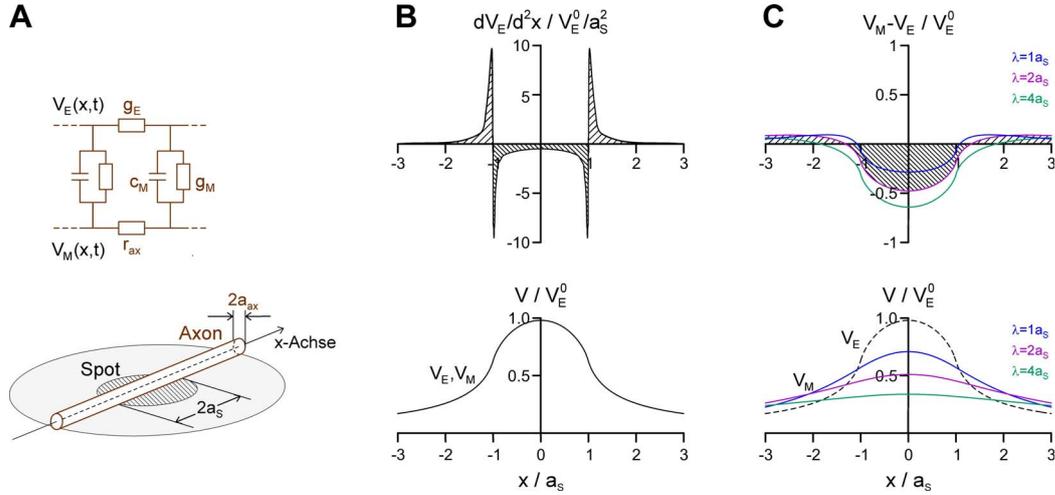


Abbildung 6.5: Prinzip der longitudinalen Reizung. **A** Schematische Darstellung (nicht maßstabsgetreu) und elektrisches Äquivalenzschaltbild eines die Reizelektrode kreuzenden Axons. **B** Aktivierende Funktion $\partial_x^2 V_E$ (oben) nach Einschalten der Elektrolytspannung (unten), jeweils im Abstand $z = 0.01a_s$ zur Oberfläche. **C** Stationäre Polarisation $V_M - V_E$ (oben) nach Erreichen des stationären Endzustands der intrazellulären Spannung V_M (unten) für verschiedene Längskonstanten $\lambda = 1, 2, 4a_s$.

Ableitung eine Polstelle bei $x = a_s$ auf, wo das Vorzeichen von $-\infty$ zu $+\infty$ wechselt. Das realistischere Profil bei $z = a_{ax}$ knapp über der Oberfläche hat seine stärkste Krümmung bei ca. $|x| = a_s \pm a_{ax}$, so dass die Faser nahe den Elektrodenrändern am raschesten de- bzw. hyperpolarisiert wird (Abb. 6.5 B). Über das Vorzeichen der aktivierenden Funktion entscheidet das Vorzeichen der Elektrolytspannung: bei $V_E^0 < 0$ wird der Faserabschnitt über der Elektrode depolarisiert, bei $V_E^0 > 0$ sind es die Bereiche außerhalb.

Stationärer Fall

Die Theorie der aktivierenden Funktion ist gültig, solange die Form der intrazellulären Spannung der der Elektrolytspannung ähnlich ist, oder, oftmals gleichbedeutend damit, solange $t \ll \tau_M \lambda^{-2}$. Im umgekehrten Fall erreicht die intrazelluläre Spannung ihren stationären Verlauf, der gemäß Gleichung 6.1 durch

$$V_M - V_E = \lambda^2 \cdot \partial_x^2 V_M \quad (6.3)$$

bestimmt ist. Abbildung 6.5 C zeigt den Einfluss der Längskonstante λ auf den Verlauf: je größer die Längskonstante, (i) desto flacher ist der Verlauf der intrazellulären Spannung, (ii) desto weiter außen findet der Übergang zwischen De- und Hyperpolarisation (Schnittpunkt von V_M und V_E) statt und (iii) umso ausgeprägter ist die Netto-Polarisation über der Elektrode.

Der Übergang von der transienten zur stationären Antwort erfolgt auf der Zeitskala der reduzierten Zeitkonstante $\tau_M^* = \tau_M \lambda^{-2}$ mit der Längskonstante λ in Einheiten von a_s . Für typische Werte $\lambda = 450 \mu\text{m}$ [Alle06], $a_s = 125 \mu\text{m}$, $\tau_M = 3 \text{ms}$ erfolgt der Übergang zum stationären Fall nach $\tau_M^* \approx 0.2 \text{ms}$ und liegt damit im Bereich der Rampendauer eines Einzelpulses.

Auswirkung auf das Reizverhalten

Eine fallende Rampe der Chipspannung $dV_S/dt < 0$ erzeugt eine negative Elektrolytspannung $V_E^0 < 0$, die das Axon im Bereich der Elektrode de- und seitlich davon hyperpolarisiert. Die Depolarisation entwickelt sich nahe des Elektrodenrandes am schnellsten (vgl. Abb. 6.5 B) und beträgt im stationären Fall typischerweise $(V_M - V_E) = -1/4 \dots -1/2 \cdot V_E^0$ (vgl. Abb. 6.5 C), der jedoch aufgrund der beschränkten Rampendauer $dc \cdot T \approx \tau_M^*$ nicht erreicht wird.

Die Kabelgleichung 6.1 gilt für ein Axon mit konstantem Durchmesser und homogenen Membraneigenschaften. Befindet sich der Zellkörper auf dem Reizspot, so sind (i) die Kabeleigenschaften lokal verändert und (ii) werden die Transmembranspannungen zusätzlich durch die kapazitive Einkopplung der lokalen Spaltspannung beeinflusst. In der folgenden Betrachtung wird der erste Effekt vernachlässigt.

Gemäß Gleichung 5.3 ist die kapazitive Polarisation der freien Membran durch die Spaltspannung V_J aufgrund des kleinen Anteils der adhärierten an der gesamten Membran gering. Zudem erfolgt die Aufladung des axonalen Bereichs der „freien“ Membran aufgrund des Längswiderstandes r_{ax} verzögert. Während einer fallenden Rampe wird die freie Membran deshalb nur schwach hyperpolarisiert, während der Großteil der Spaltspannung als Depolarisation über die adhärierte Membran abfällt. Durch die zusätzliche Relaxation der intrazellulären Spannung aufgrund der Kabeleigenschaften des Axons wird nun beiden Transmembranspannungen die sich entwickelnde Depolarisation überlagert. Ist die Elektrolytspannung groß und die Rampe lang, kann die schwache kapazitive Hyperpolarisation der freien Membran sogar in eine effektive Depolarisation umschlagen, während die Depolarisation der adhärierten Membran weiter verstärkt wird. Für ansteigende Rampen drehen sich alle Vorzeichen um, der zeitliche Verlauf bleibt derselbe.

Insgesamt wird also die Reizwirkung fallender Rampen verstärkt und auf die den Reizspot kreuzenden Neuriten ausgedehnt, während die Reizwirkung ansteigender Rampen abgeschwächt wird. Da die Natriumkanaldichte im Axon mehr als 10mal größer ist als im Soma [Dest99], können bereits Depolarisationen in der Größenordnung von 10mV ein Aktionspotenzial initiieren. Bei Pulsfolgen mit Parametern wie in den Abbildungen 6.1 bis 6.4 treten extrazelluläre Spannungen von bis zu ± 40 mV auf. Es ist deshalb durchaus möglich, dass die longitudinale Reizung des Axons auf Basis des Gildemeister-Effekts bei den gezeigten Messungen eine Rolle spielt oder der Erregung sogar vorzüglich zugrunde liegt.

Auswirkung auf die Messung

Das gemessene intrazelluläre Signal ist die Summe aus der Spannungsänderung der freien Membran und der Elektrolytspannung. Aufgrund des kleinen Flächenverhältnisses α_{JM} und der langsamen Dynamik der intrazellulären Spannungsrelaxation dominiert die Elektrolytspannung, was quantitative Aussagen über die Transmembranspannungen während der Stimulation unmöglich macht.

In der Messung von Abbildung 6.1 wird zudem beobachtet, dass die Amplitude der Modulation weniger als 15mV beträgt und damit sogar geringer ist als die erwartete Änderung der Elektrolytspannung, die sich mithilfe von Gleichung 5.2 zu $V_E = \pm 27$ mV abschätzen lässt. Dies wird versuchsweise auf (i) die Filterung der intrazellulären Spannung mit 8.4kHz

durch den Patch-Clamp-Verstärker, oder (ii) die randnahe Position der Zelle zurückgeführt. Zusammengefasst gibt die Modulation jedenfalls keinen direkten Aufschluss über die effektive Polarisation weder der freien noch der adhären Membran.

6.2.2 Zusammenfassung

Die Stimulation von einzelnen Nervenzellen der Ratte wurde auf Basis des Gildemeister-Effekts erfolgreich implementiert. Die Messungen zeigen die charakteristischen Merkmale der Summation unterschwelliger Reize und deren Spannungsabhängigkeit sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der Erregung und des Timings. Der Anteil der auf diese Weise erregbaren Zellen war stark abhängig von der Kulturdauer und betrug etwa 30%.

Das Reizverhalten der gesamten Zelle wird durch die Summe aus der *transversalen* Stimulation des Zellkörpers durch die Spaltspannung V_J und der *longitudinalen* Stimulation der angrenzenden Nervenfasern durch die Elektrolytspannung V_E im Bereich der Elektrode bestimmt. Eine Unterscheidung der beiden Mechanismen war bei der benutzten Messanordnung nicht möglich.

6.2.3 Experimenteller Ausblick

Folgende Punkte konnten in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und sollten bei der Planung zukünftiger Experimente berücksichtigt werden:

(1) Verbesserung und Erweiterung der Messmethodik.

- Eine höhere Filterfrequenz reduziert die Verzerrung der Spannungssignale.
- Eine potentiostatische Messanordnung mit einer Referenzelektrode direkt neben oder über dem Zellkörper eliminiert die Komponente der Elektrolytspannung im intrazellulären Signal und ermöglicht Aussagen über die Änderung der effektiven Transmembranspannung.
- Eine Anfärbung der Zellmembran mit spannungssensitiven Farbstoffen ermöglicht eine orts aufgelöste, direkte Detektion von Änderungen der Transmembranspannung der unteren Membran.
- Ungestörte Messungen können durch den Block der für die synaptische Übertragung verantwortlichen NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren mittels spezifischer (AP5 bzw. CNQX [Jimb00]) oder unspezifischer (2mM Mg^{2+} im Medium [Wage04]) Antagonisten erreicht werden, so dass Sekundärerregungen (vgl. Abschnitt 6.1.3) vermieden werden.

(2) Klärung des Stimulationsmechanismus.

- Der Einsatz kleinerer, der Zellsomagröße angepasster Reizelektroden verringert die Elektrolytspannung in der Umgebung der Zelle drastisch, so dass eine longitudinale Stimulation der Nervenfortsätze ausgeschlossen werden kann. Die gezielte Positionierung des Somas, die die Ausbeute drastisch reduziert, ist bei Verwendung eines Chips mit ausreichend vielen Reizelektroden obsolet.

- Es sollte die alleinige longitudinale Stimulation eines Axons untersucht werden, ohne dass der Zellkörper auf der Reizelektrode liegt. Für die Identifizierung einzelner Fasern ist jedoch eine deutlich niedrigere Zelldichte nötig.
- Weitere Untersuchungen müssen die Frequenzabhängigkeit des Gildemeister-Effekts berücksichtigen [Brom66a].

(3) Überprüfung der Anwendbarkeit.

- Mehr Messungen sind für eine fundierte Statistik der Stimulationseffizienz nötig.
- Die Langzeitverträglichkeit der Stimulation sollte mittels cell-attached Patch-Clamp [Perk06] oder Ca^{2+} -Imaging [Knop06] überprüft werden.
- Die Ergebnisse sollten bei physiologischer Badtemperatur 37°C reproduziert werden. Eine Abwägung der Abnahme der Kopplung durch die beschleunigte Diffusion im Elektrolyt [Kuyu94] gegen die Zunahme der Natriumströme [Schw87] aufgrund einer schnelleren Kinetik¹ ist vielversprechend.

¹siehe z.B. [Irvi99]; bei vergleichbarer Einzelkanalleitfähigkeit [Milb95]

Kapitel 7

Ergebnisse und Ausblick

Ergebnisse

1. Die vorliegende Arbeit entwirft ein klares Bild der elektrophysiologischen Vorgänge bei der Stimulation individueller, adhärierter Nervenzellen mithilfe von Elektrolyt/Oxid/Silizium-Kondensatoren.
2. Das System Zelle-auf-Chip wurde mit elektrischen, optischen und elektrophysiologischen Methoden eingehend charakterisiert.
3. Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Stimulation auf der kapazitiven Polarisierung der Zellmembran, die durch eine lokale Änderung der Elektrolytspannung nahe der Reizelektrode hervorgerufen wird, und dem Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle beruht.
4. Das Verhalten wurde anhand von Schneckenneuronen aus *Lymnaea stagnalis* und HEK-Zellen mit rekombinanten Natriumkanälen studiert und konnte mithilfe mathematischer Modelle analytisch beschrieben werden.
5. Säugetierneurone konnten den schwachen Kopplungsbedingungen zum Trotz durch periodische bipolare Pulsfolgen unter Ausnutzung der Summation unterschwelliger Reize in 30% der Fälle erfolgreich stimuliert werden.

Ausblick

1. Die gefundenen Ergebnisse sind in vollem Umfang übertragbar auf planare Metall-elektroden, da sie unabhängig von der Natur des Elektrodenstroms sind. Für eine Übertragung auf die Situation im Gewebe muss der Ansatz jedoch erweitert werden.
2. Vor der routinemäßigen Anwendung in dissoziierten Rattenkulturen muss der genaue Mechanismus der Stimulation mithilfe kleinerer Elektroden abschließend geklärt und die Verlässlichkeit der Stimulation gesteigert werden.
3. Eine mögliche, zukünftige Anwendung ist das synaptische Remodeling durch paarweise Stimulation der prä- und postsynaptischen Zelle [Bi98]. Ein genaueres Timing durch weitere Verbesserungen der periodischen Stimulation wäre hierfür wünschenswert.

Anhang A

Ergänzungen

A.1 Ausarbeitung des Flächenkontaktmodells

Die folgenden Abschnitte behandeln die räumliche und zeitliche Entwicklung der Spaltspannung während der kapazitiven Stimulation. Dazu wird das Flächenkontaktmodell mit passiven Membranparametern unter Voltage-Clamp-Bedingungen $V_M = 0$ analytisch gelöst.

A.1.1 Analytische Lösung für kapazitive Stimulation

Unter Vernachlässigung jeglicher Membranleitfähigkeit $g_{JM} = 0$ lautet die Kabelgleichung in Zylinderkoordinaten

$$-\frac{1}{r_J} \left(\frac{\partial^2 V_J}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial V_J}{\partial a} \right) + (c_S + c_M) \frac{\partial V_J}{\partial t} = i_S \quad (\text{A.1})$$

mit einer homogenen Quellstromdichte $i_S \equiv i_S(t)$. Diese Gleichung soll für den Fall einer Rampe und eines Sprunges in der Chipspannung mithilfe der Methode der Laplace-Transformation gelöst werden. Eine allgemeine Beschreibung der Methode findet sich in Carslaw [Cars59] im Abschnitt 12.3.

Rampe

Eine zum Zeitpunkt $t = 0$ einsetzende Rampe entspricht einer Quellstromdichte $i_S(t) = \Theta(t) \cdot c_S \Delta V_S / \Delta t_S$ mit der Heaviside-Funktion $\Theta(t)$. Nach Einsetzen in Gl. A.1 und der Laplace-Transformation ergibt sich die Subsidiärgleichung

$$\frac{\partial^2 \bar{V}_J}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial \bar{V}_J}{\partial a} - r_J (c_S + c_M) p \cdot \bar{V}_J = -\frac{r_J c_S \Delta V_S}{p \Delta t_S} \quad (\text{A.2})$$

für die Laplace-Transformierte $\bar{V}_J(p)$, die unter der Randbedingung $\bar{V}_J(\bar{a}_J) = 0$ zu der bekannten Lösung

$$\bar{V}_J = \frac{c_S}{c_S + c_M} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \left(\frac{1}{p^2} - \frac{I_0(qa)}{p^2 I_0(qa_J)} \right) \quad (\text{A.3})$$

führt, wobei die Abkürzung $q = \sqrt{r_J(c_S + c_M)}$ verwendet wurde. Mithilfe des Inversions-Theorems für Laplace-Transformationen ergibt sich daraus die Lösung¹

$$V_J(a, t) = \frac{A_J r_J c_S}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \left[\left(1 - \frac{a}{a_J}\right) - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^3 J_0(x_n a/a_J)}{x_n^3 J_1(x_n)} \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \right] \quad (\text{A.4})$$

$$\tau_n = \frac{(c_S + c_M) r_J a_J^2}{x_n^2} \quad (\text{A.5})$$

Die x_n sind dabei die Nullstellen von $J_0(x_n) = 0$. Das stationäre Parabelprofil setzt sich demnach aus einer Serie von Besselfunktionen zusammen, die mit unterschiedlichen Zeitkonstanten τ_n relaxieren. Etwas übersichtlicher schreibt man

$$V_J(a, t) = \frac{A_J r_J c_S}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^3 J_0(x_n a/a_J)}{x_n^3 J_1(x_n)} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \right] \quad (\text{A.6})$$

und der Mittelwert der Spaltspannung nimmt den zeitlichen Verlauf

$$\langle V_J \rangle = \frac{A_J r_J c_S}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^4}{x_n^4} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \right]. \quad (\text{A.7})$$

Abbildung A.1 A zeigt zur Veranschaulichung eine normierte Auftragung des räumlich-zeitlichen Verlaufs (*oben*) sowie des Profils (*Mitte*) und des Zeitverlaufs (*unten*) der Spaltspannung für ausgewählte Zeiten bzw. Radii.

Stufe

Eine zum Zeitpunkt $t = 0$ applizierte Stufe wird durch den Quellstrom $i_S(t) = \delta(t) \cdot c_S \Delta V_S^0$ mit der Dirac'schen Delta-Funktion $\delta(t)$ beschrieben. Das Vorgehen ist analog zum vorherigen Abschnitt und liefert die Lösung²

$$V_J(a, t) = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_S + c_M} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 J_0(x_n a/a_J)}{x_n J_1(x_n)} \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (\text{A.8})$$

mit dem Mittelwert

$$\langle V_J \rangle = \frac{c_S \Delta V_S^0}{c_S + c_M} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^2}{x_n^2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right). \quad (\text{A.9})$$

Die Spaltspannung ist zum Zeitpunkt $t = 0$ ein Rechteck, das mit der Zeitkonstante τ_2 auf das Profil der Besselfunktion J_0 relaxiert und anschließend mit der Zeitkonstante τ_1 vollständig abklingt, siehe auch Abbildung A.1 B.

¹siehe [Cars59], Kapitel 13.2., Fall VI, Gl. (24)

²vgl. auch [Cars59], Kapitel 13.2., Fall I, Gl. (7)

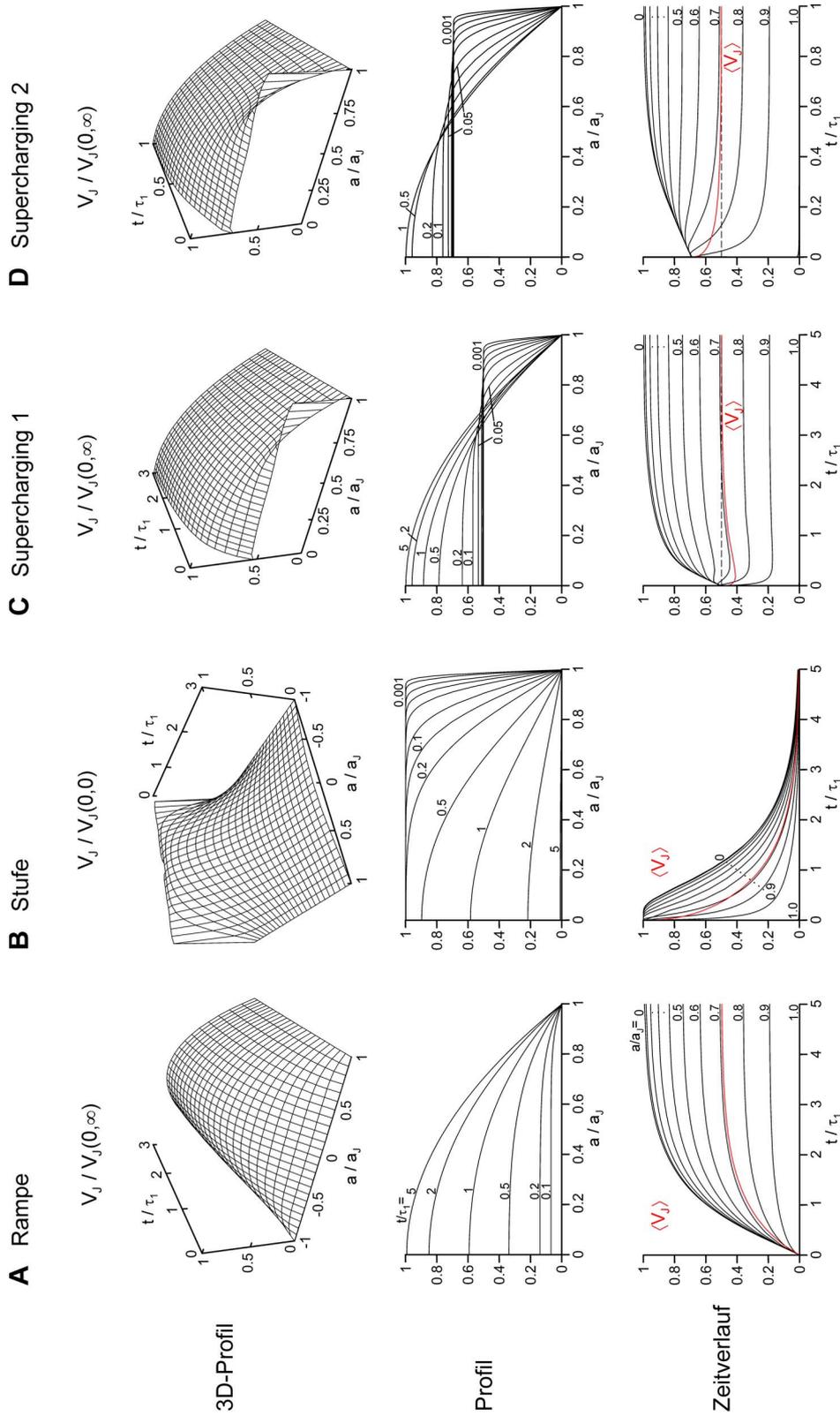


Abbildung A.1: Räumlich-zeitlicher Verlauf der Spaltspannung im Flächenkontaktmodell **A** nach Beginn einer Rampe, **B** nach einer Stufe, **C** und **D** beim Supercharging mit unterschiedlichen Stufenhöhen. Normierte Auftragung in Einheiten des Adhäsionsradius a_J , der Zeitkonstante τ_1 und der maximalen Spaltspannung. oben: vollständiger Verlauf, Mitte: Spannungsprofil für ausgewählte Zeitpunkte, unten: Zeitverlauf an ausgewählten Stellen der Adhäsionsfläche.

Supercharging

Zur Behandlung des Superchargings werden zwei Ansätze betrachtet, die die Beziehung zwischen der Stufenhöhe ΔV_S^0 und der Rampensteilheit $\Delta V_S/\Delta t_S$ anhand (i) der Amplitude des Mittelwertes der Spaltspannung $\langle V_J \rangle$ oder (ii) der langsamsten Zeitkonstante τ_1 herstellen.

Im ersten Fall wird gefordert, dass der Mittelwert der Spaltspannung unmittelbar nach dem Sprung (Gl. A.9 für $t = 0$) gleich dem stationären Wert der Rampe (Gl. A.7 für $t \rightarrow \infty$) sei. Der Vergleich ergibt

$$\Delta V_S^0 = \frac{(c_S + c_M)A_J r_J}{8\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} = \frac{c_S + c_M}{g_J^{(8\pi)}} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S}, \quad (\text{A.10})$$

identisch dem Ergebnis des Zwei-Domänen-Modells.

Abbildung A.1 C zeigt die Dynamik der Spaltspannung. Deren Mittelwert (*unten, rot*) sackt direkt nach der Stufe ab, bevor er mit der Zeitkonstante τ_1 dem stationären Wert entgegenstrebt. Im Vergleich zum Fall ohne Stufe (Abb. A.1 A) ist die Abweichung vom Endwert insgesamt geringer, die Annäherung an diesen besitzt jedoch einen ähnlichen Zeitverlauf.

Möchte man den stationären Wert schneller erreichen, so muss man die langsamste Zeitkonstante vollständig eliminieren. Dies ist möglich, indem man die Koeffizienten der entsprechenden Exponentialfunktion in den Gleichungen A.9 und A.7 miteinander identifiziert. Die Stufenhöhe resultiert zu

$$\Delta V_S^0 = \frac{(c_S + c_M)A_J r_J}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \frac{2^2}{x_1^2} = \frac{c_S + c_M}{g_J^{(5.78\pi)}} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S}, \quad (\text{A.11})$$

sie ist also proportional zur dynamischen Zeitkonstante τ_J des Zwei-Domänen-Modells.

Die mittlere Spaltspannung direkt nach der Stufe ist damit zwar um den Faktor $8/5.78$ erhöht gegenüber dem Endwert der Rampe, klingt aber mit der um ca. $1/5$ kürzeren Zeitkonstante τ_2 ab (Abb. A.1 D, man beachte die unterschiedlichen Zeitskalen).

Welche der beiden Stufenhöhen soll man wählen? Im ersten Fall wird die stationäre Spaltspannung erst verzögert erreicht, der zweite Fall führt zu einem anfänglichen Überschwinger, entspricht aber besser dem eigentlichen Sinn des Supercharging, die Aufladung des Kernmantelleiters zu beschleunigen. Experimentell ist es aufgrund der Filterung des Messsignals und der spannungsabhängigen Oxidkapazität jedoch schwierig, einen der beiden Fälle exakt einzustellen.

A.1.2 Berücksichtigung der Membranleitfähigkeiten

Im Folgenden wird die Lösung des Flächenkontaktmodells für den allgemeinen Fall einer nicht-verschwindenden Membranleitfähigkeit g_{JM} vorgestellt. Die Kabelgleichung A.12 ist um einen entsprechenden Term ergänzt.

$$-\frac{1}{r_J} \left(\frac{\partial^2 V_J}{\partial a^2} + \frac{1}{a} \frac{\partial V_J}{\partial a} \right) + g_{JM} V_J + (c_S + c_M) \frac{\partial V_J}{\partial t} = i_S. \quad (\text{A.12})$$

Die Herleitung soll anhand rein qualitativer Argumente erfolgen; eine Verifizierung durch die Methode der Laplace-Transformation steht noch aus.

Grundgedanke

Es wird angenommen, dass die zeitliche Entwicklung des Spannungsprofils weiterhin beschrieben werden kann als eine Summe von Exponentialfunktionen, deren Koeffizienten proportional zu den Besselfunktionen $J_0(x_n a/a_J)$ sind.

Ist dies der Fall, so lässt sich insbesondere auch das stationäre Profil durch eine entsprechende Fourier-Bessel-Reihe³ beschreiben, deren Koeffizienten b_n sich aus dem bekannten Profil berechnen lassen.

$$V_J(a, \infty) = \sum_{n=1}^{\infty} b_n J_0(x_n a/a_J) \quad \text{mit} \quad b_n = \frac{2}{J_1^2(x_n)} \int_0^1 t V_J(t) J_0(x_n t) dt \quad (\text{A.13})$$

Die Zeitkonstanen der Relaxation werden anschließend so gewählt, dass die beiden Grenzfälle $g_{JM} \rightarrow 0$ und $r_J \rightarrow \infty$ enthalten sind.

Profil bei stationärer Rampe

Löst man Gleichung A.12 für $\partial_t V_J = 0$ mit einem konstanten Quellstrom $i_S = c_S \Delta V_S / \Delta t_S$, erhält man das Profil

$$V_J(a, \infty) = \frac{c_S}{g_{JM}} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \left(1 - \frac{I_0(\xi a/a_J)}{I_0(\xi)} \right) \quad \text{mit} \quad \xi = a_J \sqrt{g_{JM} r_J}, \quad (\text{A.14})$$

wobei I_0 die modifizierte Besselfunktion nullter Ordnung bezeichnet. Dieses Profil eingesetzt in Gleichung A.13 liefert die Koeffizienten

$$b_n = \frac{a_J^2 r_J c_S}{\xi^2} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \frac{2\xi^2}{(x_n^2 + \xi^2) x_n J_1(x_n)} \quad (\text{A.15})$$

und die zugehörige Fourier-Bessel-Serie. In dieser sind die Grenzfälle der Parabel für $g_{JM} \rightarrow 0$ (vgl. Gl. A.6) und eines Rechtecks für $r_J \rightarrow \infty$ (vgl. Gl. A.8) enthalten.

Zeitkonstanten

Die Zeitkonstanten müssen im Grenzfall verschwindender Membranleitfähigkeit $g_{JM} \rightarrow 0$ in Gleichung A.5 übergehen. Im entgegengesetzten Grenzfall $r_J \rightarrow \infty$ fließt kein Strom mehr entlang des Spaltes, das Aufladen jedes infinitesimalen Teilbereichs des kapazitiven Mantels muss mit der Zeitkonstante $(c_S + c_M)/g_{JM}$ erfolgen. Auf dieser Grundlage werden die Zeitkonstanten gemäß

$$\tau_n = \frac{(c_S + c_M) r_J a_J^2}{\xi^2 + x_n^2} \quad (\text{A.16})$$

definiert, die beide geforderten Grenzfälle beinhalten.

³siehe [Wats44], Kapitel 18.1

Lösung für Rampe

Der räumlich-zeitliche Verlauf der Spaltspannung wird somit durch die Gleichung

$$V_J(a, t) = \frac{c_S}{g_{JM}} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \left(1 - \frac{I_0(\xi a/a_J)}{I_0(\xi)} \right) - \sum_{n=1}^{\infty} b_n J_0(x_n a/a_J) \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (\text{A.17})$$

beschrieben mit den Koeffizienten b_n gemäß Gleichung A.15 und den Zeitkonstanten τ_n gemäß Gleichung A.16. Diese Gleichung lässt sich auf die etwas kompaktere Form

$$V_J(a, t) = \frac{A_{JR} J_{CS}}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^3 J_0(x_n a/a_J)}{(\xi^2 + x_n^2) x_n J_1(x_n)} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \right] \quad (\text{A.18})$$

bringen und die Mittelwertbildung liefert schließlich

$$\langle V_J \rangle = \frac{A_{JR} J_{CS}}{4\pi} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2^4}{(\xi^2 + x_n^2) x_n^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \right]. \quad (\text{A.19})$$

A.2 Quasi-stationäres Modell der periodischen Stimulation

In diesem Teil des Anhangs wird basierend auf dem Flächenkontaktmodell eine erweiterte Theorie zur Beschreibung der periodischen Stimulation ausgearbeitet, die eine quantitative Interpretation der Experimente an HEK-Zellen (Kapitel 5) ermöglicht.

A.2.1 Grundlagen

Gemäß den Gleichungen 2.17 und 2.18 aus dem Theorieteil hat die Spaltspannung V_J im stationären Fall einen parabelförmigen Verlauf

$$V_J(a) = \left(1 - \frac{a^2}{a_J^2} \right) \cdot 2 \langle V_J \rangle \quad (\text{A.20})$$

mit der mittleren Spaltspannung $\langle V_J \rangle$, die der Spaltspannung V_J im Zwei-Domänen-Modell entspricht. Ihre Amplitude im Zentrum der Adhäsionsmembran bei $a=0$ ist doppelt so groß wie ihr Mittelwert.

Abbildung A.2 A verdeutlicht, wie sich die extrazelluläre Spannung auf die Transmembranspannungen auswirkt. Die Spannung über die freie Membran ändert sich einheitlich um den Betrag $\Delta V_{FM} = \alpha_{JM} \langle V_J \rangle$. Die Änderung der Spannung ΔV_{JM} über die adhäreren Membran spiegelt den Verlauf der Spaltspannung wider, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen und um den Betrag ΔV_{FM} angehoben, um einen stetigen Übergang zur freien Membran an den Rändern der Adhäsion zu gewährleisten. Der Mittelwert kommt entsprechend der Halbamplitude der Parabel bei $\langle \Delta V_{JM} \rangle = (\alpha_{JM} - 1) \langle V_J \rangle$ zu liegen. Der Spannungsverlauf im Voltage-Clamp entspricht dem Fall $\alpha_{JM}=0$.

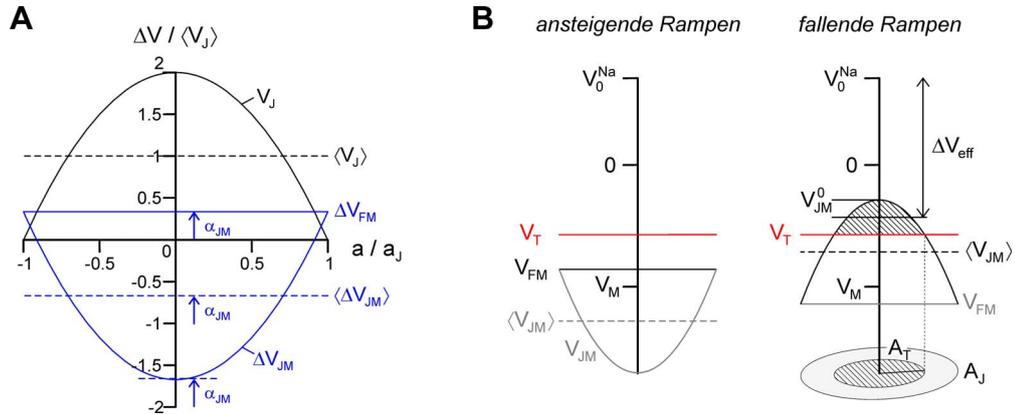


Abbildung A.2: Grundlagen des quasi-stationären Modells der periodischen Stimulation. **A** Stationäre Profile und Mittelwerte der Spannungsänderungen von Spalt, adhärierter und freier Membran in Einheiten der mittleren Spaltspannung $\langle V_J \rangle$. **B** Fallende Rampen aktivieren Natriumkanäle oberhalb des Schwellwertes V_T in dem begrenzten Bereich A_T der adhärerten Membran, ansteigende Rampen haben zunächst keinen aktivierenden Effekt.

Der Spannungsverlauf über die adhärte Membran wird vom Zwei-Domänen-Modell nur unzureichend wiedergegeben. Da das Verhältnis von Maximal- zu Mittelwert der Transmembranspannung

$$\frac{\Delta V_{JM}^0}{\langle \Delta V_{JM} \rangle} = \frac{\alpha_{JM} - 2}{\alpha_{JM} - 1} \quad (\text{A.21})$$

beträgt, ist die Spannungsänderung im Zentrum der Adhäsionsmembran zwischen 2mal (Voltage-Clamp) bis 3mal größer als der Mittelwert des Zwei-Domänen-Modells. Insgesamt die Hälfte der Adhäsionsmembran A_J wird folglich stärker depolarisiert als erwartet mit markanten Folgen für die Aktivierung von Ionenkanälen.

In den folgenden Abschnitten werden diese Merkmale des Flächenkontakmodells zu einem statischen, nulldimensionalen Modell verarbeitet.

A.2.2 Definition des Modells

Diskretisierung der Natriumleitfähigkeit

Die Öffnungswahrscheinlichkeit $p(V_M)$ von Ionenkanälen hängt stark nicht-linear von der Membranspannung ab (Kapitel 2.1.2). Üblicherweise wird ihr stationärer Verlauf durch eine Boltzmann-Verteilung

$$p(V_M) = \left(1 + \exp \left[- (V_M - V_{0.5}) / V_G \right] \right)^{-1} \quad (\text{A.22})$$

mit der Halbwertsspannung $V_{0.5}$ und der Breite des Gatingbereichs V_G angenähert. Vereinfacht man die Spannungsabhängigkeit weiter und lässt formal nur die beiden Ensemble-Zustände geschlossen (0) und offen (1) zu, so wird die Öffnung durch die Stufenfunktion

$$p(V_M) = \Theta(V_M - V_T) \quad (\text{A.23})$$

mit dem Schwellwert V_T beschrieben. Oberhalb dieses Schwellwertes sind alle Kanäle geöffnet, unterhalb seiner sind sie deaktiviert.

Die Inaktivierung reduziert den verfügbaren Anteil der Natriumkanäle unter stationären Bedingungen gemäß Gleichung A.24, mit einer Halbwertsspannung V_h und einer Steilheit s_h der Verteilung. Typische Literaturwerte für den Natriumkanal Nav1.4 lauten $V_h = -68.7\text{mV}$ und $s_h = 8.3\text{mV}$ [Mora03].

$$h(V_M) = \left(1 + \exp \left[(V_M - V_h) / s_h \right] \right)^{-1} \quad (\text{A.24})$$

Aktivierung eines Teilbereichs der Adhäsionsmembran

Fallende Rampen in der Chipspannung depolarisieren die adhärierte Membran. Überschreitet die maximale Depolarisation den Schwellwert, so gibt es einen zentralen Bereich $A_T \subseteq A_J : V_{JM} > V_T$, in dem Ionenkanäle aktiviert werden (Abb. A.2 B). Das Flächenverhältnis $\alpha_{TJ} := A_T / A_J$ von aktivierter zu adhärierter Membran ist gegeben durch

$$\alpha_{TJ} = 1 - \frac{\alpha_{JM}}{2} - \frac{V_M - V_T}{2 \langle V_J \rangle} \quad \text{für} \quad V_T - \Delta V_{JM}^0 < V_M < V_T - \Delta V_{FM} \quad (\text{A.25})$$

mit $\Delta V_{JM}^0 = (\alpha_{JM} - 2) \langle V_J \rangle$ und $\Delta V_{FM} = \alpha_{JM} \langle V_J \rangle$, wobei V_M in diesem Fall die über die *gesamte* Zellmembran gemittelte Transmembranspannung bezeichnet, die von der induzierten Polarisation nicht direkt betroffen ist. Aus den in Abschnitt A.2.1 angeführten Gründen wird diese Aktivierung vom Zwei-Domänen-Modell nur unzureichend beschrieben. Erst wenn die aktivierte Fläche bereits die Hälfte der Adhäsionsmembran ausmacht, erreicht der Mittelwert $\langle V_{JM} \rangle$ den Schwellwert V_T .

Bei der kapazitiven Stimulation mit ansteigenden Rampen ist die Depolarisation der freien Membran schwach und erreicht den Schwellwert zunächst nicht (Abb. A.2 B). Befindet sich die Membranspannung V_M jedoch in der Nähe der Schwellspannung V_T , so können ansteigende Rampen die freie Membran überschwellig depolarisieren. Die Aktivierung der oberen Membran ist dabei gleichbedeutend mit der Auslösung eines Aktionspotenzials, sofern die Inaktivierung der Kanäle noch nicht zu weit fortgeschritten ist.

Berücksichtigung der Kanaldynamik

Aufgrund der langsamen Kinetik von Natriumkanälen ist die Aktivierung der Ionenkanäle während der kurzen Pulse unvollständig. Zur Berücksichtigung des langsamen Öffnens wird der Einstrom mit dem empirischen Faktor $f_T \in [0, 1]$ multipliziert, der den mittleren Öffnungszustand für die Dauer der fallenden Rampe wiedergeben soll.

Beispiel: Mit einem einfach exponentiellen Zeitverlauf $p(t) = 1 - \exp(-t/\tau_a)$ der Kanalöffnung und einer Rampendauer $\Delta t_1 = \tau_a$ von derselben Größe wie die Zeitkonstante τ_a der Aktivierung ergibt sich $f_T = e^{-1} \approx 0.37$.

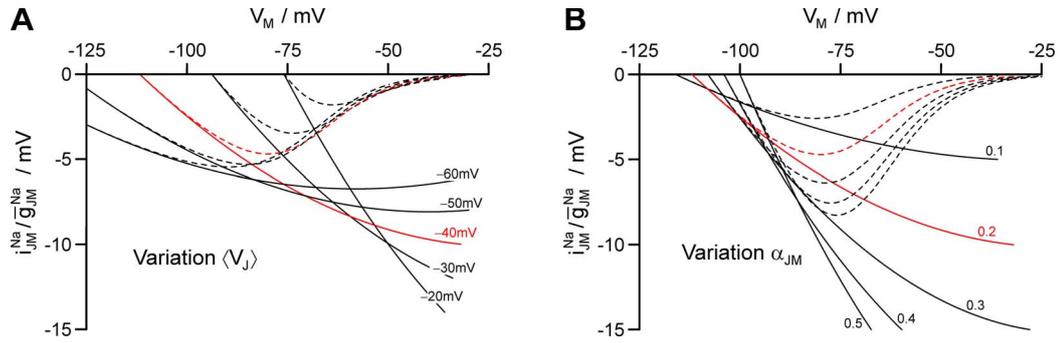


Abbildung A.3: *Spannungverlauf des stationären Natriumstroms durch die adhärenzte Membran gemäß Gleichung A.26 mit (gestrichelt) und ohne (durchgezogen) Berücksichtigung der stationären Inaktivierung. Normierte Auftragung in Einheiten der maximalen Natriumleitfähigkeit. A Variation der Spaltspannung $\langle V_J \rangle$ und B Variation des Flächenverhältnisses α_{JM} von adhärenzter zu gesamter Zellmembran, ausgehend vom Parameterset $\langle V_J \rangle = -40\text{mV}$, $V_T = -40\text{mV}$, $V_0^{\text{Na}} = 50\text{mV}$ und $\alpha_{JM} = 0.2$ (rot).*

A.2.3 Konsequenzen und Vorhersagen

Stationärer Natriumeinstrom

Durch die aktivierten Ionenkanäle fließen Na^+ -Ionen in die Zelle. Der auf die Fläche der gesamten Membran normierte Einstrom durch die aktivierte Membran ergibt sich aus dem Anteil der offenen Kanäle mal der mittleren Triebkraft ΔV_{eff} (siehe Abb. A.2 B) zu

$$i_{JM}^{\text{Na}} = \underbrace{\alpha_{JM} \cdot \bar{g}_{JM}^{\text{Na}}}_{\text{konstant}} \cdot \underbrace{\alpha_{TJ} \cdot \Delta V_{\text{eff}}}_{f(V_M)} \quad \text{mit} \quad \Delta V_{\text{eff}} = \frac{V_{JM}^0 + V_T}{2} - V_0^{\text{Na}} \quad (\text{A.26})$$

mit der (homogenen) spezifischen Leitfähigkeit \bar{g}_{JM}^{Na} der Adhäsionsmembran.

Gemäß den Gleichungen A.26 und A.25 ist der aktivierte Natriumeinstrom eine komplizierte Funktion der Membranspannung V_M . Zusätzlich hängt er von den Parametern $\langle V_J \rangle$, V_T , V_0^{Na} und α_{JM} ab. In Abbildung A.3 wird der Einfluss der Spaltspannung $\langle V_J \rangle$ und des Flächenverhältnisses α_{JM} auf den stationären Einstrom systematisch untersucht.

Ausgangs- und Orientierungspunkt ist der durchgezogene, rote Spannungverlauf für den in der Legende angegebenen Parametersatz. Unter diesen Bedingungen aktiviert der Einstrom bei $V_M = -112\text{mV}$ und steigt im physiologischen Bereich $V_M > -80\text{mV}$ stetig an.

Abbildung A.3 A zeigt Verläufe für unterschiedliche extrazelluläre Spannungen $\langle V_J \rangle = -20 \dots -60\text{mV}$, wie sie durch eine Variation der Rampensteilheit experimentell erzielt werden können. Kleine Spaltspannungen schränken den Stimulationsbereich stark ein, größere Spaltspannungen erweitern ihn und vermindern den Einstrom im physiologischen Bereich durch eine Verringerung der Triebkraft. Mit größer werdendem Flächenverhältnis α_{JM} gewinnt der Einstrom im physiologischen Bereich an Gewichtung, während der Stimulationsbereich durch den zunehmenden Spannungsabfall über die freie Membran an der unteren Grenze schrumpft (Abb. A.3 B). Die Wirkung der beiden anderen Parameter ist eher unspektakulär: eine Änderung der Schwellenspannung V_T verschiebt die Kurven entlang der V_M -Achse, eine Änderung der Umkehrspannung V_0^{Na} bewirkt im Wesentlichen eine Skalierung des Stroms (nicht gezeigt).

Abbildung A.3 zeigt zudem den Einfluss der stationären Inaktivierung (gestrichelte Kurven). Der Einstrom wird oberhalb von $V_M = -80\text{mV}$ mit zunehmender Membranspannung drastisch reduziert, während der Onset des Einstroms bei niedrigeren Spannungen nicht betroffen ist. Wird auf der Zeitskala der Inaktivierungsdynamik stimuliert, wird der Einstrom sich mit zunehmender Stimulationsdauer von den durchgezogenen Kurven hin zu den gestrichelten verschieben.

Steigerungsrate

Der Natriumeinstrom (Gl. A.26) sorgt für einen Anstieg der intrazellulären Spannung mit der Geschwindigkeit

$$\frac{dV_M}{dt} = -\frac{i_{JM}^{\text{Na}}}{c_M} = -\alpha_{JM} \cdot \frac{\bar{g}_{JM}^{\text{Na}}}{c_M} \cdot \alpha_{TJ} \cdot \Delta V_{\text{eff}} \quad (\text{A.27})$$

unter Vernachlässigung jeglicher Leckströme.

Gemäß Gleichung A.27 ist die Änderung der intrazellulären Spannung proportional zum Einstrom. Mit den Werten $\bar{g}_{JM}^{\text{Na}} = 3\text{mS/cm}^2$ und $c_M = 1\mu\text{F/cm}^2$ lässt sich Abbildung A.3 uminterpretieren, indem man die y-Achse mit $-\bar{g}_{JM}^{\text{Na}}/c_M = -3\text{ms}^{-1}$ multipliziert und damit die Änderung dV_M/dt der durchschnittlichen Membranspannung erhält. Im physiologischen Bereich liegt die Änderungsgeschwindigkeit zwischen $20 \dots 30\text{mV/ms}$; bei der Stimulation mit Rampen begrenzter Dauer und einem zeitlichen Anteil dc an der Pulsfolge (vgl. Abb. 5.1) muss dieser Wert um den Faktor $dc \cdot f_T$ reduziert werden. Mit $dc = 0.5$ und $f_T = 0.3$ beträgt er beispielsweise $3 \dots 5\text{mV/ms}$.

Stationärer Endzustand bei langanhaltender Stimulation

Bei langanhaltender Stimulation wird sich ein stationäres Gleichgewicht der Ein- und Auswärtsströme (pro Periode) einstellen, in das die Natriumströme durch die adhärierte (Gl. A.26) und die freie Membran sowie der Leckstrom eingehen.

Der Einstrom durch die freie Membran wird formal durch

$$i_{FM}^{\text{Na}} = (1 - \alpha_{JM}) \bar{g}_{FM}^{\text{Na}} \cdot (V_{FM} - V_0^{\text{Na}}) \cdot \Theta(V_{FM} - V_T) \quad (\text{A.28})$$

beschrieben und ist gemäß der stationären Inaktivierung $h \cdot i_{FM}^{\text{Na}}$ reduziert. Der Leckstrom wird durch die Gleichung

$$i_M^L = g_M^L \cdot (V_M - V_0^L) \quad (\text{A.29})$$

bestimmt mit der spezifischen Leckleitfähigkeit der Zellmembran g_M^L und einer Umkehrspannung V_0^L . Ein Gesamtzellwiderstand $R_M = 4\text{G}\Omega$ und eine Fläche $A_M = 1200\mu\text{m}^2$ bei HEK-Zellen ergeben eine Leckleitfähigkeit von etwa $g_M^L = 0.02\text{mS/cm}^2$. Die Umkehrspannung wird üblicherweise auf einen Wert nahe der Ruhespannung der Zelle, z.B. auf $V_0^L = -80\text{mV}$ festgesetzt.

Im Gleichgewicht heben sich die Ströme gegenseitig auf

$$i_M^L + dc f_T h \cdot i_{JM}^{\text{Na}} + (1 - dc) \tilde{f}_T h \cdot i_{FM}^{\text{Na}} = 0 \quad (\text{A.30})$$

und die intrazelluläre Spannung oszilliert um einen festen Durchschnittswert V_M^∞ . Der empirische Faktor f_T zur Berücksichtigung der Kinetik bei ansteigenden Rampen ist dabei entsprechend ihrer Dauer $(1 - dc) \cdot T$ zu wählen.

Zur Veranschaulichung seien zwei konkrete Fälle betrachtet: (i) Bei kontinuierlicher Stimulation mit symmetrischen Rampen ($dc=0.5$) tragen beide Membrandomänen zum stationären Einstrom bei. Mit den obigen Parametern ergibt sich für die intrazelluläre Spannung der stationäre Wert $V_M^\infty = -37\text{mV}$. (ii) Bei kontinuierlicher Stimulation mit einem Tastverhältnis $dc = 0.25$ wird die freie Membran verglichen zum ersten Fall nur 1/3 so stark depolarisiert und trägt zum stationären Endwert von $V_M^\infty = -57\text{mV}$ nicht bei.

A.3 Elektronische Schaltungen

Folgende Eigenbau-Schaltungen kamen im Versuchsaufbau zum Einsatz.

A.3.1 Spannungsaddierer

Zur Addition eines Offsets zum Funktionsgeneratorsignal wird die Schaltung aus Abbildung A.4 A verwendet. Die Eingangsspannungen V_1, V_2 werden gleichstark gewichtet und invertiert, so dass die Ausgangsspannung $V_3 = -(V_1 + V_2)$ ist. Die zum Feedbackwiderstand R_F parallel geschaltete Kapazität C_F unterdrückt Überschwinger bei stufenförmigen Signalverläufen.

In der Praxis liefert der Funktionsgenerator ein invertiertes Signal $V_1 = -\Delta V_S$, der Offset wird von einem Analogausgang der Messkarte ebenfalls invertiert $V_2 = -V_S^0$ vorgegeben, so dass die Ausgangsspannung $V_3 = V_S^0 + \Delta V_S = V_S$ den gewünschten Verlauf erhält.

Zwischen die Spannungsversorgungseingänge V_{cc+} und V_{cc-} des OPVs wird eine große Kapazität geschaltet, die das Liefern von Stromspitzen erleichtert. Die Bandbreite der Schaltung beträgt etwa 5MHz, sie ist auf kapazitive Lasten von bis zu 1.5nF ausgelegt.

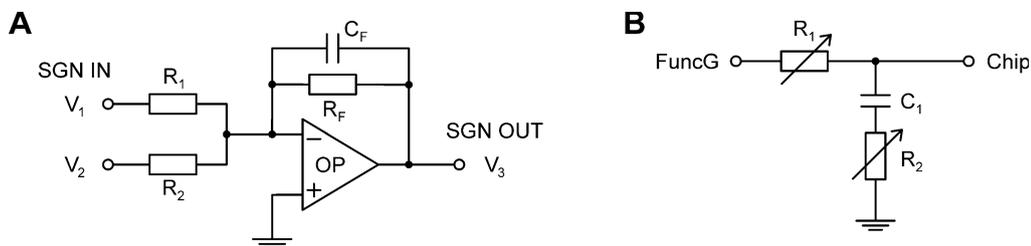


Abbildung A.4: Elektronische Schaltungen. **A** Spannungsaddierer. Eingangs- und Feedbackwiderstände $R_1=R_2=R_F=10\text{k}\Omega$, Kondensator $C_F=4.3\text{pF}$, Operationsverstärker $OP=TLE2027$. **B** Signalentkoppeler. Potentiometer $R_1=R_2=0 \dots 50\text{k}\Omega$, Kondensator $C_1=10\mu\text{F}$.

A.3.2 Entkopplung Chipsignal

Bei Änderung der Stimulationsparameter produziert der Funktionsgenerator gelegentlich sehr kurze Spannungsstörungen von mehreren Volt, die kapazitiv ins Bad einkoppeln und eine Gefahr für Chip und Zellen darstellen. Zu ihrer Unterdrückung wird der Chip während jeder Neuprogrammierung des Funktionsgenerators mithilfe eines Entkopplers manuell von dessen Ausgang getrennt.

Das Schaltbild des Entkopplers ist in Abbildung A.4 B dargestellt. Mit der Stellung „Potentiometer R_1 hochohmig“ und „Potentiometer R_2 niederohmig“ wird des Eingangssignal mit der Zeitkonstante $R_1 C_1 = 0.5s$ gefiltert, also dessen AC-Anteil abgekoppelt. In der umgekehrten Stellung der Potentiometer wird das Signal durchgeschleift.

A.4 Verwendete Materialien

A.4.1 Software

Betriebssystem	Windows XP Prof.	Microsoft, Unterschleißheim
Datenerfassung	Labview 6.1	National Instruments, München
Datenauswertung	Mathematica 5.0	Wolfram Research, Oxfordshire, UK
Ansteuerung EPC10	Patchmaster 2.10	HEKA Elektronik, Lambrecht
Literaturverwaltung	EndNote 8.0	Thomson Scientific, München
Vektorgraphiken	CorelDraw 12	Corel, Unterschleißheim
Texteditor	TEXnicCenter	Freeware, www.texniccenter.org
Textlayout	MikTEX	Freeware, www.miktex.org

A.4.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte

Computer	Pentium IV, 2.6GHz	Misco Germany Inc., Langen
Messkarten	PCI-MIO-16XE-50	National Instruments, München
	PCI-GPIB	National Instruments, München
	PCI-1600	HEKA Elektronik, Lambrecht
Funktionsgenerator	33120A, 33220A	Agilent Technologies, Böblingen
Pipettenpuller	DMZ Universal	Zeitz Instruments, Martinsried
Reinstwasseranlage	Milli-RO und Milli-Q	Millipore GmbH, Schwalbach
Osmometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH, Berlin
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Messgeräte GmbH, Berlin
Leitfähigkeitsmessgerät	InoLab Cond Level 1	WTW, Weilheim

Mikroskop

Auflichtmikroskop	BX50WI	Olympus, Hamburg
Immersionsobjektiv, 40x	LUMPlanFl	Olympus, Hamburg
Okular, 10x	WH10X/22	Olympus, Hamburg
Polarisator	U-PO	Olympus, Hamburg
Analysator	U-AN360	Olympus, Hamburg
Wollaston-Prisma	U-DICT	Olympus, Hamburg
Lichtquelle	U-LH100L	Olympus, Hamburg
Digitalkamera	Coolpix 950	Nikon GmbH, Düsseldorf

Elektrophysiologie

PatchClamp Verstärker	EPC8 EPC10	HEKA Elektronik, Lambrecht HEKA Elektronik, Lambrecht
Brückenverstärker	BA-1S	NPI Elektronik GmbH, Tamm
Ag/AgCl-Badelektrode	# EP05	WPI, Sarasota, FL, USA
Mikromanipulator	PatchMan	Eppendorf, Hamburg
Stechpipetten	# TW150F-6	WPI, Sarasota, FL, USA
Patchpipetten	# GB150T-10	Science Products GmbH, Hofheim
Pipettenbeschichtung	Sylgard 184	Dow Corning, Midland, MI, USA

Chips

Wafer, Bor-dotiert	# G40112	WaferNet GmbH, Eching
Zellkulturschalen	# 35-3001	BD Biosciences, Heidelberg
MK3 Kleber	# 53300-04	Sulzer Osypka, Rheinfelden-Herten
Spülmittel	Tickopur R-36	Bandelin, Berlin
Tork Kosmetiktuch	# 140270	SCA Tissue, Neenah, WI, USA

Zellkultur

HEK293	–	DSMZ GmbH, Braunschweig
Lymnaea stagnalis	–	VU Amsterdam, Niederlande
Ratten, Wistar Brut	–	Tierhaus MPI Biochemie
Präparationsbesteck	–	Fine Science Tools, Heidelberg
Saugpipetten	# TW150-6	WPI, Sarasota, FL, USA
Mikroliterspritze	# 1750LT	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikromanipulator	# 640055	Harvard Apparatus, Holliston, MA
Stereomikroskop	Wild M3C	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Schwanenhalslampe	KL1500 electronic	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Zellkulturschalen	# 150350	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

A.4.3 Lösungen

Schnecken

Normale Salzlösung: NS

40mM NaCl, 1.7mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 4.1mM CaCl₂, 10mM HEPES, pH=7.6 mit NaOH, Osmolalität 0.138mol/kg, steril filtriert. Spezifischer Widerstand $\rho=163\Omega\text{cm}$.

Antibiotische Salzlösung: ABS

NS autoklaviert, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycinsulfat, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, steril filtriert. Osmolalität 0.110mol/kg.

Normale Salzlösung ohne Calcium: NS-Ca(-)

40mM NaCl, 1.7mM KCl, 5.6mM MgCl₂, 0.2mM CdCl₂, 10mM HEPES, pH=7.6 mit NaOH, Osmolalität 0.138mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert. Spezifischer Widerstand $\rho=163\Omega\text{cm}$.

Badlösung zum Block der Ionenströme: NS-TEA

65mM TEA-Cl, 1.5mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH=7.6 mit NaOH, Osmolalität 0.140 mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert. Spezifischer Widerstand $\rho=165\Omega\text{cm}$.

Intrazellulärlösung: ICS

6mM NaCl, 31mM KCl, 20mM KF, 5mM EGTA, 5mM HEPES, pH=7.6 mit KOH, Osmolalität 0.138mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert. Spezifischer Widerstand $\rho=135\Omega\text{cm}$.

Definiertes Medium: DM

Leibovitz L-15 ohne inorganische Salze und ohne L-Glutamin wird im Verhältnis 1:1 mit 4fach konzentrierter NS gemischt, verdünnt, pH=7.6 mit NaOH, steril filtriert, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycinsulfat zugegeben. Osmolalität 0.140mol/kg.

Definiertes Medium mit erhöhter Osmolarität: HODM

20ml DM, 750 μl einer 1M D-Glukose-Lsg. (steril filtriert). Osmolalität 0.190mol/kg.

HEK-Zellen und Ratten

Kulturmedium mit Vitaminen und Serum: DMEM:F12-S

DMEM:F12, 10%(v/v) hitzeinaktiviertes FBS, 0.2mg/ml Geneticin.

Extrazellulärlösung: ECM

135mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 5mM HEPES, pH=7.3 mit NaOH, Osmolalität 0.287mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert. Spezifischer Widerstand $\rho=65\Omega\text{cm}$.

Intrazellulärlösung: ICM

140mM KCl, 1.0mM CaCl₂, 1.0mM EGTA, 5mM HEPES, pH=7.3 mit NaOH, Osmolalität 0.265mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert.

Extrazellulärlösung mit reduzierter Leitfähigkeit: ECM-50

50mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 5mM HEPES, pH=7.4 mit NaOH, Osmolalität 0.312mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert. Spez. Widerstand $\rho=155\Omega\text{cm}$.

Intrazellulärlösung mit reduzierter Na⁺-Konzentration: ICM-50

5mM NaCl, 135mM CsF, 10mM EGTA, 10mM HEPES, pH=7.4 mit CsOH, Osmolalität 0.307mol/kg mit D-Glukose, steril filtriert.

Leibovitz's Medium mit Serum: L-15-S

Leibovitz's L-15, 5%(v/v) hitzeinaktiviertes FBS.

Kulturmedium mit Serum: D-MEM-S
D-MEM, 10%(v/v) hitzeinaktiviertes FBS.

A.4.4 Chemikalien

Aceton	# 1.00014	Merck, Darmstadt
Ampicillin	# 11593	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua ad	–	B. Braun AG, Melsungen
BSA	# A9647	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂	# C7902	Sigma-Aldrich, Steinheim
CdCl ₂	# C2544	Sigma-Aldrich, Steinheim
CsF	# 20990	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Glukose	# 15023	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM	# 61965	Invitrogen, Karlsruhe
D-PBS	# 14040	Invitrogen, Karlsruhe
DiIC ₁₈ (3)	# D282	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
DMEM	# 21885	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM:F12	# 31331	Invitrogen, Karlsruhe
EGTA	# E4378	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	# 32205	Riedel-de Haën
Fibronectin	# F2006	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS	# 10270	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin	# G9516	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamycinsulfat	# G3632	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	# 5288	BIOMOL GmbH, Hamburg
IKVAV	# C6171	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	# 1.09634	Merck, Darmstadt
K ₂ SO ₄	# P9458	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	# P4504	Sigma-Aldrich, Steinheim
KF	# 60238	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-15	# 31415	Invitrogen, Karlsruhe
L-15 ohne Salze	# 21083027	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	# G3126	Sigma-Aldrich, Steinheim
Listerine Original	–	Pfizer Consumer Healthcare, Karlsruhe
MEM	# 21090	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl ₂ ·6H ₂ O	# M2393	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	# S5886	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neurobasal	# 21103	Invitrogen, Karlsruhe
Papain	# P4762	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	# 70013	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	# P1274	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEA-Cl	# T2265	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	# T4665	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-Inhibitor	# T9003	Sigma-Aldrich, Steinheim
TTX	# T5651	Sigma-Aldrich, Steinheim
YIGSR	# C0668	Sigma-Aldrich, Steinheim

A.5 Abkürzungen

AC	Alternating Current
AIS	Axon Initial Segment
ALD	Atomic Layer Deposition
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid
AP	AktionsPotenzial
AP5	2-amino-5-phosphonovalerat
BRICA	Bulk Resistance In Cell Adhesion
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Cornu Ammonis
CHO	Chinese Hamster Ovary
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CNS	Central Nervous System
DBS	Deep Brain Stimulation
DC	Direct Current
DIC	Difference Interference Contrast
DIV	Days in vitro
DK	Dielektrische Konstante
DM	Defined Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EC ₅₀	Equivalent Concentration at 50% activity
EOS	Electrolyte Oxide Silicon
EPSP	Excitatory Post Synaptic Potential
FET	Feld-Effekt Transistor
FBS	Fetal Bovine Serum
FLIC	Fluorescence Interference Contrast
HCN	Hyperpolarized activated, Cyclic Nucleotide gated
HEK	Human Embryonic Kidney
HVA	High Voltage Activated
ITO	Indium-Tin Oxide
LTD	Long Term Depression
LTP	Long Term Potentiation
LVA	Low Voltage Activated
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
NMDA	N-methyl d-aspartate
OPV	Operationsverstärker
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Poly Elektrolyt Gel
PZC	Point of Zero Charge
STDP	Spike-Timing Dependent Plasticity
TEA	Tetraethylammonium
TEM	Transmission Electron Microscopy
TTX	Tetrodotoxin
UE	Untereinheit

Literaturverzeichnis

- [Alle06] H. Alle und J. R. P. Geiger. Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science*, 311(5765):1290–1293, 2006.
- [Arms77] C. M. Armstrong und F. Bezanilla. Inactivation of sodium channel. 2. Gating current experiments. *Journal Of General Physiology*, 70(5):567–590, 1977.
- [Astu02] R. D. Astumian. Protein conformational fluctuations and free-energy transduction. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 75(2):193–206, 2002.
- [Auma05] M. Aumailley, L. Bruckner-Tuderman, W. G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. C. R. Jones, H. K. Kleinman, M. P. Marinkovich, G. R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J. H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J. R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L. M. Sorokin, J. F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U. M. Wewer, Y. Yamada und P. D. Yurchenco. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*, 24(5):326–332, 2005.
- [Bank77] G. A. Banker und W. M. Cowan. Rat hippocampal neurons in dispersed cell-culture. *Brain Research*, 126(3):397–425, 1977.
- [Bank98] G. Banker und K. Goslin. *Culturing nerve cells*. MIT Press, Cambridge, 2nd edition, 1998.
- [Bara06] G. Baranauskas und M. Martina. Sodium currents activate without a Hodgkin and Huxley-type delay in central mammalian neurons. *Journal Of Neuroscience*, 26(2):671–684, 2006.
- [Barr96] J. L. Barrat und J. F. Joanny. Theory of polyelectrolyte solutions. *Advances In Chemical Physics*, 94:1–66, 1996.
- [Bi98] G. Q. Bi und M. M. Poo. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: Dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *Journal Of Neuroscience*, 18(24):10464–10472, 1998.
- [Bi99] G. Q. Bi und M. M. Poo. Distributed synaptic modification in neural networks induced by patterned stimulation. *Nature*, 401(6755):792–796, 1999.
- [Blac84] J. Black, T. J. Baranowski und C. T. Brighton. Electrochemical aspects of dc stimulation of osteogenesis. *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*, 12(3-4):323–327, 1984.

- [Brau01] D. Braun und P. Fromherz. Fast voltage transients in capacitive silicon-to-cell stimulation detected with a luminescent molecular electronic probe. *Physical Review Letters*, 86(13):2905–2908, 2001.
- [Brau04] D. Braun und P. Fromherz. Imaging neuronal seal resistance on silicon chip using fluorescent voltage-sensitive dye. *Biophysical Journal*, 87(2):1351–1359, 2004.
- [Brec95] L. J. Breckenridge, R. J. A. Wilson, P. Connolly, A. S. G. Curtis, J. A. T. Dow, S. E. Blackshaw und C. D. W. Wilkinson. Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in-vitro neuronal recording. *Journal Of Neuroscience Research*, 42(2):266–276, 1995.
- [Brit05] M. Brittinger und P. Fromherz. Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 81(3):439–447, 2005.
- [Brom66a] B. Bromm. Reizwirkung mittelfrequenter Wechselstromimpulse und gleichlanger Rechteckströme am markhaltigen Nerven. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 291(3):249–260, 1966.
- [Brom66b] B. Bromm und H. Lullies. Über den Mechanismus der Reizwirkung mittelfrequenter Wechselströme auf die Nervenmembran. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 289(4):215–226, 1966.
- [Bron99] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol und H. Mühlig. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 4th edition, 1999.
- [Buch91] J. R. Buchhalter und M. A. Dichter. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell-culture of rat hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 26(3):333–338, 1991.
- [Buit02] J. R. Buitenweg, W. L. C. Rutten und E. Marani. Extracellular stimulation window explained by a geometry-based model of the neuron-electrode contact. *Ieee Transactions On Biomedical Engineering*, 49(12):1591–1599, 2002.
- [Burg94] R. E. Burgeson, M. Chiquet, R. Deutzmann, P. Ekblom, J. Engel, H. Kleinman, G. R. Martin, G. Meneguzzi, M. Paulsson, J. Sanes, R. Timpl, K. Tryggvason, Y. Yamada und P. D. Yurchenco. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biology*, 14(3):209–211, 1994.
- [Butt06] H. J. Butt, K. Graf und M. Kappl. *Physics and chemistry of interfaces*. Wiley-VCH, Weinheim, 2nd edition, 2006.
- [Cars59] H. S. Carslaw und J. C. Jaeger. *Conduction of heat in solids*. Clarendon Press, Oxford, 2nd edition, 1959.
- [Catt05a] W. A. Catterall, A. L. Goldin und S. G. Waxman. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):397–409, 2005.

- [Catt05b] W. A. Catterall, E. Perez-Reyes, T. P. Snutch und J. Striessnig. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):411–425, 2005.
- [Chen00] H. J. Chen, D. Gordon und S. H. Heinemann. Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the scorpion toxins Lqh II, Lqh III, and Lqh alpha IT. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 439(4):423–432, 2000.
- [Clar93] P. Clark, S. Britland und P. Connolly. Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. *Journal Of Cell Science*, 105:203–212, 1993.
- [Cohe02] S. Cohen-Cory. The developing synapse: Construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*, 298(5594):770–776, 2002.
- [Colo00] H. Colognato und P. D. Yurchenco. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics*, 218(2):213–234, 2000.
- [Dan06] Y. Dan und M. M. Poo. Spike timing-dependent plasticity: From synapse to perception. *Physiological Reviews*, 86(3):1033–1048, 2006.
- [Dean06] C. Dean und T. Dresbach. Neuroligins and neuexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends In Neurosciences*, 29(1):21–29, 2006.
- [Dest99] A. Destexhe und D. Pare. Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo. *Journal Of Neurophysiology*, 81(4):1531–1547, 1999.
- [Eins05] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 17:549–560, 1905.
- [Elwo72] P. H. Elworthy, A. T. Florence und A. Rahman. Conductivity of sodium-chloride and potassium-chloride in polymer-solutions and obstruction effect. *Journal Of Physical Chemistry*, 76(12):1763–1767, 1972.
- [Faas96] G. C. Faas, M. Vreugdenhil und W. J. Wadman. Calcium currents in pyramidal CA1 neurons in vitro after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. *Neuroscience*, 75(1):57–67, 1996.
- [Flie01] A. van der Flier und A. Sonnenberg. Function and interactions of integrins. *Cell And Tissue Research*, 305(3):285–298, 2001.
- [From91] P. Fromherz, A. Offenhausser, T. Vetter und J. Weis. A neuron-silicon junction: A Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252(5010):1290–1293, 1991.
- [From95] P. Fromherz und A. Stett. Silicon-neuron junction - Capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Physical Review Letters*, 75(8):1670–1673, 1995.

- [From02] P. Fromherz. Sheet conductor model of brain slices for stimulation and recording with planar electronic contacts. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 31(3):228–231, 2002.
- [Garc05] L. Garcia, G. D’Alessandro, B. Bioulac und C. Hammond. High-frequency stimulation in Parkinson’s disease: more or less? *Trends In Neurosciences*, 28(4):209–216, 2005.
- [Gild19] M. Gildemeister. Electrical resistance, capacity and polarisation of the skin. I. Tests on frog skin. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 176:84–105, 1919.
- [Gild28] M. Gildemeister. Electrical resistance, capacity and polarisation of the skin. II. Report - Human skin. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 219:89–110, 1928.
- [Gild44] M. Gildemeister. Untersuchung über die Wirkung der Mittelfrequenzströme auf den Menschen. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 247:366–404, 1944.
- [Glei06] R. Gleixner und P. Fromherz. The extracellular electrical resistivity in cell adhesion. *Biophysical Journal*, 90(7):2600–2611, 2006.
- [Goda06] Y. Goda und M. A. Colicos. Photoconductive stimulation of neurons cultured on silicon wafers. *Nature Protocols*, 1(1):461–467, 2006.
- [Gosl98] K. Goslin, H. Asmussen und G. Banker. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In G. Banker und K. Goslin, Editoren, *Culturing Nerve Cells*, 666. MIT Press, Cambridge, 2nd edition, 1998.
- [Goua05] E. Gouaux und R. MacKinnon. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 310(5753):1461–1465, 2005.
- [Grah77] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell und R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type-5. *Journal Of General Virology*, 36:59–72, 1977.
- [Gust76] B. Gustafsson und E. Jankowska. Direct and indirect activation of nerve-cells by electrical pulses applied extracellularly. *Journal Of Physiology-London*, 258(1):33–61, 1976.
- [Gutm05] G. A. Gutman, K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer und X. L. Wang. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):473–508, 2005.
- [Hami81] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv-European Journal Of Physiology*, 391(2):85–100, 1981.

- [Heid98] P. Heiduschka und S. Thanos. Implantable bioelectronic interfaces for lost nerve functions. *Progress In Neurobiology*, 55(5):433–461, 1998.
- [Herm81] A. Hermann und A. L. F. Gorman. Effects of tetraethylammonium on potassium currents in a molluscan neuron. *Journal Of General Physiology*, 78(1):87–110, 1981.
- [Hill01] B. Hille. *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, 3rd edition, 2001.
- [Hoch06] L. R. Hochberg, M. D. Serruya, G. M. Friebs, J. A. Mukand, M. Saleh, A. H. Caplan, A. Branner, D. Chen, R. D. Penn und J. P. Donoghue. Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature*, 442(7099):164–171, 2006.
- [Hodg52] A. L. Hodgkin und A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology-London*, 117(4):500–544, 1952.
- [Horn88] R. Horn und A. Marty. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *Journal Of General Physiology*, 92(2):145–159, 1988.
- [Hsu93] H. O. Hsu, E. Huang, X. C. Yang, A. Karschin, C. Labarca, A. Figl, B. Ho, N. Davidson und H. A. Lester. Slow and incomplete inactivations of voltage-gated channels dominate encoding in synthetic neurons. *Biophysical Journal*, 65(3):1196–1206, 1993.
- [Huan98] C. Q. Huang, R. K. Shepherd, P. M. Seligman und G. M. Clark. Reduction in excitability of the auditory nerve following acute electrical stimulation at high stimulus rates: III. Capacitive versus non-capacitive coupling of the stimulating electrodes. *Hearing Research*, 116(1-2):55–64, 1998.
- [Irvi99] L. A. Irvine, M. S. Jafri und R. L. Winslow. Cardiac sodium channel Markov model with temperature dependence and recovery from inactivation. *Biophysical Journal*, 76(4):1868–1885, 1999.
- [Iwam87] Y. Iwamoto, F. A. Robey, J. Graf, M. Sasaki, H. K. Kleinman, Y. Yamada und G. R. Martin. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science*, 238(4830):1132–1134, 1987.
- [Jaco77] B. S. Jacobson und D. Branton. Plasma-membrane - Rapid isolation and exposure of cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science*, 195(4275):302–304, 1977.
- [Jimbo92] Y. Jimbo und A. Kawana. Electrical-stimulation and recording from cultured neurons using a planar electrode array. *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*, 29(2):193–204, 1992.
- [Jimbo00] Y. Jimbo, A. Kawana, P. Parodi und V. Torre. The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. *Biological Cybernetics*, 83(1):1–20, 2000.

- [Katz37] B. Katz. Experimental evidence for a non-conducted response of nerve to subthreshold stimulation. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences*, 124(835):244–276, 1937.
- [Kaul07] R. A. Kaul. *Chemical synapses on semiconductor chips*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2007.
- [Kies99] V. Kiessling. *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazellulär angelegten Wechselfpannungen*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 1999.
- [Kies00] V. Kiessling, B. Müller und P. Fromherz. Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe. *Langmuir*, 16(7):3517–3521, 2000.
- [Klau03] N. Klauke, G.L. Smith und J. Cooper. Stimulation of single isolated adult ventricular myocytes within a low volume using a planar microelectrode array. *Biophysical Journal*, 85(3):1766–1774, 2003.
- [Knop06] T. Knöpfel, J. Diez-Garcia und W. Akemann. Optical probing of neuronal circuit dynamics: genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends In Neurosciences*, 29(3):160–166, 2006.
- [Kosm97] M. Kosmulski. Attempt to determine pristine points of zero charge of Nb₂O₅, Ta₂O₅, and HfO₂. *Langmuir*, 13(23):6315–6320, 1997.
- [Kosm02] M. Kosmulski. The pH-dependent surface charging and the points of zero charge. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 253(1):77–87, 2002.
- [Koza89] M. Kozak. The scanning model for translation - An update. *Journal of Cell Biology*, 108(2):229–241, 1989.
- [Krie83] A. R. Kriegstein und M. A. Dichter. Morphological classification of rat cortical-neurons in cell-culture. *Journal Of Neuroscience*, 3(8):1634–1647, 1983.
- [Kuma66] T. Kumazawa. Intracellular recording of electrical response of muscle fibre to transversely applied middle-frequency pulse stimulation. *Experientia*, 22(6):393–394, 1966.
- [Kuyu94] S. Kuyucak und S. H. Chung. Temperature-dependence of conductivity in electrolyte-solutions and ionic channels of biological-membranes. *Biophysical Chemistry*, 52(1):15–24, 1994.
- [Lai06] H. C. Lai und L. Y. Jan. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7):548–562, 2006.
- [Lamb02] A. Lambacher und 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.
- [Mack55] J. S. Mackie und P. Meares. The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane. 1. Theoretical. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical And Physical Sciences*, 232(1191):498–509, 1955.

- [Magi96] J. Magistretti, M. Mantegazza, E. Guatteo und E. Wanke. Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: Are they genuine? *Trends in Neurosciences*, 19(12):530–534, 1996.
- [Magi98] J. Magistretti, M. Mantegazza, M. de Curtis und E. Wanke. Modalities of distortion of physiological voltage signals by patch-clamp amplifiers: A modeling study. *Biophysical Journal*, 74(2):831–842, 1998.
- [Mahe99] M. P. Maher, J. Pine, J. Wright und Y. C. Tai. The neurochip: A new multi-electrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal Of Neuroscience Methods*, 87(1):45–56, 1999.
- [Mart97] M. Martina und P. Jonas. Functional differences in Na⁺ channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus. *Journal Of Physiology-London*, 505(3):593–603, 1997.
- [Mart98] M. Martina, J. H. Schultz, H. Ehmke, H. Monyer und P. Jonas. Functional and molecular differences between voltage-gated K⁺ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *Journal Of Neuroscience*, 18(20):8111–8125, 1998.
- [Masa99] L. Masaro und X. X. Zhu. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress In Polymer Science*, 24(5):731–775, 1999.
- [McIn99] C. C. McIntyre und W. M. Grill. Excitation of central nervous system neurons by nonuniform electric fields. *Biophysical Journal*, 76(2):878–888, 1999.
- [Milb95] T. Milburn, D. A. Saint und S. H. Chung. The temperature dependence of conductance of the sodium channel: Implications for mechanisms of ion permeation. *Receptors & Channels*, 3(3):201–211, 1995.
- [Milt90] R. L. Milton und J. H. Caldwell. How do patch clamp seals form - A lipid bleb model. *Pflügers Archiv-European Journal Of Physiology*, 416(6):758–765, 1990.
- [Mora03] O. Moran, F. Conti und P. Tammaro. Sodium channel heterologous expression in mammalian cells and the role of the endogenous beta 1-subunits. *Neuroscience Letters*, 336(3):175–179, 2003.
- [Muhr82] A. H. Muhr und J. M. V. Blanshard. Diffusion in gels. *Polymer*, 23(7):1012–1026, 1982.
- [Naun06] B. Naundorf, F. Wolf und M. Volgushev. Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature*, 440(7087):1060–1063, 2006.
- [Nehe76] E. Neher und B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.
- [Neum69] B. Neumcke und P. Lauger. Nonlinear electrical effects in lipid bilayer membranes. 2. Integration of generalized Nernst-Planck equations. *Biophysical Journal*, 9(9):1160–1170, 1969.

- [Noma52] G. Nomarski. Interferomètre à polarisation. *French Patent*, No. 1.059.123, 1952.
- [Nomi95] M. Nomizu, B. S. Weeks, C. A. Weston, W. H. Kim, H. K. Kleinman und Y. Yamada. Structure-activity study of a laminin alpha-1 chain active peptide segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV). *FEBS Letters*, 365(2-3):227–231, 1995.
- [Nova01] S. D. Novakovic, R. M. Eglén und J. C. Hunter. Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. *Trends In Neurosciences*, 24(8):473–478, 2001.
- [Nyqu28] H. Nyquist. Thermal agitation of electric charge in conductors. *Physical Review*, 32(1):110–113, 1928.
- [ORei99] J. P. O'Reilly, S. Y. Wang, R. G. Kallen und G. K. Wang. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na⁺ channel chimaeras. *Journal of Physiology-London*, 515(1):61–73, 1999.
- [Para01] W. J. Parak, M. George, R. Kudera, H. E. Gaub und J. C. Behrends. Effects of semiconductor substrate and glia-free culture on the development of voltage-dependent currents in rat striatal neurones. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 29(8):607–620, 2001.
- [Perk06] K. L. Perkins. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *Journal Of Neuroscience Methods*, 154(1-2):1–18, 2006.
- [Pine80] J. Pine. Recording action-potentials from cultured neurons with extracellular micro-circuit electrodes. *Journal Of Neuroscience Methods*, 2(1):19–31, 1980.
- [Prin03] A. A. Prinz und P. Fromherz. Effect of neuritic cables on conductance estimates for remote electrical synapses. *Journal Of Neurophysiology*, 89(4):2215–2224, 2003.
- [Ranc75] J. B. Ranck. Which elements are excited in electrical-stimulation of mammalian central nervous-system: A review. *Brain Research*, 98(3):417–440, 1975.
- [Ratt86] F. Rattay. Analysis of models for external stimulation of axons. *Ieee Transactions On Biomedical Engineering*, 33(10):974–977, 1986.
- [Rege89] W. G. Regehr, J. Pine, C. S. Cohan, M. D. Mischke und D. W. Tank. Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *Journal Of Neuroscience Methods*, 30(2):91–106, 1989.
- [Rubi88] J. T. Rubinstein und F. A. Spelman. Analytical theory for extracellular electrical-stimulation of nerve with focal electrodes. 1. Passive unmyelinated axon. *Biophysical Journal*, 54(6):975–981, 1988.
- [Scha98] R. Schätzthauer und P. Fromherz. Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents. *European Journal Of Neuroscience*, 10(6):1956–1962, 1998.

- [Schm06] M. Schmidtner und P. Fromherz. Functional Na⁺ channels in cell adhesion probed by transistor recording. *Biophysical Journal*, 90(1):183–189, 2006.
- [Scho98] N. E. Schoppa und F. J. Sigworth. Activation of shaker potassium channels III - An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *Journal of General Physiology*, 111(2):313–342, 1998.
- [Scho03] I. Schoen. *Kapazitive Stimulation von Ionenkanälen auf Siliziumchips*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2003.
- [Scho05] I. Schoen und P. Fromherz. Activation of Na⁺ channels in cell membrane by capacitive stimulation with silicon chip. *Applied Physics Letters*, 87(19):193901, 2005.
- [Scho06] I. Schoen und P. Fromherz. The mechanism of extracellular stimulation of nerve cells on an electrolyte-oxide-semiconductor capacitor. *Biophysical Journal*, submitted.
- [Schw87] J. R. Schwarz und G. Eikhof. Na currents and action-potentials in rat myelinated nerve-fibers at 20 and 37°C. *Pflügers Archiv-European Journal Of Physiology*, 409(6):569–577, 1987.
- [Shee99] M. F. Sheets und D. A. Hanck. Gating of skeletal and cardiac muscle sodium channels in mammalian cells. *Journal of Physiology-London*, 514(2):425–436, 1999.
- [Shep93] R. K. Shepherd, S. Hatsushika und G. M. Clark. Electrical-stimulation of the auditory-nerve - The effect of electrode position on neural excitation. *Hearing Research*, 66(1):108–120, 1993.
- [Star02] K. Staras, J. Gyori und G. Kemenes. Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *European Journal of Neuroscience*, 15(1):109–119, 2002.
- [Star05] A. Starovoytov, J. Choi und H. S. Seung. Light-directed electrical stimulation of neurons cultured on silicon wafers. *Journal Of Neurophysiology*, 93(2):1090–1098, 2005.
- [Stua97] G. Stuart, J. Schiller und B. Sakmann. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *Journal Of Physiology-London*, 505(3):617–632, 1997.
- [Swar04] K. J. Swartz. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12):905–916, 2004.
- [Syed89] N. I. Syed und W. Winlow. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis* (L). *Comparative Biochemistry And Physiology A-Physiology*, 93(3):633–644, 1989.
- [Syed90] N. I. Syed, A. G. M. Bulloch und K. Lukowiak. In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*, 250(4978):282–285, 1990.

- [Syed99] N. I. Syed, H. Zaidi und P. Lovell. In vitro reconstruction of neuronal circuits: A simple model system approach. In U. Windhorst und H. Johansson, Editoren, *Modern Techniques in Neuroscience Research*, 361-377. Springer, Berlin Heidelberg, 1st edition, 1999.
- [Sze81] S. M. Sze. *Physics of semiconductor devices*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition, 1981.
- [Taka91] K. Takahashi, S. Ueno und N. Akaike. Kinetic-properties of T-type Ca^{2+} currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal Of Neurophysiology*, 65(1):148–155, 1991.
- [Tash89] K. Tashiro, G. C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman und Y. Yamada. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A-chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *Journal Of Biological Chemistry*, 264(27):16174–16182, 1989.
- [Tash94] K. Tashiro, I. Nagata, N. Yamashita, K. Okazaki, K. Ogomori, N. Tashiro und M. Anai. A synthetic peptide deduced from the sequence in the cross-region of laminin-A chain mediates neurite outgrowth, cell attachment and heparin-binding. *Biochemical Journal*, 302:73–79, 1994.
- [Tomb05] F. Tombola, M. M. Pathak und E. Y. Isacoff. How far will you go to sense voltage? *Neuron*, 48(5):719–725, 2005.
- [Trim89] J. S. Trimmer, S. S. Cooperman, S. A. Tomiko, J. Y. Zhou, S. M. Crean, M. B. Boyle, R. G. Kallen, Z. H. Sheng, R. L. Barchi, F. J. Sigworth, R. H. Goodman, W. S. Agnew und G. Mandel. Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal-muscle sodium-channel. *Neuron*, 3(1):33–49, 1989.
- [Ukom92] C. Ukomadu, J. Y. Zhou, F. J. Sigworth und W. S. Agnew. Mu-I Na^+ channels expressed transiently in human embryonic kidney-cells - Biochemical and biophysical properties. *Neuron*, 8(4):663–676, 1992.
- [Ulbr03] M. Ulbrich. *Öffnen von Ionenkanälen durch kapazitive Kopplung in Zellmembranen auf Siliziumchips*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2003.
- [Ulbr05] M. H. Ulbrich und P. Fromherz. Opening of K^+ channels by capacitive stimulation from silicon chip. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 81(5):887–891, 2005.
- [Vass97] S. Vassanelli und P. Fromherz. Neurons from rat brain coupled to transistors. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 65(2):85–88, 1997.
- [Voel05] M. Voelker. *Detektion von Aktionspotentialen einzelner Säugetierneurone mit rauscharmen Feldeffekttransistoren nahe der thermodynamischen Messgrenze*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2005.
- [Voel06] M. Voelker und P. Fromherz. Nyquist noise of cell adhesion detected in a neuron-silicon transistor. *Physical Review Letters*, 96(22):228102, 2006.

- [Wage04] D. A. Wagenaar, J. Pine und S. M. Potter. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal Of Neuroscience Methods*, 138(1-2):27–37, 2004.
- [Wall06a] F. Wallrapp. *Hoch-K-Materialien in der Elektrolyt/Isolator/Silizium-Konfiguration: Charakterisierung und Anwendung in der Bioelektronik*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2006.
- [Wall06b] F. Wallrapp und P. Fromherz. TiO₂ and HfO₂ in electrolyte-oxide-silicon configuration for applications in bioelectronics. *Journal Of Applied Physics*, 99(11):114103, 2006.
- [Wan95] X. Wan, J. A. Harris und C. E. Morris. Responses of neurons to extreme osmomechanical stress. *Journal Of Membrane Biology*, 145(1):21–31, 1995.
- [Wats44] G. N. Watson. *A treatise on the theory of Bessel functions*. Cambridge University Press, Cambridge, 2nd edition, 1944.
- [Wils94] R. J. A. Wilson, L. Breckenridge, S. E. Blackshaw, P. Connolly, J. A. T. Dow, A. S. G. Curtis und C. D. W. Wilkinson. Simultaneous multisite recordings and stimulation of single isolated leech neurons using planar extracellular electrode arrays. *Journal Of Neuroscience Methods*, 53(1):101–110, 1994.
- [Winl82] W. Winlow, A. V. Holden und P. G. Haydon. Characterization of Lymnaea neurons by determination of action-potential trajectories. *Journal Of Experimental Biology*, 99(AUG):207–221, 1982.
- [Wong81] R. G. Wong, R. D. Hadley, S. B. Kater und G. C. Hauser. Neurite outgrowth in molluscan organ and cell-cultures - The role of conditioning factor(s). *Journal Of Neuroscience*, 1(9):1008–1021, 1981.
- [Wyss67] O. A. M. Wyss. Das apolaritäre Prinzip der Mittelfrequenz-Reizung. *Experientia*, 23(8):601–608, 1967.
- [Yaro06] V. Yarov-Yarovoy, D. Baker und W. A. Catterall. Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K⁺ channels. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 103(19):7292–7297, 2006.
- [Yu05] F. H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman und W. A. Catterall. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57(4):387–395, 2005.
- [Zamy84] A. A. Zamyatnin. Amino-acid, peptide, and protein volume in solution. *Annual Review Of Biophysics And Bioengineering*, 13:145–165, 1984.
- [Zeck03] G. Zeck und P. Fromherz. Repulsion and attraction by extracellular matrix protein in cell adhesion studied with nerve cells and lipid vesicles on silicon chips. *Langmuir*, 19(5):1580–1585, 2003.

- [Zhan03] Z. Zhang, Y. F. Xu, P. H. Dong, D. Sharma und N. Chiamvimonvat. A negatively charged residue in the outer mouth of rat sodium channel determines the gating kinetics of the channel. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 284(5):C1247–C1254, 2003.
- [Zhu98] G. Y. Zhu, Y. Zhang, H. X. Xu und C. Jiang. Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *Journal of Neuroscience Methods*, 81(1-2):73–83, 1998.

Ich bedanke mich herzlich bei

Prof. Dr. Peter Fromherz für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themas,
für seine Betreuung, Offenheit und Diskussionsbereitschaft,

Doris Eckerlein für die professionelle Präparation der Ratten,

Alexander Kaul für die gewissenhafte Schneckenzellkultur und die Einführung
in die Präparationstechnik,

Moritz Völker für seine Hilfe bei den Messungen des Abdichtungsrauschens,
beim Entwerfen elektrischer Schaltungen und für das Korrekturlesen von Tei-
len dieser Arbeit,

Ralf Zeitler für viele sachdienliche Hilfestellungen rund um die Elektrophysio-
logie,

allen Mitgliedern der Abteilung Fromherz für ihre Diskussions- und Hilfsbe-
reitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre,

meiner Freundin Marina, meiner Familie und meinen Freunden, die mich währ-
end dieser Zeit begleitet haben.