

Entwicklung von Potentialsensoren für die Zell-Halbleiter-Kopplung

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Lehrstuhl Professor H. E. Gaub)



Bernhard Stein
München

Lehrstuhl für angewandte Physik & Biophysik

Entwicklung von Potentialsensoren für die Zell-Halbleiter-Kopplung

Bernhard Stein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Tag der Abgabe: 24. Nov. 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Feb. 2004

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Schollwöck

1. Gutachter der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. Hermann E. Gaub

2. Gutachter der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. Khaled Karrai

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	3
2	Einleitung	5
2.1	Motivation	5
2.2	Elektrisch aktive Zellen	7
2.2.1	Membranpotential und Aktionspotentiale	7
2.2.2	Elektrisch aktive Zellen auf Sensoroberflächen	9
3	Der Feldeffekt-Adressierbare-Potentiometrische Sensor (FAPS)	15
3.1	Funktionsweise	15
3.2	Aufbau der Proben	17
3.2.1	Prozessierung der Proben	17
3.2.2	Maskenherstellung für die optische Lithografie	19
3.3	Messungen an FAPS-Strukturen ohne ELO-Schritt.	21
3.4	Potentialempfindlichkeit von FET Strukturen	30
3.5	Verkapselung gegen Wasser	32
3.5.1	Organische Beschichtungen	34
3.5.2	Anorganische Schichten	37
3.6	Messungen an FET-Strukturen unter elektrolytischer Lösung	41
3.7	Diskussion der Ergebnisse	44
4	Der Licht-Adressierbare-Potentiometrische Sensor (LAPS)	47
4.1	Prinzipielle Funktionsweise	47
4.1.1	Aufzeichnung einer Photostromkennlinie und Interpretation	49
4.1.2	Versuchsaufbau und Meßmethode	51
4.1.3	Ortsauflösung	55
4.2	Rauschbetrachtungen für eine Potentialmessung	58
4.2.1	Rauschen der einzelnen Komponenten im Meßaufbau	59
4.2.2	Verringerung des Oberflächenpotentialrauschens durch die Kombination des LAPS mit dem Patch-Clamp-Aufbau	69
4.3	Membranpotentialmessung	72
4.3.1	Potentialmessungen mit dem Patch-Clamp-Aufbau	72
4.3.2	Reaktion von Zellen auf periodische Stimulation	77
4.3.3	Aufzeichnung von extrazellulären Aktionspotentialen mit dem LAPS	79
4.4	Diskussion der Ergebnisse	83
5	Das Cytosensor-Mikrophysiometer	85
5.1	Funktionsweise	85
5.2	Studie an Osteoblasten und Osteosarcoma-Zellen mit dem Cytosensor Mikrophysiometer	89
5.3	Das Cytosensor-Mikrophysiometer mit Ortsauflösung	91
5.3.1	Realisierung der Ortsauflösung	91
5.3.2	Bestimmung des Sensorverhaltens mit Hilfe von pH-Pulsen	92
5.3.3	Charakterisierung des Systems mit Zellen	95
5.4	Geeignete Zellsysteme	97
	LITERATURVERZEICHNIS	101
	ANHANG	112
6	Realisierung mehrerer Meßpunkte im Cytosensor-Mikrophysiometer	112
7	Halbleiterhetrostrukturen und Halbleiter-Prozessschritte	116
8	Zur Zellkultur	121

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Potentialsensoren für die Zell-Halbleiter-Kopplung entwickelt, um mit diesen extrazelluläre Aktionspotentiale an elektrisch aktiven Zellen langzeitstabil zu messen. Derartige Sensoren werden benötigt, um eine Schnittstelle zwischen der belebten und der unbelebten Welt aufbauen zu können. Die beiden in dieser Arbeit entwickelten Sensoren weisen gegenüber bestehenden Systemen zwei Vorteile auf. Zum einen kann die Dichte der aktiven Meßpunkte in einfacher Weise stark erhöht werden, um eine an beliebiger Position auf dem Sensor adhärente Zelle elektrisch kontaktieren zu können. Zum anderen benötigen diese Sensoren, aufgrund ihres Funktionsprinzips, wesentlich weniger Zuleitungen zu den aktiven Meßpunkten als bestehende Systeme, wie Multielektroden-Arrays oder Feldeffekt-Transistor-Arrays.

Der Feldeffekt-Adressierbare-Potentiometrische-Sensor (FAPS) ist aus einer Gitterstruktur von langen, schmalen Feldeffekt-Kanälen und darunter befindlichen Gate-Elektroden aufgebaut. Mit Hilfe der Gate-Elektroden kann ein Bereich auf dem Feldeffekt-Kanal gezielt adressiert und so der Meßpunkt auf der Gitterstruktur bestimmt werden. Es wurden genauere Untersuchungen zur Potentialempfindlichkeit, Zeitauflösung und zur Skalierbarkeit der Struktur durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Potentialsensitivität für möglichst breite Feldeffekt-Kanäle und möglichst schmale Gate-Elektroden am höchsten ist. Es wurde eine Potentialauflösung von $\approx 60 \mu\text{V}$ an Luft (Gate-Fläche $10 \mu\text{m} \times 23 \mu\text{m}$) und von $\approx 3 \text{ mV}$ in elektrolytischer Lösung (Gate-Fläche $20 \mu\text{m} \times 35 \mu\text{m}$) bei einer Zeitauflösung von 3 kHz ermittelt. Um die Toxizität des verwendeten Halbleitermaterials (GaAs) zu unterdrücken, wurden Untersuchungen mit organischen und anorganischen Beschichtungen durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, daß beide Beschichtungen unter elektrischer Belastung nur einen bedingten Schutz für Zellen und Halbleiter bieten.

Der Licht-Adressierbare-Potentiometrische-Sensor (LAPS) besteht aus einem lateral unstrukturierten Halbleitersubstrat. Durch lokales, moduliertes Beleuchten wird ein Photostrom generiert, dessen Amplitude vom Oberflächenpotential abhängt. Die Adressierung erfolgt über das Verfahren des Lichtzeigers. Es konnte eine Potentialsensitivität von $\approx (50-80) \mu\text{V}$ bei einer Bandbreite von 3 kHz erreicht werden. Um ein

besseres Verständnis über die limitierenden Faktoren zu gewinnen, wurden Rauschmessungen zu den einzelnen, im Aufbau verwendeten Komponenten durchgeführt. Zur Bestimmung der Ortsauflösung wurde die Diffusion der photogenerierten Ladungsträger untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß diese abhängig vom Oberflächenpotential ist und im relevanten Potentialbereich einen Wert von $\approx 14 \mu\text{m}$ aufweist.

Um Potentialmessungen an Zellen durchführen zu können, wurde dem LAPS-Aufbau ein Patch-Clamp-Aufbau hinzugefügt. Als Testsystem wurden Neuroblastoma-Zellen verwendet. Durch wiederholtes Stimulieren der Zellen mit der Patch-Pipette und anschließendes Mitteln über die mit dem LAPS aufgezeichneten Einzelereignisse konnte das extrazelluläre Potential nachgewiesen werden, welches durch die aktiven Ionenströme der Zelle verursacht wird.

Eine kommerzielle Anwendung findet der LAPS im Cytosensor-Mikrophysiometer. Mit ihm kann der Metabolismus von Zellen gemessen werden und durch Zugabe von Pharmaka eine Aussage über deren Wirkung getroffen werden. Das Cytosensor-Mikrophysiometer macht von der Ortsauflösung des LAPS keinen Gebrauch, sondern mißt nur an einer Stelle der Meßkammer den pH-Wert. In dieser Arbeit wurden vier Meßpunkte in einer Meßkammer realisiert. Mit diesem System konnte gezeigt werden, daß der Metabolismus von unterschiedlichen, nebeneinander in der Meßkammer adhärenen Zellkolonien gleichzeitig untersucht werden kann. Damit steht jetzt ein System zur Verfügung, mit dem die chemische Interaktion von unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden kann.

2 Einleitung

2.1 Motivation

Komplexe Lebensformen bestehen aus einer großen Anzahl einzelner Zellen. Um ein sinnvolles Zusammenwirken dieser Zellen und so deren Überleben zu gewährleisten, muß zwischen diesen ein Informationsaustausch und eine Informationsverarbeitung stattfinden. Dies wird in der Regel auf chemischem (Botenstoffe, Hormone) oder auf elektrischem Weg (Nervenleitung) bewerkstelligt [1-3].

Um die genauere Funktion der einzelnen Zellen und deren Wechselwirkung mit Ihrer Umgebung untersuchen zu können, ist es nötig eine Schnittstelle zwischen der unbelebten Welt und einer einzelnen Zelle aufzubauen. Mit einem derartigem „Interface“ ist es möglich, die Reaktion von einzelnen Zellen auf z. B. isolierte chemische Substanzen zu testen. Diese Schnittstellen müssen der jeweiligen Fragestellung angepasst sein. Es gibt bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Sensoren [4]. Ein spezieller Sensortyp reagiert auf die Ansäuerung des Mediums, welches die Zelle umgibt [5-7]. Diese Ansäuerung wird durch den Metabolismus der Zelle verursacht.

Weiterhin wurden Techniken entwickelt, um elektrisch aktive Zellen (Neurone, Herzzellen) kontaktieren zu können, um ein tieferes Verständnis über deren Funktionsweise und ihr Zusammenwirken im Nervenzentrum zu gewinnen. Dazu ist es nötig, einzelne Neurone elektrisch zu kontaktieren und deren Membranpotential messen zu können. Durch den Einbau transmembraner fluoreszierender Farbstoffe, die potentialabhängig sind, ist es möglich das Membranpotential mit hoher Zeit- und Ortsauflösung zu messen [8, 9]. Mit dieser Methode können auch mehrere Zellen gleichzeitig beobachtet werden. Allerdings sind die Farbstoffe unter Fluoreszenz toxisch und sie bleichen mit der Zeit, so daß die Fluoreszenz schwächer wird.

Die direkte Kontaktierung der Zellen mit der Patch-Clamp-Technik [10] bietet nicht nur die Möglichkeit, das Membranpotential einer Zelle mit sehr hoher Potential- und Zeitauflösung zu messen, sondern die Zelle gezielt zu einem solchen zu stimulieren. Diese Technik hat jedoch den Nachteil, daß die Zelle mechanisch verletzt wird und so keine Langzeituntersuchungen durchgeführt werden können. Da für jede Zelle eine eigene Patch-Pipette benötigt wird, die über einen Mikromanipulator an die Zelle

angenähert wird, kann nur eine begrenzte Zahl an Zellen gleichzeitig beobachtet werden [11].

Um längere Zeit an einem Zellverband Messungen durchführen zu können, und somit auch Veränderungen in einem neuronalen Netzwerk beobachten zu können, darf die angewandte Technik die beobachteten Zellen nicht zerstören. Dazu wurden planare metallische Mikroelektroden entwickelt [12-14], um Membranpotentiale extrazellulär ableiten zu können. Diese bieten auch die Möglichkeit eine auf einer Elektrode adhärente Zelle zu einem Aktionspotential zu stimulieren. Weiterhin wurden Feldeffekt-Transistorarrays (FETs) entwickelt [15, 16] mit denen es möglich ist, extrazelluläre Potentiale aufzuzeichnen. Die Stimulation einer Zelle zu einem Aktionspotential über zusätzlich definierte Metallelektroden besteht auch hier [17, 18]. Beide Sensoren besitzen jedoch nur eine limitierte Anzahl an sensitiven Meßpunkten, deren Dichte nicht beliebig erhöht werden kann. Damit besteht nur begrenzt die Möglichkeit, Messungen an neuronalen Netzwerken durchzuführen.

In dieser Arbeit soll eine elektrische Schnittstelle zwischen Zellen und Halbleiter entwickelt werden, die eine noninvasive und langzeitstabile Kommunikation zwischen diesen erlaubt. Die Anforderungen an einen solchen Sensor sind durch das zu vermessende System vorgegeben.

- Die potentialsensitive Fläche, die den neuronalen Zellen zur Besiedelung zur Verfügung steht, muß für einen kleinen Zellverband ausreichend sein ($A > 500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$).
- Die Ortsauflösung sollte so hoch sein, daß die Potentialänderung einer beliebigen Zelle an einem beliebigen Ort der potentialsensitiven Fläche gemessen werden kann. Damit muß die Ortsauflösung in der Größe einer neuronalen Zelle liegen ($< 20 \mu\text{m}$).
- Die Potentialauflösung sollte es ermöglichen, das extrazelluläre Potential von beliebigen neuronalen Zellen messen zu können. Dabei muß eine Zeitauflösung erreicht werden, die an die Geschwindigkeit der Aktionspotentiale der Zellen angepasst ist.

Eine Anwendung dieses Sensors ist die orts- und zeitaufgelöste Beobachtung der Signalausbreitung in neuronalen Netzwerken, welche sich auf dem Sensor entwickelt haben. Derartige Netzwerke besitzen die Fähigkeit, ihre Morphologie zu ändern und die untereinander gebildeten synaptischen Verknüpfungen zu variieren [19-21].

2.2 Elektrisch aktive Zellen

Jede Zelle ist durch eine Plasmamembran begrenzt, die den Innenraum der Zelle von der Umgebung trennt. Diese Membran ist für die meisten wasserlöslichen Moleküle nahezu undurchlässig. Eingebettet in diese Membran befinden sich verschiedene Proteine die für den gezielten Austausch von bestimmten Molekülen zuständig sind. Dieser Transport kann sowohl passiv (entlang eines Gradienten) als auch aktiv (gegen einen Gradienten) stattfinden.

2.2.1 Membranpotential und Aktionspotentiale

Die Na^+/K^+ - Pumpe ist ein Transportprotein welches aktiv diese Ionen durch die Zellmembran unter Energieverbrauch transportiert. Dabei erhält sie eine niedrige Na^+ - Konzentration und eine hohe K^+ - Konzentration im inneren der Zelle gegen das elektrochemische Potential aufrecht [1]. Im Gleichgewicht stellt sich durch diese Konzentrationsunterschiede und die Durchlässigkeit der Zellmembran für hauptsächlich K^+ - Ionen ein Membranpotential U_M ein, das als Potentialdifferenz zwischen dem Inneren der Zelle und der Umgebung definiert ist, und durch die *Nernst-Gleichung* beschrieben wird. Es diffundieren so lange K^+ - Ionen vom Cytoplasma, durch Ionenkanäle, aus der Zelle, bis sich Potential- und Konzentrationsgradient die Waage halten¹. Ionenkanäle sind passive Transportproteine, was bedeutet, daß ein Transport nur entlang des elektrochemischen Potentialgefälles stattfindet.

$$\text{Gl. : 1} \quad U_M = \frac{R \cdot T}{Z_i \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{c_i^{\text{au\ss}en}}{c_i^{\text{innen}}}\right) = \frac{61,5\text{mV}}{Z_i} \cdot \log\left(\frac{c_i^{\text{au\ss}en}}{c_i^{\text{innen}}}\right)$$

Dabei ist R die Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin (ca. 310 K unter physiologischen Bedingungen), F die Farady-Konstante und Z_i die Wertigkeit der Ionen.

Das Nernst-Potential führt nur zu einer allgemeinen Lösung, wenn die Zellmembran nur für eine Ionensorte durchlässig ist. Sind am Ionenstrom jedoch mehrere Ionen beteiligt, müssen die einzelnen Membranleitfähigkeiten g_i für jede Ionensorte i berücksichtigt werden. Dem ist in der *Goldmann-Gleichung* [22] Rechnung getragen.

¹ Es ergibt sich ein Nernst-Potential von K^+ -Ionen von $U_M = -97 \text{ mV}$ für $C_{\text{K}}^{\text{au\ss}en} = 4\text{mM}$ und $C_{\text{K}}^{\text{innen}} = 155\text{mM}$.

Die passiven Membraneigenschaften, wie die Membrankapazität C_M und der Membranwiderstand R_M können mit der Patch-Clamp-Technik [23] bestimmt werden (siehe Kap. 4.3.1).

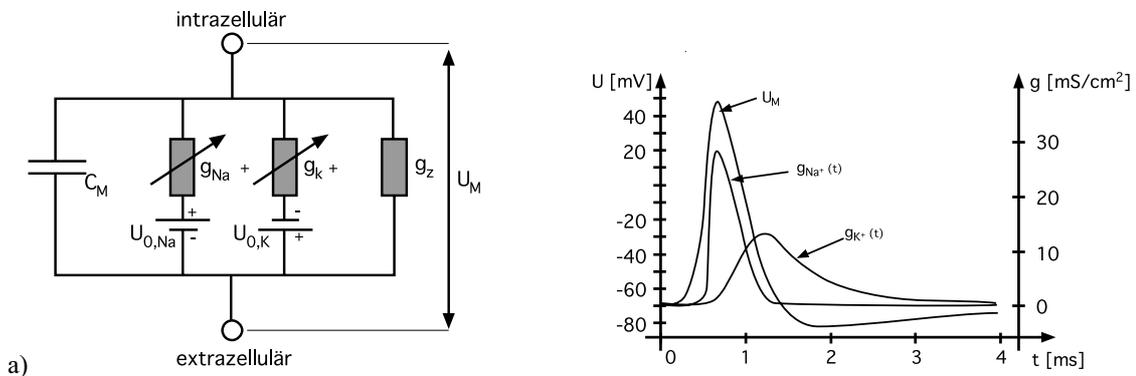


Abb. 2.2-1 a) Ersatzschaltbild für eine Zellmembran. U_0 sind die Nernstpotentiale und g die Membranleitfähigkeiten. In g_z sind die spannungsunabhängigen Leitfähigkeiten zusammengefasst. b) Gemessenes Aktionspotential eines Tintenfisch-Riesenaxons. Aufgetragen sind die zeitlichen Verläufe der Leitfähigkeiten der Membran für Na^+ und K^+ , sowie das resultierende Aktionspotential U_M (entnommen aus [22]).

In Abb. 2.2-1 a) ist das einfachste Ersatzschaltbild für eine Zellmembran gegeben um das Zustandekommen eines Aktionspotentials zu erklären. Ionenkanäle sind extrem selektiv und ihre Leitfähigkeit g kann vom Membranpotential U_M , von Transmitterstoffen und von der Zeit t abhängen. Die Na^+ - und K^+ - Kanäle sind beide potentialgesteuert. Betrachtet man eine elektrisch erregbare Zelle (z.B. Neuron) im Gleichgewicht, so ist das Ruhepotential $U_M \approx -70$ mV. Wird diese Zelle durch ein externes Signal (Stimulation) depolarisiert ($U_M > -70$ mV) so öffnen nach dem „Alles oder nichts Prinzip“ die Na^+ - Kanäle und die Leitfähigkeit g_{Na^+} der Membran steigt an. Dies führt zu einem Einstrom von Na^+ - Ionen und zu einer weiteren Depolarisation des Membranpotentials U_M , was wiederum zum weiteren Öffnen von Na^+ - Kanälen führt. Dadurch nähert sich das Membranpotential dem Nernstschen-Potential von Na^+ an. Die Na^+ - Kanäle bleiben jedoch selbst bei anhaltender Depolarisation nur für maximal einige Millisekunden geöffnet. Nahezu zeitgleich mit den Na^+ - Kanälen öffnen auch die K^+ - Kanäle, für diese wird jedoch die maximale Leitfähigkeit erst später erreicht. Der K^+ - Strom ist dem Na^+ - Strom entgegengerichtet, wodurch das Membranpotential wieder dem Ruhepotential entgegenstrebt und dieses sogar kurzzeitig unterschritten wird (Hyperpolarisation).

2.2.2 Elektrisch aktive Zellen auf Sensoroberflächen

Mit allen Oberflächenpotential-Sensitiven-Sensoren (LAPS, FAPS, FET...) wird das Potential an der Substratoberfläche unterhalb einer adhärenen Zelle gemessen. Um Vorhersage über die Amplitude und den zeitlichen Verlauf von extrazellulären Aktionspotentialen geben zu können, wurden verschiedene Modelle entwickelt [15, 18, 24, 25].

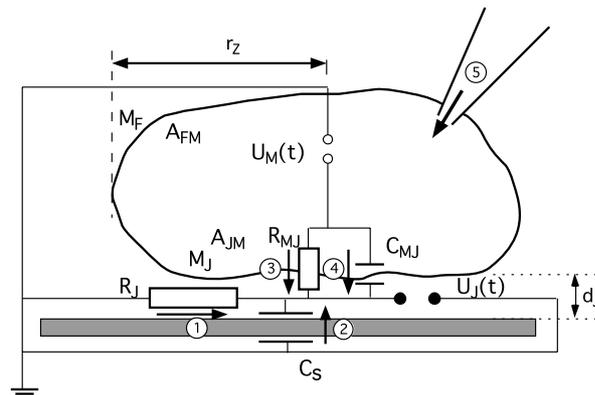


Abb. 2.2-2 Ersatzschaltbild einer Zelle, die auf einer Unterlage adhären ist. Das Membranpotential $U_M(t)$ ist im Falle eines Aktionspotentials stark zeitabhängig. R_J ist der Elektrolytwiderstand im Spalt zwischen Zelle und Substrat, d_J der Abstand Zelle-Substrat, $U_J(t)$ das Oberflächenpotential zwischen Zelle und Substrat, r_Z der Radius der Zelle, R_{MJ} der Membranwiderstand und C_{MJ} die Membrankapazität der Membran die dem Sensor zugewandt ist. ① ist der resistive Strom durch den Spalt, ② der kapazitive über den Sensor, ③ der resistive durch die Zellmembran und ④ der kapazitiver durch die Zellmembran. Wird die Zelle zusätzlich über eine Patch-Pipette in der Stromklemme stimuliert, so fließt zusätzlich der Strom ⑤ in die Zelle. Nach der Kirchhofschen Regel ist die Summe der Ströme Null. M_J ist der Membrananteil mit der Fläche A_{JM} der in engem Kontakt mit dem Sensor steht, M_F ist die „freie“ Membran mit der Fläche A_{FM} .

Das einfachste Modell ist das Punktkontaktmodell [25-27]. Bei diesem Ersatzschaltbild wird die Geometrie der Zelle und der Kontaktfläche vernachlässigt. Für die meisten Potentialsensoren (LAPS, FET,...) ist dies eine akzeptable Annäherung, da die Ortsauflösung nicht ausreichend ist um den Spannungsverlauf unterhalb der Zelle aufzulösen. Das in dem Punktkontaktmodell berechnete Oberflächenpotential $U_J(t)$ stellt den maximalen Spannungsabfall im Spalt zwischen Zelle und Sensor über den Widerstand R_J dar. In den globalen Widerstand R_J fließt der ortsabhängige Abstand der Zelle vom Substrat d_J , der Radius der Zelle und der spezifische Widerstand des Elektrolyten ρ_E ein. Die Eigenschaften der Zellmembran werden durch den Membranwiderstand R_{MJ} und die Membrankapazität C_{MJ} berücksichtigt, die dem Sensor zugewandt sind. Dabei sind nichtlineare Membraneigenschaften, wie das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen nicht berücksichtigt. Der Sensor (FAPS, LAPS) wird durch die Kapazität C_S berücksichtigt, die entweder die Gatekapazität (FAPS) oder die Kapazität des adressierten Bereichs auf dem LAPS repräsentiert. $U_J(t)$ repräsen-

tiert dann die Steuerspannung des Sensors, die mit diesem Modell in Abhängigkeit von $U_M(t)$ berechnet werden kann. Durch die Anwendung der *Kirchhoff'schen Knotenregel* und die Darstellung der Ströme im Frequenzraum erhält man:

$$\text{Gl. : 2} \quad (U_M(\omega) - U_J(\omega)) \cdot \left(\frac{1}{R_{MJ}} + i\omega C_{MJ} \right) = U_J(\omega) \left(\frac{1}{R_J} + i\omega C_S \right) \quad \text{bzw.} \quad I_{MJ}(\omega) = I_J(\omega)$$

Was bedeutet, das die Ströme (siehe Abb. 2.2-2) ③ + ④ = ① + ② sind. Damit läßt sich eine Übertragungsfunktion $h(\omega) = U_J(\omega)/U_M(\omega)$ aufstellen, die wie folgt lautet:

$$\text{Gl. : 3} \quad h(\omega) = \frac{1 + i\omega\tau_{MJ}}{1 + i\omega\tau_J} \cdot h_0 \quad \text{mit} \quad h_0 = \frac{R_J}{R_J + R_{MJ}} ; \tau_{MJ} = R_{MJ} \cdot C_{MJ} ; \tau_J = \frac{C_{MJ} + C_J}{\left(\frac{1}{R_{MJ}} + \frac{1}{R_J} \right)}$$

Mit Hilfe dieser Übertragungsfunktion $h(\omega)$ können Vorhersagen über das zu erwartende extrazelluläre Membranpotential $U_J(\omega)$ und durch eine Fouriertransformation (FT) über $U_J(t)$ gemacht werden, wenn das intrazelluläre Membranpotential $U_M(t)$ bekannt ist. Dies setzt im einzelnen Experiment voraus, daß gleichzeitig mit der extrazellulären auch eine intrazelluläre Messung (Patch-Clamp-Messung) durchgeführt wird (siehe Kap. 4.3.3).

Bei einer gezielten Stimulation der Zelle mittels einer Patch-Clamp-Messung in der Strom-Klemme (Current-Clamp CC) wird der Zelle zusätzlich der in Abb. 2.2-2 eingezeichneten Strom ⑤ aufgeprägt. Für das extrazelluläre Potential ist jedoch nur der Bruchteil $A_{JM}/(A_{FM} + A_{JM})$ von Bedeutung. Damit wird Gl. : 2 erweitert zu:

$$\text{Gl. : 4} \quad (U_M(\omega) - U_J(\omega)) \cdot \left(\frac{1}{R_{MJ}} + i\omega C_{MJ} \right) + I_{inj} \cdot \frac{A_{JM}}{A_{FM} + A_{JM}} = U_J(\omega) \left(\frac{1}{R_J} + i\omega C_S \right)$$

Das resultierende Membranpotential $U_M(t)$ wird gemessen. Dieses wird mittels der FT in $U_M(\omega)$ überführt und daraus $U_J(\omega)$ berechnet. Durch die inverse FT (FT*) erhält man schließlich $U_J(t)$, welches dann mit der extrazellulären Messung verglichen werden kann.

Werden Messungen mit der Patch-Clamp-Technik im VC-Modus durchgeführt, so wird der Zelle eine feste Spannung $U_M(t)$ aufgeprägt und der resultierende Strom in die Zelle bzw. aus ihr hinaus gemessen. Damit ist direkt der Strom $I_M(t)$ bekannt, der durch die gesamte Zellmembran fließt. Um die Stromanteile ③ und ④, also $I_{MJ}(t)$ in

Abb. 2.2-2 zu erhalten, die durch den Teil der Membran fließen, der in engem Kontakt mit dem Sensor steht, ist $I_M(t)$ mit dem Verhältnis der Flächen zu multiplizieren.

$$\text{Gl. : 5} \quad I_{MJ}(t) = \frac{A_{JM}}{A_{GES}} \cdot I_M(t) \quad \text{wobei} \quad A_{GES} = A_{FM} + A_{JM}$$

Im einfachsten Fall ist A_{JM} mit der im Mikroskop sichtbaren Querschnittsfläche A_{OPT} der Zelle gleich zu setzen. Die Gesamtoberfläche der Zelle ist nicht so einfach zugänglich. W. Parak hat in [28] eine einfache Abschätzung zur Berechnung von A_{GES} gegeben. Danach gilt $A_{GES} \approx 3 \times A_{OPT} \approx 3 \times A_{JM}$. Die einfache Abschätzung in Gl. : 5 gilt nur, solange sämtliche Ionenkanäle homogen in der Zellmembran verteilt sind und keine „self-gating“ Mechanismen auftreten [29].

Anhand des Punktkontaktmodells können Aussagen über die Abhängigkeit des extrazellulären Potentials $U_J(\omega)$ von den einzelnen Parametern getroffen werden. Um ein möglichst großes $U_J(\omega)$ zu erreichen sollte R_J möglichst groß sein. Das kann hauptsächlich durch einen möglichst kleinen Zell-Substrat-Abstand d_Z erreicht werden, da alle anderen Parameter, die R_J beeinflussen nahezu festgelegt sind. Typische Werte für d_J liegen im Bereich 10 nm – 100 nm [30-32]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, möglichst große Zellen zu verwenden, sodaß r_Z und auch R_J groß wird. Neuronen variieren in ihrem Durchmesser von ca. 10-20 μm [33] bis zu 100 μm [34]. Durch den Einsatz von Zellen, die eine möglichst große Zahl an Ionenkanälen exprimieren, erniedrigt sich der Membranwiderstand R_{MJ} , wodurch ein höheres extrazelluläres Aktionspotential $U_J(t)$ gemessen werden kann, da dies maßgeblich vom Quotienten R_J/R_{MJ} bestimmt wird. So wurden an Blutegelnervenzellen Membranleitwerte $G_M = 1/R_M$ von 0,4 bis 40 mS/cm^2 gemessen [24, 35], wohingegen embryonale Neuronen von Ratten einen Membranleitwert im Bereich von $G_M = 100 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ haben [36].

Aktionspotentiale können nicht nur von neuronalen Zellen, sondern z. B. auch von Herzmuskelzellen erzeugt werden. In Abb. 2.2-3 a) ist ein Beispiel für die Aufzeichnung eines extrazellulären Aktionspotentials von einer postnatalen Ratten-Herzmuskelzelle bei 37°C gegeben [37-39].

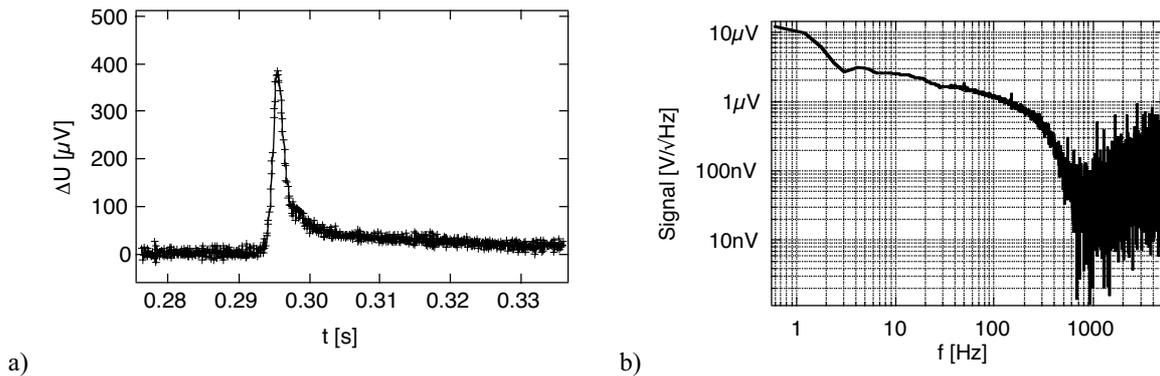


Abb. 2.2-3 a) Extrazelluläres Aktionspotential einer Herzmuskelzelle aufgezeichnet mit einem FET (entnommen aus [37]). b) Fouriertransformation des Aktionspotentials in (a).

Typische Amplituden von extrazellulären Aktionspotentialen $U_J(t)_{\max}$ reichen von einigen $10 \mu\text{V}$ bis in den mV Bereich. So wurden an Neuronen vom Hippocampus einer embryonalen Ratte [40] Potentiale von $U_J(t)_{\max} \approx (25 - 150) \mu\text{V}$ gemessen [33]. An Blutegelzellen (*leech hirudo medicinalis* [41]) wurden Potentiale von $U_J(t)_{\max} \approx 2 \text{ mV}$ gemessen [18]. Bei Messungen an Neuronen der Schnecke *Lymnaea stagnalis* [42-45] konnten extrazelluläre Membranpotentiale von $U_J(t)_{\max} \approx 2 \text{ mV}$ aufgezeichnet werden [34, 46].

In Abb. 2.2-3 a) ist das extrazelluläre Aktionspotential einer Herzmuskelzelle dargestellt, welches mit einem FET aufgezeichnet wurde². Führt man an dieser Messung eine Fouriertransformation durch, so erkennt man, daß das Signal Frequenzanteile bis zu 1 kHz enthält (Abb. 2.2-3 b). Daher wird an den Sensor die Forderung gestellt, daß er extrazelluläre Signale mit einer Amplitude von ca. $100 \mu\text{V}$ bei einer Bandbreite von $> 1 \text{ kHz}$ aufzeichnen kann.

Eine weitere Anforderung an den Sensor ergibt sich dadurch, daß bei der Entstehung von neuronalen Netzen die einzelnen Nervenzellen auf einem beliebigen Ort des verwendeten Oberflächenpotentialsensors anwachsen. Zudem verändern die sich ausbildenden neuronalen Netzwerke laufend ihre Topologie [34]. Um dennoch eine beliebige Zelle elektrisch „belauschen“ zu können, müssen die einzeln adressierbaren Meßpunkte des Sensors eine sehr hohe Dichte aufweisen (Mittlerer Abstand der Meßpunkte $< 10 - 20 \mu\text{m}$).

Typische Abmessungen für die aktiven Meßpunkte (Gate-Größe) von FET's betragen ca. $4 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ womit sie an die Größe einer Zelle angepaßt sind. Der Ab-

² Diese Messung wurde aus [37] entnommen.

stand zwischen diesen Meßpunkten beträgt ca. 100 μm – 200 μm [26, 38]. Bei den MEA`s sind die Größenverhältnisse ähnlich [47, 48]. Daher reicht bei Multielektrodearrays (MEA`s) und Feldeffekt-Transistoren (FET`s) die Dichte der Meßpunkte bis jetzt nicht aus, um an einer Zelle die an einem beliebigen Punkt des Sensors adhärent ist messen zu können. Daher wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Neuronen gezielt auf den sensitiven Meßpunkten anwachsen zu lassen und diese auch dort halten zu können.

Es besteht die Möglichkeit, um einzelne FET`s bzw. Metallmikroelektroden kleine Käfige zu bauen, in die einzelne Neuronen gezielt gesetzt werden können [46, 49-51]. Dabei werden die Zellkörper im Käfig gefangen gehalten, wohingegen sich die Axone und Dendriten frei ausbilden und beliebige Verknüpfungen aufbauen können. Durch vorgegebene Polyester-Mikrostrukturen kann auch das Wachstum von Dendriten und Axonen bestimmt und so eine fixe Topologie vorgegeben werden [52].

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturierung ist unter anderem durch das Mikrokontakt-Drucken (μCP) gegeben [53]. Mit Hilfe dieses Verfahrens können Selbst-Organisierte-Monolagen (Self-Assembled-Monolayer, SAM) mit einem PDMS-Stempel (polydimethylsiloxane) bis zu einer minimalen Strukturgröße von ca. 0.5 bis 1 μm auf ein Substrat aufgestempelt werden [54, 55]. Damit besteht die Möglichkeit, adhäsionsfördernde Substanzen (Lamenin) auf einem Chip mit FET`s oder MEA`s aufzubringen und so eine Struktur vorzugeben, auf der dann die Zellen anwachsen und ein Netzwerk ausbilden [56-59].

Durch diese Vorgehensweise wird dem Netzwerk aus Neuronen jedoch eine vorgegebene Topologie aufgezwungen. In dieser Arbeit sollen Halbleitersensoren weiterentwickelt werden, die eine so hohe Dichte an Meßpunkten aufweisen, daß eine Zelle, die an einem beliebigen Ort auf dem Sensor angewachsen ist, elektrisch „be-
lauscht“ werden kann. Damit können sich neuronale Netzwerk frei (ohne Vorgabe einer Struktur) entwickeln und extrazelluläre Aktionspotentiale an diesen abgeleitet werden.

3 Der Feldeffekt-Adressierbare-Potentiometrische Sensor (FAPS)¹

3.1 Funktionsweise

Um eine Zelle, die an einem beliebigen Ort auf dem Sensor angewachsen ist, elektrisch „belauschen“ zu können, muß die Dichte der Meßpunkte sehr hoch sein. Bei den herkömmlichen Feldeffekt-Transistor-Arrays (FET`s) oder den Multi-Elektrode-Arrays (MEA`s) stellt sich dabei das Problem, daß die Anzahl der Zuleitung mit n skaliert, wenn n die Anzahl der Meßpunkte ist, da zu jedem Meßpunkt mindestens eine Zuleitung bestehen muß.

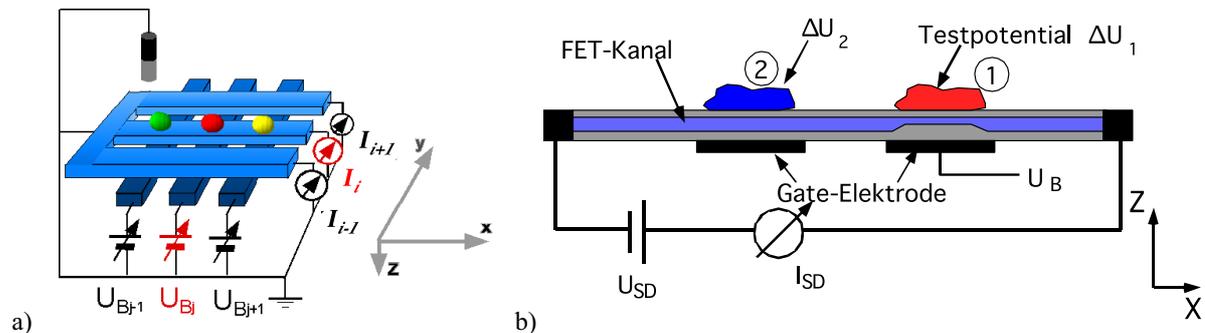


Abb. 3.1-1 a) Schematischer Aufbau einer FAPS-Struktur. In y -Richtung sind die Rückelektroden dargestellt, an die eine Spannung U_B angelegt werden kann. In x -Richtung sind die FET-Kanäle gezeigt, an denen entweder der Widerstand $R(t)$ oder der Strom $I(t)$ gemessen wird. Durch Messen des Kanal-Stroms I_i und Anlegen einer Spannung U_{B_j} wird exakt ein Meßpunkt ausgewählt. b) Schematischer Querschnitt durch die Struktur. Die Verengung des FET-Kanals soll die Erhöhung des Widerstandes $\rho(x)$ verdeutlichen.

Der FAPS ist prinzipiell anders aufgebaut. Er besteht aus einer Gitterstruktur aus metallischen Rückelektroden, über die senkrecht zu diesen die FET-Kanäle platziert sind [60, 61]. Diese FET-Kanäle bestehen aus einer GaAs/AlGaAs-Heterostruktur, die in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben wird. Die elektronischen Eigenschaften der FET-Kanäle sind so gewählt, daß diese bei einer Gatespannung $U_{\text{Gate}} = 0 \text{ V}$ leitend sind. Durch Anlegen einer negativen Spannung an die Gate-Elektrode, die sich unterhalb des FET-Kanals befindet, kann dieser lokal an Ladungsträgern verarmt werden und der lokale Widerstand $\rho(x)$ steigt an (Abb. 3.1-2).

¹ Die Idee zu diesem Projekt stammt von Dr. A. Lorke, es wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. Lorke, M. George, W. Parak und S. Böhm bearbeitet.

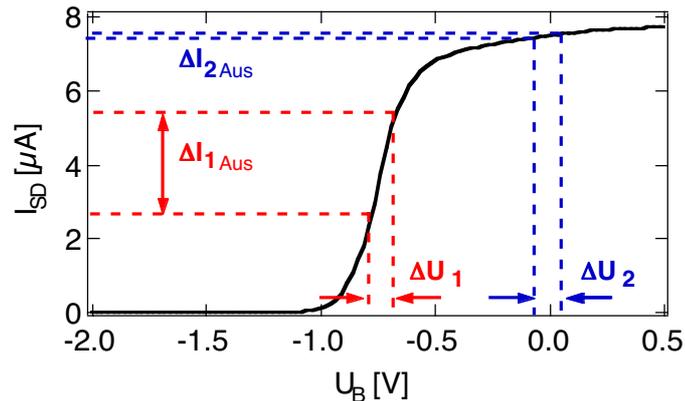


Abb. 3.1-2 Darstellung einer charakteristischen Kennlinie eines FET-Kanals. Aufgetragen ist die Strom I_{SD} , der durch den Kanal fließt über die angelegte Gatespannung U_{Gate} , wenn eine konstante Spannung U_{SD} über dem Kanal abfällt. Damit ist I_{SD} indirekt proportional zum Kanalwiderstand. Prägt man auf den Rückkontakt eine Spannung U_B auf, die an der maximalen Steigung der Kennlinie liegt, so führt eine kleine zusätzliche Spannungsänderung am Rückkontakt ΔU zu einer großen Stromänderung ΔI_{SD} im Meßsignal.

Entscheidend für die Sensitivität des Bauteils ist, wie stark der Widerstand des Kanals von der angelegten Gatespannung abhängt. Alle anderen Rückkontakte werden auf eine Spannung um 0 V gelegt. Daher reagieren alle nicht adressierten Kreuzungspunkte des betrachteten Kanals nur vernachlässigbar auf Spannungsänderungen, da wie in Abb. 3.1-2 zu sehen ist, dort die Kennlinie nahezu flach verläuft. Somit können nach diesem Prinzip orts aufgelöste Potentialmessungen mit dem FAPS durchgeführt werden. Dabei liegt die Ortsauflösung im Bereich der Größe der Kreuzungspunkte.

Prinzipiell kann die Strommessung auch durch eine Widerstandsmessung ersetzt werden. Dann wird in Abb. 3.1-1 b) die Spannungsquelle durch eine Konstantstromquelle ersetzt und in Abb. 3.1-1 a) wird nicht der Strom gemessen, der durch einen der Kanäle fließt, sondern die Spannung, die über diesen abfällt. Allerdings hat die Strommessung entscheidende Vorteile gegenüber der Spannungsmessung, die in Kapitel 3.3 genauer erläutert werden.

Für die Verknüpfung von Nervenzellen (Neuronalen Netzwerken) mit Halbleiterstrukturen ist es zusätzlich von Bedeutung, nicht nur Aktionspotentiale der Zellen messen zu können, sondern solche auch gezielt stimulieren zu können. Dies ist mit dem FAPS theoretisch ebenfalls möglich. Durch die Adressierung eines Punktes auf einem FET-Kanal fällt nahezu die gesamte am Kanal anliegende Spannung an diesem Punkt ab. Dadurch entsteht hier ein starkes elektrisches Feld, welches dazu genutzt werden könnte, biologische Systeme zu stimulieren [60].

3.2 Aufbau der Proben

Für den Aufbau von derartigen Strukturen, wie in Kap. 3.1 beschrieben, wird der sogenannte Epitaktische Lift-Off (ELO) verwendet. Dieses Verfahren wird angewendet, um eine Halbleiter-Heterostruktur von ihrem Basissubstrat zu trennen. Der ELO wurde hier bisher ausschließlich auf III-V Halbleitern angewendet. Dabei können die Schichtdicken der Halbleiterstruktur problemlos zwischen 200 nm und 1 µm eingestellt werden [62]. Die prinzipielle Schichtfolge ist in Abb. 3.2-1 a) dargestellt. Das untere (grau gezeichnete) GaAs-Substrat wird durch eine ca. 100 nm dicke AlAs-Opferschicht (hier gelb) von der Heterostruktur getrennt. Diese ist aus einer Schichtfolge (z.B. GaAs, AlGaAs, InGaAs,...) aufgebaut. Durch den extrem selektiven Ätzprozess mit 10%-iger Flußsäure wird die AlAs-Opferschicht selektiv geätzt und die Heterostruktur kann vom GaAs-Substrat getrennt werden. Die Selektivität beträgt ca. $10^7:1$ [63]. Der genaue Aufbau der Proben ist im Anhang angegeben.

3.2.1 Prozessierung der Proben

Die Herstellung von FAPS-Strukturen ist sehr aufwändig. Die spätere Funktionsfähigkeit der Proben hängt stark vom Geschick des Präparators ab. Insbesondere der epitaktische Lift-Off ist ein kritischer Schritt im Herstellungsprozeß der Proben. Daher wurde in dieser Arbeit auf diesen Schritt verzichtet, da sämtliche relevante Fragestellungen an Proben zu beantworten waren, bei deren Herstellung auf diesen Prozeßschritt verzichtet wurde. Dennoch soll aus Gründen der Vollständigkeit kurz die Präparation der FAPS-Strukturen dargestellt werden. Für genauere Beschreibungen sei auf [64-67] und [62] verwiesen.

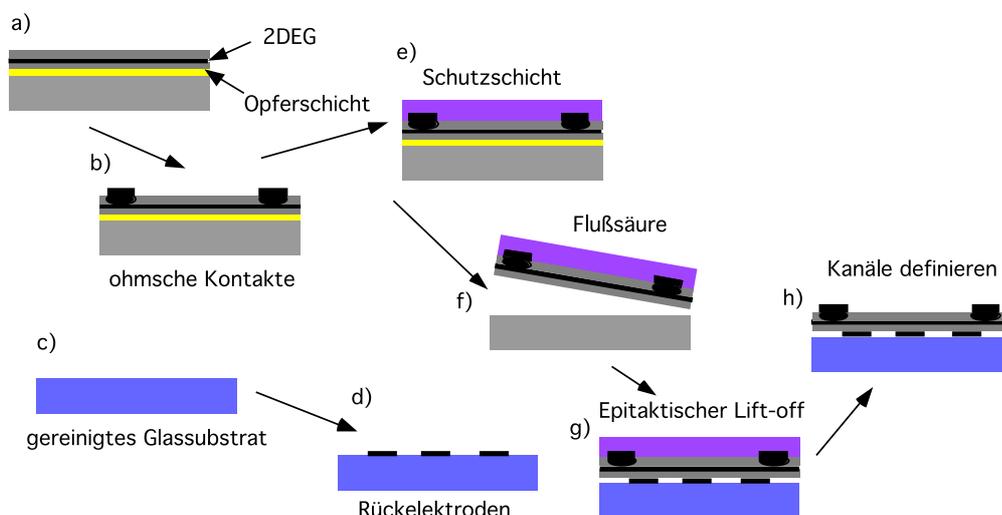


Abb. 3.2-1 Übersicht über die Herstellung einer FAPS Struktur.

Als Trägermaterial für die Halbleiterstruktur dient ein GaAs Wafer. Mittels Molecular-Beam-Epitaxi (MBE) wird auf dieses Substrat eine AlAs Opferschicht abgeschieden (Abb. 3.2-1 a)). Darauf wird ebenfalls mittels MBE die eigentlich elektrisch aktive Quantentopfstruktur aufgewachsen (a). Die elektrisch leitfähige Quantentopfstruktur wird durch thermisches Einlegieren von Ohmschen Kontakten elektrisch kontaktiert (b). Zur Vorbereitung des Epitaktischen Lift-Offs wird eine Schutzschicht aus Apiezon auf die Heterostruktur aufgebracht. Diese hat den Sinn, die Halbleiterstruktur während des Ätzvorgangs zu schützen und diese nach dem Ätzvorgang mechanisch zu stabilisieren (e). Darauf folgt der Epitaktische Lift-Off, bei dem durch selektives Ätzen die AlAs Opferschicht mit Flußsäure (HF) entfernt wird und die Quantentopfstruktur sich vom Halbleitersubstrat ablöst. Auf ein zuvor gereinigtes Glassubstrat (c) werden die Rückkontakte definiert (d). Auf diese Trägerstruktur wird der ELO-Film platziert und die Schutzschicht entfernt (g). Anschließend werden die FET-Kanäle geätzt und die gesamte Kontaktierung der Kanäle und Elektroden vorgenommen (h). Als letztes muß die Struktur noch für den Einsatz in biologischer Umgebung vorbereitet werden. Das bedeutet, daß noch eine Zellkulturkammer aufgebracht werden muß, in der dann die zu untersuchenden Zellen auf dem Halbleitersubstrat wachsen können.

Da die einzelnen Hauptschritte dieser Prozeßierung aus vielen, oft nahezu identischen Unterschritten bestehen, sollen diese anhand der Definition der Rückelektroden (Schritt(c) nach (d) in Abb. 3.2-1) erläutert werden.

Zunächst wird das Trägersubstrat, in diesem Fall ein Glassubstrat, gründlich gereinigt und anschließend Photolack mit einer Lackschleuder aufgebracht (siehe Kapitel 7) und ausgehärtet (5 min 90°C auf Heizplatte, oder 60 min 90°C Ofen). Mittels der optischen Lithografie werden die Rückelektroden im Lack mit Hilfe eines Mask-Aligners (Karl Suss MJB3, Suss Micro Tec, Garching Germany) belichtet und anschließend der Lack entwickelt. Verwendet werden ausschließlich Positiv-Lacke, was bedeutet, daß belichtete Bereiche nach der Entwicklung frei von Photolack sind (Abb. 3.2-2). Die Belichtungszeiten richten sich hauptsächlich nach der Lackdicke und der Strukturgröße und liegen im Bereich zwischen 4 sec – 60 sec. Die Zeit für die Entwicklung richtet sich ebenfalls nach Lackdicke und der Belichtungszeit (20 sec – 3 min).

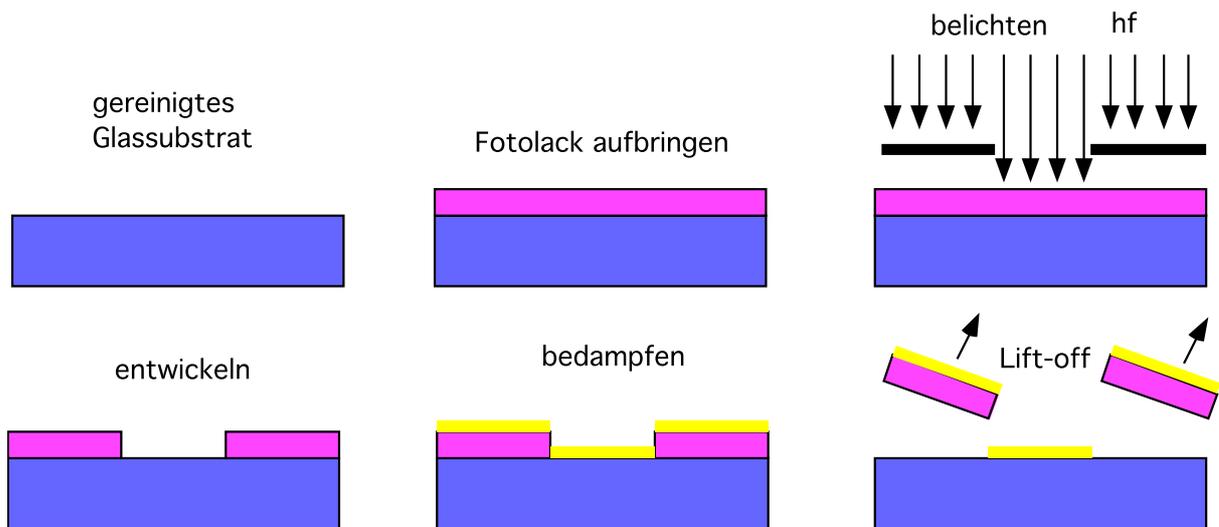


Abb. 3.2-2 Einzelnen Prozessschritte bei der Herstellung der Rückkontakte auf einem Glassubstrat.

Anschließend wird die Probe in die Aufdampfanlage eingebaut und die Rückelektroden werden aus NiCr (oder NiCr und Au) aufgedampft. Die Schichtdicke der Rückelektroden sollte 100 nm nicht überschreiten, sonst könnte es beim naßchemischen Ätzschritt bei der Definition der Feldeffekt-Kanäle (Schritt (h) in Abb. 3.2-1) dazu führen, daß Ätzlösung unter den Epi-Lift-Off-Film eindringt und diesen von unten zerstört. Nach dem Aufdampfen erfolgt der Lift-Off. Das bedeutet, daß die unerwünscht mit Metall beschichteten Flächen von diesem befreit werden. Dazu wird die Probe in Aceton gelegt, welches den Photolack auflöst und damit auch die darauf befindliche Metallschicht entfernt.

3.2.2 Maskenherstellung für die optische Lithografie

Die hergestellten FAPS-Strukturen, sowie die gefertigten FET-Strukturen, müssen zwei grundlegende Eigenschaften aufweisen. Zum einen sollen die für die Potentialmessung relevanten Strukturen die Größe von einzelnen Zellen haben (ca. 5-20 μm), und zum anderen müssen die Kontaktstrukturen weit von den potentialsensitiven Bereichen entfernt sein, um eine ausreichende Fläche für die Aussiedelung von Zellen bereitzustellen. Weiterhin sind große Kontaktstrukturen erwünscht, um eine möglichst einfache Handhabung zu gewährleisten. Dies stellt an die Maskenherstellung große Anforderungen.

Normalerweise werden Masken für die optische Lithografie mit einem Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) hergestellt. Mit diesem Verfahren können sehr feine Strukturen erzeugt werden. Der Nachteil besteht jedoch darin, daß Strukturen mit ei-

ner Ausdehnung von mehr als ein paar Millimetern nur sehr schwer hergestellt werden können. Weiterhin werden die Schreibzeiten für großflächige Strukturen wie die Anschlußkontakte extrem lang. Aus diesen Gründen wurde für die Herstellung der optischen Masken ein anderes Verfahren eingesetzt.

Für die Herstellung der Masken wird ein mit Chrom beschichtetes Glassubstrat (Chrom Blanks) in der Größe von 24 mm x 36 mm anstelle eines normalen Negativfilms in eine Spiegelreflexkamera eingebaut, das zuvor mit einer Photolackschicht versehen wurde (siehe Anhang). Die zu belichtende Struktur wird auf eine transparente Folie ausgedruckt und von hinten mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe durchleuchtet. Diese durchleuchtete Vorlage wird dann abphotografiert (siehe Abb. 3.2-3). Der belichtete Chrom Blank wird dann entwickelt und die abgelichtete Struktur durch einen Ätzprozeß in die Chromschicht übertragen.

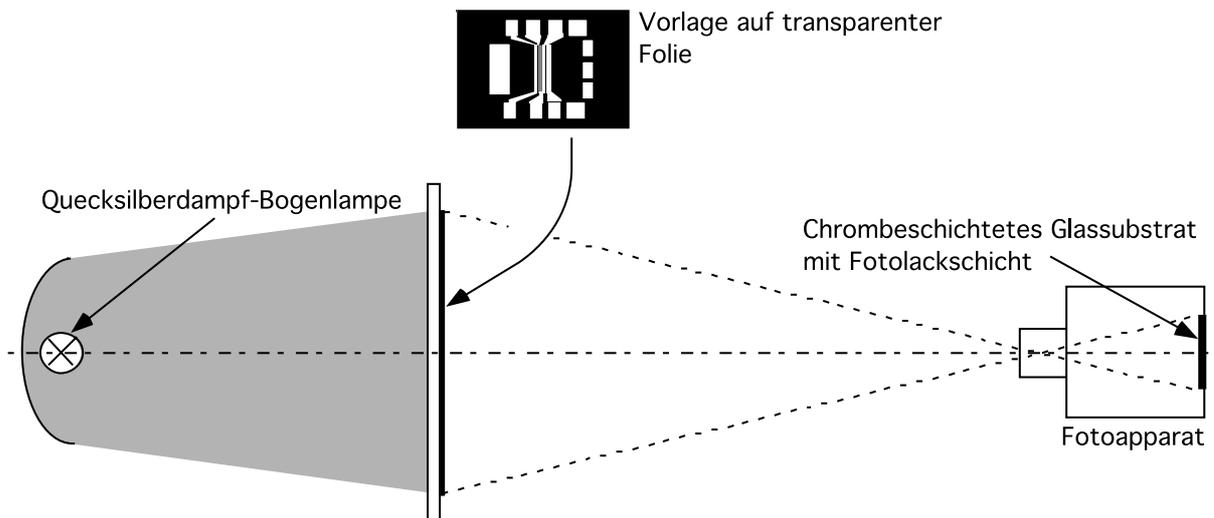


Abb. 3.2-3 Maskenherstellung für Strukturgrößen von 10 μm bis mehrere Millimeter. Da der verwendete Photolack hauptsächlich für Licht im UV Bereich empfindlich ist, wurde hier eine Quecksilberdampf-Bogenlampe verwendet, die eine ausreichende Leistung in diesem Frequenzbereich hat.

Die Vorlagen wurden typischerweise in einem Verhältnis 50:1 mittels eines Laserdruckers auf transparente Folien ausgedruckt. Bei diesem Abbildungsverhältnis ergaben sich je nach Strukturgrößen Belichtungszeiten zwischen 30 min – 45 min. Die genaue Beschreibung des gesamten Prozesses ist im Anhang oder unter [62, 67] zu finden. Mit dieser Methode lassen sich Strukturbreiten bis 10 μm realisieren. Somit erfüllt diese Methode der Maskenstrukturierung alle wichtigen Kriterien. Zum einen stellt diese eine relativ schnelle und somit auch kostengünstige Methode dar, zum anderen können mit ihr mit einem einzigen Schritt Strukturen von 10 μm bis in den Millimeterbereich belichtet werden.

3.3 Messungen an FAPS-Strukturen ohne ELO-Schritt.

Wie bereits erwähnt, besteht der Prozeß zur Herstellung einer FAPS-Struktur aus vielen Unterschritten, wobei der Epitaktische Lift-Off sehr kritisch ist, da die abgehobene Struktur sehr empfindlich auf mechanische Belastung reagiert. Das bedeutet, daß der ELO selbst und alle weiteren Prozeßschritte die Struktur sehr leicht zerstören können. Es hat sich daher als günstig erwiesen, möglichst viele Prozeßschritte, die eigentlich nach dem ELO stattfinden würden, vorzuziehen, oder wenigsten diese an der noch nicht abgehobenen Struktur vorzubereiten. Dieses Vorgehen wird „pre-processing“ genannt, da es vor dem Epitaktischen Lift-Off stattfindet [62].

Trotz dieser Vorgehensweise gibt es viele Prozeßschritte, bei denen eine Beschädigung der FAPS - Struktur auftreten kann. Defekte in der Struktur sind meist erst nach der endgültigen Fertigstellung der FAPS – Proben festzustellen. Daher wurde in dieser Arbeit auf den ELO gänzlich verzichtet, da es sich gezeigt hat, daß er für die betrachteten Fragestellungen nicht benötigt wird.

Zellen, die frisch auf dem Sensor ausgesiedelt werden, wachsen gänzlich ungerichtet und an beliebigen Orten auf der Sensoroberfläche an. Bei der Ausbildung eines neuronalen Netzwerkes und dem Aufbau neuer neuronaler Verbindungen ändert sich zudem die Morphologie des Netzwerkes [34]. Um jede Zelle auf dem Sensor elektrisch kontaktieren zu können, müssen die sensitiven Punkte zum einen kleiner als eine Zelle sein, und zum anderen muß der Abstand zwischen Ihnen ebenfalls kleiner als eine Zelle (ca. 5 μm – 20 μm) sein.

Um nachzuweisen, daß der FAPS auf diese Dimensionen skaliert werden kann, wurden spezielle Proben hergestellt. Es soll zunächst ein kurzer Überblick über die Herstellung der Probe gegeben werden.

Zunächst werden die Ohmschen Kontakte auf der Probe (Probenmaterial **B**²) mittels optischer Lithografie definiert (siehe Abb. 3.3-1) (1a) und anschließend Au/Ge aufgedampft. Nach dem Lift-Off-Schritt bleibt nur an den definierten Stellen Au/Ge auf der Probe zurück, (1b) welches dann thermisch einlegiert wird. Die unterschiedlich breiten FET-Kanäle werden ebenfalls über optische Lithografie belichtet (2a) und durch naßchemisches Ätzen in die Halbleiterstruktur übertragen (2b).

² Eine genaue Beschreibung des verwendeten Probenmaterials ist im Anhang Kap. 7 zu finden. In diesem Fall wurde Probenmaterial b) benutzt.

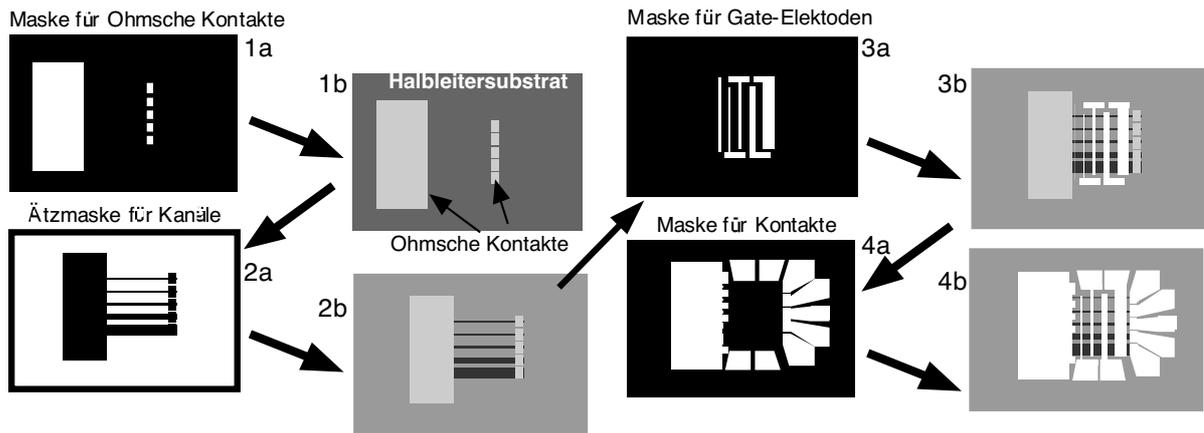


Abb. 3.3-1 Herstellung einer Probe zur Untersuchung der Auswirkung einer Skalierung der FAPS-Struktur. Dargestellt sind die einzelnen Prozessschritte mit den jeweiligen Masken (a) und der Probe (b).

Im dritten Schritt werden die Gate-Elektroden aus Au und eine Schicht Haftvermittler (NiCr) aufgebracht (3 a-b)³. Im letzten Schritt werden noch die Kontakte, ebenfalls aus Au und NiCr, aufgedampft. Auf diese Weise wurde eine Probe mit 200 μm , 100 μm , 50 μm , 25 μm und 12,5 μm breiten Kanälen und sich kreuzenden Gate-Elektroden hergestellt.

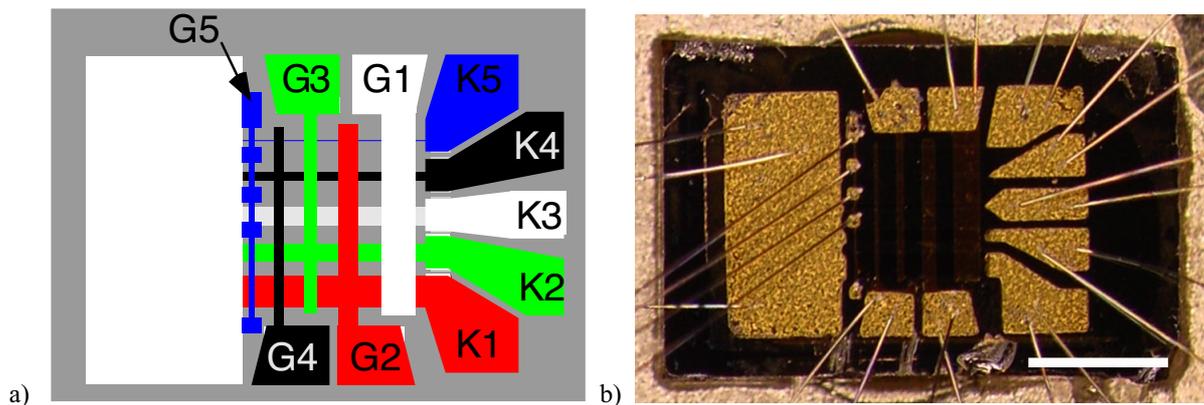


Abb. 3.3-2 a) Schematische Darstellung der Skalierungsprobe. b) Bild der Skalierungsprobe. Skalierungsbalken 1mm.

Zum Charakterisieren wird die Probe in einen Messaufbau, wie er in Abb. 3.3-3 dargestellt ist, eingebaut. Um Kennlinien aufzunehmen wie sie in Abb. 3.3-4 gezeigt sind, wird einem FET-Kanal eine feste Spannung U_{SD} angelegt. Einer Gate-Elektroden wird eine variable Spannung U_G aufgeprägt und an dem zu charakterisierendem FET-Kanal der Stromfluß I_{SD} durch diesen gemessen. Dies wird an allen Variationen der unterschiedlich breiten Kanäle und Gate-Elektroden durchgeführt.

³ Dieser Schritt ist in Kap. 3.2.1 ausführlich beschrieben.

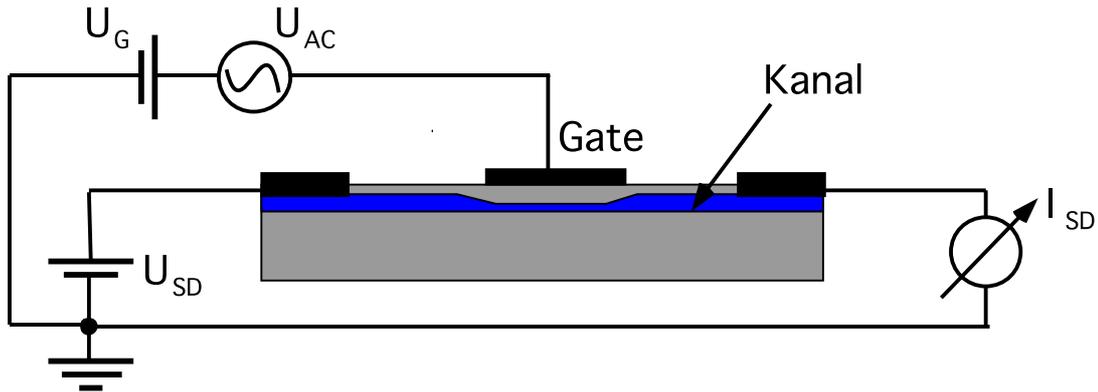


Abb. 3.3-3 Schematische Darstellung des Messaufbaus. Dem FET-Kanal wird eine konstante Spannung U_{SD} aufgeprägt und der Stromfluß I_{SD} durch den Kanal gemessen. Dem Gate wird eine Vorspannung U_G aufgeprägt, auf die zusätzlich eine Wechsellspannung U_{AC} addiert werden kann.

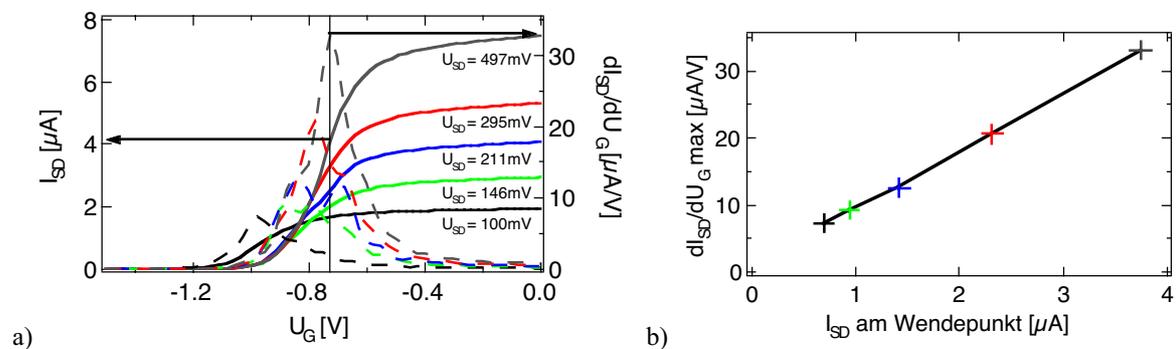


Abb. 3.3-4 a) Gemessene Kennlinien und die daraus berechneten Steigungen an Kanal 5 und Gate 5 mit jeweils $12,5 \mu\text{m}$ Breite bei unterschiedlichen U_{SD} Spannungen. b) Maximale Steigung gegen den Stromfluß am Wendepunkt für $U_{SD} = 100 \text{ mV}$, 146 mV , 211 mV , 295 mV und 497 mV .

Der Strom durch den Kanal eines MOSFET kann für kleine U_{SD} -Spannungen, also im linearen Bereich, durch folgende Formel genähert werden [68]:

$$\text{Gl. : 6} \quad I_{SD} = \frac{Z}{L} \cdot \mu_n \cdot c_0 \cdot (U_G - U_T) \cdot U_{SD}$$

Zunächst wurde untersucht, wie sich eine erhöhte U_{SD} -Spannung auf die Kennlinien auswirkt. Dabei konnte, wie nach Gl. : 6⁴ zu erwarten, festgestellt werden, daß die maximale Steigung $(dl/dU)_{\text{max}}$ der Kennlinie proportional zur angelegten U_{SD} -Spannung bzw. zum Stromfluß am Wendepunkt (Abb. 3.3-4) ist. Weiterhin kann $U_T \approx -1\text{V}$ aus Abb. 3.3-4 a) bestimmt werden.

⁴ C_0 ist die Gate-Kapazität und μ_n die Ladungsträgermobilität

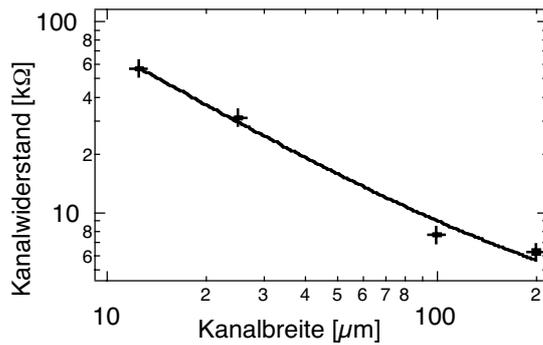


Abb. 3.3-5 Kanalwiderstand für unterschiedlich breite Kanäle bei $U_{SD} = 140 \text{ mV}$ und $U_G = 0 \text{ V}$.

Ebenso ist nach Gl. : 6 zu erwarten, daß der Kanalwiderstand sich verhält wie $R_K \sim 1/Z$, wobei Z die Kanalbreite ist. Dies ist in Abb. 3.3-5 zu sehen. Im doppelt-logarithmischen Diagramm erhält man eine Gerade. Diese wurde mit Gl. : 7 genähert. Wobei a ein konstanter Widerstand ist, der hauptsächlich von den Ohmschen Kontakten herrührt. Dieser konnte zu $a = 2200 \Omega$ ermittelt werden, was in guter Übereinstimmung mit direkten Messungen steht. Die Kanallängen betragen ca. $L \approx 1,1 \text{ mm}$. Die Gatekapazität berechnet sich mit der dielektrischen Konstante von GaAs $\epsilon_s = 13,1$ und dem Abstand zwischen Gate und FET-Kanal $d = 35 \text{ nm}$ zu $C_0 = 3,3 \text{ mF/m}^2$. Mit dem angenäherten Parameter $b = (0,684 \pm 0,028) \Omega\text{m}$ kann dann die Leitfähigkeit zu $\mu_n = (4870 \pm 200) \text{ cm}^2/\text{Vs}$ berechnet werden⁵.

$$\text{Gl. : 7} \quad f(Z) = a + \frac{b}{Z} \quad \text{wobei} \quad b = \frac{L}{\mu_n \cdot c_0 \cdot (U_G - U_T)}$$

Des weiteren wurde untersucht, wie sich die Charakteristik der Kennlinie verändert, wenn zum einen die Kanäle und zum anderen die Gate - Elektroden verkleinert werden. Dazu wurden an der in Abb. 3.3-1 beschriebenen Probe Kennlinien an sämtlichen Kreuzungspunkten aufgenommen. Wird U_{SD} für alle Kanäle gleich eingestellt, so weist - wie zu erwarten - der breiteste Kanal die größte Steigung in der Kennlinie auf. Für alle Kanäle gilt aber, daß die Steigung für schmalere Gate – Elektroden größer wird (siehe Abb. 3.3-6 a). Somit gilt für eine konstante U_{SD} -Spannung: je schmaler die Kanäle, desto kleiner die Steigung und je schmaler die Gate – Elektrode, desto größer die Steigung. Dies gilt jedoch nur für $U_{SD} = \text{konst.}$

⁵ Nach den Angaben des Centre National de la Recherche Scientifique, an dem diese Probe gewachsen wurde, beträgt die Leitfähigkeit $\mu_n = 5800 \text{ cm}^2/\text{Vs}$.

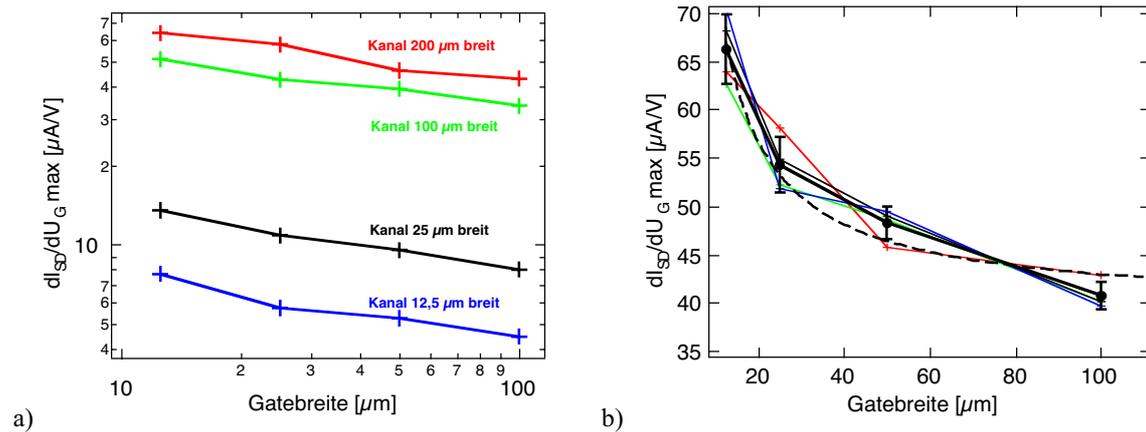


Abb. 3.3-6 a) $dI_{SD}/dU_{G(max)}$ für unterschiedliche Kanalbreiten und unterschiedliche Gatebreiten. Dabei war an allen Kanälen $U_{SD} = 140 \text{ mV}$. b) U_{SD} wurde an jedem Kanal bei $U_G = 0 \text{ V}$ so eingestellt, daß $I_{SD} \approx 23 \text{ }\mu\text{A}$ war.

Wird im Gegensatz dazu U_{SD} so eingestellt, daß an allen Kanälen I_{SD} bei $U_G = 0 \text{ V}$ gleich groß ist, so zeigen alle Kanäle nahezu die gleiche Steigungen (siehe Abb. 3.3-6 b). Die gemittelten Steigungen für die vier gemessenen Kanäle sind hyperbolisch angenähert worden. Im Rahmen des Meßfehlers stimmt die Annäherung gut mit der Messung überein. Dem Erhöhen der U_{SD} -Spannung, um eine möglichst große Steigung der Kennlinie (dI_{SD}/dU_G) zu erhalten, sind Grenzen gesetzt. Da bei großen U_{SD} -Spannungen die Schutzschicht stark beansprucht wird, die zum einen den Halbleiter vor der wäßrigen Umgebung isoliert und zum anderen die Zellen vor den toxischen Arsenionen schützt (siehe Kapitel 3.5).

Es muß daher für den idealen FAPS gelten, daß die Kanäle so breit als möglich und die Gate – Elektroden so schmal wie möglich aufgebaut werden müssen, damit bei kleinstmöglicher U_{SD} -Spannung eine größtmögliche Empfindlichkeit erreicht wird. Breite, kurze Gate-Elektroden werden auch bei FET-Arrays eingesetzt [24, 38, 69, 70], um möglichst hohe Signale zu erhalten.

Ein weiteres wesentliches Merkmal neben der Steigung der Kennlinie für die Potentialempfindlichkeit ist die Übertragungscharakteristik in Abhängigkeit der Frequenz, mit der sich das zu messende Signal verändert. Um festzustellen, in wie weit die Steigungen der Kennlinien frequenzabhängig sind, wurde zusätzlich zur Gleichspannung U_G noch eine sinusförmige Wechselspannung mit einer Amplitude von $U_{AC} = 5 \text{ mV}$ addiert und das daraus resultierende Signal mit einem Lock-In-Verstärker gemessen (siehe Abb. 3.3-7 a). Diese Messung wurde für Frequenzen von $f_0 = 100 \text{ Hz}$ bis $f_0 = 100 \text{ kHz}$ durchgeführt. Aus diesen Messungen wurde jeweils das Maximum der Stei-

gung dl_{SD}/dU_G entnommen und über die Frequenz f_0 aufgetragen und die Werte für $f_0 = 100$ Hz auf eins normiert (siehe Abb. 3.3-7 b).

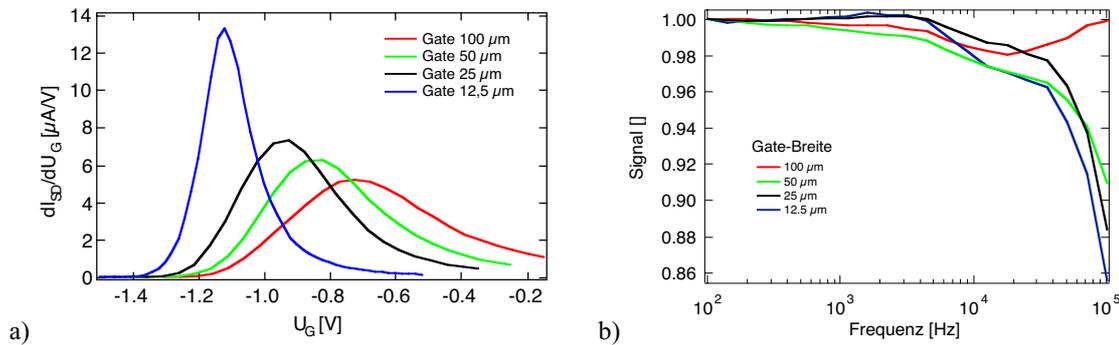


Abb. 3.3-7 a) Gemessene Steigungen an Kanal 5 (12,5 μm breit) und unterschiedlich breiten Gate-Elektroden aufgetragen über die Gatespannung U_G . Die addierte Wechselspannung betrug $U_{AC} = 5$ mV bei einer konstanten Frequenz von $f_0 = 100$ Hz. Diese Messung wurde für Frequenzen zwischen 100 Hz bis 100 kHz durchgeführt b) Aus a) entnommene maximale Steigung, die für $f_0 = 100$ Hz jeweils auf 1 normiert wurden.

Bei dieser Messung muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei dem verwendeten Vorverstärker (DLPC 200, FEMTO, Germany) für Frequenzen größer als 10 kHz die Verstärkung abnimmt. Das bedeutet, daß das Frequenzverhalten des Verstärkers bekannt sein muß, um genaue Aussagen treffen zu können.

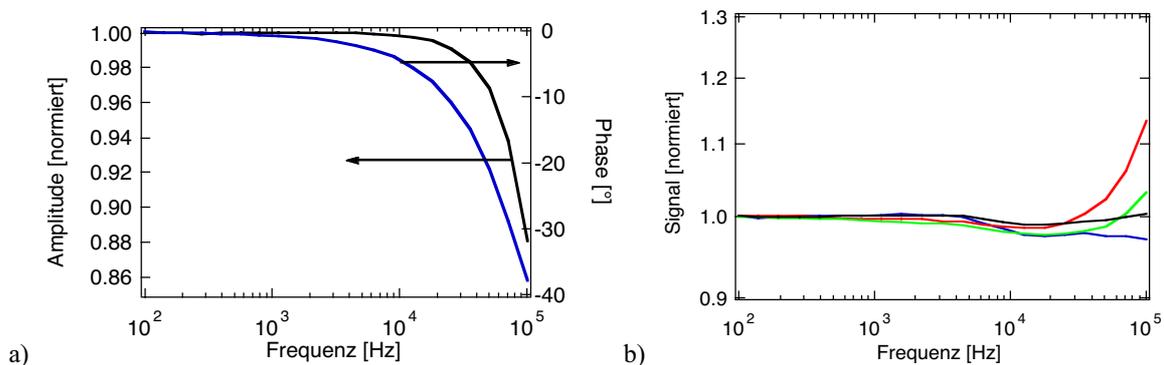


Abb. 3.3-8 Frequenzverhalten des verwendeten Vorverstärkers DLPC 200 bei einer Verstärkung von $V = 1e^6$. b) Normierter Frequenzgang der Teststruktur unter Berücksichtigung des Frequenzverhaltens des Vorverstärkers.

Daher wurde dieses Verhalten für die Verstärkung von $V = 1e^6$ nachgemessen. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3.3-8 zu sehen. Deutlich zu sehen ist das Absinken der Verstärkung für Frequenzen über 10 kHz und die einsetzende Phasendrehung, die bei 100 kHz bereits nahezu 40° erreicht hat. Dieses Verhalten ist allgemein bekannt [71]. Berücksichtigt man dieses Verhalten, so steigen die resultierenden Charakteristiken der Teststruktur (siehe Abb. 3.3-8 b) für hohe Frequenzen und große Gate-Flächen an. Dieses Verhalten kann mit einem Ersatzschaltbild qualitativ erklärt werden.

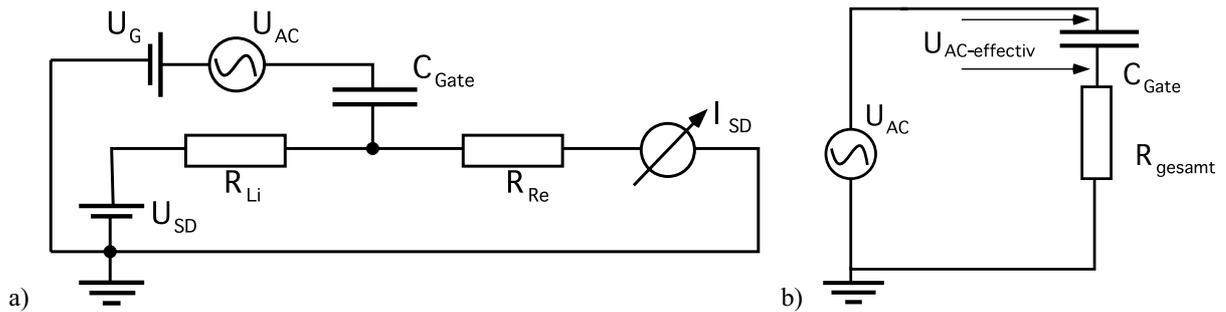


Abb. 3.3-9 a) Kleinsignal-Ersatzschaltbild der FAPS-Struktur. Der FET-Kanal ist durch eine Serienschaltung von Widerständen aufgeteilt, die Gate-Elektrode durch eine Kapazität. b) Vereinfachtes Ersatzschaltbild bei dem sämtliche Konstantspannungsquellen weggelassen wurden wie von [62] vorgeschlagen.

Das Ersatzschaltbild in Abb. 3.3-9 a) repräsentiert eine Messung an einer FAPS-Struktur. Dabei wird die Gate-Elektrode durch eine Kapazität C_{Gate} und der FET-Kanal durch eine Serienschaltung aus Widerständen R_{Li} und R_{Re} ersetzt. Im Ersatzschaltbild Abb. 3.3-9 b) sind die beiden Widerstände R_{Li} und R_{Re} zu einem zusammengefaßt worden. Dabei gilt, daß $R_{\text{gesamt}} = R_{\text{Li}}/2 = R_{\text{Re}}/2$ unter der Annahme, daß $R_{\text{Li}} = R_{\text{Re}}$ ist. Für die angelegte Modulation U_{AC} wirkt die Serienschaltung aus C_{Gate} und R_{gesamt} als frequenzabhängiger Spannungsteiler. Diese Schaltung hat nach Gl. : 8 zwei Grenzwerte. Für $\omega \rightarrow 0$ folgt $U_{\text{AC-effektiv}} \rightarrow U_{\text{AC}}$, und für $\omega \rightarrow \infty$ folgt $U_{\text{AC-effektiv}} \rightarrow 0$, wobei $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f_0$ ist.

$$\text{Gl. : 8} \quad U_{\text{AC-effektiv}} = U_{\text{AC}} \cdot \frac{R_C}{R_C + R_{\text{gesamt}}} \quad \text{wobei} \quad R_C = \frac{1}{\omega \cdot C_{\text{Gate}}} \quad \text{und} \quad C_{\text{Gate}} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_s \cdot A}{d}$$

Das bedeutet, daß bei zunehmender Modulationsfrequenz f_0 die am Gate abfallende Modulationsspannung $U_{\text{AC-effektiv}}$ kleiner wird und somit eine kleinere Modulation der Kennlinie zur Folge hat. Die aus Gl. : 8 berechneten Werte wurden für die unterschiedlich großen Gate-Elektroden in Abb. 3.3-10a) dargestellt. Dabei wurden für die Fläche A die Werte $1250 \mu\text{m}^2$, $625 \mu\text{m}^2$, $312,5 \mu\text{m}^2$ und $156 \mu\text{m}^2$ eingesetzt. Der Abstand zwischen den Gate-Elektroden und dem FET-Kanal beträgt $d = 35 \text{ nm}$ und für die dielektrische Konstante wird der Wert von GaAs eingesetzt $\epsilon_s = 13,1$. Die Werte von R_{gesamt} wurden aus der jeweiligen Kennlinie am Punkt der maximalen Steigung ($dI_{\text{SD}}/dU_{\text{G}}|_{\text{max}}$) entnommen ($149 \text{ k}\Omega$, $146 \text{ k}\Omega$, $139 \text{ k}\Omega$, $152 \text{ k}\Omega$ für Gate2,..., Gate5).

$$\text{Gl. : 9} \quad I_{\text{SD-pass}} = U_{\text{AC}} \cdot \frac{1}{R_C + \frac{R_{\text{gesamt}}}{2}}$$

Zusätzlich zu dem eben beschriebenen Effekt tritt noch ein anderer auf. Selbst ohne Anlegen einer Source-Drain-Spannung U_{SD} am FET-Kanal, wird durch das Anlegen der modulierten Gate-Spannung U_{AC} ein Ladestrom hervorgerufen, der den Kondensator - bestehend aus Gate-Elektrode, Isolator und FET-Kanal - auflädt. Der Ladestrom hat nichts mit der Kennlinie des FET-Kanals zu tun und nimmt mit steigender Modulationsfrequenz f_0 zu. Dieser Effekt ist in Abb. 3.3-10 c) dargestellt und kann mit Gl. : 9 beschrieben werden. Durch Addition der beiden Effekte lässt sich der wahre Frequenzverlauf berechnen.

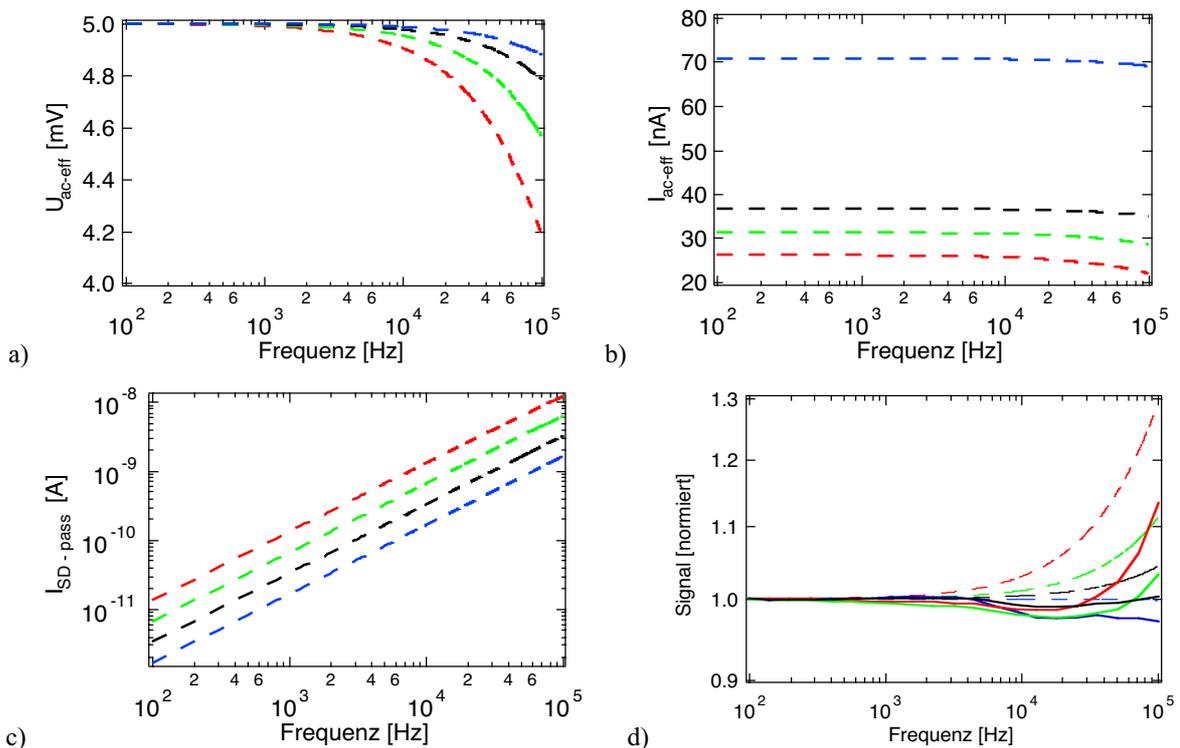


Abb. 3.3-10 a) Berechneter Spannungsabfall $U_{AC-effective}$ an den Gate-Elektroden an Kanal 5 ($12,5 \mu\text{m}$) nach Gl. : 8 (Modulationsspannung $U_{ac} = 5 \text{ mV}$). b) Mittels der Steigung (siehe Abb. 3.3-6 a) berechnete Ströme. c) Nach Gl. : 9 berechnete passive Ladeströme für eine Modulationsspannung von $U_{ac} = 5 \text{ mV}$. d) Addition von passiven und aktiven Signalsrömen die für $f = 100 \text{ Hz}$ auf eins normiert wurden (Durchgezogen = Experiment; gestrichelt = Berechnung).

Rein qualitativ stimmen die so getroffenen Vorhersagen mit den Messungen überein. Je größer die Gate-Fläche, desto eher beginnt $U_{ac-effektiv}$ abzusinken. Im Gegensatz dazu nimmt der passive Ladestrom stärker zu, so daß dieser Effekt für hohe Frequenzen überwiegt. Für die kleinste vermessene Gate-Flächen von $A = 12,5 \mu\text{m} \times 12,5 \mu\text{m}$ gleichen sich beide Effekte bis zu einer Frequenz von 100 kHz gerade aus, so daß ein nahezu flacher Verlauf zu Stande kommt.

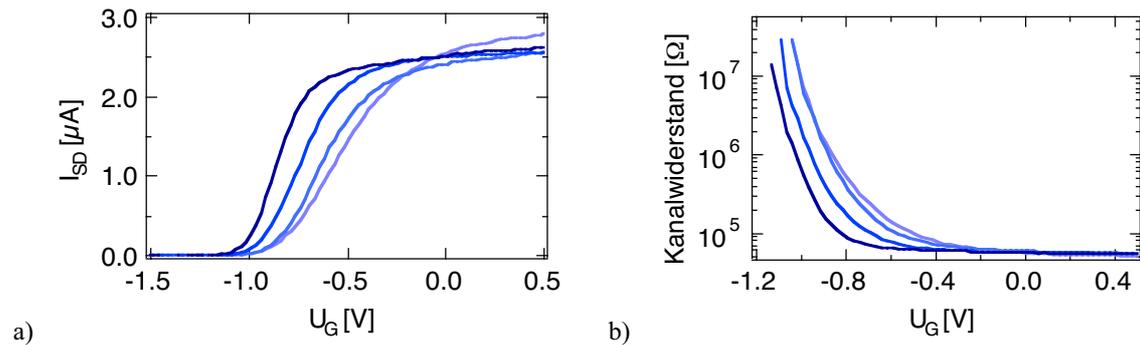


Abb. 3.3-11 a) Stromcharakteristika von Kanal 5 ($12,5 \mu\text{m}$ breit) für unterschiedlich breite Gate-Elektroden, $U_{SD} = 140 \text{ mV}$. b) Aus a) resultierende Kanalwiderstände.

Eine Strommessung ist einer Widerstandsmessung grundsätzlich vorzuziehen, da bei einer Strommessung die maximale Empfindlichkeit im Falle von Kanal 5 bei Kanalwiderständen im $\text{k}\Omega$ -Bereich erzielt wird. Im Gegensatz dazu wird in einer Widerstandsmessung die maximale Empfindlichkeit erst im $\text{M}\Omega$ -Bereich erzielt (siehe Abb. 3.3-11). Dies hat zur Folge, daß bei einer Widerstandsmessung die Kanalwiderstände in Gl. : 8 wesentlich größer sind, wodurch die Übertragungscharakteristik bereits bei wesentlich kleineren Frequenzen (im Bereich von 100 Hz) absinken würden [62].

Ein weiterer Vorteil der Strommessung besteht darin, daß die maximale Empfindlichkeit bei kleineren U_G -Spannungen erzielt wird als bei einer Widerstandsmessung. Dies hat zur Folge, daß die benötigten Schutzschichten nicht so stark beansprucht werden.

3.4 Potentialempfindlichkeit von FET Strukturen¹

Um die Potentialempfindlichkeit zu testen, wurden zunächst FET-Strukturen, wie in Abb. 3.4-1 dargestellt aufgebaut.

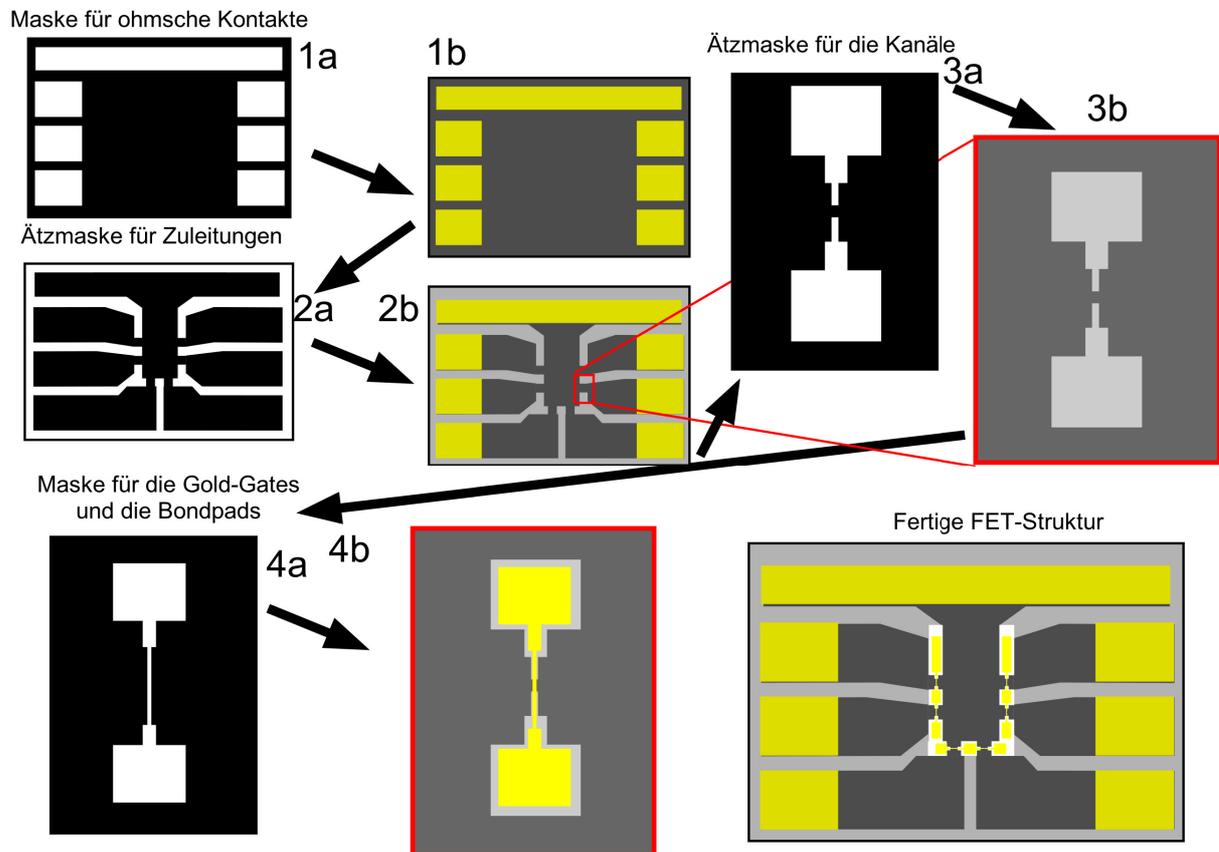


Abb. 3.4-1 Überblick über die Herstellung einer Probe mit sechs Feldeffekt-Transistoren. Die einzelnen Kanäle und die Gate-Elektroden haben jeweils eine Länge von $10\ \mu\text{m}$ und eine Breite von $25\ \mu\text{m}$. Mit (a) sind jeweils die verwendeten Masken bezeichnet. Mit (b) ist dann das Halbleitersubstrat mit der entstandenen Struktur bezeichnet..

Die aufgebauten FET-Strukturen besitzen Feldeffekt-Kanäle mit einer Länge von $10\ \mu\text{m}$ und eine Breite von ca. $24\ \mu\text{m}$. Einen Überblick über die einzelnen Prozessschritte gibt Abb. 3.4-1. Als erstes wurden die Ohmschen Kontakte auf dem Probenmaterial² definiert, aufgedampft und einlegiert (1). Anschließend wurden die Zuleitungen zu den einzelnen FETs in das Halbleitermaterial durch naßchemisches ätzen übertragen (2), worauf dann die Kanäle der einzelnen FETs ebenfalls durch naßchemisches ätzen definiert wurden (3). Im letzten Schritt wurden die Gate-Elektroden samt Zuleitungen und Bondpads belichtet und aus Gold mit NiCr als Haftvermittler aufgedampft

¹ Die in diesem Kapitel verwendeten Proben wurden von M. George hergestellt.

² Eine genaue Beschreibung des verwendeten Probenmaterials ist im Anhang Kap. 7 zu finden. In diesem Fall wurde Probenmaterial a) benutzt.

(4). In Abb. 3.4-3 a) ist ein solcher FET zu sehen. Nach der Fertigstellung wurden die Zuleitungen wie die Gate-Elektroden kontaktiert.

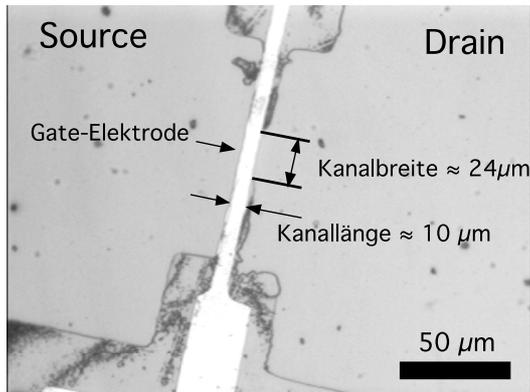


Abb. 3.4-2 FET-Struktur mit Gold-Gate. Abmessungen der Gate-Elektrode: Länge 10 μm, Breite 24 μm.

Diese Struktur wurde in einen Meßaufbau, wie in Abb. 3.3-3 dargestellt, eingebaut. Zunächst wurde eine Kennlinie der Probe aufgezeichnet (siehe Abb. 3.4-3 b). Um die Potentialempfindlichkeit bestimmen zu können, wurde die Gate-Spannung auf den Arbeitspunkt eingestellt und das Rauschen des Source-Drain-Stroms I_{SD} frequenz aufgelöst gemessen.

Mit Hilfe der zuvor gemessenen Kennlinie kann eine Umrechnung auf die Potentialauflösung am Gate vorgenommen werden. Durch Integration der Rauschamplitude über die Frequenz erhält man die absolute Rauschamplitude $\Delta U_G = 44.6 \mu\text{Vrms}$. Um diese Messung im Zeitfenster zu bestätigen, wurde eine zusätzliche Messung durchgeführt. Zunächst wurde die Gate-Spannung U_G wieder auf den Arbeitspunkt eingestellt. Zusätzlich wurden diesmal jedoch kleine Spannungspulse ($dU_G = 10, 20, 50, 80, 100 \mu\text{V}$) auf die Gate-Spannung addiert und der Source-Drain-Strom I_{SD} mit einer Einleserate von 100 kHz aufgezeichnet. Die Spannungspulse dauerten jeweils 0.3 ms und hatten eine Periode von 11 ms. Die applizierten Spannungspulse treten ab einer Höhe von $\Delta U_G = 50 \mu\text{V}$ deutlich aus dem Rauschhintergrund hervor (Abb. 3.4-3). Aus diesen Aufzeichnungen wurde zusätzlich der Rauschhintergrund über die Standardabweichung des aufgezeichneten Signals zu $\Delta U_G = (60.6 \pm 3.3) \mu\text{Vrms}$ bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit der frequenz aufgelösten Messung steht.

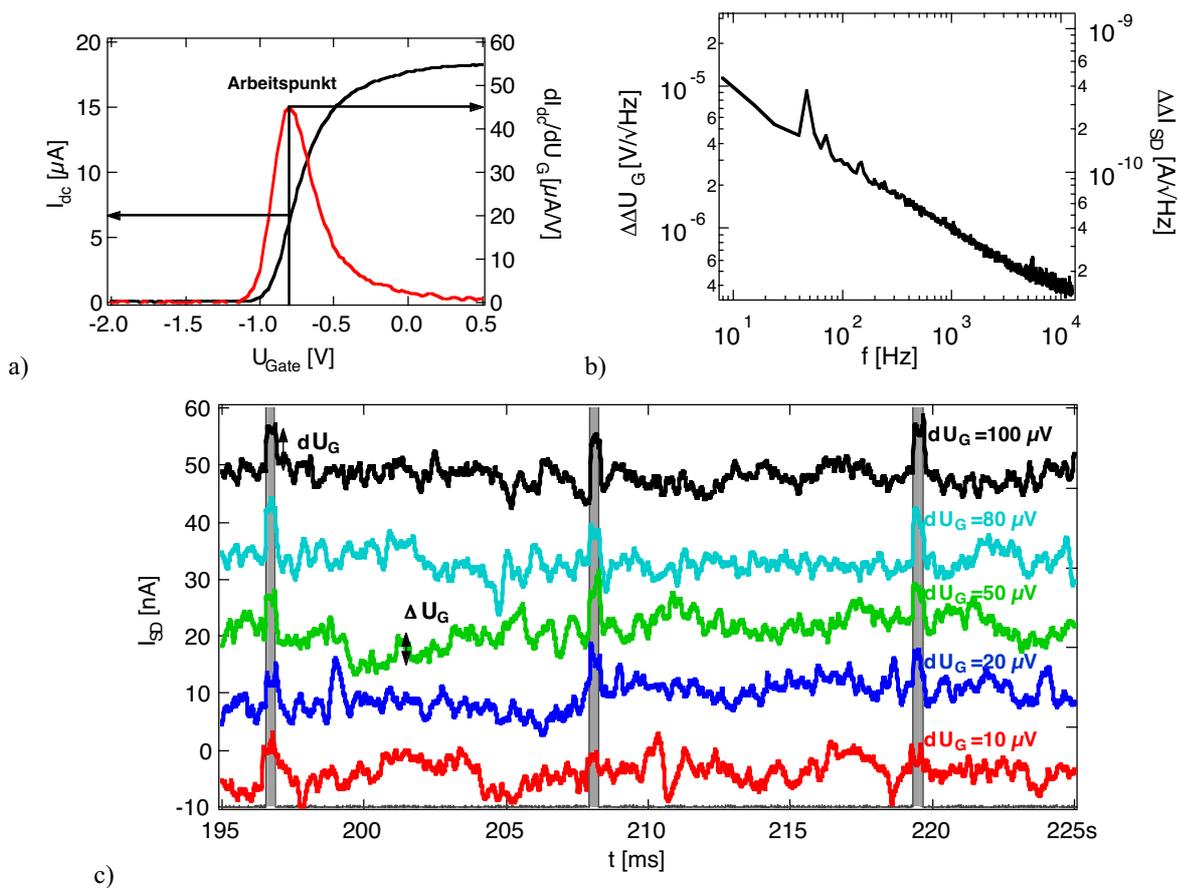


Abb. 3.4-3³ a) Kennlinie der FET-Struktur. b) Aufgezeichnetes Rauschspektrum am Wendepunkt. Dargestellt ist das Stromrauschen $\Delta\Delta I_{\text{SD}}$ und das daraus mit Hilfe der Kennlinie berechnete Potentialrauschen am Gate $\Delta\Delta U_G$. Die integrierte Rauschamplitude beträgt im Bereich von 0 kHz bis 12,8 kHz $\Delta U_G = 44.6 \mu\text{Vrms}$ c) Auf das Gold-Gate applizierte Potentialstufen von 0.3 ms Dauer und einer Periode von 11 ms. Aufgeprägt wurden Pulshöhen dU_G von 10 μV , 20 μV , 50 μV , 80 μV und 100 μV . Aus diesen Aufzeichnungen lässt sich die Standardabweichung des Oberflächenpotentials bestimmen, welches der integrierten Rauschamplitude ΔU_G entspricht. Diese beträgt ca. $\Delta U_G = 60 \mu\text{Vrms}$.

3.5 Verkapselung gegen Wasser⁴

Sollen die aufgebauten Halbleiterstrukturen als Sensor für neuronale Netzwerke eingesetzt werden, so müssen diese dauerhaft unter physiologischen Bedingungen funktionsfähig sein. Beim Einbringen von GaAs-Halbleiterstrukturen in wäßrige Umgebung wird die Oxidschicht an der Oberfläche aufgelöst, was einen kontinuierlichen atzvorgang entspricht [72, 75]. Dabei wird nicht nur das Halbleitersubstrat zerstört, sondern es reichern sich auch Arsenionen bzw. AsO_3^{3-} in der wäßrigen Umgebung an, welche bei der Hydrolyse von Oxidschichten entstehen. Diese Arsen(III)-

³ Die hier gezeigten Kurven wurden in Zusammenarbeit mit M. George an Substrat A gemessen.

⁴ Die Idee für die in diesem Kapitel beschriebenen organischen Beschichtungen stammen von Dr. M. Seitz und C. Kirchner. Die hier beschriebenen Messungen sind in [72-74] veröffentlicht. Alle Atom-Absorptions-Spektroskopie-Messungen wur-

Komponenten sind für Zellen giftig [76, 77] in dem sie beispielsweise die mitochondriale Glucoseaufnahme blockieren [78].

Dieses Abtragen der Oxidschicht und die Toxizität der dabei freigesetzten Arsen(III)-Komponenten wurden zunächst genauer untersucht. Dazu wurde ein frisch gereinigtes Gallium-Arsenid-Substrat mit einer Streifenmaske aus Photolack teilweise bedeckt. Die so präparierte Probe wurde in einer wässrigen Lösung (Millipore) für 24 h bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Nach dem Entfernen der Photolackmaske durch Reinigen der Probe mit Aceton wurden Profilmessungen mit dem (Atomic-Force-Microscop) AFM unternommen. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß ein Übertragen der Streifenmaske in das Substrat durch einen Ätzvorgang stattgefunden hat. Die mittlere Ätztiefe konnte zu 100 nm bestimmt werden, was einer Ätzrate von ca. 4 nm/h entspricht. Durch Zugabe von 140 mM NaCl in die wässrige Lösung verdoppelte sich die Ätzrate auf 8 nm/h [72].

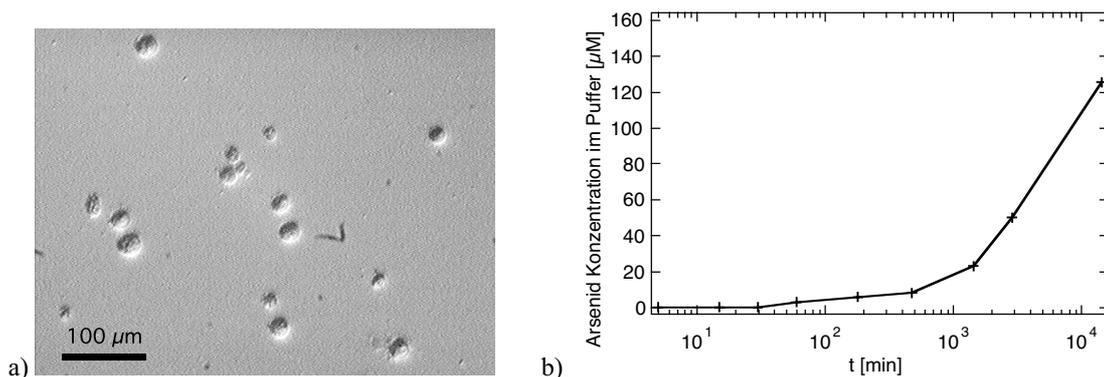


Abb. 3.5-1 a) Mikroskopische Aufnahme von NRK- Fibroblasten auf einem unbeschichteten GaAs- Substrat, aufgenommen 24 h nach dem Aussähen der Zellen. b) Eine Fläche von 80 mm² wurden mit 1 ml Wasser (Millipore) bedeckt und die Konzentration von Arsenid-Ionen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie gemessen.

Zusätzlich wurden Atom-Absorptions-Spektroskopie-Messungen (AAS) durchgeführt, bei denen die Konzentration von Arsenionen in der wässrigen Lösung bestimmt wurden. In Abb. 3.5-1 b) ist der zeitliche Verlauf einer solchen Messung zu sehen. Die Nachweisgrenze dieser Meßmethode für Arsenionen liegt bei 5 μg/l. In Experimenten mit Zellen hat sich gezeigt, daß eine Arsenit-Konzentration von mehr als ca. 10 μM das Anwachsen eines Zellrasens von NRK- (Normal Rat Kidney) Fibroblasten [32, 79] verhindert. Bei einem zuvor vollständig entwickeltem Zellrasen löste sich dieser ab einer Zugabe von 50 μM Arsenit von dessen Unterlage ab [72, 75]. In Abb. 3.5-1 a) ist eine mikroskopische Aufnahme von NRK- Fibroblasten auf einem unbeschich-

teten GaAs- Substrat, 24 h nach dem diese ausgesät wurden, zu sehen. Die Zellen sind alle nicht adhären und Kugelförmig, was auf den Zelltod hindeutet [72].

Daher müssen Schutzschichten zum Einsatz kommen, die eine Biokompatibilität garantieren. Diese sollten als Barriere für kleine Ionen und Moleküle dienen; Zum einen, um den Halbleiter vor dem Eindringen von Verunreinigungen (z. B. Na^+ Ionen) zu schützen und das Abtragen der Oxidschicht zu verhindern, zum anderen, um zu gewährleisten, daß keine giftigen Substanzen in die Umgebung freigesetzt werden, die den Zellen schaden.

Um letztendlich eine möglichst gute elektrische Kopplung zwischen Halbleiter und Zelle zu gewährleisten, sollte der Abstand zwischen Zelle und Substrat möglichst klein sein. Daher sollten die Schutzschichten die Möglichkeit einer weiteren Oberflächenmodifizierung bieten. Dies ist nötig, um adhäsionsfördernde Beschichtungen aufzubringen.

Im Folgenden werden zwei Möglichkeiten beschrieben, um eine Biokompatibilität der Strukturen zu gewährleisten.

3.5.1 Organische Beschichtungen

Es ist bekannt, daß organische Thiole auf GaAs-Oberflächen passivierende Eigenschaften haben [80]. Ebenso wurden selbstorganisierte Alkan-Thiol-Monoschichten benutzt, um GaAs zu beschichten [81]. So wurde Octadecylthiol (ODT) auf GaAs benutzt [82]. Des Weiteren wurden Alkan-Thiole benutzt, um Oberflächenfunktionalisierungen an GaAs durchführen zu können [80]. Diese Schichten unterdrücken stark die Neubildung der Oxidschicht an der Grenzfläche Thiol-GaAs [83]. Ihr Nachteil besteht jedoch darin, daß sie nur unvollständige Schichten bilden [84], so daß diese nach mehreren Stunden aufbrechen, wenn sie nicht in inerter Atmosphäre gelagert werden [82]. Um die Thiol-Bindung an das GaAs zu verbessern, wurden IN-SITU-Ätzmethoden entwickelt, welche die Neubildung der Oxidschicht verhindern [85, 86], die sich ansonsten an Luft sofort neu ausbilden würde. Durch die Entwicklung derartiger Schichten wurde es möglich, erste Biosensoren auf der Basis von GaAs herzustellen [87, 88].

An GaAs-Oberflächen, die mit selbstorganisierten Octadecylthiol (ODT) Monoschichten aus ethanolischer Lösung beschichtet wurden (bzw. 16-

mercaptohexadecanoic acid MHDA) [72], wurden Atom-Absorptions-Spektroskopie-Messungen durchgeführt. Diese unterschieden sich nicht signifikant von den Messungen an unbeschichtetem GaAs (Abb. 3.5-2 b).

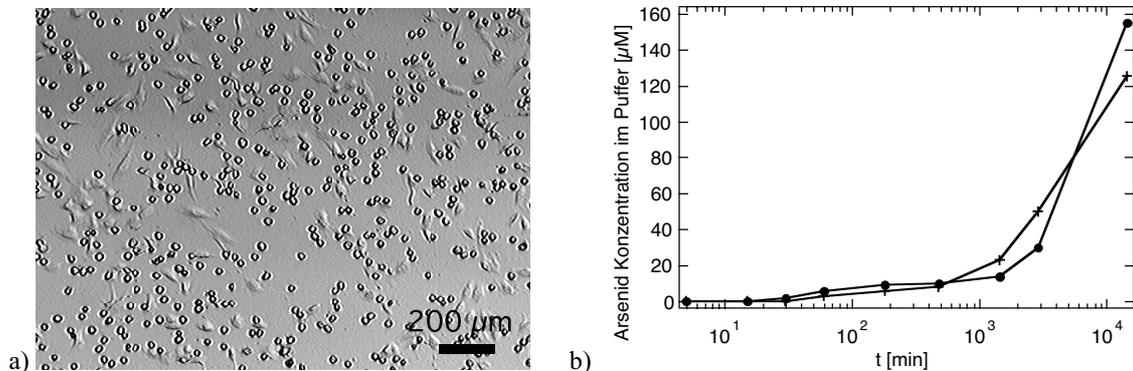


Abb. 3.5-2 a) Mikroskopische Aufnahme von NRK- Fibroblasten auf einem mit MHDA beschichtetem GaAs-Substrat, aufgenommen 22 h nach dem aussähen der Zellen. b) Eine Fläche von 80 mm² wurden mit 1 ml Wasser (Millipore) bedeckt und die Konzentration von Arsenid-Ionen mittels Atom-Absorption-Spektroskopie gemessen (● MHDA; + unbeschichtetes GaAs).

Dagegen adhären NRK- Fibroblasten zunächst auf den mit MHDA bzw. ODT beschichteten Substraten, und beginnen sich dann aber nach ca. 22 h abzulösen (Abb. 3.5-2 a).

Zur Erhöhung der Stabilität von Oberflächenbeschichtungen auf GaAs bietet sich die Verwendung von Schichten an, die sich chemisch quervernetzen lassen. Diese Quervernetzung ist mit (3-Mercaptopropyl-trimethoxysilane) (MPT) durch Zugabe einer schwachen Säure möglich [72].

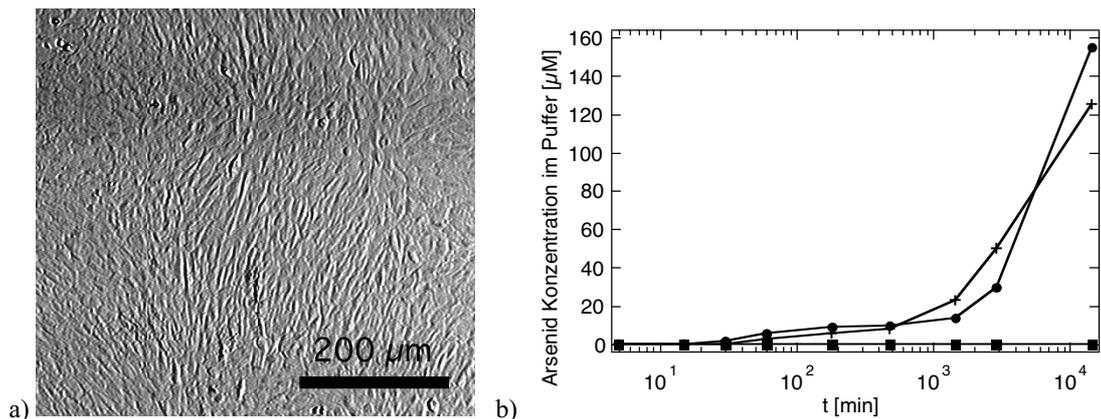


Abb. 3.5-3 a) Mikroskopische Aufnahme von NRK- Fibroblasten auf einem mit MHDA beschichteten GaAs-Substrat, aufgenommen 4 Tage nach dem Aussähen der Zellen. b) Eine Fläche von 80 mm² wurden mit 1 ml Wasser (Millipore) bedeckt und die Konzentration von Arsenid-Ionen mittels Atom-Absorption-Spektroskopie gemessen (● MHDA; + unbeschichtetes GaAs, ■ poly MPT).

Durch Verwendung von solchen polymerisierten MPT-Schichten konnte die Abgabe von Arsenit-Ionen in die wässrige Umgebung über einen Zeitraum von 10 Tagen

gänzlich unterdrückt werden. Auf Poly-MPT-Schichten ausgesäete NRK- Fibroplasten bildeten einen dichten Zellrasen aus, wie er in Abb. 3.5-3 a) zu sehen ist.

Um das Verhalten dieser Poly-MPT-Schichten unter elektrischer Belastung untersuchen zu können, wurde eine Teststruktur aufgebaut wie sie in Abb. 3.5-4 zu sehen ist. Bei dieser Teststruktur betrug die Kanallänge 2.5 mm und die Kanalbreite 100 μm .

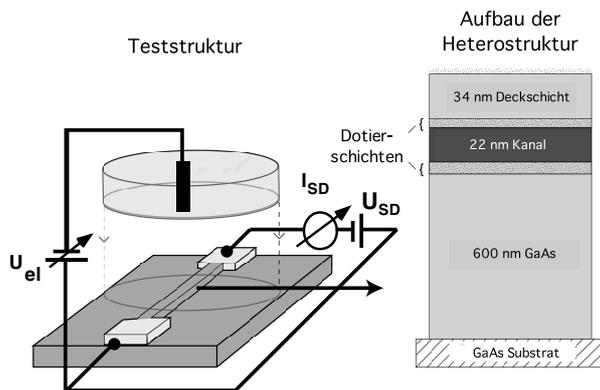


Abb. 3.5-4 Schematische Skizze des Versuchsaufbaus zur elektrischen Belastbarkeit von polymeren Beschichtungen.

Die Struktur, wie in Abb. 3.5-4 angedeutet, wurde mit einer Teflonkammer abgedichtet. Dabei lagen die Ohmschen Kontakte für Source und Drain außerhalb der Kammer. Als Elektrolyt wurde Wasser (Millipore) mit 140 mM NaCl verwendet. Die Gate-Spannung U_{el} wurde über eine Ag/AgCl Elektrode angelegt. Die Source-Drain-Spannung U_{SD} war konstant auf 140 mV eingestellt. Es wurden kontinuierlich Kennlinien aufgezeichnet, wie in Abb. 3.5-5 a) zu sehen. Aus diesen Kennlinien

wurde der jeweils maximale Leitwert des FET-Kanals bestimmt und aufgetragen (Abb. 3.5-5 b). Durch die Beschichtung der Struktur mit 10 nm Poly-MPT konnte die Lebensdauer der Struktur um den Faktor 2,5 gesteigert werden.

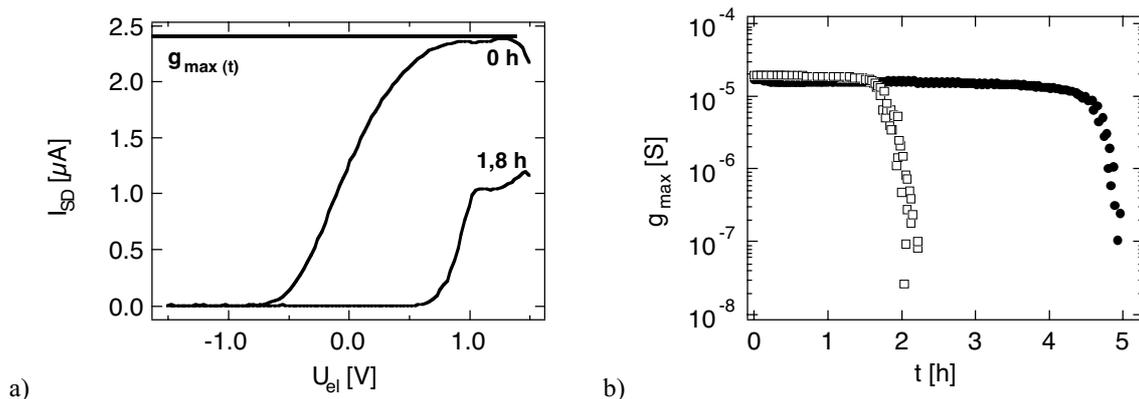


Abb. 3.5-5⁵ a) Kennlinien aufgenommen an einer unbeschichteten Struktur, wie sie in Abb. 3.5-4 dargestellt ist. U_{SD} war konstant bei 140 mV. Die Aufzeichnung der Kennlinien wurde mit einer Geschwindigkeit von $U_{el} = 50$ mV/s durchgeführt. b) Aus a) berechnete maximale Leitwerte des FET-Kanals.. (\square unbeschichteter Kanal; \bullet Poly-MPT beschichteter Kanal).

⁵ Die hier gezeigten Messungen wurden von M. George und C. Kirchner angefertigt.

Somit ist es mit den hier beschriebenen Poly-MPT-Schichten gelungen, die Freisetzung von Arsenid-Ionen unter physiologischen Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen zu unterdrücken. Die Kultivierung von NRK-Fibroblasten auf mit Poly-PMT beschichteten GaAs-Substraten ist über einen Zeitraum von 7 Tagen gelungen, ohne Anzeichen einer Vergiftung der Zellen feststellen zu können. Es konnte gezeigt werden, daß die Lebensdauer einer FET-Teststruktur unter wäßriger Lösung mit 140 mM NaCl bei kontinuierlicher elektrischer Belastung um den Faktor 2,5 gesteigert werden konnte.

Es bleibt zu zeigen, daß auch Nervenzellen auf GaAs-Substraten kultiviert werden können, die mit einer Poly-MPT-Schicht passiviert wurden. Weiterhin ist es nötig, die Stabilität der Beschichtungen gegenüber elektrischem Streß zu erhöhen.

3.5.2 Anorganische Schichten

Durch Beschichtung von Strukturen mittels der Plasma-Enhanced-Chemical-Vapor-Deposition PECVD (Plasmalab 80 Plus, Oxford Instruments) können Siliciumdioxid-Schichten (SiO_2) und Siliciumnitrit-Schichten (Si_3N_4) aufgebracht werden. Es ist bekannt, daß Si_3N_4 geeignetere Eigenschaften als SiO_2 aufweist [62, 89]. Beste Ergebnisse wurden mit Mehrschichtsystemen erzielt, die zudem bei Temperaturen zwischen 400 °C bis 800 °C ausgeheizt wurden [89]. Zudem werden in anderen Anwendungen Doppelschichten aus SiO_2 und Si_3N_4 zur Zell-Halbleiter-Kopplung mit Erfolg verwendet [90-93].

Eine wichtige Kenngröße für die Qualität der abgeschiedenen Schichten ist der mechanische Streß in ihnen. Dieser hängt hauptsächlich von der Temperatur, dem Absolutdruck der verwendeten Gase und der Frequenz des Plasmas ab [94]. Optimale Bedingungen für eine streßfreie Schicht wären Temperaturen um 550 °C, eine Plasmafrequenz von 4-5 MHz und ein Druck in der Reaktionskammer von mehr als 200 Pa [94].

Bei Temperaturen ab 300 °C beginnen jedoch Metalle in den Halbleiter zu diffundieren (Abb. 3.5-7). Dieser Effekt wird dazu benutzt, um Ohmsche Kontakte auf Halbleiterstrukturen herstellen zu können (siehe Kapitel 7). Da das Aufbringen der anorganischen Schutzschicht nach dem Aufdampfen der metallischen Gates durchgeführt wird, sind Prozeßtemperaturen von mehr als 300 °C nicht akzeptabel. Daher wurden zwei Schichten Si_3N_4 auf GaAs-Wafern bei niedrigeren Temperaturen (150 °C und

300 °C) aufgewachsen. Bis auf die Prozeßtemperaturen wurden alle anderen Parameter gleich gehalten (siehe Anhang).

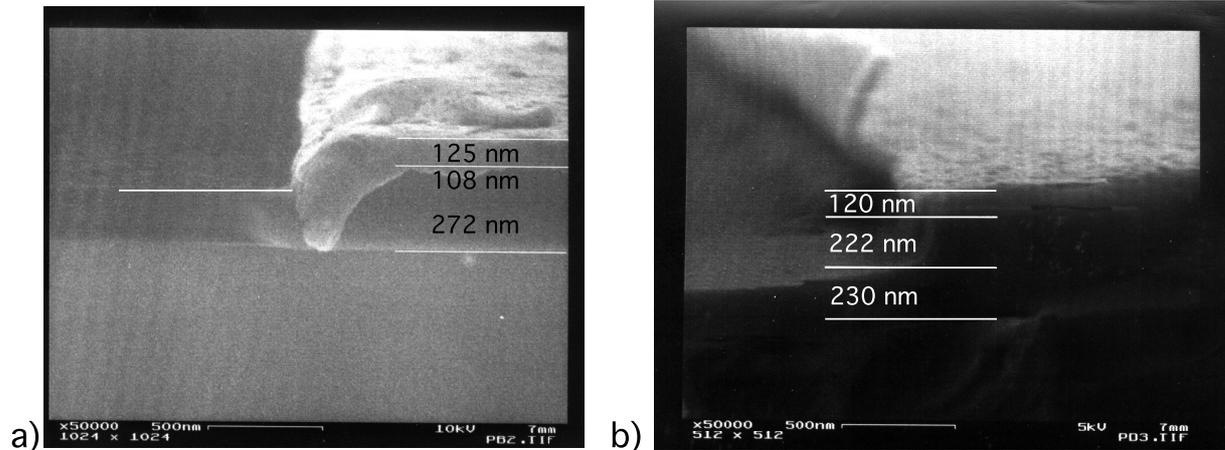


Abb. 3.5-6 REM-Aufnahmen von GaAs-Wavern, die mit dem gleichen Protokoll mit Si_3N_4 beschichtet wurden. Dabei sollten jeweils ca. 400 nm abgeschieden werden. Auf dieser Si_3N_4 -Schicht wurde dann eine Ätzmaske aus einer Aluminium-Streifenstruktur mit einer Dicke von 120 nm aufgedampft. Beide Proben wurden anschließend gleichzeitig in der RIE 3 min bei einer Leistung von 200 W geätzt. a) Prozeßtemperatur in der PECVD 300 °C, b) Prozeßtemperatur in der PECVD 150 °C.

Nach anschließendem Aufbringen einer Aluminium-Ätzmaske in Form von Streifen wurden beide Proben in eine RIE-Anlage (Reaktiv-Ion-Etching) eingebaut und in die Si_3N_4 -Schicht mit einer Leistung von 200 W für 3 min hineingeätzt (siehe Anhang). Anschließend wurden beide Proben in ein REM eingebaut und die Schichtdicken der Si_3N_4 -Schicht und die der Aluminium-Ätzmaske bestimmt. Weiterhin wurden die Ätztiefen vermessen. Da die Aluminium-Streifen gleichzeitig aufgewachsen wurden, sollten diese die exakt gleiche Dicke aufweisen. Bei der Messung mit dem REM unterscheiden sich diese jedoch um ca. 5 nm was einer Abweichung von 4 % entspricht. Diese 4 % Abweichung können als Meßfehler angesehen werden.

Prozeßtemperatur	150 °C	300 °C
Schichtdicke Si_3N_4	(452 ± 18) nm	(380 ± 15) nm
Ätztiefe	(222 ± 9) nm	(108 ± 4) nm

Tabelle 1: Si_3N_4 -Schichten die mit der PECVD auf GaAs-Substraten aufgewachsen wurden. Dabei wurden die Prozeßparameter wie in Kapitel 7 beschrieben eingestellt. Es wurde nur die Prozeßtemperatur variiert. Aufgeführt sind die Schichtdicken, die in einer Prozeßzeit von 20 min erreicht wurden. Zusätzlich sind die Ätztiefen angegeben, die mit einer RIE erzielt wurden. Prozeßparameter siehe Kapitel 7.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß bei niedrigen Prozeßtemperaturen die bei 150 °C abgeschiedene Si_3N_4 Schichtdicke um 19 % größer ist als bei 300 °C und die Ätztiefe bei gleichzeitigem Ätzen in der RIE unter gleichen Bedingungen um über 200 % zu-

nimmt. Das lässt darauf schließen, daß bei zu niedrigen Temperaturen kein stabiles Si_3N_4 abgeschieden wird. In [94] wird gezeigt, daß die abgeschiedenen Schichten nicht stöchiometrisch exakt sind. Vielmehr hängt die Komposition der Schicht von den gewählten Parametern stark ab. So enthält eine mit den hier gewählten Prozeßparametern und einer Prozeßtemperatur von $300\text{ }^\circ\text{C}$ aufgewachsene Siliziumnitrid-Schicht einen Anteil von mindestens 20 % Wasserstoff. Der Anteil von Wasserstoff nimmt für niedrigere Temperaturen stetig zu, wohingegen die Dichte ρ der Schicht stetig abnimmt [94]. Prozeßtemperaturen unter $300\text{ }^\circ\text{C}$ scheinen daher nicht sinnvoll.

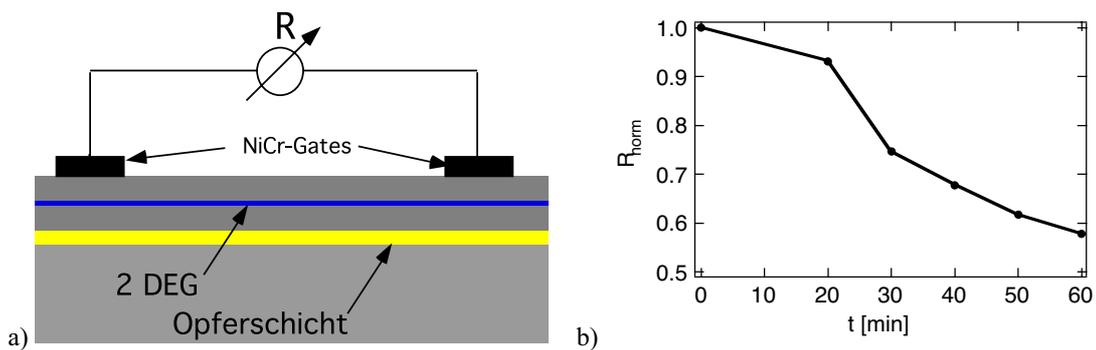


Abb. 3.5-7 a) Schema von NiCr-Gates auf GaAs-Schichtstruktur. b) Gemessene Widerstände zwischen den Gates bei unterschiedlich langen Zeiten der Probe auf $300\text{ }^\circ\text{C}$. Aufgetragen ist der bei $t = 0$ min normierte Widerstand.

Sollten beim Aufwachsen von Si_3N_4 die metallischen Gates in die elektronische Struktur des GaAs-Substrates eindiffundieren, würden die Feldeffekt-Strukturen zerstört. Daher wurden auf das verwendete Substrat metallische Gates aus NiCr aufgedampft. Diese Proben wurden dann für unterschiedliche Zeiten auf $300\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und der Widerstand zwischen den Gates bestimmt. Ab einer gewissen Diffusionszeit erreicht das NiCr das zweidimensionale Elektronengas (2 DEG). Wenn dies geschieht, sind beide NiCr-Gates in Abb. 3.5-8 über das 2 DEG miteinander verbunden und der gemessene Widerstand sinkt. Dieser Prozeß setzt bereits nach 20 min ein. Nach 30 min ist der Widerstand zwischen den Gates auf ca. 70 % des anfänglichen Wertes gesunken. Damit sind die Prozeßzeiten zum Aufwachsen von Si_3N_4 mittels der PECVD bei einer Prozeßtemperatur von $300\text{ }^\circ\text{C}$ auf ca. 20 min beschränkt. Das bedeutet, daß nur Schichtdicken von maximal 400 nm aufgebracht werden können. Dies stellt somit eine starke Einschränkung für dieses System dar.

Bei Plasmafrequenzen unter 4 MHz tritt kompressiver Streß in den Schichten auf, wohingegen für Plasmafrequenzen über 4 MHz Spannungen auftreten [94]. An der verwendeten PECVD besteht die Möglichkeit mit 0,1 MHz und 13,65 MHz Si_3N_4

Schichten aufzuwachsen. Durch abwechselndes Aufwachsen des Si_3N_4 mit den unterschiedlichen Frequenzen lässt sich der Streß in der Schicht minimieren.

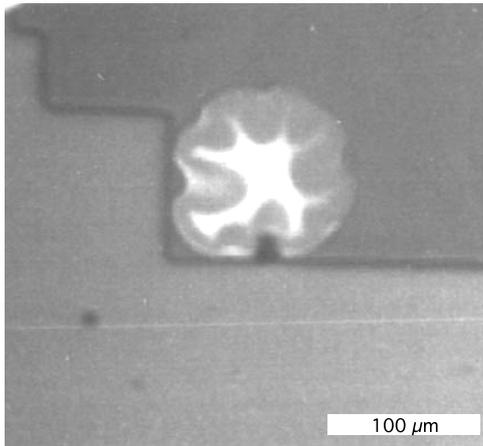


Abb. 3.5-8 Auf GaAs Substrat aufgewachsenes Si_3N_4 ca. 400 nm bei 300 °C. „Blasenbildung“ an einer 300 nm hohen Ätzkante.

Trotzdem zeigten die aufgewachsenen Si_3N_4 -Schichten teilweise bereits direkt nach dem Aufwachsen „Blasen“. Es ist bekannt, daß solche Defekte bevorzugt an Strukturkanten oder Verunreinigungen auftreten [89].

Si_3N_4 -Schichten sind jedoch biokompatibel und werden bereits seit längerem als Schutzschichten für Mikroelektrodenarrays (MEA`s) [89, 95] und andere Bio-

sensoren benutzt [90, 93]. Des weiteren ist eine Beschichtung von Si_3N_4 mit adhäsionsfördernden Polymeren gängig.

3.6 Messungen an FET-Strukturen unter elektrolytischer Lösung

Für Testmessungen unter elektrolytischer Lösung wurden Strukturen hergestellt, wie eine in Abb. 3.6-2 dargestellt ist. In Abb. 3.6-1 ist deren Herstellungsprozeß schematisch abgebildet.

Zunächst werden auf dem Substrat (Probenmaterial **A**) die Ohmschen Kontakte definiert (1). Dies geschieht auf gleiche Weise wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Anschließend wird eine definierte Schichtdicke Nickel (Ni) und Gold-Germanium (AuGe) aufgedampft und thermisch einlegiert (siehe Kapitel 7). Daraufhin werden die metallischen Zuleitungen mit den Bondflächen und die Gates belichtet und aus Gold (Au) aufgedampft (2). Eine dünne Schicht (ca. 2 nm) aus NiCr dient als Haftvermittler.

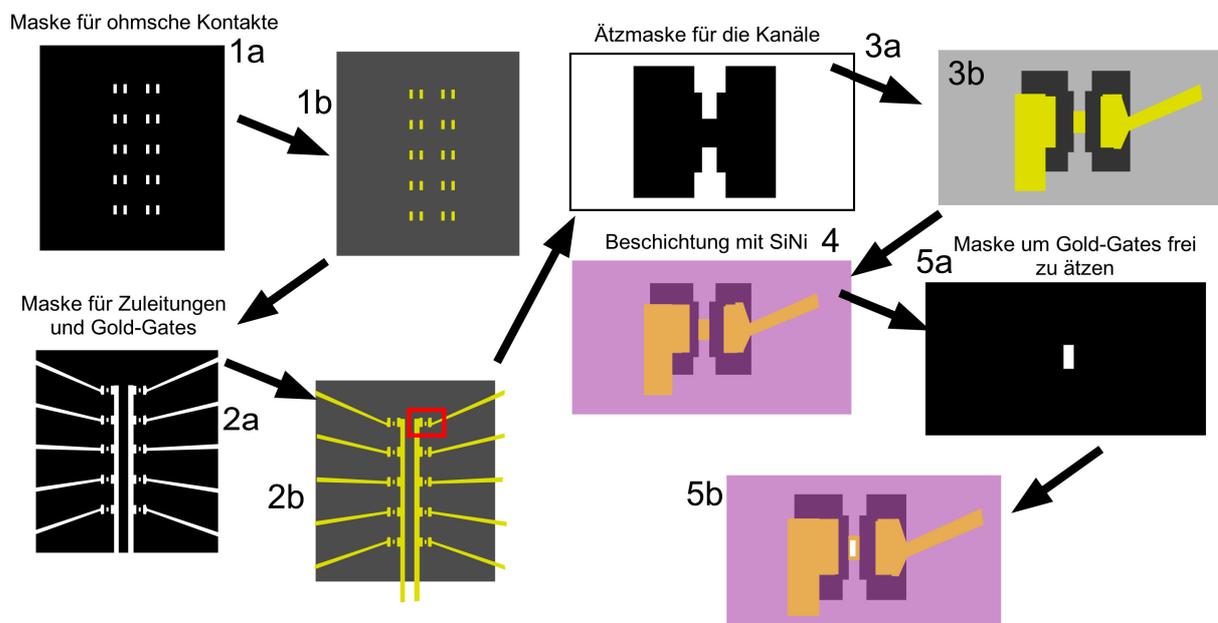


Abb. 3.6-1 Überblick über die Herstellung der Proben für Messungen unter elektrolytischer Lösung. Mit (a) sind jeweils die Masken und mit (b) das Halbleitersubstrat bezeichnet. Ab dem Schritt 3 ist nur noch der in 2b rot markierte Bereich vergrößert dargestellt.

Die Feldeffekt-Kanäle werden dann durch einen naßchemischen Ätzprozess definiert (3). Im Prinzip sind jetzt die einzelnen FET's fertig. Um diese vor dem wässrigen Milieu zu schützen, welches von den Zellen benötigt wird, muß noch eine Schutzschicht aufgebracht werden [28, 62]. Es hat sich gezeigt, daß Si_3N_4 -Schichten für diesen Zweck gut geeignet sind. Es ist möglich derartige Schichten mit Hilfe der Plasma-Enhanced-Chemical-Vapour-Deposition (PECVD) aufzubringen (siehe 3.5.2.). Nach dem Abscheiden dieser Schutzschicht (Prozeßparameter siehe Kap. 7) (4) müssen

die Kontakt-Pads und die metallischen Gates wieder freigelegt werden. Dies wird mit Hilfe der Reaktives Ionenätzen (RIE) durchgeführt (5).

Anschließend wird die Probe auf einen Chip-Träger geklebt und verdrahtet. Eine anschließend aufgebraute Plexiglasschale, wie sie auch in Abb. 4.2-10 zu sehen ist, dient als Zellkulturschale und wird mit einem biokompatiblen Kleber (Kwik-Sil; World Precision Instruments, Inc. USA) auf die Probe aufgeklebt. Diese hat in der Mitte eine Bohrung von 3 mm im Durchmesser, um einen freien Zugang zur Probe zu gewährleisten (siehe Abb. 3.6-2 a). In Abb. 3.6-2 b) sind deutlich die Ohmschen Kontakte ① und die Gate-Elektrode ② zu sehen. In der Mitte der Gate-Elektrode ist die Si_3N_4 -Schicht entfernt worden ③, um einen direkten Kontakt zwischen Gate-Elektrode und dem Elektrolyten zu ermöglichen.

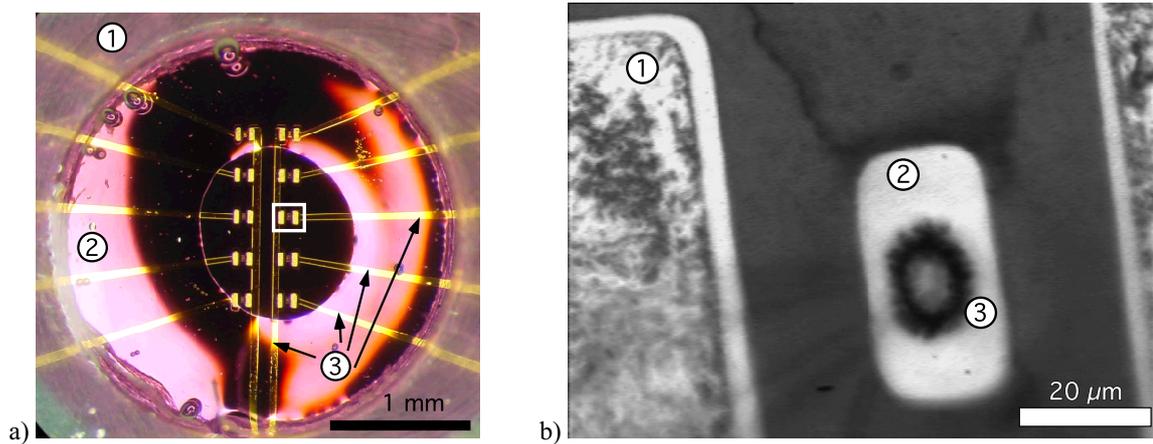


Abb. 3.6-2 a) Bild einer FET-Struktur für Messungen unter Wasser. Außen ist die Plexiglasschale ① zu erkennen, die mit Kwik-Sil-Kleber ② (biokompatibel) auf den Chip aufgeklebt wurde. Gut zu erkennen sind die Zuleitungen ③ (Source und Drain) der FET's b) Vergrößerung des in a) weiß eingerahmten Bereiches. Die Ohmschen Kontakte ① fallen durch ihre Rauigkeit auf. Das Gold-Gate ② hat als Abmessungen 40 μm Breite und 20 μm Länge. Das in die ca. 200 nm dicke Si_3N_4 -Isolationsschicht mittels RIE geätzte Loch ③ über dem Gold-Gate hat einen Durchmesser von ca. 10 μm .

Anhand derartig aufgebauter Proben wurde untersucht, wie sich eine längere Aufbewahrung dieser unter elektrolytischer Lösung auswirkt. Dazu wurde die auf der Probe befindliche Zellkulturschale mit elektrolytische Lösung gefüllt und anschließend Kennlinien an den einzelnen FETs aufgenommen. Diese Messung wurde nach 7 Tagen Aufbewahrung der Probe unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank wiederholt.

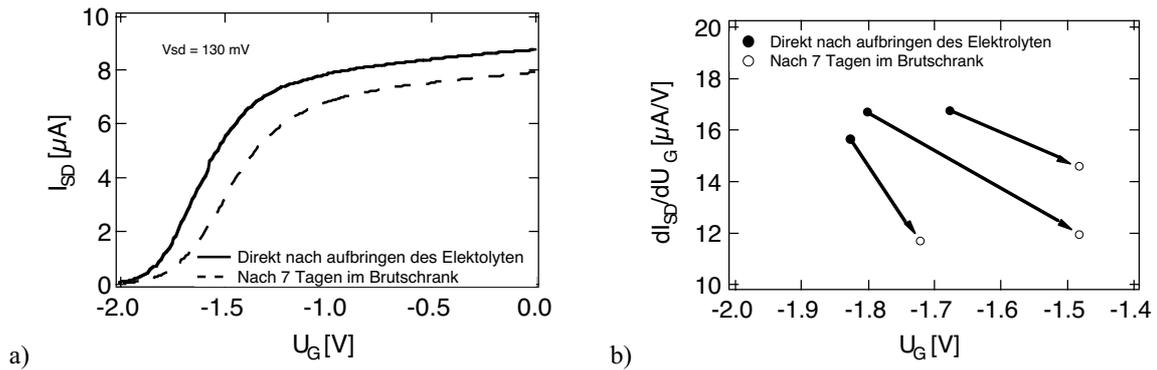


Abb. 3.6-3 a) Aufgezeichnete Kennlinien unter physiologischen Bedingungen. b) Aus a) berechnete maximale Steigungen.

Dabei hat sich gezeigt, daß die Kennlinien nach 7 Tagen unter physiologischen Bedingungen eine geringere Steigung aufweisen, als zu Beginn. Zusätzlich ist der Wendepunkt der Kennlinien auch deutlich zu positiveren Spannungen verschoben.

Weiterhin wurden Testmessungen zur Potentialempfindlichkeit der FET-Strukturen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden Kennlinien wie in Abb. 3.6-3 a) dargestellt, aufgezeichnet. Dies geschah für unterschiedliche U_{SD} -Spannungen ($U_{SD} = 43$ mV, 75 mV, 105 mV, 140 mV, 210 mV, 0.4 V, 1 V). Aus diesen Kennlinien wurde die maximale Steigung am Wendepunkt berechnet ($dI_{SD}/dU_G|_{max} = 5.44, 11.5, 12.8, 16.2, 27.0, 29.1, 45.7$ $\mu A/V$). Anschließend wurde der FET auf den Arbeitspunkt (=Wendepunkt) eingestellt und das Rauschen des Source-Drain-Stroms im Fourier-Raum mit einem Tiefpaßfilter von 3 kHz aufgezeichnet. Aus diesen Messungen erhält man durch Integration das Potentialrauschen an der Gate-Elektrode, das in Abb. 3.6-4 b) gezeigt ist.

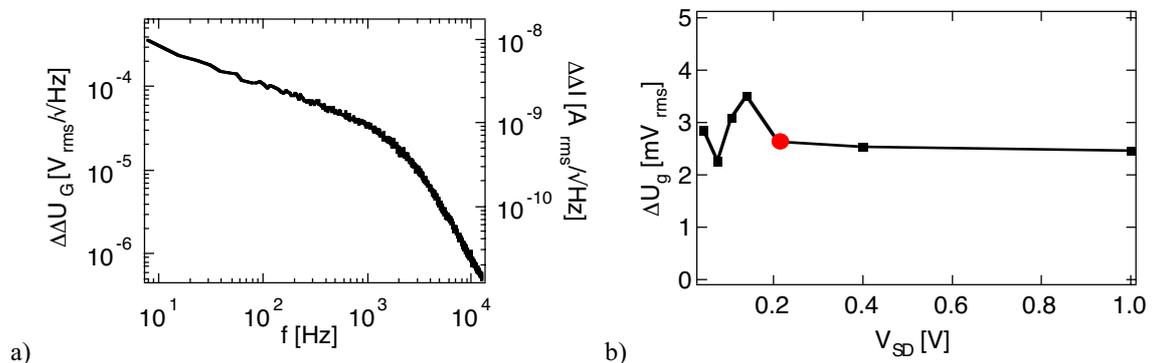


Abb. 3.6-4 a) Rauschamplitude im Fourier-Spektrum für $U_{SD} = 210$ mV. b) Aus a) berechnete Schwankung der Gatespannung. Die aus a) berechnete Schwankung ΔU_G ist als Punkt markiert.

Im wesentlichen ist die Potentialempfindlichkeit unabhängig von der Source-Drain-Spannung und wurde zu etwa $\Delta U_G = 3$ mV_{rms} bestimmt. Eine Ursache für die stark

erhöhte Rauschamplitude unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu den Messungen an Luft, ist in der großen Streukapazität zu suchen, die durch die Zuleitungen entstehen.

Ein zusätzliches Problem ergab sich dadurch, daß die verwendeten Si_3N_4 -Schichten durch die elektrische Belastung sich vom Substrat ablösen. Dieser Prozeß begann stets an den Gate-Elektroden und breitete sich von dort aus (siehe Abb. 3.6-5).

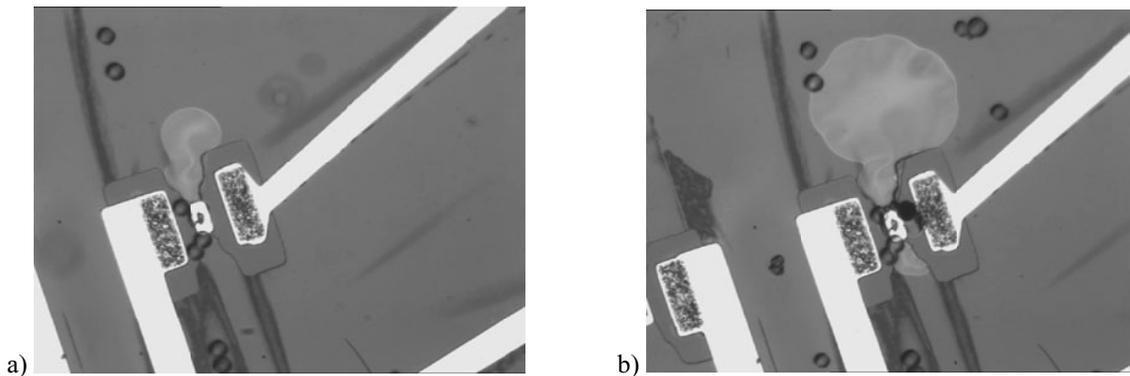


Abb. 3.6-5 a) Ablösen der Si_3N_4 -Schutzschicht bei elektrischer Belastung. b) Gleicher FET wie in a) nach einer weiteren Belastung von 10 min.

Die Ursache für dieses Ablösen ist in einer unzureichenden Haftung von Si_3N_4 -Schichten auf den verwendeten GaAs-Substraten zu suchen.

3.7 Diskussion der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß die sensitiven Bereiche des FAPS (Strukturgröße = Gatebreite x Kanalbreite) auf die Größe von einzelnen Zellen skaliert werden können (siehe auch [62]). Die Abschneidefrequenz bei Messungen mit der FAPS-Struktur wird von zwei Mechanismen beeinflusst. Zum einen erhöht sich mit steigender Frequenz das rein kapazitive Einkoppeln der Gatespannung in den FET-Kanal, zum anderen sinkt mit steigender Frequenz die effektive Modulationsspannung am Gate. Bei einer Strukturgröße von $12.5 \mu\text{m} \times 12.5 \mu\text{m}$ konnte nur ein schwaches Absinken der Sensitivität bei 10 kHz festgestellt werden. Die Potentialsensitivität einer FET-Struktur konnte an Luft zu $\Delta U_G = (60.6 \pm 3.3) \mu\text{V}_{\text{rms}}$ bestimmt werden. Unter physiologischen Bedingungen wurde eine Potentialsensitivität von $\Delta U_G \approx 3 \text{ mV}_{\text{rms}}$ nachgewiesen.

Die Abschirmung des Sensors gegen die physiologischen Umgebungsbedingungen, sowie der Zellen gegen den Sensor, der toxische Substanzen freisetzt, hat sich als problematisch erwiesen. Vor allem unter Meßbedingungen werden an die Schutz-

schichten hohe Anforderungen gestellt, was die elektrische Belastung betrifft. Organische Schutzschichten konnten unter physiologischen Bedingungen, ohne elektrische Belastung, ein Austreten toxischer Substanzen aus dem Halbleiter über einen Zeitraum von 10 Tagen verhindern. NRK-Fibroblasten wurden auf derart behandelten Substraten ausgesät und bildeten nach 4 Tagen einen dichten Zellrasen aus. An Teststrukturen wurde gezeigt, daß die Lebensdauer der Halbleiterstrukturen bei permanenter elektrischer Belastung durch organische Beschichtungen um das 2,5-fache gesteigert werden konnte. Anorganische Si_3N_4 -Schichten wurden ebenfalls untersucht. Probleme bereiten dabei die relativ hohen Prozeßtemperaturen die zum Aufwachsen nötig sind. Unter elektrischer Belastung neigen diese Schichten dazu sich vom Substrat abzulösen.

Für einen Einsatz des FAPS als Sensor zum Messen von Aktionspotentialen an elektrisch aktiven Zellen ist insbesondere eine Verbesserung der Schutzschichten erforderlich und die Potentialsensitivität unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen.

4 Der Licht-Adressierbare-Potentiometrische Sensor (LAPS)¹

4.1 Prinzipielle Funktionsweise

Der Licht-Adressierbare-Potentiometrische Sensor (LAPS) basiert auf einer Elektrolyt-Isolator-Halbleiter (EIS) Struktur, wie in Abb. 4.1-1 gezeigt. Es ist ein Oberflächenpotentialsensor, der normalerweise in wässriger Umgebung arbeitet [28, 91, 99, 100].

Der Halbleiter (S) ist auf der Rückseite mit einem Ohmschen Kontakt versehen. Die Isolatorschicht (I) auf der Vorderseite ist epitaktisch auf den Halbleiter aufgewachsen und befindet sich in Kontakt mit der elektrolytischen Lösung (E).

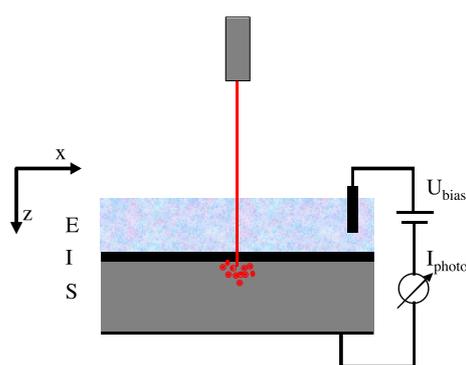


Abb. 4.1-1 Prinzipieller Aufbau eines Licht-Adressierbaren-Potentiometrischen Sensors (LAPS)

Zwischen dem Elektrolyten und dem Rückkontakt wird eine Vorspannung U_{bias} angelegt. Wird der Halbleiter mit einem moduliertem Lichtzeiger² beleuchtet, so werden in ihm Ladungsträger (Elektronen und Löcher) generiert, die zu einem Photostrom I_{photo} führen. Die Amplitude des Photostroms hängt vom Oberflächenpotential an der Isolator-Elektrolyt-Grenzfläche ab. Durch Verfahren des Lichtpunktes kann der Ort der Messung frei gewählt werden. Der Meßpunkt ist somit nicht durch eine Struktur auf dem Halbleiter

vorgegeben. Damit steht mit dem LAPS ein Oberflächenpotential sensitives Device zur Verfügung, dessen Ortsauflösung durch keinerlei Struktur, wie z.B. beim Feldefekt-Transistor, vorgegeben ist. Dabei ist es prinzipiell irrelevant, ob die Beleuchtung mit dem Lichtzeiger von oben oder von unten bewerkstelligt wird. Bei einer Beleuchtung von unten wird an das Substrat lediglich die Zusatzforderung gestellt, daß es für das Licht transparent ist.

¹ Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit M. George und W. J. Parak bearbeitet. Die Ergebnisse sind in [96-98] veröffentlicht

² Die Energie des Lichtes muß mindestens die Energie der Bandlücke des gewählten Halbleiters entsprechen. Bei Silizium entspricht dies 1,12 eV bzw. einer Wellenlänge von 1,1 μm (bei 300K)

Die bei Beleuchtung erzeugten Ladungsträger werden im elektrischen Feld der Raumladungszone getrennt und erzeugen auf diese Weise einen Photostrom. Hier findet sowohl ein Ladungsstrom, als auch ein Teilchenstrom statt. Nur in dieser Raumladungszone ist ein Potentialgradient vorhanden. Sowohl im Halbleitersubstrat, wie auch im Elektrolyten ist das elektrische Potential konstant. Dies ist in Abb. 4.1-2 veranschaulicht. Damit erfahren nur die in der Raumladungszone generierten Ladungsträger eine Beschleunigung, die auf das Vorhandensein der Bandverbiegung zurückzuführen ist. Ladungsträger, die im Volumenhalbleiter generiert werden, erfahren keine Kraft aufgrund der gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung, da genau gleich viele Elektronen und Löcher erzeugt wurden. Diese Ladungsträger diffundieren nur aufgrund ihrer thermischen Bewegung³ radial auseinander. Dabei findet kein Ladungstransport, sondern nur ein Teilchentransport statt [100].

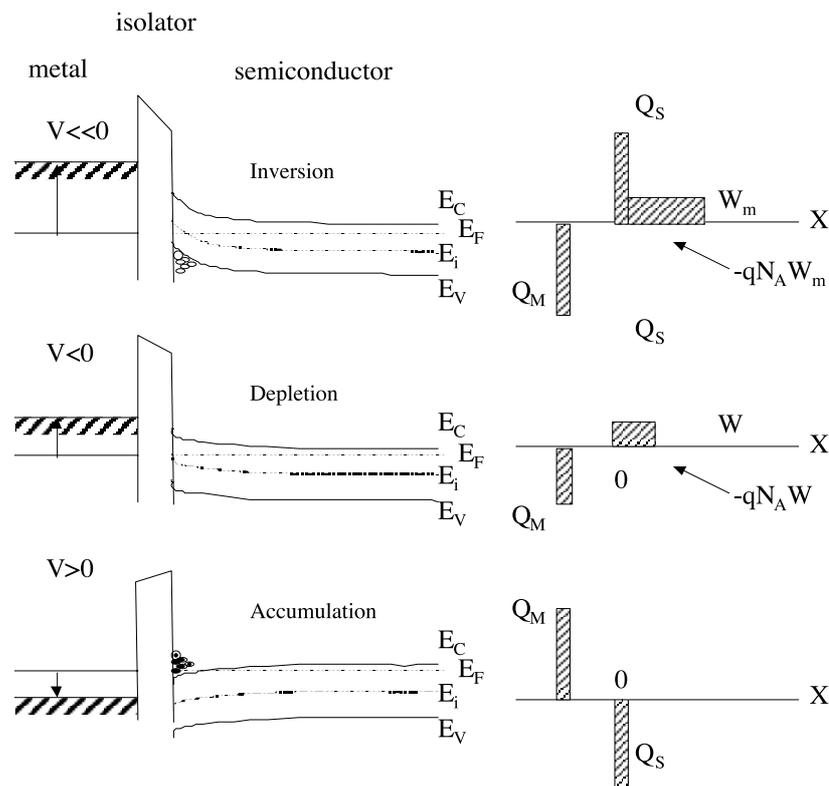


Abb. 4.1-2 Potentialverlauf und Ladungsträgerverteilung für a) Inversion b) Verarmung c) Anreicherung

Die Ladungstrennung in der Raumladungszone wirkt auf diese wieder zurück, so daß die Gleichungen, welche die Ladungstrennung beschreiben (und somit den Photostrom) selbstkonsistent gelöst werden müssen. Darauf soll jedoch hier nicht näher eingegangen werden.

³ Ficksches Gesetz

Die erzeugten Ladungsträger besitzen im Halbleiter nur eine endliche Lebensdauer τ_L . Dies hat zur Folge, daß nach dieser Zeit nur noch der $1/e$ te Teil der erzeugten Ladungsträger vorhanden ist [68].

Um mit dem LAPS Potentialmessungen durchführen zu können muß zunächst eine Photostromkennlinie wie sie in Abb. 4.1-6 dargestellt ist, aufgezeichnet werden. Dies ist nötig, damit von den von dem gemessenen Photostromänderungen auf die Änderungen des Oberflächenpotentials zurückgeschlossen werden kann. Diese Kalibrierung muß vor jeder Messung durchgeführt werden, da die Kennlinie von Versuch zu Versuch variiert.

4.1.1 Aufzeichnung einer Photostromkennlinie und Interpretation

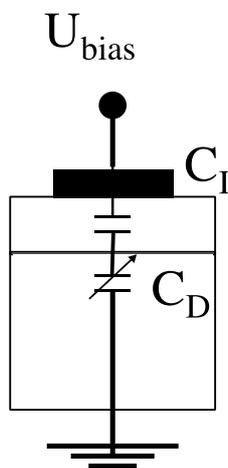


Abb. 4.1-3 Einfaches Ersatzschaltbild für den LAPS.

Das einfachste Ersatzschaltbild für eine MIS (MOS) Diode ist in Abb. 4.1-3 graphisch dargestellt. Die Diode besteht aus zwei in Serie geschalteten Kapazitäten. Dabei ist die Isolatorkapazität C_I fest und die Kapazität, welche mit der Verarmungszone C_D interpretiert wird, variabel. Parallel und seriell auftretende Widerstände, sowie weitere Kapazitäten, sind hier vernachlässigt [68].

Eine Kapazitätsmessung in Abhängigkeit von der Spannung U_{bias} wird einen nicht konstanten Verlauf ergeben, da C_D von dieser abhängig ist. Führt man diese Messung für eine konstant beleuchtete und eine unbeleuchtete MIS-Struktur durch, so ergeben sich zwei unterschiedliche Verläufe der Kapazität in Abhängigkeit von U_{bias} (Abb. 4.1-4). Dies ist

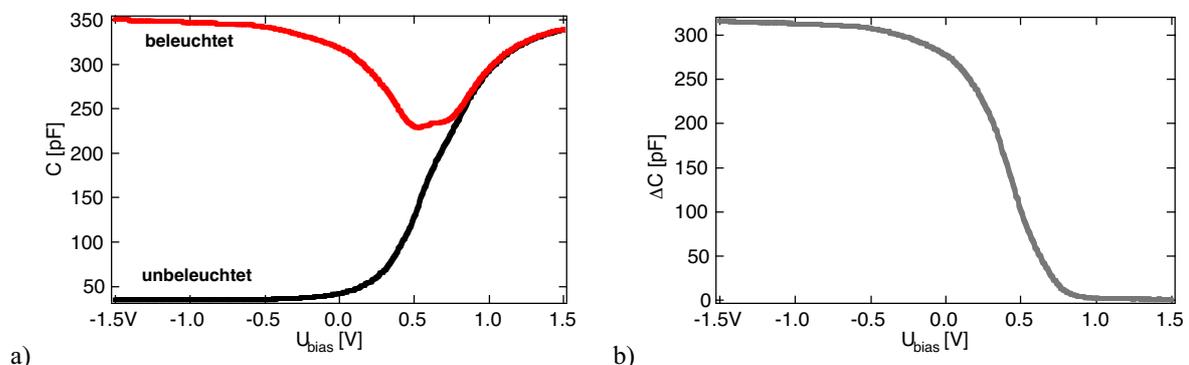


Abb. 4.1-4 a) Kapazitätsmessung über U_{bias} an einer MIS-Struktur im beleuchteten und unbeleuchteten Fall, bei einer Frequenz von 30 kHz. b) Der sich aus Subtraktion von beleuchtetem und unbeleuchtetem Fall ergebende Unterschied in der Kapazität.

darauf zurückzuführen, daß im beleuchteten Fall Überschlußladungsträger in der Raumladungszone erzeugt werden, und somit die Bandverbiegung anders ist als im unbeleuchteten Fall [28].

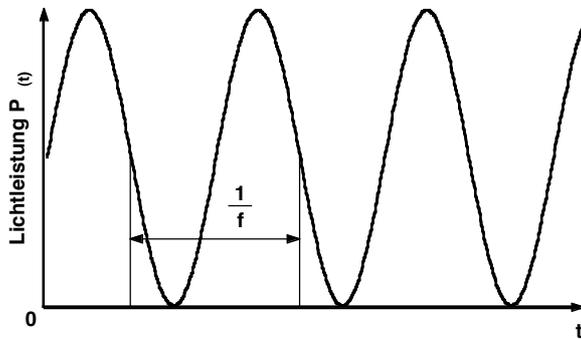


Abb. 4.1-5 Beleuchtungsleistung als Funktion der Zeit.

Wird die Leistung des Lichtzeigers sinusartig moduliert Abb. 4.1-5, so zeigt der Photostrom ebenfalls einen sinusförmigen Verlauf. Die Amplitude des Photostroms wird über einen Lock-In Verstärker phasensensitiv detektiert. Misst man die Amplitude des Photostroms über die externe Spannung U_{bias} (Abb. 4.1-6), so erhält man qualitativ einen ähnlichen Verlauf wie für den Unterschied in der Kapazität in Abb. 4.1-4 b).

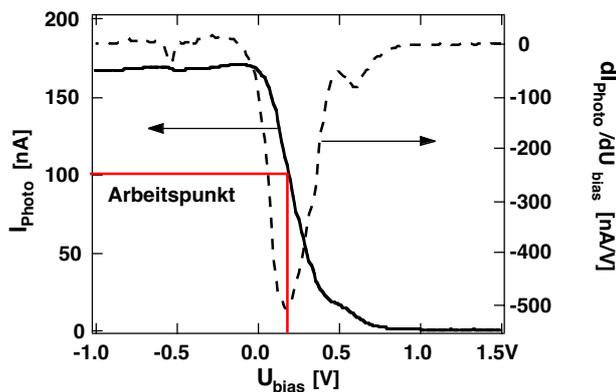


Abb. 4.1-6 Photostrom gemessen an einer MIS-Diode, mit einer aktiven Fläche von $A_{akt} = 0.22 \text{ mm}^2$, über die extern angelegte Spannung U_{bias} und deren Ableitung.

Aus diesem Resultat kann geschlossen werden, daß die durch das Licht generierten Überschlußladungsträger die Ausdehnung der Raumladungszone und somit deren Kapazität verändert. Durch die ständig veränderte Kapazität fließt bei konstant angelegter externer Spannung U_{bias} ein kapazitiver Strom.

Gl. : 10
$$I_{Photo} \approx \frac{dC}{dt} \cdot U_{bias}$$

Solange U_{bias} konstant ist, wird der Photostrom nur durch die Größe dC/dt bestimmt. Diese Größe wird durch mehrere Variablen beeinflusst. Zum einen geht die Modulationsfrequenz des Lichtzeigers ein, zum anderen dessen Amplitude (Lichtleistung) sowie die Größe der Isolator Kapazität C_i . Bei positiven Vorspannungen U_{bias} fließt kein nennenswerter Photostrom. Dies liegt daran, daß in diesem Falle (Akkumulation) na-

hezu keine Raumladungszone vorhanden ist, die durch zusätzlich generierte Ladungsträger moduliert werden könnte.

Bei der Oberflächenpotentialmessung ist die Meßgröße, die man erhält die Amplitude des Photostroms. Eine Änderung des Oberflächenpotentials führt zu einer Änderung der Photostromamplitude. Die eigentliche Meßgröße ist also die Einhüllende des sinusförmigen Photostroms. Aus dieser muß dann anhand der zuvor aufgezeichneten Photostromkurve Abb. 4.1-6 das Oberflächenpotential bestimmt werden. Um für eine Änderung des Oberflächenpotentials maximal empfindlich zu sein, wählt man als Arbeitspunkt den Punkt der Photostromkurve an dem $dI_{\text{photo}}/dU_{\text{bias}}$ maximal ist.

4.1.2 Versuchsaufbau und Meßmethode

Als Lichtquelle wird eine Laserdiode (Toshiba TOLD 9150, Neuss, Germany) mit einer Wellenlänge von 688 nm verwendet. Diese wird in den optischen Pfad eines Mikroskops (Axiotech Zeiss, Oberkochen, Germany) eingekoppelt und über ein 40 fach Objektiv auf die Oberfläche des LAPS – Chip fokussiert. Die Laserdiode wird mit einem Netzteil (SK9716, Schäfer & Kirchhoff, Hamburg, Germany) betrieben, welches sinusförmig mit einem Funktionsgenerator (PM 5127, Phillips, Germany) moduliert wird.

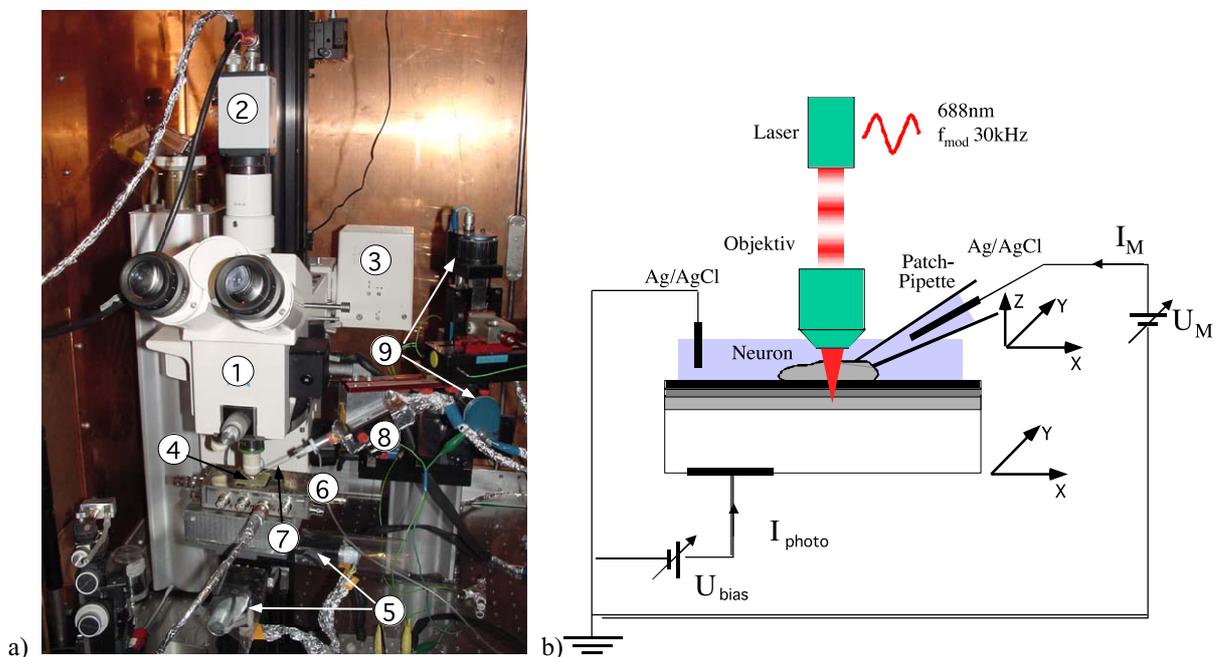


Abb. 4.1-7 a) Abbildung des Versuchsaufbaus ① Mikroskop, ② Digitalkamera, ③ Mikroskopbeleuchtung, ④ LAPS-Chip mit Chip-Carrier und Zellkulturschale, ⑤ X-Y Positioniereinheit mit Schrittmotoren, ⑥ Beheizbarer Chipsockel, ⑦ Patch-Pipette, ⑧ Patch-Vorverstärker und Pipettenhalter, ⑨ X-Y-Z Positioniereinheit der Patch-Pipette mit Schrittmotoren. b) Schematischer Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau mit den ersten Verstärkerstufen befindet sich in einem metallischem Käfig, um elektromagnetische Strahlung (auch unerwünschtes Streulicht) abzuschirmen. Um dennoch einen optischen Zugang zu haben, befindet sich am Mikroskop eine Digitalkamera (AVT BC12, AVT Horn, Aalen, Germany) mit deren Hilfe die Zellen beobachtet werden können. Zur mechanischen Manipulation ist der LAPS-Chip auf einem x-y-Tisch aufgebaut, der durch Schrittmotoren (20B121, Faulhaber, Germany) verfahren werden kann. Diese werden über eine Motorsteuerung (Owis DC Motorcontroller 500, Owis, Staufen) gesteuert. Der integrierte Patch-Clamp Aufbau wurde benutzt, um neuronale Zellen gezielt stimulieren zu können (genaue Beschreibung siehe Kapitel 4.3.1). Der gesamte Aufbau befindet sich auf einem schwingungs isolierten Tisch (I-2000 Serie, Newport), um diesen von mechanischen Schwingungen zu entkoppeln.

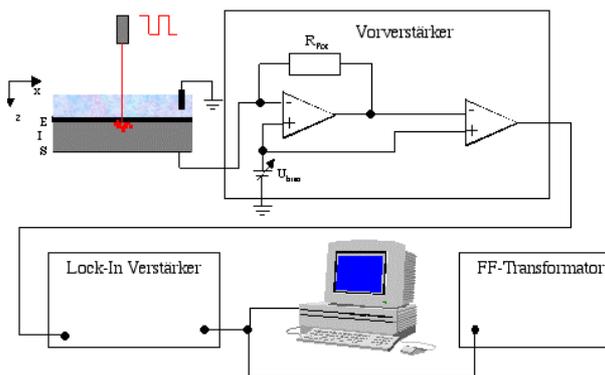


Abb. 4.1-8 Prinzipieller Meßaufbau

Der generierte Photostrom wird mit einem Operationsverstärker (DLPCA 200, FEMTO, Berlin, Germany) vorverstärkt, um dann mit dem Lock-In Verstärker (SRS 830 DSP, Stanford Research Systems, California, USA) auf der Modulationsfrequenz des Lichtzeigers phasensensitiv detektiert zu werden. Die Modulationsfrequenz beträgt 30 kHz. Die

Bandbreite der Messung sollte 3 kHz betragen. Das bedeutet, daß in einem Frequenzbereich von 27 – 33 kHz gemessen wird (siehe Abb. 4.1-10). Um diesen Frequenzbereich abdecken zu können, wird am Lock-In Verstärker eine Integrationszeit

von $\tau_c = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \Delta f}$ gewählt, wobei Δf die Bandbreite der Messung ist. Dies gilt allerdings nur, wenn ein Tiefpassfilter mit 6 dB pro Oktave benutzt wird. Im Falle einer

Filterung mit 24 dB pro Octave ist $\tau_c = \frac{1}{10 \cdot \Delta f}$. Somit muß für eine Messung mit einer

Bandbreite von 3 kHz eine Integrationszeit von 33 μ s oder kleiner gewählt werden. Der Ausgang des Lock-In Verstärkers wird mit Hilfe einer digitalen Meßkarte (PCI-6071E, National Instruments, USA) aufgezeichnet. Dabei sollte die Aufzeichnungsrate der Meßkarte ca. das 10 fache der Bandbreite der Messung betragen.

Um das Meßprinzip zu verdeutlichen, wurde auf die Badelektrode in Abb. 4.1-8 eine kleine sinusförmig modulierte Spannung mit einer Frequenz von 3 kHz aufgeprägt. Diese soll die Potentialänderung einer Zelle „simulieren“. Dadurch wird der Photostrom mit einer Frequenz von 3 kHz moduliert, was bei einer Messung im Frequenzraum dazu führt, daß zwei Seitenbänder bei 27 kHz und 33 kHz auftreten (siehe Abb. 4.1-10 a).

Das Meßsignal bei 3 kHz in Abb. 4.1-10 a) ist deshalb so groß, da über die Referenzelektrode die Potentialänderung an dem gesamten Chip angelegt wurde. Damit wird die gesamte Kapazität C_{aktiv} (Abb. 4.1-9) umgeladen, was zu einem großen Ladestrom führt.

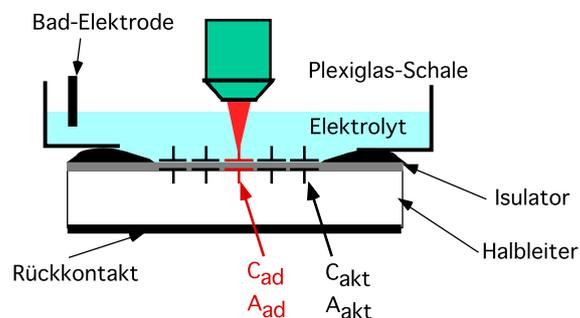


Abb. 4.1-9. Schematische Darstellung der adressierten und aktiven Kapazitäten bzw. Flächen.

Die Seitenbänder werden also durch die Amplitudenmodulation des Photostroms hervorgerufen, die durch die Potentialänderung verursacht wird. Damit sind die Seitenbänder das eigentliche Meßsignal. Wird der Photostrom mit einem Lock-In Verstärker gemessen, so erhält man direkt die Amplitude des Photostroms bzw. dessen Änderung.

In Abb. 4.1-10 b) wurde das Ausgangssignal des Lock-In Verstärkers frequenz aufgelöst aufgezeichnet. Das Signal, welches in Abb. 4.1-10 a) in Form von zwei Seitenbänder auftritt, ist hier als Modulation des Photostroms bei 3 kHz zu sehen. Die Messung wurde mit einer Integrationszeit am Lock-In Verstärker von $\tau_c = 30 \mu\text{s}$ und 24 dB/Oct durchgeführt.

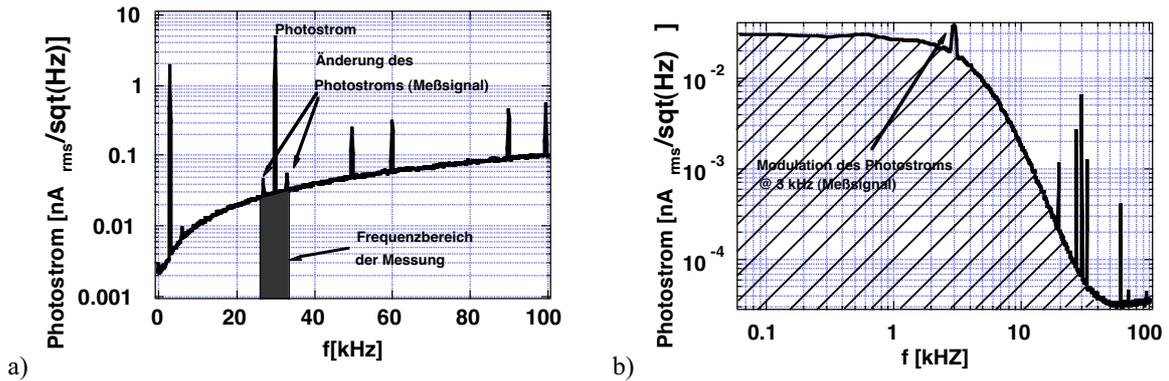


Abb. 4.1-10 a) Photostrom gemessen mit einem FFT am Ausgang des Vorverstärkerts. Zu sehen ist der mit 30 kHz modulierte Photostrom. b) Signalausgang des Lock-In Verstärkers mit der Modulation des Photostroms bei 3 kHz, die in a) bei 27 kHz bzw. 33 kHz auftreten.

Da bei der Messung von extrazellulären Aktionspotentialen nur Potentialänderungen interessant sind, wird der konstante Photostrom mit der Auto-Offset Funktion am Lock-In Verstärker abgezogen. Zusätzlich kann dann das Ausgangssignal des Lock-In Verstärkers nochmals verstärkt werden, um den Bereich der AD/DA-Karte (PCI-6071E, National Instruments, USA) im Computer besser ausnützen zu können.

4.1.3 Ortsauflösung

Um extrazelluläre Potentiale von Einzelzellen mit dem LAPS messen zu können, muß die Ortsauflösung in der Größenordnung der Ausdehnung einer einzelnen Zelle liegen. Die Ortsauflösung des LAPS ist dabei im wesentlichen durch die Diffusion der Minoritätsladungsträger, im Falle eines n-dotierten Halbleiters also Löcher, im Halbleiter bestimmt [28, 101]. Die Spotgröße des fokussierten Lichtzeigers ist damit von vergleichsweise geringer Bedeutung und muß erst optimiert werden, wenn die Ortsauflösung von der gleichen Größe wie dieser ist. Dabei spielt bei Beleuchtung von vorne die Bandverbiegung in der Raumladungszone eine große Rolle, da in der Raumladungszone eine Ladungstrennung stattfindet und die Löcher bei Inversion (Elektronen bei Akkumulation) an die Isolator-Halbleiter-Grenzfläche gezogen werden¹ [Parak, 1999 #]. An dieser Grenzfläche ist die Diffusionskonstante nicht mit der im Volumen des Halbleiters zu vergleichen, da hier Grenzflächenrauhigkeiten und zusätzliche Störstellen den Diffusionsprozeß behindern.

Um die Ortsauflösung zu bestimmen, wurden in anderen Arbeiten bereits zahlreiche Experimente durchgeführt. Zum einen können Potentialmuster abgebildet werden, die auf der Oberfläche des LAPS – Chip erzeugt werden. Dies ist durch das Aufbringen dielektrischer Schichten [102-104] möglich. Zum anderen ist es möglich, den Lichtzeiger über die Kante einer Metall-Elektrode zu scannen und den Photostrom in Abhängigkeit der Entfernung des Lichtzeigers von dieser Metallkante aufzuzeichnen [105]. Dabei tragen nur die generierten Ladungsträger zum Photostrom bei, die unter die Metall-Elektrode diffundieren können. Je weiter der Lichtzeiger von der Elektrode entfernt ist, desto geringer ist demnach der Photostrom.

Um jedoch eine genaue Abschätzung der Ortsauflösung durchführen zu können, müssen die gleichen Bedingungen gegeben sein wie bei einer Messung an einzelnen Zellen. Insbesondere die Potentialverhältnisse sollten gleich sein, da diese für die Bandverbiegung im Halbleitersubstrat verantwortlich sind. Dies ist bei den beiden zuvor beschriebenen Methoden nur unzureichend der Fall. Beim zusätzlichen Aufbringen von dielektrischen Strukturen ist die Bandverbiegung unterhalb einer solchen Struktur anders als neben solchen Strukturen. In dem Fall, daß der Lichtzeiger über die Kante einer Metall-Elektrode gefahren wird, ist das Potential zwar am Ort der

¹ Dabei ist U_{bias} so gewählt, daß ein Photostrom fließen kann.

Metallelektrode definiert, aber nicht am Ort der Generation der Ladungsträger, also dort, wo beleuchtet wird.

Daher wurde hier zur Bestimmung der Ortsauflösung eine Meßmethode gewählt, die diese Nachteile umgeht und von M. George in [100] vorgeschlagen wurde.

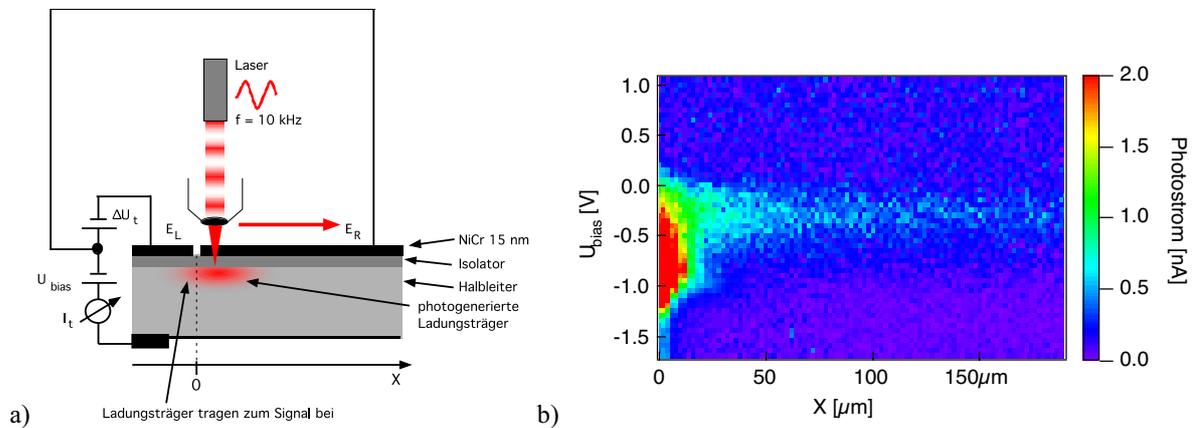


Abb. 4.1-11² a) Versuchsaufbau zur Bestimmung der Ortsauflösung des LAPS-Chip. Auf den Chip wurden zwei NiCr-Elektroden aufgedampft, die eine Dicke von ca. 15 nm aufweisen und durch einen Spalt von ca. 500 nm voneinander getrennt sind. Damit sind beide Elektroden lichtdurchlässig. An beiden Elektroden liegt eine konstante Spannung U_{bias} an. An die linke Elektrode wurde zusätzlich noch eine kleine zusätzliche Spannung ΔU_t angelegt, die mit 5 Hz moduliert wurde. Gemessen wurde der Photostrom, der diese zusätzliche Modulation aufweist und somit die Ladungsträger, die unter die Elektrode E_L diffundiert sind. b) Photostrom I_p in Abhängigkeit des Ortes und der Vorspannung.

Dazu wurde ein LAPS-Chip mit zwei metallischen Elektroden aus NiCr bedampft, die eine Dicke von ca. 15 nm aufweisen. Damit waren die Elektroden dünn genug, um für das Licht der Laserdiode teilweise transparent zu sein. Beide Elektroden sind durch einen Spalt von ca. 500 nm voneinander getrennt. Eine konstante Spannung U_{bias} wurde an beide Elektroden (E_L und E_R) angelegt. Zusätzlich wurde an E_L eine sinusförmig modulierte Spannung ($f_{mod} = 5$ Hz) ΔU_t angelegt. Die Laserdiode wurde mit einer Frequenz von 10 kHz moduliert. Mit einem Lock-In-Verstärker wurde der Photostrom $I(t)$ gemessen. Der Anteil des Photostroms, der durch Ladungsträger zustande kommt, die unter die Elektrode E_L diffundieren, weist eine zusätzliche Modulation mit $f_{mod} = 5$ Hz auf. Dieser Anteil des Photostroms wurde durch einen in Reihe geschalteten zweiten Lock-In Verstärker in Abhängigkeit des Abstandes x des Lichtzeigers von der Elektrode E_L und von der Spannung U_{bias} gemessen (Abb. 4.1-11 b).

² Das Programm zur Aufzeichnung dieser Daten wurde von M. George geschrieben.

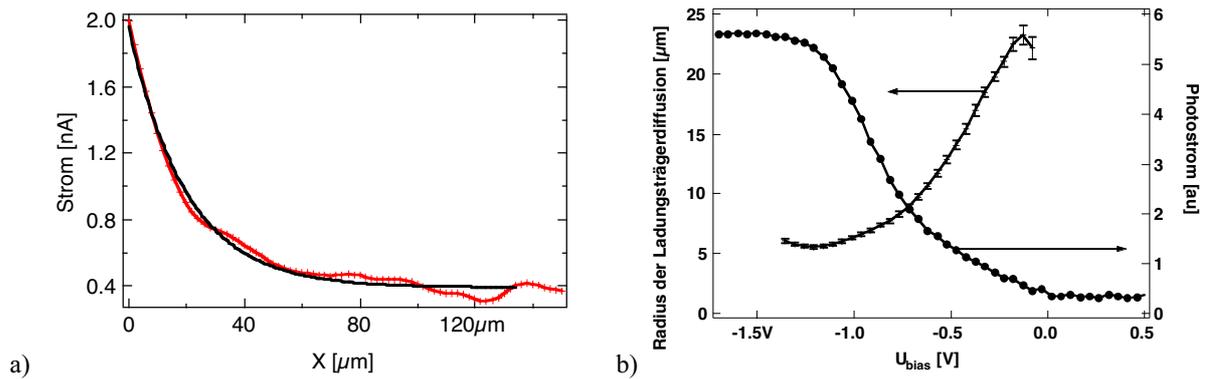


Abb. 4.1-12 a) Photostromkurve in Abhängigkeit des Ortes bei einer konstanten Spannung $U_{bias} = -0.5 V$. Diese Kurve kann durch eine Exponentialfunktion angenähert werden. Als Maß für die Ortsauflösung wird die Abfallkonstante der Exponentialfunktion benutzt und mit r_{min} bezeichnet. b) Darstellung der Photostrom-Charakteristik und der Diffusionslänge der Ladungsträger r_{min} in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} .

In Abb. 4.1-12 a) ist der Photostrom-Abfall für den Bereich $x > 0$ für eine Vorspannung $U_{bias} = -0.5 V$ gezeigt. Diese Photostromkurven wurden für unterschiedliche U_{bias} Spannungen mit einer Exponentialfunktion angenähert. Die Abfallkonstante wurde zur Definition der Ortsauflösung r_{min} herangezogen. Abb. 4.1-12 b) ist die Photostromcharakteristik und die Ortsauflösung in Abhängigkeit der Vorspannung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, daß die Ortsauflösung stark von der Vorspannung abhängt. Im Bereich der maximalen Steigung der Photostromkennlinie ($U_{bias} = -1 V$) beträgt die Ortsauflösung $2r_{min} \leq 14 \mu m$. Damit ist die Ortsauflösung für Messungen an größeren Zellen ($\approx 20 \mu m$ im Durchmesser) ausreichend.

4.2 Rauschbetrachtungen für eine Potentialmessung

Um eine realistische Rauschabschätzung durchführen zu können, muß zunächst bekannt sein, welche Signale von einem Aktionspotential einer elektrisch aktiven Zelle zu erwarten sind. Dabei ist sowohl die Signalamplitude, als auch der zeitliche Signalverlauf von elementarer Bedeutung. In Kap. 2.2.2 wurde gezeigt, daß Aktionspotentiale Frequenzen bis ca. 3 kHz aufweisen. Dagegen hängt die zu erwartende Amplitude extrazellulärer Aktionspotentiale stark vom Zelltyp, der Oberflächengeometrie und der Adhäsion der Zellen ab. Aus der Literatur sind Werte von einigen 10 μV bis zu 2-3 mV bekannt. Möchte man in der Wahl der Zellsysteme nicht eingeschränkt sein, so ist eine Potentialsensitivität des Sensors von $\approx 10 \mu\text{V}$ bei einer Bandbreite von 3 kHz nötig.

Eine Photostromkennlinie weist typischerweise eine Steigung von ca. 500 nA/V (siehe Abb. 4.1-6) bei einem Offsetstrom von ca. 100 nA auf. Dies gilt für einen Halbleiter aus Si. Dabei handelt es sich um ein Schichtsubstrat. Der genaue Aufbau ist im Anhang dargestellt. Die frei adressierbare Fläche betrug $A_{\text{akt}} = 0.25 \text{ mm}^2$. Das bedeutet, daß eine Oberflächenpotentialauflösung von 10 μV nur erreicht werden kann, wenn die Auflösung in der Strommessung besser als 5 pA ist. Dies muß in einer Bandbreite von 6 kHz erreicht werden. Dies entspricht einem Signal/Offset Verhältnis von 5.0×10^{-5} . Unter der Annahme weißen Rauschens bedeutet dies, daß ein Stromrauschen von 65 fA/ $\sqrt{\text{Hz}}$ nicht überschritten werden darf, wenn eine Potentialauflösung von 10 μV erreicht werden soll. In Abb. 4.1-10 a) ist zur Veranschaulichung eine frequenz aufgelöste Messung des Photostroms zu sehen. Dabei wurde das Potential der Bad-elektrode mit einer sinusförmigen Spannung von 3 kHz moduliert, um ein Aktionspotential zu „simulieren“. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Frequenzbereich dar, in dem die Messung stattfindet. Die beiden Seitenbänder sind das eigentliche Meßsignal. Der gesamte „graue Untergrund“ ist Rauschen. Dieses Rauschen entspricht dem gestricheltem Bereich in Abb. 4.1-10 b).

Um das Signal/Offset Verhältnis zu verbessern, wurde von W. J. Parak [28, 106] eine Differenzmessung vorgeschlagen. Mittels einer solchen Differenzmessung ist es möglich, das Signal/Offset Verhältnis um ca. zwei Größenordnungen zu verbessern. Der Nachteil dieser Messmethode liegt darin, daß zwei Lichtquellen vorhanden sind, was zu einer Erhöhung der Rauschamplitude in der Potentialmessung führt.

4.2.1 Rauschen der einzelnen Komponenten im Meßaufbau

Um eine genaue Analyse der Potentialempfindlichkeit des Meßaufbaus geben zu können, ist es von Vorteil, jede einzelne Komponente des Aufbaus einzeln zu betrachten.

Da die Leistung der Lichtquelle direkt für die Größe des Photostroms verantwortlich ist, muß diese sehr stabil sein, um keine unerwünschten Änderungen im Photostrom hervorzurufen. Daher wurde die Ausgangsleistung der verwendeten Laserdiode (Toshiba TOLD 9150, Neuss, Germany) und zum Vergleich die einer Leuchtdiode (LH3344QT) nachgemessen. Da es in diesem Fall nur auf das Verhältnis zwischen Offset zu Hintergrund ankommt, wurde die Lichtleistung bei der Modulationsfrequenz von 30 kHz normiert. Die gemessene Lichtleistung entspricht in der Photostromkennlinie (Abb. 4.1-6) dem Offsetstrom am Arbeitspunkt von ca. 100 nA. Um den Rauschuntergrund abschätzen zu können, muß in einem Intervall von 27 kHz bis 33 kHz der Untergrund integriert werden.

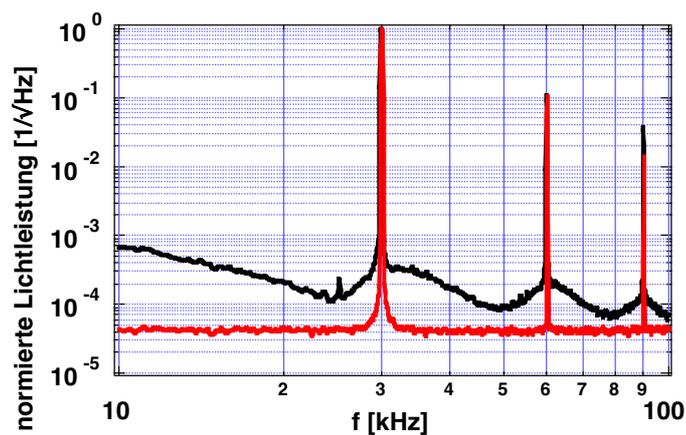


Abb. 4.2-1. Gemessene Lichtleistung einer Laserdiode (–) (Toshiba TOLD 9150, Neuss, Germany) und einer Leuchtdiode (–) (LH3344QT).

Deutlich zu erkennen ist, daß eine Leuchtdiode ein wesentlich geringeres Rauschen aufweist wie ein Laser. Gegen die Verwendung einer Leuchtdiode spricht jedoch die wesentlich geringere Lichtintensität, wodurch das Schrotrauschen nach Gl. : 11 relativ zum Signal ansteigen würde. Weiterhin besitzen Leuchtdioden einen lichtemittierenden Bereich von typischerweise $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$. Damit lassen diese sich nur unzureichend fokussieren, wodurch die Ortsauflösung des LAPS – Sensors sinkt.

	Lasere	Leuchtdiode
„Noise to Signal“	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$
Äquivalentes Potentialrauschen ΔV	$67 \mu V_{\text{rms}}$	$14 \mu V_{\text{rms}}$

Tabelle 2: Berechnetes „Signal to Noise“ Verhältnis für zwei Lichtquellen (Lasere und Leuchtdiode). Dabei wurde das Rauschen über den Frequenzbereich von 27 kHz bis 33 kHz integriert und daraus das äquivalente Potentialrauschen berechnet.

Das Schrotrauschen in einer Strommessung kann bei kleinen Strömen einen relativ großen Anteil annehmen. Leuchtdioden weisen ein geringeres Rauschen auf, haben aber eine wesentlich geringere Lichtleistung als Laserdioden. Es ist bekannt, daß der Photostrom, wie auch die maximale Steigung des Photostroms am Wendepunkt bei Erhöhung der Lichtleistung bei dem verwendeten Substrat in gleicher Weise ansteigt [28].

$$\text{Gl. : 11} \quad \Delta I_{\text{Schrot}} = \sqrt{2 \cdot e \cdot I \cdot \Delta f} \quad \text{wobei } \Delta f = 6 \text{ kHz}; e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$$

Da jedoch das Schrotrauschen in einer Strommessung mit \sqrt{I} anwächst, ist ein hoher Photostrom von Vorteil. Um ein Schrotrauschen zu erreichen, das einem Oberflächenpotentialrauschen von weniger als $10 \mu V$ entspricht, ist bei dem verwendeten Substrat ein Photostrom am Wendepunkt von ca. 800 nA nötig und damit eine Steigung von ca. $4 \mu A/V$ am Wendepunkt. Bei der in Abb. 4.1-6 dargestellten Kennlinie beträgt der Photostrom am Wendepunkt ca. 100 nA und die Steigung ca. 500 nA/V . Damit erzeugt das Schrotrauschen nach Gl. : 11 ein Rauschen in der Oberflächenpotentialmessung von ca. $27,7 \mu V$.

Die Spannungsquelle, mit der die Spannung U_{bias} angelegt wird, um den Photostrom auf den Arbeitspunkt einzustellen, muß sehr rauscharm sein. Aus Kapazitätsmessungen des verwendete Chips Abb. 4.2-2 ergibt sich, daß dieser am Arbeitspunkt der Photostromkennlinie eine Kapazität von ca. 40 nF/cm^2 hat. Die mit dem LAPS frei adressierbare Fläche ($A_{\text{aktiv}} + A_{\text{passiv}}$) sollte sinnvoller Weise mindestens eine Fläche von ca. $0.5 \text{ mm} \cdot 0.5 \text{ mm}$ aufweisen, um genügend Zellen die Möglichkeit zu bieten, auf diesem Bereich zu adhären. Damit hat diese Fläche eine Kapazität von ca. 100 pF . Somit ist die gemäß Gl. : 12 maximal zu tolerierende Schwankung der Spannungsquelle 160 nV bzw. im Mittel $2.2 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ zwischen 27 kHz bis 33 kHz .

$$Gl. : 12 \quad \Delta U_{bias} = \frac{\Delta I}{\omega \cdot C} \quad \Delta I = 3pA \text{ und } \omega = 2 \cdot \pi \cdot 30 \text{ kHz}$$

Der DA Ausgang der eingebauten Meßkarte des Computers weist jedoch eine Rauschamplitude von ca. $1 \mu V/\sqrt{Hz}$ auf. Daher empfiehlt es sich für Potentialmessungen an Zellen eine Batterie als Spannungsquelle zu benutzen.

Der Vorverstärker muß zwei grundlegende Kriterien erfüllen. Zum einen sollte seine obere Abschneidefrequenz über 33 kHz liegen, und zum anderen sollte das äquivalente Rauschen am Eingang nicht größer als die zuvor abgeschätzten $65 \text{ fA}/\sqrt{Hz}$ sein. Ein Vorverstärker, der diese Kriterien erfüllt ist der DLPC-200 (FEMTO, Berlin, Germany). Für diesen Verstärker wird laut Datenblatt bei einer Verstärkung von 10^7 eine obere Abschneidefrequenz (-3 dB) von 45 kHz und ein äquivalentes Eingangsrauschen von $43 \text{ fA}/\sqrt{Hz}$ @ 100 Hz ausgewiesen. Für Messungen mit dem LAPS ist jedoch das äquivalente Eingangsrauschen bei einer Frequenz um 30 kHz maßgebend. Daher wurde dieses nachgemessen und zu $47 \text{ fA}/\sqrt{Hz}$ zwischen 200 Hz und 40 kHz bestimmt. Dies entspricht einem Oberflächenpotentialrauschen von $< 10 \mu V$.

Bei dieser Verstärkung führt der Offset des Photostroms von 100 nA zu einer Ausgangsspannung am Vorverstärker von 1 V p-p.

Der verwendete Lock-In Verstärker hat eine maximale ausgewiesene Dynamik von 100 dB. Bei Messungen des Rauschens am Ausgang des Lock-In Verstärkers betrug dies jedoch ca. $2,6 \text{ mV}_{rms}$ bei einer Zeitkonstante von 30 μs . Die maximale Ausgangsspannung beträgt 10 V. Damit ergibt sich bestenfalls ein Signal zu Offset – Verhältnis von $2,6 \cdot 10^{-4}$. Dies würde bedeuten, daß Signale kleiner als ca. $50 \mu V$ nicht mehr aufgelöst werden können.

Im Folgenden soll der LAPS- Chip an sich betrachtet werden. In der Arbeit von [28] wurde bereits gezeigt, daß die Potentialempfindlichkeit zum einen von der Größe der frei adressierbaren Fläche abhängt, und zum anderen von dem Aufbau des verwendeten Halbleitersubstrats. Dabei wurde gezeigt, daß hoch dotierte Substrate eine gute Potentialauflösung, aber eine schlechte Ortsauflösung haben. Wohingegen sich niedrig dotierte Substrate genau entgegengesetzt verhalten.

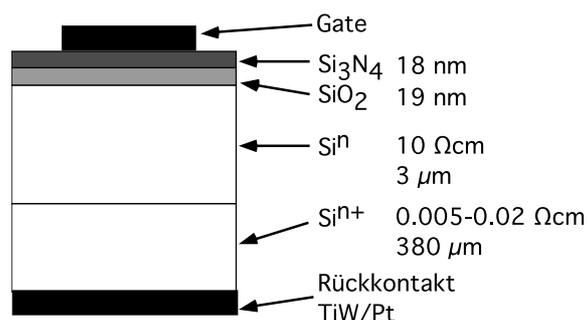


Abb. 4.2-2. Schematischer Aufbau des verwendeten LAPS-Chip.

Um die Vorteile beider miteinander zu vereinen, wurde ein Schichtsubstrat eingeführt, wie es in Abb. 4.2-2 schematisch dargestellt ist. Dieses besteht aus einem sehr hoch dotierten Halbleitersubstrat auf das eine 3 µm dicke Schicht niedrig dotiertes Material epitaktisch aufgewachsen wurde. Damit wird sichergestellt, daß die gesamte eingestrahlte Lichtleistung der verwendeten Lichtquelle (688 nm) innerhalb dieser Schicht absorbiert wird [107]. Führt man an einem solchen Substrat Kapazitätsmessungen durch, so stellt man fest, daß diese nicht nur von der angelegten Vorspannung U_{bias} am Substrat abhängt, sondern auch von der Frequenz, bei der diese Messung durchgeführt wurde [107].

Dieses Phänomen ist mit dem einfachen Ersatzschaltbild, wie es in Abb. 4.1-3 gegeben ist, nicht zu erklären. An der Grenzfläche Si – SiO₂ und im SiO₂ selber existieren jedoch unterschiedliche Ladungen, die für diese Phänomene verantwortlich sind.

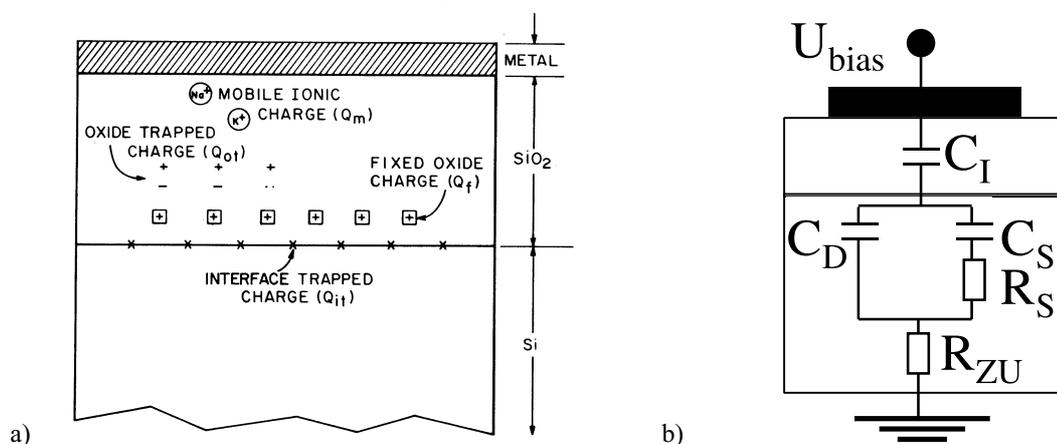


Abb. 4.2-3. a) Ladungen, die mit thermisch gewachsenem SiO₂ auftreten; entnommen aus [107]. b) Ersatzschaltbild für die Berücksichtigung der „Interface trapped charges“.

Bei dieser Betrachtung ist die Grenzschicht zwischen SiO₂ – Si₃N₄ des verwendeten LAPS-Chip nicht berücksichtigt. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich die Impedanzmessungen mit dem in Abb. 4.2-3 b) gegebenen Ersatzschaltbild gut annähern lassen. MOBILE IONIC CHARGES wie OXIDE TRAPPED CHARGES und FIXED OXIDE CHARGES sind von der Herstellung des Oxides abhängig. Sie können nicht durch Anlegen einer Spannung umgeladen werden. INTERFACE TRAPPED CHARGES hingegen können im Gegensatz dazu durch das Anlegen einer Vorspan-

nung umgeladen werden und zeigen eine starke Frequenzabhängigkeit, weshalb sie im Ersatzschaltbild (Abb. 4.2-3 b) durch ein R-C- Glied repräsentiert werden können. Es ist vorstellbar, daß beim Umladen dieser Zustände Energie benötigt wird und somit der Widerstand R_s als realer Widerstand zu betrachten ist, der beim Umladungsprozeß überwunden werden muß. Dann ist R_s ein thermisch rauschender Widerstand, dessen Rauschamplitude gegeben ist durch Gl. : 13.

$$Gl. : 13 \quad i^2 = 4 \cdot k_B \cdot T \cdot G \cdot \Delta f \quad v^2 = 4 \cdot k_B \cdot T \cdot R_s \cdot \Delta f \quad G = 1/R_s$$

Dabei ist $k_B T$ die Rauschleistung, die pro Herz Bandbreite von einem Widerstand im thermischen Gleichgewicht abgegeben wird. Diese Rauschleistung ist bis zu Energien, bei denen die Energie eines Quants hf vergleichbar mit $k_B T$ wird, konstant (weißes Rauschen) [108].

Um die einzelnen Größen der Elemente im Ersatzschaltbild Abb. 4.2-3 b) zu bestimmen, wurden an dem verwendeten Substrat Impedanzmessungen durchgeführt. Dazu wurde ein Impedanzaufbau, bestehend aus einem Stromverstärker (DLPCA 200, FEMTO, Berlin, Germany) und einem Lock-In Verstärker (SRS 830 DSP, Stanford Research Systems, California, USA), aufgebaut.

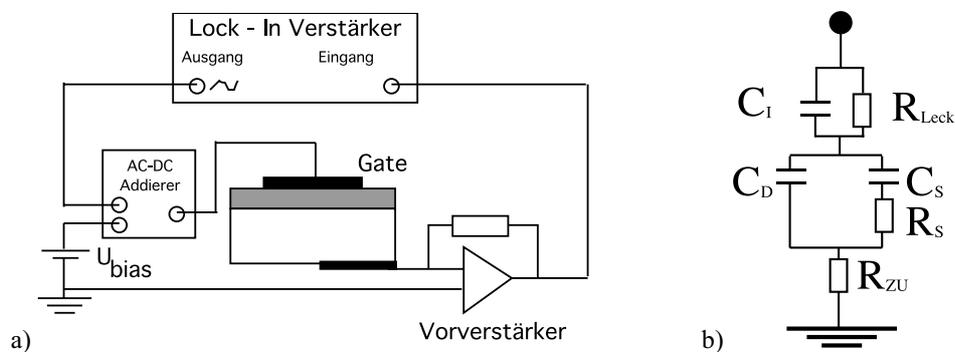


Abb. 4.2-4. a) Schematische Darstellung des Impedanzaufbaus. b) Aufgebaute Ersatzschaltung, um Impedanzmessungen zu testen.

Die automatisierte Aufzeichnung der Daten wurde mit Hilfe des Programms „Labview“ (National Instruments) bewerkstelligt. Die aufgezeichneten Daten wurden mit dem Programm „Igor“ ausgewertet. Um sicher zu stellen, daß die Messungen und anschließenden Auswertungen zu korrekten Ergebnisse führen, wurden unterschiedliche Ersatzschaltungen, wie in Abb. 4.2-4 b) dargestellt, vermessen.

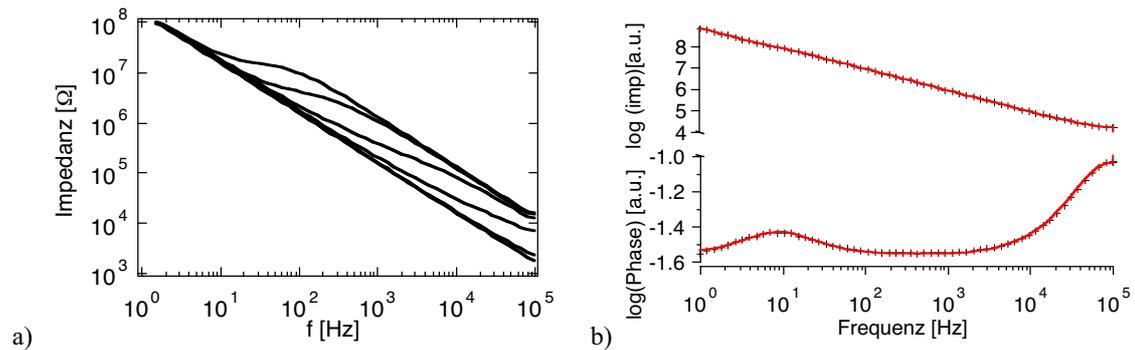


Abb. 4.2-5.¹ a) Messung am LAPS-Chip mit einer Elektrodenfläche von $A = 1\text{mm}^2$ bei unterschiedlichen Vorspannungen U_{bias} . b) Messung an Ersatzschaltung 1. Zur besseren Bestimmung der einzelnen Werte wird nicht nur die Impedanz, sondern auch die Phase aufgezeichnet und angenähert.

Die Ergebnisse von zwei dieser Ersatzschaltungen (aufgebaut aus Metallfilmwiderständen und Kapazitäten) sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Der bei den Messungen abgedeckte Frequenzbereich reicht von 1 Hz bis 100 kHz. Messungen über 100 kHz waren mit dem verwendeten Lock-In-Verstärker nicht möglich, worauf die relativ großen Fehler bei kleinen Zuleitungswiderständen R_{zu} zurückzuführen sind.

	Ersatz 1	Messung von Ersatz 1	Ersatz 2	Messung von Ersatz 2
R_{zu} [Ω]	356 Ω	(857 ± 360) Ω	38 kΩ	(38.0 ± 0.72) kΩ
R_{leck} [Ω]	20 MΩ	(19.9 ± 0.3) MΩ	690 kΩ	(594 ± 223) kΩ
R_{S} [Ω]	20 kΩ	(20.4 ± 0.3) kΩ	690 kΩ	(686 ± 57) kΩ
C_{i} [F]	680 pF	(768 ± 6) pF	1.24 nF	(1.44 ± 0.3) nF
C_{dep} [F]	68 pF	(75 ± 4) pF	66 pF	(70 ± 1.2) pF
C_{S} [F]	220 pF	(174 ± 4) pF	40 pF	(41 ± 1.4) pF

Tabelle 3: Aufgeführt sind die Werte von zwei getesteten Ersatzschaltungen (bezeichnet mit Ersatz1 und Ersatz2) mit den zugehörigen Meßwerten.

Um den verwendeten LAPS-Chip im Impedanzaufbau zu vermessen, wurden sechs unterschiedlich große Gate-Elektroden aus NiCr und Au aufgedampft (Abb. 4.2-4 a). Die Größen betragen 0.125mm^2 , 0.25mm^2 , 0.5mm^2 , 1mm^2 , 2mm^2 , 5mm^2 . Zunächst wurde vor jeder Impedanzmessung eine Charakteristik des Chip aufgenommen, wie sie in Abb. 4.2-6 zu sehen ist. Anschließend wurde im relevanten Bereich

¹ Das Programm zur Aufzeichnung dieser Daten wurde von M. George geschrieben.

die Impedanzmessung durchgeführt. Es hat sich gezeigt, daß der Leckwiderstand R_{leck} nicht meßbar war, weshalb er in allen Auswertungen auf unendlich gesetzt wurde. Die Isolator­kapazität wurde aus den Messwerten bei starker Anreicherung bestimmt. Da alle Parameter in der Ersatzschaltung mit der Fläche skalieren, wurden alle Werte auf eine Einheitsfläche von 1 mm^2 umgerechnet.

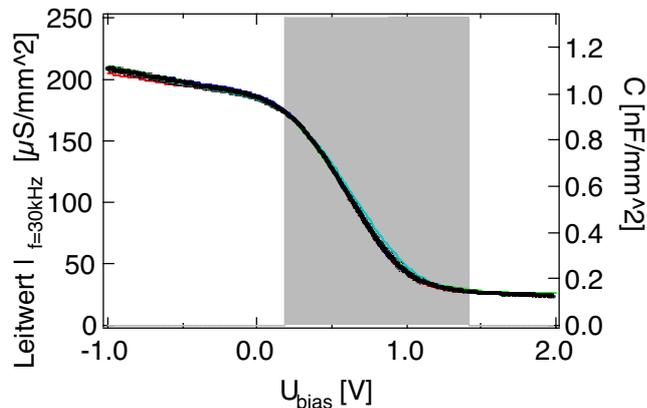


Abb. 4.2-6. Skalierte Leitwerte der Impedanzprobe bei einer Modulationsfrequenz von $f = 30 \text{ kHz}$. Grau markiert ist der Bereich, in dem die Messungen mit der Ersatzschaltung angenähert wurden.

Für die Isolator­kapazität C_i ergibt sich dann ein gemessener Wert von $C_i = (1.129 \pm 0.061) \text{ nF/mm}^2$. Zusätzlich wurden die Isolator­kapazitäten mit Hilfe der Gl. : 14 berechnet, woraus sich eine Isolator­kapazität von $C_i = 1.281 \text{ nF/mm}^2$ ergibt.

Gl. : 14

$$C_i = \frac{1}{\frac{d_{SO}}{A \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{SO}} + \frac{d_{SN}}{A \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{SN}}}$$

Für die Annäherung der anderen Parameter im Ersatzschaltbild wurde jeweils die nach Gl. : 14 berechnete Isolator­kapazität eingesetzt. Alle so erhaltenen Parameter wurden ebenfalls auf eine Gate-Fläche von 1 mm^2 umgerechnet. Die einzelnen Meßwerte sind in Abb. 4.2-7 zu sehen. Aus diesen einzelnen Messungen ($n=6$) wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Der Arbeitspunkt für eine LAPS-Messung würde bei ca. $U_{\text{bias}} = 0.6 \text{ V}$ liegen. Daher sind für eine Rauschanalyse besonders die Werte der Impedanzmessung bei dieser Spannung von Interesse. Diese lassen sich aus den Messungen in Abb. 4.2-7 ablesen ($R_{\text{zu}} = (2.88 \pm 0.56) \text{ k}\Omega/\text{mm}^2$; $R_s = (16.7 \pm 4.3) \text{ k}\Omega/\text{mm}^2$; $C_{\text{dep}} = (1.27 \pm 0.35) \text{ nF/mm}^2$; $C_s = (2.82 \pm 0.34) \text{ nF/mm}^2$).

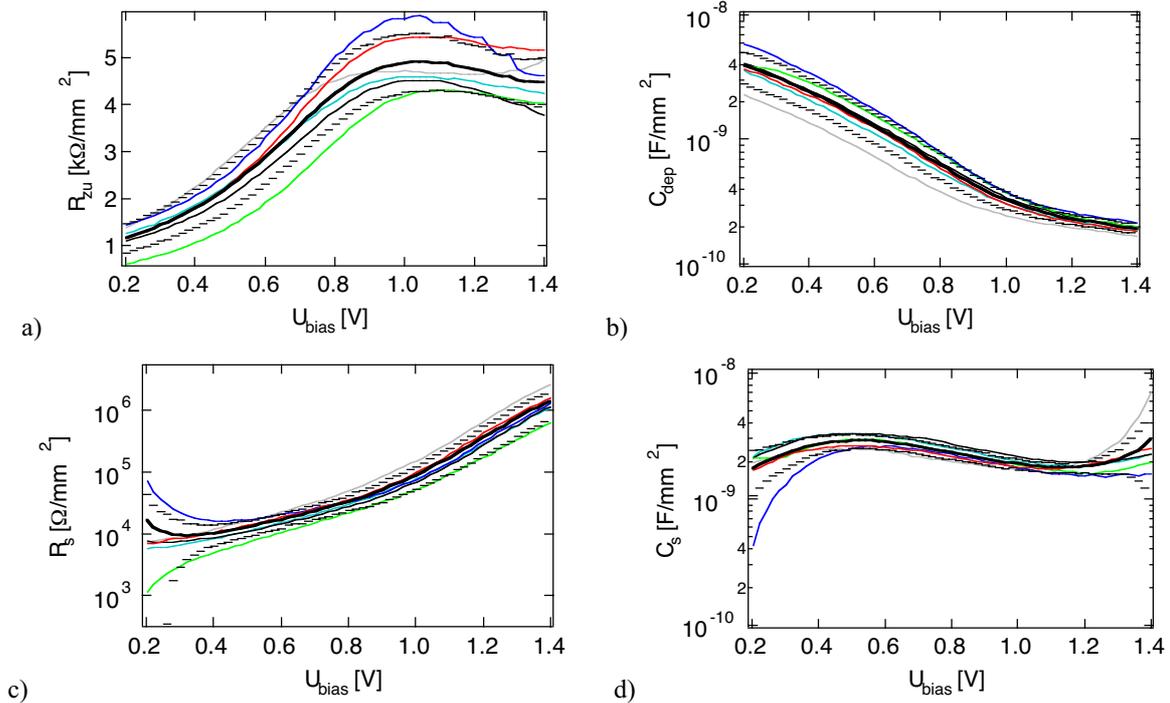


Abb. 4.2-7. Angenäherte und skalierte Werte der Ersatzschaltung für den LAPS-Chip mit unterschiedlich großen Gate-Elektroden. (● 0.125mm², ● 0.25 mm², ● 0.5 mm², ● 1 mm², ● 2 mm², ● 5 mm²).

Mit den so bestimmten Werten kann nun das Rauschen dieser Ersatzschaltung berechnet werden. Dazu wurden zwei getrennte Fälle betrachtet. Einerseits wurde das Rauschen betrachtet, welches durch den Widerstand R_S verursacht wird und andererseits das Rauschen, welches durch den Widerstand R_{ZU} entsteht. Schließlich wurden dann beide Teile addiert, um das Rauschen der Gesamtschaltung zu bestimmen. Zur Berechnung wurde das Spannungsrauschen des Widerstandes R_S und R_{ZU} nach Gl. : 13 berechnet und als externe Spannungsquelle U_N im Ersatzschaltbild angenommen [108]. Danach wurde das Stromrauschen durch den in Abb. 4.2-8 a) mit ② bezeichneten Zweig berechnet. Da der durch Zweig ① fließende Strom nicht zum Photostrom beiträgt, muß dieser nicht berücksichtigt werden. Im Gegensatz dazu müssen in Abb. 4.2-8 b) beide Zweige berücksichtigt werden.

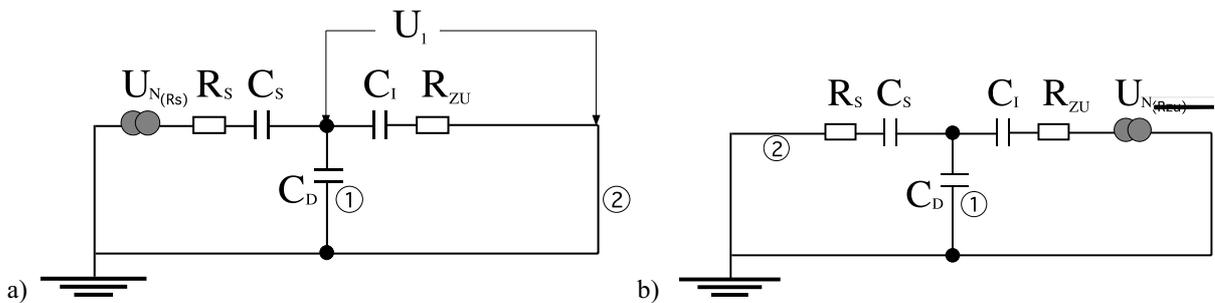


Abb. 4.2-8. Kleinsignalersatzschaltbild zur Berechnung des Stromrauschens a) verursacht durch den Widerstand R_S b) verursacht durch den Widerstand R_{ZU} .

Die einzelnen Teilströme, die durch das Rauschen der Widerstände R_S und R_{ZU} verursacht werden, sind gegeben durch:

$$\begin{aligned}
 \text{Gl. : 15} \quad I_a &= \frac{U_{N(R_S)}}{\left(R_S - \frac{i}{\omega \cdot c_S} \right) \cdot \left(R_Z - \frac{i}{\omega \cdot c_i} \right) \cdot \left(i\omega \cdot c_i + \frac{1}{R_Z - \frac{i}{\omega \cdot c_i}} + \frac{1}{R_S - \frac{i}{\omega \cdot c_S}} \right)} \\
 I_b &= \frac{U_{N(R_{ZU})}}{\frac{1}{\frac{1}{R_S - \frac{i}{\omega \cdot c_S}} + i\omega \cdot c_D} + R_Z - \frac{i}{\omega \cdot c_i}}
 \end{aligned}$$

Das absolute Rauschen der Gesamtschaltung ist dann die Summe der Teilströme. Das durch die Widerstände erzeugte thermische Rauschen wurde für einen LAPS – Chip mit einer Gate-Elektrode von $A = 0,8 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$ berechnet und ist in Abb. 4.2-9 a) dargestellt. Um dies zu bestätigen, wurde das Rauschen des LAPS-Chip direkt gemessen. Zusätzlich wurde eine Ersatzschaltung aufgebaut, die dem LAPS-Chip mit einer Gate-Fläche von $A = 0,8 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$ entspricht und auch deren Rauschen nachgemessen.

Sowohl die Messung an der Ersatzschaltung, wie auch die Messung am LAPS-Chip wiesen annähernd den gleichen Verlauf auf. Das Stromrauschen bei einer Frequenz von $f = 30 \text{ kHz}$ entspricht einem Oberflächenpotentialrauschen von ca. $\Delta u = 600 \text{ nV}_{\text{rms}} / \sqrt{\text{Hz}}$, was einem absoluten Wert von $\Delta U = 46 \text{ } \mu\text{V}_{\text{rms}}$ bei einer Bandbreite von 3 kHz entspricht.

Sämtliche durchgeführten Messungen zur Bestimmung des Rauschens des LAPS-Chip fanden im Dunkeln statt. Somit gelten diese Rauschbetrachtungen nur für den unbeleuchteten Chip. Da bei Potentialmessungen mit dem LAPS an Zellen der Chip jedoch gepulst beleuchtet wird, sind die bestimmten Werte als Abschätzung zu betrachten.

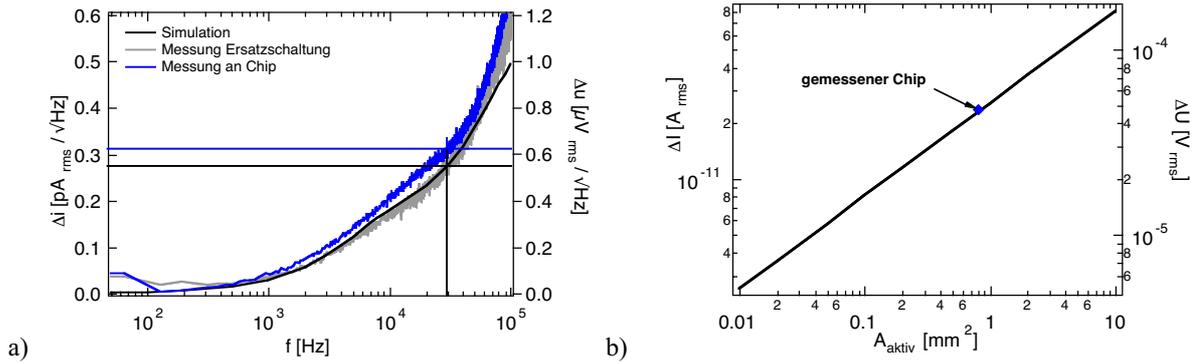


Abb. 4.2-9. a) Blau dargestellt ist das gemessene Stromrauschen des Chip bei einer angelegten Spannung $U_{\text{bias}} = 0,6 \text{ V}$ und einer Gate-Fläche von $0,8 \text{ mm} * 0,8 \text{ mm}$. Grau dargestellt ist die Rauschmessung für die Ersatzschaltung ($C_i = 820 \text{ pF}$; $C_D = 820 \text{ pF}$; $C_S = 1,8 \text{ nF}$; $R_S = 25 \text{ k}\Omega$; $R_{ZU} = 4,5 \text{ k}\Omega$). Schwarz eingezeichnet ist die für die Ersatzschaltung berechnete Rauschamplitude. b) Berechnetes und gemessenes Rauschen des LAPS – Chips in Abhängigkeit der frei adressierbaren Fläche. Dargestellt ist das integrierte Stromrauschen zwischen 27 kHz und 33 kHz und das äquivalente Oberflächenpotentialrauschen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es Rauschquellen gibt, die von der Größe der aktiven Fläche des verwendeten LAPS-Chip abhängen, und solche, die von dieser Fläche unabhängig sind. Unabhängige Rauschquellen sind das Laserrauschen und das Rauschen, welches auf die unzureichende Dynamik des Lock-In-Verstärkers zurückzuführen ist. Ebenso ist das Schrotrauschen von der Größe der adressierbaren Oberfläche unabhängig, da es nur vom Absolutwert des Photostroms abhängt und damit proportional zur mittleren Lichtleistung ist.

4.2.2 Verringerung des Oberflächenpotentialrauschens durch die Kombination des LAPS mit dem Patch-Clamp-Aufbau

Mit diesem kombinierten Aufbau ist es möglich, einzelne neuronale Zellen gezielt mit der Patch-Pipette zu stimulieren und über mehrere einzelne Ereignisse (Aktionspotentiale) mit dem LAPS zu integrieren. Damit kann das Rauschen des Oberflächenpotentials in der LAPS-Messung verringert werden. Um dies zu demonstrieren, wurde ein LAPS-Chip (siehe Abb. 4.2-10) in den Aufbau eingesetzt. Daraufhin wurde eine Kennlinie (Abb. 4.1-6) aufgenommen und U_{bias} auf den Arbeitspunkt (steilster Punkt der Kennlinie) eingestellt.

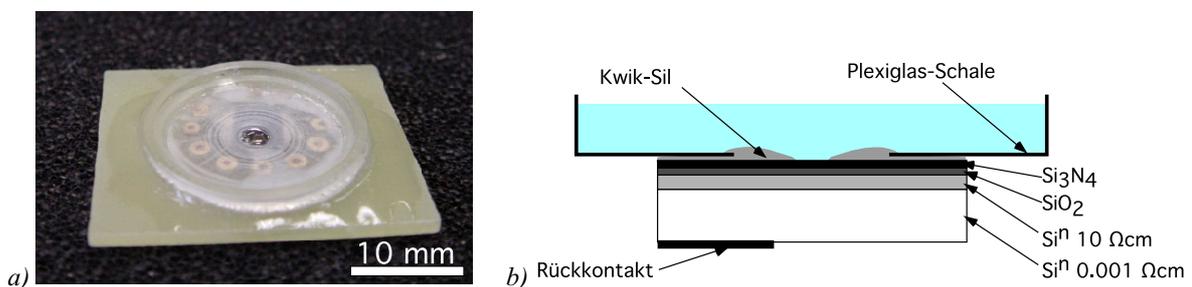


Abb. 4.2-10. a) Aufnahme eines LAPS-Chips. Der Chip besitzt eine Abmessung von ca. 3 mm x 5 mm.. Auf den Chip wird mit einem biokompatiblen Kleber (Kwik-Sil; World Precision Instruments, Inc. USA) eine Plexiglas-Schale geklebt und der aktive Bereich des Chips weiter bis auf ca. 0.22 mm² verringert, um die passive Streukapazität weiter zu verringern. b) Schematische Zeichnung des LAPS-Chips mit Meßkammer.

Mit der Auto-Offset Funktion des Lock-In-Verstärkers wurde der konstante Offset von ca. 100 nA abgezogen und mit dem Computer nur die Änderungen im Photostrom ΔI aufgezeichnet. Dies wurde für verschiedene Integrationszeiten 30 μ s, 100 μ s, 300 μ s, 1 ms bzw. verschiedene Bandbreiten (BW) 3 kHz, 1kHz, 0.3 kHz, 0.1 kHz über eine Sekunde durchgeführt (Abb. 4.2-11 a). Aus den Photostromänderungen ΔI wurde mittels der Kennlinie die Oberflächenpotentialänderung ΔU berechnet.

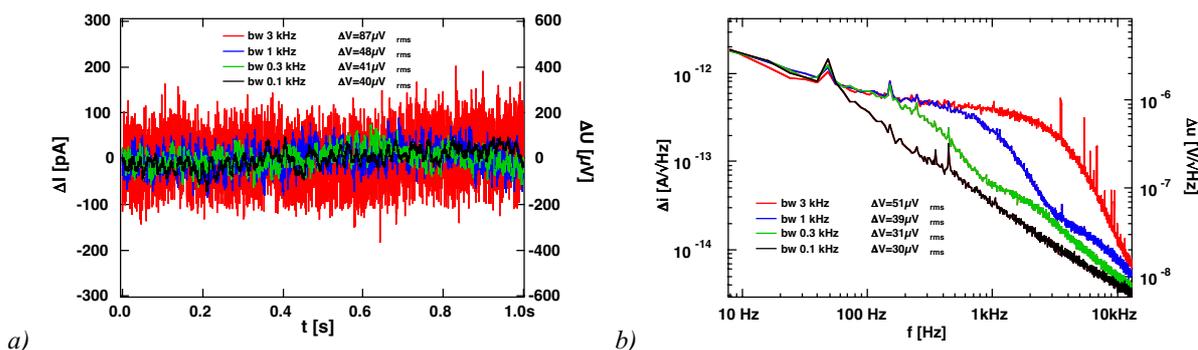


Abb. 4.2-11 Der LAPS wurde auf seinen sensitivsten Punkt $U_{bias} = 0.2 \text{ V}$ $dI/dU = 500 \text{ nA/V}$ eingestellt. a) Zeitverlauf des Meßsignals am Lock-In-Verstärker für verschiedene Integrationszeiten des Lock-In-Verstärkers. Aufgezeichnet mit einer Abtastrate von 100 kHz. Aufgenommen wurden nur Änderungen des Photostroms. Der konstante Offset wurde mit der Auto-Offset-Funktion des Lock-In-Verstärkers abgezogen. b) Spektraler Verlauf des Ausgangssignals am Lock-In-Verstärker. Um das gesamte Spektrale Rauschen zu erhalten, wurde über die Frequenz integriert. Gut zu sehen sind die Grenzfrequenzen für die verschiedenen Integrationszeiten.

Aus den gemessenen Fluktuationen wurde die Standardabweichung berechnet. Zusätzlich wurde ein Rauschspektrum von dem ausgegebenen Signal des Lock-In Verstärkers bei den verschiedenen Integrationszeiten aufgezeichnet (Abb. 4.2-11 b). Aus diesem wurde über Integration der RMS-Wert für das Potentialrauschen bestimmt. Beide Werte (Standardabweichung und RMS-Wert) stimmen gut überein. Um festzustellen, in wie weit sich das Potentialrauschen durch mehrfaches Mitteln verringern läßt, wurde die Änderung des Photostroms ΔI für 65 ms aufgezeichnet. Dies wurde anschließend z.B. $n = 50$ mal durchgeführt und über diese 50 Einzelmessungen gemittelt (Abb. 4.2-12 a). Aus diesen wurde dann die Standardabweichung bestimmt und über n aufgetragen (Abb. 4.2-12 b). Wie zu erwarten sinkt das Rauschen mit $1/\sqrt{n}$, wobei n die Anzahl der Mittelungen ist.

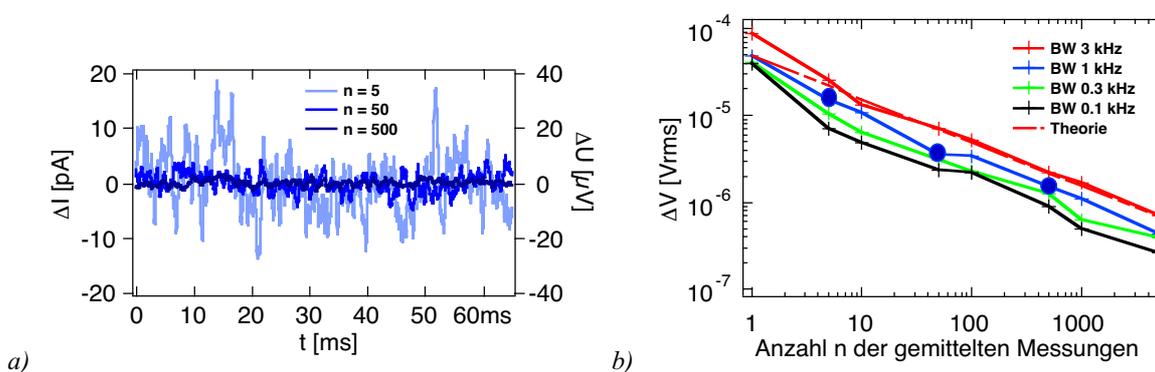


Abb. 4.2-12. a) Gemittelte Oberflächenpotentialänderungen für $n = 5, 50, 500$, bei einer BW von 1 kHz. b) Aus Messungen wie in (a) berechnete Standardabweichungen σ für BW 3 kHz, 1 kHz, 0.3 kHz, 0.1 kHz und verschiedene Anzahlen n der Mittelungen. Die Werte aus Messung (a) sind mit blauen Punkten gekennzeichnet. Rot gestrichelt eingezeichnet ist der theoretisch zu erwartende Verlauf für eine BW von 3 kHz.

Damit besteht jetzt die Möglichkeit, einzelne Zellen mit einer Patch-Pipette zu kontaktieren und gezielt zu stimulieren. Diese Stimulation kann periodisch wiederholt werden und währenddessen das Oberflächenpotential mit dem LAPS gemessen werden. Das gemessene Oberflächenpotential kann anschließend über die Anzahl der periodischen Stimulationen gemittelt werden, wodurch das Rauschen in der Messung um bis zu zwei Größenordnungen verringert werden kann.

4.3 Membranpotentialmessung

Da das Potentialrauschen des LAPS nicht unter einen Wert von ca. 80 μVrms (bei einer Bandbreite BW von 3kHz) zu realisieren war, konnten an den vorhandenen Zellsystemen keine einzelnen Aktionspotentiale gemessen werden. Daher wurde zusätzlich zu dem LAPS-Aufbau ein Patch-Clamp-System hinzugefügt (siehe Abb. 4.1-7). Mit Hilfe dieses Patch-Clamp-Aufbaus ist es möglich, einzelne Zellen gezielt elektrisch zu untersuchen. Dabei wird im Wesentlichen eine mit Elektrolyt gefüllte Glaspipette, welche an ihrem vorderen Ende eine Öffnung mit einer Größe von ca. 1 μm aufweist, an die zu vermessende Zelle herangefahren. Durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks an die Glaspipette wird die Zellmembran ein wenig in diese eingesaugt und schließlich aufgerissen. Die Zellmembran bildet dann einen dichten Abschluß mit der Pipette. Sowohl im Elektrolyten in der Meßkammer, wie auch im Inneren der Patch-Pipette befindet sich eine Ag/AgCl-Elektrode, die mit einem sogenannten Patch-Verstärker verbunden sind.

Damit ist ein elektrischer Zugriff ins Innere der Zelle hergestellt. Somit besteht nun die Möglichkeit, die Zellen mit dem Patch-Clamp-Aufbau elektrisch zu reizen und gezielt ein Aktionspotential auszulösen. Das resultierende extrazelluläre Membranpotential kann dann mit dem LAPS gemessen werden. Die Anregung der Zelle kann periodisch wiederholt werden, so daß es möglich ist über mehrere mit dem LAPS gemessene Aktionspotentiale das Mittel zu bilden.

4.3.1 Potentialmessungen mit dem Patch-Clamp-Aufbau¹

Der schematische Aufbau ist in Abb. 4.1-7 dargestellt. Dieser Aufbau besteht aus einem Mikroskop (Axiotech, Zeiss), um die Zelle zu beobachten und die Pipette gezielt mit einem Mikromanipulator (Mini 25, Lugis & Neumann) an diese annähern zu können. Zur Stimulation der Zelle und zum Messen des Pipettenstroms bzw. des Membranpotentials wurde ein Verstärker (EPC-7, List-Elektronik) verwendet, der über einen zusätzlichen Vorverstärker, welcher direkt auf dem Mikromanipulator angebracht ist und die Patch-Pipette aufnimmt, verbunden ist. Da der zuvor beschriebene dichte Abschluß („seal“) zwischen Zelle und Pipette bei der geringsten Erschütterung abrei-

¹ Der in diesem Kapitel verwendete Patch-Clamp-Aufbau wurde in Zusammenarbeit mit M. George realisiert. Das Programm zum Aufzeichnen dieser Daten wurde von M. George geschrieben.

ßen würde, befindet sich der gesamte Aufbau auf einem schwingungsgedämpften Tisch (I-2000 Serie, Newport).

Da eine genaue Beschreibung zum prinzipiellen Vorgehen bei Patch-Clamp-Messungen in [28, 109] gegeben ist, soll hier nur noch einmal auf die wesentlichen Schritte eingegangen werden.

Zunächst wird das Kulturmedium durch die extrazelluläre Elektrolytlösung ersetzt. Anschließend werden Glaspipetten (Clark Electromedical Instruments GC150F-10) in einem Pipetten-Zieher (Narishge PP83, Japan) gezogen. Diese müssen direkt vor jeder Messung neu hergestellt werden, da ansonsten die Spitzen verschmutzen und somit kein dichter Kontakt zwischen Zelle und Pipette (seal) zustande kommt. Für die verwendeten Zellen N1E-115 (mouse neuroblastome Zellen) [110, 111] haben sich Pipetten mit einem Widerstand von ca. 6 M Ω als optimal herausgestellt. Diese haben dann eine Öffnung von ca. 1 μm [28]. Die Glas-Pipetten werden aus einem Glasröhrchen gezogen. Das Glasröhrchen wird durch eine elektrisch betriebene Heizwendel in der Mitte geschmolzen, und gleichzeitig die beiden Enden auseinander gezogen. Durch das Einstellen des Heizstroms kann die Länge des Schafts und die Größe der Öffnung der Pipette eingestellt werden. Bei jedem Ziehvorgang erhält man zwei identische Pipetten. Es haben sich für die zwei Ziehschritte die Einstellungen No1: 13,8 Skt und No2: 9,0 Skt am Pipetten-Zieher als optimal herausgestellt.

Die frisch gezogene Pipette wird mit intrazellulärer Elektrolytlösung (siehe Anhang) gefüllt und sogleich auf den Vorverstärker montiert. Über einen Schlauch und eine Spritze wird ein leichter Überdruck in der Pipette aufgebaut, was zur Folge hat, daß Elektrolyt ausströmt. Dadurch wird verhindert, daß die Pipette zu schnell verschmutzt. Diese wird dann mit Hilfe des Mikromanipulators in die extrazelluläre Lösung mit den Zellen gefahren und unter dem Mikroskopobjektiv in unmittelbarer Nähe einer zuvor ausgewählten Zelle positioniert. Mit dem Computer werden über den Patch-Verstärker kleine Spannungspulse angelegt (< 10 mV) und der resultierende Strom aufgezeichnet. Das hierfür geschriebene Programm berechnet daraus automatisch den Widerstand der Pipette. Diese wird jetzt an die Zelle angenähert. Befindet sich die Pipettenspitze direkt an der Zelle, so wird die Zellmembran durch die auströmende Elektrolytlösung leicht eingedrückt, was gut im Mikroskop zu sehen ist. Gleichzeitig steigt der Pipettenwiderstand um ca. 10% an. Jetzt wird der Überdruck von der Pipette entfernt und die Zellmembran relaxiert und nähert sich zusätzlich an

die Pipettenspitze an, was ein weiteres Ansteigen des Pipettenwiderstandes zur Folge hat. Durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette wird die Membran ein kleines Stück in diese hineingezogen, wodurch der dichte Abschluß zwischen Zelle und Pipette (seal) geformt wird. Dies kann zusätzlich dadurch unterstützt werden, daß an die Pipette ein Haltepotential $U_{MH} \approx -70$ mV angelegt wird. Dadurch sollte der Widerstand auf mehrere Gigaohm ansteigen, weshalb der Seal auch „Gigaseal“ genannt wird.

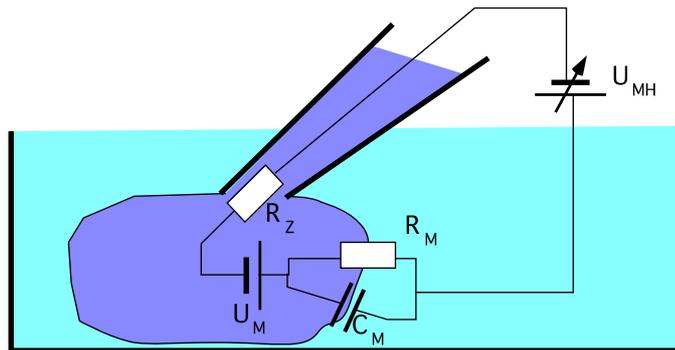


Abb. 4.3-1 Erstschalbild für eine Zelle, die mit einer Patch-Pipette elektrisch kontaktiert wurde.

Durch das Anlegen eines kurzen, aber starken Unterdrucks wird die Zellmembran in der Pipette aufgebrochen und es entsteht die sogenannte Ganzzell-Ableitung. Es besteht jetzt ein direkter Zugang zum Inneren der Zelle. Das Haltepotential U_{MH} sollte so gewählt sein, daß es dem Ruhepotential der Zelle entspricht. Aufgrund der kleinen Spannungspulse fließt jeweils beim Ein- und Ausschalten von diesem ein kapazitiver Strom, der exponentiell abklingt (Abb. 4.3-2). Aus einer solchen Messung lassen sich bereits drei wesentliche Werte berechnen [112]. Zum einen der Zugriffswiderstand R_Z , und zum anderen der Leck- bzw. Membranwiderstand R_M und die Membrankapazität C_M . Um ein möglichst unverraushtes Meßsignal zu erhalten, werden die in Abb. 4.3-2 dargestellten Meßkurven immer n-mal durchfahren und über die einzelnen Messungen gemittelt.

$$Gl. : 16 \quad R_Z = \Delta U_M / I_{M(0)}; \quad R_M = \Delta U_M / I_{M(\infty)}; \quad C_M = \tau_M \cdot (1 / R_Z + 1 / R_M)$$

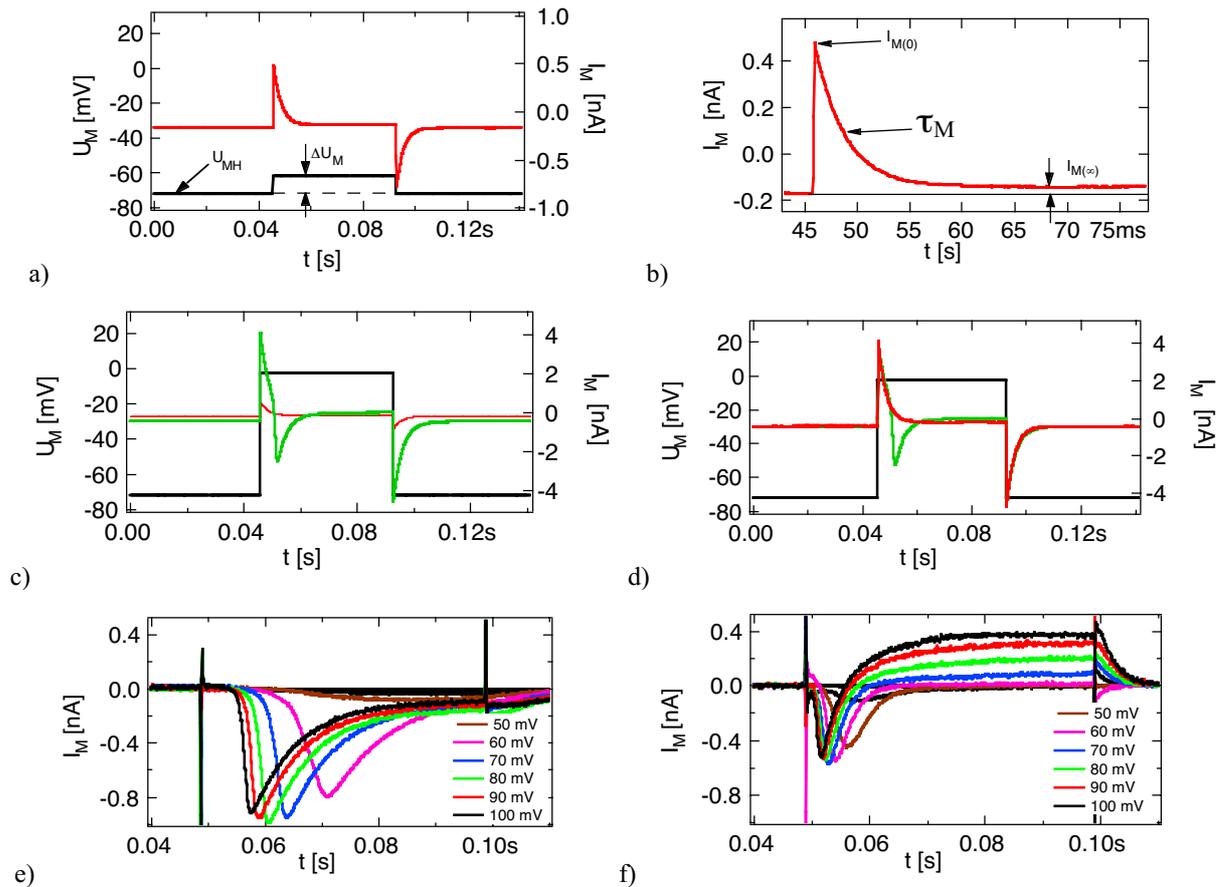


Abb. 4.3-2. Patch-Clamp-Messungen im Modus der Spannungs-klemme (VC). Um ein möglichst rauscharmes Signal zu erhalten, wurde jeweils über $n=13$ Zyklen gemittelt, Aufzeichnungsrate 20 kHz, gefiltert LP 3 kHz. a) Angelegtes Potential an der Pipette $U_{M(t)}$ (schwarz) und gemessener Pipettenstrom $I_{M(t)}$ (rot). Es sind nur passive Ströme zu messen. b) Detailausschnitt aus (a) $I_{M(0)}$ kennzeichnet den rein Ohmschen Stromfluß zum Zeitpunkt des Einschaltens des Testpotentials. $I_{M(\infty)}$ kennzeichnet den passiven Leckstrom und τ_M die Zeitkonstante für das Abklingen des kapazitiven Stroms. c) Bei einem angelegten Spannungspuls von 70 mV treten zusätzlich zu den rein kapazitiven Strömen auch noch aktive Ströme auf (grün). d) Um die passiven Anteile aus der Messung herausrechnen zu können, werden die passiven Ströme in diesem Fall um den Faktor 7 skaliert und anschließend von der grünen Kurve subtrahiert. e) Gemessene aktive Ströme einer N1E-115 Zelle. Erst ab einer Depolarisation von 50 - 60 mV treten aktive Na^+ -Einwärts-Ströme auf. Um die Na^+ -Einwärts-Ströme besser sichtbar zu machen, wurden die K^+ -Auswärts-Ströme durch die Substitution von KCl durch CsCl in der intrazelluläre Lösung geblockt (Verwendung von Intrazellulär CsCl-BAPTA-Lösung siehe Anhang). f) Gemessene aktive Ströme einer N1E-115 Zelle. Hier sind sowohl Na^+ -Einwärts-, wie auch K^+ -Auswärts-Ströme sichtbar (K^+ -Kanäle nicht geblockt KCl-BAPTA-Lösung).

Die angelegten, depolarisierenden Spannungspulse ΔU_M werden nun schrittweise von 10 mV auf 100 mV erhöht. Dadurch erhöhen sich zum einen die kapazitiven Ladeströme, zum anderen treten zusätzlich aktive Ströme auf (Abb. 4.3-2 (b)). Um die rein aktive Stromantwort der Zelle auf den Depolarisationspuls zu erhalten (Abb. 4.1-6 (e) und (f)), müssen die passiven Anteile noch abgezogen werden. Dazu wird die gemessene Stromantwort auf den 10 mV Depolarisationspuls aus Messung (a) z. B. mit dem Faktor 7 skaliert und von der Stromantwort aus Messung (c) subtrahiert (siehe (d)), da diese mit einem Depolarisationspuls von 70 mV gemessen wurde. Dies wird für alle Messungen mit den entsprechenden Skalierungsfaktoren durchge-

führt, so daß man letztendlich jeweils nur die aktiven Stromanteile erhält (e) und (f) [113].

Die eben beschriebene Art, eine Zelle mit der Patch-Pipette anzuregen, wird Spannungsklemme (**Voltage-Clemp VC**) genannt, da der Zelle in diesem Fall jeweils eine feste Spannung U_M aufgeprägt und der Strom I_M gemessen wird. Es ist aber auch möglich, in die Zelle einen festen Strom I_M einzuprägen und das daraus resultierende Membranpotential U_M der Zelle zu messen. Diese Methode wird dann Stromklemme genannt (**Current-Clemp CC**). Dabei wird das Haltepotential U_H über einen der Zelle fest aufgeprägten Stromfluß eingestellt. Dieser wird wiederum so gewählt, das U_H ca. dem Ruhepotential der Zelle entspricht.

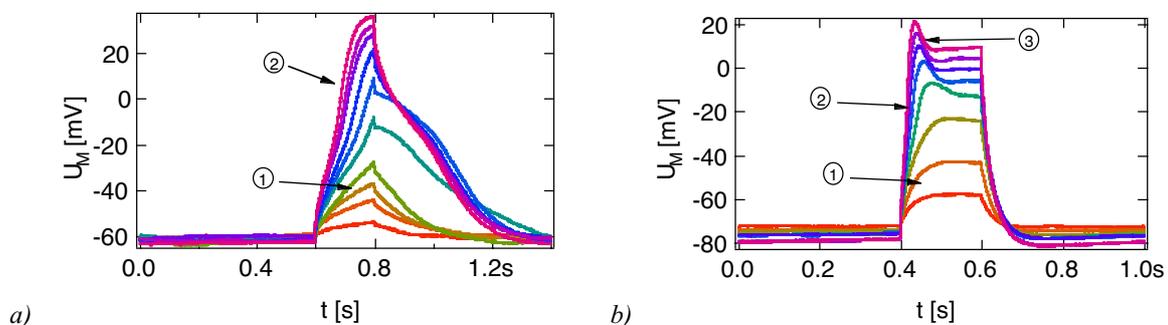


Abb. 4.3-3. Patch-Clamp Messungen im Modus der Stromklemme (CC) an N1E-115 Zellen. Es wurde über jeweils 13 Einzelmessungen gemittelt. Angeregt wurde über eine Zeitdauer von 0.2 s. Aufzeichnungsrate 20 kHz, gefiltert LP 3 kHz. a) In der intrazellulären Elektrolytlösung wurde KCl durch CsCl substituiert (Verwendung von Intrazellulär CsCl-BAPTA-Lösung). Angelegte Strompulse von 10 pA, 20 pA, ..., 100 pA. b) In der intrazellulären Elektrolytlösung befindet sich KCl (Verwendung von Intrazellulär KCl-BAPTA-Lösung). Angelegte Strompulse von 25 pA, 50 pA, ..., 200 pA.

In Abb. 4.3-3 sind zwei Messungen in der Stromklemme dargestellt. In (a) wurde KCl durch CsCl in der intrazellulären Elektrolytlösung substituiert und in (b) nicht. In beiden Fällen öffnen ab einem Membranpotential von ca. -20 mV die Na-Kanäle und erzeugen einen aktiven Na^+ -Einwärtsstrom ②, was in einem zusätzlichem Anstieg des Membranpotentials U_M zu sehen ist. Bleibt dagegen der Maximalwert des Membranpotentials U_M unter -20 mV, so sind die aufgezeichneten Kurven von rein passiver Natur ①. Im Fall von Messung (b) treten zusätzlich zu den Na-Strömen auch K^+ -Auswärtsströme ③ auf. Dies äußert sich in einem Abfall des Membranpotentials. In Messung (a) erscheinen diese nicht, da hier diese Kanäle durch die Substitution des KCl durch CsCl blockiert worden sind.

4.3.2 Reaktion von Zellen auf periodische Stimulation

Es ist nicht möglich, elektrisch aktive Zellen beliebig oft und beliebig lange mit einem Patch-Clamp-Aufbau zu stimulieren. Das hat mehrere Gründe. Zum einen ist das Volumen des externen Elektrolyten auf ca. 1 ml begrenzt, da die Kulturschale, in der die Zellen auf dem LAPS-Chip wachsen (Abb. 4.2-10 a) sehr klein ist. Dies hat zur Folge, daß bei dem hier realisierten Aufbau sich durch Verdampfen die Molaritäten im Elektrolyten im Laufe der Zeit verändern und die Zellen sterben. Um dies zu verhindern müsste eine zusätzliche Perfusion aufgebaut werden.

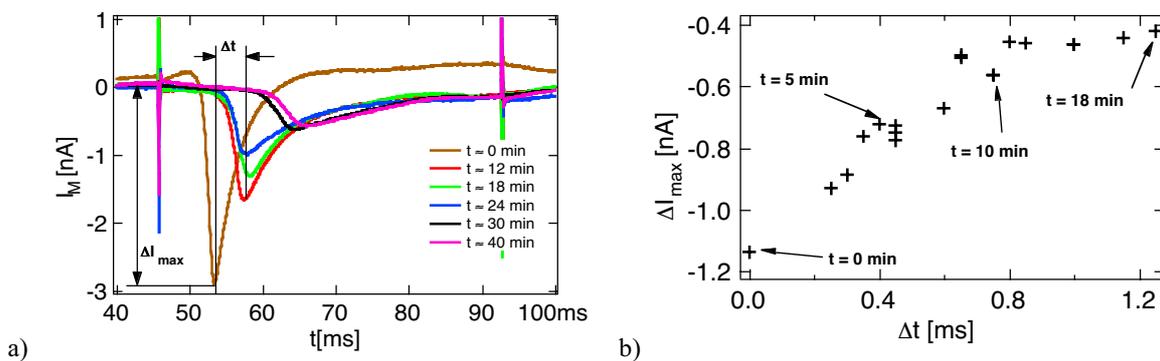


Abb. 4.3-4. Na^+ -Ströme bei einer Depolarisation von 70 mV, gemessen an N1E-115-Zellen, Einleserate 20 kHz, gefiltert LP 3 kHz. a) In der intrazelluläre Elektrolytlösung wurde KCl durch CsCl substituiert. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Zellen kontinuierlich stimuliert. Jede einzelne Messung besteht aus $n = 13$ Mittelungen. b) Es wurde die gleiche Messung wie in (a) durchgeführt, nur hat die intrazelluläre Elektrolytlösung KCl enthalten. Aufgetragen wurde der maximale Na^+ -Einwärtsstrom ΔI_{\max} über der Zeitverzögerung gegenüber der ersten Messung Δt . Die einzelnen Messungen wurden in einem Abstand von $t = 1$ min durchgeführt. In dieser Minute wurde die Zelle kontinuierlich mit einer Amplitude von 70 mV depolarisiert, wie in Abb. 4.3-2 (c). Das bedeutet, daß die Zelle zwischen jeder Messung 400 mal depolarisiert wurde.

Zum anderen ist der „seal“ zwischen Pipette und Zelle sehr instabil, so daß kleinste Erschütterungen oder ein Driften der Pipette, zu einer Zerstörung dieses „seals“ führen. Letztlich bedeutet das Aufreißen der Zellmembran mit der Patch-Pipette zur Herstellung einer Ganz-Zell-Ableitung natürlich einen starken Eingriff in die Zelle. Durch die Öffnung der Zelle findet ein Austausch zwischen dem Cytoplasma und dem Elektrolyten in der Patch-Pipette statt. Weiterhin hatten die hier verwendeten N1E-115 Zellen die Tendenz den Zugang über die Pipette wieder zu schließen. Dadurch erhöhte sich der Zugriffswiderstand R_Z stark, was eine Ursache für das späte einsetzen der Na^+ - Einwärtsströme und der starken Abnahme deren Amplitude in Abb. 4.3-4 ist.

Auch ohne Erhöhung des Zugriffswiderstandes R_Z hat sich gezeigt, daß bei langen Stimulationszeiten die Na^+ - Ströme immer später auftreten. In Abb. 4.3-4 (b) wurde

die Abschwächung der Na^+ - Einwärtsströme ΔI_{\max} über die Zeitverzögerung Δt gegenüber der ersten Messung aufgetragen (siehe Abb. 4.3-4 (a)). Zwischen den einzelnen Messungen liegt ein Zeitintervall von 1 min. Während dieser Zeit wurde die Zelle so wie in Abb. 4.3-2 (c) zu sehen ist 400 mal mit 70 mV depolarisiert. Die zeitliche Verzögerung der Na^+ - Einwärtsströme bei Verwendung von intrazellulärer KCl-Lösung beträgt nach 18 min 1.25 ms. Somit besteht nicht die Möglichkeit, beliebig lange an einer Zelle zu messen.

4.3.3 Aufzeichnung von extrazellulären Aktionspotentialen mit dem LAPS¹

Um ein möglichst großes extrazelluläres Signal zu erhalten, ist es nötig, den Abstand zwischen Zelle und LAPS-Chip möglichst klein zu halten [27, 100]. Daher wurden vor dem Aussiedeln von Zellen die Chips mit Poly-d-Lysine (Sigma P1024) beschichtet (siehe Anhang). Die Messungen wurden 48 h nach dem Aussiedeln von den N1E-115-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die zu untersuchende Zelle mit Hilfe des optischen Mikroskops ausgesucht und der Laser auf diese fokussiert. Daraufhin wurde vor jeder Messung eine Photostrom-Spannungs-Charakteristik (Abb. 4.1-6) aufgenommen, um eine spätere Umrechnung des Photostroms auf das Oberflächenpotential vornehmen zu können. Anschließend wurde die ausgewählte Zelle im Ganzzell-Modus mit der Patch-Pipette kontaktiert (siehe Kap 4.3.1) und eine Messung wie in Abb. 4.3-2 dargestellt durchgeführt, um sicher zu stellen, daß der Kontakt zwischen Zelle und Pipette (Seal) einen Widerstand von mehr als einem Gohm hatte.

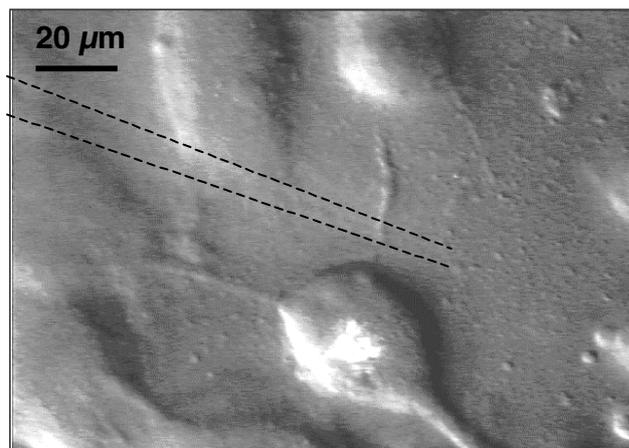


Abb. 4.3-5 Lichtmikroskopische Aufnahme einer N1E-115-Zelle direkt vor dem Patchen. Der helle Bereich auf der Zelle ist der Lichtpunkt des Lasers. Andeutungsweise ist auch die Pipette zu erkennen, die zur Verdeutlichung noch mal hervorgehoben wurde.

Daraufhin wurde eine Messung mit dem LAPS durchgeführt. In Abb. 4.3-5 ist eine N1E-115-Zelle gezeigt, bevor an dieser eine solche Messung durchgeführt wurde. Der fokussierte Laser ist als heller Bereich auf der Zelle zu sehen. Um die Meßzeit möglichst kurz zu halten, ist es nicht möglich eine Spannungsreihe wie in Abb. 4.3-2 (e) bzw. (f) durchzuführen. Stattdessen wurde eine feste Depolarisationsspannung in der Spannungsklemme (VC-Modus) gewählt, und nur für diese die Messung durch-

¹ Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt wurden in [114] zur Veröffentlichung eingereicht.

geführt. In Abb. 4.3-6 sind drei derartige Messungen dargestellt. Dabei wurde in Messung (1) noch unterschwellig mit Pulsen von $\Delta U_M = 50$ mV depolarisiert (a1). In der Patch-Clamp-Messung (b1) sind gut die passiven Ströme zu sehen, die durch die Kapazität der Membran zustande kommen.

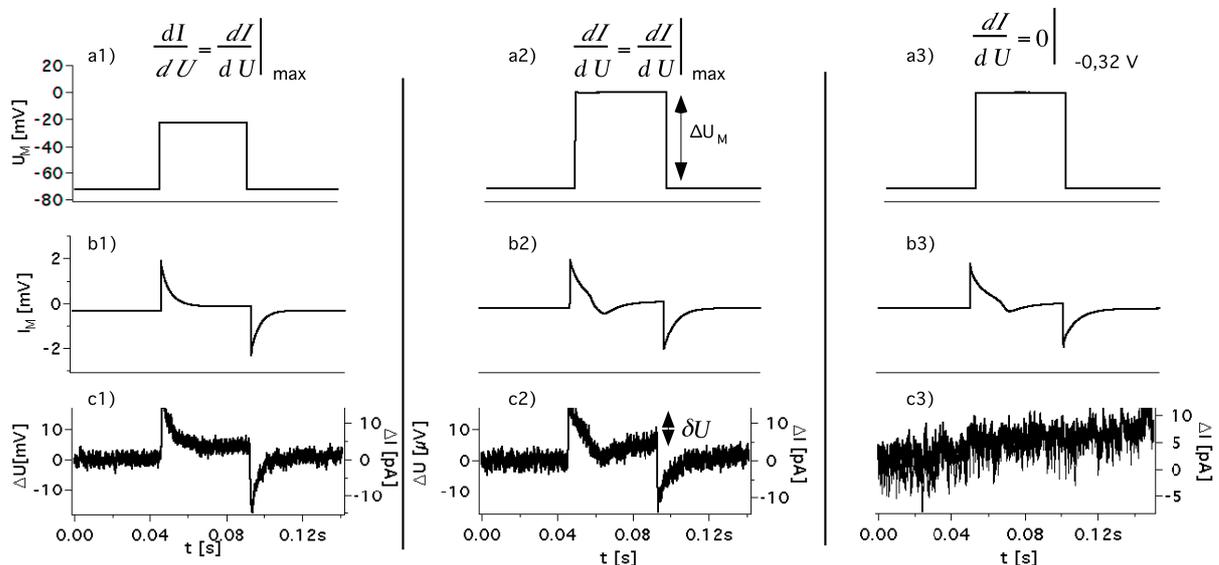


Abb. 4.3-6 Simultane Patch-Clamp- und LAPS-Messung. Bei dieser Messung wurde eine CsCl-BAPTA-Lösung verwendet. Die Daten wurden mit einer Rate von 20 kHz eingelesen. Jede Messung (1, 2, 3) wurde über ca. 2130 einzelne Messungen gemittelt. Es sind hier drei Einzelmessungen dargestellt, die in Spalten angeordnet und mit 1, 2, 3 gekennzeichnet sind. In der oberen Reihe (a) ist jeweils das Membranpotential U_M dargestellt, in der mittleren Reihe (b) der Membranstrom I_M und in der unteren Reihe (c) das mit dem LAPS gemessene Oberflächenpotential ΔU bzw. der Photostrom ΔI . In der ersten Messung (1) wurde die Zelle mit 50 mV depolarisiert. Es sind nur passive Ströme zu messen (b1), die auch eine Änderung im Oberflächenpotential erzeugen (c1). Bei der zweiten Messung (2) wurde die Zelle überschwellig mit 70 mV depolarisiert. Deutlich treten Na^+ -Einwärtsströme auf (b2), die sich ebenfalls in einer Änderung des Oberflächenpotentials widerspiegeln (c2). Kontrollmessung (3) durchgeführt. Vorspannung auf $U_{\text{bias}} = -0.32$ V eingestellt. Hier ist die Photostromkennlinie Abb. 4.1-6 flach. In diesem Fall darf eine Änderung im Oberflächenpotential zu keinem Meßsignal im Photostrom führen. Da in diesem Fall keine Umrechnung vom Photostrom auf das Oberflächenpotential möglich ist, kann hier (c3) nur die Änderung im Photostrom angegeben werden.

Dieser Stromfluß erzeugt eine Änderung des Oberflächenpotentials und konnte mit dem LAPS gemessen werden (c1). Die Kennlinie hatte in diesem Fall eine maximale Steigung von 830 nA/V bei $U_{\text{bias}} = 0.2$ V. Im Fall der Zweiten Messung wurde die Depolarisation ΔU_M auf 70 mV erhöht (a2). Deutlich zu erkennen sind die aktiven Na^+ -Einwärtsströme in der Patch-Clamp-Messung (b2). Auch in dem mit dem LAPS aufgezeichneten Signal erzeugen diese eine deutliche Veränderung des Oberflächenpotentials (c2). Um sicher zu stellen, daß die gemessene Oberflächenpotentialänderung tatsächlich durch die Zelle verursacht wird, wurde eine Kontrollmessung (3) durchgeführt. Dazu wurde die Vorspannung auf einen Wert eingestellt ($U_{\text{bias}} = -0.32$ V) an dem die Photostromkennlinie (Abb. 4.1-6) flach ist. In diesem Fall darf eine Änderung im Oberflächenpotential zu keinem Meßsignal im Photostrom führen, was in

Messung (c3) gut zu sehen ist. Dagegen ist die Messung über die Patch-Clamp-Pipette nahezu unverändert (b3). Deutlich zu erkennen ist auch hier, daß die gemessene Na^+ -Einwärtsströme, in Messung (b3), im Vergleich zur Messung (b2) bereits merklich kleiner und später auftreten.

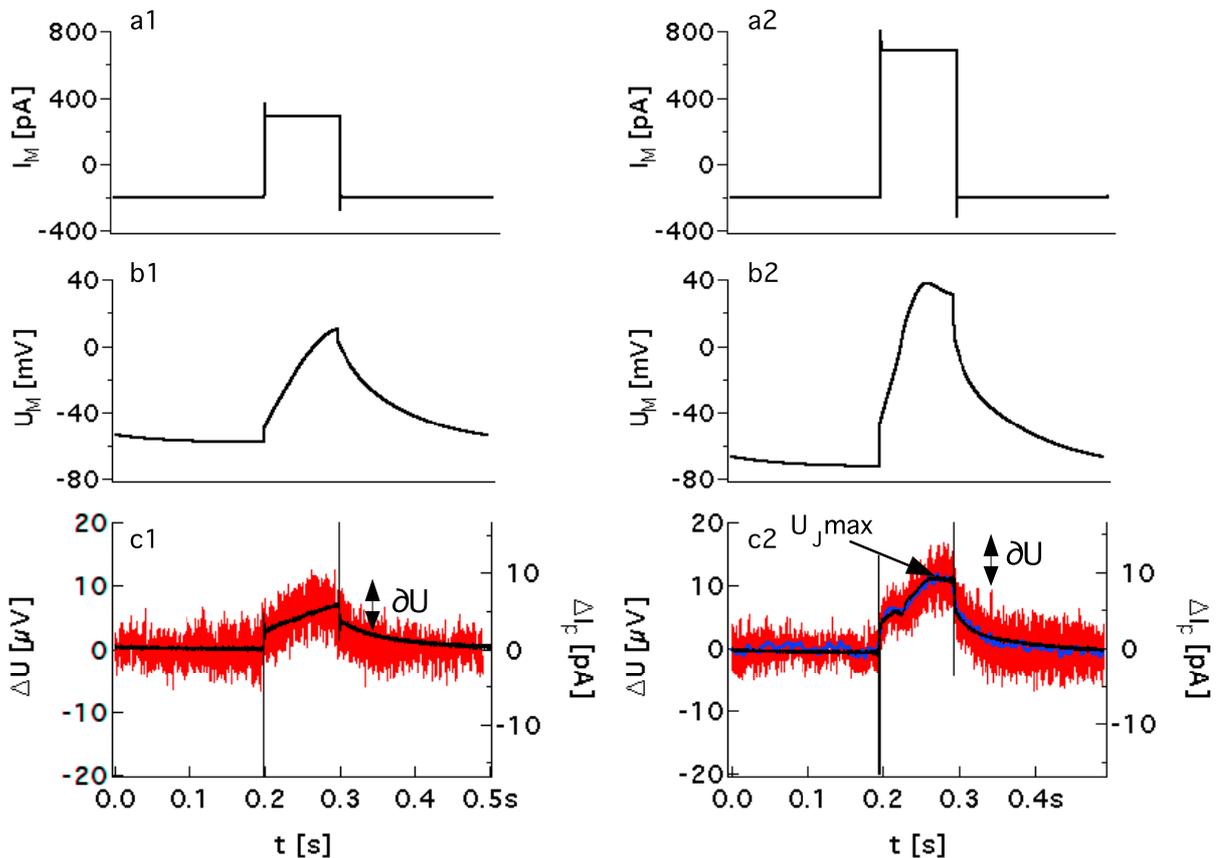


Abb. 4.3-7. Patch-Clamp- und LAPS-Messungen im CC-Modus an einer N1E-115-Zelle. Gemittelt wurde über jeweils 612 Einzelmessungen. Die Samplingrate betrug 20 kHz. Messung (1) Anregung mit 500 pA. Messung (2) Anregung mit 800 pA. LAPS Messung (c1) und (c2) mit einer Integrationszeit $\tau = 100 \mu\text{s}$. Die schwarzen Kurven sind die nach Gl. 4.3-4 simulierten, extrazellulären Aktionspotentiale. In (c2) ist zusätzlich das gemessene Aktionspotential mit einem 100 Hz LP Filter gefiltert (blau) und mit der in Kap. 2.2.2 eingeführten Theorie angenähert worden (schwarz).

Um nicht nur die passiven Ströme in der Spannungsklemme und die Na^+ -Einwärtsströme im extrazellulären Potential zu sehen, wurden auch Messungen in der Stromklemme (CC-Modus) an N1E-115 Zellen durchgeführt (Abb. 4.3-7). Für diese Messungen wurde die KCl-BAPTA-Lösung verwendet, um gezielt Aktionspotentiale auslösen zu können. Weiterhin wurde ebenso vorgegangen wie in der zuvor beschriebenen Messung. Um eine charakteristische Struktur feststellen zu können, wurde über 612 Einzelmessungen gemittelt. In der in Abb. 4.3-7 dargestellten Messung wurde zunächst mit einem Strom von $I_M = 500 \text{ pA}$ (a1) angeregt. Dadurch konnte noch kein aktives Aktionspotential ausgelöst werden (b1). Im Gegensatz dazu wurde durch eine

Anregung mit $I_M = 800 \text{ pA}$ (a2) ein deutlich erkennbares Aktionspotential ausgelöst (b2). Auch die Aufzeichnungen des extrazellulären Potentials (c1, c2) unterscheiden sich voneinander. In (c2) ist das extrazelluläre Aktionspotential zu sehen.

Die extrazellulären Aktionspotentiale der in Abb. 4.3-7 gezeigten Messung wurden zusätzlich theoretisch angenähert. Dazu wurde die in Kap. 2.2.2 eingeführte Theorie (Gl. : 4) verwendet. Um Aussagen über den Abstand zwischen Zelle und Substrat machen zu können, wird folgende Beziehung für den Widerstand R_J verwendet [35].

$$\text{Gl. : 17} \quad R_J = \frac{\rho_J}{K \cdot d_J} \quad \text{wobei} \quad K = 5\pi, \dots, 8\pi$$

Wobei ρ_J die Leitfähigkeit des Elektrolyten und d_J der Abstand zwischen Zelle und Substrat ist. K ist ein Umrechnungsfaktor, der aus dem Vergleich zwischen Punktkontakt- und dem Plattenkontaktmodell kommt. Eine genauere Herleitung dieser Beziehung ist in [24, 100] zu finden. Die beste Übereinstimmung zwischen beiden Modellen erhält man für $K = 8\pi$ [100]. Dieser Wert wurde auch für die Berechnung des Abstands zwischen Zelle und Substrat d_J verwendet.

Für die Simulationen wurde $A_{\text{opt}} = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$ aus mikroskopischen Aufnahmen, wie in Abb. 4.3-5, bestimmt. Die gesamte Oberfläche der Zellmembran wurde mit $A_{\text{JM}} + A_{\text{FM}} \approx 3 \cdot A_{\text{opt}}$ festgelegt. Wesentlich schwieriger zugänglich ist dagegen A_{JM} , also die Fläche der Membran, die im engen Kontakt zur Sensoroberfläche steht. Daher wurden der Flächenanteil A_{JM} und der Abstand d_J zwischen Zelle und Sensor als einzige Parameter für die Simulation verändert, um eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation zu erhalten. Der Membranleitwert $G_{\text{JM}} = 1/R_{\text{JM}}$ wurde, wie in Kap. 4.3.1 beschrieben, gemessen und zu $G_{\text{JM}} = 34 \text{ } \mu\text{S}/\text{cm}^2$ bestimmt. Die Membrankapazität wurde aus der Literatur entnommen und bei $C_{\text{JM}} = 1 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2$ festgehalten [33, 38]. Die Kapazität des Sensors beträgt $C_S = 60 \text{ nF}/\text{cm}^2$. Diese zeigte jedoch keinen Einfluß auf die simulierten extrazellulären Membranpotentiale.

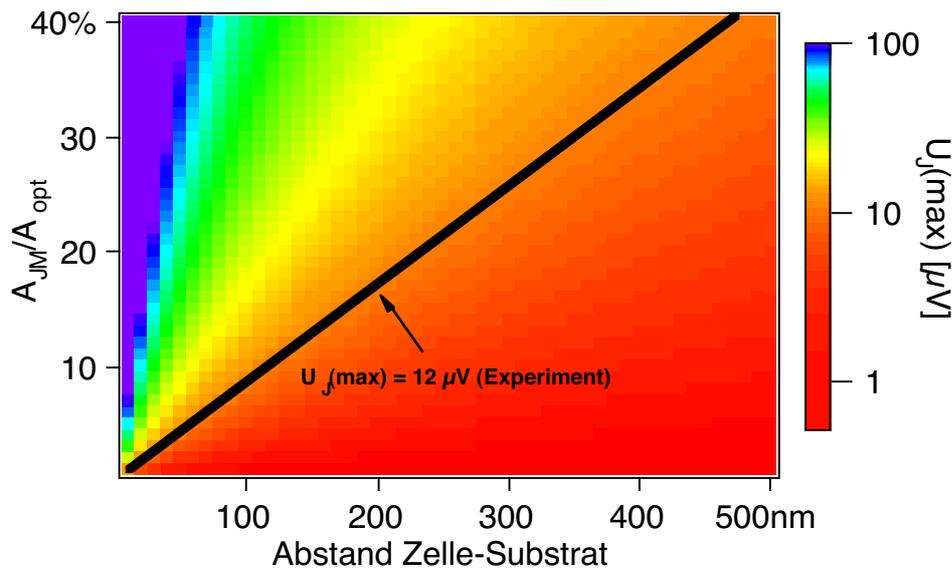


Abb. 4.3-8. Simulation des maximalen, extrazellulären Aktionspotentials $U_j(max)$ siehe Abb. 4.3-7. Diese wurde in Abhängigkeit vom Abstand d_j der Zellmembran zum Sensor und dem Verhältnis der Fläche A_{JM}/A_{opt} durchgeführt. Das maximale, extrazelluläre Aktionspotential aus dem Experiment in Abb. 4.3-7 ist als schwarze Linie eingezeichnet.

Die beste Übereinstimmung ergab sich für einen Wert von $G_J \approx 670 \text{ mS/cm}^2$ (siehe Abb. 4.3-7), wobei hier der Leitwert G_J durch die Kontaktfläche A_{JM} geteilt wurde. Ähnliche Werte für G_J wurden auch in anderen Messungen beobachtet [33, 115]. Typische Werte für den Flächenanteil A_{JM}/A_{opt} sind 18% - 40% [33, 115, 116].

Die Simulation in Abb. 4.3-8 zeigt, daß die Zelle nur schlecht auf der Sensoroberfläche adhärirt war. Nimmt man an, daß $A_{JM}/A_{opt} \approx 15\%$ betrug, so ergibt sich ein Zell-Substratabstand von $d_j \approx 170 \text{ nm}$.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß die Ortsauflösung des LAPS vom Oberflächenpotential abhängt. Im relevanten Bereich (Ort der größten Steigung der Kennlinie) konnte eine Ortsauflösung von ca. $14 \mu\text{m}$ nachgewiesen werden. Dieser Wert ist ausreichend, um an größeren Zellen Messungen durchführen zu können.

Es wurde eine ausführliche Betrachtung zur Potentialsensitivität des LAPS durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Rauschquellen betrachtet, wobei sich herausgestellt hat, daß die Stabilität der Beleuchtungsquelle ein limitierender Faktor ist, da eine Schwankung der Lichtleistung direkt eine Änderung des Photostrom zur Folge hat. Weiterhin sind die zu erwartenden Signale so klein, daß das Schrotrauschen

nicht mehr zu vernachlässigen ist. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man eine intensiver Lichtquelle benutzen, oder durch das von Parak [28] vorgeschlagene differenzielle Meßprinzip, den Offset-Strom verringern. Dies hätte auch den Vorteil, daß dann das sehr große „Offset zu Signal“ Verhältnis verringert werden würde, was eine Detektion des Signals mit dem Lock-In-Verstärker vereinfacht. Der Nachteil liegt jedoch darin, daß dann zwei Lichtquellen eingesetzt werden müssen, wodurch sich das Rauschen im Photostrom wiederum erhöht. Schließlich wurde gezeigt, daß der Chip selbst eine Rauschquelle darstellt. Das erzeugte Rauschen ist äquivalent zu einem Oberflächenpotentialrauschen von ca. $\Delta V = 48 \mu V_{\text{rms}}$ bei einer adressierbaren Fläche von $A = 0,8 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Aufbau konnte eine Potentialauflösung von ca $\Delta V = 80 \mu V_{\text{rms}}$ bei einer Bandbreite von 3 kHz erzielt werden.

Es ist bekannt, daß an Zellen aus dem Nervenzentrum (Paired pedal ganglia) der Schnecke *Lymnaea stagnalis* [42] extrazelluläre Signale mit einer Amplitude von mehr als 1 mV abgeleitet wurden [34, 46, 117]. An Blutegelzellen (*leech hirudo medicinalis* [41]) wurden Potentiale von 2 mV abgeleitet [18]. Für diese Zellen sollte die Potentialauflösung des LAPS ausreichen, um extrazelluläre Membranpotentiale abzuleiten.

Um auch an anderen Zellsystemen Messungen durchführen zu können, wurde ein zusätzlicher Patch-Clamp-Aufbau dem LAPS hinzugefügt. Somit besteht die Möglichkeit, einzelne Zellen gezielt zu stimulieren und über mehrere Einzelereignisse zu mitteln. Mit diesem Aufbau wurden extrazelluläre Aktionspotentiale von N1E-115 Zellen aufgezeichnet. Diese Messungen konnten mit dem Punkt-Kontakt-Modell angenähert werden. Die dabei aufgetretenen extrazellulären Aktionspotentiale waren sehr klein und hatten eine maximale Amplitude von $U_J(t)_{\text{max}} \approx 12 \mu V$. Dies liegt an der vergleichsweise geringen Leitfähigkeit der Zellmembran von $G_M \approx 34 \mu S/cm^2$ und der ungenügenden Adhäsion der Zelle auf dem Substrat. Der aus der theoretischen Annäherung ermittelte Leitwert des Spaltes zwischen Zelle und Sensor von $G_J = 670 \text{ mS/cm}^2$ und auch die Form des aufgezeichneten extrazellulären Potentials ist mit anderen Messungen vergleichbar [33].

5 Das Cytosensor-Mikrophysiometer

5.1 Funktionsweise

Das Cytosensor-Mikrophysiometer ist ein sehr sensibler pH-Sensor¹, der auf dem Prinzip des Licht-Adressierbaren-Potentiometrischen Sensors (LAPS) beruht. Mit diesem Sensor kann der Metabolismus von Zellen gemessen werden [91, 118], da als Nebenprodukt des Metabolismus Protonen von den Zellen freigesetzt werden. Dadurch sinkt der pH-Wert des Mediums in der Meßkammer, was eine Verschiebung der Photostromkurve zur Folge hat. Das System enthält zusätzlich eine computergesteuerte Perfusionseinheit. Diese bietet die Möglichkeit, zum einen die Perfusionsgeschwindigkeit zu regeln und zum anderen zwischen zwei verschiedenen Medien umzuschalten, die durch die Meßkammer geleitet werden (Abb. 5.1-2). Das Medium sowie die Meßkammer können beheizt werden. Eine Entgasermembran entzieht dem Medium eventuell enthaltene Luftblasen, da diese die Messung stören würden. In der industriellen Realisierung des Cytosensors wird auf die mögliche Ortsauflösung, die der LAPS bietet, verzichtet.

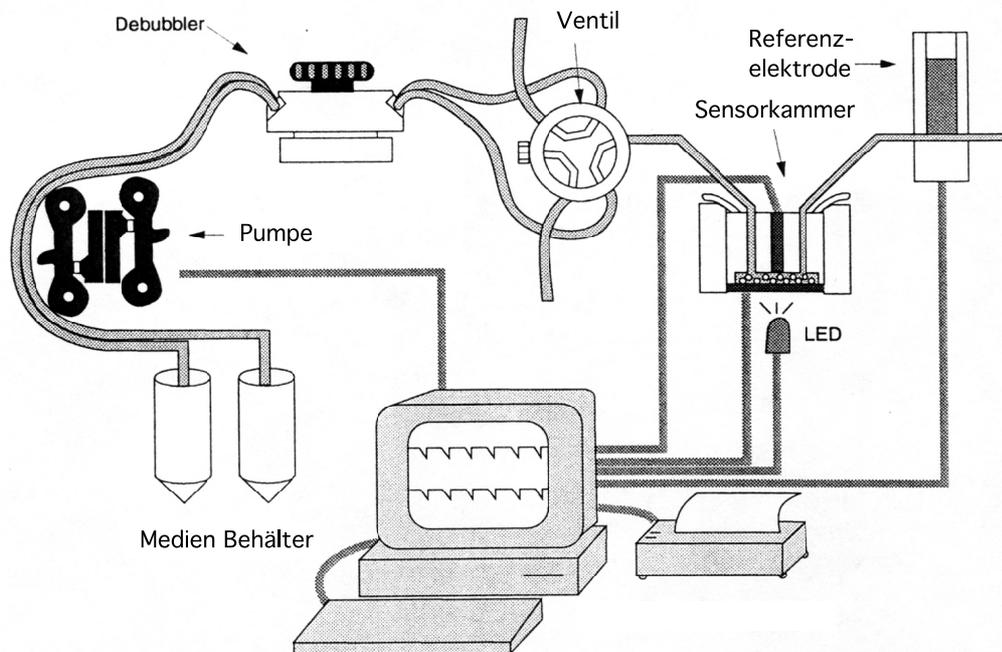


Abb. 5.1-1 Schematische Darstellung des Cytosensor-Mikrophysiometers (entnommen aus [118]).

¹ Sensitivität von ca. 1mpH

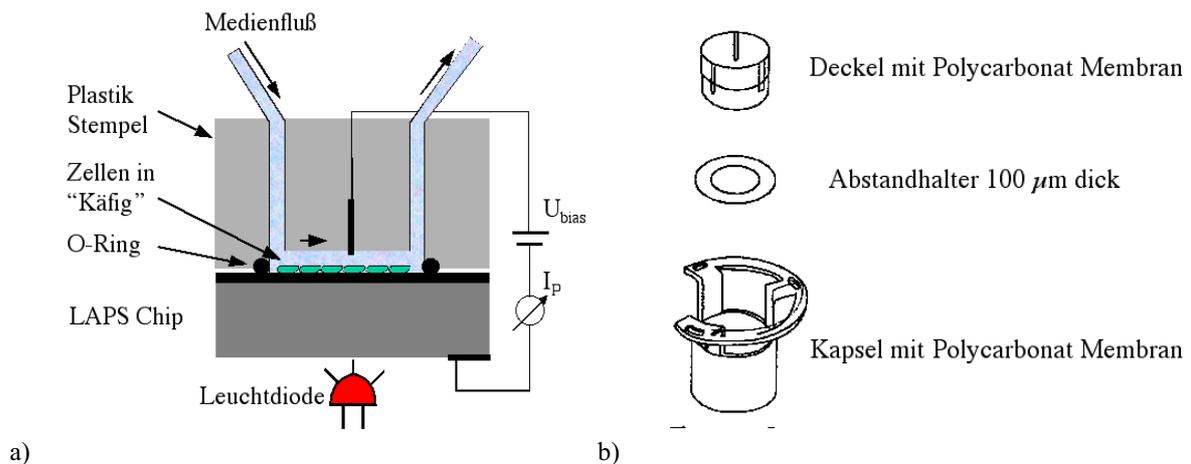


Abb. 5.1-2 a) Schematischer Aufbau einer Meßkammer. b) Zellen werden in der Kapsel auf einer Polycarbonat-Membran ausgesät (Porengröße 3 μm) und in der Regel für 24 Stunden inkubiert. Vor einer Messung wird ein Abstandhalter auf den Zellen platziert und darauf ein Deckel gesetzt, der ebenfalls eine Polycarbonat-Membran besitzt. Dadurch werden die Zellen in einen „Käfig“ eingeschlossen. Dies bietet die Möglichkeit, auch nicht adhärenente Zellen vermessen werden können, die andernfalls durch den Medienfluß weggespült werden.

Als Beleuchtungsquelle dient eine Leuchtdiode². Diese wird mit einem Rechtecksignal bei einer Frequenz von 5 kHz gepulst betrieben. Der dadurch entstehende Photostrom I_P hängt stark von der Vorspannung U_{bias} und dem pH-Wert des Mediums ab. Um den pH-Wert des Mediums bestimmen zu können wird jede Sekunde ein Photostrom-Spannungs-Charakteristik I_P - U_{bias} aufgezeichnet und deren Wendepunkt bestimmt (Abb. 5.1-4 a).

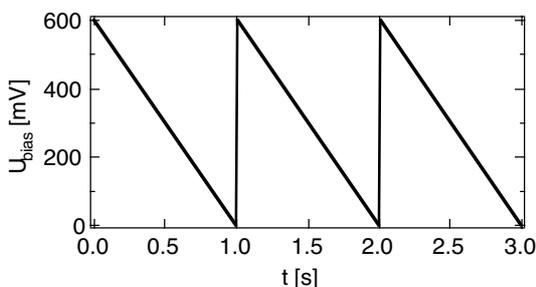


Abb. 5.1-3 U_{bias} wird sägezahnartig durchgeführt, um die Photostrom-Spannungs Charakteristik aufzeichnen zu können, wie sie in Abb. 5.1-4 dargestellt ist.

Eine Verschiebung des Wendepunktes um 60 mV entspricht einer pH-Änderung um ca. eine Einheit [119]. Auf diese Weise wird pro Sekunde einmal der pH-Wert bestimmt. Um den Metabolismus von Zellen messen zu können, wird nach einer konstanten Perfusion von Medium³ über die Zellen die Perfusion angehalten. Aufgrund des Stoffwechsels der Zellen säuert das Medium langsam an. Nach einer gewissen Zeit

wird die Perfusion wieder gestartet. Dieser Stop-Flow-Zyklus wird stetig wiederholt (Abb. 5.1-4 b).

² LED mit einer emittierten Wellenlänge von 950 nm.

³ Das für die Messungen verwendete Medium muß frei von Puffer sein. Ansonsten würde der Puffer den pH-Wert des Mediums konstant halten, womit keine sinnvolle Messung möglich wäre.

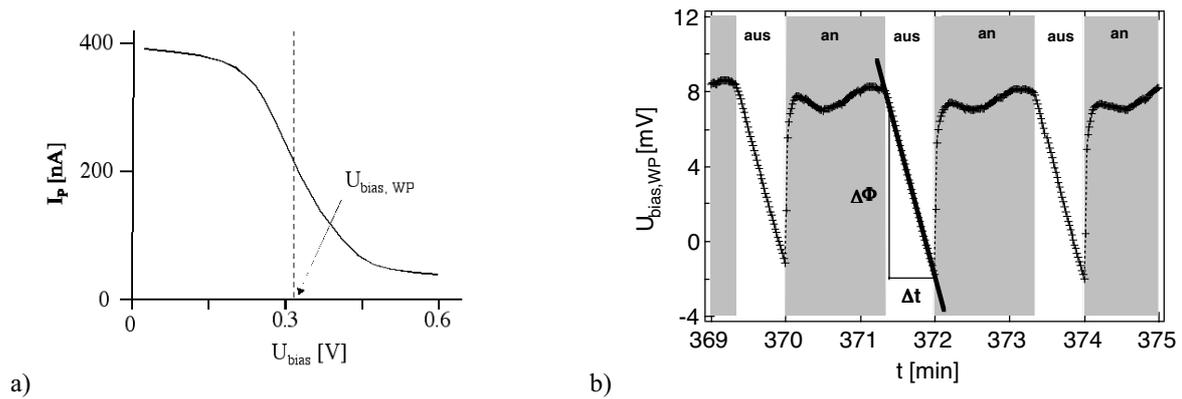


Abb. 5.1-4 a) Photostrom-Spannungs I_P - U_{bias} Charakteristik b) Stop-Flow-Zyklen in der Perfusion. Aufgezeichnet wurden die Wendepunkte, die aus den sekundlich aufgezeichneten I_P - U_{bias} Charakteristiken berechnet wurden. Im weißen Bereich ist die Perfusion gestoppt (40sec), im grauen Bereich wird frisches Medium über die Zellen perfundiert (Dauer 80sec). Durch den Metabolismus der Zellen säuert das stehende Medium an, was ein Absinken des Oberflächenpotentials zur Folge hat.

In der Stop-Phase des Zyklus wird die Oberflächenpotentialänderung durch eine Gerade angenähert und die Potentialänderung $\Delta\Phi$ durch die verstrichene Zeit Δt geteilt. Damit erhält man einen Wert für die Ansäuerungsrate r [V/s] (Abb. 5.1-4 b). Der Stop-Flow-Zyklus hat für gewöhnlich eine Periode von 2 min. Somit erhält man alle 2 min einen Wert für die Ansäuerungsrate r , womit man den Stoffwechsel von Zellen zeitaufgelöst studieren kann.

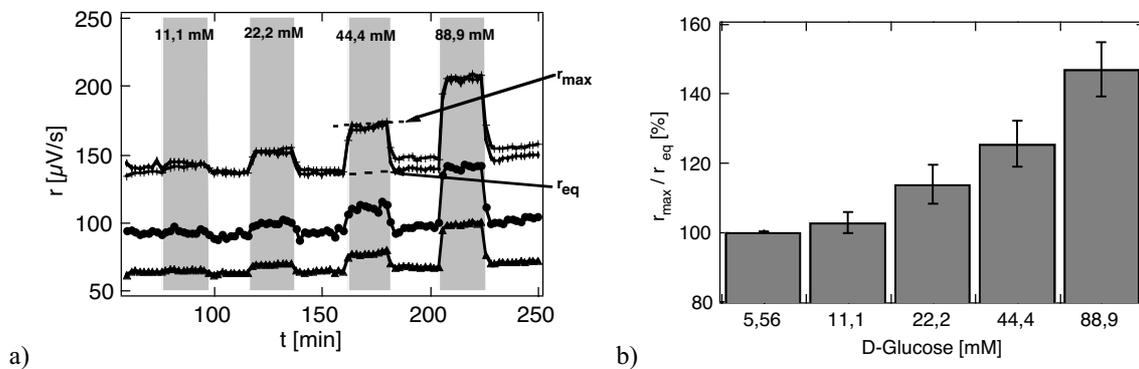


Abb. 5.1-5 a) Zeitabhängigkeit der Ansäuerungsrate. In vier separaten Meßkammern des Cytosensors wurden CHO-K1-Zellen eingebaut. Die Zellen wurden durch Zugabe von D-Glucose während der grau markierten Bereiche stimuliert. In den weißen Bereichen betrug die Konzentration von D-Glucose 5,6 mM. Die Ansäuerungsrate, die für die einzelnen Kammern gemessen werden, variieren stark und hängen z.B. von der absoluten Anzahl der Zellen ab, die in einer Meßkammer vorhanden sind. Um die gewonnenen Daten besser vergleichen zu können, wird die Ansäuerungsrate ohne zusätzliche Zugabe von Stimulanzen auf 100 % normiert und r_{eq} genannt. Die Maximale Ansäuerung, die durch eine zugegebene Stimulanz erzeugt wird, wird r_{max} genannt. b) Durch Auftragen von r_{max} / r_{eq} gegen die Konzentration der zugegebenen Stimulanz erhält man sogenannte Dosis-Antwort-Kurven. Hier wurde durch eine vermehrte Zugabe von D-Glucose der Metabolismus der Zellen erhöht.

In Abb. 5.1-5 a) ist ein derartiger Zeitverlauf dargestellt. Bei dieser Messung wurden CHO-K1-Zellen [120, 121] durch Zugabe von D-Glucose stimuliert, was mit einer deutlich erhöhten Stoffwechselaktivität der Zellen einhergeht. Durch Zugabe unter-

schiedlicher Konzentrationen einer Stimulanz können Dosis-Antwort-Kurven aufgenommen werden (Abb. 5.1-5 b).

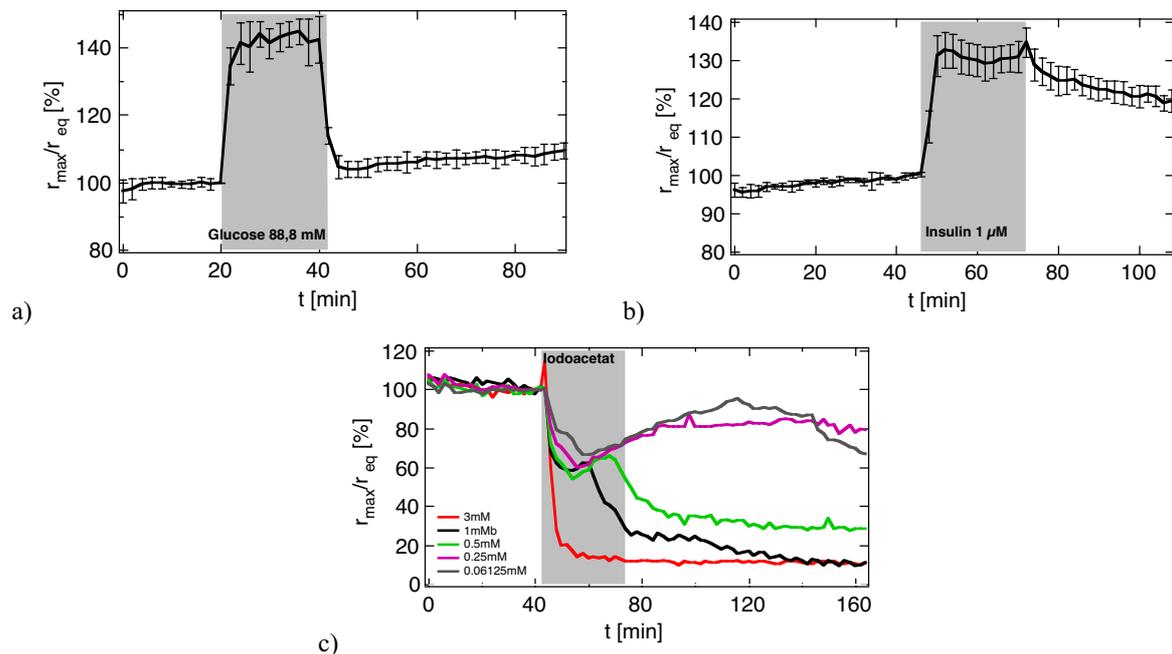


Abb. 5.1-6⁴ Dargestellt ist die zeitabhängige Wirkung von verschiedenen Pharmaka auf CHO-K1 Zellen. a) Zugabe von 88,9 mM Glucose für 20 min. Gemittelt über N=4 Einzelmessungen b) Zugabe von 1 μM Insulin für 20 min (N=5). c) Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen Iodoacetat für jeweils 30 min.

Die dargestellten Zeitkinetiken in Abb. 5.1-6 unterscheiden sich stark voneinander. Zugabe von Glucose erhöht den Stoffwechsel von Zellen sehr schnell (Zeit bis zum Erreichen des Reaktionsmaximums $t_{\text{rmax}} < 2$ min), und die Wirkung läßt nach dem Ausspülen der Glucose auch wieder schnell nach (Zeit bis zum Erreichen des Ausgangswertes $\pm 3\%$ $t_{\text{eq}} < 4$ min). Im Gegensatz dazu sieht der Zeitverlauf bei der Zugabe von Insulin deutlich anders aus. Zum einen ist die Zeit $t_{\text{rmax}} < 4$ min etwas erhöht, aber noch viel deutlicher ist, daß die Reaktion nur sehr langsam nachläßt ($t_{\text{eq}} \gg 30$ min). In Abb. 5.1-6 c) ist die zeitliche Reaktion von CHO-K1-Zellen auf Iodoacetat dargestellt. Iodoacetat greift in die Glykolyse ein und unterbindet diese [122]. Ab einer zugegebenen Konzentration von mehr als 0,5 mM ist die Wirkung irreversibel und hat den Tod der Zellen zur Folge. Bei Konzentrationen $< 0,25$ mM scheint die Reaktion über den beobachteten Zeitraum von 1,5 h reversibel zu sein. Somit ist es mit dem Cytosensor-Mikrophysiometer nicht nur möglich, Aussagen über die Stärke der erzielten Wirkung einer Substanz zu machen, sondern auch über de-

⁴ Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit M. George durchgeführt.

ren temporären Verlauf. Damit können unter Umständen auch Aussagen über die Wirkungsweisen der einzelnen Substanzen getroffen werden.

5.2 Studie an Osteoblasten und Osteosarcoma-Zellen mit dem Cytosensor Mikrophysiometer⁵

Mit Hilfe dieses Meßverfahrens konnte eine Studie an Osteoblasten durchgeführt werden, die hier kurz dargestellt werden soll.

In gesunden Knochen werden sowohl zelluläre wie auch Gerüstbausteine ständig regeneriert, so daß sich Auf- und Abbau die Waage halten. Osteoblasten katalysieren die Anlagerung von Knochen-Mineralien und setzen Matrix-Proteine frei (Collagen I). Im Gegensatz dazu resorbieren die Osteoclasten die Knochen. Dazu exprimieren diese Zellen eine spezielle Protonenpumpe auf ihrer Zellmembran (vATPase) [127-129]. Die Säuresekretion in Osteoclasten ist experimentell und klinisch gut untersucht. Dagegen wurde bisher nur in wenigen Studien die extrazelluläre Ansäuerung durch Osteoblasten untersucht. Es ist nachgewiesen, daß Schilddrüsenhormone die Freisetzung von Protonen durch Osteoblasten und Osteosarcoma-Zellen erhöhen [130]. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, daß synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatischen Arthritis-Erkrankungen durch metabolische Aktivierung Protonen abgeben [131]. Weiterhin wurde die potentielle Möglichkeit betrachtet, daß auf der Zellmembran exprimierte vATPasen an der Ansäuerung der Zellumgebung durch Freisetzen von Protonen beteiligt sind. Dabei wurde nachgewiesen, daß Osteoblasten nach geeigneter Stimulation Säure freisetzen und zugleich Matrix abbauende Proteasen nicht nur während der Stimulation mit TNF- α und Phorbol ester (PMA) sondern auch darüber hinaus exprimieren. Durch Zugabe von ATPase-Blockern wie Bafilomycin und Amilorid konnte eine Reduzierung der Protonenabgabe erzielt werden (siehe Abb. 5.2-2 b). Das läßt den Schluß zu, daß nicht nur Osteoclasten, sondern auch Osteoblasten über eine Säure sekretierende ATPase verfügen und daher nicht nur am Aufbau von Knochen, sondern insbesondere unter pathologischen Bedingungen (z.B. Knochentumor, Osteosarcom) auch an dessen Resorption beteiligt sind.

⁵ Das in diesem Kapitel dargestellte Projekt wurde in Zusammenarbeit mit W. Aicher, W. J. Parak, M. George und T. Pap durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in [123, 124, 126] veröffentlicht, bzw. zur Veröffentlichung eingereicht.

Zur Stimulierung der Osteoblasten wurde PMA benutzt, da dieses die Protein-Kinase C (PKC), einen Regulierungsfaktor für die Zelldifferenzierung und -teilung beeinflusst. Des weiteren wurde die PKC bereits früher mit der Protonenabgabe in Knochen [132] und mit der Erzeugung eines sauren Milieus in der Umgebung von Osteoblasten, T-Zellen und Bauchfell-Makrophagen in Verbindung gebracht [133, 134].

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin. Es wurde als ein physiologischer Aktivator für die Osteoblasten benutzt. Es konnte festgestellt werden, daß TNF- α ein möglicher Stimulus der Säuresekretion durch Osteoblasten darstellt. Beachtenswert ist der Befund, daß länger in Kultur gehaltene Osteoblasten sowohl eine geringere Reaktion auf TNF- α , als auch auf PMA zeigen, als nur kurz in Kultur gehaltene. Als mögliche Ursache ist eine verringerte metabolische Aktivität (z.B. auch Glycolyse) terminal differenzierter oder replikativ seneszenten Zellen zu sehen.

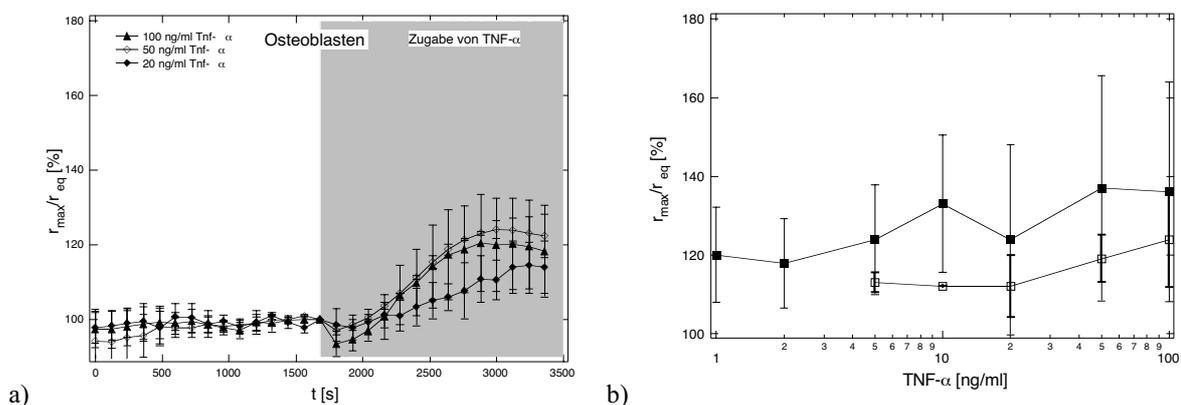


Abb. 5.2-1 a) Zeitabhängigkeit der normierten Ansäuerungsrate r_{max}/r_{eq} von Osteoblasten bei Zugabe von TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen. b) Dosis-Antwort-Kurven von kurz in Kultur (4 bis 8 Passagen) ■ und von lang in Kultur gehaltenen (10 bis 12 Passagen) □ Osteoblasten.

In Abb. 5.2-1 a) tritt die maximale Reaktion auf TNF- α erst nach einer Zeit von ca. 20 min auf. Die Dosis-Antwort-Kurven von Osteoblasten auf PMA sind in Abb. 5.2-2 dargestellt. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden Kontrollmessungen an SAOS-2 Osteosarcoma Zellen durchgeführt. Diese zeigen eine deutlich höhere Reaktion auf PMA als Osteoblasten. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Blocken der vATPase mit Bafilomycin A1 und der Na⁺/H⁺ Austausch ATPase mit Amilorid, eine Reduzierung der Ansäuerungsrate erreicht werden konnte.

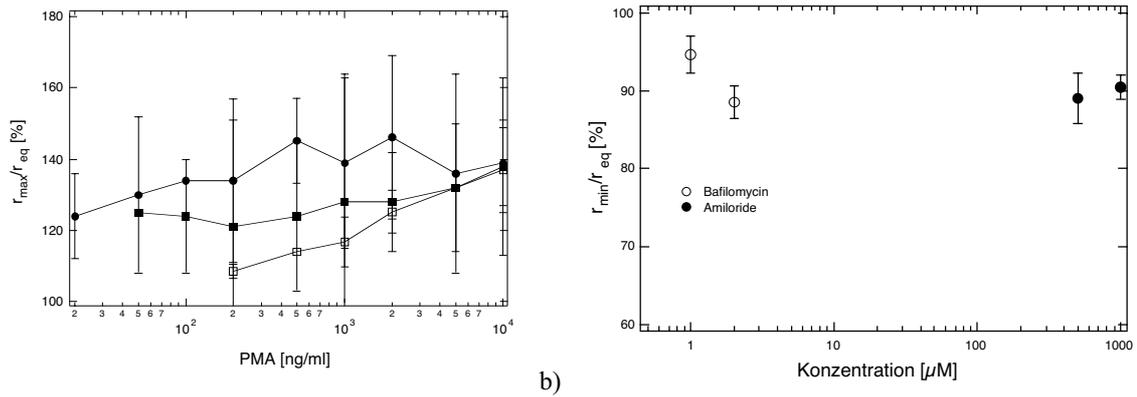


Abb. 5.2-2 a) Dosis – Response Kurven von kurz in Kultur (4 bis 8 Passagen) ■ und lang in Kultur gehaltenen (10 bis 12 Passagen) □ Osteoblasten und von SAOS-2 Zellen. b) Wirkung von Bafilomycin und Amilorid auf Osteoblasten.

Somit können diese beiden Prozesse zur Ansäuerung der Umgebung der Osteoblasten beitragen und mit für die Resorption von Knochen verantwortlich sein. Damit kann nicht mehr ausgeschlossen werden, daß Osteoblasten am Abbau von Knochenmaterial, z. B. bei einer Prothesenlockerung, beteiligt sind.

5.3 Das Cytosensor-Mikrophysiometer mit Ortsauflösung⁶

Um chemische (hormonelle) Kommunikationsmechanismen zwischen unterschiedlichen Zellen studieren zu können, benötigt man einen Sensor mit Ortsauflösung. In der kommerziellen Ausführung des Cytosensors, wie zuvor beschrieben, wird die Möglichkeit einer Ortsauflösung, die das LAPS-Prinzip bietet, nicht genutzt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Cytosensor derart modifiziert, daß die Möglichkeit einer ortsaufgelösten Messung besteht. Damit steht dann ein Meßinstrument zur Verfügung, mit dem der Informationsfluß durch chemische Botenstoffe studiert werden kann.

5.3.1 Realisierung der Ortsauflösung

Die Ortsauflösung beim LAPS wird dadurch erzielt, daß nur lokal beleuchtet wird. In dem hier realisierten Fall wird dies durch vier Leuchtdioden (LED's) gewährleistet, die in einem Rechteck angeordnet den LAPS-Chip⁷ abwechselnd beleuchten (Abb. 5.3-1). Dies geschieht durch eine Blende mit vier Löchern, die einen Durchmesser von je 1 mm und einen Abstand von 4 mm aufweisen (siehe Abb. 5.3-1). Dadurch ist

⁶ Die Idee zu diesem Projekt stammt von Dr. W. J. Parak und J. C. Behrends. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit W. J. Parak und M. George durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in [135] veröffentlicht.

⁷ Beschreibung siehe Anhang

es möglich, das Oberflächenpotential an vier verschiedenen Positionen auf dem Chip zu bestimmen.

Da es nur sehr schwer möglich ist, mehrere verschiedene Zellsysteme nebeneinander in einer Kapsel mit Polycarbonat-Membran (siehe Abb. 4.1-1 b) zu kultivieren, wurde im Folgenden auf diesen „Käfig“ verzichtet. Somit können nur Zellsysteme vermessen werden, die an der Oberfläche des verwendeten Chip anwachsen und somit durch die Perfusion von Medium während einer Messung nicht weggespült werden.

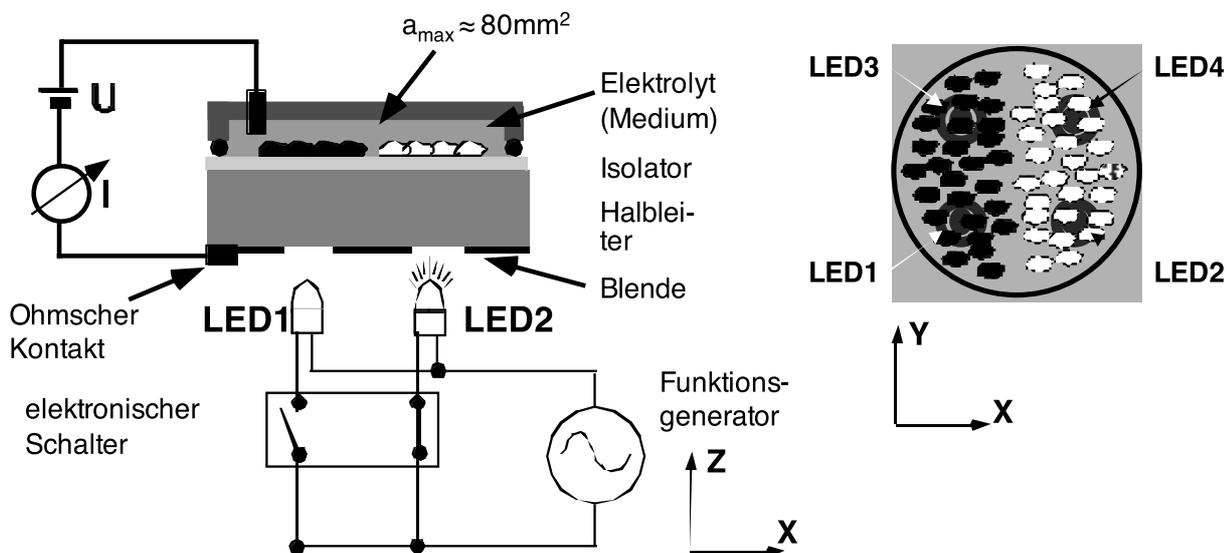


Abb. 5.3-1 Schematische Skizze des umgebauten Cytosensor Mikrophysiometers. Es wurden 4 LED's unter dem LAPS Chip positioniert, deren Licht durch eine Blende auf den Chip fällt. Eine zusätzliche Elektronik bestimmt den Zeitpunkt, zu dem eine neue I_P-U_{bias} Kennlinie aufgenommen wird (Abb. 5.1-3) und schaltet zu diesem Zeitpunkt zur nächsten LED um. Dies wird fortwährend im Kreis durchgeführt, so daß am Ort jeder LED alle vier Sekunden eine I_P-U_{bias} Kennlinie aufgenommen wird. Auf diese Weise wird am Ort von LED1 alle vier Sekunden das Oberflächenpotential bestimmt. Ebenso bei LED2 usw..

5.3.2 Bestimmung des Sensorverhaltens mit Hilfe von pH-Pulsen

Um die Fähigkeit des Systems zu testen, an allen vier Punkten den pH-Wert ortsauflöst und zeitaufgelöst zu detektieren, wurden pH-Pulse appliziert. Dazu wurde instantan von einer Lösung mit einem pH-Wert von vier auf eine andere Lösung mit einem pH-Wert von drei umgeschaltet (Abb. 5.3-2 a). Nach einer Equilibrierungszeit von ca. 180 sec stellt sich ein gemessenes Oberflächenpotential von ca. -20 mV ein. Die einige mV großen Unterschiede zwischen den einzelnen Meßpunkten haben ihre Ursache in der Inhomogenität des Chips und in der unterschiedlichen Leuchtstärke

der einzelnen Leuchtdioden. Nach dem Einleiten des Elektrolyten mit pH-Wert drei sinkt das gemessene Oberflächenpotential auf ca. -80 mV ab.

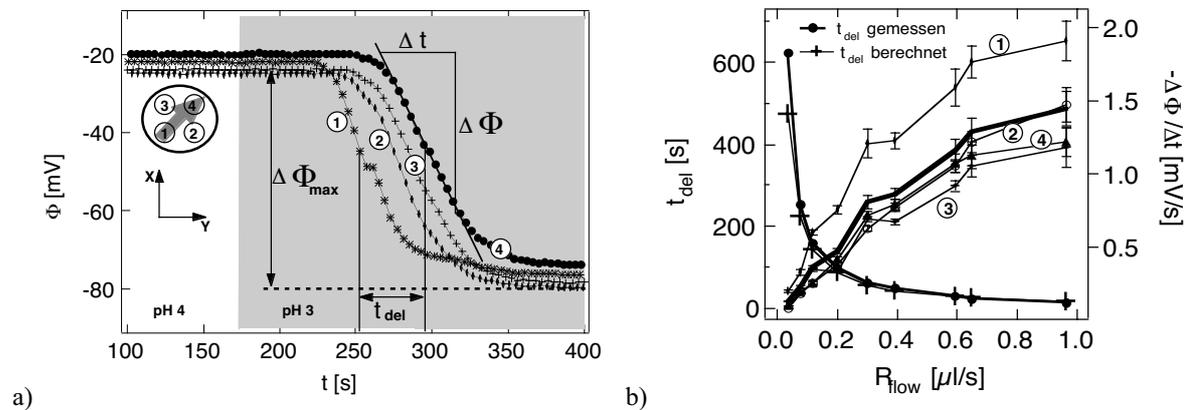


Abb. 5.3-2: Änderung des Oberflächenpotentials während des Perfundierens eines pH-Pulses. a) Zeitabhängigkeit des Oberflächenpotentials $\Phi(t)$, aufgenommen an allen vier Meßpunkten, während des Spülens eines pH-Pulses über die Sensor-Oberfläche. Beim Zeitpunkt $t = 180$ sec wurde instantan von pH 4 auf pH 3 umgeschaltet (grau hinterlegter Bereich). Dieses Experiment wurde für verschiedene Perfusionsgeschwindigkeiten wiederholt. Aus den Experimenten wurden jeweils vier Werte bestimmt: die maximale Änderung des Potentials ($\Delta\Phi_{max}$), die Verzögerungszeit (t_{del}) zwischen Meßpunkt 1 und 4, die Equilibrierungszeit (t_{eq}), und der maximale Potentialgradient ($\Delta\Phi/\Delta t$). b) Abhängigkeit der Verzögerungszeit (t_{del}) und des Potentialgradienten ($\Delta\Phi/\Delta t$) von der Flußgeschwindigkeit des Elektrolyten. Die berechnete Verzögerungszeit ist mit Kreuzen, die gemessene mit Kreisen dargestellt.

Die maximale Änderung des Oberflächenpotentials betrug immer ca. 60mV. Die Zeitverzögerung bis ein Absinken des pH-Wertes registriert wird, ist um so größer, je weiter der Meßpunkt vom Einlaß des Elektrolyten entfernt ist. Die Zeitdifferenz vom Absinken des pH-Wertes an Meßpunkt 4 gegenüber Meßpunkt 1 wurde mit t_{del} bezeichnet (Abb. 5.3-2 a). Diese Zeitdifferenz wurde für verschiedene Perfusionsgeschwindigkeiten R_{flow} gemessen (Abb. 5.3-2 b). Eine einfache Abschätzung kann gegeben werden, in dem man die Zeit berechnet, die der pH-Puls benötigt, um von Meßpunkt 1 bis zu Meßpunkt 4 zu gelangen. Der Abstand zwischen den Meßpunkten d_{14} beträgt $(4^2 + 4^2)^{1/2} = 5.7$ mm. Bei einer maximalen Querschnittsfläche der Meßkammer von 3 mm^2 (Abb. 5.3-1) beträgt die Flußgeschwindigkeit des perfundierten Elektrolyten 320, 40 und $12 \mu\text{m/s}$ für Flußraten von 0.96, 0.12 und $0.036 \mu\text{l/s}$. Damit ergibt sich für die Zeitdifferenzen t_{del} ungefähr 17.8, 142 und 475 sec, in Abb. 5.3-2 b) mit Kreuzen dargestellt. Die gemessenen und berechneten Daten zeigen eine Abweichung von ca. 11%.

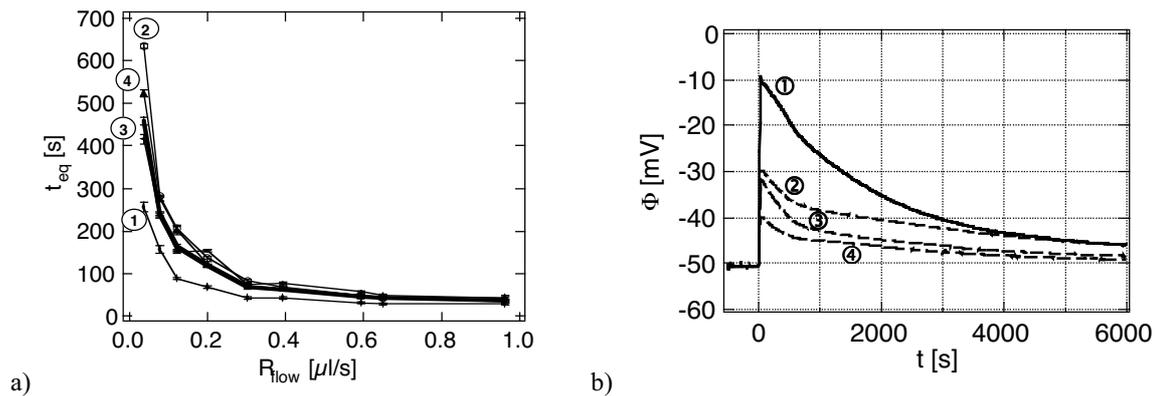


Abb. 5.3-3 a) Equilibrierungszeit (t_{eq}) der vier Meßpunkte aufgetragen gegen die Flußrate. Dick eingezeichnet ist der Mittelwert aus allen Meßpunkten. b) Equilibrierung eines pH-Pulses nach dem Stoppen der Pumpen. Nach dem Einspülen eines pH-Pulses wurden die Pumpen gestoppt, sobald sich an Meßpunkt 1 der Photostrom änderte. Die Zeitabhängigkeit des Oberflächenpotentials ist für alle vier Meßpunkte dargestellt.

Die Zeitspanne, die benötigt wird damit sich ein neues Gleichgewicht einstellt (t_{eq}), kann mit der Zeit gleichgesetzt werden, die der pH-Puls benötigt, um einen Meßpunkt von 1 mm Durchmesser zu passieren. Für Flußraten von 0.96, 0.12 und 0.036 $\mu\text{l/s}$ ergeben sich Zeiten für t_{eq} von 3.1, 25 und 83 sec, bis der pH-Puls Meßpunkt 1 ganz passiert. Diese Zeiten sind signifikant kürzer als die gemessenen Werte (Abb. 5.3-3 a). Je weiter der Meßpunkt vom Einlaß des Elektrolyten entfernt ist, desto länger ist diese Equilibrierungszeit $t_{eq4} > t_{eq1}$. Dieses kann nur durch eine turbulente Strömung in der Meßkammer erklärt werden.

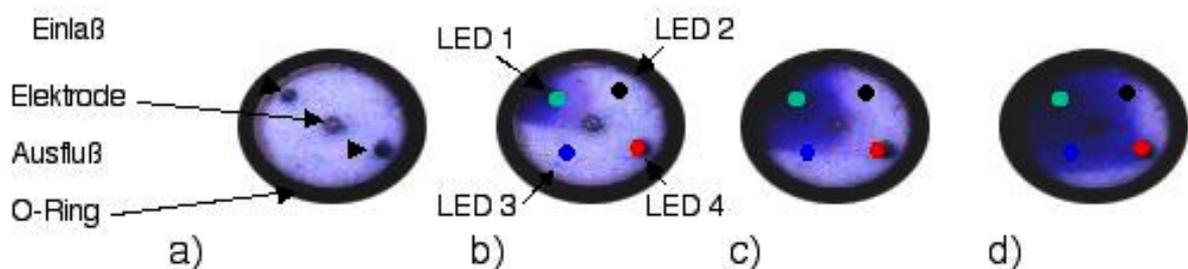


Abb. 5.3-4 Gezeigt ist eine Meßkammer (Querschnitt siehe Abb. 5.3-1) von unten. Der Chip wurde hier durch eine Glasplatte ersetzt, um einen Einblick in die Kammer zu erlauben. Der Durchfluß von angefärbtem Wasser durch die Meßkammer wurde in einzelnen Aufnahmen dokumentiert. Bei der hier gewählten Durchflußgeschwindigkeit von ca. $4\mu\text{l/s}$ ist der Elektrolyt nach ca. 16 sec vollständig ausgetauscht. Die Zeitdifferenz zwischen den einzelnen Aufnahmen beträgt 4 s. In Bild b) und c) ist deutlich zu erkennen, daß die Grenze zwischen angefärbtem und klarem Wasser ausgeschmiert ist. Dies kann durch turbulente Strömung in der Kammer und durch Mischeffekte in den Zuleitungen zustande kommen.

Um die Diffusionsgeschwindigkeit der Protonen abschätzen zu können wurde, ein pH-Puls in die Meßkammer eingeleitet und, sobald sich das Oberflächenpotential an Meßpunkt 1 geändert hat, die Pumpen gestoppt (Abb. 5.3-3 b). Die Zeitspanne bis das Oberflächenpotential an Meßpunkt 1 den ursprünglichen Wert an Meßpunkt 2 und 3 bzw. 4 erreicht hat, dauert ca. 1330, 1610 und 2840 s. Dies kann mit der Zeit

verglichen werden, die es dauern würde bis Protonen die entsprechende Strecke durch Diffusion zurückgelegt hätten. Die Diffusionskonstante für Protonen in Wasser beträgt $D_P = 9.31 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{s}$. Damit ergeben sich Diffusionszeiten für Protonen zwischen Meßpunkt 1 und 2 bzw. 3 ($d_{13} = d_{12} = 4 \text{ mm}$) von 1700 s, und zwischen Meßpunkt 1 und 4 ($d_{14} = 5.7 \text{ mm}$) von 3500 s. Diese Zeiten sind vergleichbar mit den gemessenen, die 1330 s für d_{12} , 1610s für d_{13} und 2840 s für d_{14} betragen. Somit kann man die Diffusion von Protonen in der Meßkammer annäherungsweise mit $t_{\text{dif}} = d^2/D_P$ beschreiben. Da es mehr als 2000 s dauert, bis Protonen von einem Meßpunkt zu einem anderen diffundieren, kann dies als limitierender Prozeß für die Ortsauflösung ausgeschlossen werden.

5.3.3 Charakterisierung des Systems mit Zellen

Zunächst wurden CHO-K1-Zellen direkt auf dem Sensor-Chip kultiviert, und mit einem Mikroskop überprüft ob diese Zellen gut adhärirten. Dazu wurde die Sensoroberfläche gereinigt⁸ und nicht weiter mit adhäsionsfördernden Beschichtungen versehen. Es stellte sich heraus, daß dies für das gewählte Zellsystem ausreichend ist.

Zellen wurden in verschiedener Dichte direkt auf den Chip und in Kapseln 48 Stunden vor einer Messung ausgesät. Vor den Messungen wurden optische Bilder von den Zellen gemacht, welche direkt auf den Chips angewachsen sind. In Abb. 5.3-5 a) ist deutlich zu sehen, daß für Zellen, die direkt auf der Sensoroberfläche angewachsen sind, eine starke Zunahme der Ansäuerungsrate r mit der Zellzahl zu beobachten ist, die bei 100.000 Zellen ein Maximum von ca. 170 $\mu\text{V}/\text{s}$ erreicht. Für diesen Fall bilden die Zellen gerade einen dichten Zellrasen aus, wie in Abb. 5.3-5 d) zu sehen ist.

⁸ Mechanische Reinigung mit Helmanex 2%ig und anschließendes Ultraschallreinigen in Helmanex 2%ig für mindestens 5 min. Spülen mit Millipore-Wasser (5-10 mal). Anschließendes Reinigen in 70% Ethanol und spülen mit Millipore-Wasser (5-10 mal).

Zur Aufbewahrung sollten die Meßkammern mit 70% Ethanol gefüllt und in einem dicht schließenden Gefäß gelagert werden, um eine erneute Kontamination zu vermeiden.

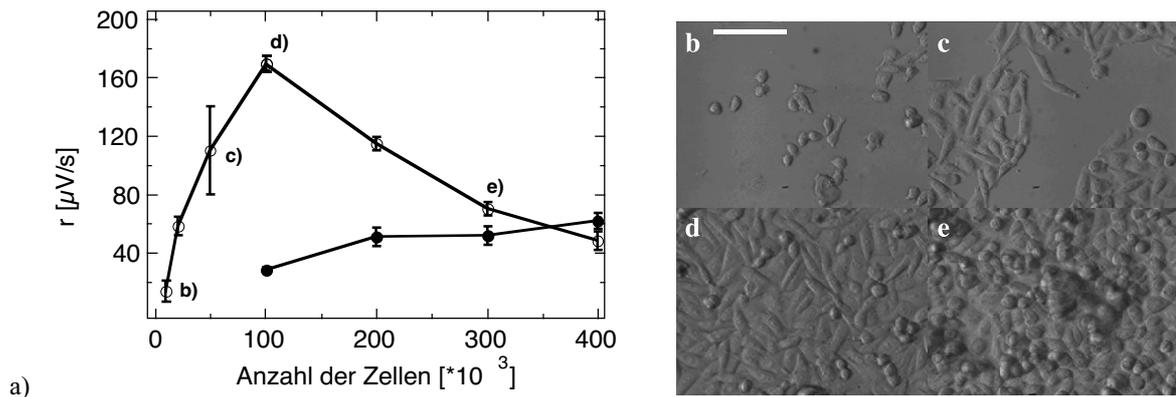


Abb. 5.3-5 a) Vergleich zwischen CHO-K1-Zellen, die direkt auf dem Chip ausgesät wurden (leere Kreise) und Zellen, die in Kapseln ausgesät wurden (gefüllte Kreise). Die Zellen wurden jeweils 48 Stunden vor einer Messung ausgesät. Die Anzahl der Zellen bezieht sich auf den Zeitpunkt der Aussaat. Gezeigt sind die Mittelwerte der Ansäuerungsraten und die Standardabweichung für Messungen über 30-60 min. b)-d) Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop von den Zellen auf der Sensoroberfläche direkt vor den Messungen. b) 10000 Zellen c) 50000 Zellen d) 100000 Zellen e) 300000 Zellen; Skalierungsbalken 100 μm .

Daß die Ansäuerungsraten sogar weit höher sind als im Falle von Zellen, die in den Kapseln gewachsen und gemessen wurden, hat seine Ursache in dem geringeren Abstand zwischen Zelle und Chip (<100 nm) [30, 136]. Das Absinken der Ansäuerungsrate bei Überschreiten einer Zellzahl von 100.000 Zellen kann mit der Schwächung des Stoffwechsels der Zellen erklärt werden, der eintritt, wenn die Kulturen eine zu hohe Dichte aufweisen [137]. Da die Zellen in den Kapseln mindestens die Dicke der Polycarbonat-Membran vom Chip entfernt sind, müssen die durch den Stoffwechsel ausgeschütteten Protonen erst zum Chip diffundieren. Daher ist auch für eine Zellzahl von 400.000 noch keine Sättigung erreicht.

Um die Ortsauflösung des Sensors mit einem Zellsystem zu demonstrieren, wurden CHO-K1- und CHO-M1-Zellen getrennt auf dem linken und rechten Halbraum des LAPS-Chip ausgesiedelt (siehe Abb. 5.3-1)⁹. Nur CHO-M1-Zellen können durch Zugabe von Carbachol ins Zellmedium stimuliert werden [121, 138], wohingegen CHO-K1-Zellen keine Reaktion zeigen [121]. Wie in Abb. 5.3-6 zu sehen, ist nur eine erhöhte Ansäuerungsrate während der Zugabe von Carbachol und nur an den Orten von LED 2 und LED 4 zu messen, an denen CHO-M1 Zellen adhären sind. In den grau markierten Intervallen wurden Konzentrationen zwischen 0,6 bis 20 μM Carbachol dem Medium zugegeben. Deutlich zu sehen ist auch die Abhängigkeit der Reaktionsstärke von der Konzentration des zugegebenen Wirkstoffs. Dabei ist bis zu

⁹ Genaue Beschreibung siehe Anhang

einer Konzentration von 20 μM Carbachol keine Sättigung in der Ansäuerungsrate eingetreten.

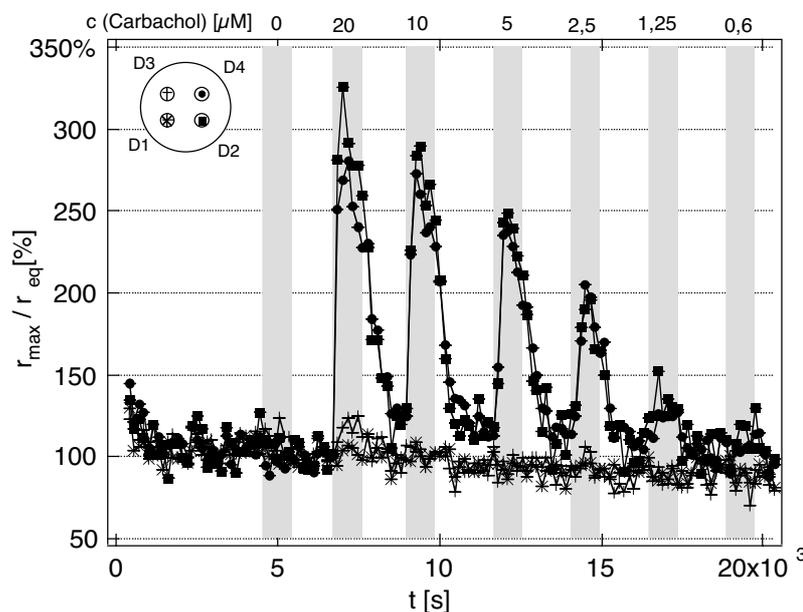


Abb. 5.3-6: Es wurden CHO-K1 (LED 1,3) und CHO-M1 (LED 2,4) Zellen ausgesiedelt. Das Medium wurde über die Zellen in einem Stop-Flow-Zyklus (80 s Perfusion, 70 s Stop) perfundiert und die Ansäuerungsrate r gemessen. Die aufgetragenen Raten sind auf den Equilibrierungswert normiert. Carbachol wurde in Konzentrationen von 0,6 bis 20 μM für die grau markierten Zeiträume zugegeben. Ausschließlich CHO-M1-Zellen reagieren auf Carbachol, da nur diese den hierfür nötigen Rezeptor besitzen.

Damit konnte gezeigt werden, daß orts aufgelöste Messungen der Ansäuerungsraten an Kolonien von verschiedenen Zellarten auf einem Chip, gleichzeitig durchgeführt werden können. Weder die Diffusion von Protonen, noch die turbulenten Strömungsverhältnisse in der Meßkammer sind in dem hier realisierten Fall limitierend für die Ortsauflösung.

5.4 Geeignete Zellsysteme

Um eine Kommunikation zwischen z. B. zwei verschiedenen Zellarten A und B studieren zu können, sollten diese einige Kriterien erfüllen. Zum einen sollten beide Zellarten in möglichst gleicher Umgebung (Inhaltsstoffe des Mediums, Temperatur...) existieren können, um ein gemeinsames Überleben in einer Meßkammer zu gewährleisten. Zum anderen sollte z. B. Zelltyp A einen Transmitter bzw. Botenstoff freisetzen können, für den Zelltyp B einen Rezeptor besitzt und somit auf diesen Botenstoff reagieren kann. Weiterhin ist es nötig, daß die Freisetzung dieses Botenstoffs mit Hilfe einer chemischen Substanz gezielt stimuliert werden kann. Dabei ist darauf zu achten, daß diese Substanz nach Möglichkeit nur eine Reaktion in Zelltyp

A hervorruft und nicht in B, da dies sonst die Ergebnisse verfälschen würde. Als letztes ist zu gewährleisten, daß der Zelltyp A auch eine ausreichende Menge dieses Botenstoffes in kurzer Zeit freisetzen kann. All diese Anforderungen schränken die Wahl der verwendbaren Zellsysteme ein.

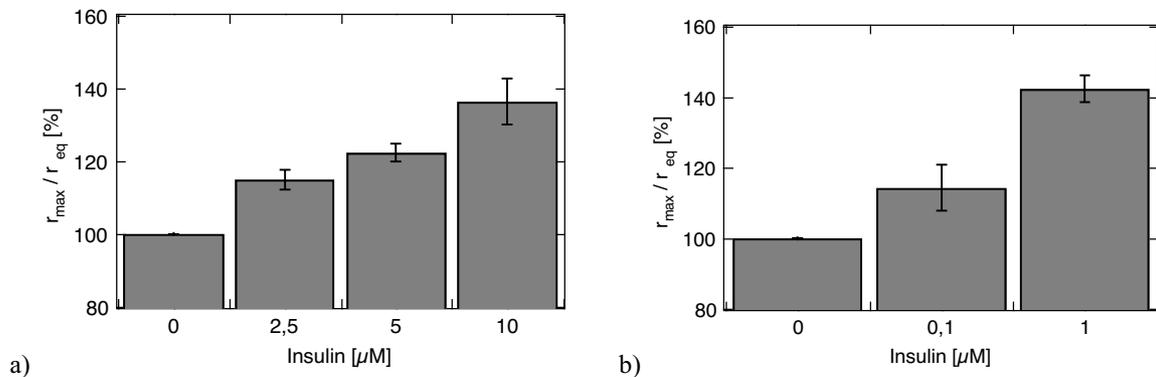


Abb. 5.4-1: Reaktion von a) NRK-Zellen und b) CHO-K1-Zellen auf unterschiedliche Konzentrationen von Insulin. Deutlich zu erkennen ist, daß CHO-K1-Zellen wesentlich stärker auf Zugabe von Insulin reagieren.

Ein denkbarer Botenstoff wäre Insulin. Insulinoma-Zellen können durch Zugabe von Glucose oder Glucagon stimuliert werden [139]. Bei einer Glucosekonzentration von 5 mM geben Pankrea- β -Zellen nahezu kein Insulin ab. Durch Erhöhen der Glucosekonzentration auf 11 mM wird in den Zellen ein Reaktionsmechanismus ausgelöst, durch den Insulin freigesetzt wird [139]. Diese Freisetzung findet in zwei Phasen statt. Insulinoma-Zellen geben in der ersten Phase der Insulinausschüttung (Dauer ca. 10min) ca. 200 Vesikel Insulin durch Exocytose frei, die sich in einem sogenannten „readily releasable pool (RRP)“ [140] befinden. Dies entspricht einer Freisetzrate von ca. 1 Vesikel in 3 Sekunden. Ein Vesikel enthält durchschnittlich 2,5 fg Insulin [139]. Auf diese erste Phase folgt eine Phase 2 der Insulinfreisetzung, die geringer aber konstant ist.

Bei einem Experiment mit dem orts aufgelösten Cytosensor würde ein Halbraum des Chips mit Pankrea- β -Zellen (z. B. HIT-T15) [140] besiedelt werden und die andere Hälfte mit CHO-K1 Zellen. Unter der Annahme, daß jeweils ca. 10^5 Zellen adhären in der Meßkammer sind, und das Volumen der Kammer ca. 24 μl beträgt, könnte die Insulinkonzentration durch die HIT-T15-Zellen pro Minute um ca. 36 nM erhöht werden. Diese freigesetzte Insulinmenge sollte ausreichen, um eine deutliche Reaktion bei den CHO-K1-Zellen auszulösen.

Da CHO-K1 Zellen sehr sensitiv auf Insulin (Abb. 5.4-1 b), jedoch kaum auf Glucose reagieren (Abb. 5.1-5 b), und Insulinoma-Zellen sehr stark durch Glucose stimuliert werden, scheint dies ein geeignetes Zellsystem darzustellen.

Literaturverzeichnis

Eigene Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften:

- [72] C. Kirchner, M. George, B. Stein, W. J. Parak, H. E. Gaub, and M. Seitz, "Corrosion protection and long-term chemical functionalization of gallium arsenide in aqueous environment," *Advanced Functional Materials*, 2002, **12**, pp. 266-276.
- [98] B. Stein, M. George, C. Kirchner, M. Seitz, W. J. Parak, and H. E. Gaub, "Entwicklung und Charakterisierung von Potentialsensoren für die Zell-Halbleiter Kopplung," *Dresdner Beiträge zur Sensorik*, 2002, **16**, pp. 41-44, ISBN 3-935712-71-5.
- [114] B. Stein, M. George, W. J. Parak, and H. E. Gaub, "Extracellular Measurements of Ionic Currents with the Light-Addressable-Potentiometric Sensor (LAPS)," *Sensors and Actuators*, accepted.
- [123] T. Pap, A. Claus, S. Ohtsu, K. M. Hummel, P. Schwartz, S. Drynda, G. Pap, A. Machner, B. Stein, M. George, R. E. Gay, W. Neumann, S. Gay, and W. K. Aicher, "Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells," *Arthritis Research & Therapy*, 2003, **5**, pp. R163-R173.
- [126] M. George, B. Stein, O. Müller, M. Weis-Klemm, T. Pap, W. J. Parak, and W. K. Aicher, "Metabolic activation stimulates acid secretion and expression of matrix degrading proteases in human osteoblasts," *Annals of the Rheumatic Diseases*, accepted.
- [135] B. Stein, M. George, H. E. Gaub, J. C. Behrends, and W. J. Parak, "Spatially Resolved Monitoring of the Cellular Metabolic Activity with a Semiconductor-Based Biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **18**, pp. 31-41.

Eigene Kurz-Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften, Patente....

- [73] C. Kirchner, M. George, B. Stein, W. J. Parak, A. Vix, T. Salditt, H. E. Gaub, and M. Seitz, "Biocompatible Coatings for Gallium Arsenide Based Biosensors (abstract only)," *European Biophysics Journal*, 2000, **29**, pp. 377 (abstract 11A-11).
- [74] M. Seitz, W. J. Parak, M. George, C. Kirchner, B. Stein, A. Lorke, and J. Behrends, "Ionenbindende Polymerbeschichtung zur Toxizitätsminderung von Halbleitersubstraten," *Deutsches Patent und Markenamt*, 2002.
- [96] M. George, B. Stein, W. J. Parak, S. Kudera, C. Schmidt, S. Kölblin, and H. E. Gaub, "Time Resolution and Potential Sensitivity of the Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS)," *European Biophysics Journal*, 2000, **29**, .
- [97] M. George, B. Stein, W. J. Parak, S. Kudera, C. Schmidt, and H. E. Gaub, "Investigation of different semiconductor substrates for an optimized light-

addressable potentiometric sensor (LAPS) (abstract only),” presented at Euro-sensors XIV, Copenhagen, Denmark, 2000.

- [124] B. Stein, T. Pap, M. George, W. J. Parak, O. Müller, S. Gay, and W. K. Aicher, “V-ATPASE INHIBITOR BAFILOMYCIN A1 REDUCES PROTON SECRETION IN FIBROBLASTS (abstract only),” presented at Annals. of the Rheum Diseases (EULAR 2001), Prague, Czech Republik, 2001.

Referenzen:

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, Inc., 1995.
- [2] I. Tasaki and T. Takeuchi, “Weitere Studien über den Aktionsstrom der markhaltigen Nervenfasern und über die elektrolytische Übertragung des Nervenimpulses,” *Pfluegers Archiv*, 1942, **245**, pp. 764-782.
- [3] R. Fitzhugh, “Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane,” *Biophysical Journal*, 1961, **1**, pp. 445-466.
- [4] E. A. H. Hall, *Biosensoren*, 1 ed. Berlin: Springer, 1990.
- [5] J. C. Owicki and J. W. Parce, “Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification,” *Biosensors & Bioelectronics*, 1992, **7**, pp. 255 - 272.
- [6] S. Alegret, J. Bartroli, C. Jimenez, E. Martinez-Fabregas, D. Martorell, and F. Valdes-Perezgasga, “ISFET-based urea biosensor,” *Sensors and Actuators B*, 1993, **15-16**, pp. 453-457.
- [7] L. Bousse, R. J. McReynolds, G. Kirk, T. Dawes, P. Lam, W. R. Bemiss, and J. W. Parce, “Microfabricated multichannel systems for the measurement of cellular metabolism,” *Sensors and Actuators B*, 1994, **20**, pp. 145 - 150.
- [8] I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin, and L. Carnay, “Changes in Fluorescence, Turbidity, and Birefringence Associated with Nerve Excitation,” *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1968, **61**, pp. 883 - 888.
- [9] T. Knöpfler and P. Fromherz, “Fluorescence monitoring of membrane potentials: the spatio-temporal resolution in isolated neurons of *Helix pomatia*,” *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences*, 1987, **42c**, pp. 986-990.
- [10] E. Neher and B. Sakmann, “Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres,” *Nature*, 1976, **260**, pp. 799 - 802.
- [11] R. M. Fitzsimonds, H.-J. Song, and M.-M. Poo, “Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks,” *Nature*, 1997, **388**, pp. 439-448.
- [12] G. W. Gross, E. Rieske, G. W. Kreutzberg, and A. Meyer, “A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular

- single unit neuronal activity in vitro," *Neuroscience Letters*, 1977, **6**, pp. 101-105.
- [13] D. A. Israel, W. H. Barry, D. J. Edell, and R. G. Mark, "An array of microelectrodes to stimulate and record from cardiac cells in culture," *American Journal of Physiology*, 1984, **247**, pp. H669-H674.
- [14] P. Connolly, P. Clark, A. S. G. Curtis, J. A. T. Dow, and C. D. W. Wilkinson, "An extracellular microelectrode array for monitoring electrogenic cells in culture," *Biosensors & Bioelectronics*, 1990, **5**, pp. 223-234.
- [15] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter, and J. Weis, "A Neuron-Silicon Junction: A Retzius Cell of the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor," *Science*, 1991, **252**, pp. 1290 - 1293.
- [16] A. Offenhäusser, J. Rühle, and W. Knoll, "Neuronal Cells cultured on modified microelectronic device Surfaces," *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 1995, **13**, pp. 2606 - 2612.
- [17] P. Fromherz and A. Stett, "Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip," *Physical Review Letters*, 1995, **75**, pp. 1670 - 1673.
- [18] A. Stett, B. Müller, and P. Fromherz, "Two-way silicon-neuron interface by electrical induction," *Physical Review E*, 1997, **55**, pp. 1779-1782.
- [19] T. B. DeMarse, D. A. Wagenaar, A. W. Blau, and S. M. Potter, "The Neurally Controlled Animat: Biological Brains Acting with Simulated Bodies," *Autonomous Robots*, 2001, **11**, pp. 305-310.
- [20] G. Shahaf and S. Marom, "Learning in Networks of Cortical Neurons," *Journal of Neuroscience*, 2001, **21**, pp. 8782-8788.
- [21] N. Birbaumer and R. F. Schmidt, *Biologische Psychologie*, 3 ed. Berlin: Springer, 1996.
- [22] Sakmann, *Biophysik Skript*, 1996.
- [23] J. Dudel, "Informationsvermittlung durch elektrische Erregung," in *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt and G. Thews, Eds., 27 ed. Berlin: Springer, 1997, pp. 20-42.
- [24] R. Weis and P. Fromherz, "Frequency dependent signal transfer in neuron transistors," *Physical Review E*, 1997, **55**, pp. 877-889.
- [25] P. Fromherz, "Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane," *European Biophysics Journal*, 1999, **28**, pp. 235-242.
- [26] P. Fromherz, C. O. Müller, and R. Weis, "Neuron Transistor: Electrical Transfer Function Measured by the Patch-Clamp Technique," *Physical Review Letters*, 1993, **71**, pp. 4079 - 4082.
- [27] D. Braun, "Kapazitive Stimulation von Säugetierzellen auf Silizium-Chips gemessen bei optischer Auflösung mit spannungsabhängigen Farbstoffen," Dissertation, Technische Universität München, 2000.

- [28] W. J. Parak, "Zell-Halbleiter-Hybride," Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München, München, 1999.
- [29] P. Fromherz, "Self-Gating of Ion Channels in Cell Adhesion," *Physical Review Letters*, 1997, **78**, pp. 4131-4134.
- [30] D. Braun and P. Fromherz, "Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon," *Applied Physics A*, 1997, **65**, pp. 341-348.
- [31] D. Braun and P. Fromherz, "Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon," *Physical Review Letters*, 1998, **81**, pp. 5241-5244.
- [32] W. J. Parak, J. Domke, M. George, A. Kardinal, M. Radmacher, H. E. Gaub, A. D. G. deRoos, A. P. R. Theuvenet, G. Wiegand, E. Sackmann, and J. C. Behrends, "Electrically Excitable NRK Fibroblasts - A New Model System For Cell-Semiconductor Hybrids," *Biophysical Journal*, 1999, **76**, pp. 1659-1667.
- [33] S. Vassanelli and P. Fromherz, "Transistor-records of excitable neurons from rat brain," *Applied Physics A*, 1998, **66**, pp. 459-463.
- [34] M. Jenkner, B. Müller, and P. Fromherz, "Interfacing a Silicon Chip to Pairs of Snail Neurons connected by Electrical Synapses," *Biological Cybernetics*, 2001, **84**, pp. 239-24.
- [35] M. Jenkner and P. Fromherz, "Bistability of Membrane Conductance in Cell Adhesion Observed in a Neuron Transistor," *Physical Review Letters*, 1997, **79**, pp. 4705-4708.
- [36] S. Vassanelli and P. Fromherz, "Neurons from rat brain coupled to transistors," *Applied Physics A*, 1997, **65**, pp. 85-88.
- [37] C. Sprössler, "Extrazelluläre Signalableitung durch ein Sensorfeld mit Feldefekttransistoren," Dissertation, , 1997.
- [38] C. Sprössler, M. Denyer, S. Britland, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Electrical recordings from rat cardiac muscle cells using field-effect transistors," *Phys. Rev. E*, 1999, **60**, pp. 2171-2176.
- [39] C. Sprössler, D. Richter, M. Denyer, and A. Offenhäusser, "Long-term recording system based on field-effect transistor arrays for monitoring electrogenic cells in culture," *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, **13**, pp. 613-618.
- [40] G. A. Banker and W. M. Cowan, "Rat Hippocampal Neurons in Dispersed Cell Culture," *Brain Res.*, 1977, **126**, pp. 397-425.
- [41] I. D. Dietzel, P. Drapeau, and J. G. Nicholls, "Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurons in culture," *Journal of Physiology*, 1986, **372**, pp. 191-205.
- [42] C. T. Slade, J. Mills, and W. Winlow, "The Neuronal Organisation of the Paired Pedal Ganglia of *Lymnaea stagnalis*," *Domp. Biochem. Physiol.*, 1981, **69A**, pp. 789-803.
- [43] R. G. Wong, R. D. Hadley, S. B. Kater, and G. C. Hauser, "Neurite outgrowth in molluscan organ and cell cultures: The role of conditioning factor(s)," *The Journal of Neuroscience*, 1981, **1**, pp. 1008-1021.

- [44] N. V. Swindale and P. R. Benjamin, "The Anatomy of Neurosecretory Neurons in the Pond Snail *Lymnaea Stagnalis*," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 1976, **274**, pp. 169-202.
- [45] M. Kyriakides, C. R. McCrohan, C. T. Slade, N. I. Syed, and W. Winlows, "The morphology and electrophysiology of the neurons of the paired pedal ganglia of *lymnaea stagnalis*," *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, **93A**, pp. 861-876.
- [46] G. Zeck and P. Fromherz, "Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2001, **98**, pp. 10457-10462.
- [47] G. W. Gross, A. Rhoades, and R. Jordan, "Neuronal networks for biochemical sensing," *Sensors and Actuators B*, 1992, **6**, pp. 1-8.
- [48] H. Hämmerle, U. Egert, A. Mohr, and W. Nisch, "Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays," *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, **9**, pp. 691 - 696.
- [49] S. Tatic-Lucic, J. A. Wright, Y.-C. Tai, and J. Pine, "Silicon cultured-neuron prosthetic devices for in vivo and in vitro studies," *Sensors and Actuators*, 1997, **B 43**, pp. 105-109.
- [50] J. Pine, M. Maher, S. Potter, Y. C. Tai, S. Tatic-Lucic, and J. Wright, "A Cultured Neuron Probe," presented at Annual Meeting, Amsterdam, The Netherlands, 1996.
- [51] M. P. Maher, J. Pine, J. Wright, and Y.-C. Tai, "The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons," *Journal of Neuroscience Methods*, 1999, **87**, pp. 45-56.
- [52] M. Merz and P. Fromherz, "Polyester Microstructures for Topographical Control of Outgrowth and Synapse Formation of Snail Neurons," *Advanced Materials*, 2002, **14**, pp. 141-144.
- [53] J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, and G. M. Whitesides, "Microfabrication by microcontact printing of self-assembled monolayers," *Advanced Materials*, 1994, **6**, pp. 600-604.
- [54] Y. Xia, M. Mrksich, E. Kim, and G. M. Whitesides, "Microcontact Printing of Octadecylsiloxane on the Surface of Silicon Dioxide and Its Application in Microfabrication," *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, pp. 9576-9577.
- [55] M. Mrksich and G. M. Whitesides, "Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensors ?," *TIBTECH*, 1995, **13**, pp. 228-235.
- [56] C. Sprössler, M. Scholl, M. C. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Model network architectures in vitro on extracellular recording systems using microcontact printing," *Synthetic Metals*, 2001, **117**, pp. 281-283.
- [57] L. Lauer, A. Vogt, C. K. Yeung, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Electrophysiological recordings of patterned rat brain stem slice neurons," *Biomaterials*, 2002, **23**, pp. 3123-3130.

- [58] M. Scholl, C. Sprössler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, and A. Offenhäusser, "Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicoan oxide surfaces," *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, **104**, pp. 65-75.
- [59] C. K. Yeung, L. Lauer, A. Offenhäusser, and W. Knoll, "Modulation of the growth and guidance of rat brain stem neurons using patterned extracellular matrix proteins," *Neuroscience Letters*, 2001, **301**, pp. 147-150.
- [60] W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, S. Böhm, and A. Lorke, "The Field-Effect-Addressable Potentiometric Sensor / Stimulator (FAPS) - A new concept for a surface potential sensor and stimulator with spatial resolution," *Sensors and Actuators B*, 1999, **58**, pp. 497-504.
- [61] S. Böhm, W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, and A. Lorke, "Characterization of the Field-Effect-Addressable Potentiometric Sensor (FAPS)," *Sensors and Actuators B*, 2000, **68**, pp. 266-273.
- [62] S. Böhm, "Der epitaktische Lift-off als Methode, elektrische- und optische Eigenschaften an III-V-Halbleiter-Strukturen zu beeinflussen," Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2002.
- [63] E. Yablonovitch, T. Gmitter, J. P. Harbison, and R. Bhat, "Extreme selectivity in the lift-off of epitaxial GaAs films," *Applied Physics Letters*, 1987, **51**, pp. 2222-2224.
- [64] P. Demeester, I. Pollentier, P. DeDobbelaere, C. Brys, and P. VanDaele, "Epitaxial lift-off and its applications," *Semicond. Sci. Technol.*, 1993, **8**, pp. 1124-1135.
- [65] E. Yablonovitch, D. M. Hwang, T. J. Gmitter, I. T. Florez, and J. P. Harbison, "Van der Waals bonding of GaAs epitaxial lift-off films onto arbitrary substrates," *Applied Physics Letters*, 1990, **56**, pp. 2419-2421.
- [66] J. Maeda, Y. Sasaki, N. Dietz, K. Shibahara, S. Yokoyama, S. Miyazaki, and M. Hirose, "High-Rate GaAs Epitaxial Lift-Off Technique for Optoelectronic Integrated Circuits," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 1997, **36**, pp. 1554-1557.
- [67] S. Böhm, "Elektronische Eigenschaften zweidimensionaler Elektronengase in epitaktisch abgelösten Heterostrukturen," Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität München, 1997.
- [68] S. M. Sze, *Physics of Semiconductor Devices*, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- [69] A. Offenhäusser, C. Sprössler, M. Matsuzawa, and W. Knoll, "Field-Effect Transistor Array for Monitoring Electrical Activity from Mammalian Neurons in Culture," *Biosensors & Bioelectronics*, 1997, **12**, pp. 819-826.
- [70] B. Besl and P. Fromherz, "Transistor array with an organotypic brain slice: field potential records and synaptic currents," *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE*, 2002, **15**, pp. 999-1005.
- [71] U. Tietze and C. Schenk, *Halbleiter-Schaltungstechnik*, vol. 12. Berlin: Springer, 2001.

- [75] C. Kirchner, "Biokompatible Galliumarsenid Oberflächen," Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universität, München, 2000.
- [76] B. Liebl, "Vicinal Dithiole als Arsenantidota - Vergleichende funktionelle und kinetische Untersuchungen in Zellkulturen," Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 1997.
- [77] B. Liebl, H. Muckter, P. Ngyen, E. Doklea, S. Islambouli, B. Fichtl, and W. Forth, "Differential-effects of various trivalent and pentavalent ornice and inorganic arsenic-species on glucose-metabolism in isolated kidney-cells," *Applied organometallic chemistry*, 1995, **9**, pp. 531-540.
- [78] H. V. Aposhian, "Biochemical toxicology of arsenic," in *Reviews in biochemical toxicology*, vol. 10, E. Hodgson, J. R. Bend, and R. M. Philpot, Eds. Amsterdam: Elsevier, 1989, pp. 265-299.
- [79] A. D. G. deRoos, "Electrophysiological Aspects of Growth Factor Signaling in NRK Fibroblasts," Dissertation, Katholische Universität Nijmegen, 1997.
- [80] S. R. Lunt, G. N. Ryba, P. G. Santangelo, and N. S. Lewis, "Chemical studies of the passivation of GaAs surface recombination using sulfides and thiols," *J. Appl. Phys.*, 1991, **70**, pp. 7449-7467.
- [81] O. S. Nakagawa, S. Ashok, C. W. Sheen, J. Martenson, and D. J. Allara, "GaAs Interfaces with Octadecyl Thiol Self-Assembled Monolayer: Structural and Electrical Properties," *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1*, 1991, **30**, pp. 3759-3762.
- [82] R. C. Tiberio, H. G. Craighead, M. Lercel, T. Lau, C. W. Sheen, and D. L. Allara, "Self-assembled monolayer electron beam resist on GaAs," *Appl. Phys. Lett.*, 1993, **62**, pp. 476-478.
- [83] C. W. Sheen, J. X. Shi, J. Martenson, A. N. Prikh, and D. J. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, pp. 1514.
- [84] H. Ohno, M. Motomatsu, W. Mizutani, and H. Tokumoto, "AFM observation of Self-Assembled Monolayer Films on GaAs (110)," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 1995, **34**, pp. 1381-1386.
- [85] T. Baum, S. Ye, and K. Uosaki, "Formation of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on GaAs Surface with in Situ Surface Activation by Ammonium Hydroxide," *Langmuir*, 1999, **15**, pp. 8577-8579.
- [86] T. Okumura and C. Kaneshiro, "Ideal GaAs Schottky Contacts Fabricated by in Situ Photoelectrochemical Etching and Electrodeposition," *Electronics and Communications in Japan 2*, 1999, **82**, pp. 690-697.
- [87] D. G. Wu, D. Cahen, P. Graf, R. Naaman, A. Nitzan, and D. Shvarts, "Direct Detection of Low-Concentration NO in Physiological Solutions by a New GaAs-Based Sensor," *Chem. Eur. J.*, 2001, **7**, pp. 1743-1749.
- [88] D. G. Wu, G. Ashkenasy, D. Shvarts, R. V. Ussyshkin, R. Naaman, A. Shanzer, and D. Cahen, "Novel NO Biosensor Based on the Surface Derivatization of GaAs by "Hinged" Iron porphyrins," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, pp. 4496-450.

- [89] G. Schmitt, J. W. Schultze, F. Faßbender, G. Buß, H. Lüth, and M. J. Schöning, "Passivation and corrosion of microelectrode arrays," *Electrochimica Acta*, 1999, **44**, pp. 3865-3883.
- [90] H. M. McConnell, J. C. Owicki, J. W. Parce, D. L. Miller, G. T. Baxter, H. G. Wada, and S. Pitchford, "The Cytosensor Microphysiometer: Biological Applications of Silicon Technology," *Science*, 1992, **257**, pp. 1906 - 1912.
- [91] J. W. Parce, J. C. Owicki, K. M. Kercso, G. B. Sigal, H. G. Wada, V. C. Muir, L. Bousse, K. L. Ross, B. I. Sikic, and H. M. McConnell, "Detection of Cell-Affecting Agents with a Silicon Biosensor," *Science*, 1989, **246**, pp. 243 - 247.
- [92] J. C. Owicki, L. Bousse, D. Hafeman, G. L. Kirk, J. D. Olson, H. G. Wada, and J. W. Parce, "The Light-Addressable Potentiometric Sensor: Principles and Biological Applications," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1994, **23**, pp. 87 - 113.
- [93] H. Tanaka, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, "Application of the chemical imaging sensor to electrophysiological measurement of a neural cell," *Sensors and Actuators B*, 1999, **59**, pp. 21-25.
- [94] W. A. P. Claassen, W. G. J. N. Vokenburg, M. F. C. Willemsen, and W. M. v. d. Wijgert, "Influence of Deposition Temperature, Gas Pressure, Gas Phase Composition, and RF Frequency on Composition and Mechanical Stress of Plasma Silicon Nitride Layers," *J. Electrochem. Soc.: Solid-State science and technology*, 1985, **132**, pp. 892-898.
- [95] A. Mohr, W. Finger, K. J. Foehr, W. Göpel, H. Hämmerle, and W. Nisch, "Performance of a thin film microelectrode array for monitoring electrogenic cells in vitro," *Sensors and Actuators*, 1996, **B 34**, pp. 265-269.
- [99] D. G. Hafeman, J. W. Parce, and H. M. McConnell, "Light-Addressable Potentiometric Sensor for Biochemical Systems," *Science*, 1988, **240**, pp. 1182 - 1185.
- [100] M. George, "Untersuchungen zur Noninvasiven Membranpotentialmessung mit einem Licht Adressierbaren Potentiometrischen Sensor," Diplomarbeit, LMU München, 1997.
- [101] W. J. Parak, U. G. Hofmann, H. E. Gaub, and J. C. Owicki, "Lateral Resolution of Light Addressable Potentiometric Sensors: An Experimental and Theoretical Investigation," *Sensors and Actuators A*, 1997, **63**, pp. 47-57.
- [102] M. Nakao, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, "Improvement of Spatial Resolution of a Laser-Scanning pH-Imaging Sensor," *Japanese Journal of Applied Physics*, 1994, **33**, pp. L 394 - L 397.
- [103] M. Nakao, S. Inoue, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, "High-resolution pH imaging sensor for microscopic observation of microorganisms," *Sensors & Actuators B*, 1996, **34**, pp. 234-239.
- [104] Y. Ito, "High-spatial resolution LAPS," *Sensors and Actuators B*, 1998, **52**, pp. 107-111.
- [105] M. George, W. J. Parak, I. Gerhardt, W. Moritz, F. Kaesen, H. Geiger, I. Eisele, and H. E. Gaub, "Investigation of the spatial resolution of the light-

- addressable potentiometric sensor (LAPS),” *Sensors and Actuators A*, 2000, **83**, pp. 149-249.
- [106] W. Parak, “Aufbau und Charakterisierung eines LAPS-Systems zur noninvasiven Membranpotentialmessung,” Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [107] S. M. Sze, *Semiconductor Devices-Physics and Technology*. New York: John Wiley & Sons, 1985.
- [108] R. Müller, *Rauschen*, vol. 2. Berlin: Springer Verlag, 1990.
- [109] M. Cahalan and E. Neher, “Patch clamp techniques: an overview,” *Methods in Enzymology*, 1992, **207**, pp. 3-14.
- [110] T. Amano, E. Richelson, and M. Nirenberg, “Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972, **69**, pp. 258-263.
- [111] E. Richelson, “Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115,” *Neurochemistry*, 1973, **21**, pp. 1139-1145.
- [112] M. Lindau and E. Neher, “Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells,” *European Journal of Physiology, Pflügers Archiv*, 1988, **411**, pp. 137-146.
- [113] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, “Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*,” *Journal of Physiology*, 1952, **116**, pp. 449 - 472.
- [115] S. Vassanelli and P. Fromherz, “Transistor Probes Local Potassium Conductances in the Adhesion Region of Cultured Rat Hippocampal Neurons,” *J. Neurosci.*, 1999, **19**, pp. 6767-6773.
- [116] B. Straub, E. Meyer, and P. Fromherz, “Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing,” *Nature Biotechnology*, 2001, **19**, pp. 121-124.
- [117] P. Fromherz, “Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips,” *ChemPhysChem*, 2002, **3**, pp. 276-284.
- [118] F. Hafner, “Cytosensor[®] Microphysiometer: technology and recent applications,” *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, **15**, pp. 149-158.
- [119] J. W. Parce, J. C. Owicki, and K. M. Kersco, “Biosensors for directly measuring cell affecting agents,” *Annales de Biologie Clinique*, 1990, **48**, pp. 639-641.
- [120] M. A. Buck and C. M. Fraser, “Muscarinic acetylcholine receptor subtypes which selectively couple to phospholipase C: Pharmacological and biochemical properties,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, **173**, pp. 666-672.
- [121] G. T. Baxter, M.-L. Young, D. L. Miller, and J. C. Owicki, “Using microphysiometry to study the pharmacology of exogenously expressed m₁ and m₃ muscarinic receptors,” *Life Sciences*, 1994, **55**, pp. 573-583.

- [122] L. Bott-Flügel, "Einfluß des intrazellulären pH auf den Päkonditionierungseffekt in sympathoadrenergen Zellen," Dissertation, Technische Universität München, München, 2001.
- [127] B. S. Lee, L. S. Hollicay, I. Krits, and S. L. Gluck, "Vacuolar H⁺-ATPase activity and expression in mouse bone marrow cultures," *Journal of bone and mineral research*, 1999, **14**, pp. 2127-2136.
- [128] S. L. Teitelbaum, "Bone Resorption by Osteoclasts," *Science*, 2000, **289**, pp. 1504-1508.
- [129] A. V. Rousselle and D. Heymann, "Osteoclaststic acidification pathways during bone resorption," *Bone*, 2002, **30**, pp. 533-540.
- [130] M. G. Barrett, G. S. Belinsky, and A. H. Tashjian, "A new action of parathyroid hormone," *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, pp. 26346-26353.
- [131] W. J. Parak, S. Dannöhl, M. George, M. K. Schuler, J. Schaumburger, H. E. Gaub, O. Müller, and W. K. Aicher, "Metabolic Activation Stimulates Acid Production in Synovial Fibroblasts," *Journal of Rheumatology*, 2000, **27**, pp. 2312-2322.
- [132] T. Sato, M. d. C. Ovejero, Peng, Hou, A.-M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged, and J.-M. Delaissé, "Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts," *Journal of Cell Science*, 1997, **110**, pp. 589-596.
- [133] H. C. Blair, R. F. Sidonio, R. C. Friedberg, N. N. Khan, and S.-S. Dong, "Proteinase expression during differentiation of human osteoclasts in vitro," *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, **78**, pp. 627-237.
- [134] J. C. Scimeca, A. Franchi, C. Trojani, H. Parrinello, J. Grosgeorge, C. Robert, O. Jaillon, C. Poirier, P. Gaudray, and G. F. Carle, "The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants," *Bone*, 2000, **26**, pp. 207-213.
- [136] D. Braun and P. Fromherz, "Cell adhesion studied by fluorescence, Abstract only," *European Biophysics Journal*, 1997, **26**, pp. 57.
- [137] M. Baba, S. Hirai, S. Kawakami, T. Kishida, N. Sakai, S. Kaneko, M. Yao, T. Shuin, Y. Kubota, M. Hosaka, and S. Ohno, "Tumor suppressor protein VHL is induced at high cell density and mediates contact inhibition of cell growth," *Oncogene*, 2001, **20**, pp. 2727-2736.
- [138] J. C. Owicki, J. W. Parce, K. M. Kercso, G. B. Sigal, V. C. Muir, J. C. Venter, C. M. Fraser, and H. M. McConnell, "Continuous monitoring of receptor-mediated changes in the metabolic rates of living cells," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1990, **87**, pp. 4007 - 4011.
- [139] P. Rorsman, L. Eliasson, E. Renström, J. Gromada, S. Brag, and S. Göpel, "The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion," *News. Physiol. Sci.*, 2000, **15**, pp. 72-77.

- [140] T. Bratanova-Tochkova, H. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y. Liu, J. Mulvaney-Musma, T. Schermerhorn, S. Straub, H. Yajima, and G. Sharp, "Triggering and augmentation mechanism, granule pool, and biphasic insulin secretion," *Diabetes*, 2002, **51**, pp. S83-S90.

Anhang

6 Realisierung mehrerer Meßpunkte im Cytosensor- Mikrophysiometer

Veränderungen am Gerät

Um an vier Punkten in einer Meßkammer des Cytosensors „gleichzeitig“ messen zu können, mußten einige Veränderungen an dem Gerät vorgenommen werden. Für die Meßkammern wurde eine neue Bodenplatte gefertigt, die vier sphärische Blendenöffnungen aufweist (Abb. 5.4-1). Aus elektrischen Isolationsgründen wurde diese Bodenplatte aus PVC gefertigt. Die einzelnen Blendenöffnungen haben einen Durchmesser von 1mm, einen Abstand von 4mm und bilden ein Rechteck.

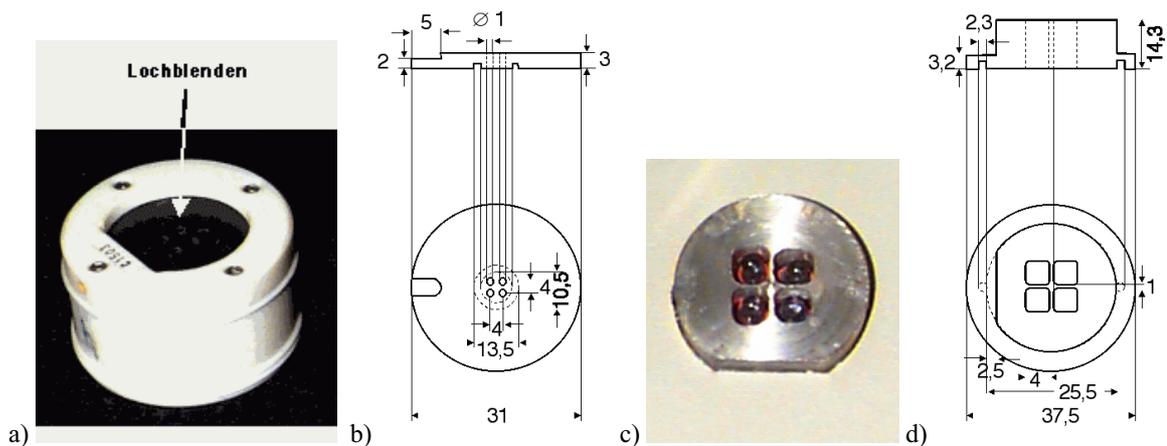


Abb. 5.4-1 a) Bild von der Meßkammerunterseite mit den vier Lochblenden. b) Konstruktionszeichnung für die Bodenplatte der Meßkammer c) Bild der Diodenhalterung im Cytosensor d) Konstruktionszeichnung für die Diodenhalterung. (Alle Abmessungen sind in mm angegeben).

Die Halterung für die vier Leuchtdioden (LED`s 950 nm, Osram/Infineon, München) , auf der die Meßkammer aufgesetzt wird, wurde ebenfalls an die neue Geometrie angepaßt. Da die Meßkammer zusätzlich von unten beheizbar sein muß, wurde die Halterung aus Aluminium gefertigt. Eine elektronische Schaltung wurde hinzugefügt, um zwischen den einzelnen LED`s umzuschalten. Als Signal, um den Umschaltzeitpunkt festzulegen, wurde die sägezahnartige Spannung gewählt, die vom Cytosensor angelegt wird, um die Strom-Spannungs-Kennlinien durchzufahren (Abb. 5.1-3).

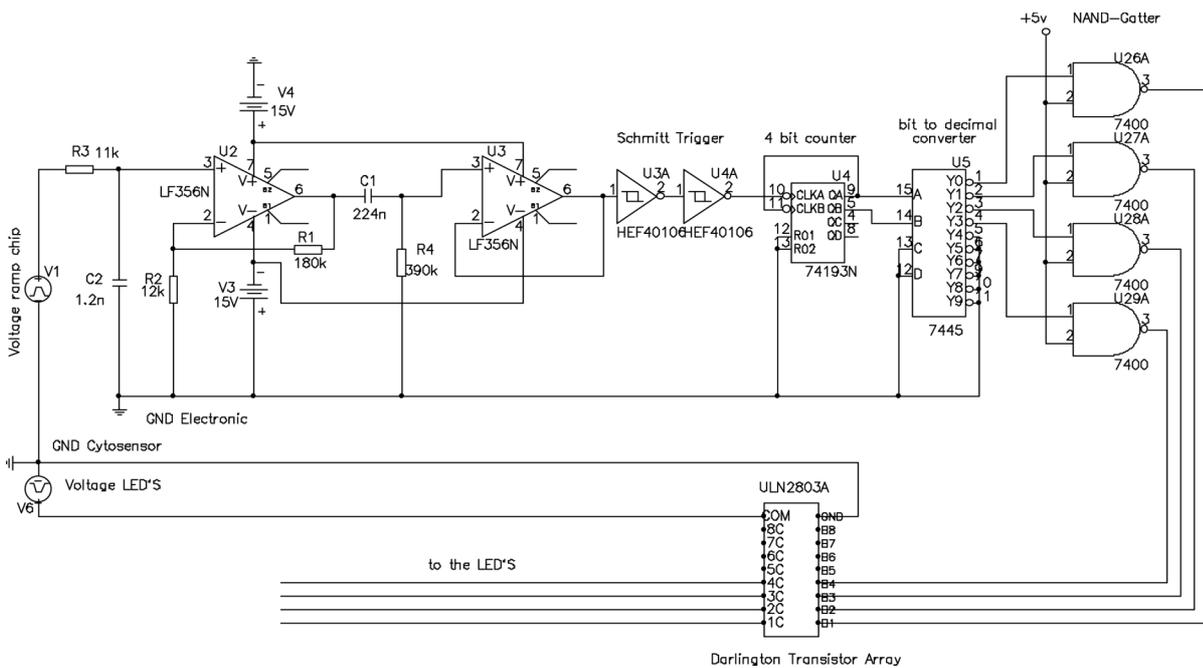


Abb. 5.4-2 Zusätzliche Elektronik, die zwischen den vier LED's umschaltet.

Damit wurde sichergestellt, daß zu Beginn jeder neu durchgeführten Meßkurve (siehe Abb. 5.1-4 bzw. Abb. 5.1-3) jeweils zu der nächsten LED umgeschaltet wurde. Die Schaltung in Abb. 5.4-2 besteht in ihrem analogen Teil zunächst aus einem LP-Filter mit $f_g \approx 75 \text{ kHz}$ (R3 und C2), um hochfrequentes Rauschen zu unterdrücken. Anschließend wird das Signal über einen invertierenden Verstärker um den Faktor 15 verstärkt und erneut gefiltert (HP-Filter $f_g \approx 11,5 \text{ Hz}$ (C1 und R4)). Danach wird das Signal nochmals invertiert. Diese Schaltung erzeugt am Beginn der in Abb. 5.1-3 gezeigten sägezahnartigen Spannung einen kurzen Spannungspuls, der dann als Schaltsignal dient. Das noch analoge Signal wird durch die „Schmitt-Trigger“ digitalisiert. Der 4 Bit Zähler erzeugt aus den Pulsen eine binäre Zahl (00, 01, 10, 11) und schaltet bei jedem Puls um eine weiter (endlos wiederholend). Anschließend wird die binäre Zahl im „Bit zu Dezimal Wandler“ in eine dezimale Zahl umgewandelt. Das bedeutet, daß für den Wert 00 am Ausgang 1 eine Spannung von 5 V anliegt, für 01 am Ausgang 2 usw.. Alle anderen Ausgänge liegen auf einer Spannung von 0 V. Das „NAND-Gatter“ invertiert dieses Signale wieder. Am „Darlington Transistor Array“ liegt zwischen GND und COM die Versorgungsspannung für die LED's an. Diese wird je nach Schaltsignal auf eine der Ausgänge 1C,...,4C gelegt.

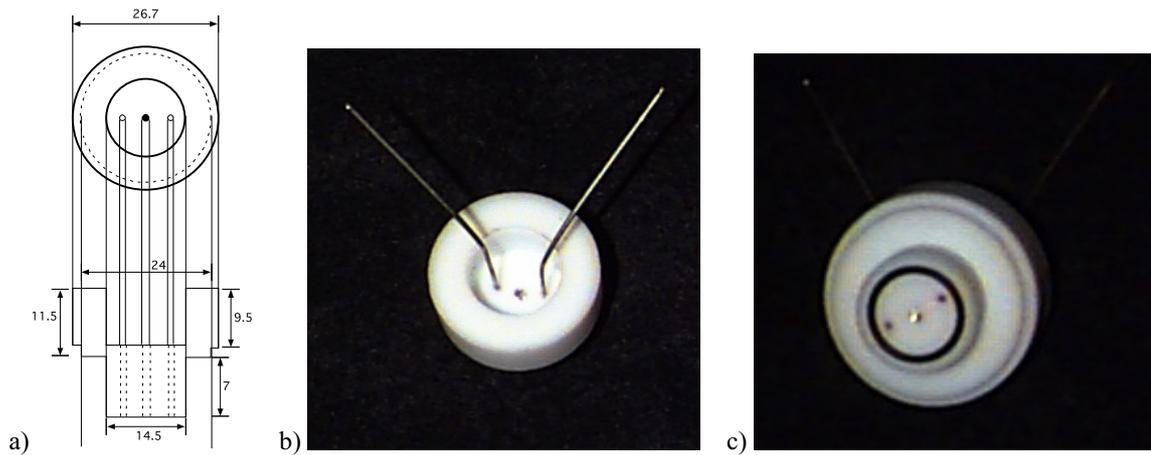


Abb. 5.4-3 a) Konstruktionszeichnung für den neuen Tauchkolben b) Foto von oben. Zu sehen sind Ein- und Auslas für das Zellmedium und die Referenzelektrode aus Platin in der Mitte. c) Foto von unten. Der schwarze O-Ring dichtet die entstehende Kammer aus Tauchkolben und Chip ab.

Der Tauchkolben wurde neu konstruiert, um den vorhandenen Platz in der Meßkammer optimal ausnützen zu können. Damit wurde es möglich, den Durchmesser der Meßkammer, die aus Tauchkolben und Chip gebildet wird (Abb. 5.4-3), auf 10mm zu vergrößern. Der Tauchkolben wurde aus Teflon gefertigt, da dieser chemisch möglichst resistent sein muß, damit keine unerwünschten chemischen Reaktionen stattfinden können.

Der verwendete LAPS-Chip ist von der Firma MDC und ist wie folgt aufgebaut. Auf ein 0,5 mm dickes Si-Substrat mit einem spezifischem Widerstand von 10-15 Ωcm ist eine SiO_2 Schicht (30 nm) und eine Si_3N_4 -Schicht (60 nm) aufgewachsen. Der ohmsche Kontakt auf der Rückseite wird durch ein feines Gitter aus Gold gebildet, welches thermisch eindiffundiert wurde. Die einzelnen LAPS-Chips weisen eine Größe von 20 x 20 mm auf.

Aussähen von zwei verschiedenen Zellarten auf einen LAPS-Chip

Zunächst wird die gesamte Meßkammer mit Helmanex gereinigt, und anschließend mit 70% Ethanol sterilisiert. Direkt vor dem Aussäen der Zellen wird die Meßkammer mit autoklaviertem Wasser mehrfach gespült.



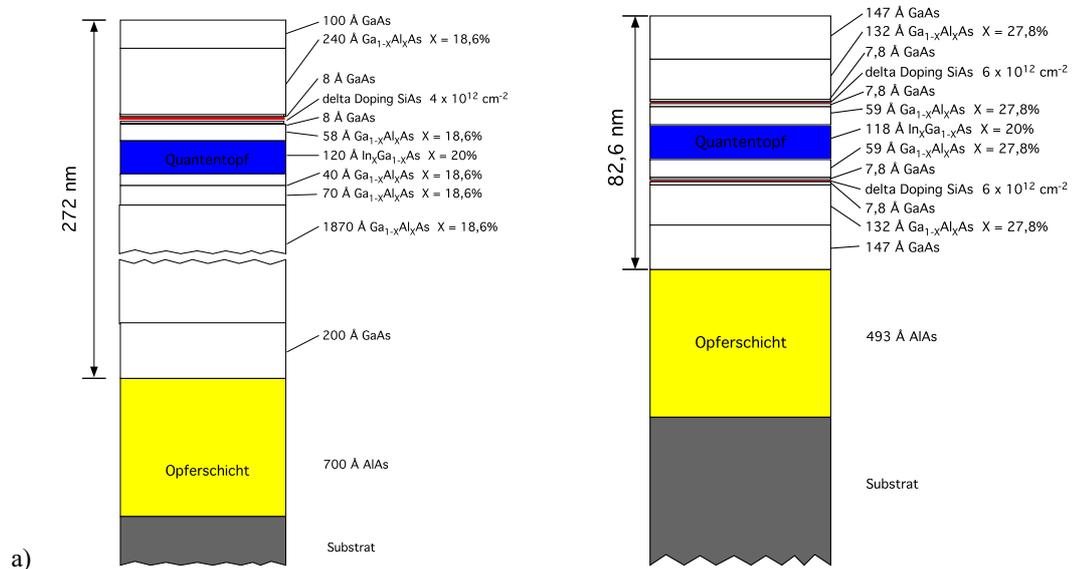
Abb. 5.4-4 Meßkammer mit eingesetzter Trennwand aus Teflon. Mit Hilfe dieser Trennwand lassen sich die beiden Halbräume der Kammer mit unterschiedlichen Zellen besiedeln.

In die Mitte auf den Chip wird eine Trennwand aus Teflon befestigt, die exakt mit den Rändern der Meßkammer abschließt. Durch die Hydrophobizität des Teflons ist eine zusätzliche Abdichtung nicht nötig. So entstehen zwei Halbräume auf dem Chip. Auf jeden Halbraum des Chips wird 0.1 ml einer Zellsuspension von 16×10^5 Zellen/ml aufgebracht. Nach einigen Stunden ist die Adhäsion der Zellen ausreichend, so daß die Teflonbarriere entfernt werden kann, ohne daß sich die Zellen wieder vermischen. Anschließend wird 4 ml frisches Medium hinzugefügt.

7 Halbleiterheterostrukturen und Halbleiter-Prozessschritte

Verwendete Halbleiterstrukturen für den FAPS

Nachfolgend sind schematisch der Schichtaufbau der verwendeten Halbleiterstrukturen dargestellt.



Die Halbleiterstruktur in Abb. 5.4-1 a) wurde von Infineon Technologies AG Corporate Research zur Verfügung gestellt. Die Halbleiterstruktur in Abb. 5.4-1 b) wurde in einer Kooperation mit Antonella Cavanna am Lehrstuhl Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN) am Institut CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE hergestellt.

Halbleiter-Prozessschritte

Photolack aufbringen

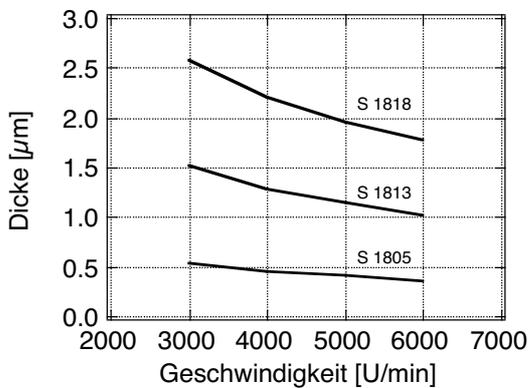


Abb. 5.4-2 Photolack- Schichtdicke für unterschiedliche Lacke bei verschiedenen Geschwindig-

wählen. Wobei darauf zu achten ist, daß immer ein Vorschleuder-Schritt (500 U/min, 1 s) vollzogen werden muß, damit der Lack homogen auf der gesamten Probe verteilt wird. Anschließend folgt der 30 s dauernde Schleuder-Schritt, bei dem der Lack bei der gewünschten Drehzahl auf die entsprechende Dicke gebracht wird. Danach wird der Lack entweder auf einer Heizplatte (90 °C, 5 min) oder im Ofen (90 °C, 1 h) getrocknet. Zum Entwickeln wird der Entwickler MF-321 benutzt.

Die Belichtungszeiten, um die Struktur der Masken mit einem „Mask-Aligners“ (Karl Suss MJB3, Suss Micro Tec, Garching Germany) in den Photolack zu übertragen, richten sich nach der Strukturgröße und der Dicke des aufgeschleuderten Lacks. Von der Belichtungszeit, der Lackdicke und der Strukturgröße hängt dann wiederum die Entwicklungsdauer ab. Beide Parameter (Belichtungszeit und Entwicklungsdauer) müssen für jede Struktur neu bestimmt werden.

Maskenherstellung

Zunächst sind chrombeschichtete Glassubstrate (Chrom Blanks) in 24 mm x 36 mm große Masken-Stücke zu schneiden. Die Chrom Blanks sind auf der Chrom beschichteten Seite mit einem Schutzlack vor Verschmutzung geschützt. Dieser muß nach dem Schneidevorgang entfernt werden. Dazu werden die Stücke mit der chrombeschichteten Seite nach unten in heißes Aceton gehalten. Dies ist wichtig, damit auf dem Lack befindlicher Schmutz beim Auflösen des Lacks nach unten fällt und nicht auf der Chromschicht zu liegen kommt. Anschließend sind die Masken mit

Photolack zu beschichten. Die Lackschicht sollte möglichst dünn sein, um die Belichtungszeiten „kurz“ halten zu können. Dazu wird Photolack mit der Bezeichnung 1805 bei einer Drehzahl von 7000 U/min aufgeschleudert und anschließend getrocknet. Danach wird die Maske in den Photoapparat eingelegt (Abb. 3.2-3). Für die verschiedenen Abbildungsverhältnisse ergeben sich dann folgende Belichtungszeiten.

Abbildungsverhältnis	Belichtungszeit
30 : 1	10 – 20 min
50 : 1	30 – 45 min
75 : 1	45 – 60 min

Tabelle 4: Belichtungszeiten für Lithografie-Masken in Abhängigkeit des Abbildungsverhältnisses

Die Belichtungszeiten hängen zudem auch von der Strukturgröße ab, die belichtet wird. Im allgemeinen gilt, je kleiner die Struktur, desto länger muß belichtet werden. Nach dem Belichten wird die Maske für ca. 1 – 3 min entwickelt. In wie weit die Entwicklung des Lacks abgeschlossen ist, kann unter dem optischen Mikroskop festgestellt werden. Nach dem Entwicklungsvorgang wird die Struktur durch Ätzen in die Chromschicht übertragen. Dazu wird die Maske in ein Bad mit Chromätze für ca. 3 min bei Raumtemperatur gelegt. Es ist zu überprüfen, ob die Chromschicht durch die Ätze vollständig entfernt wurde. Erst danach kann der restliche Photolack mit Aceton entfernt werden.

Ohmsche Kontakte

Zur Realisierung von ohmschen Kontakten wird im Wesentlichen vorgegangen wie bei der Herstellung der Rückkontakte (siehe 3.2.1). Es werden hier die Materialien Ni und AuGe mittels der „E-Gun“ aufgedampft. Aufgebracht werden ca. 120 Å Ni (30 Å Faktor 4, Rate < 0.3 Å/s) und anschließend AuGe (88:12) ca. 400 Å (200 Å Faktor 4, Rate < 1 Å/s). Dabei ist darauf zu achten, daß der Druck vor dem Aufdampfen $p < 4 \times 10^{-7}$ mbar ist.

Diffusionstiefe	150 °C	380 °C	400 °C – 440 °C
30 nm – 50 nm	2 – 3 min	3 – 5 min	
200 nm – 400 nm	2 – 3 min	5 min	5 min

Tabelle 5: Temperaturen mit zugehörigen Zeiten zum Eindiffundieren von ohmschen Kontakten.

Nachdem der Lift-off durchgeführt wurde, können die ohmschen Kontakte eindiffundiert werden. Dies geschieht unter Argon-Schutzgas. Um die Diffusionstiefe zu bestimmen, werden Temperaturschritte wie in Tabelle 5 gezeigt, benutzt.

Anorganische Beschichtungen

Die Prozeßtemperatur wurde auf 300 °C festgelegt und ein Arbeitsdruck von $p = 0.8$ mbar eingestellt. Die zugeleiteten Prozeßgase sind SiH_4 700 ccm und NH_3 14 ccm. Um eine möglichst gleichmäßige Schicht zu erhalten, werden zwei verschiedene Plasmen, ein hochfrequentes (HF = 13,65 MHz) und ein niederfrequentes (LF = 100 kHz) benutzt. Für die Plasmen lassen sich sowohl die Zeit wie auch die Leistung frei wählen. Benutzt wurden die Einstellungen HF 25 Watt 25 s und LF 25 Watt 15 s. Die gesamte Prozeßzeit wurde auf 15 min beschränkt. Dies führte zu Schichtdicken von ca. 200 nm.

GaAs Ätzen

Zum Ätzen von GaAs wurde eine Stammlösung aus 400 ml Wasser (H_2O) und 20 ml Schwefelsäure (H_2SO_4 96%) angesetzt. Direkt vor jedem Ätzvorgang wurden 21 ml dieser Stammlösung mit 1 ml Wasserstoffperoxid (H_2O_2 30%) versetzt. Mit diesem Mischungsverhältnis ergeben sich Ätzraten von 5 nm/s.

Reaktives Ionenätzen (RIE)

Um Si_3N_4 zu ätzen, wurde auf die Methode des reaktiven Ionenätzens zurückgegriffen. Als Ätzmasken können sowohl Hartmasken aus Metall wie auch Photolack benutzt werden. Bei der Verwendung von Photolack ist darauf zu achten, daß die Photolackschicht ca. 5 mal dicker ist als die zu ätzende Si_3N_4 -Schicht.

Bei den hier geätzten Si_3N_4 -Schichten von ca. 300 nm wurde eine Photolackmaske von ca. 1.8 μm Dicke aufgebracht. Vor dem Ätzvorgang sollte ein Druck von minde-

stens 1×10^{-5} mbar erreicht worden sein. Als Ätzgas wird CF_4 benutzt, welches mit einem Fluß von 50 sccm eingeleitet wird.

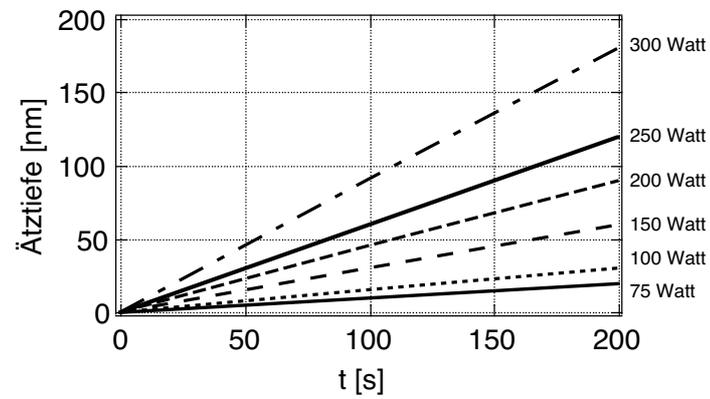


Abb. 5.4-3: Ätztiefe in Abhängigkeit der Leistung und der Zeit für Si_3N_4 .

8 Zur Zellkultur

Allgemeine Arbeitsmethoden in der Zellkultur sind in [28] ausführlich beschrieben. Daher wird hier darauf verzichtet. Es sollen hier lediglich die verwendeten Medien und Chemikalien, sowie besondere Methoden beschrieben werden, soweit diese in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind.

Medien

Medien für N1E-115 Zellen (Maus Neuroblastomazelllinie)

Kulturmedium:

DMEM für 5l + Aminosäuren-Mix 50 ml + 10% hitzeinaktiviertes FKS + 50 µg/ml Streptomycin + 50U/ml Penicillin

Medienzusatz:

1 Portion DMEM (für 5l)

HEPES 9,05g (7,6mM)

NaHCO₃ 12,6g (30mM)

AS-Mix 50ml

pH 7,4 mit 1M NaOH einstellen

5l Aqua dest. Zugeben

steril filtern

Aminosäure-Mix

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,2l]	Firma
L-Cysteine	175,64		1054	Sigma C-6852
L-Alanine	89,09		712	Sigma A-7469
L-Aspartic acid	133,1		1060	Sigma A-4534
L-Proline	115,1		920	Sigma P-5607
L-Glutamic acid	169,1		1350	Sigma G-5889
L-Asparagine	150,1		1351	Sigma A-4284

200ml destilliertes Wasser zugeben und im Ultraschallbad lösen und in 50ml Portionen bei -20°C einfrieren.

Splitten:

Einen Großteil des Mediums absaugen. Anschließend Zellen abklopfen (Die Verwendung von Trypsin ist nicht notwendig). Zellen lösen sich und schwimmen in Klumpen umher. Durch mehrfaches Aufsaugen und Ausblasen mit einer Pasteurpi-

pette lassen sich die Zellkluster auflösen, und die Zellen schwimmen einzeln im Medium. Zellen verdünnt wieder aussäen.

Einfrieren:

In Medium komplett + 10% DMSO

Extrazelluläre Normal-Lösung

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,1l]	Firma
NaCl	58,44	125	731	Merck 1.01540
KCl	74,56	1	7,456	Merck 1.05001
MgCl ₂	203,30	1	20,33	Merck 8.14733
Hepes	238,3	20	476	Sigma H-3375
D-Glucose	180,2	10	180	Sigma G-6152

pH mit NaOH auf 7,35 einstellen, sterilfiltern und in 10 ml Portionen einfrieren.

Extrazelluläre TEA-Lösung

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,1l]	Firma
CaCl ₂	147,02	20	294	Merck 1.02083
TEACl	165,7	100	1675	
4-AP	94,12	5	47,1	
Hepes	238,3	20	476	Sigma H-3375
MgCl ₂	203,30	1	20,33	Merck 8.14733
D-Glucose	180,2	10	180	Sigma G-6152

pH mit KOH auf 7,35 einstellen, sterilfiltern und in 10 ml Portionen einfrieren.

Intrazelluläre K-Glykonat-Lösung

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,1l]	Firma
K-Glykonat	234,24	110	2577	
EGTA	380,3	0,6	22,8	Sigma E-4378
Na-ATP	551,1	1	55,1	Sigma A-2383
Hepes	238,3	10	238,3	Sigma H-3375
MgCl ₂	203,30	5	102	Merck 8.14733

pH mit KOH auf 7,2 einstellen, sterilfiltern und in 2 ml Portionen einfrieren.

Intrazelluläre CsCl-BAPTA-Lösung

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,1l]	Firma
CsCl	168,36	110	1852	Merck 1.02041
CaCl ₂	147,02	1	14,7	Merck 1.02083
BAPTA	476,4	3,45	164	Sigma A-4926
Hepes	238,3	10	238,3	Sigma H-3375
Mg ₂ -ATP	567,2	5	283,6	

pH mit CsOH auf 7,2 einstellen, sterilfiltern und in 2 ml Portionen einfrieren.

Intrazelluläre KCl-BAPTA-Lösung

Substanz	M [g/mol]	c [mM]	m [mg/0,1l]	Firma
----------	-----------	--------	-------------	-------

KCl	74,56	110	820	Merck 1.05001
CaCl ₂	147,02	1	14,7	Merck 1.02083
BAPTA	476,4	3,45	164	Sigma A-4926
Hepes	238,3	10	238,3	Sigma H-3375
Mg ₂ -ATP	567,2	5	283,6	

pH mit KOH auf 7,2 einstellen, sterilfiltern und in 2 ml Portionen einfrieren.

Medium für Cytosensor-Mikrophysiometer-Messungen

Dieses Medium muß ungepuffert sein, damit eine pH-Änderung mit dem Cytosensor festgestellt werden kann. Hier wird Natriumbikarbonat durch Natriumchlorid substituiert.

Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma M-0894)

Für 1 Liter Medium:

Minimum Essential Medium + 820 mg NaCl (entspricht 14mM) + 1 l Millipore-Wasser

pH auf 7,3 mit NaOH oder HCl einstellen

Medien für CHO-K1- und CHO-M1-Zellen

Grundbestandteil ist 500 ml HAM's F-12 Medium mit Bicarbonat-Puffer (Biochrom FG 0815). Dem werden folgende Bestandteile zugesetzt.

	CHO-K1	CHO-M1
FCS	50 ml	50 ml
P/S	5 ml	5 ml
L-Glutamin	5 ml	5 ml
Geneticin		2,5 ml

Medium für SAOZ-Zellen

Grundbestandteil ist 500 ml Dulbecco's MEM (FG 0435). Dazu kommt 5 ml P/S und 50 ml FCS

Beschichtungen

Laminin-Beschichtung

- Zu beschichtendes Substrat reinigen und sterilisieren.
- Substrat mit 1% Laminin-Lösung bedecken und 1 bis 1,5 h bei Raumtemperatur einwirken lassen.
- Laminin-Lösung absaugen und Zellen sofort aussäen.

PDL-Beschichtung

- Zu beschichtendes Substrat reinigen und sterilisieren.
- Substrat mit Poly-D-Lysin-Lösung beschichten, dazu Lösung ca. 0,5 bis 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubieren.
- Substrat anschließend 3 mal mit sterilem Millipore-Wasser spülen. Substrat danach sofort mit Zellen besiedeln.

Weitere Chemikalien

Charbachol (Sigma C-4382)

Insulin (Sigma I-5500)

Buffilomycin (Calbiochem Cat. No. 1960000)

PMA (Biomol, PE160-0001)

Amiloride (Calbiochem 129876)

TNF- α (Sigma T-7539)

Hepes (Sigma H-3375)

FCS Fetal Bovine Serum (Sigma F-7524)

P/S Penicillin-Streptomycin Lösung (Sigma P-7539)

Geneticin Antibiotika (Sigma G-7034)



Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich hinsichtlich dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. H. Gaub, für die Betreuung dieser Arbeit, für die zahlreichen anregenden Diskussionen und die Unterstützung in allen Bereichen.
- M. George, für die vielen Diskussionen, die kompetente Beratung bei der Programmierung mit „LabView“ und „Igor“ und die gemeinsam durchgeführten Messungen.
- C. Kirchner, für die Entwicklung und Herstellung der organischen Schutzschichten und die daran gemeinsam durchgeführten Messungen, für seine stete Hilfsbereitschaft bei Problemen mit dem „Apfel“.
- A. Kardinal, für die Einführung und Unterstützung in der Zellkultur und die vielen Präparationen.
- Dr. M. Seitz, für die Entwicklung biokompatibler Schichten und die anregenden Diskussionen.
- Dr. W. Parak, für die hilfreichen Diskussionen, die Einführung auf dem Gebiet des LAPS und die gute Zusammenarbeit auch über große Entfernungen.
- Prof. Dr. J. Behrends und Dr. N. Fertig, für die Einführung in die patch-clamp Technik.
- Prof. Dr. A. Lorke und Dr. S. Böhm für die Zusammenarbeit im FAPS-Projekt.
- A. Kriele und PD. Dr. B. Lorenz für die Unterstützung bei den Arbeiten im Reinraum.
- PD. Dr. W. Aicher und Dr. O. Müller für die Zusammenarbeit im Cytosensor-Projekt.
- Dr. B. Helmreich und Dr. C. Greio am Institut für Wassergüte und Abfallwirtschaft der TU München für die Durchführung der Atom-Absorptions-Spektroskopischen Messungen.

-
- A. Cavanna am Laboratoire de Photonique et de Nanostructure (LPN) und H. Riechelt von Infineon Corporate Research für das Bereitstellen der GaAs-Heterostrukturen.
 - Prof. Dr. J. Feldmann, der mich während der Umbaumaßnahmen in seinem Labor aufnahm.
 - Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.
 - Allen die mich während dieser Zeit andauernd moralisch und allgemein unterstützt haben, insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin Angelika.

