

Zell-Halbleiter-Hybride

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Lehrstuhl Professor H. Gaub)

Wolfgang J. Parak
Dachau

München
03.08.1999

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von elektrischen Schnittstellen zwischen lebenden Zellen und Halbleitersensoren, sogenannten Zell-Halbleiter-Hybriden. Dazu sollen Zellen auf der Oberfläche eines Sensors kultiviert und deren extrazelluläres Potential gemessen werden. Das Projekt wurde in zwei Teilaspekte aufgliedert: (i) die Kultur von Zellen auf Halbleiteroberflächen und (ii) die Entwicklung geeigneter Sensoren.

Als Modellsystem für elektrisch aktive Zellen wurden drei verschiedene Zelltypen verwendet und die Präparationsmethoden dazu etabliert: (i) Herzmuskelzellen, (ii) NRK-Fibroblasten und (iii) striatale Neurone. Zur Charakterisierung der elektrischen Zelleigenschaften wurde ein patch-clamp System aufgebaut und damit Aktionspotentiale der Zellen untersucht. Die Adhäsionseigenschaften der Zellen auf verschiedenen relevanten Substraten (Glas, Silizium mit Oxid-/ Nitrid-Beschichtung) wurden mit Hilfe der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) und dem Rasterkraft-Mikroskop (AFM) charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, daß NRK-Fibroblasten ähnliche Eigenschaften wie Schrittmacher-Herzmuskelzellen haben und sie damit als eine dauerhaft in Kultur haltbare Zell-Linie anstelle der jedesmal frisch zu präparierenden Herzmuskelzellen verwendet werden können. Insbesondere bei Nervenzellen werden die elektrischen Eigenschaften der Zelle durch das unterliegende Substrat beeinflusst. So wurde gezeigt, daß die Entwicklung von striatalen Neuronen auf oxi-/ nitridierten Silizium-Unterlagen im Vergleich zu Glas-Unterlagen verzögert ist. Mit den ermittelten elektrischen und geometrischen Parametern der Zell-Halbleiter-Kontaktzone wurden mit Hilfe eines von Fromherz aufgestellten Ersatzschaltbildes die zu erwartenden extrazellulären Potentiale abgeschätzt. Es folgt, daß Sensoren mit einer Potentialempfindlichkeit um $100 \mu\text{V}$, einer Zeitauflösung von ca. 1 ms und einer Ortsauflösung um $10 \mu\text{m}$ nötig sind.

Bisherige Oberflächenpotential-Sensoren weisen einen konzeptionellen Mangel auf. Zu jeder aktiven Meßposition ist mindestens eine eigene Zuleitung nötig, weshalb aus Platzgründen die Zahl der aktiven Meßpositionen und damit die Möglichkeit orts aufgelöster Messungen eingeschränkt ist. Es wurden zwei Halbleiter-basierte Sensorsysteme weiter- bzw. neuentwickelt, bei welchen die Zahl der nötigen Zuleitungen bei gleichbleibender Zahl aktiver Meßpositionen drastisch reduziert und dadurch erhöhte Integrationsdichten möglich sind: (i) der Licht-adressierbare potentiometrische Sensor (LAPS) und (ii) der Feldeffekt-adressierbare potentiometrische Sensor (FAPS).

Mit dem LAPS können Oberflächenpotentiale über die Bestimmung der Amplitude eines Photostroms gemessen werden, wobei der Photostrom durch lokale Beleuchtung eines Teils der Sensor-Oberfläche mit einem Lichtzeiger erzeugt wird. Durch Positionierung des Lichtzeigers kann dabei eine beliebige Meßposition adressiert werden. Die Funktionsweise des LAPS wurde durch Berechnungen zur Potentialempfindlichkeit und zur Ortsauflösung analysiert. Dabei zeigt sich, daß die Ortsauflösung durch Verwendung dünner Halbleiterschichten mit niedriger Minoritätsladungsträger-Diffusionslänge gesteigert werden kann. Die Potentialempfindlichkeit ist bei niedriger Dotierung günstiger, wobei allerdings Dotierungen $< 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ keinen verbessernden Effekt mehr zeigen. Zur experimentellen Charakterisierung des LAPS wurden Halbleitermaterialien verschiedener Dicken und Dotierungen vermessen. Die Potentialempfindlichkeit konnte dabei durch ein

Differenzmeßverfahren mit zwei Lichtzeigern weiter gesteigert werden. Sie skaliert linear mit der Größe der Potential-sensitiven Oberfläche. Die Ortsauflösung wurde experimentell durch Messung der exponentiellen Abklinglänge der Ladungsträgerdichte an einer Kante gemessen. Bei 10 kHz Lasermodulation, ca. 1 mW Laserleistung und einer Potential-sensitiven Oberfläche von ca. 3 mm², wurde bei einer Zeitauflösung von 0,3 ms eine Potentialempfindlichkeit von $\approx 80 \mu\text{V}$ und eine Ortsauflösung von $\approx 20 \mu\text{m}$ erreicht. Die gewonnenen experimentellen Ergebnisse stimmen gut mit den theoretischen Aussagen überein.

Der FAPS basiert im wesentlichen auf Feldeffekt-Transistor-Strukturen mit gemeinsam benutzten Gate-Elektroden und Feldeffekt-Kanälen. Es wurde ein Konzept zum Aufbau eines FAPS basierend auf GaAs mit der Technik des epitaktischen lift-offs entwickelt und dessen Funktionsweise anhand erster Messungen demonstriert. Die cytotoxischen Eigenschaften der GaAs- Oberfläche konnten durch Beschichtung mit PMMA unterdrückt werden.

Mit dem LAPS wurden elektrisch aktive Herzmuskelzellen untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß sich durch die Kontraktion der Herzzellen die Fokussierung des Lichtzeigers und damit die Amplitude des Photostroms ändert. Es wurde abgeschätzt, daß dieser optische Effekt die eigentlich zu messenden extrazellulären Potentiale überlagert. Mit einem als pH-Sensor eingesetzten LAPS-System wurden Auswirkungen bestimmter Cytokine auf den Stoffwechsel von synovialen Fibroblasten, durch Messung der „sauren“ Stoffwechselprodukte untersucht.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	
1.1	Einleitung	6
1.2	Messung der elektrischen Aktivität einzelner Zellen	8
1.3	Ziel des Projektes	10
2	Charakterisierung elektrisch aktiver Zellen	
2.1	Aktionspotentiale	12
2.2	Präparation und Kultur	19
2.3	Aufbau eines patch-clamp Systems zur Messung von Aktionspotentialen	20
2.4	Vergleich der Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen und NRK-Fibroblasten	22
2.5	Untersuchung der Aktionspotentiale von Nervenzellen	27
3	Kopplung elektrisch aktiver Zellen an Sensor-Oberflächen	
3.1	Elektrisches Ersatzschaltbild	34
3.2	Untersuchungen zur Zelladhäsion mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) und dem Rasterkraft-Mikroskop (AFM)	36
3.3	Simulation extrazellulärer Potentiale	42
3.4	Zelladhäsion auf Galliumarsenid	46
4	Der Licht-adressierbare potentiometrische Sensor (LAPS)	
4.1	Funktionsweise	47
4.2	Analyse der Oberflächenpotential-Empfindlichkeit	50
4.3	Analyse der Ortsauflösung	57
4.4	Experimenteller Aufbau	60
4.5	Bestimmung der Oberflächenpotential-Empfindlichkeit	67
4.6	Experimente zur Ortsauflösung	73
5	Der Feldeffekt-adressierbare potentiometrische Sensor (FAPS)	
5.1	Funktionsweise	78
5.2	Experimenteller Aufbau	82
5.3	Charakterisierung	83
6	Messungen mit Zell-Halbleiter-Hybriden	
6.1	Herzmuskelzellen	84
6.2	Synoviale Fibroblasten	92
7	Ausblick	
7.1	Vergleich verschiedener Oberflächenpotential-Sensoren	93
7.2	Wie sieht ein „ideales“ LAPS-System aus	96
8	Literaturangaben	

Danksagung

Ich möchte mich für ihre Unterstützung dieser Arbeit bedanken bei:

- Prof. Dr. H. Gaub („Gambi“) für die Überlassung des Projektes, die Betreuung der Arbeit, für viele anregende und hilfreiche Diskussionen und Unterstützung in allen Bereichen.
- M. George („Schorschi“) für die vielen gemeinsam in der „LAPS-Universität“ verbrachten Stunden, die unzähligen Diskussionen und die gemeinsamen Messungen, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen wäre.
- A. Kardinal („Angi“) für die Unterstützung in der Zellkultur und die vielen Präparationen.
- S. Kölblin („Kollege Kölbelmeier“), S. Dannöhl, S. Kudera („Kokuju“), C. Schmidt, A. Mast und R. Wöhrl für die Unterstützung des Projektes im Rahmen ihrer Diplomarbeit bzw. als Werkstudent.
- Dr. M. Seitz für die Zusammenarbeit zur Erzeugung biokompatibler Schichten und viele anregenden Diskussionen.
- J. Domke und C. Rotsch aus der Gruppe von PD. Dr. M. Radmacher für die AFM-Messungen.
- J. Wieser vom Elektroniklabor für die Hilfe und Entwicklung des LAPS-Vorverstärkers.
- M. Benoit („Marschall“), H. Clausen-Schaumann („Hank“), M. Kudera („Kokuse“), R. Matzke und Dr. M. Rief für viele anregende Diskussionen.
- Dr. U. Hofmann für die Einführung in die Zellkultur.
- Dr. J. Behrends („Kollege Behrends“) für das Beibringen der patch-clamp Technik, die Nervenzell-Präparationen und vieles mehr.
- Dr. E. Rumpel, A. Gruenewald, L. Kargel vom Lehrstuhl von Prof. Dr. G. ten Bruggencate für die Präparation von Neuronen.
- PD. Dr. A. Lorke, S. Böhm für die Zusammenarbeit im FAPS-Projekt, für das Beibringen der Grundlagen des Arbeitens im Reinraum und viele stimulierende Diskussionen.
- Dr. R. Blick, A. Kriehle und Prof. Dr. J. Kotthaus für interessante Diskussionen über Halbleiterphysik.
- G. Wiegand und Dr. S. Gritsch vom Lehrstuhl Prof. Dr. E. Sackmann für die zusammen durchgeführten RICM-Experimente.
- Dr. A. Offenhäusser und Dr. C. Sprössler für die FET-Messungen an ihrem Aufbau.
- Dr. M. Denyer und Dr. M. Riehle für das Beibringen der Herzmuskelzell-Präparation
- N. Fuchs, S. Hörlein, Dr. R. Metzger und Dr. L. Laxhuber für die Cytosensor-Messungen.
- Dr. O. Müller und PD. Dr. W. Aicher für die Zusammenarbeit am Cytosensor-Projekt.
- Dr. A. de Roos und Dr. L. Theuvenet für die Zusammenarbeit mit NRK-Fibroblasten.
- H. Geiger und Dr. F. Kaesen vom Lehrstuhl Prof. Dr. I. Eisele für die Herstellung von Oxid- und Nitrid-Schichten auf Silizium.
- I. Gerhard und PD. Dr. W. Moritz für die Zusammenarbeit zur Untersuchung der LAPS-Ortsauflösung.
- Prof. Dr. K. Jacobson und Dr. J. Owicki für viele anregende Diskussionen
- Dr. A. Hache vom BMBF für die Unterstützung des Projektes.
- Dr. F. Thomanek, Dr. W. Potzel und Dr. M. Steiner, bei denen ich als Werkstudent vieles lernen konnte.
- Allen Mitarbeitern des Lehrstuhl Gaub für das angenehme Klima.
- J. Behrends, H. Gaub, M. George, A. Lorke und meiner Familie für das Korrekturlesen der Arbeit.

1 Einführung

1.1 Einleitung

Für den menschlichen Körper ist es von großer Wichtigkeit, Information über seine Umgebung zu erhalten. Ein großer Teil seiner Fähigkeit zur Wahrnehmung der Umwelt basiert dabei auf den hochspezialisierten Sinnesorganen. So werden Geräusche mit dem Ohr, Gerüche mit der Nase, u.s.w. registriert und zur Verarbeitung über Nervenbahnen an das Hirn weitergeleitet. Die „Datenverarbeitung“ im Körper läuft dabei entweder elektrisch (Nervenleitung) oder chemisch (Ausschüttung von Transmittern oder Hormonen) ab [1].

Im Gegenzug ist es schon immer ein Traum der Menschheit gewesen, Kontakt zum Inneren des Körpers aufzunehmen und Information auszutauschen. Man denke dabei nur an den Leidener Trichter, welcher „Wissen“ und „Information“ direkt in das Gehirn eines Menschen ablegen soll, ohne den aufwendigen Weg des Lernens gehen zu müssen. Oder an das futuristische Bild eines gläsernen Menschen, bei welchem über eine in den Körper implantierte Schnittstelle medizinisch relevante Daten, wie z.B. der Blutzucker-Gehalt, „online“ ausgelesen und die Daten über das Internet zu einem Arzt übermittelt werden können. Dies setzt immer eine Schnittstelle voraus, welche eine Kommunikation mit dem Körper ermöglicht. Da in der Gegenwart der Hauptteil aller Datenverarbeitung auf elektronischem Wege stattfindet, sollte diese Schnittstelle so aufgebaut sein, daß sie mit Zellen des Körpers kommuniziert, die Information in ein elektrisches Signal wandelt und diese an ein Meßsystem außerhalb der Körpers weiterleitet.

Wie könnte nun eine zelluläre Schnittstelle aussehen? Zellen reagieren in vielfältiger Weise auf Veränderung ihrer Umwelt. Wird z.B. durch äußere Einflüsse der Stoffwechsel von Zellen erhöht, so scheiden sie verstärkt „saure“ Stoffwechselprodukte wie Milchsäure, Kohlensäure und Protonen aus [2-4]. Andere Zellen ändern bei speziellen Umwelteinflüssen ihr Membranpotential, d.h. die Spannung zwischen dem Zellinneren und dem die Zellen umgebenden Medium [5]. Um nun mit einer Zelle kommunizieren zu können, braucht man einen Sensor, der die Reaktionen der Zelle detektieren kann. Für die beiden gerade beschriebenen Zellantworten wäre dazu ein pH- bzw. ein Potential-Sensor nötig. Während Zellen auf Wirkstoffe mit einer Änderung der Ausscheidungsrate ihrer Stoffwechselprodukte im Minuten-Bereich reagieren, sind Reaktionen im Membranpotential viel schneller (Millisekunden bis Sekunden-Zeitfenster) und bieten dadurch die Möglichkeit zur Kommunikation mit besserer Zeitauflösung¹.

¹ Als Beispiel einer zellulären Schnittstelle sei hier kurz ein Duftsensoren erwähnt. Die menschliche Nase ist ohne weiteres in der Lage, zwischen vielen Gerüchen zu unterscheiden, was mit herkömmlichen Gassensoren [6-8] äußerst schwierig ist, besonders hinsichtlich der Selektivität. In einer kürzlich vorgestellten Arbeit [9] wurde ein Sensor bestehend aus einem künstlich in den Winterschlaf versetzten Kartoffelkäfer auf einem Feldeffekt-Transistor (FET) vorgestellt. Kartoffelkäfer reagieren mit ihren Sinneszellen auf bestimmte Düfte, z. B. Sexualduftstoffe anderer Käfer, äußerst empfindlich, was sich in einer veränderten Spannung zwischen Antennen und Rumpf äußert. Mit Hilfe eines nachgeschalteten FETs konnten diese Spannungsänderungen präzise gemessen werden. Einen Sensor mit ähnlichen Qualitäten komplett aus künstlichen Materialien herzustellen ist bisher nicht möglich. Eine potentielle Anwendung eines derartigen Duftsensors ist die Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft.

Umgekehrt können Zellen auch durch elektrische Stimulation von außen erregt werden. Daher wäre eine Schnittstelle vorteilhaft, die eine elektrische Wechselwirkung zwischen dem Außenraum und dem Inneren von Zellen ermöglichen würde.

Auf makroskopischer Ebene sind Messungen der elektrischen Aktivität von Zellen längst gängige klinische Praxis. Man denke dabei nur an die Elektrokardiographie (EKG), bei der Potentialänderungen durch Ströme im Herzmuskel gemessen werden [1, (K.7.5, S.116)]. Prinzipiell sind solche Messungen denkbar einfach, wie in Abb. 1.1.1 dargestellt ist. Andere medizinische Techniken sind die Elektromyographie (EMG), die Elektroenzephalographie (EEG) und die Elektroneurographie (ENG), bei denen Ströme in Skelettmuskeln, im Hirn und in Nervensträngen gemessen werden [1, (K.7.5, S.116)]. Es ist also medizinisch relevant, die elektrische Aktivität von Zellen zu messen. Dabei sind noninvasive, d.h. möglichst schonende und langzeitstabile Meßtechniken wünschenswert.

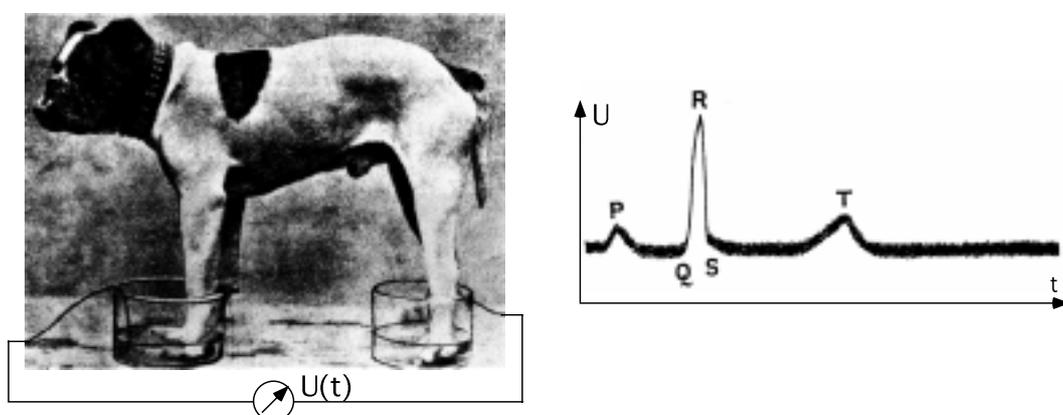


Abbildung 1.1.1: An einem Hund 1909 von A. D. Waller aufgenommenes EKG. Dabei wurde die Spannung U zwischen zwei Füßen gemessen, die zur Kontaktierung in einem Salzwasserbad standen (entnommen aus [10]).

Zum detaillierten Verständnis von elektrischen Schnittstellen mit Zellen bietet sich die Untersuchung der elektrischen Aktivität einzelner Zellen an.

1.2 Messung der elektrischen Aktivität einzelner Zellen

(a) Patch-clamp und intrazelluläre Mikroelektroden

Die direkteste Möglichkeit zur Untersuchung der elektrischen Aktivität von Zellen ist die Messung ihres Membranpotentials. Klassische Ansätze basieren auf dem Einstechen von feinen, mit Elektrolyt gefüllten Glaskapillaren in das Innere der Zelle [11]. Dabei ist der Innenraum der Zelle über den Elektrolyt in der Glaskapillare ohmsch kontaktiert und das Membranpotential kann direkt durch Messung der Spannung zwischen Glaspipette und einer Referenzelektrode im Medium um die Zelle bestimmt werden. Ein Nachteil dieser sogenannten intrazellulären Mikroelektroden ist offensichtlich: Durch das Einstechen einer Glaskapillare mit einem Spitzendurchmesser von ca. $0,5 \mu\text{m}$ in eine Zelle wird ein Loch in ihrer Membran erzeugt, welches besonders für kleine Zellen mit einem Durchmesser unter $10 \mu\text{m}$ einen drastischen Eingriff bedeutet.

Ein entscheidender Durchbruch wurde mit der 1976 von Neher und Sakmann entwickelten patch-clamp Technik erzielt [12, 13]. Hierbei wird die Spitze der Glaskapillare nicht mehr in die Zelle eingestochen, sondern an die Zellmembran gedrückt. Durch Ansaugen wird dann ein leichter Unterdruck in der Glaspipette erzeugt und damit die Zellmembran fest an die Spitze angeschmiegt. Wird nun für eine Ganzzell-Ableitung der Membranfleck („patch“) unter der Kapillarenspitze durch starkes Ansaugen zerrissen, besteht ein direkter ohmscher Kontakt zwischen dem Zellinneren und dem Elektrolyt in der Pipette. Gegenüber intrazellulären Mikroelektroden ist die patch-clamp Technik viel schonender und der Kontakt zwischen Pipette und Zelle ist so dicht, daß Leckströme in das die Zelle umgebende Medium nahezu unterbunden sind.

Beide Methoden bieten die Möglichkeit zur direkten Messung des Membranpotentials und damit zur Beobachtung der elektrischen Aktivität einzelner Zellen. Die Potentialauflösung ist dabei im Vergleich zu anderen Meßmethoden optimal. Durch die Kapazität der Pipettenspitze ist die Zeitauflösung typischerweise auf 10 kHz bzw. $0,1 \text{ ms}$ limitiert. Dies ist für die meisten Anwendungen ausreichend, da Aktionspotentiale, d.h. aktive Änderungen des Membranpotentials, im Millisekunden-Zeitbereich ablaufen.

Die Pipetten werden in der Praxis mit Mikromanipulatoren an die Zellen angenähert. Durch Drift der Pipettenposition wird der elektrische Kontakt zwischen Zelle und Pipette mit der Zeit unweigerlich elektrisch undicht, und es setzen Leckströme ein. Typischerweise sind Messungen bis zu einigen Stunden möglich. Nach jeder Messung muß eine neue Pipette verwendet werden, da mit Pipettenspitzen, die durch Reste der Zellmembran verunreinigt sind, keine elektrisch dichten Kontakte an eine neue Zelle mehr möglich sind. Auch sind Zellen nach Entfernung der Pipette so weit geschädigt, daß in der Regel keine zweite Messung an derselben Zelle sinnvoll ist. Es kann also nicht schnell hintereinander das Membranpotential einer Zelle oder eines Zellverbandes an mehreren Stellen gemessen werden. D.h. es gibt keine Rastermöglichkeit zur Abbildung seiner räumlichen Verteilung [14, 15]. Zwar kann durch die Verwendung von mehreren Pipetten an einigen wenigen Stellen gleichzeitig gemessen werden [16, 17], wobei aber aus Platzmangel nur eine limitierte Zahl von Mikromanipulatoren nebeneinander aufgebaut werden können.

(b) Potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Änderungen des Membranpotentials einer Zelle können Änderungen ihrer optischen Eigenschaften bewirken [18]. Um diese Effekte zu verstärken, werden Farbstoff-Moleküle in die Zelle injiziert. Am gebräuchlichsten sind Potential-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe, d.h. Moleküle, deren Fluoreszenz-Eigenschaften vom Membranpotential der Zelle abhängig sind [19-21]. In der Literatur werden dazu verschiedene Funktionsmechanismen beschrieben [22]. Gängige Potential-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe bieten Potentialempfindlichkeiten im Millivolt-Bereich [23] und einige zehntel Millisekunden Zeitauflösung [24]. Sie ermöglichen auch orts aufgelöste Messungen. Durch Aufnahme des Fluoreszenzlichts mit einem optischen Mikroskop und einer nachfolgenden CCD-Kamera können so Bilder von Membranpotential-Verteilungen innerhalb einzelner Zellen und Zellverbände aufgenommen werden. Da die Ortsauflösung hier prinzipiell nur durch die Auflösung des optischen Mikroskops beschränkt ist, liegt sie unter 1 μm [25].

In die Zelle eingebrachte Farbstoffe bleichen bei Beleuchtung aus und können cytotoxisch sein. Zur Zeit werden verbesserte Farbstoffe entwickelt, langzeitstabile Messungen sind aber nach wie vor problematisch [26, 27].

(c) Extrazelluläre Techniken

Beide gerade beschriebenen Techniken setzen einen Zugang zum Inneren der Zelle voraus. Sie stellen damit einen Eingriff in die Zelle dar. Dadurch sind sie nur bedingt noninvasiv und in ihrer Langzeitstabilität auf jeden Fall stark eingeschränkt. Techniken ohne Kontaktierung des Zellinneren, also extrazelluläre Methoden wären daher wünschenswert.

Änderungen des Membranpotentials einer Zelle bewirken auch eine Änderung des elektrischen Potentials außerhalb der Zelle [28]. So wurde z.B. gezeigt, daß eine auf die Gate-Elektrode eines Feldeffekt-Transistors (FET) gesetzte Blutegel-Nervenzelle durch Änderung ihres extrazellulären Potentials den FET schalten kann [28]. Ebenso können extrazelluläre Potentiale auch durch Metall-Mikroelektroden aufgezeichnet werden [29].

Allgemein wird für Messungen extrazellulärer Potentiale ein Sensor benötigt, welcher Potentiale in wäßriger Umgebung wie dem Zell-Medium detektieren kann.

1.3 Ziel des Projektes

Ziel des hier diskutierten Projekts ist es, Zell-Halbleiter-Hybride und damit eine elektrische Schnittstelle zur noninvasiven Kommunikation mit einzelnen Zellen zu entwickeln und zu untersuchen. Dazu sollen Zellen auf die Oberfläche eines Halbleiter-Sensors aufwachsen und ihre elektrischen Signale extrazellulär und ortsaufgelöst gemessen werden, vgl. Abb. 1.3.1.

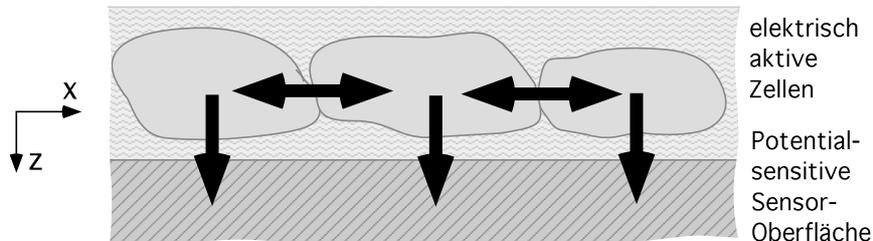


Abbildung 1.3.1. : Kommunikation zwischen elektrisch aktiven Zellen und einer Potential-sensitiven Sensoroberfläche.

Zum Erreichen dieses Ziels sind mehrere Schritte nötig. So müssen zum Einen geeignete Kulturen elektrisch aktiver Zellen etabliert und charakterisiert werden. Parallel dazu muß ein geeigneter Oberflächenpotential-Sensor mit Ortsauflösung entwickelt und dessen Empfindlichkeit getestet werden. Schließlich sollen Zellen auf der Oberfläche des Sensors kultiviert und damit extrazelluläre Potentiale gemessen werden.

Als Modellsystem elektrisch aktiver Zellen sind leicht präparierbare und einfach handhabbare Zellen wünschenswert, die langzeitstabil auf Halbleiter-Oberflächen kultiviert werden können. Durch Untersuchungen ihrer elektrischen Eigenschaften und ihrer Haftung auf Halbleiter-Oberflächen sollen dann Vorhersagen über die zu erwartenden extrazellulären Potentiale getroffen werden.

Zur Detektion extrazellulärer Potentiale in wäßriger Umgebung wird ein planarer Oberflächenpotential-Sensor benötigt. Im Prinzip stehen mit Feldeffekttransistor- und Mikroelektroden-Feldern, mit denen bereits erfolgreich extrazelluläre Potentiale aufgezeichnet werden konnten, solche Sensoren zur Verfügung. Allerdings haben sie den Nachteil einer beschränkten Anzahl aktiver Meßpositionen auf ihrer Oberfläche, wodurch ihre „Rasterfähigkeit“ zu ortsaufgelösten Potential-Messungen eingeschränkt ist. Besonders wenn man mit einzelnen Zellen kommunizieren möchte, wäre eine gute Ortsauflösung aber wünschenswert. Es soll in dieser Arbeit daher ein Sensorsystem entwickelt werden, welches ortsaufgelöste Potential-Messungen an möglichst vielen Punkten der Sensoroberfläche zuläßt. Dazu sollen Prototypen aufgebaut und deren Potentialempfindlichkeit und Ortsauflösung untersucht werden.

Schließlich sollen die beiden eben beschriebenen Schritte zusammengefaßt werden, indem Zellen auf der Oberfläche des entwickelten Potential-Sensors kultiviert werden und das extrazelluläre Potential einzelner Zellen detektiert wird, vgl. Abb. 1.3.1. Für einen in dieser Weise als Zell-Halbleiter-Hybrid aufgebauten Sensor zur langzeitstabilen und ortsaufgelösten Messung der elektrischer Aktivität einzelner Zellen gäbe und gibt es zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten:

Voraussetzung für den Einsatz von Zell-Halbleiter-Hybriden als Biosensoren ist, daß elektrisch aktive Zellen die Dynamik ihres Membranpotentials unter Einwirkung bestimmter Umwelteinflüsse, wie der Zugabe von Pharmaka ändern. Dies ist z.B. bei Herzmuskelzellen der Fall, welche nach Stimulation mit Adrenalin ihre Pulsfrequenz erhöhen [1]. Mit dem Sensor sollen nun diese Änderungen im extrazellulären Potential der Zellen abgefragt werden [5, 30-33]. In großflächig verknüpften Netzwerken von Zellen lösen nicht alle Zellen synchron Aktionspotentiale aus. Vielmehr breiten sich Aktionspotentiale mit endlicher Geschwindigkeit über das Netzwerk aus. Daher ist es sinnvoll gezielt das extrazelluläre Potential einzelner Zellen abzufragen, anstatt das mittlere extrazelluläre Potential zu messen. Zellen reagieren sehr spezifisch auf bestimmte Wirkstoffe. In Biosensoren, die aus Zell-Halbleiter-Hybriden aufgebaut sind, ist die Rolle der lebenden Zellen dann die von Signalwandlern, -filtern und -verstärkern. Derartige Biosensoren zeichnen sich damit durch hohe Selektivität und Sensitivität aus.

Im menschlichen Hirn sind Millionen von Nervenzellen miteinander verschaltet. Die Kommunikation derartig komplexer neuronaler Netzwerke ist bisher noch nicht im Detail verstanden, besonders da die einzelnen Verschaltungen dynamisch und lernfähig sind [1, (K.8.6, S.137)]. Eine Möglichkeit zu weiterem Verständnis ist die Untersuchung kleiner Netzwerke in vitro. So wäre es wünschenswert, Nervenzellen auf einer Sensoroberfläche unter möglichst natürlichen Bedingungen aufwachsen lassen zu können, welche Verbindungen untereinander eingehen und so miteinander kommunizieren können. Mit orts- und zeitaufgelöster Detektion der extrazellulären Potentiale einzelner Zellen könnte dann gezielt die Signalausbreitung zwischen Zellen untersucht werden. Dazu wäre eine langzeitstabile Kontaktierung einzelner Neurone nötig.

Mit langzeitstabilen Verbindungen zwischen Zellen und elektrischen Detektions- und Stimulationssystemen wird auch die Entwicklung von Neuroprothesen angestrebt. Da durchtrennte Nervenzellen nur bedingt regenerationsfähig sind [34], wäre mit Neuroprothesen eine Überbrückung zwischen Defektstellen denkbar [35-37]. Ein eingebauter Halbleitersensor könnte Signale von Nervenzellen an der Schnittstelle aufnehmen, mit einem integrierten Computer verarbeiten und mit einem Stimulator Signale an andere Nervenzellen weitergeben. Zur Zeit sind Hörprothesen [35, 36] bereits weit fortgeschritten, während Sehprothesen wie Retinaimplantate [38, 39] noch in der Entwicklungsphase stehen. Auch hier wäre die Möglichkeit zur gezielten Kontaktierung einzelner Neurone extrem hilfreich².

² Könnten z.B. die Nervenzellen, welche die Kontraktion von Muskelfasern steuern, nur als ganze Bündel kontaktiert werden, wären nur grob-motorische Bewegungen möglich.

2 Charakterisierung elektrisch aktiver Zellen

2.1 Aktionspotentiale

Die elektrischen Eigenschaften von Zellen sind wesentlich durch ihre Zellmembran bestimmt. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit Poren durch eingelagerte Proteine. Dabei lässt sich die Lipidmembran durch eine Kapazität C_M und die Poren bzw. Kanäle durch einen Widerstand R_M beschreiben, vgl. Abb. 2.1.1. Während die spezifische Membrankapazität, bestimmt durch die Dicke und Dielektrizitätskonstante der Lipiddoppelschicht, bei allen Zellen im Bereich um $c_M \approx 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ liegt [40, (K.1, S.9)], variiert die Zahl der Kanäle und damit die spezifische Leitfähigkeit g_M stark zwischen unterschiedlichen Zellen.

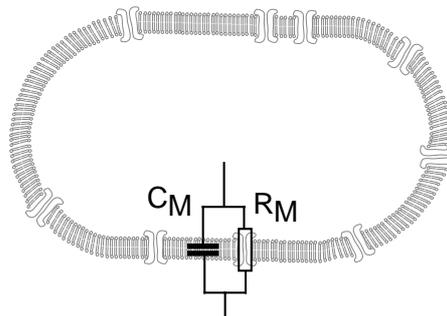


Abbildung 2.1.1: Elektrisches Ersatzschaltbild für die Zellmembran

Zellen sind unter physiologischen Bedingungen meist von einer Kochsalz-ähnlichen Lösung, bestehend aus Na^+ - und Cl^- -Ionen umgeben. Ihr Innenraum dagegen ist mit K^+ - und organischen Anionen gefüllt, vgl. Tab. 2.1.1. Im Gleichgewicht gibt es Poren in der Membran, die durchlässig für K^+ -Ionen, aber undurchlässig für Na^+ -Ionen sind. Durch osmotischen Druck getrieben diffundieren so K^+ -Ionen aus dem Innenraum der Zelle in die extrazelluläre Lösung, Na^+ -Ionen dagegen können nicht durch die semipermeable Membran gelangen. Durch den Transport positiver Ladung nach außen wird ein rücktreibendes elektrisches Feld aufgebaut, und es stellt sich ein Gleichgewicht ein [1, (K.7.3, S.108), 40, (K.1, S.11), 41, (K.23.12, S.264), 42, (K.5, S.61)]. Damit ist der Innenraum der Zelle negativer als der Außenraum und das als Potentialdifferenz zwischen Innerem und Äußerem der Zelle definierte Membranpotential beträgt im Ruhezustand typischerweise $U_{MR} \approx -70 \text{ mV}$. Dies entspricht in etwa dem Nernst-Potential von K^+ -Ionen. Das Nernst-Potential beschreibt die Gleichgewichtsspannung $U_{MR}(j)$ an einer für Ionen j permeablen Membran:

$$U_{MR}(j) = (RT/z_j F) \times \ln(c_{Za}(j)/c_{Zi}(j)) \quad (0)$$

c_{Za} und c_{Zi} sind dabei die Konzentrationen auf den Seiten a und i der Membran bzw. im Außen- und Innenraum einer Zelle, z_j die Wertigkeit der Ionen, R die Gaskonstante, F die Faraday-Konstante und T die Temperatur. In Tab. 2.1.1 sind Nernst-Potentiale von einigen Ionensorten aufgelistet. Das Ruhepotential von Zellen ist also im wesentlichen ein Kalium-Gleichgewichts-Potential. Wäre die Zellmembran im Gleichgewicht dagegen nur permeabel für Natriumionen, wäre das Ruhepotential positiv.

j	$c_{Za}(j)$ [mM]	$c_{Zi}(j)$ [mM]	$U_{MR}(j)$ [mV]
Na^+	145	12	+67
K^+	4	155	-98
Ca^{2+}	1,5	0,0001	+129
Cl^-	123	4,2	-90

Tabelle 2.1.1: Nernst-Potentiale für verschiedene Ionensorten j. c_{Za} und c_{Zi} entsprechen dabei den Ionenkonzentrationen in Säugetier-Skelettmuskel-Zellen (entnommen aus [40, (K.1, S.15)]).

Durch Messung von Membranpotentialen mit Hilfe der patch-clamp Technik [43] können die passiven Membraneigenschaften R_M und C_M bestimmt werden: Wird einer Zelle ein kleiner Spannungspuls U_{M0} appliziert, fließt wie in Abb. 2.1.2 dargestellt ein exponentiell mit der Zeitkonstante $\tau_M = R_M C_M$ abklingender Umlade-Strom der Form¹ [44]:

$$I_M(t) = (I_M(0) - I_M(\infty)) \cdot \exp(-t/\tau_M) + I_M(\infty) \quad (1)$$

$$\text{wobei } R_{ZA} = U_{M0}/I_M(0), \quad R_M = U_{M0}/I_M(\infty) - R_{ZA}, \quad C_M = \tau_M (1/R_{ZA} + 1/R_M) \quad (2)$$

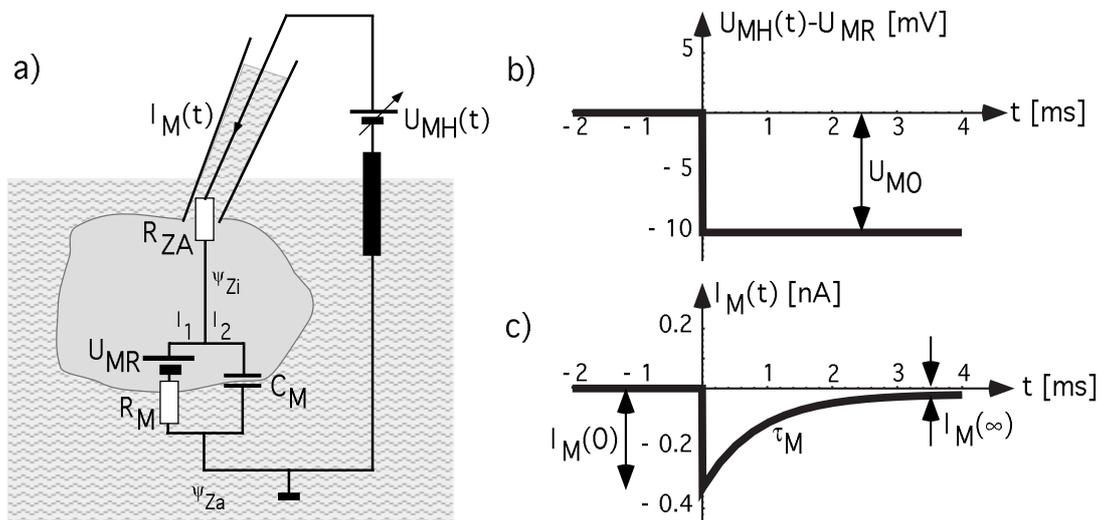


Abbildung 2.1.2: a) Ersatzschaltbild für eine mit einer patch-clamp Pipette kontaktierte Zelle. Das Ruhepotential der Zelle durch Kaliumionen ist durch eine Spannungsquelle U_{MR} beschrieben, R_{ZA} ist der Zugriffswiderstand. b) Zeitlicher Verlauf eines Stimuluspulses $U_{M0} = 10$ mV. c) Zeitlicher Verlauf des durch den Stimulus verursachten Umladestroms, berechnet für $R_{ZA} = 30$ M Ω , $R_M = 0,5$ G Ω und $C_M = 30$ pF.

Neben den Ionenkanälen, die im Gleichgewicht für das K^+ -Ionen-Ruhepotential verantwortlich sind, enthalten Zellen noch viele andere Kanaltypen. Von biologischem Interesse sind vor allem Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionenkanäle, welche nur für jeweils eine Ionenart i gut durchlässig sind. Ihre Leitfähigkeit g_i kann vom Membranpotential U_M , von der Konzentration spezifischer Moleküle c_L und der Zeit t abhängig sein:

$$g_{Mi} = g_{Mi}(i, U_M, c_L, t) \quad (3)$$

Die Leitfähigkeit Potential-gesteuerter Ionenkanäle ist abhängig vom Membranpotential der Zelle. Falls dieses eine bestimmte Schwelle überschreitet, erhöht sich die Leitfähigkeit aktiv weiter und es wird ein sogenanntes Aktionspotential ausgelöst [42, (K.6, S.74)]. Zellen mit der

¹ Die Herleitung ist im Anhang Kap. 10.1 zusammengefaßt.

Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotentialen werden auch elektrisch aktive Zellen genannt. Dieser Sachverhalt ist am einfachsten am Beispiel des Tintenfisch-Riesenaxons, einer dicken langgestreckten Nervenfasern, zu verstehen [1, (K.7.4, S.111)]: Im Gleichgewicht ($U_M = U_{MR} = -70$ mV, Ruhepotential) ist die Leitfähigkeit von den in der Membran enthaltenen Potential-gesteuerten Na- und K-Kanälen klein. Durch eine Erniedrigung des Membranpotentials, z.B. durch eine externe Stimulation, wird die Zelle depolarisiert und dabei die Leitfähigkeit der Na-Kanäle erhöht, vgl. Abb. 2.1.3.

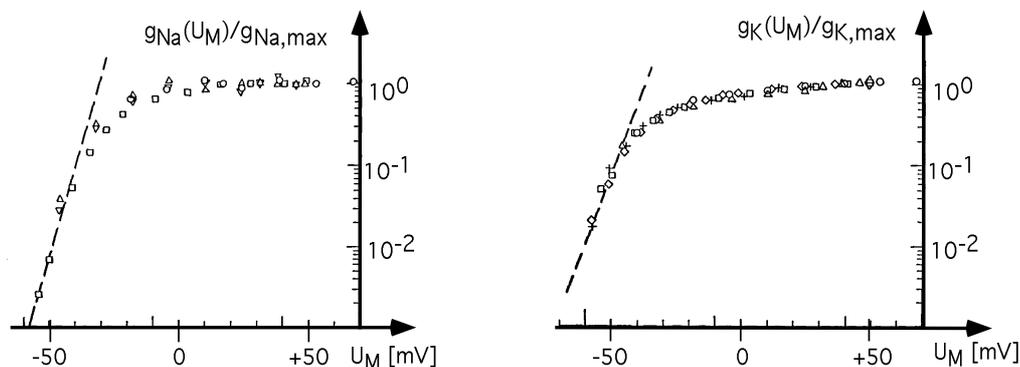


Abbildung 2.1.3: Potential-gesteuerte Leitfähigkeit $g_{Na}(U_M)$ bzw. $g_K(U_M)$ von Na- und K-Kanälen des Tintenfisch-Riesenaxons, normiert auf die Maximal-Leitfähigkeit [45] (entnommen aus [40, (K.2, S.42)]). Das Ruhepotential betrug dabei etwa $U_{MR} \approx -56$ mV.

Über den dadurch verursachten Einstrom von positiv geladenen Na^+ -Ionen in die Zelle wird diese im Inneren weniger negativ ($0 > U_M > U_{MR}$, Depolarisation). Überschreitet die Depolarisation einen bestimmten Schwellwert, wird die Na^+ -Leitfähigkeit soweit erhöht, daß ein positiver Rückkopplungs-Effekt eintritt: Weiterer Na^+ -Einstrom läßt das Innere der Zelle weniger negativ werden und erhöht damit die Na^+ -Leitfähigkeit weiter, wodurch noch mehr Na^+ -Ionen einströmen und das Membranpotential sogar positiv werden kann² ($U_M > 0$, Umpolarisation), vgl. Abb. 2.1.4. Durch die Änderung des Membranpotentials zu positiveren Werten wird nun mit leichter zeitlicher Verzögerung die Leitfähigkeit der Potential-gesteuerten K-Kanäle erhöht und positiv geladene K^+ -Ionen strömen aus der Zelle aus. Dadurch wird das Potential der Zelle wieder negativ ($U_M < 0$, Repolarisation) und die Na-Kanäle schließen. Meist strömt soviel K^+ aus der Zelle, daß ein negativeres Membranpotential als das Ruhepotential erreicht wird ($U_M < U_{MR}$, Hyperpolarisation), bevor die Potential-gesteuerten K-Kanäle wieder schließen und das Potential schließlich wieder auf den Gleichgewichtswert U_{MR} (Ruhepotential) durch Potential-unabhängige K-Kanäle zurückgeht [1, (K.7.4, S.111)]. Über eine Energie-getriebene Pumpe wird langfristig sichergestellt, daß im Gleichgewicht die Na^+ - und K^+ -Gleichgewichts-Konzentration in der Zelle aufrechterhalten wird [1, (K.7.4, S.112), 40, (K.1, S.2)]. Diese sogenannte Na-K-Pumpe ist aber nicht direkt mit der Ausbildung eines Aktionspotentials verknüpft.

² Wie in Tab. 2.1.1 gezeigt, ist das Potential an einer für Na^+ -Ionen permeablen Membran positiv.

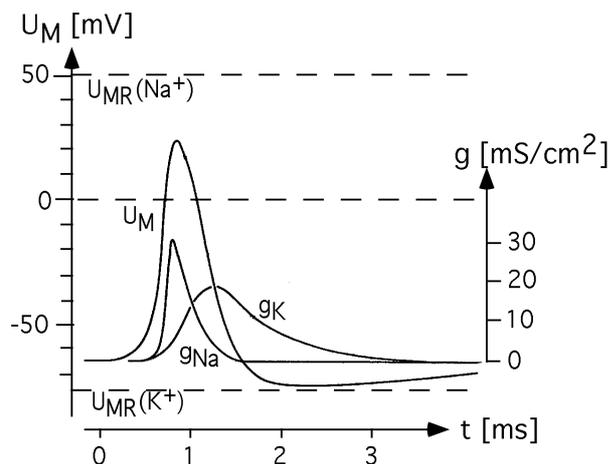


Abbildung 2.1.4: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials, gemessen an einem Tintenfisch-Riesenaxon bei 18,5 °C. Aufgetragen sind der Verlauf des Membranpotentials und die Leitfähigkeit der Potential-gesteuerten Na- und K-Kanäle. Aufgrund etwas unterschiedlicher Ionenkonzentrationen im Vergleich zu Säugetier-Skelettmuskel-Zellen, weichen die hier eingetragenen Nernst-Potentiale von den in Tab. 2.1.1 dargestellten ab (entnommen aus [1, (K.7.4, S.113), 40, (K.2, S.52)].

Der Strom durch die einzelnen Ionenkanäle I_{Mi} in der Membran des Tintenfisch-Axons fließt also im wesentlichen durch 3 verschiedene Typen von Kanälen: (i) Potential-abhängige Natrium-Kanäle i , (ii) Potential-abhängige Kalium-Kanäle j („delayed rectifier channels“) und (iii) Potential-unabhängige Leck-Kanäle l [40, (K.2, S.32, S.39)]. Leck-Kanäle sind im wesentlichen Potential-unabhängige K-Kanäle, die für das Ruhepotential der Zelle verantwortlich sind [40, (K.2, S.34)]. Die Ionenkanäle sind dabei durch ihre Leitfähigkeit (g_{Na} , g_K , g_L) und ihr Gleichgewichtspotential ($U_{MR}(Na) > 0$, $U_{MR}(K) < 0$, $U_{MR} < 0$) beschrieben [46]. Dem Membranwiderstand im Gleichgewicht der Zelle entspricht damit dem Kehrwert der Summe der Leitfähigkeiten der Potential-unabhängigen Leck-Kanäle: $R_M = (\sum_l g_L)^{-1}$. Der Gesamtstrom I_M enthält zusätzlich noch die kapazitive Aufladung der Membran bei zeitlich veränderlichen Potentialen:

$$I_M = \sum_i I_{Mi} + C_M \cdot dU_M/dt$$

$$= \sum_i g_{Na} \cdot (U_M - U_{MR}(Na)) + \sum_j g_K \cdot (U_M - U_{MR}(K)) + \sum_l g_L \cdot (U_M - U_{MR}) + C_M \cdot dU_M/dt \quad (4)$$

Grundsätzlich enthalten auch Nervenzellen in Säugetieren diese drei Kanaltypen. Allerdings sind die detaillierten Verhältnisse viel komplexer. So gibt es z.B. mehrere unterschiedliche Na-Kanäle, welche sich in ihrer Aktionspotential-Schwelle und Dynamik unterscheiden. Mit Hilfe der Hodgkin-Huxley-Gleichungen [40, (K.2, S.44)] läßt sich die Dynamik von Aktionspotentialen Potential-gesteuerter Ionenkanäle $g_i(U_M, t)$ theoretisch beschreiben. Durch Wirkstoffe lassen sich Ionenkanäle spezifisch blockieren, so daß keine Ionen mehr durch sie fließen können. Z. B. blockiert Tetrodotoxin (TTX) spezifisch Potential-gesteuerte Na-Kanäle [40, (K.3, S.79)].

Die Leitfähigkeit von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen hängt von der Konzentration spezieller Liganden ab, die spezifisch an Rezeptoren des Kanals binden und diesen dadurch öffnen können. So gibt es z.B. Ligand-gesteuerte Na- und Ca-Kanäle, die sich z.B. bei Bindung eines Acetylcholin- oder Glutamat-Moleküls an ihre Bindungsstelle öffnen und damit depolarisierende Wirkung haben³ und ein Aktionspotential auslösen können. Dagegen gibt es z.B. Cl-Kanäle, die sich bei Bindung von Molekülen wie γ -Amino-Buttersäure-A (GABA-A) öffnen und damit hyperpolarisierende Wirkung haben⁴ [47, (K.3.1)]. Insgesamt gibt es viele Kanäle, die sehr spezifisch auf bestimmte Liganden reagieren.

³ Bei Öffnung strömt positive Ladung in die Zelle ein.

⁴ Bei Öffnung strömt negative Ladung in die Zelle.

Aktionspotentiale können sich innerhalb von Nervenzellen fortpflanzen [1, (K.7.5, S.116)], vgl. Abb. 2.1.5: Wird durch Reizung an einer Stelle x_1 die Membran über den Schwellwert zur Auslösung eines Aktionspotentials depolarisiert, strömen lokal Na^+ -Ionen durch die Membran ein und polarisieren diese um. Durch elektrostatische Abstoßung verteilen sich die Natriumionen im Inneren der Zelle, wodurch nun auch eine benachbarte Stelle x_2 depolarisiert und dort ebenfalls ein Aktionspotential ausgelöst wird. Dadurch wird nun wieder die Membran an der Stelle x_3 depolarisiert, u.s.w. So kann sich durch Na^+ -Ionen-Einstrom senkrecht zur Membran ein fortlaufendes Aktionspotential parallel zur Membran ausbreiten [48, (K.15.1.3.1, S.670)].

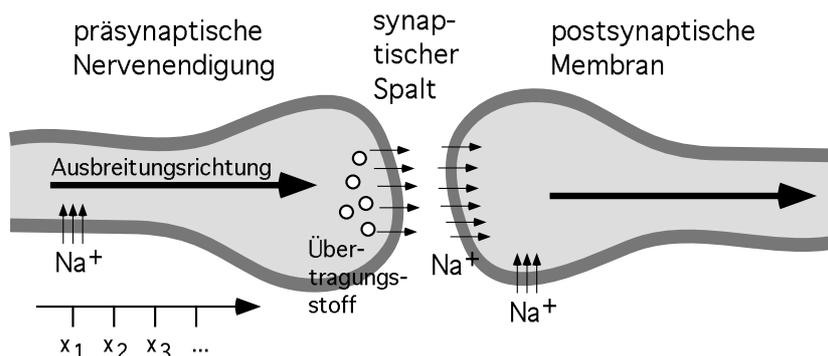


Abbildung 2.1.5: Aktionspotential-Ausbreitung innerhalb einer Nervenzelle und Informationsfluß an einer erregenden Synapse zwischen zwei Nervenzellen.

Die Leitfähigkeit von Ionenkanälen ist auch zeitabhängig. So sind Na-Kanäle nach jedem ausgelösten Aktionspotential für eine gewisse Zeit inaktiviert, d.h. innerhalb der sogenannten absoluten Refraktärzeit kann auch durch erneute Depolarisation an der selben Stelle kein neues Aktionspotential mehr ausgelöst werden. Deshalb können Aktionspotentiale nicht rückwärts laufen [1, (K.7.4, S.113), 40, (K.2, S.41)].

Informationen zwischen einzelnen Nervenzellen werden über als Synapsen bezeichnete Schnittstellen ausgetauscht [1, (K.8, S.121)]. So gehen über Synapsen am Zellkörper und an seinen Dendriten genannten Fortsätzen Signale von anderen Zellen ein, welche innerhalb der Nervenzelle verarbeitet werden. Das Ergebnis wird i.A. aus einem ausgezeichneten Fortsatz, dem Axon, an Synapsen zu anderen Zellen weitergeleitet [42, (K.4, S.42)]. Innerhalb von Nervenzellen wird „Information“ in Form von Aktionspotentialen weitergeleitet. Dabei trägt nicht die Höhe des Aktionspotentials, die im Mittel immer etwa gleich bleibt, sondern die Häufigkeit der Aktionspotentiale die Information. Entlang der Zellfortsätze wird das Aktionspotential so zu Schnittstellen mit anderen Zellen geleitet. Solch eine Synapse ist in Abb. 2.1.5 dargestellt. An Zell-Zell-Schnittstellen können Signale elektrisch [1, (K.8.7, S.140)] oder chemisch [42, (K.4, S.42), 48, (K.15.1.4, S.673)] ausgetauscht werden. Bei chemischen Synapsen werden bei Depolarisation der Zellmembran an der präsynaptischen Nervenendigung durch ein einlaufendes Aktionspotential Übertragungssubstanzen in den synaptischen Spalt, d.h. den Zwischenraum zwischen den beiden Zellen freigesetzt. Der Übertragungssubstanz bindet an Rezeptoren Ligand-gesteuerte Kanäle in der postsynaptischen Membran und bewirkt dort einen Ionenstrom. Je nach Art der Verschaltung, d.h. nach Aufgabe der Nervenzelle im Organismus, werden verschiedene Übertragungssubstanzen freigesetzt. An erregenden Synapsen werden Übertragungssubstanzen freigesetzt, die an Rezeptoren von Ligand-gesteuerten Kanälen in der postsynaptischen Membran binden, welche die postsynaptische

Zelle bei Kanalöffnung depolarisieren, wie z.B. Na-Kanäle. Durch die Depolarisation kann dann ein Aktionspotential in der postsynaptischen Zelle ausgelöst werden und sich dort weiter fortpflanzen⁵. An hemmenden Synapsen dagegen werden Übertragungstoffe freigesetzt, die bei Bindung Ionenkanäle öffnen, welche die postsynaptische Zelle hyperpolarisieren, wie z.B. Cl-Kanäle, und damit der Bildung eines Aktionspotentials entgegenwirken⁶. Auf diese Weise ist eine Verschaltung von Nervenzellen möglich: An einer Nervenzelle geht über Synapsen von anderen Zellen Information ein. Das Ausgabesignal der Zelle hängt davon ab, ob die Signale aus erregenden oder hemmenden Synapsen dominieren. Dominieren die erregenden Synapsen, wird die Zelle über ihren Schwellwert zur Ausbildung eines Aktionspotentials depolarisiert und ein Aktionspotential über das Axon weitergeleitet, welches dann wieder in andere Zellen eingespeist wird. Im menschlichen Körper werden so von Rezeptorzellen wie Hör- oder Sehzellen empfangene Signale an das Gehirn geleitet. In den dort verknüpften Nervenzellen wird die Information verarbeitet und schließlich z.B. an Muskelzellen weitergeleitet, die dann eine Aktion ausführen. Die Verschaltung der Nervenzellen eines Organismus zu einem neuronalen Netz ist nicht statisch. Durch Gewöhnungseffekte kann sich die Stärke von Synapsen in beide Richtungen ändern, das neuronale Netz ist lernfähig [1, (K.8.6, S.137)]

Der Aktionsstrom, d.h. der aktive Strom durch die Zellmembran während eines Aktionspotentials, setzt sich aus den Strömen durch die einzelnen Ionenkanäle zusammen. Obwohl der zeitliche Verlauf des Aktionsstroms genau festgelegt ist, kann keine sichere Vorhersage für die Ströme durch die einzelnen Ionenkanäle gemacht werden. Vielmehr erhöht Depolarisation der Membran die Öffnungswahrscheinlichkeit Potential-gesteuerter Ionenkanäle. Der Mittelwert des Stroms durch alle Ionenkanäle ist durch die Öffnungswahrscheinlichkeit der einzelnen Ionenkanäle bestimmt und liegt somit fest, vgl. Abb. 2.1.6.

Der molekulare Mechanismus Potential-gesteuerter Kanäle kann an folgendem Modell veranschaulicht werden: Durch die Depolarisations-Spannung werden geladene Regionen im Kanalprotein verschoben, was eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt [48, (K.15.1.2.4, S.669)]. Dadurch wird der Ionenkanal geöffnet oder geschlossen. Die Ladungsverschiebung im Protein während der Konformationsänderung heißt „gating current“. Sie kann gemessen werden, indem Na⁺-, K⁺-, und Ca²⁺-Ströme durch Applikation von Kanalblockenden Molekülen unterdrückt werden. Bei Depolarisation fließt dann nur der transiente Strom aufgrund der Konformationsänderung der Kanäle [40, (K.2, S.54), 49].

⁵ Erregendes postsynaptisches Potential (EPSP).

⁶ Inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP).

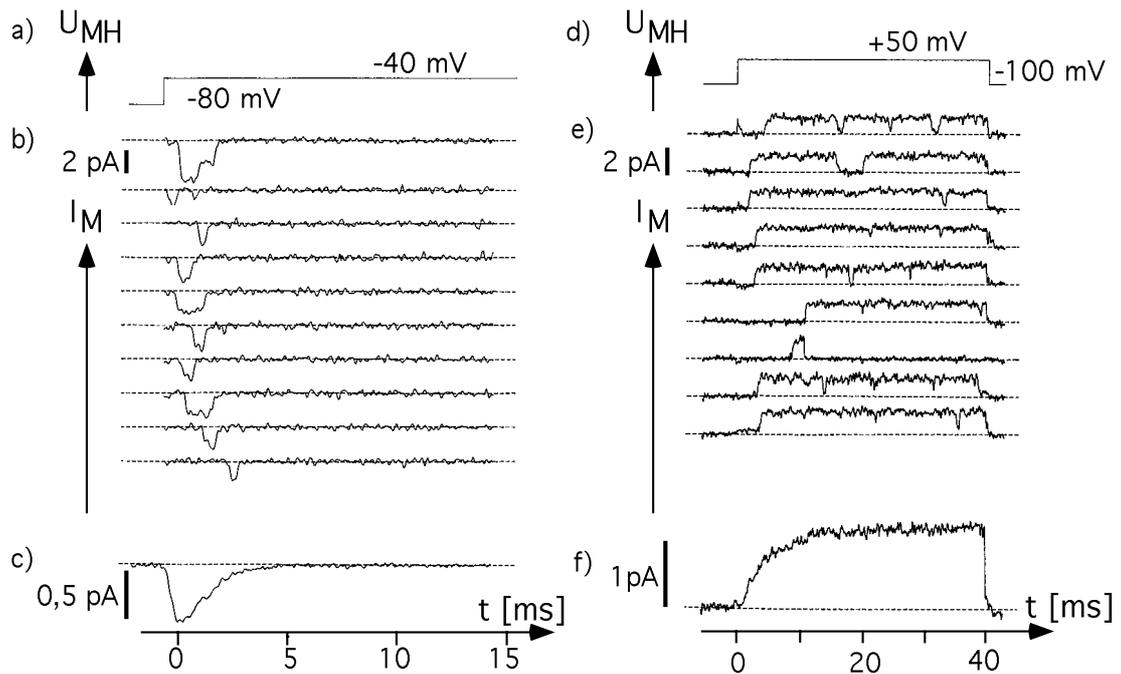


Abbildung 2.1.6: Patch-clamp Messungen an Na-Kanälen der Muskelzelle einer Maus (a-c) und K-Kanälen am Tintenfisch-Riesenaxon (d-f) in Einzelkanal-Ableitung. Gezeigt sind mehrere Messungen des Stroms durch einzelne Ionenkanäle (b, e) nach einem depolarisierenden Testpuls (a, d). Hier wird deutlich, daß die individuellen Ionenkanäle rein statistisch öffnen, daß aber der Mittelwert aller Strommessungen (c, f) genau dem bekannten Verlauf des Aktionsstroms entspricht (entnommen aus [40, (K.3, S.68-69)]).

2.2 Präparation und Kultur⁷

Leider gibt es kein Universalsystem elektrisch aktiver Zellen, welches alle zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden vorteilhaften Eigenschaften in sich vereint. In der klassischen Elektrophysiologie wurden aufgrund ihres hohen Aktionsstroms und ihrer Größe häufig Zellen aus Invertebraten, d.h. Nicht-Wirbeltieren, wie Schnecken oder Tintenfischen verwendet [11]. Z.B. sind Retzius-Zellen aus Blutegeln [50] mit einer Größe von bis zu 100 μm und Aktionsströmen bis zu 100 nA mittlerweile als Standard-Modellsystem für extrazelluläre Potentialmessungen etabliert [28, 51, 52]. Allerdings haben Zellen aus Invertebraten den Nachteil, daß sie von ihrer evolutionären Entwicklung her nur entfernt vergleichbar mit Zellen aus höherentwickelten Tieren sind. Daher können damit gewonnene Aussagen nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragen werden. Nerven- und Muskelzellen aus Wirbeltieren sind dagegen als Primärkulturen aufwendig zu präparieren.

Herzmuskelzellen (Cardiomyocyten) sind elektrisch aktive Zellen mit der Fähigkeit zur spontanen periodischen Ausbildung von Aktionspotentialen. Mit jedem Aktionspotential geht eine Kontraktion und Relaxation der Zellen des Herzmuskels einher, welche im lebenden Organismus für die Blutzirkulation verantwortlich ist [53]. Bei sorgfältiger Auflösung des Herzmuskels in Einzelzellen behalten diese ihre Fähigkeit zur spontanen Ausbildung von Aktionspotentialen und mechanischem Pulsen bei. In dieser Arbeit wurden Herzmuskelzellen in Petrischalen und auf Halbleiter-Substraten kultiviert. Bei geglückter Präparation kontrahierten und relaxierten die Zellen mechanisch auf dem Substrat, d.h. sie lösten spontane Aktionspotentiale aus [5, 54-56]. Wurden die Zellen so dicht ausgesät, daß sie untereinander Kontakte ausbilden konnten, pulste der gesamte Zellrasen synchron.

Um nicht für jedes Experiment frische Zellen präparieren zu müssen wurde versucht, ein System elektrisch aktiver Zellen zu etablieren, welches stabil in Kultur gehalten werden kann. NRK- („normal rat kidney“) Fibroblasten sind eine Zell-Linie, die aus der Niere von Ratten gewonnen wurde und kultivierbar ist. In dieser Arbeit wurden NRK-Fibroblasten in Petrischalen und auf Halbleiter-Substraten kultiviert. Sie konnten durch Depolarisation zu Aktionspotentialen stimuliert werden. Da Bindegewebezellen normalerweise elektrisch inaktiv sind, stellt diese Fibroblasten-Linie mit ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotentialen eine Ausnahme dar [57-59].

Im Hinblick auf medizinische Untersuchungen sind Neurone von Wirbeltieren besonders interessant. Sie bilden auch *in vitro* chemische Synapsen zueinander aus, d.h. es können kleine neuronale Netzwerke in der Zellkultur aufgebaut werden [32]. In dieser Arbeit wurden Nervenzellen aus dem Hirn von Ratten und Hühnerembryos präpariert und in Petrischalen und auf Halbleiter-Substraten kultiviert. [60, 61]. Leider sind Neurone klein und haben vergleichsweise geringe Aktionsströme die im nA Bereich liegen.

⁷ Die Präparationsprotokolle sind im Anhang Kap. 11.1 nachzulesen.

2.3 Aufbau eines patch-clamp Systems zur Messung von Aktionspotentialen⁸

Um die Eignung der in dieser Arbeit verwendeten Zellarten für Zell-Halbleiter-Hybride zu untersuchen wurde ein patch-clamp System aufgebaut, mit dem die elektrischen Eigenschaften dieser Zellen charakterisiert werden können. Der patch-clamp Aufbau wurde dabei so in den LAPS-Aufbau (vgl. Kap. 4.4) integriert, daß die Möglichkeit bestand Zellen mit patch-clamp zu stimulieren und mit dem LAPS das dadurch resultierende extrazelluläre Potential zu messen.

Im wesentlichen besteht der patch-clamp Aufbau aus einem Mikromanipulator (Mini 25, Luigs & Neumann) mit welchem die Pipette in die Nähe der Zelle gebracht werden kann und einem Verstärker (EPC-7, List-Elektronik) zur Messung des Pipettenstroms [13]. Dabei wird die Pipette in einen Halter mit integriertem Vorverstärker („headstage“) eingebaut, welcher auf dem Mikromanipulator fixiert ist. Da der Kontakt zwischen Zelle und Pipette bei kleinen Stößen sofort undicht werden würde, wurde der gesamte Aufbau auf einem schwingungs isolierten Tisch (I-2000 Serie, Newport) befestigt. Üblicherweise werden Zellen in Petrischalen kultiviert, so daß die Annäherung der Pipette während des Experiments mit einem invertierten Mikroskop verfolgt und kontrolliert werden kann, vgl. Abb. 2.3.1.a. Sollen die Zellen jedoch auf einem undurchsichtigen Substrat, wie Si oder GaAs untersucht werden, muß die Beobachtung mit einem Mikroskop (Axiotech, Zeiss) von oben erfolgen, vgl. Abb. 2.3.1.b. Durch den Arbeitsabstand des Mikroskops (≈ 2 mm) ist dann der für die Pipettenpositionierung zu Verfügung stehende Raum festgelegt. So erfordert es einiges Geschick, um die Pipette ohne Zerstörung der Spitze auf die Zelloberfläche zu positionieren.

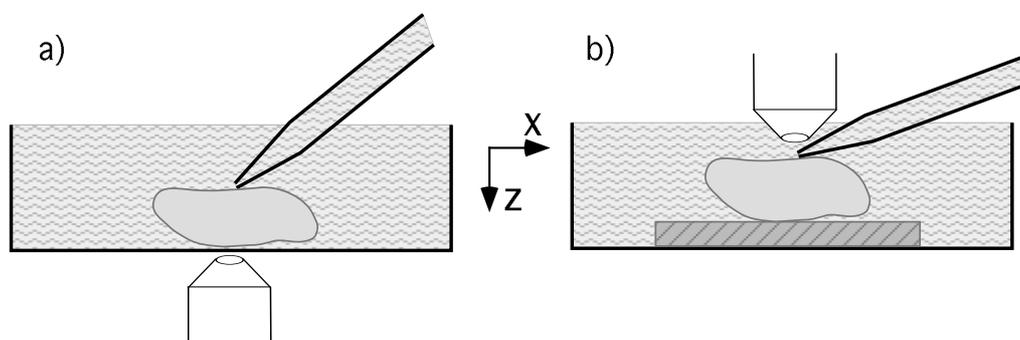


Abbildung 2.3.1: Positionierung einer patch-clamp Pipette über eine Zelle unter Beobachtung mit einem optischen Mikroskop a) von unten und b) von oben.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen sind Ganzzell-Ableitungen. Grundsätzlich gibt es nun zwei verschiedene Untersuchungsmethoden, den Spannungsklemme („voltage-clamp“, VC) und den Stromklemme Modus („current-clamp“, CC) [13].

Im voltage-clamp Modus wird ein Haltepotential U_{MH} zwischen der Pipette⁹ und einer Referenzelektrode im Medium¹⁰ angelegt und dabei der Strom I_M gemessen welcher nötig ist,

⁸ Eine detaillierte Beschreibung der Elektronik eines patch-clamp Verstärkers und der Durchführung einer Messung sind im technischen Anhang Kap. 10.2 bzw. Kap. 10.3 nachzulesen.

⁹ = intrazellulärer Raum.

¹⁰ = extrazellulärer Raum.

um das Haltepotential aufrecht zu erhalten, vgl. Abb. 2.1.2. Schaltungstechnisch entspricht dies einem Betrieb als Potentiostat. Wird z.B. ein depolarisierendes Haltepotential $U_{MH} > U_{MR}$ angelegt, öffnen Na-Kanäle in der Zellmembran und Na^+ -Ionen strömen in die Zelle ein. Um das Haltepotential aufrecht erhalten zu können, d.h. um die Netto-Ladung in der Zelle konstant zu halten, muß dieselbe Menge an Ladung die durch die gesamte Membran über Na^+ -Einstrom in die Zelle gelangt ist, über die Pipette abfließen. Der in die Pipette fließende Strom $I_M < 0$ entspricht damit dem Strom durch die Zellmembran. $I_M < 0$ bedeutet dabei Einstrom positiver Ladung in die Zelle und $I_M > 0$ Ausstrom positiver Ladung.

Im current-clamp Modus wird der Zelle über die Pipette ein Haltestrom I_{MH} aufgeprägt und dabei das Potential U_M zwischen Pipette und Badelektrode gemessen, welches zur Aufrechterhaltung des Stroms nötig ist. Dies ist analog zum Betrieb eines Galvanostaten. Wird der Zelle ein Haltestrom $I_{MH} = 0$ aufgeprägt und das Membranpotential der Zelle ändert sich aufgrund eines Aktionspotentials, regelt der patch-clamp Verstärker das Potential zwischen Pipette und Badelektrode so, daß es jeweils dem Membranpotential der Zelle entspricht, um stromfrei zu bleiben. Das gemessene Pipettenpotential U_M entspricht damit dem Membranpotential der Zelle.

2.4 Vergleich der Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen und NRK-Fibroblasten¹¹

Zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden sind Herzmuskelzellen ein etabliertes Modellsystem [5, 63]. Da sie aber für jede Versuchsserie neu präpariert werden müssen, soll in dieser Arbeit die Eignung von NRK-Fibroblasten als alternative Zellart untersucht werden. Dazu sollen die elektrischen Eigenschaften beider Zellarten verglichen werden.

(a) Herzmuskel-Zellen

Durch koordinierte Kontraktion und Relaxation der Herzkammern wird der Blutfluß im Körper aufrecht erhalten [1, (K.10.3, S.167-)]. Ein ausgewachsenes Herz [64, (S.362-)] ist dabei in verschiedene funktionelle Einheiten unterteilt, wie in Abb. 2.4.1 schematisch dargestellt ist. Üblicherweise geht die spontane Erregungsbildung von einem Teil der rechten Vorhofmuskulatur, dem Sinusknoten (Nodus sinu-atrialis) aus [1, (K.10.4, S.170), 65, (K.23.1, S.472)]. Die in diesem Gewebe enthaltenen Zellen werden Schrittmacherzellen genannt. Die elektrische Erregung breitet sich dann zunächst langsam über die beiden Vorhöfe (Atrium dextrum und Atrium sinistrum) aus und bringt diese zur Kontraktion¹². Anschließend pflanzt sich die Erregung über den Atrio-Ventrikular (AV)-Knoten (Nodus atrioventricularis) zu den beiden Herzkammern (Ventrikeln) fort [64, (S.370)]. Die Kammern kontrahieren damit deutlich nach den Vorhöfen. Die schnelle Erregungfortpflanzung zu den Kammern geschieht dabei in auf Erregungsleitung spezialisiertem Gewebe, den Purkinje-Fäden, so daß verschiedene Regionen der Herzkammern gleichzeitig bzw. rasch nacheinander von der Erregung erfaßt werden [1, (K.10.4, S.170-), 65, (K.23.1, S.473)]. Von dort breitet sich die Erregung verlangsamt über die Kammermuskulatur aus. Das Herz enthält so im wesentlichen also zwei verschiedene Arten von Muskelzellen¹³: ein Teil der Zellen ist zur Spontanerregung und schnellen Weiterleitung der Erregung spezialisiert, wie z.B. Zellen aus dem Sinusknoten, AV-Knoten oder den Purkinje-Fäden, während die Zellen der Arbeitsmuskulatur (Arbeitsmyokard) der Vorhöfe und der Kammern hauptsächlich für die mechanische Pumparbeit zuständig sind [65, (K.23.1, S.473)].

Die im Herzen enthaltenen Schrittmacherzellen sind in der Lage selbständig, d.h. ohne Steuerung durch Nervenzellen, spontane periodische elektrische Erregung zu erzeugen und damit einen rhythmischen Herzschlag auszulösen. Über Ausschüttung von Acetylcholin und Noradrenalin durch Herznerven kann die Pulsfrequenz aber über das Hirn gesteuert werden [1, (K.10.6, S.179), 65, (K.23.4, S.483)]: Durch Abflachung des Schrittmacherpotentials senkt Acetylcholin die Herzfrequenz und hält damit den Ruhepuls niedrig. Noradrenalin hingegen bewirkt ein Steilerwerden des Schrittmacherpotentials und damit eine Ansteigen der Herzfrequenz.

¹¹ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in [62] veröffentlicht.

¹² Die Ausbreitung der elektrischen Erregung im Muskel kann klinisch mit Hilfe von EKG-Messungen verfolgt werden [1, (K.10.5, S.174), 65, (K.23.5, S.484)].

¹³ Neben Muskelzellen enthält das Herz eine Vielzahl von Bindegewebe- und Nervenzellen.

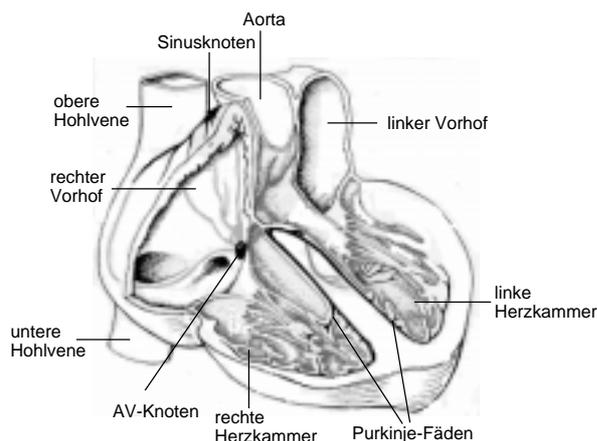


Abbildung 2.4.1.: Aufbau des Herzens (entnommen aus [1, (K.10.4 S.170)]), siehe auch [64, 65, (K.23.1, S.473)].

Die elektrische Erregung des Herzmuskels basiert auf Aktionspotentialen der einzelnen Herzmuskelzellen. Der Aktionsstrom einer Zelle ist dabei im wesentlichen aus zeitabhängigen Na^+ -, Ca^{2+} -, und K^+ -Ionenströmen zusammengesetzt [65, (K.23.1, S.474)]. Während im Arbeitsmyokard das Aktionspotential über Stromfluß durch schnelle Na-Kanäle steil ansteigt und durch Öffnen von Ca-Kanälen über einige 100 ms lang auf einem Plateau gehalten wird, haben Schrittmacherzellen keine schnellen Na-Kanäle [66]. Bei Schrittmacherzellen steigt das Aktionspotential deshalb langsamer an und wird im wesentlichen durch Ca^{2+} -Ionen-Einstrom getragen. Alle Herzmuskelzellen sind über sogenannte „gap junctions“, d.h. kleine Kanäle zwischen benachbarten Zellen [1, (K.3.4, S.42)] elektrisch miteinander gekoppelt [1, (K.10.4, S.170)]. Aktionspotentiale pflanzen sich darüber von Zelle zu Zelle fort.

Während eines Aktionspotentials wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ca. 100-fach erhöht. Dadurch werden Ca^{2+} -Konzentrations-abhängige Ca-Ionenkanäle in intrazellulären Calciumspeichern (sarcoplasmatisches Reticulum) geöffnet und somit die Ca^{2+} -Konzentration im Inneren der Zelle weiter erhöht [1, (K.10.4, S.172, K.10.6, S.179)]. Durch den erhöhten Calcium-Spiegel wird eine Reaktion zwischen den Molekülen Aktin und Myosin in den Muskelzellen ausgelöst, welche für eine Kontraktion der Zelle sorgt [67, (K.4, S.67), 68, (K.1.3, S.14)]. Das elektrische Aktionspotential bewirkt also über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration mechanische Kontraktion¹⁴.

(b) NRK-Fibroblasten

Erst kürzlich wurde entdeckt, daß NRK-Fibroblasten sich wie elektrisch erregbares Gewebe verhalten [57-59]. In konfluenten Zellrasen können Ca-Aktionspotentiale durch Depolarisation erzeugt werden. Depolarisation ist über eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration oder durch Zugabe von Bradykinin möglich [57, (K.4)]: Durch Erhöhung der

¹⁴ So wird klinisch der mechanische Herzschlag durch Verabreichung von Herzglykosiden, wie Digitalis und Strophanthin gesteigert, welche eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken. Eine andere Möglichkeit zur Verstärkung der Kontraktionskraft ist die Anwendung von Ca-Agonisten wie Noradrenalin und Adrenalin, welche über eine Erhöhung der Ca-Leitfähigkeit den Ca^{2+} -Einwärtsstrom bei einem Aktionspotential erhöhen und so die elektromechanische Kopplung verstärken. Umgekehrt kann der Herzschlag auch abgeschwächt werden, wie es z.B. bei Bluthochdruck sinnvoll ist. Dies kann entweder durch extrazellulären Ca^{2+} -Entzug oder durch Ca-Antagonisten wie Verapamil, Nifedipin und Diltiazem, welche den Ca^{2+} -Einwärtsstrom hemmen, erreicht werden [1, (K.10.4, S.172)]. Dies kann bis zum Grenzfall völliger elektromechanischer Entkopplung geschehen, wo trotz elektrischer Aktionspotentiale keine mechanische Kontraktion erfolgt.

extrazellulären K^+ -Konzentration wird das Nernst-Potential für K^+ -Ionen und damit auch das Innere der Zelle weniger negativ. Zugabe von Bradykinin setzt Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern frei und erhöht damit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Dadurch wiederum öffnen Ca^{2+} -aktivierbare Cl^- -Kanäle. Wegen der hohen intrazellulären Cl^- -Ionenkonzentration bei NRK-Fibroblasten von 65 mM ist bei einer extrazellulären Cl^- -Konzentration von 127 mM das Nernst-Potential für Cl^- -Ionen -17 mV, also weniger negativ als das für K^+ -Ionen. Damit wird bei gleichzeitiger Permeabilität der Zellmembran für K^+ - und Cl^- -Ionen das Membranpotential weniger negativ.

Die Aktionspotentiale enthalten keine Na^+ -Strom-Komponente, sondern werden durch Ca^{2+} - oder Sr^{2+} -Ionen durch Ca-Kanäle getragen: Bei Depolarisation werden Potential-abhängige L-Typ-Ca-Kanäle mit einem Schwellwert zur Auslösung eines Aktionspotentials von $U_M \approx -20 \dots -10$ mV geöffnet [57, (K.5)] und Ca^{2+} -Ionen strömen in die Zelle ein bis ungefähr das Nernstsche Ca-Gleichgewichtspotential erreicht ist. Nach einer Plateau-Phase durch Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle stellt sich das Membranpotential der Zelle wieder auf seinen Ruhewert ein, vgl. Abb. 2.4.2.

In konfluenten Zellrasen sind Fibroblasten miteinander gekoppelt. Bei Ausbildung eines Aktionspotentials in einer Zelle werden dabei über „gap junctions“ auch L-Typ-Ca-Kanäle benachbarter Zellen geöffnet, wodurch das Aktionspotential weitergeleitet wird. Wird gezielt ein Teil des Zellrasens lokal depolarisiert, breitet sich das erzeugte Aktionspotential entlang des Rasens mit einer Geschwindigkeit von ca. 6 mm/s aus [57, (K.6)]. Neben künstlich durch Depolarisation stimulierten Aktionspotentialen können auch spontane Aktionspotentiale beobachtet werden [58]. Im Gegensatz zu Herzmuskelzellen ist mit der Ausbildung eines Aktionspotentials dabei keine mechanische Kontraktion verknüpft.

(c) Materialien und Methoden

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden konfluente Rasen aus embryonalen Hühner-Herzmuskel-Zellen und NRK-Fibroblasten auf Silizium-Substraten¹⁵ kultiviert. Aktionspotentiale wurden mit Hilfe der patch-clamp Technik im current-clamp Modus bei Raumtemperatur aufgezeichnet¹⁶. Im Falle der Herzmuskelzellen wurden spontane Aktionspotentiale an Stellen des Zellrasens aufgezeichnet, an welchen keine Kontraktion sichtbar war. Aktionspotentiale von NRK-Fibroblasten wurden in Ca^{2+} -freiem Medium mit 3 mM Sr^{2+} -Zusatz durch ca. 10-20 mm von der patch-clamp Pipette entfernte Zugabe kleiner Mengen von 120 mM K^+ ausgelöst [57, (K.6)]¹⁷.

(d) Ergebnisse

In Abb. 2.4.2.a und b sind aufgenommene Aktionspotentiale von NRK-Fibroblasten und embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen dargestellt. Bei NRK-Zellen dauerte die Plateau-Phase während stimulierter Aktionspotentiale 39 ± 11 s. Bei Herzmuskelzellen traten spontane Aktionspotentiale in Intervallen zwischen 0,5 bis einigen Sekunden auf. In Tab. 2.4.1 sind die

¹⁵ Die Zusammensetzung der Silizium-Substrate („Typ 1A“) ist im technischen Anhang Kap. 13.2 aufgelistet.

¹⁶ Die Zusammensetzung der Pipettenfüllung (intrazelluläre Lösung) ist im Anhang Kap. 11.4 nachzulesen.

¹⁷ Die hier gezeigten Messungen an NRK-Fibroblasten wurde von Dr. Albert de Roos in der Gruppe von Dr. Lex Theuvenet durchgeführt und in dieser Arbeit zur Kontrolle wiederholt.

aus den Messungen bestimmten Kenngrößen beider Zellarten gegenübergestellt. An Kontrollmessungen an Zellen die auf Petrischalen adhärirt waren, wurden keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den auf Silizium-Substraten adhärennten Zellen festgestellt.

	n	U_{Mmin} [mV]	U_{Mmax} [mV]	ΔU_M [mV] = $U_{Mmax} - U_{Mmin}$	$(dU_M/dt)_{max}$ [Vs^{-1}]
Herzmuskelzellen	7	-59 ± 7	$+8 \pm 6$	67 ± 9	$1,6 \pm 0,7$
NRK-Fibroblasten	11	-64 ± 7	$+35 \pm 5$	99 ± 9	$1,2 \pm 0,3$

Tabelle 2.4.1: Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung verschiedener Kenngrößen zur Beschreibung eines Aktionspotentials. Sie wurden aus je n patch-clamp Messungen bestimmt. U_{Mmin} bezeichnet das minimale Membranpotential, was im Fall der Fibroblasten dem Ruhepotential U_{MR} und im Fall der Herzmuskelzellen dem maximalen diastolischen Potential entspricht, U_{Mmax} das maximale Membranpotential. ΔU_M ist die Änderung des Membranpotential während eines Aktionspotentials und $(dU_M/dt)_{max}$ die maximale Anstiegsrate des Aktionspotentials.

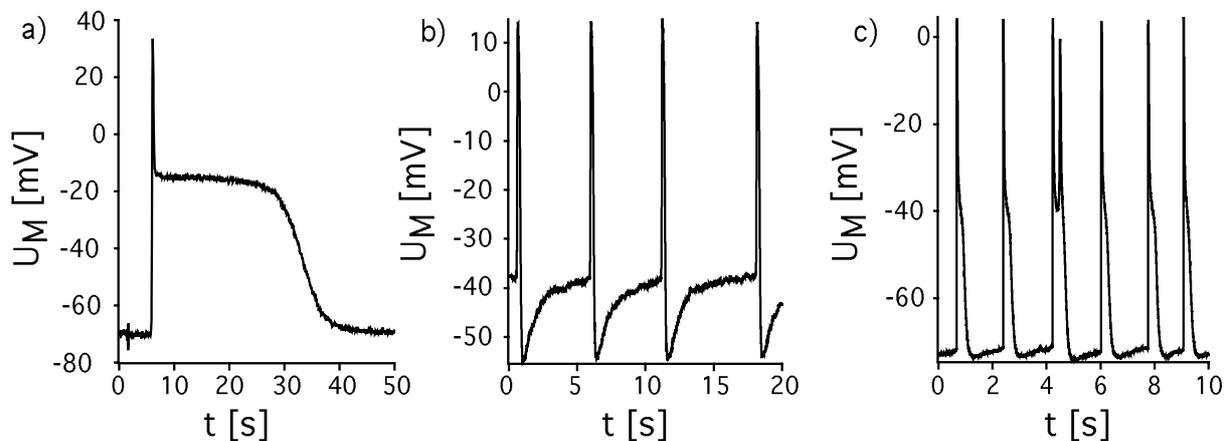


Abbildung 2.4.2: a) Stimuliertes Aktionspotential, aufgenommen an einem Rasen aus NRK-Fibroblasten. b) Spontane Aktionspotentiale, aufgenommen an einem Rasen aus embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen, 3 Tage nach der Präparation. c) Spontane Aktionspotentiale, aufgenommen an einem Rasen aus postnatalen Ratten-Herzmuskelzellen, 2 Tage nach der Präparation (entnommen aus [63]).

(e) Diskussion

Die in dieser Studie untersuchten, aus embryonalen Hühnern isolierten Herzmuskelzellen, wiesen Aktionspotentiale mit nur leicht schnelleren Anstiegsraten als die bei den NRK-Fibroblasten vorgefundenen auf. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß diese Herzmuskelzellen Schrittmacherzellen ohne schnelle Na-Kanäle waren. Für Schrittmacherzellen sind in der Literatur Messungen bei physiologischen Temperaturen ($37^{\circ}C$) zu finden, welche ebenfalls Anstiegszeiten $dU_M/dt|_{max}$ deutlich unter $10 V/s$ ergeben haben [69-71]. Die Ähnlichkeit der Kinetiken der Anstiegsphasen der Aktionspotentiale von embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen und NRK-Fibroblasten scheint plausibel, da die Ionenströme bei beiden Zelltypen durch L-Typ Ca-Kanäle getragen werden.

Aktionspotentiale von Herzmuskelzellen hängen stark von der Art des Gewebes ab, welchem die Zellen entnommen wurden. So wurde berichtet, daß sich die Steilheit von Aktionspotentialen in aus verschiedenen Stellen des Sinusknotens erwachsener Ratten

präparierten Zellen um bis zu einem Faktor 10-20 unterscheiden kann¹⁸ [69-71]. In Abb. 2.4.2.c sind Aktionspotentiale einer Ratten-Herzmuskelzelle bei physiologischer Temperatur aufgezeichnet [63]. Im Vergleich zu den an embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen aufgenommenen Aktionspotentialen sind diese um eine Größenordnung schneller¹⁹. Obwohl die Messungen zu Abb. 2.4.2.b und Abb. 2.4.2.c mit Zellen durchgeführt wurden, welche aus kompletten Herzen gewonnen wurden, zeigen sie die typischen Eigenschaften von Schrittmacherzellen bzw. Zellen aus dem Arbeitsmyokard. Dies ist vermutlich auf das unterschiedliche Alter des Spendergewebes zurückzuführen: Zellen in embryonalen Herzen sind noch nicht fertig ausdifferenziert und scheinen deshalb ähnlich zu akuten Schrittmacherzellen. Im ausdifferenzierten Gewebe postnataler Herzen sind aufgrund der Größe der Herzkammern im Vergleich zum Sinusknoten viel mehr Zellen aus dem Arbeitsmyokard als Schrittmacherzellen enthalten. Bei Vorhersagen des zu erwartenden extrazellulären Potentials, muß also unbedingt zwischen unterschiedlichen Herzmuskelzell-Präparationen unterschieden werden.

Die Membrankapazität und der Membranwiderstand von Herzmuskelzellen sind bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht worden [74-78]. Die diesbezüglichen Werte für NRK-Fibroblasten wurden mit Hilfe der aus [57, (K.2)] entnommenen Daten berechnet²⁰. Ein Vergleich beider Zellarten ist in Tab. 2.4.2. zusammengefaßt.

	c_M [μFcm^{-2}]	r_M [$\text{k}\Omega\text{cm}^2$]
Herzmuskelzellen	1 - 5	3-150
NRK-Fibroblasten	1	60

Tabelle 2.4.2: Vergleich der spezifischen Membrankapazität c_M und des spezifischen Membranwiderstandes r_M .

Damit sind sowohl die aktiven elektrischen Eigenschaften, d.h. Amplitude und Steigung von Aktionspotentialen, als auch die passiven elektrischen Eigenschaften, d.h. Membrankapazität und -Widerstand, von NRK-Fibroblasten sehr ähnlich zu denen embryonaler Hühner-Herzmuskelzellen. Somit könnten NRK-Fibroblasten in einer Zahl von Experimenten anstelle von Herzmuskelzellen verwendet werden, was eine deutliche Arbeitserleichterung in der Zellkultur mit sich bringen würde.

¹⁸ Die Zellen mit steilen Aktionspotentialen werden dabei als „peripheral cells“ bzw. „subsidiary pacemakers“, die Zellen mit langsamen Aktionspotential-Anstiegen als „central cells“ bzw. „dominant pacemakers“ bezeichnet.

¹⁹ Bei Messungen an Zellen, welche aus adulten Herzen gewonnen wurden, wurden Steilheiten bis zu $dU_M/dt|_{\max} \approx 100 - 200 \text{ V/s}$ berichtet [72-74].

²⁰ Mit patch-clamp Messungen wurde $C_M = 30 \text{ pF}$ für einzelne Zellen und $C_M = 300 \text{ pF}$ für Verbände aus 10 Zellen gefunden. Dabei ist die Kapazität proportional zu der Zahl der gekoppelten Zellen: Bei Zellen, die durch „gap-junctions“ gekoppelt sind, setzt sich die gemessene Kapazität aus den Membrankapazitäten der Zellen zusammen. Der an einzelnen Zellen gemessenen Wert für $R_M = 1/G_M = 2 \text{ G}\Omega$ streute viel stärker als C_M . Bei Untersuchung von gekoppelten Zellen war keine gute Korrelation des Widerstandes zu der Zahl der Zellen erkennbar. Unter der Annahme $c_M = 1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ ergibt sich dann die Oberfläche einer Zelle zu $A_{Z\text{tot}} = C_M/c_M = 30\text{pF}/1\mu\text{Fcm}^{-2} = 3000 \mu\text{m}^2$. Damit wurde der spezifischer Membranwiderstand zu $r_M = R_M \cdot A_{Z\text{tot}} = 2 \text{ G}\Omega \cdot 3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 = 60 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ berechnet.

2.5 Untersuchung der Aktionspotentiale von Nervenzellen²¹

Die Grundlage von Zell-Halbleiter-Hybriden ist die direkte Adhäsion von Zellen auf der Oberfläche eines Potential-Sensors. Die elektrischen Eigenschaften der Zellen hängen dabei von vielen äußeren Umständen ab, wie dem Alter der Zellen, der Oberfläche des Sensors, und der Formulierung des Mediums. In diesem Kapitel wird eine Studie vorgestellt, welche die zeitabhängige Entwicklung der elektrischen Eigenschaften von striatalen Neuronen unter verschiedenen Bedingungen beschreibt. Es wurde untersucht, welchen Einfluß das den Zellen zur Adhäsion angebotene Substrat auf ihre elektrische Eigenschaften hat. Dazu wurden speziell Glas und oxi-/nitridierte Siliziumsubstrate miteinander verglichen. Glas wird als ein Standardsubstrat vielfach in der Zellkultur verwendet, wogegen die Oberfläche von Potential-Sensoren häufig aus oxi-/nitridiertem Silizium besteht. Es wurde weiterhin der Einfluß des Kulturmediums auf die elektrischen Eigenschaften der Zellen untersucht. Dazu wurden zwei Arten von Kulturmedien verwendet: serumhaltiges Medium („serum containing medium“, SCM) und serumfreies Medium („neurobasal medium“, NBM). In SCM wachsen neben den eigentlichen Neuronen immer auch Glia-Zellen in Cokultur. Da Glia-Zellen sich zwischen Neurone und das unterliegende Substrat anlagern und somit dem Abstand zwischen Zelle und Unterlage vergrößern können, wären Glia-freie Kulturen für den Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden von großem Vorteil. Das Wachstum von Glia-Zellen kann dazu durch Kultur in NBM-Medium unterdrückt werden [60].

(a) Materialien und Methoden

Zellkultur: Striatale Neurone wurden aus E17 Rattenembryos entweder in SCM oder in NBM kultiviert. Als Substrate wurden je zur Hälfte Deckgläschen und oxi-/ nitridierte Silizium-Substrate mit Laminin-Beschichtung verwendet²².

Datenaufnahme: Es wurden zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen (5, 7, 9, 11, 13 „days in vitro“ (DIV)) bei Raumtemperatur (24-27°C) insgesamt ca. 700 patch-clamp Messungen im voltage-clamp Modus bei einem Haltepotential $U_{MH} \approx -73$ mV durchgeführt. Zu jedem Fall (5/7/9/11/13 DIV, Glas-/Silizium-Substrat, NBM/SCM) liegen daher 30 patch-clamp Messungen an Zellen aus mindestens 4 verschiedenen Präparationen vor. Zusätzlich wurden Photos der Zellen aufgenommen und daraus die Querschnittfläche $A_{Z,opt}$ bestimmt. In einem weiteren Experiment wurden patch-clamp Messungen im current-clamp Modus an 13 DIV-Zellen durchgeführt, welche in SCM auf Silizium-Substraten kultiviert worden waren.

(b) Ergebnisse

Rohdaten: Es ergibt sich der Eindruck, als ob Zellen auf Silizium-Substraten etwas schlechter als auf Glas haften. Unter dem Mikroskop waren bei Proben mit NBM öfter krank aussehende Zellen enthalten, als bei Proben mit SCM.

²¹ Die Ergebnisse dieses Kapitel wurden in [79] zur Veröffentlichung eingereicht.

²² Die Zellen wurden von Dr. J. Behrends, Dr. E. Rumpel, L. Kargl und A. Grunewald präpariert. Die Protokolle sind im technischen Anhang Kap. 11.1 und Kap. 11.2 detailliert beschrieben. Alle patch-clamp Messungen wurden in „physiologischer Salzlösung für Neuronen“ als Badmedium und mit „Neuron-patch-clamp-Lösung“ als Pipettenfüllung durchgeführt, vgl. Anhang Kap. 11.4. Wenn im folgenden von Silizium die Rede ist, ist immer Silizium mit Oxid-/ Nitrid-Beschichtung gemeint. Verwendet wurden die in der Gruppe von Prof. Eisele bearbeiteten Silizium-Wafer, vgl. Anhang Kap. 13.2.

Als Meßergebnisse liegen bei den patch-clamp Messungen im voltage-clamp Modus die aufgezeichneten Ströme $I_M(t)$ in Abhängigkeit verschiedener Spannungspulse $U_{MH}(t)$, bei den Messungen im current-clamp Modus die aufgezeichneten Potential U_M in Abhängigkeit der Stimulationspulse $I_{MH}(t)$ vor, siehe Abb. 2.5.1.

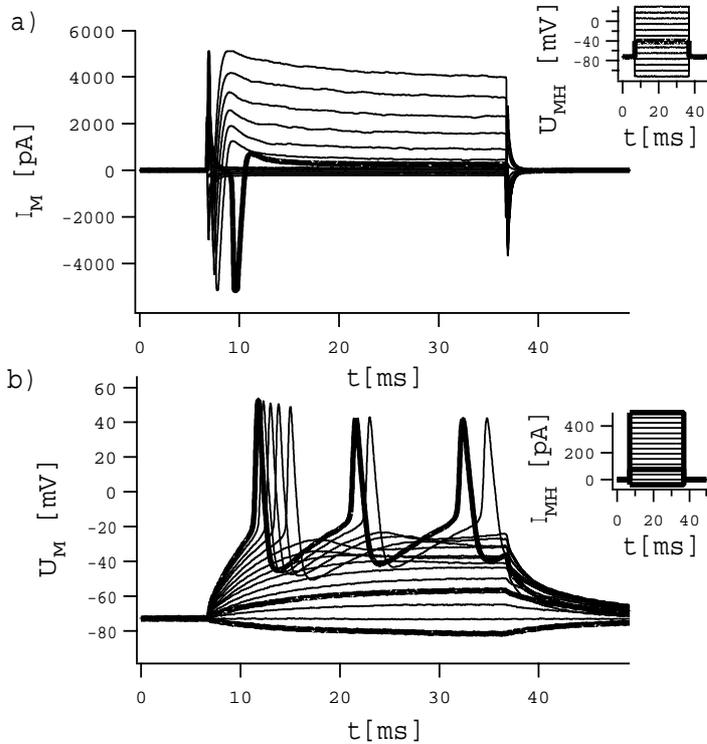


Abbildung 2.5.1: a) Voltage-clamp und b) anschließende current-clamp Messung an einem Neuron, 13 DIV, auf Silizium in SCM kultiviert. Deutlich sind die bei hohen depolarisierenden Pulsen ausgelösten Aktionspotentiale bzw. Aktionsströme erkennbar. Die in den rechts oben eingefügten Abbildungen der Stimulationspulse (U_{MH} bzw. I_{MH}) dick eingezeichneten Kurven korrespondieren zu den dick eingezeichneten Kurven der Messungen (I_M bzw. U_M).

Datenverarbeitung: Der im voltage-clamp Modus an einer Zelle gemessene Strom enthält neben durch aktivierte Ionenkanäle fließenden Komponenten auch eine passiven Komponente durch Umladungsprozesse der Zellmembran. Dieser durch Membranleckwiderstand und -kapazität verursachte passive Anteil muß von dem Gesamtstrom abgezogen werden, um den Aktionsstrom durch aktivierte Ionenkanäle zu erhalten. Eine Analyse der passiven Stromkomponenten bei hyperpolarisierenden Testpuls liefert den Membranwiderstand R_M , die Membrankapazität C_M und den Zugriffswiderstand R_{ZA} ²³.

Da die Nervenzellen durch Dendriten stark verzweigt waren, konnte bei Anlegen eines Testpulses mit der patch-clamp Pipette nicht die ganze Zelle auf ein homogenes Potential „geklemmt“ werden. Dies ist in Abb. 2.5.1 zu sehen: Bei ausreichender Depolarisation floß der Aktionsstrom praktisch als ein alles-oder-nichts-Ereignis und es konnte keine Potentialabhängigkeit angegeben werden. Aus den aktiven Stromantworten bei Depolarisation wurde daher für jede Zelle der maximale Einwärtsstrom $I_{Na,max}$, unabhängig von der Höhe der Stimulation bestimmt. Daneben wurde aus den aktiven Stromantworten jeder Zelle der Auswärtsstrom I_K in Abhängigkeit des Testpotentials U_{MH} bestimmt und daraus die Leitfähigkeit der Kaliumkanäle $G_K = I_K/U_{MH}$ berechnet²⁴.

²³ Details zur Auswertung sind im Anhang Kap. 10.4 nachzulesen. Die Auswertung wurde gemeinsam mit Dr. J. Behrends und M. George durchgeführt, die Software dazu von M. George programmiert.

²⁴ In früheren Experimenten von Dr. J. Behrends wurde gezeigt, daß der Einwärtsstrom hauptsächlich durch Na^+ , der Auswärtsstrom dagegen durch K^+ -Ionen getragen wird. Das Potential in der Zelle ist besonders kurz nach

Resultate der voltage-clamp-Messungen: In Abb. 2.5.2 ist der Entwicklungs-abhängige Verlauf der Membran-Kapazität, des Membran-Widerstandes und der Zell-Querschnittsfläche unter verschiedenen Kulturbedingungen aufgezeichnet. Deutlich ist die Zunahme der Zellgröße $A_{Z,opt}$ und damit verbunden der Gesamt-Membran-Kapazität C_M im Verlauf der Entwicklung zu erkennen. Die Querschnittsfläche der Zellen, aber viel weniger ausgeprägt deren Membrankapazität, wächst dabei signifikant schneller bei Kultur in SCM als in NBM. Ein Einfluß des Substrats ist nicht signifikant erkennbar²⁵. Der Membranwiderstand sinkt mit wachsender Entwicklung, was zum einen auf die Zunahme der gesamten Zelloberfläche und zum anderen auf eine zusätzliche Expression von Leck-Kanälen zurückzuführen ist. Dabei gleichen sich die Entwicklungen unter allen Bedingungen, mit Ausnahme der Zellen, welche in NBM auf Silizium-Substraten kultiviert worden waren. Dort ist der Membranwiderstand nach 5 DIV sogar kleiner als nach 7 und 9 DIV.

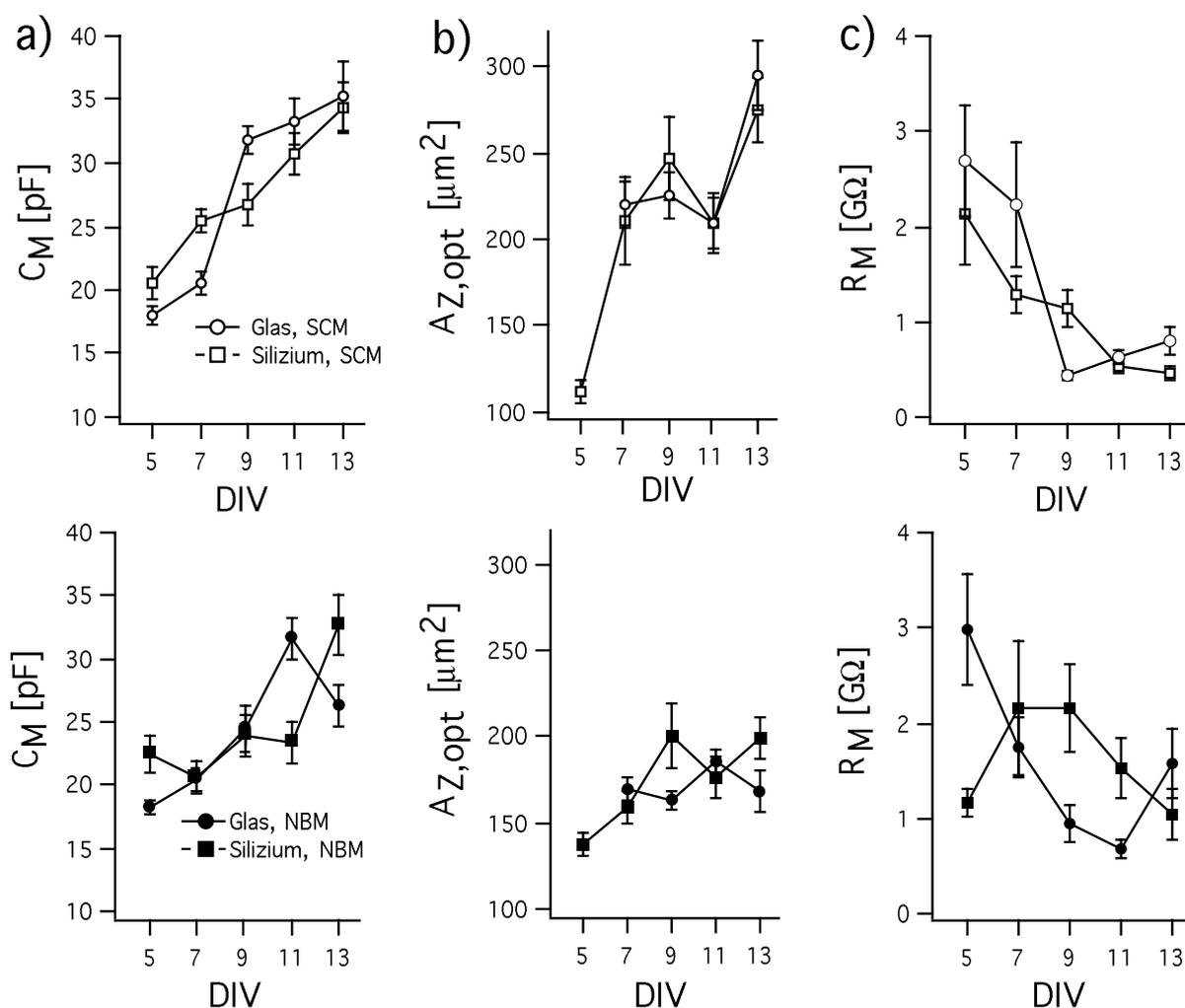


Abbildung 2.5.2: Entwicklungsabhängigkeit passiver Membran-Eigenschaften als Funktion der Differenzierungsstufe : a) Membran-Kapazität, b) Zellquerschnitt und c) Membran-Widerstand. Jeder Punkt entspricht dabei dem aus ca. 30 Zellen gewonnenen Mittelwert, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an [80].

dem Einschalten bzw. nach dem Ausschalten des Testpulses inhomogen verteilt. Zu den restlichen Zeiten ist das Potential in der Zelle in etwa homogen auf das Haltepotential „geklemmt“.

²⁵ Es wurden dazu Signifikanz-Tests nach Kolmogorov und Smirnov durchgeführt [79, 80].

Speziell für Kultur in SCM auf Silizium-Substraten wurden nach 13 DIV folgende Werte gefunden²⁶: $C_M = 34 \pm 13$ pF, $A_{Z,opt} = 280 \pm 110$ μm^2 , $R_M = 0,47 \pm 0,44$ G Ω . Aus diesen Werten kann nun die spezifische Membrankapazität und der spezifische Membranwiderstand abgeschätzt werden: $c_M = 2,7$ μFcm^{-2} und $r_M = 3,9$ k Ωcm^2 .

Die Entwicklung der maximalen Na^+ -Ionenstromdichte $i_{\text{Na,max}} = I_{\text{Na,max}}/C_M$ und die der Leitfähigkeit der K^+ -Ionenkanäle $g_{\text{K}} = G_{\text{K}}/C_M$ ist in Abb. 2.5.3 abgebildet. I.A. steigt die Na^+ -Ionenstromdichte im Verlauf der Entwicklung. Dies hat nichts mit dem Effekt der Zunahme der Zelloberfläche und damit der Zunahme der absoluten Zahl der Na-Kanäle zu tun, da dies bereits über die Normierung mit der Kapazität berücksichtigt ist. Deutlich ist die Entwicklung des Na^+ -Stroms bei Zellen, die in NBM kultiviert worden waren, gegenüber denen in SCM verzögert. Bei Kultur in NBM ist ein Einbruch der Na^+ -Stromdichte bei 11 bzw. 13 DIV bei beiden Substraten deutlich zu erkennen. Bei Kultur in SCM, ist die Entwicklung der Na^+ -Stromdichte bei den Zellen, die auf Silizium-Substraten kultiviert worden waren, signifikant gegenüber der von auf Glas kultivierten Zellen verzögert.

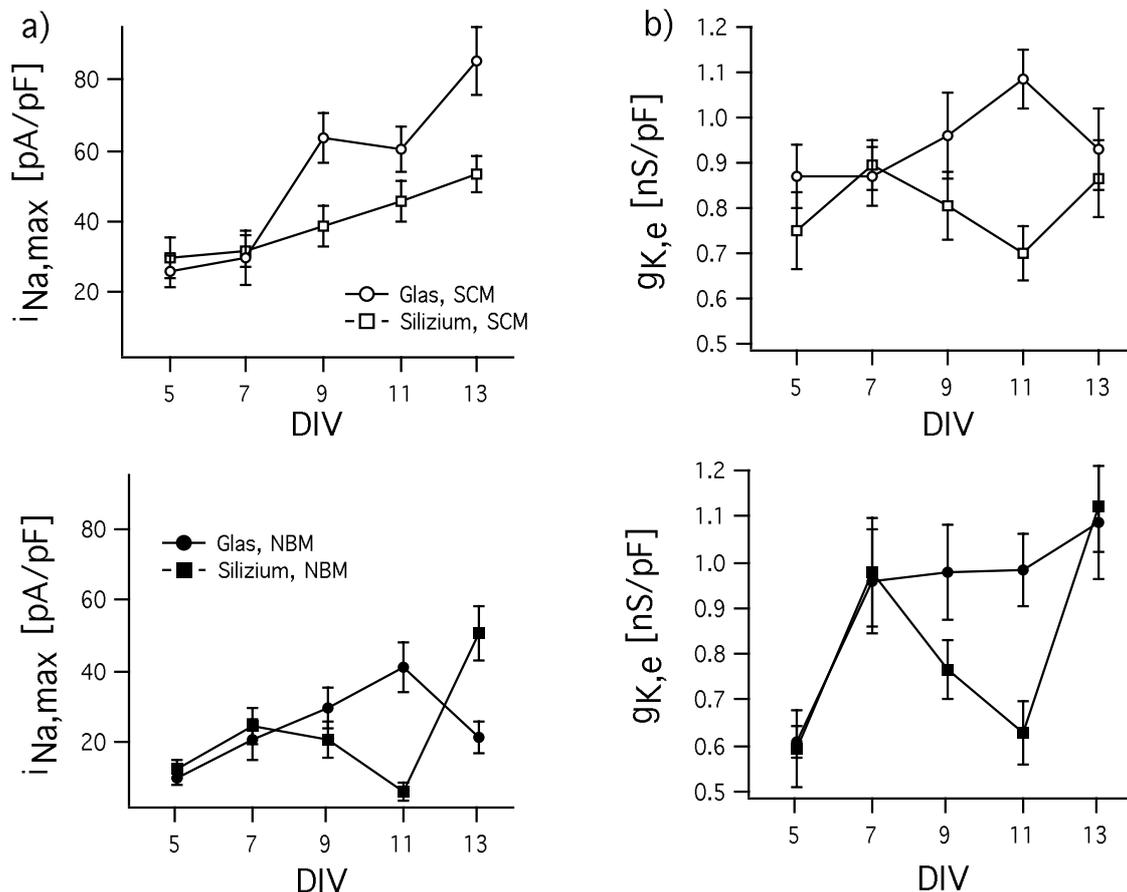


Abbildung 2.5.3: Entwicklungsabhängigkeit aktiver Membran-Eigenschaften als Funktion der Differenzierungsstufe: a) maximale Natrium-Stromdichte b) Kaliumkanal-Leitfähigkeit am Ende (e) des Testpulses. Jeder Punkt entspricht dabei dem aus ca. 30 Zellen gewonnenen Mittelwert, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an.

Mit Ausnahme früher Differenzierungsstufen (DIV 5) hängt die Kalium-Kanal-Leitfähigkeit nicht vom Medium ab. Nach 5 DIV ist die Auswärtsstrom-Leitfähigkeit bei in SCM kultivierten Zellen bereits gut entwickelt, während sie bei in NBM kultivierten Zellen von 5

²⁶ Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

auf 7 DIV noch deutlich steigt. Dagegen ist ein Einfluß des Substrats zwischen 9 und 11 DIV deutlich zu sehen. So hat die Auswärtsstrom-Leitfähigkeit in dieser Entwicklungsstufe bei auf Silizium-Substraten kultivierten Zellen einen signifikanten Einbruch, welcher nicht bei Zellen auf Glas-Substraten zu beobachten ist.

Resultate der current-clamp Messungen: Aus den current-clamp Messungen an mehreren in SCM auf Silizium-Substrat kultivierten Zellen nach 13 DIV wurden folgende Werte über die Form des Aktionspotentials gewonnen²⁷: $dU_{Mmax} = 100 \pm 20 \text{ mV}$ und $(dU_M/dt)_{max} = 130 \pm 70 \text{ V/s}$.

(c) Diskussion

In Hinblick auf eine Verwendung in Zell-Halbleiter-Hybriden verbessern sich die Zelleigenschaften mit fortschreitender Entwicklung [81]. So steigt die Höhe der Aktionsströme bzw. die Höhe der Aktionspotentiale an, und die Membranleitfähigkeit nimmt zu. Für Messungen sollten deshalb bevorzugt ausdifferenzierte Zellen verwendet werden. Allerdings setzt dies voraus, daß sie solange in Kultur gehalten werden können und nicht vorher absterben.

Diese Studie zeigt drei Ergebnisse: (i) in NBM kultivierte striatale Neurone zeigen gegenüber in SCM kultivierten Neuronen eine verringerte Einwärtsstromdichte, aber unveränderte Auswärtsleitfähigkeit. Dieser Effekt ist unabhängig vom Substrat. (ii) In SCM kultivierte Neurone zeigen eine deutlich bessere Entwicklung der Einwärtsstromdichte, wenn sie auf Glas anstelle auf Silizium kultiviert wurden. In NBM ist diese Substratabhängigkeit nicht ersichtlich. (iii) Bei Kultur auf Silizium, ist in der Auswärtsleitfähigkeit um DIV 11 ein Einbruch zu erkennen, sowohl in SCM als auch in NBM. Dieser Effekt tritt nicht bei Glas-Substraten auf. Da die Zellkulturen von Präparation zu Präparation variierten, sind die gewonnenen quantitativen Werte mit relativ hohen Fehlerbalken behaftet.

(i) Vergleich SCM / NBM: In Vergleich zur Kultur in SCM haben in NBM kultivierte Zellen signifikant kleinere Zellkörper („soma“, $A_{Z,opt}$), aber nur wenig kleinere Membrankapazitäten (C_M). Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß die Dendriten bei Kultur in NBM stärker verzweigt sind²⁸. Die gefundenen experimentellen Daten legen nahe, daß bei Kultur in NBM signifikant und spezifisch die Entwicklung der Einwärts-, aber nicht die der Auswärts-Stromdichte verzögert ist. Dies ist entweder direkt dadurch möglich, daß essentielle Proteine für die Entwicklung der Na-Kanäle in NBM nicht enthalten sind, oder durch die Unterdrückung des Gliazell-Wachstums²⁹. Unabhängig von den Ursachen zeigt diese Studie, daß die elektrische Aktivität von Zellen, die in NBM kultiviert worden waren, behindert ist. Da Glia-freie Zellkulturen aber für Zell-Halbleiter-Hybride wünschenswert sind, müssen verbesserte Medien entwickelt werden, welche zwar das Glia-Wachstum verhindern, aber sonst die Entwicklung der Nervenzellen nicht verzögern.

²⁷ Zur Bestimmung dieser Werte wurden ebenfalls passive Anteile des aufgezeichneten Potentials abgetrennt.

²⁸ Bei der Auswertung der Zellquerschnittsfläche $A_{Z,opt}$ wurde nur der Zellkörper, aber nicht die Dendriten berücksichtigt. In der Membrankapazität ist aber die Kapazität der Dendriten enthalten, weshalb auch nicht die ganze Zelle auf ein homogenes Potential geklemmt werden konnte.

²⁹ Es gibt Hinweise, daß Gliazellen Wachstumsfaktoren für Neurone ausscheiden.

(ii) Vergleich Wafer / Glas: Von den beiden Auswirkungen des Substrats auf die Zellentwicklung, fand eine, die Reduktion der Na^+ -Einwärtsstromdichte nur in SCM, aber nicht in NBM statt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das Substrat eine Auswirkung auf das Wachstum von Gliazellen hat. Da in NBM ohnehin keine Gliazellen vorhanden sind, spielt für diesen Effekt das Substrat keine Rolle. Falls das Wachstum von Gliazellen auf Silizium dem gegenüber auf Glas beeinträchtigt wäre, könnte eine dadurch reduzierte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren die Entwicklung von Na-Kanälen behindern.

Viel schwerer zu interpretieren ist der Einbruch der Kalium-Leitfähigkeit bei Kultur auf Silizium, welcher zwischen 9 und 11 DIV sowohl bei Zellen zu sehen ist, die in SCM kultiviert worden waren, als auch bei denen in NBM. Ein spekulative Erklärung wäre z.B., daß der Auswärtsstrom durch zwei Arten von Kanälen getragen wird, von denen die eine maßgeblich im Anfangsstadium der Entwicklung, die andere aber erst in ausgebildeten Zellen für den Stromtransport verantwortlich ist. Wenn durch irgendeinen Effekt Silizium-Substrate die Entwicklung des zweiten Kanaltyps verzögern würden, könnte eine Lücke in der Kalium-Leitfähigkeit entstehen, wenn der erste Kanaltyp schon rückgebildet wird, der zweite aber noch nicht fertig entwickelt ist.

Bei Neuronen scheint die Wahl des Substrats also durchaus einen Einfluß auf die Zellentwicklung zu haben, auch bei so ähnlichen Substraten wie Glas und oxi-/ nitridiertem Silizium. Zur Verbesserung der Kulturbedingungen ist also neben der Entwicklung neuer Medien auch eine Modifikation der Substratoberflächen erforderlich, welche nachteilige Effekte des Substrats unterdrückt.

(iii) Ist oxi-/ nitridiertes Silizium biologisch ähnlich zu Glas ? Die Oberfläche eines Substrats kann in vielfältiger Weise mit Zellen wechselwirken. Die am offensichtlichsten dadurch beeinflusste Eigenschaft ist sicher die Güte der Zelladhäsion. Es ist weiterhin denkbar, daß diese, d.h. die Art, wie Zellen adhärirt sind, auch Einfluß auf andere Eigenschaften der Zellen, z.B. die Ausbildung von Aktionspotentialen haben könnte. Dies ist deshalb durchaus denkbar, da in natürlichem Gewebe Zellen immer in dichtem Kontakt mit Nachbarzellen stehen, also hochgradig vernetzt sind. D.h. Zellen spüren ihre Umgebung. Deshalb scheint es nicht unwahrscheinlich, daß elektrophysiologische Eigenschaften von Zellen durch den Kontakt mit ihrer Umgebung, im Fall von Zell-Halbleiter-Hybriden also durch die Adhäsion auf dem Substrat bzw. der Sensor-Oberfläche, beeinflusst werden können. Grundsätzlich kann Zelladhäsion durch vier Eigenschaften beeinflusst werden, in denen sich die Oberflächen von Glas und oxi-/nitridiertem Silizium unterscheiden können: reaktive Gruppen, Rauigkeit, Ladung und Hydrophobizität.

Als Glas-Substrat wurde in dieser Studie Schott D263M Glas (64.1% SiO_2 , 8.4% B_2O_3 , 4.2% Al_2O_3 , 6.4% Na_2O , 6.9% K_2O , 5.9% ZnO , 4.0% TiO_2 , 0.1% Sb_2O_3) verwendet. Da es bis zu 40% Metalloxide enthält, ist es chemisch nicht identisch zu SiO_2 . Chemische Reaktionen der Zellen oder der Laminin-Beschichtung mit reaktiven Gruppen der Substrat-Oberfläche sind aber unwahrscheinlich, da sowohl die Zusammensetzung der Glas-, als auch die der Silizium-Substrate hoch-inert ist.

Mit dem Rasterkraftmikroskop wurden erste Vorversuche zum Vergleich der Rauigkeit zwischen Glas und Silizium durchgeführt³⁰ [62, 82]. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied in der Rauigkeit festgestellt, wenn diese als mittlere Höhenfluktuation bezogen auf die Hauptebene eines $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ großen Substratausschnittes definiert wurde. Aussagekräftiger wären aber Messungen der Rauigkeit auf mehreren Längenskalen (0,1 nm - 100 μm), um z.B. Unterschiede in der Laminin-Adsorption und der mikroskopischen Topologie auf die Zellanlagerung ausschließen zu können.

Aus vielen Studien ist bekannt, daß Oberflächenladung Zelladhäsion beeinflussen kann [84, 85]. Die Oberflächenladung eines Substrats in wäßriger Lösung wird i.A. über den pH des Ladungsneutralpunktes (pH_{pzc}) angegeben. In Kontakt mit Elektrolyt bildet die SiO_2 -Oberfläche von Glas Silanol- (Si-OH), die Silizium-Wafer mit SiO_2 / Si_3N_4 -Oberfläche neben Silanol- auch Silamin- (Si-NH₂) Gruppen. Da der pH_{pzc} von Siliziumnitrid- und Siliziumoxid-Oberflächen sehr ähnlich ist, folgern Bousse et al., daß die Oberfläche beider Substrate hauptsächlich aus Silanol-Gruppen besteht und praktische keine ionisierbaren Silamin-Gruppen (unter 2%) vorhanden sind [86], während Raiteri et al. einen etwas größeren Silamin-Gruppen-Anteil (bis 12 %) berichten [87]. Daraus folgert Bousse weiterhin, daß bezüglich Biokompatibilität oder Proteinadsorption beide Oberflächen sehr ähnlich sind. Ein Vergleich der in der Literatur vorhandenen Daten deutet insgesamt an, daß Si_3N_4 -Oberflächen bei $\text{pH} = 7$ tendenziell weniger negativ geladen sind als SiO_2 -Oberflächen, besonders nach langem Kontakt mit elektrolytischer Lösung [86-88], wobei der Herstellungsprozeß der Substrate eine große Rolle spielt.

Auch Hydrophobizität spielt in der Zelladhäsion eine Rolle [89]. Si_3N_4 ist hydrophober als Glas. Dies ist z.B. daraus ersichtlich, daß Wassertropfen besser auf Deckgläschen, als auf den in dieser Studie verwendeten oxi-/nitridierten Silizium-Wafern verlaufen.

Die Oberflächen von Glas und Silizium können sich damit insgesamt durchaus in Hinblick auf ihre biologischen Eigenschaften unterscheiden, wobei Glas dabei das günstigere Substrat ist. Dies ist bei der Entwicklung von Zell-Halbleiter-Hybriden zu berücksichtigen. Der Grad und die Ursache der Unterschiedlichkeit sind noch nicht ausreichend bekannt. Besonders kompliziert ist dabei, daß sehr viele Parameter berücksichtigt werden müssen. So kann die Adhäsion einer Zelle direkt vom unterliegenden Substrat beeinflusst werden. Möglich ist aber z.B. auch ein Einfluß der Menge an Laminin, welches auf dem Substrat adsorbiert.

³⁰ Die zugehörigen AFM-Messungen wurden von S. Dannöhl durchgeführt [82, 83].

3 Kopplung elektrischer aktiver Zellen an Sensor-Oberflächen

3.1 Elektrisches Ersatzschaltbild

Nachdem im vorigen Kapitel die elektrischen Eigenschaften mehrerer Zellarten charakterisiert worden sind, soll in diesem Abschnitt die Kopplung dieser Zellen an die Oberfläche eines Potential-Sensors untersucht werden. Mit Hilfe eines elektrischen Ersatzschaltbildes soll dabei die Höhe der zu erwartenden extrazellulären Potentiale berechnet werden, um so die Anforderungen an einen Oberflächenpotential-Sensor zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden abschätzen zu können. Ein von Fromherz und Mitarbeitern vorgestelltes Ersatzschaltbild zur Beschreibung des elektrischen Kontaktes zwischen Zelle und Sensor ist in Abb. 3.1.1 gezeigt¹ [28, 93, 94].

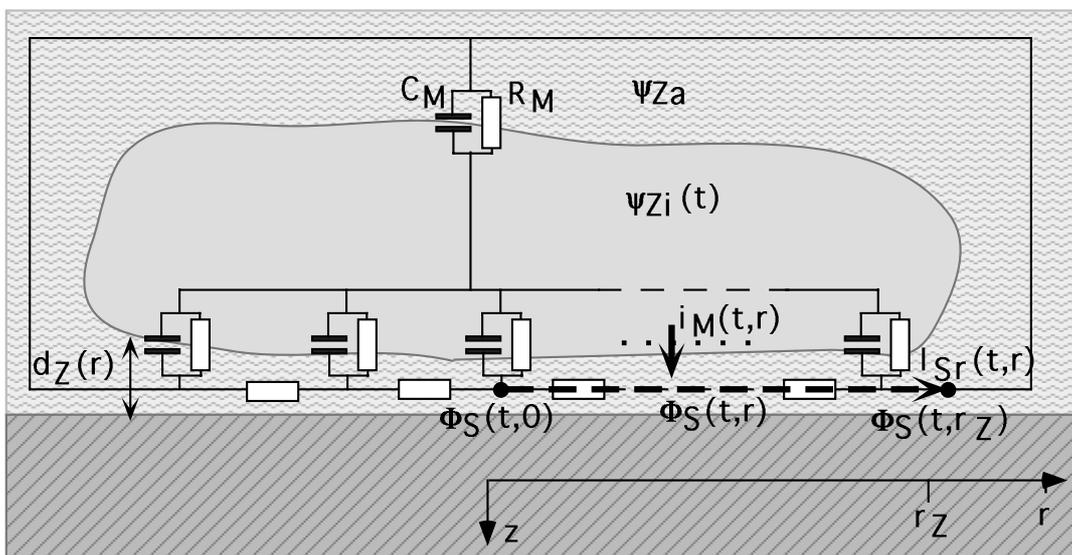


Abbildung 3.1.1: Ersatzschaltbild zur Zell-Halbleiter-Kopplung. Zwischen einer adhärenen Zelle mit Radius r_z und der unterliegenden Sensoroberfläche liegt ein Elektrolytfilm der Dicke d_z [m] mit spezifischem Widerstand ρ_E [Ωm]. Während eines Aktionspotentials fließt durch die Membran ein komplexer Ionenstrom i_M [$A m^{-2}$], dessen ohmscher Anteil durch den Membranwiderstand r_M [Ωm^2] und dessen kapazitiver Anteil durch die Membrankapazität c_M [$F m^{-2}$] bestimmt ist. Durch den Elektrolytfilm unter der Zelle fließt dadurch ein Strom I_S [A].

Während eines Aktionspotentials strömen Ionen durch die Zellmembran. An der Oberseite der Zelle findet dabei ein isotroper Ionenfluß zum Volumen des Elektrolyts statt, wohingegen der durch die Zelle unterseite fließende Strom nur durch den dünnen Elektrolytfilm zwischen Zelle und Sensoroberfläche abfließen kann. Dabei fällt gemäß dem ohmschen Gesetz ein Potential $\Phi_S(r,t)$ [V] an dem Widerstand des Elektrolytfilms ab. Der Spannungsabfall am Elektrolytfilm zwischen dem Mittelpunkt der Zelle unterseite und dem Rand der Zelle entspricht dabei dem maximal zu erwartenden, extrazellulären Potential $\Delta\Phi_S(t) = \Phi_S(t,r=r_z) - \Phi_S(t,r=0)^2$:

¹ Erweiterte Modelle sind z.B. in [52, 63, 90-92] beschrieben.

² Um extrazelluläre Potentiale messen zu können ist also ein Sensor mit Ortsauflösung erforderlich, welcher die Differenz der Oberflächenpotentiale am Ort unter der Zelle und an einem zellfreien Ort bestimmen kann. Eine Herleitung von Gl. 1 ist im Anhang Kap. 10.5 nachzulesen.

$$\Delta\Phi_S(t) = F^{-1} \left(F(U_M(t) - U_{MR}) \cdot \left(1 - \frac{1}{I_0 \left(\sqrt{\frac{1 - i\omega r_M c_M}{r_M d_Z} \rho_E r_Z} \right)} \right) \right) \quad (1)$$

wobei I_0 die modifizierte Besselfunktion nullter Ordnung und F und F^{-1} die Fourier- bzw. inverse Fourier-Transformation darstellen.

Jeder Strom der durch die Zellunterseite durch den Elektrolytfilm zwischen Zelle und ihrer Unterlage in das Volumen des Elektrolyts fließt, verursacht also einen Potentialabfall am komplexen Widerstand der Zellmembran und am Elektrolytfilm, unabhängig von der Richtung des Stroms. Das Membranpotential, d.h. die Spannung zwischen Innerem der Zelle und dem Volumen des Elektrolyts, teilt sich dabei nach dem Prinzip eines Spannungsteilers auf den komplexen Membran- und den Elektrolytfilm-Widerstand auf. Je höher der Widerstand des Elektrolytfilms im Vergleich zum komplexen Membranwiderstand ist, desto mehr Potential fällt extrazellulär entlang des Elektrolytfilms ab. In erster Näherung ist die maximal meßbare Änderung im extrazellulären Potential deshalb das Verhältnis zwischen Elektrolytfilm-Widerstand und dem Gesamtwiderstand aus komplexem Membran- und Elektrolytfilm-Widerstand, multipliziert mit der Amplitude des Aktionspotentials ΔU_M .

Um möglichst große extrazelluläre Potentiale messen zu können, ist also ein hoher Elektrolytfilm- und ein niedriger Membran-Widerstand nötig. Da der spezifische Widerstand des Zellmediums ρ_E in etwa durch die Anforderungen der Zelle festgelegt ist, kann der Widerstand des Elektrolytfilms experimentell nur durch eine möglichst dichte Haftung der Zelle auf der Sensoroberfläche, d.h. durch Verringerung des Zell-Sensor-Abstands d_Z optimiert werden. Der gesamte Widerstand des Elektrolytfilms wächst außerdem mit dem Radius r_Z der Zelle, welcher aber ebenfalls nicht beeinflussbar ist. Allerdings ist es möglich den effektiven Zellradius zu erhöhen, indem Kulturen dicht aneinander wachsender Zellen verwendet werden. Bei schnellen Aktionspotentialen sinkt der kapazitive Widerstand der Membran. Je steiler die Steigung eines Aktionspotentials ist, um so höher wird damit das extrazelluläre Potential an der Unterseite der Zelle sein. Da bei den meisten Zellen der komplexe Membranwiderstand recht hoch ist, können während eines Aktionspotentials extrazellulär typischerweise nur ca. 100 μV Potentialänderung, also nur ein Tausendstel der Membranpotentialänderung gemessen werden. Der Vorteil extrazellulär messen zu können, wird damit im Vergleich zu intrazellulären Messungen durch einen Verlust in der Empfindlichkeit erkauf.

Zur quantitativen Analyse von extrazellulären Potentialen verschiedener Zelltypen müssen also neben den elektrischen Eigenschaften der Zellen die jeweiligen Parameter der Zellgeometrie, wie der Abstand zwischen Zelle und Sensoroberfläche d_Z und der Zellradius r_Z experimentell bestimmt werden. Ist der Zellradius noch relativ einfach mit Mikroskopie zu ermitteln, so ist die Spalte zwischen Zelle und Sensoroberfläche wesentlich schwerer zugänglich.

3.2 Untersuchungen zur Zelladhäsion mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) und dem Rasterkraft-Mikroskop (AFM)³

Um die Eignung von NRK-Fibroblasten zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden zu untersuchen, wird in diesem Kapitel deren Haftung auf Sensoroberflächen charakterisiert. Dazu wird die Adhäsion von NRK-Fibroblasten und Herzmuskelzellen auf Silizium-basierten Substraten verglichen.

(a) Methoden zur Untersuchung der Zelladhäsion

Damit Zellen dicht und fest auf einer Unterlage haften ist es oft nötig, deren Oberfläche gezielt zu modifizieren. Da Zellen untereinander starke Verbindungen eingehen können eignen sich besonders solche Moleküle, die auch in natürlichen Zellmembranen vorkommen, als Adhäsions-unterstützende Beschichtungen für ein Substrat. In der Literatur sind viele verschiedene Beschichtungsverfahren beschrieben⁴. Rein qualitativ eignen sich z.B. Laminin-Beschichtungen für Nervenzell-Kulturen, Fibronectin-Beschichtungen für Herzmuskelzellen, wogegen Fibroblasten-Kulturen auch auf vielen unbeschichteten Substraten gut anwachsen. Um die Zelladhäsion quantitativ zu untersuchen, wurden in dieser Arbeiten zwei verschiedene Ansätze durchgeführt.

Mit Hilfe der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) [95-104] kann der Abstand zwischen einer Zelle und dem unterliegenden transparenten Substrat interferometrisch bestimmt werden. Das Prinzip funktioniert dabei ganz analog der Ausbildung Newtonscher Ringe. Im wesentlichen wird von unten Licht auf eine Zelle gestrahlt, die auf einem Glassubstrat adhäriert ist. Ein Teil des einfallenden Lichtes wird bereits an der Oberkante des Glassubstrats, d.h. an der Glas / Medium - Grenzfläche reflektiert, ein anderer Teil des einfallenden Lichtes dagegen erst an der Unterseite der Zelle, d.h. an der Medium / Zellmembran - Grenzfläche. Durch Aufnahme des aus beiden reflektierten Strahlen entstehenden Interferenzmusters kann dann in erster Näherung die Dicke des Mediumfilms d_z zwischen Zelle und Substrat angegeben werden⁵.

Mit Hilfe des Rasterkraft-Mikroskops (AFM) kann die Topologie von adhären Zellen vermessen werden, insbesondere die Zellhöhe h_z , welche mit rein optischer Mikroskopie nicht zugänglich ist. Da das AFM bereits in vielen Arbeiten am Lehrstuhl Gaub detailliert beschrieben worden ist, sei zum Verstehen der Funktionsweise auf diese Arbeiten verwiesen [115-121]. Aus der Topologie einer Zelle können unter bestimmten Annahmen Aussagen über die Zelladhäsion getroffen werden. Im wesentlichen können drei verschiedene Wechselwirkungen eine Rolle für die Zelladhäsion spielen: (i) die Anziehungskraft der Zellen untereinander, (ii) die Anziehungskraft des Substrats auf die Zellen und (iii) die intrinsische Form der Zellen. Wie in Abb. 3.2.1 dargestellt ist, muß für eine gute Haftung von Zellen an die Oberfläche eines Substrats die Zell-Substrat- stärker als die Zell-Zell-Anziehung sein, da die Zellen sonst zu Verbänden aggregieren. Vernachlässigt man Fluktuationen der Zellmembran

³ Die Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden in [62] veröffentlicht. Die AFM-Bilder wurden von J. Domke aufgenommen und die RICM-Messungen am Aufbau von G. Wiegand durchgeführt.

⁴ Die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle sind im Anhang Kap. 11.2 nachzulesen.

⁵ Eine Beschreibung der RICM-Technik und der verwendeten Methoden zur Auswertung der Daten ist im technischen Anhang Kap. 10.5 nachzulesen. Alternative optische Meßtechniken sind z.B. TIRF [105-109] und FLICM [110-114].

(„Undulation“, [122-125]), dann sind Zellen ohne Wechselwirkung mit ihrer Umgebung in etwa kugelförmig⁶. Ist die Anziehung eines Substrats dagegen stark, so ist es energetisch vorteilhaft, wenn ein möglichst großer Anteil der Zelloberfläche dicht auf dem Substrat aufliegt, die Zellen also ausgestreckt und flach sind. In dieser Arbeit wird deshalb kugelförmige Zelltopologie mit schlechter, flache und langgestreckte Zellform dagegen mit guter Zelladhäsion verknüpft.

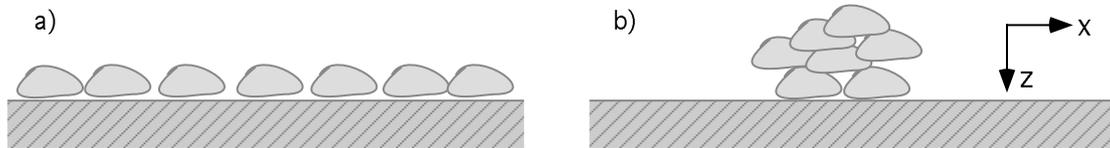


Abbildung 3.2.1: Zelladhäsion auf einem Substrat. a) Die Wechselwirkung der Zellen mit dem Substrat ist stärker als die der Zellen untereinander. b) Die Wechselwirkung der Zellen untereinander ist stärker als die mit dem Substrat.

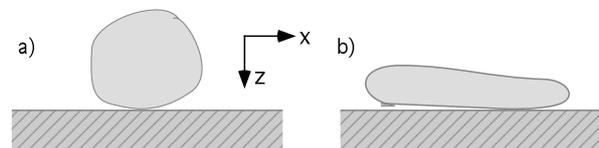


Abbildung 3.2.2: Zelladhäsion auf einem Substrat. a) Die Wechselwirkung mit dem Substrat beeinflusst die Form der Zelle kaum („Kugel-Form“). b) Die Anziehung der Zelle durch das Substrat ist so stark, daß sich die Zelle möglichst dicht anschmiegt („Pfannkuchen-Form“).

(b) RICM-Messungen

Da Silizium-Substrate für sichtbares Licht nicht transparent sind, können mit ihnen keine RICM-Messungen durchgeführt werden. Unter der Annahme, daß Glas eine ähnliche Oberfläche wie oxi-/nitridiertes Silizium hat, wurden alle in diesem Kapitel beschriebenen RICM Messungen mit Glas-Substraten (Schott D263M Glas) durchgeführt. NRK-Fibroblasten wurden dazu direkt auf die Glassubstrate gesiedelt, während die Glassubstrate vor Besiedelung mit Herzmuskelzellen mit Fibronectin beschichtet wurden. Alle Messungen wurden an subkonfluenten Zellkulturen durchgeführt, damit Teile des Substrates frei von Zellen waren und als Referenz verwendet werden konnten. In Abb. 3.2.3 sind zwei typische RICM-Aufnahmen von NRK-Fibroblasten und Herzmuskelzellen abgebildet. Insgesamt wurden ca. 100 Zellen aus sieben verschiedenen Präparationen vermessen.

In den RICM-Bildern von NRK-Fibroblasten konnten einzelne Zellen leicht identifiziert werden. Auch enthielten fast alle Bilder dunkle Regionen, die als Regionen dichten Kontakts („focal contacts“, [101]) zwischen Zelle und Substrat angesehen werden. Derartige „focal contacts“ waren fast immer über die gesamte Unterseite der NRK-Fibroblasten verteilt und nahmen im Mittel einen Anteil von $16 \pm 5\%$ ($n=10$)⁷ ein.

⁶ Dies ist z.B. in Abb. 11.3.2.b sichtbar, in welcher ein Zellrasen nach Zugabe eines Enzyms abgebildet ist, welches die Haftung der Zellen an das Substrat zerstört.

⁷ In dem gesamten Kapitel werden alle Meßwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. n bezeichnet die Zahl der Messungen, welche der Statistik zu Grunde liegen.

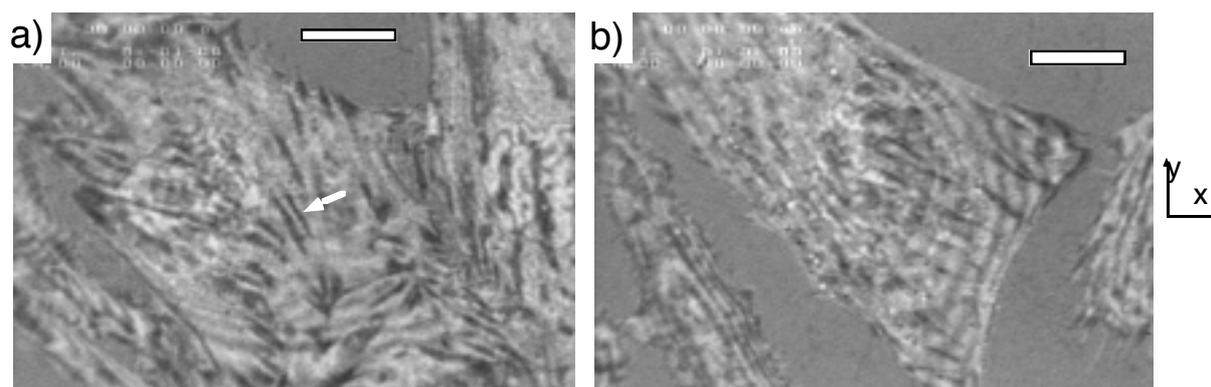


Abbildung 3.2.3: RICM Bilder von a) NRK Fibroblasten und b) Embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen. Die Skalierungsbalken zeigen jeweils 10 μm an. Bei kugelförmigen Zellen müßten konzentrische Interferenzringe sichtbar sein. Die hier gezeigten, komplex strukturierten Interferenzmuster deuten dagegen auf relativ flache Zellunterseiten hin. Dunkle Stellen korrespondieren dabei mit Regionen mit dichten Zell-Substrat-Kontakt. Der Pfeil zeigt exemplarisch auf eine als „focal contact“ bzw. „focal adhesion“ angenommene Stelle der Zelle, erkennbar als streifenförmiger dunkler Fleck im Interferenzbild. Am rechten Rand des Bildes der Herzmuskelzelle sind schwache Interferenzringe erkennbar. Diese korrespondieren mit Interferenzen durch die gewölbte Zelloberseite.

Zur quantitativen Auswertung der RICM-Aufnahmen an NRK-Fibroblasten wurde ein optisches Modell angenommen, welches die Kontaktzone zwischen Zelle und Glassubstrat durch die vier Schichten Glas / Mediumfilm / Zellmembran / Cytoplasma beschreibt. Die Parameter⁸ für das Modell wurden so angepaßt, daß es die experimentellen Daten am besten beschreibt. Das Modell ergab dann einen Wert für den mittleren Abstand d_z zwischen Zellmembran und Glassubstrat. So wurde an „focal contacts“ der Zelle $d_z = 30 \text{ nm}$ gefunden. Innerhalb einer Zelle variierte dieser Abstand um $\pm 15 \text{ nm}$ ($n=10$ „focal contacts“), die Mittelwerte für verschiedene Zellen variierten um $\pm 20 \text{ nm}$ ($n=10$ Zellen). Um mögliche Fehler in der Auswertung zu bestimmen, wurden die Parameter des optischen Modells systematisch variiert und die Auswirkung auf d_z untersucht. Es zeigte sich, daß allein durch Variation eines der Parameter um ca. 1% der Zell-Substrat-Abstand um bis zu $\pm 25 \text{ nm}$ verändert wird⁹.

Die Form einzelner Herzmuskelzellen in den RICM-Aufnahmen war viel unregelmäßiger als die von Fibroblasten. Auch waren die Herzzellbilder in der Regel viel kontrastärmer und weniger Anteile ihrer Adhäsionsfläche konnten als „focal contacts“ identifiziert werden. Insgesamt standen im Mittelwert $6 \pm 3\%$ ($n=10$) der Zellunterseite in dichtem Kontakt („focal contacts“) mit dem unterliegenden Glassubstrat. Dies ist ein signifikant geringerer Anteil als der bei NRK-Fibroblasten gefundene. Da die Substrate zur Verbesserung der Zelladhäsion mit Fibronektin beschichtet worden waren [5], konnte nicht dasselbe, aus vier optischen Schichten bestehende Modell verwendet werden, welches zur Auswertung der Fibroblasten-Daten aufgestellt wurde. Durch die zusätzliche Schicht hätte das Modell um zwei weitere Parameter, Brechungsindex und Schichtdicke, erweitert werden müssen. In Hinblick auf die geringe Fehlertoleranz bei der Parameterwahl wurde daher auf eine quantitative Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes für Herzmuskelzellen verzichtet.

In einigen RICM-Aufnahmen von Herzzellen konnten große Interferenzringe beobachtet werden, welche üblicherweise mit Lichtreflexion an der Oberseite der Zelle erklärt werden [104]. Da sie klar von den Reflexionen an der Unterseite der Zelle unterscheidbar waren, wurde

⁸ Optische Dicken d_2 und Brechungsindizes n_0, n_1, n_2, n_3 .

⁹ Am meisten Einfluß hatte die Variation des Brechungsindex des Cytosols n_3 .

dadurch die Identifikation der „focal contacts“ nicht beeinflusst. Insbesondere bei Herzmuskelzellen, welche während der RICM-Messung kontrahierten, war klar erkennbar, daß sich während einer Kontraktion zwar die durch Reflexionen an der Zelloberseite entstandenen Interferenzringe weiteten, aber die Interferenzbilder an „focal contacts“ der Zellunterseite unverändert blieben.

(c) AFM-Messungen

Alle AFM-Messungen wurden mit einem Bioscope von Digital Instruments durchgeführt. Die Messungen wurden an subkonfluenten Rasen aus NRK-Fibroblasten und embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen auf Silizium-Substraten mit Oxid/Nitrid-Beschichtung aufgenommen¹⁰. Im normalen Kontakt-Modus werden weiche Objekte wie Zellen bei einer Auflagekraft des AFM-Tips von ca. 1-2 nN zusammengedrückt und die so direkt aus den Kraft-Abstands-Kurven bestimmten Höhen sind um ca. 25-35% zu niedrig [83]. Daher wurden Kraft-Abstands-Kurven sowohl auf der Zelle, als auch auf dem nackten, praktisch unendlich harten Substrat aufgenommen. Die so gewonnene Daten können dann abschnittsweise mit dem Hertz-Modell [126] simuliert werden, wobei der Youngs-Modulus und die reale Höhe h_z als unabhängige Simulationsergebnisse geliefert werden [127, 128] („force map“-Modus).

Aus den aufgenommenen AFM-Bildern wurden direkt Länge l_z , Breite b_z und optische Querschnittfläche $A_{z,opt}$ der abgebildeten Zellen bestimmt. Die reale Zellhöhe h_z wurde dann mittels der „force map“-Methode gewonnen. Zur weiteren Auswertung der Daten wurden die Verhältnisse $s_1 = l_z/b_z$ und $s_2 = (\sqrt{4})^{1/2} h_z/A_{z,opt}^{1/2}$ berechnet¹¹. Dabei wird angenommen, daß Zellen um so besser haften, je größer s_1 und je kleiner s_2 ist. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2.1 zusammengefaßt.

Zelltyp	n	l_z [μm]	b_z [μm]	h_z [μm]	$A_{z,opt}$ [μm^2]	s_1	s_2
NRK-Fibroblasten	7	64 ± 19	37 ± 15	$3,6 \pm 0,6$	1700 ± 400	$1,7 \pm 1,3$	$0,078 \pm 0,016$
Herzmuskelzellen	11	72 ± 22	34 ± 13	$2,9 \pm 0,7$	1300 ± 500	$2,1 \pm 1,1$	$0,071 \pm 0,021$

Tabelle 3.2.1: Beschreibung der Topologie adhärenter Zellen.

(d) Diskussion der Ergebnisse

Aus den AFM-Messungen folgt eindeutig, daß NRK-Fibroblasten zwar eine größere absolute Kontaktfläche mit dem Substrat haben, aber weniger langgestreckt und weniger flach als Herzmuskelzellen sind. Die Ergebnisse der an der Oberseite der Zellen gemessenen Topologie deuten damit auf eine festere Adhäsion von Herzmuskelzellen hin.

Die RICM-Messungen ergeben eine größere Anzahl von „focal contacts“ für NRK-Fibroblasten als für Herzmuskelzellen. Auch waren die „focal contacts“ gleichmäßig über die Zellunterseite der Fibroblasten verteilt. Da „focal contacts“ als Zonen besonders dichter Zelladhäsion angesehen werden, deuten die mit RICM an der Unterseite der Zellen

¹⁰ Eine detaillierte Beschreibung der Substrate („Typ 1A“) ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

¹¹ Dazu wurde die Form der Zelle als Ellipsoid mit den Achsen l_z , b_z und h_z angenommen. Für ein Scheibenförmiges Ellipsoid ($l_z=b_z$) gilt $s_1 = 1$, für ein Zigarrenförmiges ($l_z \gg b_z$) gilt $s_1 = l_z/b_z$. Für ein Kugel-förmiges Ellipsoid ($l_z=b_z=h_z$, $A_{z,opt} = l_z \cdot b_z$) gilt $s_2 = 1$, für ein flaches ($h_z \ll l_z$, $h_z \ll b_z$) gilt $s_2 = 0$.

beobachteten Bilder der Adhäsionszone auf eine dichtere Adhäsion von NRK-Fibroblasten hin.

Die durch AFM-Messungen gewonnene Aussage, daß Herzmuskelzellen flacher als NRK-Fibroblasten sind, wird auch durch die RICM-Messungen erhärtet. Denn nur bei Herzzellen, aber nie bei Fibroblasten wurden Licht-Reflexionen von der Oberseite der Zelle beobachtet. Die Zelloberseite bei Herzmuskelzellen muß folglich näher am Substrat gewesen sein, als die von Fibroblasten. Einen weiteren Hinweis auf gute Zellhaftung von Herzmuskelzellen ist die Tatsache, daß der Zell-Substrat-Abstand an „focal contacts“ auch während einer Kontraktion der Zellen erhalten blieb, d.h. die Zellen fest an das Substrat angehaftet waren.

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen kann damit nicht eindeutig geklärt werden, ob die Adhäsion von Herzmuskelzellen auf Glas stärker als die von NRK-Fibroblasten oder umgekehrt ist. Untersuchungen der Topologie der Zelloberseite liefern ein anderes Ergebnis als Untersuchungen der Topologie der Zellunterseite. Allerdings scheint die Adhäsion von Herzmuskelzellen weniger langzeitstabil zu sein. Es konnte einige Male beobachtet werden, daß sich nach einigen Tagen in Kultur der gesamte Herzmuskelzell-Rasen vom Glassubstrat löste und ein ballförmiges Aggregat bildete. Derartiges Lösen vom Substrat wurde niemals bei NRK-Fibroblasten beobachtet.

Der für Fibroblasten mit RICM gewonnene Wert $d_z = 30 \pm 25$ nm für den Abstand zwischen Zelle und Substrat an „focal contacts“ ist in vernünftiger Übereinstimmung mit dem am meisten in der Literatur zitierten Wert von 10-15 nm [101]. Der hohe Fehler des in dieser Arbeit bestimmten Wertes ist auf konzeptionelle Probleme der RICM-Technik zurückzuführen. Um die Messungen quantitativ auswerten zu können, ist die Aufstellung eines optischen Modells erforderlich. In dieser Arbeit konnten die experimentell gefundenen Daten am besten mit einer $d_2 = 10$ nm dicken Zellmembran erklärt werden. Dieser Wert ist signifikant größer als die physikalische Dicke einer Lipid-Doppelschicht von 3-5 nm [102, 129]. D.h. die als Zellmembran bezeichnete optische Schicht umfaßt neben der eigentlichen Lipid-Doppelschicht auch Teile des Aktin-Netzwerks in der Zelle und der extrazellulären Glykokalix. Da die optischen Schichten nicht genau mit den realen, strukturellen Schichten übereinstimmen, ist die absolute Angabe der optischen Schichtdicken mit Fehlern behaftet. Genauso können die Brechungsindizes der optischen Schichten nur mit Unsicherheiten angegeben werden. Zusätzlich wird auch darüber diskutiert, daß der Brechungsindex der Zellmembran nicht homogen entlang der gesamten Zellunterseite verteilt ist, sondern durch vermehrte Aktin-Anreicherung an „focal contacts“ erhöht ist [95]. Die Güte der Simulation der experimentellen Daten und damit die Bestimmung des freien Parameters, hier des Zell-Substrat-Abstands d_z , ist damit allein durch Unsicherheiten bei der Wahl der Parameter schon stark eingeschränkt. Zur quantitativen Bestimmung von Zell-Substrat-Abständen ist die RICM-Technik daher nur bedingt geeignet. Sie liefert aber direkte Bilder der Topologie der Zellunterseite, in welchen dicht an das Substrat adhären Bereiche der Zelle dunkel erscheinen.

Da RICM nur an transparenten Substraten möglich ist, mußten die in dieser Arbeit beschriebenen RICM-Messungen mit Glas-Substraten durchgeführt werden, obwohl es das Ziel war, die Adhäsion von Zellen auf Silizium-Substraten mit Oxid/Nitrid-Beschichtung zu untersuchen. In Kap. 2.5 wurde bereits diskutiert, in wie weit sich die Oberfläche von Glas-

und Silizium- Substraten unterscheidet. Um dennoch Interferenzmessungen an nicht-transparenten Substraten durchführen zu können, wurde kürzlich in der Gruppe von Fromherz die FLICM (fluorescence interference-contrast microscopy) -Technik entwickelt [110]. Damit sind Zell-Substrat-Abstands-Messungen auch an Silizium-Substraten möglich. Der mit FLICM an Erythrocyten bestimmte Wert für den minimalen Zell-Substrat-Abstand auf oxidierten Silizium-Substraten von $d_z = 12,4 \pm 0,7$ nm [112] ist in guter Übereinstimmung mit dem mit RICM an auf Glas adhären Erythrocyten bestimmten Wert von ca. 10 nm [130-133]. Dieser Vergleich deutet an, daß die Ergebnisse der Adhäsions-Untersuchungen von Herzmuskel- und NRK-Zellen auf Glas-Substraten, auf deren Adhäsion auf oxi/nitridierten Silizium-Substraten übertragbar ist.

Zusammenfassend gesehen ist die Adhäsion von NRK-Fibroblasten auf Silizium-Substraten vergleichbar mit der von Herzmuskelzellen. Von der Seite der Zelladhäsion her betrachtet, scheinen NRK-Fibroblasten damit eine vielversprechende Zellart für den Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden zu sein, welche in vielen Anwendungen Herzmuskelzellen ersetzen könnte.

3.3 Simulation extrazellulärer Potentiale

Sind an einer Zell-Sensor-Schnittstelle die elektrischen und geometrischen Parameter bekannt, kann das extrazelluläre Potential entlang der Sensor-Oberfläche berechnet werden. Mit den in dieser Arbeit bestimmten Parametern sollen in diesem Kapitel die extrazellulären Potentiale der verwendeten Zellen vorhergesagt werden.

(a) Wahl der Parameter

Zur Simulation des extrazellulären Potentials muß der zeitliche Verlauf des intrazellulären Membranpotentials $U_M(t)$ bekannt sein. Für die in diesem Kapitel vorgestellten Simulationen wurden dabei folgende, mit patch-clamp bestimmte Aktionspotentiale $U_M(t)$ verwendet, deren maximale Amplitude und Steigung in Tab. 3.3.1 zusammengefaßt ist:

- (i) „NRK“: NRK-Fibroblasten (bei 20-25°C), siehe Abb. 2.4.2.a
- (ii) „Herz, kalt“: Embryonale Hühner-Herzmuskelzellen (bei 20-25°C), siehe Abb. 2.4.2.b
- (iii) „Herz, warm“: Postnatale Ratten-Herzmuskelzellen (bei 37°C), siehe Abb. 2.4.2.c
- (iv) „Nerven“: Embryonale striatale Neurone (bei 20-25°C), siehe Abb. 2.5.1.b¹²

	NRK (Bsp.)	NRK (Mit.)	Herz „kalt“ (Bsp.)	Herz „kalt“ (Mit.)	Herz „warm“ (Bsp.)	Nerven (Bsp.)	Nerven (Mit.)
U_{Mmin} [mV]	-71	-64	-55	-59	-73	-98	-93
U_{Mmax} [mV]	33	35	14	8	4	10	7
ΔU_M [mV]	104	99	69	67	77	108	100
$(dU_M/dt)_{max}$ [V/s]	1,2	1,2	2,1	1,6	34	217	130

Tabelle 3.3.1: Kennwerte von Aktionspotentialen, aufgenommen an verschiedenen Zellarten¹³.

Um nicht immer den gesamten zeitlichen Verlauf eines Aktionspotentials für die Simulation verwenden zu müssen, wurde eine empirische Formel aufgestellt, die den Verlauf mit zwei Parametern, der maximalen Amplitude ΔU_M und der maximalen Steigung $(dU_M/dt)_{max}$, beschreibt. Es reicht dann aus, die maximale Amplitude ΔU_M und die maximale Steigung $(dU_M/dt)_{max}$ der Aktionspotentiale zu kennen¹⁴:

¹² Die Neuronen wurden in serumhaltigem Medium auf Siliziumsubstraten kultiviert und nach 13 DIV untersucht. Es werden hier die Daten bei einer Strom-Stimulations-Amplitude von $I_{MH} = 500$ pA verwendet, wobei die rein passive, durch Membranwiderstand und -kapazität verursachte Antwort abgezogen wurde.

¹³ Die hier für die Simulation verwendeten Parameter wurden alle an Zellen bestimmt, welche auf oxidierten/nitrierten Silizium-Substraten adhärten. Es werden hier für jeden Zelltyp 2 Parametersätze verwendet: In (Bsp., Beispiel) wurden exemplarisch die Werte ΔU_M und $(dU_M/dt)_{max}$ aus den in (i) - (iv) genannten Experimenten verwendet. In (Mit., Mittelwert) wurden die Mittelwerte für ΔU_M und $(dU_M/dt)_{max}$ aus mehreren Messungen verwendet.

¹⁴ Für eine einzige Messung würde dies natürlich keinen Sinn machen, da zur Bestimmung von ΔU_M und $(dU_M/dt)_{max}$ sowieso der gesamte Aktionspotentialverlauf $U_M(t)$ mit Hilfe der patch-clamp Technik aufgezeichnet werden muß. Es kann aber erheblicher Zeitaufwand gespart werden, wenn mehrere Zellen untersucht und ein Mittelwert bestimmt werden soll. Der zeitliche Verlauf eines Aktionspotentials läßt sich schlecht mitteln, da das Öffnen von Ionenkanälen ein statistischer Prozeß ist. Um den Mittelwert des maximal zu erwartenden extrazellulären Potentials zu bestimmen, müßten für alle gemessenen Aktionspotentiale die zugehörigen extrazellulären Potentiale separat simuliert und deren Mittelwert gebildet werden. Im Gegensatz zum detaillierten zeitlichen Verlauf ist das Maximum und die maximale Steigung eines Aktionspotentials recht gut definiert. D.h. es läßt sich aus allen Aktionspotentialmessungen der Mittelwert der maximalen Amplitude und maximalen

$$U_M(t) = U_{MR} + 256 e^{-4} \frac{(dU_M/dt)_{\max}^4}{\Delta U_M^3} t^4 \exp\left(-16e^{-2} \frac{(dU_M/dt)_{\max}}{\Delta U_M} t\right) \quad (1)$$

Neben dem zeitlichen Verlauf des Aktionspotentials gehen in die Simulation der spezifische Widerstand r_M und die spezifische Kapazität c_M der Zellmembran, der Radius der Kontaktfläche r_Z , der Abstand d_Z zwischen Zelle und unterliegendem Substrat und der spezifische Widerstand $\rho_E = 70 \text{ } \Omega\text{cm}$ des Zellmediums ein. Die hier benutzten Werte sind in Tab. 3.3.2 zusammengefaßt¹⁵.

	NRK	Herz	Nerven
r_M [$\text{k}\Omega\text{cm}^2$]	60	20	3,9
c_M [μFcm^{-2}]	1	1	2,7
r_Z [μm]	23	20	9,4
d_Z [nm]	30	65	109

Tabelle 3.3.2: Kennwerte passiver elektrischer Eigenschaften und der Zell-Substrat-Kontaktzone, aufgenommen an verschiedenen Zellarten¹⁶.

(b) Ergebnisse

Die Ergebnisse der mit diesen Werten durchgeführten Simulation zur Bestimmung des maximalen extrazellulären Potentials $\Delta\Phi_{S_{\max}}$ sind in Tab. 3.3.3 zusammengefaßt. In Abb. 3.3.1 ist exemplarisch der simulierte zeitliche Verlauf des für Herzmuskelzellen berechneten extrazellulären Potentials $\Delta\Phi_S(t)$ aufgezeichnet.

	NRK	Herz „kalt“	Herz „warm“	Nerven
$\Delta\Phi_{S_{\max}}$ [μV] (Mes.)	70	40	384	880
$\Delta\Phi_{S_{\max}}$ [μV] (Bsp.)	76	47	396	882
$\Delta\Phi_{S_{\max}}$ [μV] (Mit.)	74	42	-	546

Tabelle 3.3.3: Vorhersage extrazellulärer Potentiale verschiedener Zellarten¹⁷.

Steigung bestimmen. Unter Verwendung von Gl. 1 reicht dann eine Simulation, um den Mittelwert des maximal zu erwartenden extrazellulären Potentials zu berechnen.

¹⁵ In grober Näherung wurden hier die Zellen als rund und mit homogenem Abstand zum Substrat angenommen. Der Kontaktradius r_Z wurde dazu aus den mikroskopisch bestimmten Flächen $A_{Z,\text{opt}}$ der Zellen ermittelt: $A_{Z,\text{opt}} = \pi r_Z^2$. Der Elektrolytwiderstand wurde an Herzmedium experimentell bestimmt.

¹⁶ Für r_M und c_M wurden die in Kap. 2.4 und Kap. 2.5, für r_Z und d_Z die in Kap. 3.2 und Kap. 2.5 ermittelten Werte verwendet. Für d_Z wurden im Falle der Herzmuskel- und Nervenzellen Literaturwerte verwendet [113]: Darin wurde der Abstand von Zellen zu Fibronectin-beschichteten und der Abstand von Nervenzellen zu Laminin-beschichteten Silizium-Substraten bestimmt. Es gibt Hinweise, daß der Zell-Substrat-Abstand mehr von der Beschichtung eines Substrats, als vom Zelltyp abhängt [113]. Für Nervenzellen wurde d_Z in serumfreiem Medium bestimmt. Der in dieser Simulation verwendete Verlauf des Aktionspotentials wurde dagegen in serumhaltigem Medium gemessen. Es kann also sein, daß dort unter der Zelle Glia-Zellen lagen und d_Z damit zu klein angenommen wurde.

¹⁷ Die Simulation wurde mit Gl. 1 aus Kap. 3.1 durchgeführt: In (Mes., Messung) sind die Ergebnisse der Simulation angegeben, in welchen der mit patch-clamp gemessene Zeitverlauf des Aktionspotentials verwendet wurde. In (Bsp., Beispiel) wurde der mit Gl. 1 aus diesem Kapitel bestimmte Verlauf von $U_M(t)$ verwendet, wobei die Parameter ΔU_M und $(dU_M/dt)_{\max}$ der in (Mes.) dargestellten Messung entnommen wurden. In (Mit., Mittelwert) wurde ebenfalls Gl. 1 aus diesem Kapitel verwendet, aber die Mittelwerte für ΔU_M und $(dU_M/dt)_{\max}$ aus mehreren Messungen verwendet.

(c) Diskussion

Ein Vergleich der Simulationsergebnisse, die unter Verwendung experimentell bestimmter Aktionspotential-Verläufe ermittelt wurden (Mes.) mit denen, bei welchen Gl. 1 verwendet wurde (Bsp.) zeigt, daß der relevante zeitliche Verlauf eines Aktionspotentials im wesentlichen durch dessen maximale Amplitude und maximale Steigung beschrieben ist. Die i.A. mit geringerer Steigung abfallende Abklingphase des Aktionspotentials hat auf den Maximalwert des extrazellulären Potentials kaum Einfluß, wohl aber auf dessen Form, siehe Abb. 3.3.1. Es zeigt sich, daß die Höhe eines extrazellulären Potentials besonders durch die Steilheit des Aktionspotentials bestimmt ist. Da die Amplitude eines Aktionspotentials bei den meisten Zellen im Bereich von $\Delta U_M \approx 100$ mV liegt, spielt sie für die Höhe extrazellulärer Potentiale keine große Rolle.

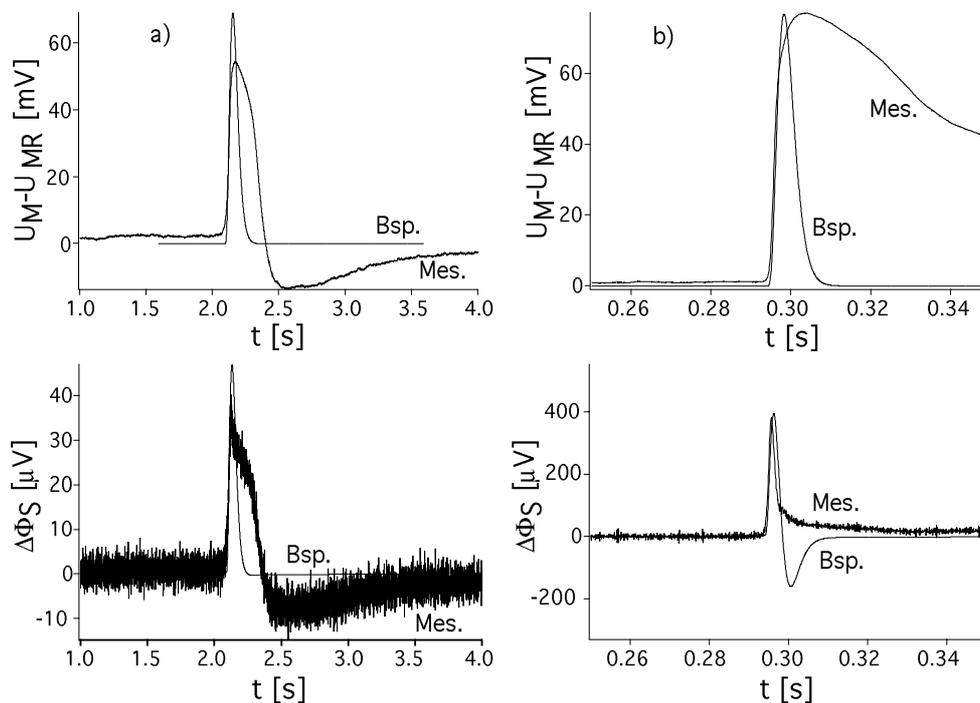


Abbildung 3.3.1: In der oberen Reihe ist der zeitliche Verlauf des Aktionspotentials $U_M(t) - U_{MR}$ von a) embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen bei Raumtemperatur und b) postnatalen Ratten-Herzmuskelzellen bei 37°C dargestellt. Es ist dabei jeweils der experimentell mit patch-clamp bestimmte Datensatz (Mes.) und der dazu mit Gl. 1 simulierte Zeitverlauf (Bsp.) aufgetragen. Dabei zeigt sich, daß der Anstieg des Aktionspotentials gut mit Gl. 1 beschrieben werden kann, der Abfall aber deutlich von der Messung abweicht. In der unteren Reihe sind die dazu simulierten extrazellulären Potentiale $\Delta\Phi_S(t)$ dargestellt. Das unter Verwendung von Gl. 1 bestimmte maximale extrazelluläre Potential $\Delta\Phi_{S\max}$ (Bsp.) stimmt dabei sehr gut mit dem Wert überein, welcher aus dem gemessenen Zeitverlauf des Aktionspotential bestimmt wurde (Mes.). Im biphasischen Verlauf des mit Gl. 1 für Ratten-Herzmuskelzellen berechneten extrazellulären Potentials (Bsp.) ist deutlich der kapazitive Kopplungsmechanismus zu erkennen, der auf den schnellen Abfall des Aktionspotentials zurückzuführen ist. Der real gemessene Abfall des Aktionspotentials ist dagegen so langsam, daß nur eine ohmsche, monophasische Kopplung vorhergesagt wird (Mes.).

Die Verwendung von embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen bei Raumtemperatur erscheint zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden wenig erfolgversprechend, da die zu erwartenden extrazellulären Potentiale aufgrund des langsamen Aktionspotentials sehr klein sind. Das gleiche gilt im Prinzip auch für NRK-Fibroblasten. Diese sind allerdings etwas größer und auch vermutlich etwas dichter an der Substratoberfläche adhäriert, wodurch höhere extrazelluläre Potentiale zu erwarten sind. Da NRK-Fibroblasten konfluent, d.h. dicht an dicht kultiviert werden müssen um Aktionspotentiale ausbilden zu können, kann der effektive Kontaktradius

viel größer als der einer einzelnen Zelle sein. Daher scheint es durchaus realistisch, daß bei Raumtemperatur gemessene, gemittelte extrazelluläre Potentiale unter einem Zellrasen aus NRK-Fibroblasten oder embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen deutlich größer als die unter einzelnen Zellen sind.

Bei auf 37°C temperierten postnatalen Ratten-Herzmuskelzellen sind wegen der Steilheit des Anstiegs des Aktionspotentials ausreichend hohe extrazelluläre Potentiale zu erwarten ($>> 100 \mu\text{V}$). Dies wurde z.B. in der Gruppe von A. Offenhäusser experimentell gefunden, indem mit FET-Feldern extrazelluläre Signale von mehreren $100 \mu\text{V}$ aufgezeichnet werden konnten¹⁸ [63, 134, 135]. Aufgrund ihrer leichten Handhabung sind Herzmuskelzellen bei physiologischen Temperaturen also eine gut geeignete Zellart für den Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden.

Simulationen mit Nervenzellen zeigen, daß trotz ihrer kleinen Zellgröße und des recht großen Zell-Substrat-Abstands, wegen ihres schnellen Aktionspotentialanstiegs realistische Chancen bestehen, extrazelluläre Potentiale messen zu können. So wurde von mehreren Gruppen die erfolgreiche Messung extrazellulärer Potentiale berichtet [15, 30, 32, 33, 136-139]. In serumfreiem Medium ist es aber recht wahrscheinlich, daß Glia-Zellen zwischen der eigentlichen Nervenzelle und dem Sensor liegen. Dadurch wäre der Abstand zwischen Neuron und Sensor sehr groß und die Chance extrazelluläre Potentiale messen zu können verringert. In serumfreier Zellkultur sind keine Gliazellen vorhanden, dafür ist aber die Ausbildung von Aktionspotentialen beeinträchtigt. In der Gruppe von Fromherz konnten unter serumfreien Kulturbedingungen extrazelluläre Potentiale einzelner Neurone mit FET-Feldern gemessen werden [140-142]. Ideal wäre allerdings die Entwicklung eines Kulturmediums, welches Glia-Wachstum unterdrückt, aber trotzdem die Entwicklung der Zellen nicht gegenüber Kultur in serumhaltigem Medium verzögert.

¹⁸ Allerdings läßt sich deren Signalform nur grob mit der in dieser Arbeit verwendeten Simulationsmethode beschreiben. Offenhäusser und Mitarbeiter mußten zur verbesserten Beschreibung der Signalform Potential-abhängige Ionenkanal-Leitfähigkeiten verwenden.

3.4 Zelladhäsion auf Galliumarsenid¹⁹

Damit Zellen auf der Oberfläche eines Sensors wachsen, muß diese biokompatibel sein. Dies ist zwar für Silizium-basierten Oberflächen erfüllt, nicht aber bei GaAs.

Die Toxizität von GaAs ist in Abb. 3.4.1 veranschaulicht: Wird ein Stück GaAs auf einen intakten Zellrasen gelegt, so sterben nach einiger Zeit die Zellen in der Nähe des GaAs-Stücks ab, während weit entfernte Zellen nicht geschädigt werden. Je länger das GaAs-Stück in der Lösung liegt, um so weiter breitet sich das Absterben der Zellen aus. Es liegt damit nahe, daß durch den Elektrolyten toxische Stoffe aus dem GaAs-Stück gelöst werden, die sich Diffusions-getrieben in der Lösung verteilen. Vermutlich sind dabei gelöste Arsenatome, die in wäßriger Lösung zu arseniger Säure reagieren, für die Toxizität von GaAs verantwortlich [144].

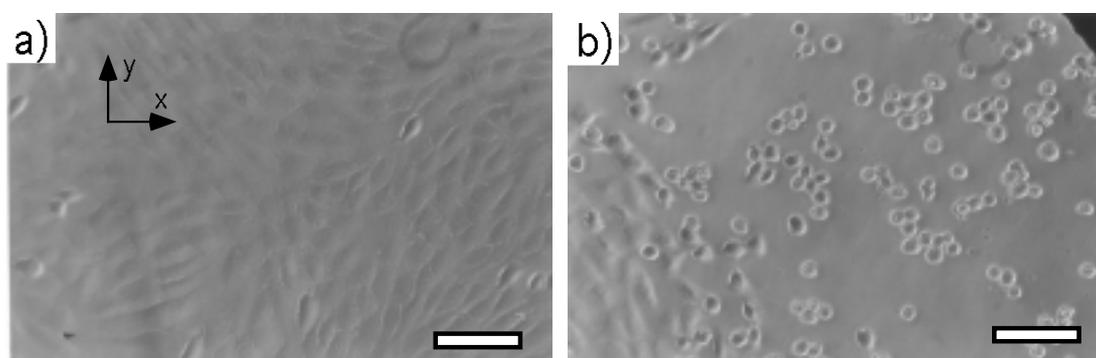


Abbildung 3.4.1: a) Photographie eines Zellrasens von NRK-Fibroblasten, 3 Tage nach Aussaat auf einer unbeschichteten Petrischale. Die Skalierungsbalken zeigen 100 µm Länge an. b) Auf diese Probe wurde dann ein steriles GaAs-Bruchstück gelegt, von welchem ein Teil in der rechten oberen Ecke zu sehen ist. Die hier gezeigte Aufnahme wurde 2 Tage nach Zugabe des GaAs gemacht. Direkt um das GaAs herum sind bereits alle Zellen abgestorben, wie an der rundlichen Zellform zu erkennen ist. Weiter entfernt sehen die Zellen normal aus, wie in der linken Seite des Bildes.

Um Diffusion von Arsenionen in die Lösung zu unterbinden, müssen Sensoren mit GaAs-Oberflächen also mit einer diesbezüglichen Schutzschicht überzogen werden²⁰. In dieser Arbeit wurden dazu zwei Ansätze getestet. Schutzschichten aus aufgesputtertem SiO₂ haben sich als instabil erwiesen, da sie in Kontakt mit Elektrolyt leicht zu Rissen tendieren. Vielversprechender war der Überzug mit PMMA²¹, welches durch Aufschleudern auf die GaAs-Substrate aufgebracht wurde. Es zeigte sich, daß NRK-Fibroblasten auf GaAs-Substraten wachsen, die mit einer 100 nm dicken PMMA-Schicht überzogen wurden.

¹⁹ Die Daten aus diesem Kapitel wurden in [143] veröffentlicht.

²⁰ Zusätzlich soll die Schutzschicht auch verhindern, daß Ionen aus dem Elektrolyt, wie Na⁺ in den Halbleiter diffundieren und diesen dadurch verunreinigen.

²¹ 2% Poly(Methylmethacrylat) mit Molekulargewicht 150000 g/mol, gelöst in Methylisobutylketon (MIBK).

4 Der Licht-adressierbare potentiometrische Sensor (LAPS)

4.1 Funktionsweise

Der Licht-adressierbare potentiometrische Sensor (LAPS) ist ein i.A. in wäßriger Lösung arbeitender Oberflächenpotential-Sensor mit Ortsauflösung [3, 145-150]. Er ist aus einem lateral völlig unstrukturierten Halbleitersubstrat (S) aufgebaut, dessen Rückseite mit einem ohmschen Kontakt versehen und dessen Vorderseite mit einer Isolationsschicht (I) überzogen ist. Die Isolationsschicht steht auf ihrer anderen Seite in Kontakt mit elektrolytischer Lösung (E), vgl. Abb. 4.1.1. Zwischen einer Referenzelektrode im Elektrolyt und der Rückseite des Halbleiters wird eine Vorspannung U_{bias} angelegt. Unter Gleichgewichtsbedingungen kann auf Grund der Isolationsschicht kein Strom fließen. Wird nun ein Teil des Halbleiters mit einem modulierten Lichtzeiger beleuchtet, so werden dort Elektron-Loch-Paare erzeugt und es fließt ein Photostrom I_p , dessen Amplitude abhängig vom lokalen Oberflächenpotential der beleuchteten Stelle ist. Durch Verfahren des als virtuelle Elektrode wirkenden Lichtzeigers entlang der Oberfläche kann die Meßposition frei gewählt werden. Oberflächenpotential-Messungen sind damit nicht auf speziell strukturierte Orte der Oberfläche eingeschränkt, wie z.B. die Gate-Elektroden bei Feldeffekt-Transistor-Feldern.

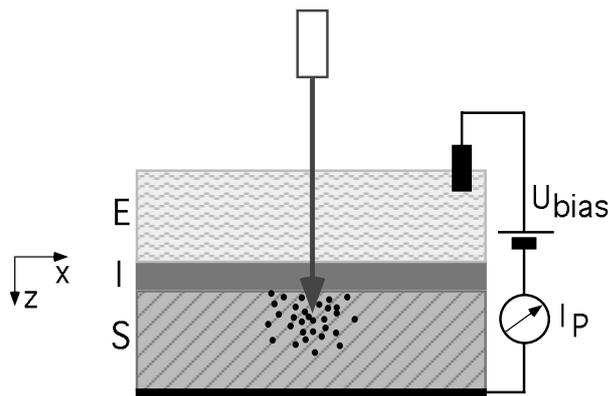


Abbildung 4.1.1: Aufbau eines LAPS in Elektrolyt (E), Isolator (I), Halbleiter (S) Geometrie. Die unstrukturierte Oberfläche des Bauelements ist parallel zur x-y-Ebene eingezeichnet. Mit einem modulierten Lichtzeiger wird ein Teil der Oberfläche beleuchtet. Bei geeigneter Vorspannung U_{bias} fließt dann ein Photostrom I_p in z-Richtung. Dessen Amplitude ist abhängig vom lokalen Oberflächenpotential an der beleuchteten Stelle.

Um den Photostrom zu berechnen, müßte die Diffusionsgleichung für Elektronen und Löcher im Halbleiter unter Berücksichtigung des Drift-Term gelöst werden [151, (K.1.7.1, S.51)]. Alle Berechnungen in diesem Kapitel beziehen sich auf einen n-dotierten Halbleiter.

$$\frac{\partial}{\partial t} p_n = G_p - \frac{1}{\tau_{sp}} p_n + D_{sp} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) p_n - \mu_p \left(\frac{\partial}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial z} \right) (p_n \cdot E) \quad (1)$$

$$j_{pz} = \mu_p \left(p_n \cdot E_z - \frac{k_B T}{e} \frac{\partial}{\partial z} p_n \right) \quad (2)$$

Dabei ist p_n [m^{-3}] die Löcherdichte, G_p [$\text{m}^{-3}\text{s}^{-1}$] = $G_p(x,y,z,t)$ die Generationsrate von Elektron-Loch-Paaren, τ_{sp} und D_{sp} die Lebensdauer bzw. die Diffusions-Konstante freier Löcher im Volumen des Halbleiters, μ_p [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] die Löcher-Beweglichkeit, E [Vm^{-1}] = $E(p_n(x,y,z,t), x,y,z,t)$ das von der angelegten Vorspannung abhängige elektrische Feld im Halbleiter und j_{pz} [$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$] = $j_{pz}(x,y,z,t)$ die axiale Löcherstromdichte. Der erste Term in Gl. 1 beschreibt dabei die Licht-generierte Erzeugung freier Löcher, der zweite die Löcher-Rekombination im Volumen des Halbleiters, der dritte die Löcher-Diffusion und der vierte die

Löcher-Drift durch das elektrische Feld im Halbleiter. Elektronen können analog behandelt werden. I.A. ist Gl. 1 aber nicht analytisch lösbar und in der Literatur sind nur sehr eingeschränkte Spezialfälle beschrieben [152]. Daher wurde in dieser Arbeit Gl. 1 durch Aufspaltung in Teilprobleme gelöst.

Zum besseren Verständnis der Verhältnisse im LAPS ist in Abb. 4.1.2 der Verlauf des elektrostatischen Potentials für den Fall negativer Vorspannung aufgezeichnet. Das Volumen des Elektrolyts liegt dabei auf negativerem elektrischen Potential als das Volumen des Halbleiters. Vom negativen Potential des Elektrolyts werden im Halbleiter freie Löcher angezogen und das Potential im Halbleiter dadurch statisch abgeschirmt¹. Genauso werden im Elektrolyt durch das positive Potential des Halbleiters negativ geladene Ionen angezogen und so das Potential im Elektrolyt statisch abgeschirmt. Durch die Potentialabschirmung überall dort, wo freie Ladungsträger verfügbar sind, sind das Volumen von Elektrolyt und Halbleiter feldfrei. Im Halbleiter liegt nur an der Grenzfläche zum Isolator ein elektrisches Feld vor. Dieser Bereich wird als Raumladungszone bezeichnet.

Im folgenden sei nun angenommen, daß im Volumen des Halbleiters durch einen scharf fokussierten Lichtblitz zusätzliche Elektron-Loch-Paare erzeugt werden². Im n-dotierten Halbleiter sind im Volumen viele freie Elektronen enthalten. Durch die Licht-erzeugten Elektronen ändert sich die Elektronendichte deshalb kaum. Anders bei freien Löchern. Deren Dichte ist im Volumen des Halbleiters sehr niedrig. Deshalb ist an der beleuchteten Stelle die lokale Zahl freier Löcher merklich erhöht, vgl. Abb. 4.1.2.

Im feldfreien Volumen des Halbleiters wirkt auf die Licht-generierten Überschußladungsträger keine elektrostatische Kraft³. Sie beginnen nach dem Fickschen Gesetz zu diffundieren und zwar aufgrund der Feldfreiheit radial in alle Richtungen. Dieser Prozeß ist als reiner Teilchentransport zu verstehen: Löcher und Elektronen diffundieren symmetrisch nach allen Richtungen, wobei kein Netto-Ladungstransport stattfindet. Es fließt ein Teilchenstrom, aber kein Ladungsstrom. Dieser Prozeß wird in Kap. 4.3 ausführlich beschrieben. Zusätzlich muß noch die Rekombination der Überschußladungsträger berücksichtigt werden, da diese im Volumen des Halbleiters nur eine endliche Lebensdauer haben.

Durch Diffusion wird ein Teil der Überschußladungsträger schließlich in die Nähe Raumladungszone an der Grenze zur Isolationsschicht gelangen. Diese ist nicht feldfrei, wodurch Löcher und Elektronen sich nicht mehr äquivalent verhalten: Die ankommenden Ladungsträger werden im elektrischen Feld der Raumladungszone getrennt. Ist der Elektrolyt negativer als der Halbleiter, so werden Löcher im Feld der Raumladungszone in Richtung der Isolationsschicht angezogen, während Elektronen von der Raumladungszone abgestoßen werden. Die Richtung dieser Ladungstrennung ist dabei abhängig vom Vorzeichen der Vorspannung. Da im Feld der Raumladungszone Löcher in eine andere Richtung als Elektronen fließen, findet Ladungstransport statt und bei geeigneter Vorspannung fließt ein Ladungsstrom, welcher im folgenden als Photostrom I_p bezeichnet wird. Dieser Prozeß wird in Kap. 4.2 detailliert beschrieben.

¹ Analog dem Debye-Hückel-Modell.

² Die Leistung des Lichtblitzes soll dabei so liegen, daß im n-dotierten Halbleiter die Dichte Licht-generierter Elektronen kleiner als die Dichte der durch Dotierung vorliegenden Elektronen ist.

³ Da gleich viele Elektronen und Löcher während des Lichtblitzes erzeugt werden, wird die so generierte Ladungsträgerwolke nicht durch elektrostatische Abstoßung auseinander getrieben.

Natürlich ist es in der Praxis nicht möglich, einen Lichtblitz im Inneren des Halbleitervolumens zu erzeugen. Vielmehr muß der Halbleiter von seiner Vorderseite her durch den Elektrolyt oder von seiner Rückseite her beleuchtet werden. An dieser Stelle soll vielmehr durch Abstraktion die Beteiligung zweier getrennter Prozesse verdeutlicht werden: (i) Licht-generierte Ladungsträger im Volumen des Halbleiters diffundieren isotrop, es fließt ein diffusiver Teilchenstrom sowohl in radialer, als auch in axialer Richtung. (ii) Überall dort, wo freie Ladungsträger entlang der Halbleiter-Oberfläche in den Bereich der Raumladungszone gelangen, werden Elektronen und Löcher in deren Feld getrennt, was bei geeigneter Vorspannung einen in axialer Richtung fließenden Photostrom verursacht.

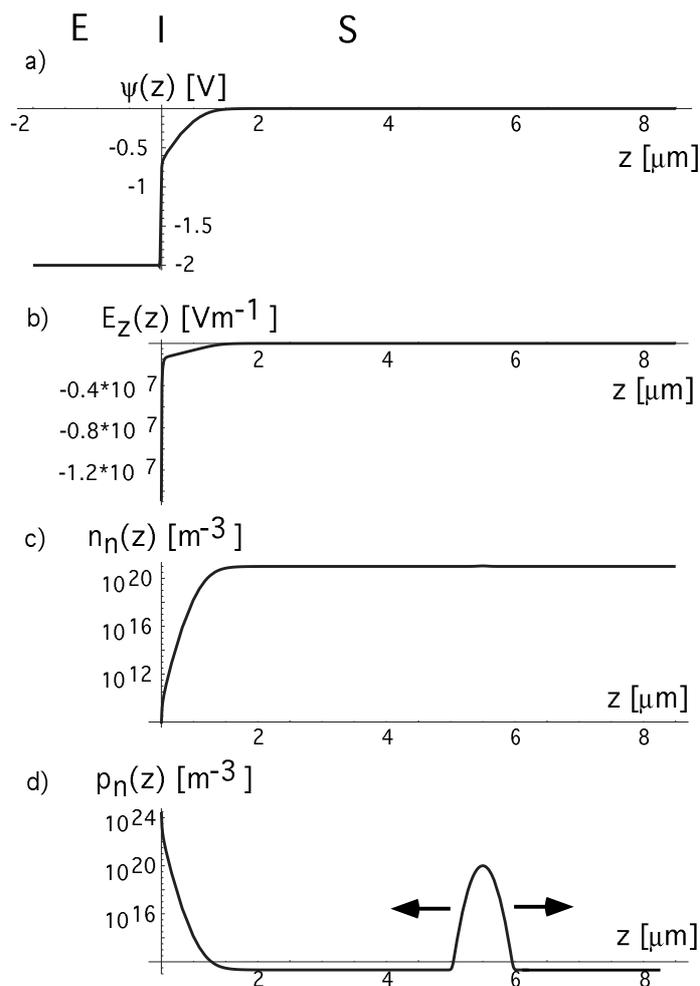


Abbildung 4.1.2: a) Verlauf des elektrostatischen Potentials in einer EIS-Struktur bei negativer Vorspannung. b) Verlauf des axialen elektrischen Potentials senkrecht zur Oberfläche, $E_z = -\partial\psi/\partial z$. Es gibt kein radiales elektrisches Feld parallel zur Oberfläche, $E_x = E_y = 0$. c) Verlauf der Dichte freier Elektronen und d) Löcher im n-dotierten Halbleiter. Im Volumen beträgt die Elektronendichte dabei $n_{n0} = 10^{21} \text{ m}^{-3}$. Zusätzlich wurde sowohl zur Elektronen-, als auch zur Löcherdichte folgender Term als Licht-generierte Ladung addiert: $\delta n^{\text{ill}} = \delta p^{\text{ill}} = 10^{20} \text{ m}^{-3} \cdot \exp(-2 \cdot [(z-5\mu\text{m}) / 0,15\mu\text{m}]^2)$, d.h. ein Gauß-förmiger Lichtblitz 5 µm tief im Volumen des Halbleiters mit einem Radius von 0,15 µm. Durch die vom Lichtblitz erzeugte Überschussladung wird die Elektronendichte nicht verändert, wogegen in der Löcherdichte deutlich die zusätzlichen Ladungsträger erkennbar sind. Nach dem Lichtblitz beginnen die Überschussladungsträger isotrop zu diffundieren.

Das Anwendungspotential des LAPS ist im wesentlichen durch 3 Parameter bestimmt: (i) Potentialempfindlichkeit, (ii) Ortsauflösung und (iii) Zeitauflösung. In den folgenden Kapiteln werden theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Parameter vorgestellt.

4.2 Analyse der Oberflächenpotential-Empfindlichkeit

Ziel dieses Kapitel ist es zu beschreiben, wie durch Messung der Amplitude des Photostroms eine Aussage über das Potential an der beleuchteten Stelle getroffen werden kann. Dazu wird der Photostrom als Differenz der Kapazität einer beleuchteten und unbeleuchteten EIS-Struktur berechnet.

(a) Gleichgewichts-Ladungsträgerverteilung in einer EIS-Struktur

Potentiale elektrischer Ladungen an der Grenzfläche eines Leiters werden durch freie Ladungsträger mit entgegengesetzter Ladung im Leiter abgeschirmt. In Abb. 4.2.1 ist für eine EIS-Struktur der Verlauf der Ladungsträgerdichten im n-dotierten Halbleiter ($z \geq 0$) für drei verschiedene Vorspannungen U_{bias} eingezeichnet⁴.

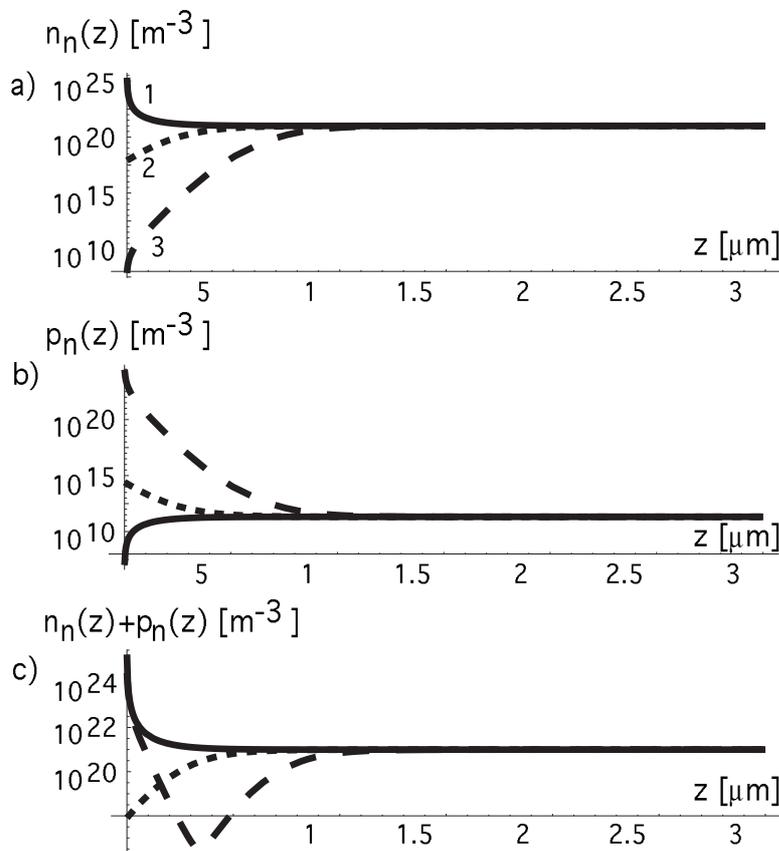


Abbildung 4.2.1: Axiale Dichteverteilung a) freier Elektronen und b) freier Löcher im Halbleiter bei drei verschiedenen Vorspannungen: $U_{\text{bias}} = +4V$ („Akkumulation“, durchgezogene Linie 1), $-0,1V$ („Verarmung“, gepunktete Linie 2), $-2V$ („Inversion“, gestrichelte Linie 3). c) Totale Dichte freier Ladungsträger (Löcher + Elektronen).

Ist bei positiver Vorspannung U_{bias} das Volumen des Elektrolyts auf positiverem Potential als das Volumen des Halbleiters, so sammeln sich im Halbleiter an dessen Grenzfläche zum Isolator Elektronen an („Akkumulation“, $n_n(z=0) > n_{n0}$) und die Löcherdichte ist verringert. Damit sind überall im Halbleiter Elektronen als frei bewegliche Ladungsträger vorhanden. Bei negativer Vorspannung werden dagegen im Halbleiter Löcher an die Grenzschicht angezogen und freie Elektronen von der Grenzschicht weggedrängt ($p_n(z=0) > p_{n0}$, $n_n(z=0) < n_{n0}$). Da

⁴ Alle hier vorgestellten Berechnungen sind nach den im Anhang Kap. 12.3 beschriebenen Methoden mit folgenden Parametern berechnet worden: $\epsilon_E = 81$ (statischer Wert von Wasser), $c_E = 0,01 \text{ mol/l}$, $Z = 1$, $\text{pH} = 7$, $\text{pH}_{\text{pzc}} = 2,2$, $\delta = 0,00071$, $n_0(\text{Si}^-) = 1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, $d_1 = 30 \text{ nm}$, $\epsilon_1 = 3,9$ (SiO_2), $\epsilon_S = 11,9$ (Si), $n_i = 1,45 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ (Si), $n_D = 10^{15} \text{ cm}^{-3}$, $T = 293 \text{ K}$, keine Beleuchtung.

aber im n-dotierten Halbleiter weniger freie Löcher als freie Elektronen vorhanden sind ($n_{n0} \gg p_{n0}$), wiegt bei kleinen Vorspannungen der Gewinn an Löchern den Verlust an Elektronen nicht auf ($p_n(0) < n_{n0}$). D.h. der Halbleiter ist an der Grenzfläche zum Isolator verarmt an freien Ladungsträgern („Verarmung“). Bei hohen negativen Vorspannungen dagegen wird die Dichte freier Löcher an der Grenzschicht größer als die Volumendichte freier Elektronen ($p_n(0) > n_{n0}$). An der Grenzfläche zum Isolator liegen nun stark angereichert Löcher vor („Inversion“), während im Volumen des Halbleiters weiterhin freie Elektronen für die Leitfähigkeit verantwortlich sind. Dabei gibt es einen Bereich zwischen Grenzfläche zum Isolator und dem Volumen des Elektrolyts, in welchem der Halbleiter verarmt an freien Ladungsträgern ist⁵. Dort ist die elektrische Verbindung zwischen den freien Löchern an der Grenzfläche und den freien Elektronen im Volumen des Halbleiters unterbrochen.

(b) Kapazität einer EIS-Struktur

Die Gesamt-Kapazität C_{EIS} einer EIS-Struktur entspricht einer Reihenschaltung der Kapazitäten der Raumladungszone im Elektrolyt C_E , des Isolators C_I und der Raumladungszone im Halbleiter C_S . Dabei dominiert die kleinste Kapazität. Da Ladungen im Elektrolyt sehr effektiv abgeschirmt werden und somit die Ausdehnung der Abschirmschicht sehr klein ist (nm-Bereich), ist die Elektrolytkapazität in den in dieser Arbeit verwendeten Strukturen immer deutlich größer als die von Isolator und Halbleiter. Deshalb spielt C_E für die Gesamtkapazität eine untergeordnete Rolle. Diese wird also hauptsächlich durch C_I und C_S bestimmt. Im Fall von Akkumulation sind im Halbleiter an der Grenzfläche zum Isolator viele freie Elektronen vorhanden, welche Potentiale effektiv abschirmen können. Durch die kleine Ausdehnung der Abschirmschicht (μm -Bereich) ist $C_S \gg C_I$ und damit C_I bestimmend für C_{EIS} . Im Fall von Verarmung sind an der Halbleiter-Grenzfläche nur wenig freie Ladungen vorhanden. Die Abschirmung ist damit ineffektiv und weit ausgedehnt, was eine kleine Kapazität $C_S \ll C_I$ bedeutet. Im Fall von Inversion liegen an der Halbleiter-Grenzfläche viele Löcher vor, wodurch die Abschirmung effektiv und die Kapazität groß ist, $C_S \gg C_I$. Damit ist C_{EIS} durch C_I bestimmt. Der Gleichgewichtsverlauf der Kapazität in Abhängigkeit der Vorspannung ist in Abb. 4.2.2 dargestellt.

Komplizierter sind die Verhältnisse, wenn Nicht-Gleichgewichtsfälle betrachtet werden. Dies ist nötig, wenn die Vorspannung moduliert wird und neben dem Gleich- auch einen Wechselspannungsanteil hat. Im Fall von Akkumulation und Beginn der Verarmung spielt Modulation der Vorspannung für die Kapazität keine Rolle. Anders im Fall von Inversion: Dort sind zwar an der Halbleiter-Grenzfläche viele freie Ladungsträger (Löcher) vorhanden, welche aber durch den hohen Widerstand der Verarmungszone von den Ladungsträgern im Volumen des Halbleiters (Elektronen) getrennt sind, vgl. Abb. 4.2.1. Bei schnellen Änderungen in der Vorspannung können die freien Ladungsträger sich dadurch nicht so schnell umlagern, wie es die Änderungen in der Vorspannung verlangen würden. Damit können Potentialänderungen nicht schnell genug abgeschirmt werden, was eine Erniedrigung der Kapazität zur Folge hat. Deshalb ist in Inversion $C_S < C_I$ und $C_{EIS} = C_I$. Der Hochfrequenz-Verlauf der Kapazität in Abhängigkeit der Vorspannung ist in Abb. 4.2.2 dargestellt⁶.

⁵ In dem in Abb. 4.2.1.c gezeigten Beispiel liegt die Verarmungszone ca. $0,5 \mu\text{m}$ tief im Halbleiter und im Falle von Inversion gilt: $p_n(0,5 \mu\text{m}) < n_{n0}$, $n_n(0,5 \mu\text{m}) < n_{n0}$.

⁶ Jede EIS-Diode ist ein eigenständiger Oberflächenpotential-Sensor: Wie in Abb. 4.2.2 gezeigt ist, hängt die Kapazität vom Potential ab [153-156]. Die größte Potential-Empfindlichkeit liegt vor, wenn die Vorspannung auf

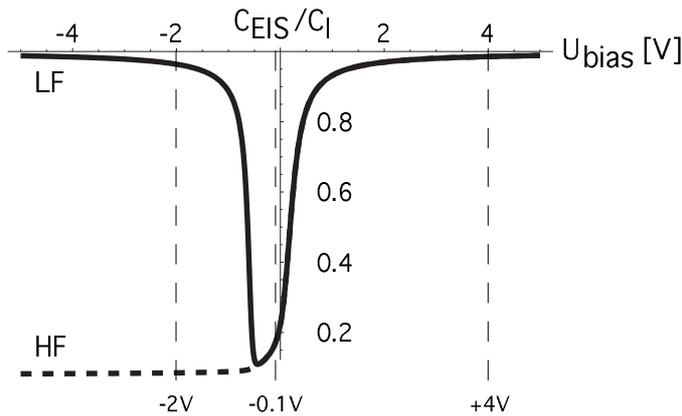


Abbildung 4.2.2⁷: Niederfrequenz- (LF, „low frequency“) und Hochfrequenz- (HF, „high frequency“) Kapazität C_{EIS} einer EIS-Struktur, in Abhängigkeit der modulierten Vorspannung U_{bias} . Der Fall sehr niedriger Frequenzen entspricht dem Gleichgewichtswert. Die Kapazität ist auf die Kapazität der Isolationschicht C_I normiert.

(c) Photostrom bei Beleuchtung einer EIS-Struktur

Wird eine EIS-Struktur beleuchtet, so werden im Halbleiter zusätzlich Elektron-Loch-Paare δn^{ill} , δp^{ill} erzeugt. In Inversion wächst dabei bereits bei schwacher Beleuchtung ($p_{n0} < \delta n^{ill} < n_{n0}$) die Zahl der freien Ladungsträger an der Grenzfläche, wodurch Potentiale effektiver abgeschirmt werden und die Abschirmlänge abnimmt. Dadurch steigt die Kapazität des Halbleiters und es fällt weniger Potential über dem Halbleiter und mehr über dem Isolator ab. Die Gesamtkapazität nimmt damit ab und nähert sich der Isolatorkapazität. Anders im Falle von Akkumulation: Dort sind auch ohne Beleuchtung sehr viele freie Elektronen in der Grenzschicht enthalten, so daß durch schwache Beleuchtung die Zahl freier Ladungsträger nur unmerklich erhöht wird und deshalb die Kapazität unverändert bleibt. Im Grenzfall starker Beleuchtung sind so viele freie Ladungsträger an der Halbleiter-Grenzfläche vorhanden, daß unabhängig von der Vorspannung $C_S > C_I$ und damit $C_{EIS} = C_I$ ist. In Abb. 4.2.3 und Abb. 4.2.4 ist die Auswirkung von Beleuchtung auf die Ladungsträgerverteilung und Kapazität in Abhängigkeit der Vorspannung zusammenfassend dargestellt.

Im Fall von Inversion liegen im Gleichgewicht für dunkle und beleuchtete EIS-Strukturen im Halbleiter jeweils unterschiedliche statische Ladungsträger- bzw. Potential-Verteilungen vor. Wird die Beleuchtung nun an- und ausgeschaltet, müssen sich die Ladungsträger an der Grenzfläche zwischen den beiden Gleichgewichtsverteilungen umlagern. Beim An- und Ausschalten der Lichtquelle fließt dabei jeweils ein abklingender Verschiebestrom. Bei periodischer Modulation der Beleuchtung fließt dann ein periodischer Wechselstrom, welcher als Photostrom I_P bezeichnet wird. Bei Akkumulation ändert schwache Beleuchtung nichts an der Ladungsträger-Verteilung im Halbleiter, und es fließt auch bei periodischer Modulation der Lichtquelle kein Photostrom. Die Potentialabhängigkeit des Photostroms ist in Abb. 4.2.5 aufgetragen⁸. Sie ist im Fall der Verarmung, d.h. am Wendepunkt der $I_P(U_{bias})$ -Kurve am

den Wendepunkt der (HF-) Kapazitäts-Spannungs-Kennlinie eingestellt wird. Kleine Änderungen des Potentials an der Oberfläche der EIS-Diode bewirken dort starke Änderungen der Kapazität. Um ortsaufgelöst messen zu können, müssen viele solcher EIS-Dioden parallel betrieben werden. Die Sensor-Oberfläche ist dann in einzelne aktive Meßpositionen aufgeteilt, wobei jede aktive Meßposition der Oberfläche einer einzelnen EIS-Diode entspricht. Im LAPS hingegen, kann unter Verwendung eines Lichtzeigers mit einer einzigen, lateral unstrukturierten EIS-Struktur Ortsauflösung erreicht werden.

⁷ Details der Simulation sind im Anhang Kap. 12.3 nachzulesen. Es wurde hier für den LF-Grenzfall $B=0$ und den HF-Grenzfall $B=1$ verwendet, alle anderen Parameter entsprechen denen von Abb. 4.2.1.

⁸ Der Photostrom ist proportional zur Differenz der Kapazitäten im dunklen und beleuchteten Fall: $I_P \propto \Delta Q_S / \Delta t \propto (\Delta C_{EIS} \cdot U_{bias}) / \Delta t \propto \Delta C_{EIS}$. ΔQ_S ist dabei die bei Einschaltung der Beleuchtung im Halbleiter bei konstanter Vorspannung U_{bias} verschobene Ladung und $\Delta C_{EIS} = C_{EIS}(\text{beleuchtet}) - C_{EIS}(\text{dunkel})$ die dadurch veränderte Kapazität der Halbleitergrenzfläche.

größten. Weder in Akkumulation, noch in Inversion hängt der Photostrom von Potentialänderungen $\Delta\Phi_S$ ab, da dort die Steigung der Kennlinie Null ist.

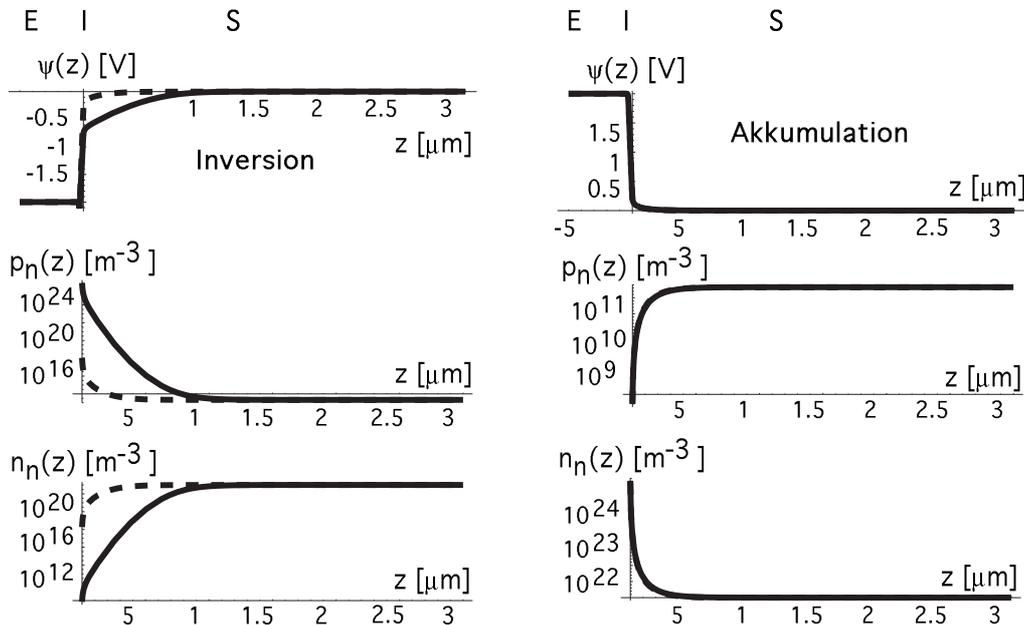


Abbildung 4.2.3⁹: Räumlicher Verlauf von Potential, Löcher- und Elektronendichte im Halbleiter bei Inversion $U_{bias} = -2V$ und Akkumulation $U_{bias} = +2V$. Eingezeichnet sind jeweils die Verläufe für einen unbeleuchteten (durchgezogene Linie) und beleuchteten (gestrichelte Linie) Halbleiter. Im Fall von Inversion wird durch Beleuchtung die Ladungsträgerdichte im Halbleiter an der Grenze zum Isolator merklich erhöht. Dadurch wird das Potential des Elektrolyten effektiver abgeschirmt (kürzere Abklinglänge des exponentiell abfallenden Potentials), wodurch weniger Potential über den Halbleiter abfällt (weniger Bandverbiegung¹⁰). Durch die bei Beleuchtung vorliegende geringere Bandverbiegung reichern sich weniger freie Ladungsträger an der Grenzfläche an. Im Fall von Akkumulation ändert Beleuchtung die Ladungsträgerdichte im Halbleiter und damit auch dessen elektrostatisches Potential an der Grenzschicht nur unmerklich.

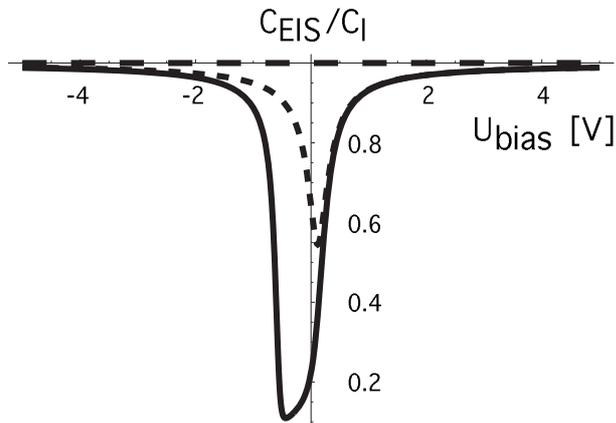


Abbildung 4.2.4¹¹: Gleichgewichts-Kapazität C_{EIS} einer EIS-Struktur ohne (durchgezogene Linie), mit schwacher (kurz gestrichelte Linie) und mit starker (lang gestrichelte Linie) Beleuchtung, in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} , normiert auf die Isolatorkapazität C_I .

⁹ Für die Simulation wurde im Fall ohne Beleuchtung $\delta p^{III} = \delta n^{III} = 0$, für den Fall mit Beleuchtung $\delta p^{III} = \delta n^{III} = 10^{14} \text{cm}^{-3} \cdot \exp(-z/3\mu\text{m})$ verwendet, alle anderen Parameter entsprechen denen von Abb. 4.2.1. Das Minimum in der Potentialverteilung bei $z = 0$ im Falle der Inversion wird durch die Oberflächenladung der Isolationschicht verursacht.

¹⁰ Im Grenzfall maximaler Beleuchtung sind im Halbleiter so viele freie Ladungsträger (Elektronen wie Löcher) enthalten, daß er ähnlich zu einem Metall (nur Elektronen) und dadurch im Inneren völlig feldfrei ist. Im Metall ist die Abschirmung so effektiv, daß sich nur an dessen Oberfläche freie Elektronen befinden und kein statisches Potential in das Innere eindringen kann, es gibt keine Bandverbiegung und die Kapazität ist unendlich.

¹¹ In der Simulation wurde für den Fall keiner Beleuchtung $\delta p^{III} = \delta n^{III} = 0$ und für den Fall schwacher Beleuchtung $\delta p^{III} = \delta n^{III} = 10^{15} \text{cm}^{-3} \cdot \exp(-z/3\mu\text{m})$ verwendet. Dargestellt ist jeweils der Niederfrequenz-Fall $B=0$. Für den Fall starker Beleuchtung wurde $C_{EIS} = C_I$ gesetzt. Alle anderen Simulationsparameter sind analog zu den in Abb. 4.2.1 verwendeten.

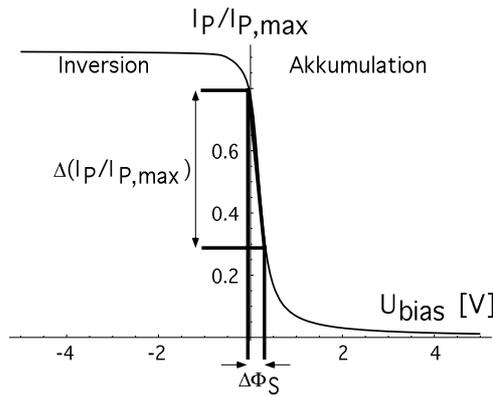


Abbildung 4.2.5¹²: Photostrom-Spannungs-Kurve ($I_p(U_{bias})$) einer EIS-Struktur unter hochfrequenter Beleuchtung. Am Wendepunkt, d.h. am Ort der maximalen absoluten Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie, hängt der Photostrom am empfindlichsten von Potential-Änderungen ab: kleine Änderungen im Oberflächenpotential $\Delta\Phi_S$ bewirken dort eine maximale Änderung des Photostroms ΔI_p .

Nur an den Stellen der EIS-Struktur, bei denen an der Halbleiter-Grenzfläche Licht-generierte Ladungsträger vorliegen¹³, fließt im Fall von Verarmung bzw. Inversion ein Photostrom. Damit läßt sich durch Beleuchtung mit einem Lichtzeiger der Orts der Messung frei auswählen. Diese Konfiguration mit der Möglichkeit orts aufgelöster Messungen wird als LAPS bezeichnet. Lokale Oberflächenpotentiale $\Delta\Phi_S$ an der Elektrolyt-Isolator-Grenzfläche verschieben das Potential des Halbleiters je nach deren Vorzeichen in Richtung Akkumulation bzw. Inversion und können so durch Bestimmung der Amplitude des Photostroms gemessen werden.

(d) pH-Abhängigkeit des Photostroms

Das Oberflächenpotential und damit der Photostrom eines auf Silizium-Basis aufgebauten LAPS hängt vom pH-Wert des Elektrolyten ab [3, 145]: Befindet sich eine Siliziumoxid-Oberfläche (I) in Kontakt mit elektrolytischer Lösung (E), reagieren Protonen aus dem Elektrolyt mit ihren Silanol-Gruppen¹⁴. In Abb. 4.2.6 ist dazu der Verlauf der Ladungsträgerdichte in einer EIS-Struktur für zwei verschiedene pH-Werte abgebildet. Bei pH-Werten die kleiner als der Ladungsneutralpunkt pH_{pzc} sind, binden Protonen an die Silanolgruppen und laden die Oberfläche der Isolationsschicht damit positiv auf. Im Fall $pH = pH_{pzc}$ trägt die Isolationsschicht keine Oberflächenladung ($Q_I = 0$). Das im Vergleich zum Elektrolyten negativere Potential des Halbleiters wird dann durch positiv geladene Ionen im Elektrolyt ($Q_E > 0$) abgeschirmt, während das im Vergleich zum Halbleiter positivere Potential des Elektrolyten durch Elektronen im Halbleiter ($Q_S < 0$) abgeschirmt wird. Im Fall $pH > pH_{pzc}$ werden Protonen von den Silanolgruppen an den Elektrolyt abgegeben, und die Isolationsschicht ist negativ geladen ($Q_I \ll 0$). Sowohl im Elektrolyten, als auch im Halbleiter, wird dieses Potential durch Anreicherung positiver Ladung abgeschirmt ($Q_E > 0$, $Q_S > 0$). Durch den pH-Wert des Elektrolyten wird also die Ladungsträgerverteilung in der

¹² Die Kurve wurde mit der im Anhang Kap. 12.3 beschriebenen Theorie gewonnen, in dem die Hochfrequenzkapazität ($B=1$) einer unbeleuchteten EIS-Struktur ($C_{EIS} = C_I$) von der Hochfrequenzkapazität ($B=1$) einer äußerst stark beleuchteten EIS-Struktur ($\delta p^{III} = \delta n^{III} = 10^{15} \text{cm}^{-3} \cdot \exp(-z/3\mu\text{m})$, andere Parameter analog Abb. 4.2.1) abgezogen und auf den Maximalwert normiert wurde. Durch Variation der Beleuchtungsstärke könnte im Prinzip auch die Lichtleistungs-Abhängigkeit des Photostroms simuliert werden.

¹³ Diese können entweder direkt an der Grenzfläche erzeugt worden oder durch Diffusion zur Grenzfläche gekommen sein, vgl. Kap. 4.3. Die Potentialabhängigkeit des Photostroms kann auch mit folgendem Bild veranschaulicht werden. In Inversion fällt ein signifikanter Teil der Vorspannung über dem Halbleiter (kleine Kapazität) ab. Deshalb liegt im Halbleiter an der Grenzfläche zum Isolator eine Raumladungszone vor, in deren elektrischem Feld Elektronen und Löcher getrennt werden, d.h. ein Photostrom fließen kann. In Akkumulation ist die Kapazität des Halbleiters hoch, d.h. nahezu die gesamte angelegte Vorspannung fällt über dem Isolator ab. Dadurch gibt es keine Raumladungszone und kein elektrisches Feld an der Grenzfläche zum Isolator, kein Photostrom kann fließen.

¹⁴ Eine Herleitung ist im Anhang Kap. 12.2 nachzulesen.

Halbleiter-Grenzfläche beeinflusst. Bei konstanter Vorspannung reagiert die Ladungsträger-Verteilung im Halbleiter daher auch in Abhängigkeit des pH-Wertes unterschiedlich auf Beleuchtung. Ein hoher pH-Wert ist ja im Prinzip gleichbedeutend mit einer Verschiebung der Vorspannung in Richtung Inversion, d.h. Elektrolyt und Isolator sind stärker negativ als der Halbleiter geladen. Damit verschiebt sich die Kapazitäts-Spannungs- bzw. Photostrom-Spannungs-Kurve der EIS-Struktur wie in Abb. 4.2.7 aufgezeichnet entlang der Spannungsachse. Durch Messung der Photostromamplitude kann damit eine Aussage über den pH-Wert getroffen werden.

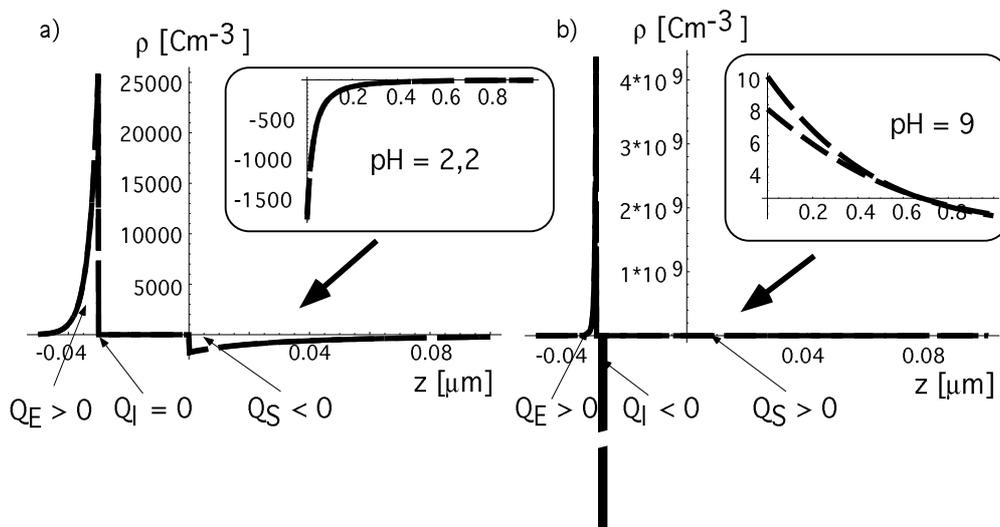


Abbildung 4.2.6¹⁵: Verlauf der Ladungsdichte $\rho(z)$ in einer EIS-Struktur mit SiO_2 -Isolationsschicht. Je nach pH-Wert des Elektrolyten ist die Oberfläche der Isolationsschicht geladen. Eingezeichnet sind a) eine ungeladene ($\text{pH} = 2,2 = \text{pH}_{\text{pzc}}$) und b) eine stark negativ ($\text{pH} = 9 > \text{pH}_{\text{pzc}}$) geladene Oxidoberfläche. Bei einer Vorspannung von $U_{\text{bias}} = +0,2\text{V}$ ändert Beleuchtung bei $\text{pH} = 2,2$ die Ladungsverteilung kaum (a), wogegen diese sich bei $\text{pH} = 9$ durch Beleuchtung deutlich ändert (b). Siehe dazu die umrahmten Einfügungen in a) und b), welche Ausschnitte der Ladungsverteilung für den Fall einer unbelichteten und beleuchteten EIS-Struktur zeigen.

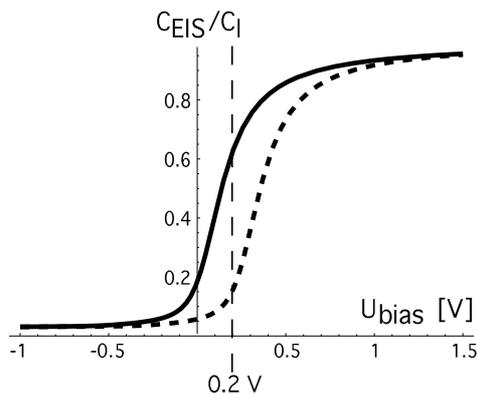


Abbildung 4.2.7¹⁶: Kapazität der in Abb. 4.2.6 besprochenen EIS-Struktur. Eingezeichnet sind die Kapazitäten für $\text{pH} = 2,2$ (durchgezogene Linie) und $\text{pH} = 9$ (gestrichelte Linie). Bei einer konstanten Vorspannung von $U_{\text{bias}} = +0,2\text{V}$ ist der Halbleiter bei $\text{pH} = 2,2$ noch in Verarmung, bei $\text{pH} = 9$ dagegen schon in Inversion.

(e) Optimierung der EIS-Struktur

Damit der LAPS sensitiv Oberflächenpotentiale detektieren kann, muß der Photostrom bzw. die Änderung der Kapazität bei Beleuchtung möglichst stark Potential-abhängig sein. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Dotierung des Halbleiters: Ist der Halbleiter sehr stark dotiert, gibt es wie in Metallen keine Bandverbiegung und seine Kapazität ist unendlich. Damit ist die Kapazität der Gesamtstruktur gleich der Isolatorkapazität und somit Potential-

¹⁵ Für die Simulation wurde $n_D = 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ gewählt. Beleuchtung wurde mit $\delta p^{\text{ill}} = \delta n^{\text{ill}} = 10^{13} \text{ cm}^{-3} \cdot \exp(-z/3\mu\text{m})$, Dunkelheit mit $\delta p^{\text{ill}} = \delta n^{\text{ill}} = 0$ simuliert. Die restlichen Parameter entsprechen den in Abb. 4.2.1 verwendeten.

¹⁶ Es wurde die Hochfrequenzkapazität ($B=1$) unter Verwendung der Parameter von Abb. 4.2.6 berechnet.

unabhängig¹⁷. Im Prinzip sind also Halbleiter mit möglichst niedriger Dotierung wünschenswert, um möglichst hohe Photoströme zu bekommen. In Abb. 4.2.8 sind die Kapazitäten von EIS-Strukturen mit unterschiedlicher Dotierung aufgetragen. Es zeigt sich, daß eine Erniedrigung der Dotierung nur bis zu einem bestimmten Maße die Amplitude des Photostroms erhöht. Für auf Silizium / Siliziumoxid basierende LAPS-Strukturen sind daher Dotierungen um $n_D = 10^{14} \dots 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ sinnvoll. Dotierungen $< 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ erhöhen die Amplitude des Photostroms dagegen nicht weiter¹⁸.

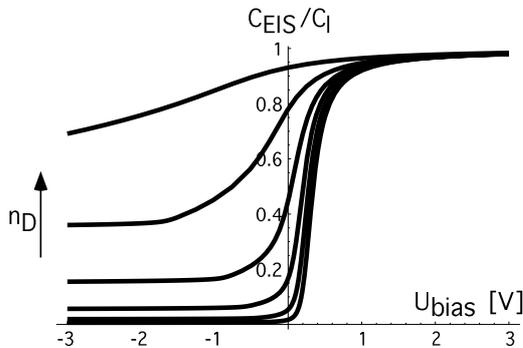


Abbildung 4.2.8¹⁹: Abhängigkeit der Kapazitäts-Spannungs-Kurve einer EIS-Struktur von der Dotierung des Halbleiters (S). Simuliert wurden n -dotierte Silizium-Substrate mit Dotierungen von $n_D = 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17}$ und 10^{18} cm^{-3} . Je stärker die Gesamtkapazität von der Isolatorkapazität abweicht, um so höher ist der an dieser Struktur erzeugbare Photostrom

Auch die Dicke der Isolationsschicht ist ein Größe, die bei dem Aufbau einer LAPS-Struktur optimiert werden kann. Bei sehr dicken Isolationsschichten wird deren Kapazität rasch sehr klein und dominiert damit die Gesamtkapazität, weswegen kein Photostrom fließen kann. In Abb. 4.2.9 ist die Abhängigkeit der Kapazitäts-Spannungs-Kurve einer aus Si/SiO₂ aufgebauten EIS-Struktur von der Dicke der Isolationsschicht gezeigt. Es zeigt sich, daß Oxiddicken von einigen 10 nm durchaus dünn genug sind, um eine ausreichende Potential-Abhängigkeit der Kapazität und des Photostroms zu erhalten. Der Aufwand elektrisch dichte Schichten $< 10 \text{ nm}$ zu erzeugen, lohnt sich also nicht²⁰.

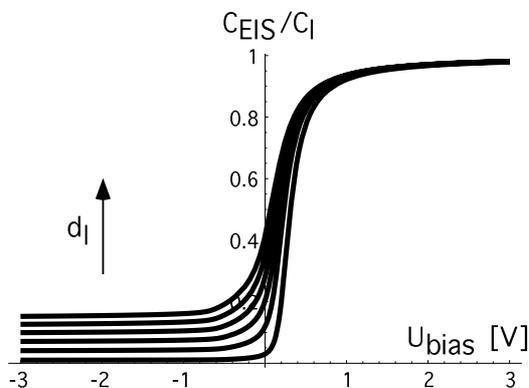


Abbildung 4.2.9²¹: Abhängigkeit der Kapazitäts-Spannungs-Kurve einer EIS-Struktur von der Dicke der Isolationsschicht (I). Simuliert wurde eine SiO₂-Schicht mit den Dicken $d_I = 5, 20, 35, 50, 65, 80 \text{ nm}$. Je stärker die Gesamtkapazität von der Isolatorkapazität abweicht, um so höher ist der an dieser Struktur erzeugbare Photostrom

¹⁷ Die Anordnung entspricht einem Kondensator, dessen Isolator auf beiden Seiten von Material hoher Leitfähigkeit (Elektrolyt, hochdotierter Halbleiter) umgeben und dessen Kapazität damit potentialunabhängig ist.

¹⁸ In einem völlig intrinsischen Halbleiter ohne Dotierung wäre die $C_{EIS}(U_{bias})$ Kurve symmetrisch (bis auf unterschiedliche Löcher- und Elektronen-Beweglichkeiten) und die Begriffe Akkumulation und Inversion verlieren ihre Bedeutung. Es würde dabei sowohl bei hohen negativen, als auch bei hohen positiven Vorspannungen ein maximaler Photostrom fließen (in verschiedene Richtungen).

¹⁹ Es wurden die Hochfrequenzkapazitäten ($B=1$) ohne Beleuchtung $\delta n^{III} = \delta p^{III} = 0$ mit den folgenden Parametern simuliert: $d_I = 20 \text{ nm SiO}_2$, $c_E = 0,15 \text{ mol/l}$, der Rest ist wie in Abb. 4.2.1 beschrieben.

²⁰ Die Isolationsschicht muß möglichst wenige Löcher aufweisen, damit sie eine reine Kapazität darstellt und nicht noch einen parallelen ohmschen Widerstand enthält. Dies ist um so schwieriger, je dünner die Isolationsschicht wird.

²¹ Es wurden die Hochfrequenzkapazitäten ($B=1$) ohne Beleuchtung $\delta n^{III} = \delta p^{III} = 0$ mit den folgenden Parametern simuliert: $n_D = 5 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-3} \text{ Si}$, $c_E = 0,15 \text{ mol/l}$, die restlichen Parameter wurden analog Abb. 4.2.1 gewählt.

4.3 Analyse der Ortsauflösung²²

Eine herausragende Eigenschaft des LAPS ist die Fähigkeit, Oberflächenpotentiale an frei wählbaren Stellen zu messen. Um diese Fähigkeit zu charakterisieren, soll in diesem Kapitel die Ortsauflösung des LAPS analysiert werden. Dazu wird die Diffusion Licht-generierter Ladungsträger im feldfreien Volumen des Halbleiters untersucht [158, 159].

In n-dotierten Halbleitern sind Löcher Träger des Photostroms. Daher reicht es aus, nur die Löcher-Diffusion zu untersuchen. Es wird dazu angenommen, daß durch einen Lichtblitz zur Zeit $t = 0$ eine Überschuß-Löcher-Verteilung im Volumen des Halbleiters vorliegt, deren Form abhängig vom Profil des Lichtblitzes ist. Die durch Diffusion getriebene Ausbreitung dieser Löcher im Volumen des Halbleiters kann durch Lösung der Diffusionsgleichung unter folgenden Annahmen verfolgt werden: Sobald Löcher durch Diffusion die Raumladungszone an der Oberfläche des Halbleiters erreichen, werden sie durch deren Feld zur Halbleiter-Isolator-Grenzfläche hingezogen²³. Dadurch sind diese Löcher vom weiteren Diffusionsprozeß im Volumen des Halbleiters ausgeschlossen. Ebenso rekombinieren alle Löcher, falls sie durch Diffusion den ohmschen Kontakt an der Rückseite des Halbleiters erreichen und sind damit ebenfalls von weiterer Diffusion ausgeschlossen. Mit diesem Ansatz kann nun die laterale Verteilung der Löcher, d.h. deren Ausbreitung parallel zur Oberfläche des Halbleiters, an der Grenze zur Raumladungszone berechnet werden.

Es fließt überall dort ein Photostrom, wo freie Löcher in die Nähe der Raumladungszone gelangen. Je breiter dort die Ausbreitung der Löcher parallel zur Oberfläche ist, um so schlechter wird die damit die Ortsauflösung des LAPS sein. Als Ortsauflösung r_{\min}^2 wird deshalb die laterale Ausdehnung der Löcherstrom-Verteilung an der Grenze zwischen Raumladungszone und Volumen des Halbleiters definiert.

Im wesentlichen ist die Löcher-Diffusion im Volumen des Halbleiters durch das Verhältnis von drei Längen bestimmt: (i) die Diffusionslänge freier Löcher $L_{Sp} = (\tau_{Sp}D_{Sp})^{1/2}$, d.h. der mittlere Weg den Löcher im Volumen des Halbleiters zurücklegen können, bevor sie rekombinieren, (ii) die Dicke d_s des Halbleitersubstrats²⁴ und (iii) die Eindringtiefe λ_L des Lichtblitzes in den Halbleiter wenn angenommen wird, daß die Dichte der durch den Lichtblitz im Volumen des Halbleiters erzeugten Löcher exponentiell abnimmt²⁵.

Durch Lösung der Diffusionsgleichung kann auch der Anteil der Löcher $\Delta P_j/\Delta P_0$, welcher durch Diffusion getrieben vom Ort der Entstehung aus die Raumladungszone erreicht, berechnet werden. Am günstigsten wäre ein Wert von $\Delta P_j/\Delta P_0 = 1$, d.h. alle im Volumen des Halbleiters erzeugten Ladungsträger würden durch Diffusion zur Raumladungszone gelangen und so zum Photostrom beitragen. Für $\Delta P_j/\Delta P_0 = 0$ würden dagegen alle Löcher bereits im Volumen des Halbleiters rekombinieren und es würde kein Photostrom fließen.

²² Die Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden in [157] veröffentlicht. Die zu diesem Kapitel durchgeführten Berechnungen sind im Anhang Kap. 13.4 nachzulesen.

²³ U_{bias} wird so angenommen, daß im Halbleiter Verarmung oder Inversion vorliegt und ein Photostrom fließen kann.

²⁴ Genau genommen ist die Dicke des Halbleiters minus der axialen Ausdehnung der Raumladungszone gemeint.

²⁵ Alle in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse beschreiben den Grenzfall eines unendlich scharf fokussierten Lichtblitzes (Radius $r_L \rightarrow 0$). Natürlich ist in der Praxis die laterale Ausdehnung des Lichtzeigers von einigen Mikrometern die obere Grenze für die erreichbare Ortsauflösung.

In Tab. 4.3.1 sind die berechneten Ergebnisse für r_{\min}^2 und $\Delta P_j/\Delta P_0$ für den Fall exponentiell abfallender Beleuchtung des Halbleiters von der Vorderseite, durch den Elektrolyt und Isolator hindurch, zusammengestellt, in Tab. 4.3.2 die Ergebnisse für den Fall exponentiell abfallender Beleuchtung des Halbleiters von der Rückseite, durch den ohmschen Kontakt hindurch.

$d_s \ll L_{sp}$:	$r_{\min}^2 =$	$\Delta P_j/\Delta P_0 =$	$d_s \gg L_{sp}$:	$r_{\min}^2 =$	$\Delta P_j/\Delta P_0 =$
$\lambda_L \gg d_s$:	$d_s^2/12$	$d_s/2\lambda_L$	$\lambda_L \gg L_{sp}$:	$2 L_{sp}^2$	L_{sp}/λ_L
$\lambda_L \ll d_s$:	$4/3 d_s \lambda_L$	1	$\lambda_L \ll L_{sp}$:	$2 L_{sp} \lambda_L$	1

Tabelle 4.3.1: Angegeben sind die quadratische Ortsauflösung r_{\min}^2 und der Anteil der die Raumladungszone erreichenden Löcher $\Delta P_j/\Delta P_0$ bei Beleuchtung der Vorderseite, berechnet für dünne ($d_s \ll L_{sp}$) und dicke ($d_s \gg L_{sp}$) Halbleiter-Substrate.

$d_s \ll L_{sp}$:	$r_{\min}^2 =$	$\Delta P_j/\Delta P_0 =$
$\lambda_L \gg d_s$:	$d_s^2/12$	$d_s/2\lambda_L$
$\lambda_L \ll d_s$:	$7/15 d_s^2$	0

Tabelle 4.3.2: Angegeben sind die quadratische Ortsauflösung r_{\min}^2 und der Anteil der die Raumladungszone erreichenden Löcher $\Delta P_j/\Delta P_0$ bei Beleuchtung der Rückseite, berechnet für dünne ($d_s \ll L_{sp}$) Halbleiter-Substrate. Bei unendlich dicken Halbleitern würde kein Photostrom fließen, da alle Ladungsträger vor Erreichen der Raumladungszone bereits rekombinieren würden.

Bei dicken Halbleitersubstraten ($d_s \gg L_{sp}$) ist die Ortsauflösung bei Beleuchtung der Vorderseite im wesentlichen durch die Volumen-Diffusionslänge L_{sp} limitiert. So ist sie bei großen Eindringtiefen ($\lambda_L \gg L_{sp}$) rein durch die Volumen-Diffusionslänge bestimmt: Es werden Ladungsträger tief im Volumen des Halbleiters erzeugt, die mindestens die Strecke L_{sp} axial zur Oberfläche diffundieren müssen, um die Raumladungszone zu erreichen. Deshalb rekombiniert ein Teil der Licht-erzeugten Löcher im Volumen des Halbleiters und trägt nicht zum Photostrom bei. Anders bei kleine Eindringtiefen ($\lambda_L \ll L_{sp}$): Hier werden alle Löcher so dicht in der Nähe der Raumladungszone erzeugt, daß sie diese im Mittel erreichen, bevor sie im Volumen des Halbleiters rekombinieren. Es nehmen daher praktisch alle Löcher am Photostrom teil. Im Vergleich zu großen Eindringtiefen ist deshalb die Ortsauflösung besser, da ein großer Teil der Löcher sehr schnell die Raumladungszone erreicht und damit vom weiteren Diffusionsprozeß im Volumen ausgeschlossen ist. Bei dicken Substraten ist also eine Vorderseiten-Beleuchtung mit möglichst kurzer Eindringtiefe und ein Halbleiter-Material mit möglichst kleiner Volumen-Diffusionslänge wünschenswert. In der Praxis ist eine derartige Anordnung aber auf Ortsauflösungen von einigen 10 μm eingeschränkt²⁶.

Um die Ortsauflösung zu verbessern, ist den obigen Ergebnissen zu Folge eine Verwendung dünner Halbleiters sinnvoll. Dies bedeutet eine Einschränkung der freien Volumen-Diffusion, da auch Löcher, welche durch Diffusion den ohmschen Rückkontakt im Halbleiter erreichen, dort rekombinieren und damit von weiteren Diffusionsprozessen ausgeschlossen sind. Die freie Volumen-Diffusion ist bei dünnen Halbleitern also im wesentlichen durch die Dicke des Halbleiters eingeschränkt²⁷. Bei großen Eindringtiefen ($\lambda_L \gg d_s$) ist der Halbleiter in seiner ganzen Tiefe homogen durchleuchtet. Bei kleinen Eindringtiefen ist eine Beleuchtung von vorne günstiger als von hinten: Bei Beleuchtung von vorne werden in Analogie zu dicken Substraten

²⁶ Beispiel: „roter“ Lichtzeiger mit $\lambda_L \approx 3\mu\text{m}$, $\rho_s = 10\Omega\text{cm}$ Si-Halbleiter mit $L_{sp} \approx 100\mu\text{m} \Rightarrow r_{\min} \approx 25\mu\text{m}$.

²⁷ Dies ist dadurch sichtbar, daß bei Beleuchtung von vorne in der berechneten Ortsauflösung L_{sp} beim Übergang von dicken zu dünnen Substraten durch d_s ersetzt ist.

die Löcher bereits in unmittelbarer Nähe der Raumladungszone erzeugt, so daß sie diese durch Diffusion schnell erreichen. Bei Beleuchtung von der Rückseite her müssen die Löcher dagegen eine weitere Strecke bis zu Raumladungszone diffundieren, wodurch die Ortsauflösung verschlechtert wird. Allerdings liegen in praktischen Aufbauten sowohl die Eindringtiefe des Lichtzeigers als auch die Dicke des Halbleitersubstrates im Bereich von einigen Mikrometern, und es spielt deshalb keine Rolle, ob von vorne oder hinten beleuchtet wird. Auf jeden Fall sollte aber bei Verwendung dünner Halbleiter-Substrate die Ortsauflösung wesentlich gesteigert werden und es sollten Ortsauflösungen besser als 10 μm möglich sein.

Löcher welche in die Raumladungszone gesaugt werden sind durch das Potential der durch die Vorspannung erzeugten Bandverbiegung an einen Kanal parallel zur Oberfläche des Halbleiters ($z=0$) gebunden, können sich also axial in z -Richtung nicht mehr frei bewegen und sind damit von der Diffusion im Volumen des Halbleiters ausgeschlossen²⁸. Dafür ist nach wie vor laterale Diffusion in x - und y -Richtung im Kanal parallel zur Oberfläche möglich. Diese Diffusion entlang der Oberfläche wird im ungünstigsten Fall gleichfalls durch die Volumen-Diffusionslänge begrenzt sein. Die hier mit dem Modell der Diffusion im Volumen des Halbleiters ohne Berücksichtigung der Raumladungszone abgeschätzte Ortsauflösung ist also eine Obergrenze für die Ortsauflösung, da diese durch Diffusion in der Raumladungszone nur verschlechtert werden kann. Diffusion in der Raumladungszone wird besonders dann eine Rolle spielen, wenn bei Beleuchtung von vorne mit einer kurzen Eindringtiefe ein hoher Anteil der Licht-generierten Löcher bereits in der Raumladungszone erzeugt wird. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß die Diffusion in der Raumladungszone zusätzlich durch Rekombination der Löcher an Oberflächenzuständen der Isolator-Halbleiter-Grenzfläche und an Potentialrauhigkeiten des Kanals eingeschränkt ist und sich damit die Fehler der hier vorgestellten Abschätzung in Grenzen halten.

²⁸ Die Ausdehnung der Raumladungszone ist bei den verwendeten Dotierungen kleiner als 10 μm , vgl. [151, (K.2.3)].

4.4 Experimenteller Aufbau²⁹

Ein LAPS-Aufbau besteht im wesentlichen aus drei Komponenten: der Meßkammer in EIS-Geometrie, der für den Lichtzeiger benötigten Optik und der Elektronik zur Messung des Photostroms [146-148]. Der in dieser Arbeit erstellte Aufbau wurde so konzipiert, daß neben der Messung von Photostrom-Spannungs-Kurven ($I_p(U_{bias})$) auch Kapazitäts-Spannungs-Kurven ($C_{EIS}(U_{bias})$) von EIS-Strukturen aufgenommen werden konnten, siehe Abb. 4.4.1. Die eigentliche Meßkammer bestand aus einem Siliziumchip (S), dessen Oberseite mit einer Isolationsschicht (I) überzogen und dessen Rückseite mit einem ohmschen Kontakt versehen war. Die Oberseite des Chips wurde mit Elektrolyt (E) bedeckt und konnte mit bis zu zwei Lasern gleichzeitig beleuchtet werden. Dabei wurde das Licht des ersten Lasers mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs, das des zweiten Lasers mit einer einfachen Linse auf die Oberfläche des Siliziumchips gebündelt. Die Meßkammer war über einen x-y-Tisch verfahrbar, so daß beliebige Stellen der Siliziumoberfläche beleuchtet werden konnten. Zwischen einer Referenzelektrode im Elektrolyt und dem ohmschen Kontakt an der Rückseite des Siliziums wurde eine Spannung U_{bias} angelegt und die Amplitude des dabei fließenden Stroms I_{EIS} bzw. I_p gemessen. Für Kapazitäts-Messungen wurde zu der Vorspannung U_{bias} eine Wechselspannung U_{mod} mit Modulationsfrequenz f_{mod} addiert und der dabei durch die Anordnung fließende Strom $I_{EIS} \propto f_{mod} \cdot C_{EIS}$ gemessen und daraus die Spannungs-abhängige Kapazität C_{EIS} bestimmt. Die Kapazitätsmessungen wurden ohne oder mit konstanter Beleuchtung durchgeführt. Zu Messungen des Photostroms I_p , d.h. im LAPS-Betrieb, wurde die Leistung P_L der Beleuchtung auf der Siliziumoberfläche sinusförmig mit der Frequenz f_L moduliert, siehe Abb. 4.4.2. Für Differenzmessungen wurde der Halbleiter mit zwei gegenphasig modulierten Lichtquellen beleuchtet [146]. Der Aufbau ließ dabei die Variation folgender Betriebsparameter zu: der Vorspannung U_{bias} , der Leistung des Lichtzeigers P_L , bei Photostrom-Messungen der Modulationsfrequenz des Lichtzeigers f_L , der Größe des Beleuchtungsflecks des Lichtzeigers auf der Halbleiteroberfläche A_L , bei Kapazitäts-Messungen der Modulationsfrequenz des Wechselstromanteils der Vorspannung f_{mod} und des pH-Wertes des Elektrolyten pH.

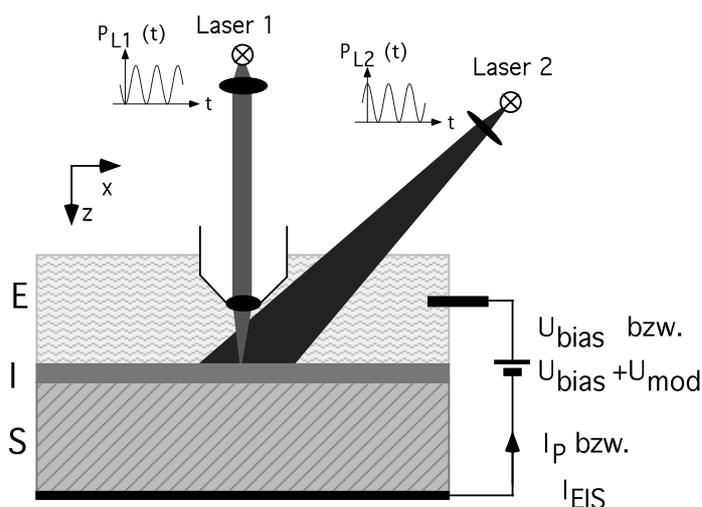


Abbildung 4.4.1: Aufbau des LAPS-Kapazitäts-Meßplatzes. Gezeichnet ist ein Schnitt durch die x-z-Ebene. Der Halbleiterchip liegt dabei symmetrisch in der x-y-Ebene.

²⁹ Details der in dieser Arbeit aufgebauten Apparaturen sind im Anhang Kap. 13.1 nachzulesen.

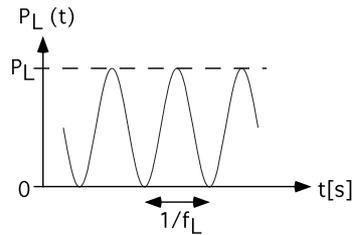


Abbildung 4.4.2: Definition der Leistung P_L der Beleuchtung.

Im folgenden werden verschiedene Messungen vorgestellt, mit denen die Eigenschaften des LAPS-Aufbaus charakterisiert wurden.

(a) Zeitauflösung

Die Zeitauflösung bei Photostrom-Messungen ist experimentell durch die Modulationsfrequenz des Lichtzeigers vorgegeben. In dieser Arbeit wurde meist eine Modulationsfrequenz $f_L = 10$ kHz gewählt. Zur Bestimmung der Amplitude des Photostroms wurde ein Lock-In-Verstärker eingesetzt. Dabei mußte das Ausgabesignal Tiefpaß-gefiltert werden. In dieser Arbeit wurde dabei eine Filterfrequenz 3 kHz (< 10 kHz = f_L) gewählt, d.h. die Zeitauflösung des LAPS betrug 0,3 ms. Dies wäre ausreichend zur Detektion extrazellulärer Potentiale.

(b) Aufnahme von Photostrom-Spannungs-Kurven

In Abb. 4.4.3 sind die an einer typischen EIS-Struktur aufgenommenen Kapazitäts- und Photostrom-Spannungs-Kurven gegenübergestellt. Die Kapazität der EIS-Struktur änderte sich dabei bei Beleuchtung und zeigt wie der Photostrom die in Kap. 4.2 vorhergesagte Form. Ebenso ist der Potential-abhängige Verlauf des Photostroms ähnlich dem Verlauf der Differenz der Kapazitäten des beleuchteten und unbeleuchteten Halbleiters.

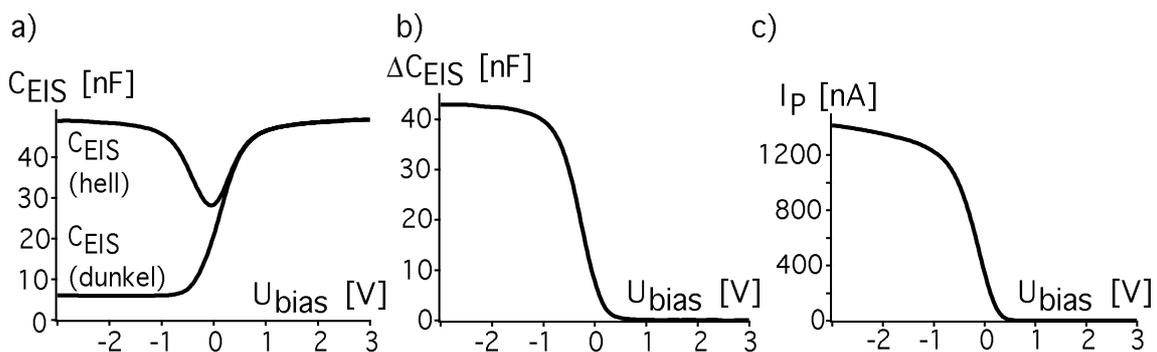


Abbildung 4.4.3³⁰: a) Kapazitäts-Spannungs-Kurve ($C_{EIS}(U_{bias})$), aufgenommen an einem n-dotierten Silizium-Wafer mit spezifischen Widerstand $\rho_s = 15 \Omega\text{cm}$ unter Abdunklung bzw. konstanter Beleuchtung ($P_L = 2,8$ mW) der gesamten Oberfläche ($A_L = A_{akt} = 90$ mm²). Zur Vorspannung wurde dazu eine Wechselspannung mit Modulationsfrequenz $f_{mod} = 250$ Hz und Amplitude $U_{mod} = 12$ mV addiert. Als Elektrolyt wurde pH=4 Pufferlösung (Merck, Darmstadt) und als Referenz-Elektrode ein in KCL elektrolysierter Silberdraht verwendet. b) Kapazitäts-Unterschied zwischen beleuchtetem und unbeleuchtetem Fall $\Delta C_{EIS} = C_{EIS}(\text{hell}) - C_{EIS}(\text{dunkel})$. c) Am selbem Wafer anschließend aufgenommene Photostrom-Spannungs-Kurve ($I_p(U_{bias})$). Die Beleuchtung wurde dabei bei einer maximalen Leistung $P_L = 2,8$ mW sinusförmig mit $f_L = 250$ Hz moduliert.

³⁰ Es wurde angenommen, daß die Impedanz der EIS-Struktur vorwiegend durch deren Kapazität C_{EIS} bestimmt ist, d.h. parallel und seriell geschaltete ohmsche Widerstände (Elektrolyt-, Halbleiter-Widerstand, Leckströme durch die Isolationsschicht) wurden vernachlässigt. Es gilt dann $C_{EIS} = (2\pi f_L)^{-1} \cdot I_{EIS}/U_{mod}$. Die hier gezeigte Kurve wurde von M. George an einem „Typ 8E“-Substrat aufgenommen. Der genaue Aufbau dieses Wafers ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

In hochdotierten n-Si-Substraten fließt nur bei stark negativen Vorspannungen ein Photostrom, siehe Abb. 4.4.4. Der Photostrom wird dabei nur von einer Ladungs-Sorte getragen, was an seiner nahezu konstanten Phase erkennbar ist. In niederdotierten n-Si-Substraten dagegen fließt ein Photostrom sowohl bei stark negativen, als auch bei sehr positiven Vorspannungen, und die $I_P(U_{\text{bias}})$ -Kurve zeigt eine Symmetrie um $U_{\text{bias}} \approx 0$. Die Phase des Photostroms ist für beide Grenzfälle um ca. 180° verschoben, d.h. der Photostrom fließt jeweils in eine andere Richtung. Dies legt nahe, daß bei sehr negativen Vorspannungen ein Löcherstrom, bei sehr positiven Vorspannungen dagegen ein Elektronenstrom in die Raumladungszone fließt.

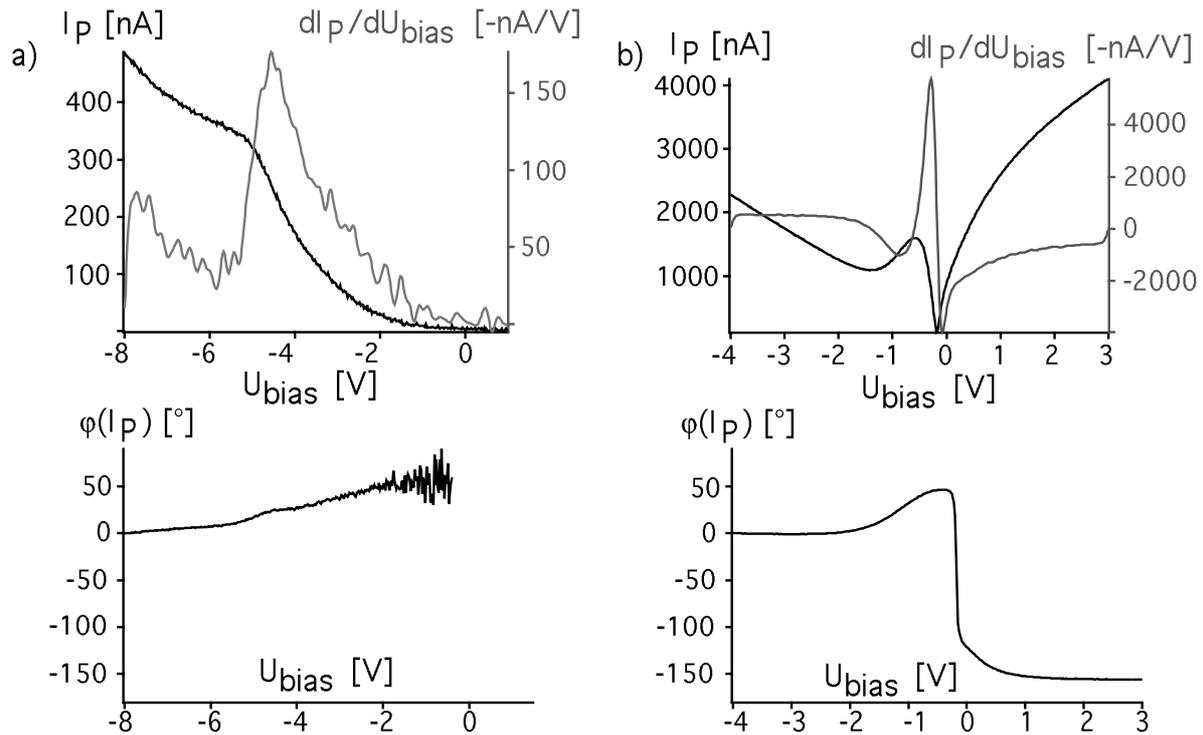


Abbildung 4.4.4³¹: Photostrom-Spannungs-Kurven, aufgenommen an n-dotierten Silizium-Wafern mit einem spezifischen Widerstand von a) $\rho_S = 0,014 \Omega\text{cm}$ (hochdotiert) und b) $\rho_S = 900\text{-}1800 \Omega\text{cm}$ (niederdotiert). Gezeigt sind Amplitude I_P (dunkle Kurve, oberes Bild), Ableitung der Amplitude dI_P/dU_{bias} (helle Kurve, oberes Bild) und Phase $\varphi(I_P)$ (unteres Bild) des Photostroms. Alle Messungen wurden bei einer Lichtzeiger-Modulation mit $f_L = 10 \text{ kHz}$ und einer Beleuchtungsleistung von $P_L \approx 1,1 \text{ mW}$ in $\text{pH} = 4$ -Pufferlösung durchgeführt. Die beleuchtete Fläche betrug dabei $A_L \approx 50 \mu\text{m}^2$, die gesamte Oberfläche der LAPS-Wafer war $A_{\text{akt}} = 90 \text{ mm}^2$.

(c) Abhängigkeit des Photostroms von der Leistung des Lichtzeigers

Je höher die Leistung P_L des Lichtzeigers ist, um so mehr Elektron-Loch-Paare werden im Halbleiter erzeugt und es sollte ein um so höherer Photostrom fließen. In diesem Abschnitt wird dazu die Photostromantwort auf Beleuchtung in Abhängigkeit der Dotierung des Halbleiters untersucht.

³¹ Der genaue Aufbau der verwendeten Silizium Substrate („Typ 4D“ und „Typ 6D“) ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen. Zu Beginn jedes Experimentes wurde die Phase des Photostroms bei sehr negativen Vorspannungen zu Null definiert. Beim hochdotierten Wafer fließt bei positiven Vorspannungen kein Photostrom, weshalb dort keine, bzw. nur eine stark verrauschte Phase angegeben werden kann.

Materialien und Methoden³²: Für jeden untersuchten LAPS-Wafer wurden für mindestens 14 verschiedene Beleuchtungsleistungen P_L Photostrom-Spannungs-Kurven $I_p(U_{bias})$ aufgenommen. Es wurde für alle Kurven die Vorspannung $U_{bias,WP}$ ermittelt, bei welcher der Betrag der Ableitung des Photostroms nach der Vorspannung maximal ist, d.h. der Wendepunkt (WP) der Kurve. Für jede Meßreihe wurde dann sowohl der Photostrom am Wendepunkt $I_{p,WP}$, als auch die Steigung des Photostroms am Wendepunkt $dI_p/dU_{bias}|_{WP}$ gegen die jeweils eingestrahlte Leistung P_L aufgetragen, siehe Abb. 4.4.5. In doppelt logarithmischer Auftragung lassen sich sowohl $I_{p,WP}(P_L)$ als auch $dI_p/dU_{bias}|_{WP}(P_L)$ mit einer linearen Funktion beschreiben. Dies bedeutet, daß Amplitude und Ableitung des Photostroms in dem untersuchten Bereich mit einem Potenzgesetz von der Lichtzeiger-Leistung abhängen:

$$I_{p,WP}(P_L) \text{ [nA]} = A \cdot (P_L \text{ [\mu W]})^B, \quad dI_p/dU_{bias}|_{WP}(P_L) \text{ [-nA/V]} = C \cdot (P_L \text{ [\mu W]})^D \quad (1)$$

Durch Anpassen der doppelt logarithmierten Meßdaten mit einer Geraden wurden wie in Abb. 4.4.5 gezeigt, die Koeffizienten A, B, C und D aus Gl. 1 für verschiedene Wafertypen bestimmt. Es wäre wünschenswert gewesen, alle Kurven jeweils mit nur einem variablen Parameter zu beschreiben. Dies war jedoch nicht möglich.

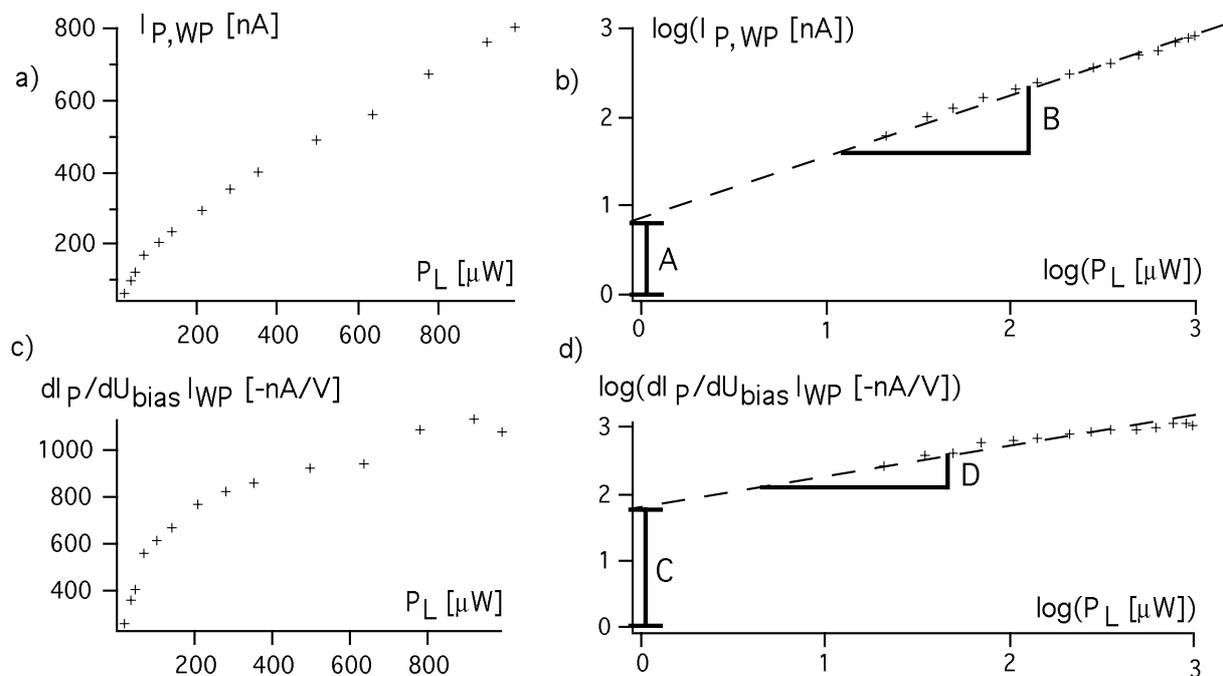


Abbildung 4.4.5³³: a) Photostrom $I_{p,WP}$ am Wendepunkt der Strom-Spannungs-Kurve, aufgetragen gegen die Leistung des Lichtzeigers P_L . Es sind exemplarisch die an einen n-dotierten Silizium Wafer mit spezifischem Widerstand $\rho_s = 15 \Omega\text{cm}$ und Isolationsschicht $d_I(\text{SiO}_2) = 30 \text{ nm} + d_I(\text{Si}_3\text{N}_4) = 59 \text{ nm}$ gemessenen Daten dargestellt. b) Auftragung der in a) gezeigten Daten in doppelt logarithmischer Darstellung. Sie können mit einer Geraden mit Achsenabschnitt A und Steigung B beschrieben werden. c) Ableitung des Photostroms $dI_p/dU_{bias}|_{WP}$ am Wendepunkt der Strom-Spannungs-Kurve, aufgetragen gegen die Leistung des Lichtzeigers P_L . d) Daten aus c) in doppelt logarithmischer Auftragung, angepaßt mit einer Geraden mit Achsenabschnitt C und Steigung D.

³² Alle Messungen wurden bei einer Modulation von $f_L = 10 \text{ kHz}$ mit einer Zeitauflösung von 3 kHz in $\text{pH} = 4$ - Pufferlösung durchgeführt. Die beleuchtete Fläche betrug dabei ca. $A_L = 50 \mu\text{m}^2$, die gesamte Oberfläche der LAPS-Wafer war $A_{akt} = 90 \text{ mm}^2$. Die Software zur Auswertung der Messungen und Darstellung der Ergebnisse wurde von M. George geschrieben.

³³ Der detaillierte Aufbau des Wafers vom „Typ 8E“ ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

Ergebnisse und Diskussion: In Abb. 4.4.6 sind die für verschiedene Wafertypen bestimmten Parameter A, B, C und D in Abhängigkeit der Dotierung des Siliziums aufgetragen. Sowohl A, als auch C steigen mit wachsendem Silizium-Widerstand. Je höher A und C sind, desto stärker wächst die Amplitude und die Ableitung des Photostroms mit zunehmender Lichtzeigerleistung. Diese Tendenz ist gut zu erklären: je höher der spezifische Widerstand des Siliziums ist, um so geringer ist dessen Dotierung und um so weniger freie Ladungsträger liegen vor. Die durch Beleuchtung erzeugten freien Ladungsträger fallen dann stärker in das Gewicht und es fließt ein größerer Photostrom. Für B und besonders bei D ist keine so deutlich ausgeprägte Tendenz zu erkennen.

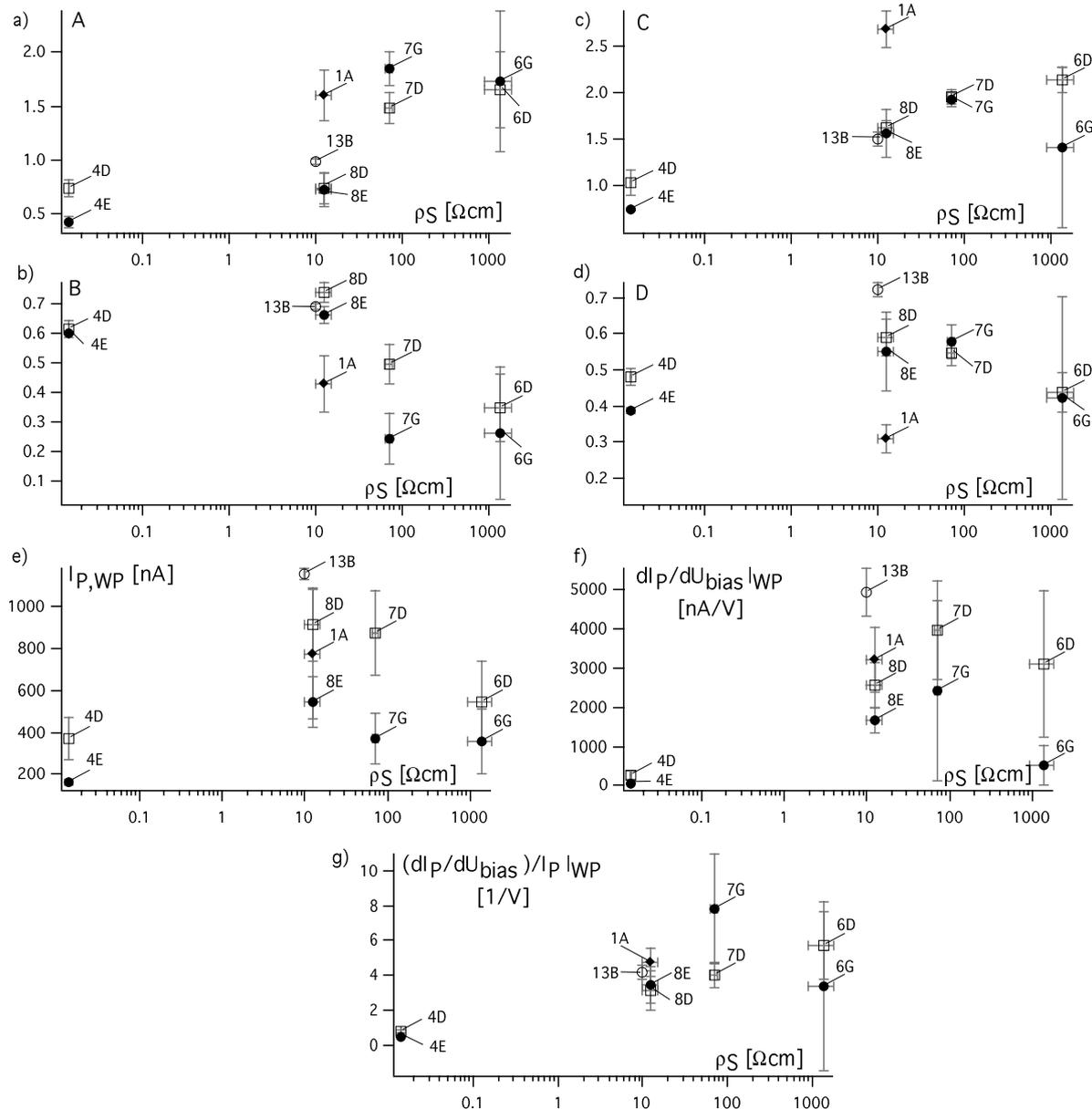


Abbildung 4.4.6³⁴: a-d) Parameter A, B, C, D, bestimmt für verschiedene Silizium-Substrate, aufgetragen gegen den spezifischen Widerstand des Siliziums. Die Quadrate entsprechen Proben mit dünner Isolationsschicht ($d_1(\text{SiO}_2) \approx 30 \text{ nm} + d_1(\text{Si}_3\text{N}_4) \approx 60 \text{ nm}$), die ausgefüllten Kreise Proben mit dicker Isolationsschicht ($d_1(\text{SiO}_2) \approx 10 \text{ nm} + d_1(\text{Si}_3\text{N}_4) \approx 30 \text{ nm}$). Für jeden Wafertyp wurden zwischen 4 bis 8 verschiedene Substrate vermessen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. e,f) Amplitude und Steigung des Photostroms bei einer Lichtzeigerleistung $P_L = 1,1 \text{ mW}$. g) Verhältnis Steigung zu Amplitude bei einer Lichtzeigerleistung $P_L = 1,1 \text{ mW}$.

³⁴ Eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Substrate ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

In Abb. 4.4.6 ist auch der Photostrom und dessen Ableitung am Wendepunkt bei einer Lichtzeigerleistung von $P_L = 1,1 \text{ mW}$ und deren Verhältnis in Abhängigkeit des Silizium-Widerstandes aufgetragen. Diese Darstellung der Daten zeigt ebenfalls, daß der Photostrom und dessen Ableitung bei abnehmender Dotierung und damit zunehmendem Widerstand ansteigen (vgl. „Typ 4“ und „Typ 8“). Bei sehr niedrigen Dotierungen kehrt sich dieser Effekt allerdings um (vgl. „Typ 7“ und „Typ 6“). Sowohl Amplitude als auch Steigung des Photostroms sind höher bei dünnen Isolationsschichten („Typ D“) als bei dicken („Typ E“ und „Typ G“).

Siliziumsubstrate mit einem spezifischen Widerstand von 10 - 100 Ωcm und einer einigen 10 nm dicken Isolationsschicht sind zum Aufbau eines LAPS also besonders gut geeignet. Eine weitere Verringerung der Dotierungsdichte erhöht den Photostrom nicht mehr. Ebenfalls zeigt sich, daß bei dünnen Halbleitersubstraten („Typ 13“) der Photostrom im Vergleich zu dicken („Typ 8“) eher erhöht als erniedrigt ist.

(d) Intensitäts-Abhängigkeit des Photostroms

Wird der Lichtzeiger an Unsauberkeiten der LAPS-Oberfläche gestreut und damit der Beleuchtungsfleck vergrößert, nimmt der Photostrom zu. Dieser Effekt wurde mit folgendem Experiment verdeutlicht: Ein Teil der LAPS-Oberfläche wurde mit einem Deckglas bedeckt und der Lichtzeiger von einem Teil der unbedeckten Oberfläche zu einem Glas-bedeckten Teil gefahren. Bei Beleuchtung sowohl unbedeckter, als auch Glas-bedeckter Bereiche blieb die Amplitude des Photostroms konstant. Traf der Lichtzeiger dagegen die Kante des Glases, war ein deutliches Maximum im Photostrom zu sehen. Gleichzeitig wurde mit dem Mikroskop-Objektiv eine Streuung und Defokussierung des Lichtzeiger an der Kante beobachtet. Die Amplitude des Photostroms ist neben der Leistung deshalb auch von der Intensität des Lichtzeigers, d.h. bei konstanter Leistung P_L von der Größe des Beleuchtungsflecks A_L abhängig.

Die Intensitätsabhängigkeit des Photostroms ist ein Effekt der Nicht-Linearität der Photostrom-Leistungs-Kurve. Dies kann an folgendem Gedankenmodell veranschaulicht werden: Der Photostrom I_p bei einer Beleuchtungs-Leistung P_L , fokussiert auf eine doppelte Fläche ($2 \cdot A_L$), entspricht zwei mal dem Photostrom ($2 \cdot I_p$) bei Beleuchtung der jeweils einfachen Fläche A_L mit halber Leistung ($P_L/2$), oder allgemein: $I_p(P_L, n \cdot A_L) \stackrel{35}{=} n \cdot I_p(P_L/n, A_L)$. Bei Kenntnis der experimentell unter Beleuchtung mit einem Lichtfleck der Fläche A_{L0} bestimmten Strom-Leistungs-Kurve $I_p(P_L, A_{L0})$, kann damit der Photostrom für Beleuchtung mit Lichtflecken anderer Flächen A_L berechnet werden: $I_p(P_L, A_L) = (A_L/A_{L0}) \cdot I_p(P_L \cdot (A_{L0}/A_L), A_{L0})$. Dieses Gedankenexperiment zur Intensitäts-Abhängigkeit ist in Abb. 4.4.7 dargestellt.

Um absolute Photoströme miteinander vergleichen zu können, ist also neben der Kenntnis der Beleuchtungsleistung P_L auch eine Kenntnis der beleuchteten Fläche A_L nötig. Die Intensitätsabhängigkeit könnte durch Annahme eines Sättigungs-Effekts erklärt werden: Bei

³⁵ Die linke Seite der Gleichung beschreibt dabei, wie eine Fläche $n \cdot A_L$ mit Leistung P_L beleuchtet wird. Die rechte Seite beschreibt, wie n mal die Fläche A_L mit jeweils der Leistung P_L/n beleuchtet, d.h. die gesamte Fläche $n \cdot A_L$ mit der Leistung $n \cdot P_L/n = P_L$ beleuchtet wird.

hohen Lichtintensitäten sind schon sehr viele Atome des beleuchteten Halbleiters ionisiert, d.h. ihre Elektronen aus dem Valenz- in das Leitungsband gehoben. Bei weiterer Erhöhung der Lichtleistung kann deshalb die Zahl Licht-generierter Ladungsträger nicht mehr proportional zunehmen und die Photostrom-Leistungs-Kennlinie ist nicht-linear.

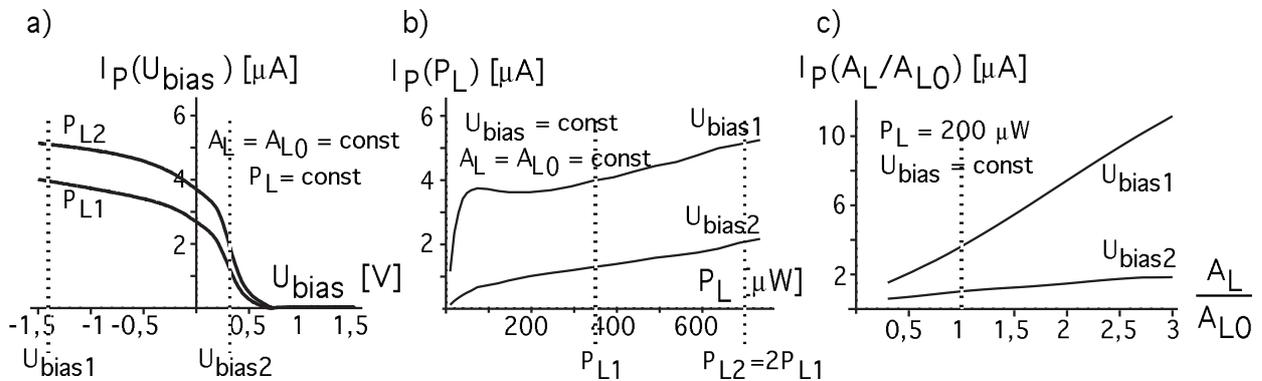


Abbildung 4.4.7: Intensitätsabhängigkeit des Photostroms. a) Photostrom-Spannungs-Kurve ($I_P(U_{bias})$), aufgenommen mit einem Beleuchtungsfleck der Fläche $A_{L0} \approx 50 \mu m^2$ bei 2 verschiedene Beleuchtungsleistungen $P_{L1} = 0,35 mW$ und $P_{L2} = 0,7 mW$ an einem Silizium-Substrat ($\rho_S \approx 10-15 \Omega cm$, $d_f(SiO_2) \approx 30 nm$, $d_f(Si_3N_4) \approx 60 nm$) mit einer Gesamt-Oberfläche $A_{akt} = 90 mm^2$ in $pH=4$ Pufferlösung und einer Modulationsfrequenz von $f_L = 10 kHz$. b) Photostrom-Beleuchtungsleistungskurven ($I_P(P_L)$), aufgenommen unter den selben Bedingungen wie in a) bei zwei verschiedene Vorspannungen $U_{bias1} = -1,4 V$ und $U_{bias2} = +0,3 V$. c) Vorhersage der Intensitätsabhängigkeit, berechnet nach der Formel $I_P(P_L, A_L) = (A_L/A_{L0}) \cdot I_P(P_L, A_{L0})$.

(e) Abhängigkeit des Photostroms von der Modulationsfrequenz

In erster Näherung kann der LAPS mit einer Potential-abhängigen Kapazität C_{EIS} beschrieben werden. Seine Impedanz ist dann proportional zu $(C_{EIS} \cdot f_L)^{-1}$. Bei hochfrequenter Modulation des Lichtzeigers sinkt deshalb die Impedanz und der Photostrom nimmt zu, vgl. Abb. 4.4.8. Bei sehr hohen Frequenzen sollte der Photostrom wieder abnehmen, da dann der kapazitive Widerstand so klein wird, daß die ohmschen, Frequenz-unabhängigen Widerstände der Elektrolyt-Lösung und des Halbleitermaterials nicht mehr zu vernachlässigen sind [148]. Einen hochfrequenten Betrieb des LAPS sind damit Grenzen gesetzt.

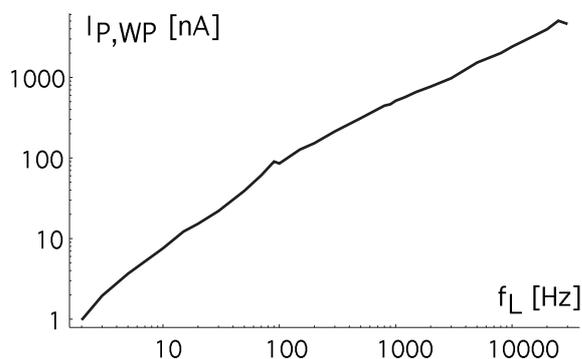


Abbildung 4.4.8³⁶: Abhängigkeit des Photostroms $I_{P,WP}$ am Wendepunkt der Photostrom-Spannungs-Kurve von der Modulationsfrequenz f_L , aufgenommen an einem Silizium-Substrat ($\rho_S \approx 15 \Omega cm$, $d_f(SiO_2) \approx 12 nm$, $d_f(Si_3N_4) \approx 31 nm$) mit $pH=4$ - Puffer, bei einer Beleuchtungsleistung von $P_L = 5,8 mW$, einem Beleuchtungsfleck von $A_L \approx 1 mm^2$ und einer Gesamtoberfläche von $A_{akt} = 90 mm^2$.

(f) pH-Abhängigkeit der Photostroms

Die pH-Abhängigkeit des Photostroms wurde bereits in vorherigen Arbeiten demonstriert [146-148]. Sie entspricht den theoretischen Erwartungen.

³⁶ Der detailliert Aufbau des Silizium-Substrats („Typ 8D“) ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

4.5 Bestimmung der Oberflächenpotential-Empfindlichkeit

Um mit dem LAPS orts aufgelöst zu messen, wird nur ein sehr kleiner Teil seiner Halbleiter-Oberfläche beleuchtet. Nur dort ändert sich die Kapazität der Raumladungszone, wodurch ein lokaler Photostrom fließt. Der Photostrom ist dabei proportional zur Änderung der Gesamtkapazität ΔC_{EIS} bei Beleuchtung. Diese ist eine Differenz aus großen Summen, da die Kapazität der unbeleuchteten Bereiche konstant bleibt und nur der kleine, durch den Lichtzeiger beleuchtete Teil der Oberfläche, seine Kapazität ändert: $\Delta C_{\text{EIS}} = C_{\text{EIS}}(\text{Beleuchtung an}) - C_{\text{EIS}}(\text{Beleuchtung aus}) = (\sum_{i,i,j} c_i(\text{dunkel}) + c_j(\text{hell})) - (\sum_{i,i,j} c_i(\text{dunkel}) + c_j(\text{dunkel}))$. Meßprobleme die eine Differenzbildung zwischen zwei großen Summen erfordern sind aber besonders anfällig für Rauschen: Im Fall des LAPS wirken die unbeleuchteten Teile der Oberfläche als Streukapazität und erzeugen dadurch Rauschen im Photostrom. In einem einfachen Bild wird das Rauschen im Photostrom proportional zur Streukapazität, d.h. zur Oberfläche des LAPS sein. Die Potentialempfindlichkeit des LAPS wird deshalb um so besser sein, je kleiner dessen Oberfläche ist. Es stellt sich deshalb die Frage, wie weit die Oberfläche des LAPS verkleinert werden muß, um eine ausreichende Potentialempfindlichkeit zu erhalten. Müßte die Oberfläche so weit verkleinert werden, daß sie nur noch die Größe der Gate-Elektrode eines FET-Feldes hätte, wäre der Vorteil des LAPS, die freie Oberflächenpotential-Messung entlang einer großen Oberfläche, verloren. In diesem Kapitel werden dazu Messungen zur Flächenabhängigkeit der Potentialempfindlichkeit vorgestellt.

(a) Materialien und Methoden

Um die Oberfläche des LAPS zu variieren, wurden Teile der Oberfläche dick mit Photolack (1813 Photoresist, Shipley) bedeckt, so daß nur in der Mitte eine Fläche der Größe A_{akt} freibleib, vgl. Abb. 4.5.1. Diese Fläche entsprach dann der aktiven Oberfläche des LAPS, da mit Photolack bestrichenen Teile der Oberfläche eine gegen Null gehende Kapazität haben und somit passiviert sind.

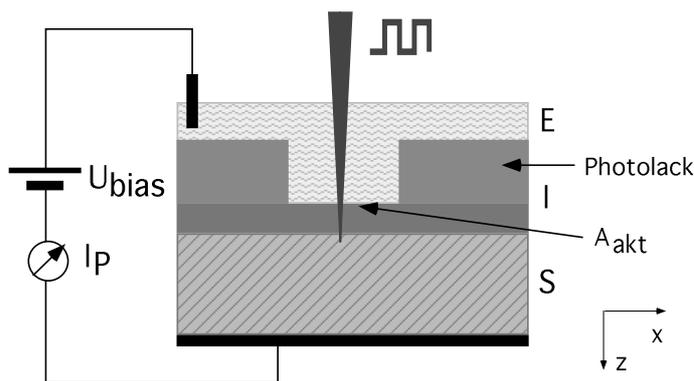


Abbildung 4.5.1: Aufbau eines LAPS-Experimentes zur Bestimmung der Potentialempfindlichkeit. Große Teile der Halbleiter-Oberfläche sind mit Photolack bedeckt, so daß nur in der Mitte eine Fläche der Größe A_{akt} freibleibt.

Die Mitte der freien Fläche wurde mit einem Lichtzeiger mit einem Querschnitt $A_L \approx 50 \mu\text{m}^2$ mit einer Leistung $P_L = 1,1 \text{ mW}$ beleuchtet. Für jeden Halbleiter wurde dann zunächst eine Photostrom-Spannungs-Kurve aufgenommen und deren Ableitung bestimmt, vgl. Abb. 4.5.2. Am Ort der maximalen Steigung $U_{\text{bias,WP}}$ ist der Photostrom maximal sensitiv auf Potentialänderungen. Die absolute Steigung der Kennlinie $dI_p/dU_{\text{bias}}|_{\text{WP}}$ liefert damit den Skalierungsfaktor zur Umrechnung der gemessenen Photoströme in Potentialänderungen.

Um das Rauschen im Photostrom zu messen wurde die Vorspannung konstant auf den Wendepunkt der $I_P(U_{\text{bias}})$ -Kennlinie $U_{\text{bias,WP}}$ eingestellt. Dann wurde innerhalb des Lock-In-Verstärkers von der Amplitude des Photostroms $I_P(t)$ der konstante Anteil („offset“) $I_{P,WP}$ abgezogen und nur der zeitliche Verlauf der Fluktuationen $\Delta I_P(t) = I_P(t) - I_{P,WP}$ aufgezeichnet, vgl. Abb. 4.5.2. Als Rauschamplitude $\Delta \Delta I_P$ wird die Standardabweichung der Photostrom-Fluktuationen, bestimmt über ein Zeitintervall von einer Sekunde definiert:

$$\Delta \Delta I_P = \sqrt{\frac{1}{1s} \int_t^{t+1s} (\Delta I_P(t) - \overline{\Delta I_P})^2 dt} \quad \text{mit} \quad \overline{\Delta I_P} = \frac{1}{1s} \int_t^{t+1s} \Delta I_P(t) dt \quad (1)$$

Durch Skalierung mit der Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie am Wendepunkt kann nun aus dem mittleren Rauschen im Photostrom das Rauschen in der Potentialbestimmung, d.h. die Potentialempfindlichkeit $\Delta \Delta \Phi_S$ berechnet werden:

$$\Delta \Delta \Phi_S = \Delta \Delta I_P / (-dI_P/dU_{\text{bias}}|_{\text{WP}}) \quad (2)$$

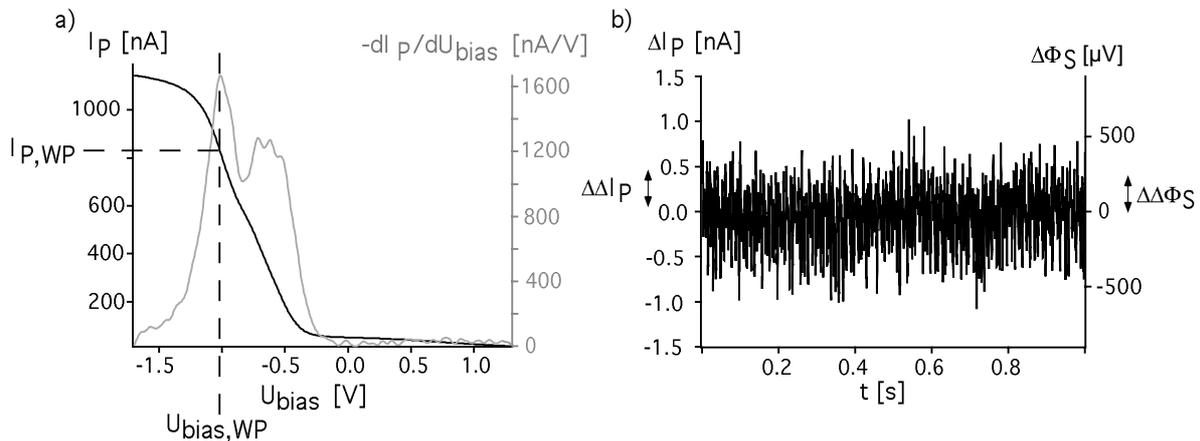


Abbildung 4.5.2³⁷: Prinzip zur Bestimmung der Potentialempfindlichkeit. a) Aufnahme einer Photostrom-Spannungs-Kurve ($I_P(U_{\text{bias}})$, linke Skala). Der Wendepunkt $U_{\text{bias,WP}}$ der Kurve wurde als Maximum der Ableitung ($dI_P/dU_{\text{bias}}(U_{\text{bias}})$, rechte Skala) bestimmt. Dort floß ein Photostrom ($I_{P,WP} \approx 820$ nA), dessen Amplitude maximal sensitiv auf Änderungen im Potential war ($-dI_P/dU_{\text{bias}}|_{\text{WP}} \approx 1700$ nA/V). Die aufgezeichnete Kurve wurde in pH=4-Puffer mit einem Silizium-Substrat mit spezifischem Widerstand $\rho_S = 15 \Omega\text{cm}$ und einer $d_1(\text{SiO}_2) = 12 + d_2(\text{Si}_3\text{N}_4) = 31$ nm dicken Isolationsschicht aufgenommen. Die Photolack-freie Fläche betrug $A_{\text{akt}} \approx 1,2$ mm². b) Bei konstanter Vorspannung $U_{\text{bias,WP}}$ wurden Fluktuationen des Photostroms $\Delta I_P(t) = I_P(t) - I_{P,WP}$ um seinen konstanten Wert $I_{P,WP}$ herum aufgezeichnet. Über die Steigung der Photostrom-Spannungs-Kurve am Wendepunkt $dI_P/dU_{\text{bias}}|_{\text{WP}}$ wurden die Stromfluktuationen ΔI_P (linke Skala) in Potential-Fluktuationen $\Delta \Phi_S$ (rechte Skala) umskaliert. Bei einer Zeitauflösung von 3 kHz wurde als Stromrauschen $\Delta \Delta I_P = 0,36$ nA und als Potential-Empfindlichkeit $\Delta \Delta \Phi_S = 0,36\text{nA} / 1700$ nA/V = 0.21 mV bestimmt.

Mit dieser Methode wurde die Potentialempfindlichkeit $\Delta \Delta \Phi_S$ verschiedener Silizium-Substrate bestimmt. Für jede Dotierung wurden dazu Messungen an zwischen 2 bis 8 Wafern mit jeweils 4 bis 7 verschiedenen Photolackbeschichtungen, d.h. Oberflächen A_{akt} durchgeführt. Alle Messungen wurden mit einer Modulationsfrequenz von $f_L = 10$ kHz bei einer Zeitauflösung von 3 kHz durchgeführt. Wie in dem in Abb. 4.5.3 gezeigten Beispiel zu sehen ist, kann der Zusammenhang zwischen Potentialempfindlichkeit und Oberfläche A_{akt} in erster Näherung linear beschrieben werden. Dieser lineare Zusammenhang wurde anhand der

³⁷ Der detaillierte Aufbau des Silizium-Substrats („Typ 8D“) ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

vorliegenden Meßdaten für alle Wafertypen bestimmt.

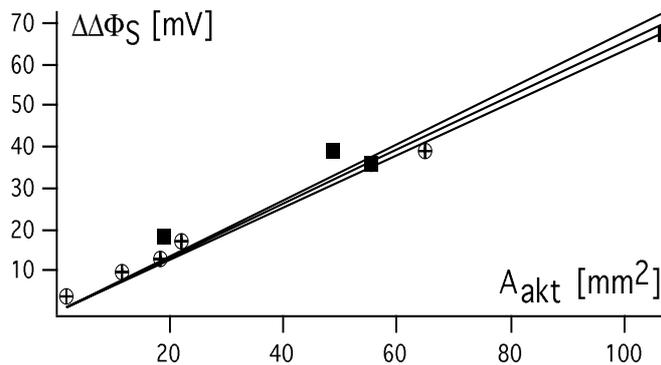


Abbildung 4.5.3³⁸: Potential-Empfindlichkeit $\Delta\Delta\Phi_S$ von Silizium-Substraten mit spezifischem Widerstand $\rho_S = 0,014 \Omega\text{cm}$ und einer Isolationsschicht mit $d_I(\text{SiO}_2) = 30 \text{ nm} + d_I(\text{Si}_3\text{N}_4) = 59 \text{ nm}$, in Abhängigkeit der aktiven Fläche A_{akt} . Es wurden Messungen an zwei verschiedenen Proben (Plus- bzw. Quadrat-Symbole) mit jeweils 5 bzw. 4 unterschiedlichen Photolack-Beschichtungen mit aktiver Oberfläche A_{akt} durchgeführt. Die Meßpunkte in dem gezeigten Beispiel können mit einer Ursprungsgeraden mit Steigung $\Delta\Delta\Phi_S/A_{\text{akt}} = 0,65 \pm 0,02 \text{ mV/mm}^2$ beschrieben werden.

(b) Ergebnisse und Diskussion³⁹

In Abb. 4.5.4 ist die Potentialempfindlichkeit pro Fläche gegen den spezifischen Widerstand für die untersuchten Halbleitertypen aufgezeichnet.

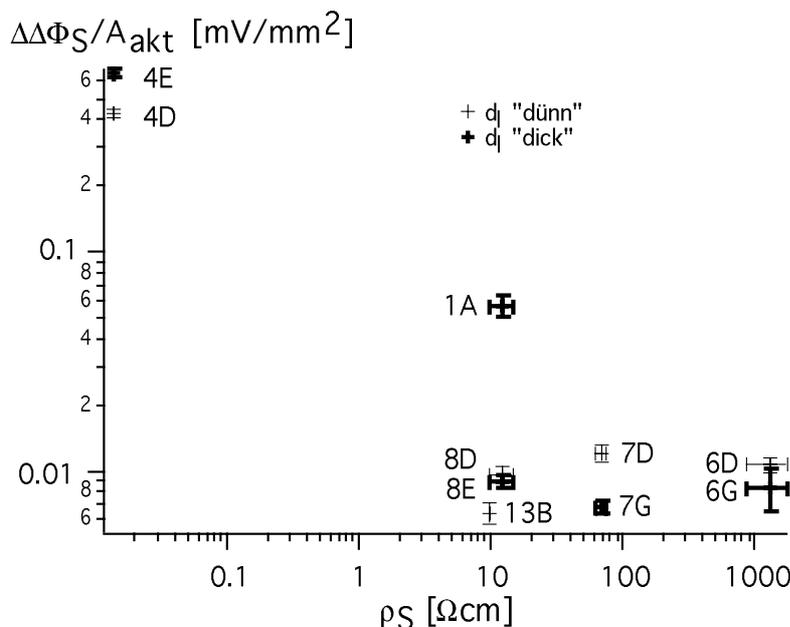


Abbildung 4.5.4⁴⁰: Aufgetragen ist die Potentialempfindlichkeit pro Oberfläche $\Delta\Delta\Phi_S/A_{\text{akt}}$ für verschiedene Silizium-Substrate, aufgetragen gegen den spezifischen Widerstand ρ_S . $\Delta\Delta\Phi_S/A_{\text{akt}}$ wurde für jedes Substrat wie in Abb. 4.5.3 beschrieben durch „Fitten“ einer Ursprungsgerade an die aufgezeichneten $\Delta\Delta\Phi_S(A_{\text{akt}})$ -Daten berechnet. Die dick bzw. dünn eingezeichneten Punkte beschreiben dabei Substrate mit dicker bzw. dünner Isolationsschicht. Das Substrat „Typ 1A“ ist der kommerziell von Molecular-Devices erhältliche LAPS-Wafer, „Typ 13B“ ein ausgedünntes Substrat.

Bei hohen Dotierungen bzw. kleinen spezifischen Widerständen ($\rho_S = 0,014 \Omega\text{cm}$) ist bei einer konstanten Oberfläche die Potentialempfindlichkeit des LAPS viel schlechter, als bei niedrigen Dotierungen ($\rho_S = 10 - 1800 \Omega\text{cm}$). Eine Verringerung der Dotierung verbessert die Potentialempfindlichkeit nicht weiter, wenn der spezifischen Widerstand größer als ca. $10 \Omega\text{cm}$ wird. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen. Ein Vergleich zwischen den Substraten „Typ 8D“ und „Typ 13B“ zeigt, daß bei gleicher Dotierung eine Verdünnung des Halbleiters von $d_S = 1000 \mu\text{m}$ („Typ 8D“) auf $d_S = 10 \mu\text{m}$ („Typ 13B“) die Potentialempfindlichkeit nicht verschlechtert, sondern eher verbessert.

Neben der Größe der unbeleuchteten aktiven Oberfläche hängt die Streukapazität im LAPS

³⁸ Details über das verwendete Silizium-Substrat („Typ 4E“) sind im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

³⁹ Die Software zur Auswertung der Meßdaten wurde von M. George geschrieben.

⁴⁰ Eine nähere Beschreibung der Silizium-Substrate ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

auch von der spezifischen Kapazität der EIS-Struktur und damit von der spezifischen Kapazität der Isolationsschicht ab. Bei Substraten mit dicker Isolationsschicht sollte die Potentialempfindlichkeit deshalb besser sein. Bei den untersuchten Proben war das Rauschen im Photostrom $\Delta I_p/A_{akt}$ bei dünnen Isolationsschichten („Typen 4D, 8D, 7D, 6D“) höher als bei vergleichbaren Proben mit dicken Isolationsschichten („Typen 4E, 8E, 7G, 6G“) (Daten nicht gezeigt). Bis auf Substrate vom „Typ 4“ war auch die Potentialempfindlichkeit bei Substraten mit dicker Isolationsschicht („Typen 8E, 7G, 8G“) besser als die bei vergleichbaren Proben mit dünner Isolationsschicht („Typen 8D, 7D, 6D“) ⁴¹.

Eine Extrapolation des linearen Zusammenhangs zwischen $\Delta\Phi_S$ und A_{akt} würde für Silizium-Substrate mit einem spezifischen Widerstand $\rho_S > 10 \Omega\text{cm}$ bei einer Oberfläche von $A_{akt} \approx 1 \text{ mm}^2$ Potentialempfindlichkeiten im Bereich von $\Delta\Phi_S \approx 10 \mu\text{V}$ ergeben. Dies wäre im Vergleich mit anderen Techniken ein ausgezeichneter Wert. Leider ist aber eine Extrapolation der Empfindlichkeit für kleine Flächen nicht möglich, da in diesem Bereich auch Limitierungen des elektronischen Aufbaus zur Messung des Photostroms berücksichtigt werden müssen.

(c) Limitierung der Potentialempfindlichkeit durch den elektronischen Aufbau

Sowohl Amplitude I_p , als auch Steigung des Photostroms dI_p/dU_{bias} sollten von der Fläche des LAPS unabhängig sein, solange die Oberfläche A_{akt} größer als die der Ortsauflösung entsprechende Fläche $(2 \cdot r_{min})^2$ ist. Das Rauschen im Photostrom ΔI_p und damit auch die Potentialempfindlichkeit $\Delta\Phi_S$ sollten dagegen linear mit A_{akt} skalieren. Wie in Abb. 4.5.5 gezeigt ist, treffen diese Überlegungen für aktive Oberflächen A_{akt} größer $\approx 20 \text{ mm}^2$ zu. Darunter ist jedoch ein deutlich abweichendes Verhalten zu beobachten, obwohl die Ortsauflösung zu r_{min} kleiner $\approx 100 \mu\text{m}$ abgeschätzt wurde, d.h. $(2r_{min})^2$ kleiner $\approx 0,04 \text{ mm}^2$ ist. So nahmen sowohl Amplitude $I_{p,WP}$, als auch Steigung des Photostroms $dI_p/dU_{bias|WP}$ am Wendepunkt bei Flächen kleiner $\approx 20 \text{ mm}^2$ deutlich ab, wogegen ihr Verhältnis $(dI_p/dU_{bias})/I_{p|WP}$ in etwa konstant blieb. Dies bedeutet, daß die Potentialempfindlichkeit $\Delta\Phi_S = \Delta I_{p,WP} / (dI_p/dU_{bias|WP})$ mit sinkender Fläche weniger als linear verbessert wird. Der Photostrom wurde also davon beeinflusst, ob die Oberfläche des LAPS $\approx 2 \text{ mm}$ vom Beleuchtungsfleck entfernt mit Photolack bedeckt war, obwohl die Ortsauflösung kleiner $\approx 100 \mu\text{m}$ abgeschätzt wurde. Dieses Ergebnis ist nicht eindeutig erklärbar. Da in den Messungen zur Bestimmung der Ortsauflösung bisher kein Fehler entdeckt werden konnte, welcher Abweichungen in dieser Größenordnung erklären könnte, ist nur eine unbefriedigende Erklärung dieses Sachverhaltes möglich: Wie bereits in früheren Arbeiten spekuliert wurde [157], könnte die die Ortsauflösung limitierende diffusive Ausdehnung der Ladungsträgerwolke im Halbleiter neben dem in Kap. 4.6 beschriebenen kurzreichweitigen Term einen langreichweitigen Schwanz besitzen.

Auch das Rauschen im Photostrom $\Delta I_p = 200 \text{ pA}$ nahm bei kleinen Flächen weniger als linear mit der Oberfläche des LAPS ab. Bei kleinen Flächen war das Rauschen etwa konstant und lag

⁴¹ Die Potentialempfindlichkeit ist der Quotient aus dem Rauschen des Photostrom und der maximalen Steigung der Photostrom-Spannungs-Kennlinie. Bei hohen Dotierungen („Typ 4“) ist zwar die Steigung in der Photostrom-Spannungs-Kennlinie bei dünnen Oxidschichten höher, vgl. Kap. 4.4, dafür ist aber auch das Rauschen im Photostrom höher, wodurch sich insgesamt eine geringere Potential-Empfindlichkeit ergibt.

um $\Delta\Delta I_P \approx 200$ pA. Dieser Effekt kann durch das Rauschen in der Elektronik zur Messung des Photostrommessung erklärt werden: Die Messung des Photostroms fand in zwei Verstärkern statt. Der in der Meßkammer integrierte Vorverstärker kann nicht Ursache des Rauschens gewesen sein, da sein Rauschen zu nur $\Delta\Delta I \approx 60$ pA $\ll 200$ pA bestimmt wurde. Im nachfolgenden Lock-In-Verstärker wurde mit Hilfe der Auto-Offset-Funktion der konstante Teil des Photostroms abgezogen und die Amplitude der Photostrom-Fluktuationen ausgegeben. Es mußten also sehr kleine Fluktuationen im Photostrom ($\Delta I_P(t)$ bis < 200 pA) auf einem hohen konstanten Trägersignal ($I_{P,WP}$ bis > 1000 nA) gemessen werden. Dies entspricht einem „Signal-zu-Offset“-Verhältnis von bis zu $0,2\text{nA}/1000\text{nA} = 2 \cdot 10^{-4}$. Der verwendete Lock-In-Verstärker hatte bei einer maximalen Ausgabespannung von 10 V ein intrinsisches Rauschen von ca. 3 mV, d.h. ein „Signal-zu-Offset“-Verhältnis von $3\text{mV}/10000\text{mV} = 3 \cdot 10^{-4}$. Damit konnten bei einem absoluten Photostrom von 1000 nA Stromfluktuationen, die deutlich kleiner als 300 pA waren, nicht mehr nachgewiesen werden. Das bei kleinen Oberflächen resultierenden Rauschen im Photostrom konnte also nicht mehr vom Lock-in-Verstärker aufgelöst werden.

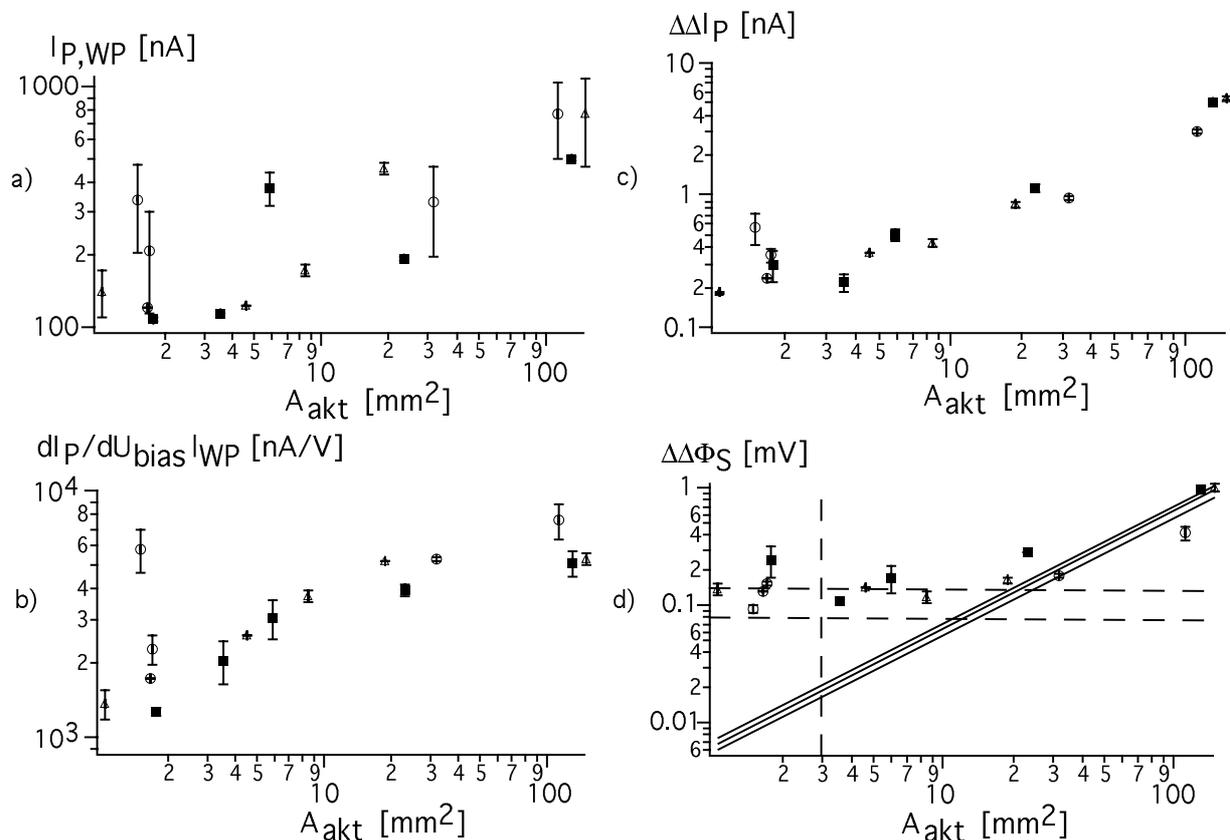


Abbildung 4.5.5⁴²: Bestimmung der Potentialempfindlichkeit an drei Silizium-Proben (Dreiecke, Kreise, Quadrate) mit $\rho_s = 10 \Omega\text{cm}$, $d_I(\text{SiO}_2) = 12 \text{ nm}$, $d_I(\text{Si}_3\text{N}_4) = 31 \text{ nm}$ in pH=4-Puffer. Es wurden dabei jeweils zwischen 4 und 5 verschiedene Photolackbeschichtungen A_{akt} vermessen. a) Amplitude des Photostroms am Wendepunkt. b) Steigung des Photostroms am Wendepunkt. c) Rauschamplitude des Photostroms. Im linearen Bereich ist $\Delta\Delta I_P = 0,035 \text{ nA/mm}^2$. d) Potentialempfindlichkeit. Im linearen Bereich ist $\Delta\Delta\Phi_S = 0,0064 \text{ mV/mm}^2$. Bei einer Fläche von $A_{\text{akt}} = 3 \text{ mm}^2$ beträgt die Potentialempfindlichkeit $130 \pm 50 \mu\text{V}$ (obere gestrichelte Linie, $n=6$, Datenpunkte nicht einzeln eingezeichnet). Unter Verwendung eines Differenzmeßverfahrens kann die Potentialauflösung bei gleicher Fläche auf $80 \pm 40 \mu\text{V}$ gesteigert werden (untere gestrichelte Linie, $n=6$, Daten nicht einzeln eingezeichnet).

⁴² Eine nähere Beschreibung der Halbleitersubstrate vom „Typ 13B“, ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

(d) Erhöhung der Potentialempfindlichkeit durch Differenzmessungen mit zwei Lichtzeigern

Das Problem hoher Offset-Photoströme läßt sich teilweise durch Verwendung einer Differenzmeßmethode umgehen [146, 148]: Dabei wird neben der Beleuchtung der Meßposition die Oberfläche des LAPS mit einem defokussierten zweiten Lichtzeiger beleuchtet, welcher um 180° phasenversetzt zum ersten moduliert wird. Ist das Oberflächenpotential an den beiden beleuchteten Stellen gleich, so haben beide lokale Teilströme dieselbe Amplitude. Da die Modulation aber gegenphasig ist, ist auch die Phase beider Teilströme um 180° verschoben und der resultierende Photostrom sollte Null sein. Wenn sich das Oberflächenpotential am Ort eines Lichtzeigers ändert, so ändert sich auch die Amplitude des Photostroms. Sie ist proportional zur Differenz der Oberflächenpotentiale zwischen beiden beleuchteten Stellen. Durch die Differenzmessung sollte der Offset-Photostrom idealerweise zu Null kompensiert sein. In der Praxis enthielt der Photostrom jedoch viele anharmonische Anteile, so daß der Offset des Photostroms zwar drastisch verringert werden konnte, aber nicht Null war. Dies lag vor allem daran, daß Anstieg und Abfall des Photostroms nicht identisch waren.

Unter Verwendung eines Lichtzeigers wurde mit einem Silizium-Substrat ($\rho_S = 10 \text{ } \Omega\text{cm}$, $d_1(\text{SiO}_2) = 12 \text{ nm}$, $d_1(\text{Si}_3\text{N}_4) = 31 \text{ nm}$)⁴³ mit einer aktiven Fläche $A_{\text{akt}} \approx 3 \text{ mm}^2$ bei einer Zeitauflösung von 3 kHz eine Potentialempfindlichkeit von $130 \pm 50 \text{ } \mu\text{V}$ ($n=6$) erreicht, siehe Abb. 4.5.5. Durch Verwendung des Differenzmeßprinzips konnte die Potentialempfindlichkeit auf $80 \pm 40 \text{ } \mu\text{V}$ verbessert werden.

Zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden sollte die Empfindlichkeit des hier vorgestellte LAPS-Aufbaus gerade ausreichend sein. Mit einer verbesserten Meßelektronik scheinen aber durchaus Potential-Empfindlichkeiten von einigen $10 \text{ } \mu\text{V}$ bei Oberflächen um 1 mm^2 realisierbar.

⁴³ Eine detaillierte Beschreibung des Substrats vom „Typ 13B“ ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

4.6 Experimente zur Ortsauflösung

Um die Ortsauflösung des LAPS zu untersuchen, werden drei verschiedene Strategien angewendet, wie im folgenden beschrieben ist.

(a) Abbildung von Potentialmustern

Durch Aufdampfen dielektrischer Schichten [158-160] oder Bestrahlung mit UV [146, 157] können auf der Oberfläche des LAPS gezielt Variationen des Oberflächenpotentials $\Delta\Phi_S(x)$ erzeugt werden. Durch Rastern des Lichtzeigers über das Potential-Muster und Messung des Photostrom $I_p(x)$ wird das Potentialmuster abgebildet: $I_p = I_p(\Delta\Phi_S(x))$. Die Ausdehnung der kleinsten Oberflächenpotential-Struktur, welche durch Messung des Photostroms noch auflösbar ist, wird dabei als Ortsauflösung definiert.

In Tab. 4.6.1 sind nach dieser Methode durchgeführte Experimente zusammengefaßt. Sie zeigen, daß die Ortsauflösung des LAPS durch Verwendung dünner Substrate verbessert [158-160] wird. Bei Beleuchtung von hinten ist die Ortsauflösung besser bei großen Eindringtiefen des Lichtzeigers [159].

Referenz	d_s [μm]	λ [nm]	λ_L [μm] ⁴⁴	Quelle	R_{Exp} [μm]	r_{min} [μm]
[159]	630	633	2	hinten	< 1000	-
[159]	300	633	2	hinten	< 500	-
[159]	100	633	2	hinten	< 100	-
[159]	20	830	5	hinten	< 10	6-14 ⁴⁵
[160]	0,5	532	1	hinten	< 5	0,14- 0,35 ⁴⁶
[146, 157]	500	690	3	vorne	< 100	25-50 ⁴⁷

Tabelle 4.6.1: Vergleich experimentell bestimmter Ortsauflösungen. Dazu wurden n-dotierte Silizium-Substrate mit einem Widerstand von $\rho_s = 10-15 \Omega\text{cm}$ untersucht, in denen die Löcher-Diffusionslänge $L_{Sp} \approx 100-400 \mu\text{m}$ beträgt. d_s bezeichnet dabei die Dicke des Substrates, λ die Wellenlänge und λ_L die Eindringtiefe des Lichtzeigers. Die Spalte „Quelle“ zeigt an, ob das Substrat von vorne oder von hinten beleuchtet wurde. R_{Exp} gibt die experimentell bestimmte Ortsauflösung an, während r_{min} den nach Kap. 4.3 abgeschätzten Wert der Ortsauflösung angibt. Es ist darauf zu achten, daß R_{Exp} und r_{min} auf unterschiedlichen Definitionen beruhen.

(b) Ausnutzung der Nicht-Linearität der Strom-Leistungs-Kurve

In diesem Experiment wird die Oberfläche des LAPS mit zwei gleichphasig modulierten Lichtzeigern an zwei Stellen im Abstand Δx_L mit jeweils der Leistung P_L beleuchtet. Sind die beiden beleuchteten Stellen so weit voneinander entfernt ($\Delta x_L \gg 0$), daß die durch sie im Halbleiter erzeugten Wolken freier Ladungsträger nicht überlappen, dann werden sich die Teil-Photoströme I_{p1} und I_{p2} linear zu dem Gesamt-Photostrom $I_p = I_{p1} + I_{p2}$ aufaddieren. Beleuchten dagegen im anderen Extremfall beide Lichtzeiger dieselbe Stelle ($\Delta x_L = 0$), dann überschneiden sich die Licht-generierten Ladungsträger. Dies entspricht genau dem Fall, daß

⁴⁴ Die Abhängigkeit von λ_L von λ ist in [151, (K.1.6, S.32)] tabelliert.

⁴⁵ $\lambda_L \approx d_s \Rightarrow (1/12)^{1/2} d_s < r_{\text{min}} < (7/15)^{1/2} d_s$.

⁴⁶ Die Dotierung des Substrats wurde nicht veröffentlicht. $\lambda_L \approx d_s \Rightarrow (1/12)^{1/2} d_s < r_{\text{min}} < (7/15)^{1/2} d_s$.

⁴⁷ Der Aufbau des „Typ 1A“-Substrates ist im Anhang Kap. 13.2 beschrieben. $r_{\text{min}} = (2L_{Sp}\lambda_L)^{1/2}$.

die Stelle mit nur einem Lichtzeiger mit doppelter Leistung $2 P_L$ beleuchtet würde. Wegen der Nichtlinearität von $I_p(P_L)$ ist bei doppelter Lichtleistung der Photostrom aber nicht doppelt so groß. Der Gesamt-Photostrom bei Beleuchtung einer Stelle mit zwei Lichtzeigern ist also kleiner als die Summe der Teilströme, die jeweils bei nur einem Lichtzeiger fließen würden $I_p < I_{p1} + I_{p2}$. Während eines Experiments wird der Abstand zwischen beiden Lichtzeigern Δx variiert und dabei der jeweilige Photostrom $I_p(\Delta x)$ gemessen. Dabei ist der Photostrom bei großen Δx konstant und beginnt abzunehmen, wenn der Abstand zwischen beiden Lichtzeigern so klein wird, daß die Licht-generierten Ladungsträger beider Lichtzeiger überlappen. Die mittlere Ausdehnung $\langle \Delta x \rangle$ dieses Einbruchs ist damit ein Maß für die Ortsauflösung. Experimente dazu wurden in [148, (K.5.2)] beschrieben. Quantitative Aussagen wurden mit dieser Methode bisher noch nicht erhalten.

(c) Bestimmung der Abklinglänge der Ladungsträgerverteilung entlang der LAPS-Oberfläche⁴⁸

Die Oberfläche von oxi-/nitridierten Silizium-Substraten wurde auf einer Hälfte ($x < 0$) mit einer Metallschicht bedampft, während die andere Hälfte nackt blieb. Der Lichtzeiger wurde von dem Metall-bedeckten Bereich in den unbedeckten Bereich gefahren und dabei der Photostrom $I_p(x, U_{bias})$ bei verschiedenen Vorspannungen U_{bias} gemessen, siehe Abb. 4.6.1. Eine typische Messung dazu ist in Abb. 4.6.2 und Abb. 4.6.3 dargestellt.

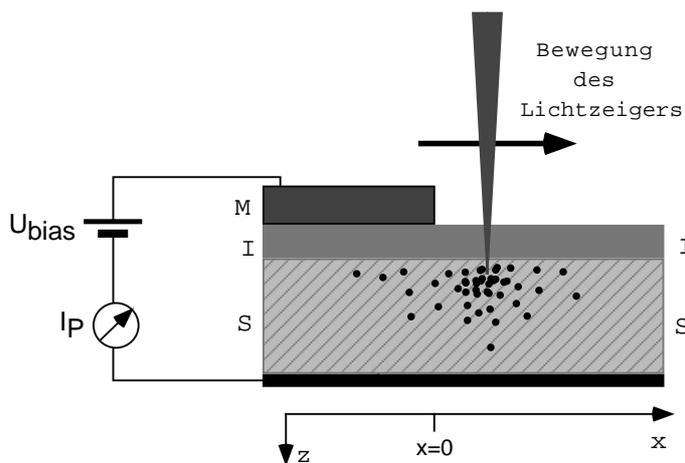


Abbildung 4.6.1: Prinzipieller Aufbau zur Bestimmung der Ortsauflösung. Nur eine Hälfte der isolierten Halbleiteroberfläche (IS) ist mit einer dünnen und deshalb semi-transparenten Metallschicht (M) überzogen. Der Lichtzeiger wird vom Metall-bedeckten Bereich ($x < 0$) über die Kante in den unbedeckten Bereich ($x > 0$) bewegt und dabei der Photostrom gemessen. Es kann nur dort ein Photostrom fließen, wo freie Ladungsträger (hier als Punkte eingezeichnet) in der Nähe der Raumladungszone im Halbleiter vorliegen.

Die Abhängigkeit des Photostroms von der Vorspannung zeigte in allen Experimenten die gewohnte sigmoidale Form $I_p(U_{bias})$: maximaler Photostrom in Inversion ($U_{bias} \ll 0$) und kein Photostrom in Akkumulation ($U_{bias} \gg 0$). Zur Auswertung der Ortsabhängigkeit wurde bei allen Messungen der räumliche Verlauf des Photostroms $I_p(x)$ in starker Inversion ($U_{bias} = -8V$) verwendet.

Bei Beleuchtung des Siliziums weit im nicht-metallisierten Bereich ($x \gg 0$) floß kein Strom, da kein geschlossener Stromkreis vorlag: Das Silizium-Substrat war dort zwar durch den

⁴⁸ Die Messungen in diesem Abschnitt wurden von M. George und zum Teil von I. Gerhardt durchgeführt. Dies ist das einzige LAPS-Experiment in dieser Arbeit, welches nicht in Elektrolyt durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden in [292] zur Veröffentlichung eingereicht.

ohmschen Rückkontakt von hinten, durch das Fehlen der Metallisierung aber nicht von vorne kontaktiert. An den Metall-freien Bereichen lag damit keine Vorspannung an, und es war keine Raumladungszone ausgebildet.

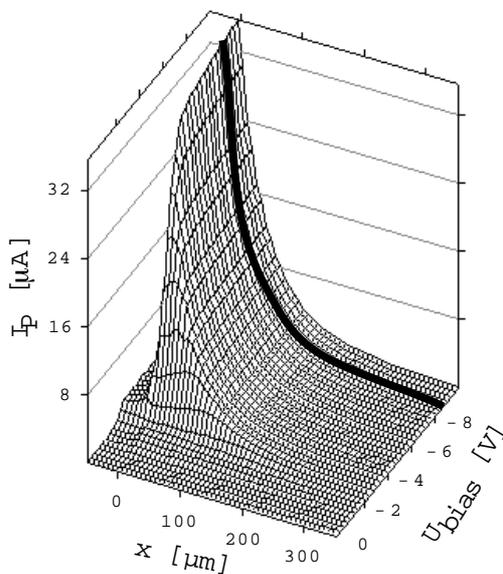


Abbildung 4.6.2: Photostrom I_P in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} und der Position des Lichtzeigers. Die Kurve wurde an einem „5G-Typ“-Silizium-Substrat aufgenommen, welches auf einer Hälfte ($x > 0$) mit einem 25 nm dicken NiCr-Metallfilm überzogen war. Der Radius des mit 10 kHz modulierten roten Lichtzeigers bei einer optischen Leistung von $P_L \approx 1$ mW betrug $r_L \approx 3-4 \mu\text{m}$ ⁴⁹.

Bei Beleuchtung des Siliziums tief im metallisierten Bereich ($x \ll 0$) floß ein konstanter Photostrom. Dessen Amplitude war gering, da bei Beleuchtung des Siliziums durch die Metallisierung hindurch von dieser ein Teil des Lichtes reflektiert und absorbiert wurde. In der Nähe der Metallkante ($x < 0$) stieg der Photostrom stark an und erreichte kurz hinter der Metallkante ($x > 0$) sein Maximum. Die Ausschmierung des Photostroms um die Metall-Kante herum wurde durch die endliche Ausdehnung des Lichtzeigers verursacht. Weiter im Metall-freien Bereich nahm die Amplitude des Photostroms exponentiell ab. Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Die Licht-generierten Ladungsträger diffundierten im Silizium und es floß überall dort ein Photostrom, wo in der Nähe der Raumladungszone freie Löcher vorlagen. Eine Raumladungszone existierte aber nur im Bereich des Metall-bedeckten Siliziums⁵⁰. Deshalb floß nur dann ein Photostrom, wenn Elektron-Loch-Paare entweder bereits unter der metallisierten Schicht erzeugt wurden, oder wenn sie durch laterale Diffusion parallel zur Oberfläche unter einen Metall-bedeckten Bereich gelangten. Der Photostrom nahm damit ab, je weiter der Ort der Beleuchtung vom metallisierten Bereich entfernt war. Die durch Anpassung des Abfalls mit einer Exponentialfunktion bestimmte Abklinglänge ist deshalb als effektive laterale Diffusionslänge freier Löcher parallel zur Oberfläche zu interpretieren und

⁴⁹ Der Radius des Lichtzeigers r_L wurde in einem getrennten Experiment ermittelt. Dabei wurde eine Seite eines isolierten Siliziumsubstrats (IS) mit einem dicken, die andere mit einem dünnen Metallfilm überzogen, der Lichtzeiger über die Kante gefahren und dabei der Photostrom aufgenommen. Bei Beleuchtung des dicken Metallfilms war der Photostrom klein, da viel Licht vom Metall absorbiert oder reflektiert wurde und nur wenige Elektron-Loch-Paare im darunterliegenden Halbleiter erzeugt werden konnten. Bei Beleuchtung des dünnen Metallfilms war der Photostrom deshalb viel größer. Die Ausdehnung bzw. Anstiegslänge der exponentiellen Zunahme des Photostroms beim Überfahren der Kante zwischen dickem und dünnem Metallfilm wurde als Radius des Lichtzeigers angenommen. Der Wert stimmt mit optischen Messungen überein, bei welchen der Radius des Lichtzeigers mit einem Mikroskopobjektiv abgeschätzt wurde.

⁵⁰ Das Feld der Raumladungszone dringt sicher auch etwas in den Metall-freien Bereich des Halbleiters ein, genauso wie außerhalb der Platten eines Kondensators ein Streufeld vorliegt. Da die Ausdehnung der Raumladungszone senkrecht zur Halbleiteroberfläche selbst bei sehr geringen Dotierungen kleiner als $10 \mu\text{m}$ ist [151, (K.2.3)], sollte sich die Raumladungszone nur deutlich unter $10 \mu\text{m}$ über die metallisierte Fläche hinaus in x -Richtung ausdehnen. Dies liegt dann in der selben Größenordnung wie der Radius des Lichtzeigers. Die Ortsauflösung kann mit dieser Methode also nicht viel genauer als $\approx 10 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

wird hier als Abschätzung der Ortsauflösung r_{\min} verwendet. Mit dieser Methode wurde die Ortsauflösung für verschiedene n-dotierte Silizium-Wafer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.6.4 zusammengefaßt⁵¹.

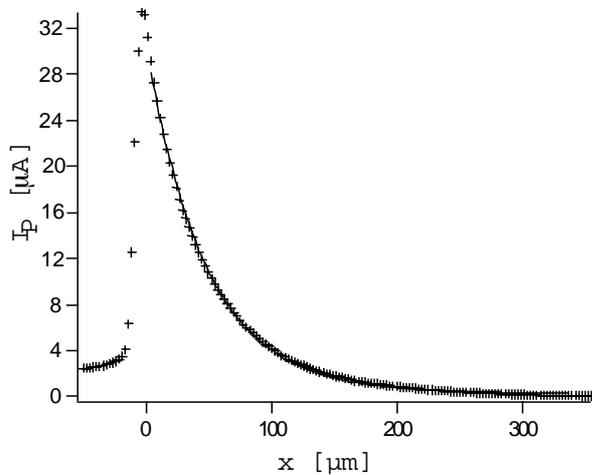


Abbildung 4.6.3: Schnitt aus Abb. 4.6.2 (dick eingezeichnete Linie) in der I_p - x -Ebene bei einer Vorspannung $U_{\text{bias}} = -8V$. Der Abfall der Photostroms im nicht-metallisierten Bereich kann mit einer Exponential-Funktion beschrieben werden. Die dadurch bestimmte Abfallkonstante wird als Ortsauflösung r_{\min} definiert..

Deutlich ist bei dicken Substraten ein Einfluß der Dotierung auf die Ortsauflösung zu beobachten („Typ 3,5,6,7,8“). Je kleiner der spezifische Widerstand ρ_s des Siliziums, um so besser ist die Ortsauflösung⁵². Der prinzipielle Effekt ist leicht verständlich: Bei starker Dotierung sind mehr Fremdatome im Silizium vorhanden, an denen Elektron-Loch-Paare gestreut werden können. Damit wird die Volumen-Diffusionslänge kürzer und die Ortsauflösung besser.

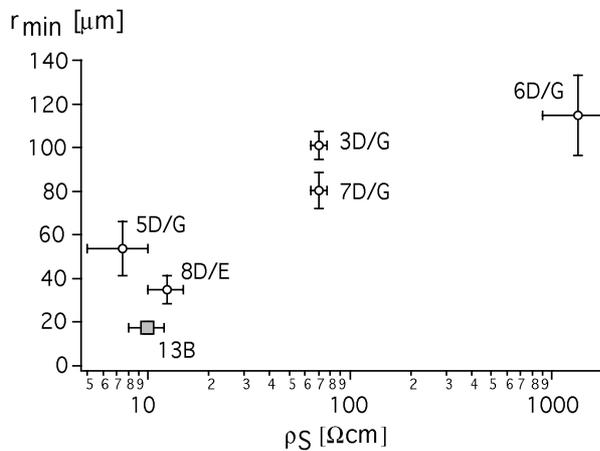


Abbildung 4.6.4: Experimentell bestimmte Ortsauflösung r_{\min} für verschiedene Halbleitertypen, aufgetragen gegen den spezifischen Widerstand des n-dotierten Siliziums ρ_s .

⁵¹ In dieser Arbeit sind nur prinzipielle Ergebnisse dargestellt. Für eine genauere Analyse müssen noch die Abhängigkeiten anderer Parameter, wie z.B. der Leistung des Lichtzeigers P_L und der Vorspannung U_{bias} berücksichtigt werden. In einer weiteren Variante ist geplant, auf die Hälfte der Oberfläche eines oxi-/nitrierten Siliziumsubstrats einen Film aus LaF_3 aufzudampfen und dann die gesamte Oberfläche mit einem Metallfilm zu überziehen. Von LaF_3 ist bekannt, daß es das Oberflächenpotential verändert [155]. Fahren des Lichtzeigers über eine derartige Potentialstufe und Bestimmung der Abfall-Länge im Photostrom sollte eine alternative Methode zur Bestimmung der Ortsauflösung sein. Die Experimente hätten den Vorteil, daß aufgrund der vollständigen Metallisierung nun entlang der gesamten Oberfläche eine durch Vorspannung erzeugte Raumladungszone ausgebildet wäre.

⁵² Die Umrechnung $n_D \leftrightarrow \rho_s$ ist in [151, (K.1.5.2, S.32)] tabelliert. Es bleibt unverständlich, warum die Ortsauflösung von „Typ 3“ Halbleitern schlechter als die von „Typ 7“ Halbleitern und die von „Typ 5“ Halbleitern schlechter als die von „Typ 8“ Halbleitern ist, obwohl die Halbleiter vom „Typ 3“ dünner als die vom „Typ 7“ und die vom „Typ 5“ dünner als die vom „Typ 8“ sind. Hier könnten entweder Unterschiede in der Halbleiter-Prozessierung (Gitterfehler,...) oder die in der vorigen Fußnote beschriebenen Effekte eine Rolle spielen. Weitere Angaben zu den Halbleiter-Substraten sind im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen.

Weiterhin ist in Abb. 4.6.4 die für einen dünnen Silizium-Wafer („Typ 13B“) bestimmte Ortsauflösung eingetragen. Sie liegt mit $r_{\min} = 17 \pm 3 \mu\text{m}$ deutlich unter der dicker Substrate mit vergleichbarer Dotierung⁵³ („Typ 5“ und „Typ 8“).

(d) Diskussion

Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente zur Bestimmung der Ortsauflösung zeigen drei klare Tendenzen: (i) die Ortsauflösung ist bei dicken Silizium-Substraten um so besser, je stärker die Dotierung ist. (ii) Bei einer Beleuchtung von vorne ist ein Lichtzeiger mit geringer Eindringtiefe (sichtbares Licht), bei einer Beleuchtung von hinten dagegen ein Lichtzeiger mit großer Eindringtiefe (infrarotes Licht) günstig. (iii) Die Ortsauflösung kann verbessert werden, in dem die Dicke des Silizium-Substrats reduziert wird. Diese Tendenzen können in sehr guter Übereinstimmung mit der in Kap. 4.3 vorgestellten Theorie erklärt werden. Bei Angabe absoluter Zahlen unterscheiden sich Theorie und Experiment allerdings teilweise deutlich.

Durch Verwendung dünner Halbleiter-Substrate konnte die Ortsauflösung des LAPS in den Bereich von 10-20 μm gebracht werden. Dies stellt eine deutliche Verbesserung zu den früher verwendeten dicken Halbleiter-Substraten dar [146, 157]. Die Ortsauflösung liegt damit im Bereich der Größe einzelner Zellen und sollte für den Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden ausreichend sein.

⁵³ Die in Kap. 4.3 beschriebene Theorie sagt hier ($d_s = \lambda_L = 3 \mu\text{m}$): $(1/12)^{1/2} d_s < r_{\min} < (7/15)^{1/2} d_s$, d.h. $0,84 \mu\text{m} < r_{\min} < 2,1 \mu\text{m}$ voraus. Dies ist deutlich kleiner als der experimentell bestimmte Wert. Wegen der Größe des Lichtzeigers waren sowieso keine Ortsauflösungen $< 10 \mu\text{m}$ bestimmbar. Außerdem besteht das „Typ 13B“-Substrat aus einer Epi-Schicht, d.h. einen dünnen schwach dotierten Film ($d_s = 3 \mu\text{m}$) auf einem dicken (380 μm) stark dotierten Si-Substrat. Es ist denkbar, dass die Ortsauflösung durch Diffusion der freien Löcher im unterliegenden Si-Substrat signifikant verschlechtert wird.

5 Der Feldeffekt-adressierbare potentiometrische Sensor (FAPS)¹

5.1 Funktionsweise

Der Feldeffekt-adressierbare potentiometrische Sensor (FAPS) ist ein Oberflächenpotential-Sensor mit einer hohen Integrationsdichte aktiver Meßpositionen. Im Vergleich mit konventionellen FETs liegt sein Vorteil besonders darin, daß bei Aufbau eines $n \times n$ - Feldes die Zahl der nötigen Zuleitungen nur mit n und nicht mit n^2 skaliert.

Der FAPS besteht aus zwei sich kreuzenden, gitterartigen Strukturen auf einem Trägersubstrat, siehe Abb. 5.1.1. Die obere Gitterstruktur besteht dabei aus einem Halbleitermaterial mit elektrisch steuerbarem, nicht-linearem Widerstand. Im folgenden wird das Halbleitermaterial, aus welchem diese sogenannten leitfähigen Kanäle aufgebaut sind, als n -Typ angenommen, d.h. die freien Ladungsträger sind Elektronen. Der spezifische Widerstand $r_c(x)$ [Ωm^{-1}] an einer Stelle x des Kanals ist proportional zum Kehrwert der Dichte der freien Ladungsträger $n_n(x)$ [m^{-3}] [151, (S.140)]:

$$r_c(x) = 1/(d_s \cdot b_s \cdot e \cdot n_n(x) \cdot \mu_n) \quad (1)$$

e [As] ist dabei die Elementarladung und μ_n [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] die Beweglichkeit der Elektronen, welche in erster Näherung als Potential-unabhängig betrachtet wird. d_s und b_s bezeichnen Dicke und Breite des Kanals und deren Produkt die Querschnittsfläche. Der gesamte Widerstand R_c des Kanals ist $R_c = \int_0^{l_s} r_c(x) dx$, wobei l_s die Länge des Kanals ist.

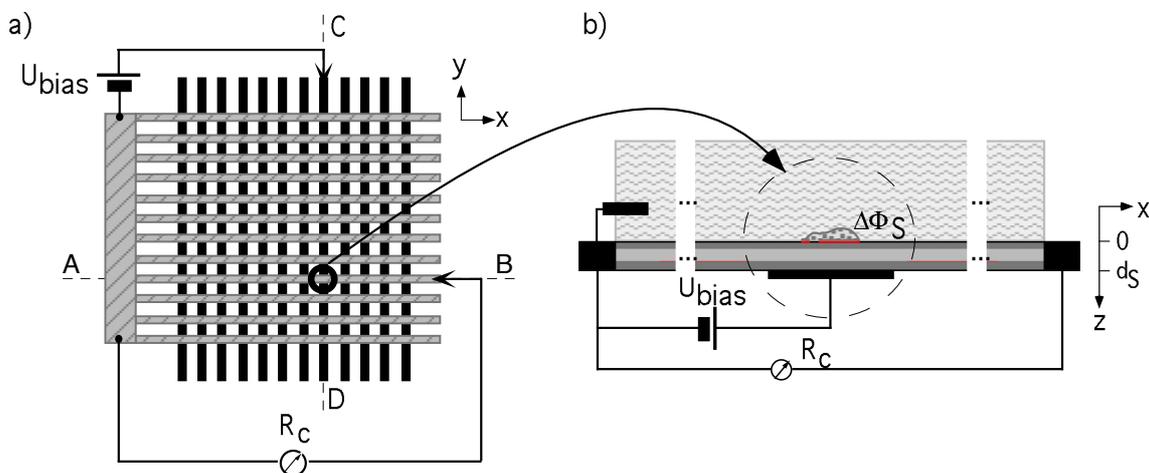


Abbildung 5.1.1: Schematischer Aufbau des FAPS. a) Blick von oben. Nicht eingezeichnet sind der Elektrolyt oberhalb und das Glas-Trägersubstrat unterhalb der Gitterstruktur. In x -Richtung sind die leitfähigen Kanäle, in y -Richtung die Gate-Elektroden streifenförmig angeordnet. Durch Anlegen einer Vorspannung U_{bias} an die entlang der Linie C-D eingezeichnete Gate-Elektrode und Messung des Widerstandes R_c des entlang der Linie A-B eingezeichneten Kanals, ist die aktive Meßposition durch den Kreuzungspunkt aus Kanal und Gate bestimmt. b) Querschnitt entlang eines leitfähigen Kanals in x -Richtung. Nicht eingezeichnet ist das Glas-Trägersubstrat. Auf den Kanal wirkt von unten das über eine Gate-Elektrode angelegte Potential U_{bias} und von oben in der elektrolytischen Phase ein Testpotential $\Delta\Phi_S$. Der Elektrolyt ist über eine Referenzelektrode mit dem Stromkreis verbunden. Ist das Gate-Potential negativ, so sinkt die Dichte freier Elektronen, was ein Abschnüren des Kanals bewirkt.

¹ Der FAPS basiert auf einer Idee von Dr. A. Lorke. Das gesamte Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. Lorke, S. Böhm und M. George begonnen. Die Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden in [143, 161-163] veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht.

Unter den leitfähigen Kanälen befindet sich eine von ihnen elektrisch isolierte Anordnung aus Steuer- bzw. Gate-Elektroden. Nach dem Feldeffektprinzip kann durch Anlegen einer Spannung U_{bias} an eine Steuerelektrode nun der lokale Widerstand $r_c(x)$ der darüber liegenden Kanäle am Ort der Kreuzungspunkte eingestellt werden: Wirkt an einer Stelle x eine negative Vorspannung $U_{bias}(x)$, werden dort freie Elektronen aus dem Kanal verdrängt und der Widerstand des Kanals nimmt zu. Bei kleinen Vorspannungen ist die Verarmung der Ladungsträgerdichte $\Delta n_n(x)$ dabei proportional zur angelegten Spannung [151]:

$$\Delta n_n(x) \propto -U_{bias}(x) + \text{const.} \quad (2)$$

$$n_n(x) = n_{n0} - \Delta n_n(x) \quad (3)$$

n_{n0} ist dabei die Elektronendichte im Kanal ohne angelegte Vorspannung. Der genaue physikalische Mechanismus der Ladungsträgerverarmung durch Anlegen eines Feldes hängt im Detail von der Art des verwendeten Halbleiters ab, aus welchem die Kanäle aufgebaut sind. Nach Gl. 1 - Gl. 3 ist der lokale Widerstand in den Kanälen proportional zum Kehrwert der dort anliegenden Spannung, vgl. Abb. 5.1.2. U_{th} ist dabei die Schwellenspannung, ab welcher der Kanal abgeschnürt, d.h. vollkommen verarmt an freien Elektronen ist:

$$r_c(x) \propto 1/(U_{bias}(x)-U_{th}) \quad (4)$$

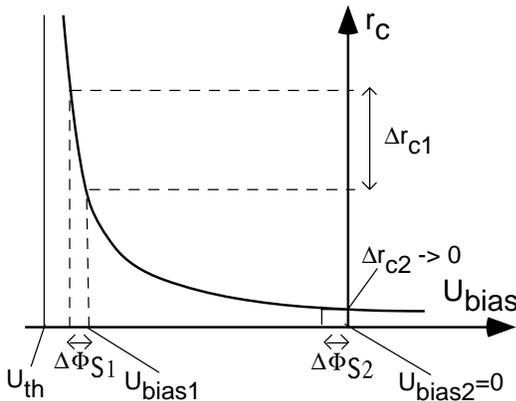


Abbildung 5.1.2: Theoretische Abhängigkeit des lokalen Kanalwiderstandes r_c von der angelegten Vorspannung U_{bias} . Bei einer Vorspannung U_{bias1} wird der Kanalwiderstand bei Einwirkung eines zusätzlichen Potentials $\Delta\Phi_{S1}$ stark verändert, $\Delta r_c \gg 0$. Bei einer Vorspannung $U_{bias1} = 0$ wirken sich zusätzliche Potentiale $\Delta\Phi_{S2}$ nicht auf den Widerstand des n-Kanals aus, $\Delta r_c \rightarrow 0$.

Das effektive Potential U_{gate} an einem leitenden Kanal am Kreuzungspunkt mit einer Steuer-Elektrode setzt sich aus der von unten mit der Steuer-Elektrode angelegten Vorspannung U_{bias} und dem zu messenden Testpotential $\Delta\Phi_S$ an der Oberfläche des Sensors zusammen, siehe Abb. 5.1.1:

$$U_{gate} = U_{bias} + \Delta\Phi_S \quad (5)$$

Durch Anlegen einer Steuerspannung $U_{bias1} \ll 0$ an eine ausgewählte Steuerelektrode, z.B. die in Abb. 5.1.1 entlang der Linie C-D eingezeichnete, kann der lokale Widerstand eines Kanals, z.B. der entlang der Linie A-B eingezeichnete, nun so eingestellt werden, daß er an diesem Kreuzungspunkt stark vom Potential $\Delta\Phi_S$ der Sensoroberfläche abhängig ist ($|dr_c/dU_{gate}| \gg 0$). An allen anderen Steuer-Elektroden wird eine Spannung U_{bias2} angelegt, so daß Potentiale $\Delta\Phi_S$ an der Oberfläche der Sensors an diesen Kreuzungspunkten nur einen vernachlässigbaren Einfluß auf r_c haben ($dr_c/dU_{gate} \approx 0$), siehe Abb. 5.1.2. Indem nur an eine Steuerelektrode eine

Spannung $U_{\text{bias}} \gg 0$ angelegt und der Widerstand R_c von nur einem Kanal gemessen wird, ist durch die Wahl des Kreuzungspunktes aus Steuerelektrode und Kanal die aktive Meßposition des Sensors bestimmt. Durch Messung des Kanalwiderstandes kann das Oberflächenpotential $\Delta\Phi_S$ an dieser Stelle bestimmt werden: $R_c = R_c(\Delta\Phi_S)$. Damit ist die Möglichkeit einer orts aufgelösten Oberflächenpotential-Detektion gegeben.

Umgekehrt sind durch lokale Abschnürung von Elektronenkanälen in der Halbleiterstruktur durch Anlegen einer Steuerspannung am adressierten Kreuzungspunkt elektrische Felder erzeugbar, mit denen auf der Oberseite angeordnete biologische Systeme manipuliert und stimuliert werden könnten [143].

Für eine praktische Realisierung des FAPS-Konzepts muß zunächst eine Technik zur Herstellung der leitfähigen Kanäle ausgewählt werden. Prinzipiell sind Methoden aus der Silizium-Technologie (z.B. die „silicon-on-insulator“ (SOI)- oder „wafer bonding“-Technik [164, 165]), die Verwendung dünner Filme aus amorphem Silizium [166], oder der Einsatz von halbleitenden Polymeren [167] denkbar. In diesem Projekt wurden die leitfähigen Kanäle durch sogenannte Quantentopfstrukturen mit der Technik des „epitaktischen lift-offs“ realisiert, siehe Abb. 5.1.3.

Ein Quantentopf besteht im wesentlichen aus einem Drei-Lagen-Schichtsystem, wobei die potentielle Energie E_{pot} für freie Ladungsträger in der innersten Schicht viel niedriger als in den beiden äußeren ist. Freie Ladungsträger, hier Elektronen, sind damit durch die Potentialbarrieren der Nachbarschichten an die innerste Schicht gebunden. Liegt die Dicke der innersten Schicht in der Größenordnung der de Broglie-Wellenlänge thermischer Elektronen, dann ist die Ladungsträgerverteilung senkrecht zum Schichtsystem in z-Richtung von den Gesetzen der Quantenmechanik bestimmt und deren Energie quantisiert [168-170]. In x- und y-Richtung ist das Elektronengas an die Länge l_s und Breite b_s der Kanäle gebunden. Da l_s und b_s deutlich größer als die de Broglie-Wellenlänge sind, können sich Elektronen innerhalb eines Kanals nach den Gesetzen der klassischen Mechanik frei in x- und y-Richtung bewegen. Diese Limitierung der freien Elektronenbewegung auf die x-y-Ebene wird mit dem Ausdruck „2-dimensionales Elektronengas“ beschrieben.

Wird nun an einer Stelle x_2 durch eine Gate-Elektrode eine negative Vorspannung U_{bias1} senkrecht zu dem Kanal angelegt, wird durch den resultierenden linearen Potentialgradient die potentielle Energie für freie Elektronen erhöht, siehe Abb. 5.1.3. Dadurch wird der Aufenthalt an der Stelle x_2 des Kanals für Elektronen energetisch ungünstig und sie wandern zu benachbarten, energetisch günstigeren Stellen x_1 und x_3 des Kanals. Damit sinkt an der Stelle der angelegten Vorspannung die Elektronendichte im Kanal und der lokale Widerstand wird größer. Leitfähige Kanäle aus Quantentopf-Strukturen erfüllen damit die geforderten Kriterien eines Halbleitermaterials, mit elektrisch steuerbarem, nicht-linearem Widerstand.

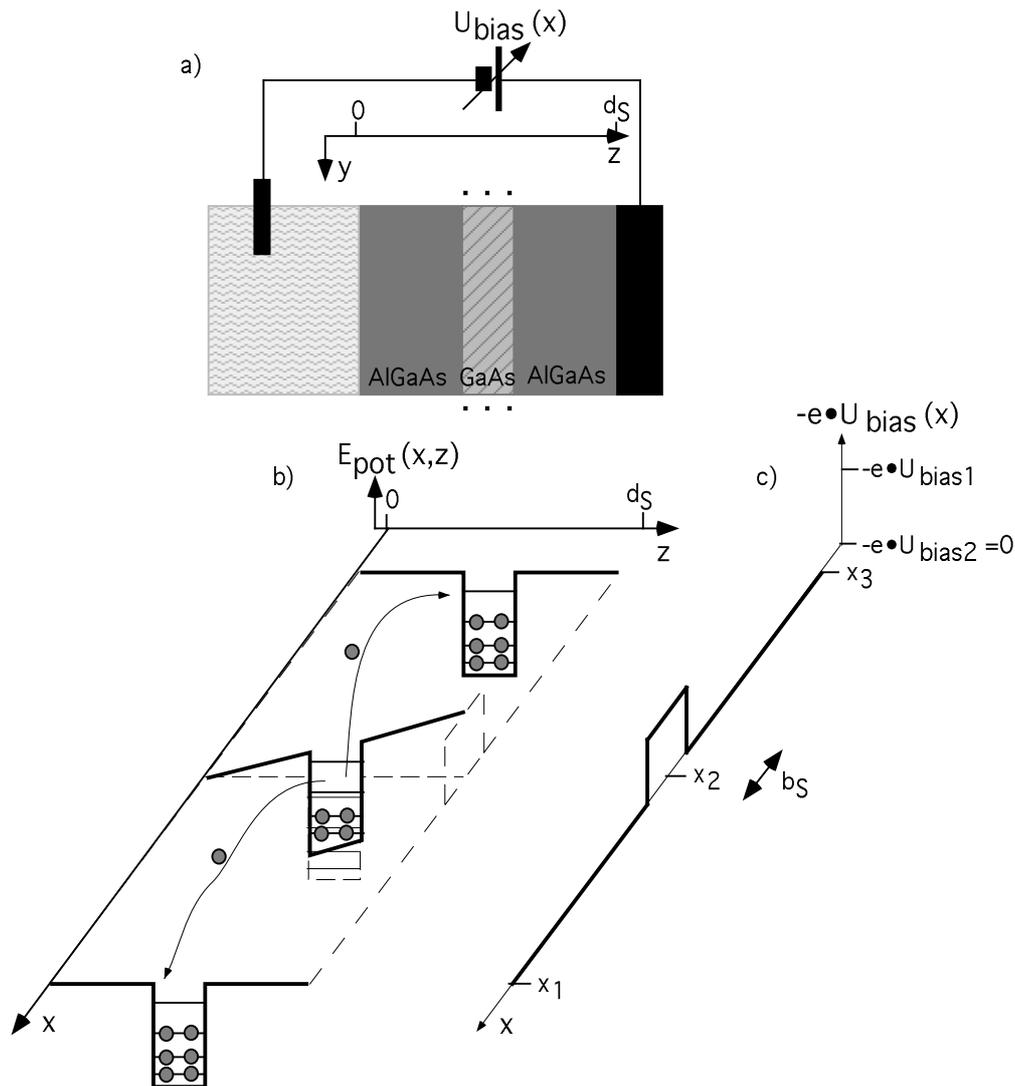


Abbildung 5.1.3: a) Schnitt durch einen in Quantentopf-Bauweise realisierten leitfähigen Kanal. Von der linken Seite wirkt auf den Kanal das Massepotential der Referenzelektrode im Elektrolyt, von der rechten Seite das über die angrenzende Gate-Elektrode angelegte Potential $U_{bias}(x)$. Der Quantentopf besteht aus einem Dreischichtsystem, wobei die beiden äußeren Schichten viel weniger stark leitfähig sind, als die innerste Schicht. b) Innerhalb der Quantentopfstruktur sind die freien Ladungsträger an die innere Schicht gebunden, da dort die potentielle Energie am niedrigsten ist. In z-Richtung ist die Energie der freien Ladungsträger, hier Elektronen, quantisiert, was in der Abbildung durch die auf diskreten Energieniveaus liegenden, kugelförmig eingezeichneten Elektronen angedeutet ist. Durch Anlegen einer lokalen Vorspannung entlang einer Gate-Elektrode mit Breite b_S an der Stelle x_2 , vgl. c), wird die potentielle Energie der Elektronen erhöht. Um diese energetisch ungünstigen Niveaus zu vermeiden, fließen Elektronen in x-Richtung zu anderen Stellen des Kanals, wo kein Potential anliegt. Damit wird die Dichte der freien Elektronen am Kreuzungspunkt mit einer negativ vorgespannten Elektrode erniedrigt und der lokale Kanalwiderstand steigt.

5.2 Experimenteller Aufbau

Die Herausforderung beim Aufbau eines FAPSs mit einer Quantentopfstruktur besteht im Aufbringen und Strukturieren der Quantentopfstruktur über den Gate-Elektroden. Ein etablierte Möglichkeit dazu ist die Technik des „epitaktischen lift-offs“ [171-173], welche bevorzugt auf GaAs-basierte Halbleitern anwendbar ist. Mit ihr können dünne, kristalline Halbleiterfilme auf strukturierte Substrate aufgebracht werden. Da die Technik bereits ausführlich beschrieben wurde, werden die einzelnen Schritte hier nur schematisch dargestellt, siehe dazu Abb. 5.2.1.

Basis ist eine Halbleiter-Struktur, in welcher auf einem Substrat (GaAs) eine Opferschicht (AlAs) und eine dünne kristalline Quantentopf-Struktur (AlGaAs/GaAs/AlGaAs-Heterostruktur) aufgebracht sind (a). Zunächst werden elektrische Anschlußkontakte zu den leitfähigen Kanälen durch einen lithographischen Arbeitsschritt und eine nachfolgende Metallbedampfung hergestellt (b). Um eine ohmsche Kontaktierung der leitfähigen Kanäle zu erhalten, werden die aufgedampften Metalle dazu thermisch in die Halbleiterstruktur einlegiert. Parallel dazu werden auf dem für den FAPS vorgesehenen Glas-Substrat (c) mit Standardlithographischen Methoden metallische Leiterbahnen als Gate-Elektroden abgeschieden (d). Nun wird die Quantentopfstruktur mit einer Schutzschicht überzogen (e). Sie dient einerseits als Schutz gegenüber der im folgenden Schritt verwendeten Flußsäure, andererseits als mechanische Verstärkung. Durch geeignete Ätzverfahren kann nun die Opferschicht entfernt werden (f), wobei die darüber befindliche Quantentopf-Struktur abgehoben und auf das Glas-Substrat mit den darauf erzeugten Gate-Elektroden aufgelegt werden kann (g). Dieses Verfahren wird als „epitaktischer lift-off“ bezeichnet. Bei der Verwendung einer GaAs/AlGaAs-Quantentopfstruktur wird als Opferschicht AlAs verwendet. Diese Schicht kann mit hoher Selektivität durch Flußsäure aufgelöst werden. Die so abgelöste und auf das Glassubstrat aufgelegte GaAs/AlGaAs-Quantentopfstruktur haftet aufgrund von van der Waals-Kräften. Dies hat den Vorteil, daß die abgehobene Schicht auch ohne Verwendung von Klebstoffen oder Haftvermittlern eine äußerst stabile mechanische Verbindung mit der Unterlage eingeht. In einem anschließenden Schritt wird die Schutzschicht entfernt (h). Abschließend muß die aufgelegte Quantentopfstruktur noch mit lithographischen Techniken strukturiert, d.h. die einzelnen leitfähigen Kanäle herausgeätzt werden.

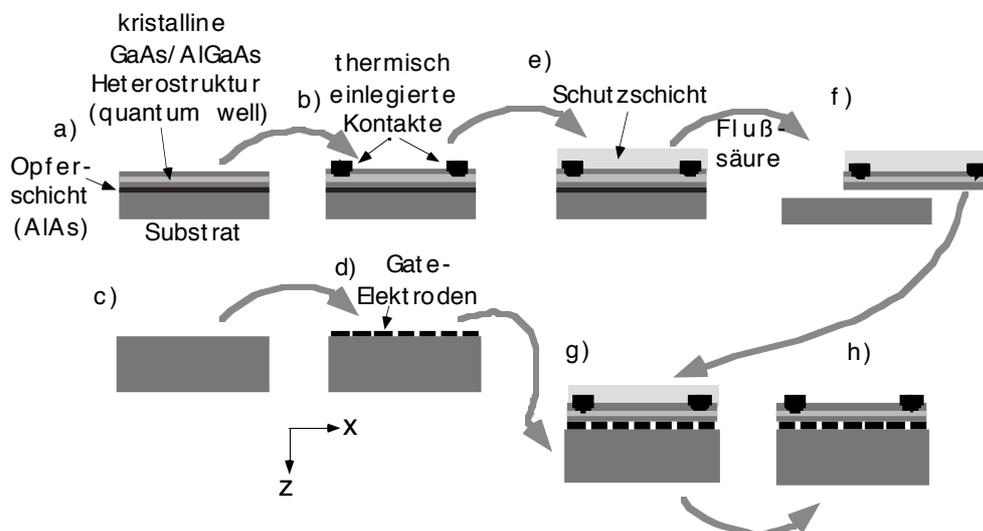


Abbildung 5.2.1: Herstellung einer FAPS-Struktur mit Hilfe der Technik des „epitaktischen lift-offs“.

5.3 Charakterisierung²

In Abb. 5.3.1 ist das Bild einer FAPS-Teststruktur aufgezeichnet. Es wurde dabei eine von der Firma Siemens hergestellte Quantentopfstruktur verwendet, welche aus einem 300 nm AlGaAs / 100 nm GaAs / 60 nm AlGaAs-Schichtsystem bestand, wobei die 60 nm dicke AlGaAs-Schicht der Steuerelektrode zugewendet war. An den beiden Grenzen zwischen AlGaAs und GaAs befand sich eine modulationsdotierte Si- δ -Schicht³ [173].

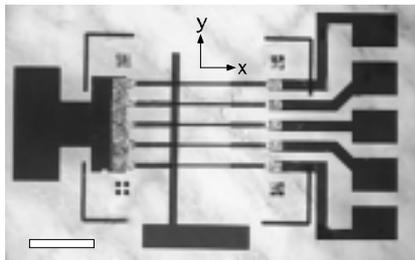


Abbildung 5.3.1: FAPS-Teststruktur bestehen aus einer Steuerelektrode und fünf leitfähigen Kanälen. Der Skalierungsbalken ist 1 mm lang. Mit der Technik des „epitaktischen lift-offs“ ist es möglich, derartige Strukturen auch im Mikrometer-Bereich herzustellen. Es sollte deshalb möglich sein, einen FAPS mit einer Ortsauflösung von nur wenigen Mikrometern aufzubauen.

Mit dieser Teststruktur wurde die Steuerbarkeit des Widerstandes R_c der leitfähigen Kanäle durch Anlegen einer Steuerspannung U_{bias} demonstriert, siehe Abb. 5.3.2. Dazu wurde ein konstanter Strom $I_c = 0,7 \mu A$ in den Kanal gespeist und die am Kanal abfallende Spannung U_c in Abhängigkeit des mit der Steuer-Elektrode eingestellten Potentials U_{bias} gemessen. Der Kanalwiderstand ist dann $R_c = U_c/I_c$. Bei einer Vorspannung $U_{bias} = -0,84 V$ betrug die maximale normalisierte Steigung der Kennlinie $|(dR_c/dU_{bias}) / R_c| \approx 21 V^{-1}$.

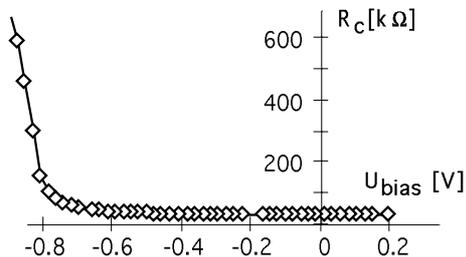


Abbildung 5.3.2: Kanalwiderstand R_c in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} , gemessen bei Raumtemperatur.

Damit wurde demonstriert, daß (i) FAPS-Strukturen mit der Technik des epitaktischen lift-offs realisierbar sind, (ii) der Widerstand der leitfähigen Kanäle in etwa proportional zum Kehrwert des auf ihn wirkenden Potentials ist und es damit Bereiche der Kennlinie gibt, in welchen R_c sehr empfindlich auf kleine Potentialänderungen reagiert und (iii) die maximale normalisierte Steigung der Kennlinie vergleichbar mit der von anderen Oberflächenpotential-Sensoren ist. Obwohl die Möglichkeiten des FAPS noch nicht umfassend charakterisiert worden sind, legen die in dieser Arbeit gemachten Messungen nahe, daß mit dem FAPS ein neuer Oberflächenpotential-Sensor entwickelt wurde, der sich gut zum Aufbau von Zell-Halbleiter-Hybriden eignen sollte.

² Die hier vorgestellte Teststruktur wurde von S. Böhm entwickelt und die Messungen damit von S. Böhm und M. George durchgeführt.

³ Die freien Elektronen dieser Schicht „fallen“ in den GaAs Quantentopf und füllen ihn damit mit freien Ladungsträgern.

6 Messungen an Zell-Halbleiter-Hybriden

6.1 Herzmuskelzellen¹

Mit Herzmuskelzellen wurden bereits erfolgreich Zell-Halbleiter-Hybride aufgebaut. So konnten an ihnen mit Mikroelektroden- [5, 175-179] und Feldeffekt-Transistor-Feldern [63, 134, 135] extrazellulärer Potentiale gemessen werden. Aufgrund der Höhe ihrer extrazellulären Potentiale von bis zu mehreren 100 μV und ihrem Durchmesser von einigen 10 μm , sollten an diesen Zellen auch extrazelluläre Potentiale mit dem LAPS meßbar sein, welcher bei einer Potentialempfindlichkeit von bis zu 80 μV bei einer Zeitauflösung von 0,3 ms eine Ortsauflösung von 20 μm ermöglicht². Diese Möglichkeit wird in diesem Kapitel untersucht.

(a) Messungen mit Feldeffekt-Transistor-Feldern³

Um die in dieser Arbeit verwendete Technik zur Kultur von embryonalen Hühner-Herzmuskelzellen auf oxidierten/nitridierten Silizium-Oberflächen zu überprüfen, wurde versucht an diesen Kulturen extrazelluläre Potentiale mit FET-Feldern zu messen und damit die Ergebnisse von Sprössler et al. an postnatalen Ratten-Herzmuskelzellen zu reproduzieren [135]. Dazu wurden embryonale Hühner-Herzmuskelzellen auf Fibronectin-beschichteten FET-Feldern ausgesät. Die Messungen wurden einen Tag nach der Präparation bei 37°C durchgeführt, vgl. Abb. 6.1.1. Ein mechanisches Pulsen der Zellen konnte dabei deutlich unter einem Mikroskop beobachtet werden.

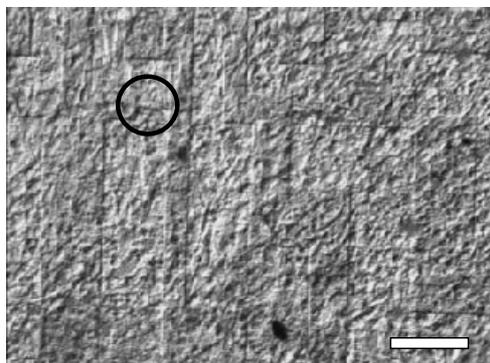


Abbildung 6.1.1: Kultur embryonaler Hühner-Herzmuskelzellen auf der Oberfläche eines FET-Feldes, aufgenommen 1 Tag nach der Präparation. Die Elektrodenstrukturen sind mit einem dichten Zellrasen bedeckt, so daß sie darunter kaum noch erkennbar sind. Der schwarze Kreis umrahmt eine identifizierbare Gate-Elektrode. Der weiße Balken entspricht 100 μm .

Im Rhythmus der Herzzell-Kontraktion wurden Änderungen im Drain-Source-Strom von $\Delta I_{\text{DS}} \approx 50 - 100 \text{ nA}$ beobachtet, welche Änderungen im extrazellulären Potential von $\Delta \Phi_{\text{S}} \approx 150 - 300 \mu\text{V}$ entsprechen. In Abb. 6.1.2 ist ein typisches Meßergebnis aufgezeichnet. Die Signale entsprachen dabei in etwa den von A. Offenhäuser und Mitarbeitern beschriebenen, obwohl dort auch teilweise viel höhere Signale gemessen werden konnten [63, 134, 135]. Damit wurde demonstriert, daß auch mit den in dieser Arbeit verwendeten Kulturen embryonaler Hühner-Herzmuskelzellen extrazelluläre Potentiale aufgenommen werden können.

¹ Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden in [174] zur Veröffentlichung eingereicht.

² Vgl. dazu die Ergebnisse aus Kap. 3 und Kap. 4.

³ Alle FET-Messungen wurden am Aufbau von Dr. A. Offenhäuser durchgeführt, vgl. auch [147, 148]. Die Zellpräparation wurde den Protokollen von Dr. M. Denyer nachvollzogen.

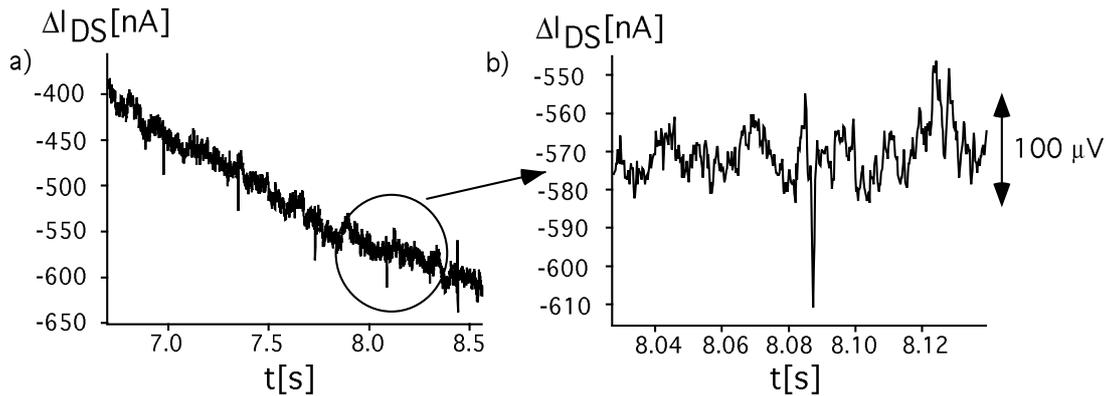


Abbildung 6.1.2: Zeitliche Variation des Drain-Source-Stroms ΔI_{DS} nach Abzug des konstanten Offsetstroms I_{DS}^{const} (≈ 1 mA) an einem FET, auf dessen Gate-Elektrode Herzmuskelzellen adhärirt waren, aufgenommen mit einer Abtastrate von 4 kHz. Als Betriebspunkt wurde $U_{DS} = -3V$ und $U_{bias} = U_{GS} = -3V$ gewählt. Die Steigung der Transfer-Kennlinie betrug dort $g_m = \Delta I_{DS}/\Phi_s = 300$ nA/mV. Je negativer der Drain-Source-Strom I_{DS} dabei war, um so negativer war das wirkende Oberflächenpotential Φ_s . a) Ausschnitt mit 5 sichtbaren Maxima und Minima im Drain-Source-Strom, welche durch Aktionspotentiale der auf der Gate-Elektrode sitzenden Zelle ausgelöst wurden. Deutlich zu sehen ist hier auch eine starke Drift. b) Ausschnitt aus a), welcher ein extrazelluläres Potential im Detail zeigt. Eine Änderung des extrazellulären Potentials von $100 \mu V$ entspricht dabei einem Drain-Source-Strom von $30 nA$.

(b) Messungen mit dem LAPS⁴

Alle Experimente wurden mit Silizium-Substraten (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mit einer aktiven Oberfläche von $A_{Akt} \approx 3$ mm² durchgeführt. Embryonale Hühner-Herzmuskelzellen wurden 1 bis 3 Tage vor den Messungen auf Fibronectin-beschichtete LAPS-Oberflächen gesiedelt. Um eine möglichst hohe Potentialempfindlichkeit zu erhalten, wurden alle Messungen mit der Differenzmeßmethode bei einer Zeitauflösung von 1 kHz mit einer Modulationsfrequenz von $f_L = 10$ kHz bei 37°C durchgeführt, vgl. Abb. 4.4.1. Dabei wurde mit einem Lichtzeiger mit Leistung $P_L \approx 1$ mW und Querschnittsfläche $A_L \approx 50 \mu m^2$ das Silizium-Substrat unter der zu untersuchenden Zelle beleuchtet, vgl. Abb. 6.1.3. Mit einem zweiten, defokussierten und um 180° zum ersten phasenverschobenen Lichtzeiger wurde ein großer Teil der LAPS-Oberfläche als Referenz beleuchtet. Während eines Experiments wurde der zeitliche Verlauf der Änderung des Photostroms ΔI_P aufgezeichnet und gleichzeitig die mechanische Kontraktion der Zellen mit einem optischen Mikroskop beobachtet⁵.

In den aufgezeichneten zeitlichen Verläufen der Photostromänderungen $\Delta I_P(t) = I_P(t) - I_P^{const}$ sind deutlich Maxima und Minima erkennbar, welche eindeutig mit den mechanischen Kontraktionen der Zellen korreliert waren, vgl. Abb. 6.1.4. Diese Maxima und Minima waren sowohl dann zu sehen, wenn die Vorspannung auf den Wendepunkt $U_{bias,WP}$ der Photostrom-Spannungs-Kurve ($I_P(U_{bias})$) eingestellt worden war, als auch bei sehr negativen

⁴ Die LAPS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit M. George und S. Kölblin gemacht, vgl. [147, 148].

⁵ Der detaillierte Aufbau der verwendeten Silizium-Substrate von „Typ 1A“ ist im Anhang Kap. 13.2 nachzulesen. Die Potentialempfindlichkeit der Photostrom-Spannungs-Kurve am Wendepunkt lag bei den hier vorgestellten Messungen um $100 - 200 \mu V$, die Ortsauflösung betrug in etwa $30-100 \mu m$. Aufgrund eines Skalierungsfehlers ist die genaue Amplitude der gemessenen Photoströme nicht mehr rekonstruierbar. Allerdings stimmt das Verhältnis aller Amplituden zueinander. Mit den zu Ende dieser Arbeit untersuchten Substraten vom „Typ 13B“ wäre eine noch bessere Potentialempfindlichkeit und Ortsauflösung möglich gewesen. Die hier gezeigten LAPS-Messungen wurden alle an dichten Rasen aus Herzmuskelzellen aufgenommen. Es wurden aber auch Messungen an einzelnen Herzmuskelzellen durchgeführt. Die Signale bei einzelnen Zellen sahen ähnlich aus, allerdings war die Kontraktionsfrequenz viel unregelmäßiger.

Vorspannungen $U_{\text{bias}} \ll 0$, bei welchen der LAPS weit im Inversions-Bereich war. Die am Wendepunkt der Photostrom-Spannungs-Kurve bestimmten Maxima und Minima würden Änderungen des Oberflächenpotentials von bis zu $500 \mu\text{V}$ entsprechen. In einigen Messungen traten Übergangsformen auf, wie der in Abb. 6.1.5 dargestellte Photostromverlauf, in welchem Maxima in Minima übergehen. Obwohl in den meisten Messungen während der Kontraktion der Herzmuskelzellen der Photostrom entweder ausgeprägte Maxima oder Minima, d.h. monophasisches Verhalten zeigte, wurden auch komplexere Kurvenformen aufgezeichnet, wie die in Abb. 6.1.6 gezeigten bi- und triphasischen Formen. Diese komplexen Formen traten immer nur kurzzeitig, einige zehn Sekunden lang auf.

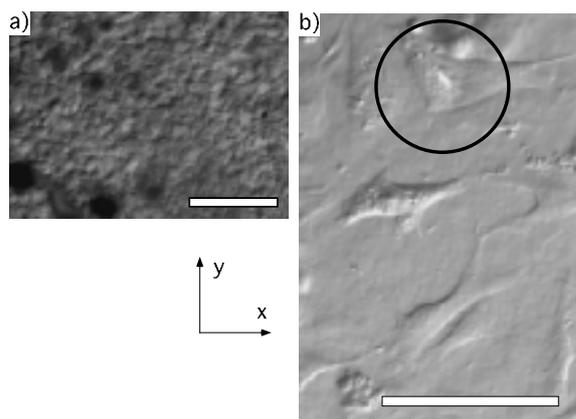


Abbildung 6.1.3: Photo von Herzmuskelzellen, welche auf der Oberfläche eines LAPS adhärirt sind. Der Skalierungsbalken entspricht dabei $100 \mu\text{m}$. a) Dichter Zellrasen. b) Verdünnte Kultur, bei welcher einzelne Zellen erkennbar sind. Der eingekreiste Bereich zeigt die Beleuchtung des LAPS-Wafers unter der zu untersuchenden Zelle mit dem Lichtzeiger.

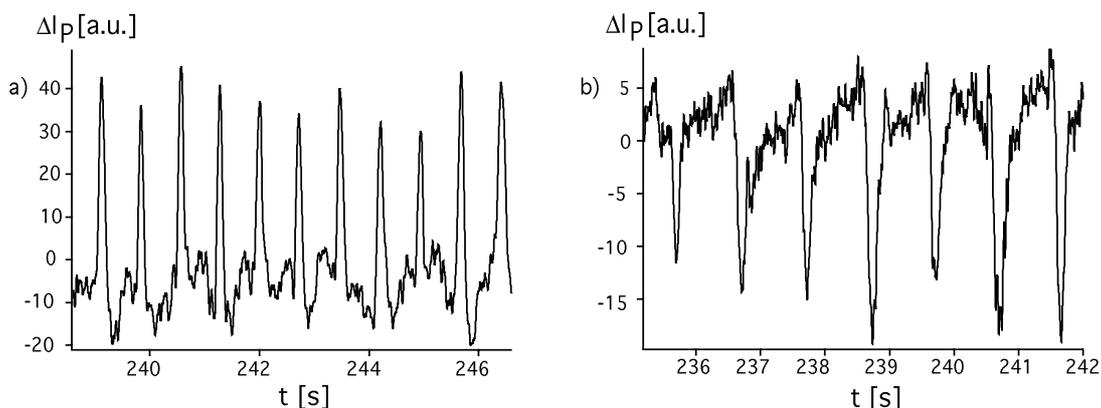


Abbildung 6.1.4: Zeitlicher Verlauf des Photostroms $\Delta I_P(t)$, nach Abzug des konstanten Offsets, bei Beleuchtung von Herzmuskelzellen, die auf der Oberfläche des LAPS adhärirt waren. Der konstante Offset-Photostrom betrug dabei um $I_P^{\text{const}} = 10000 - 20000 \text{ a.u.}$ a) Photostromverlauf mit Maxima, welche mit der Herzzell-Kontraktion korreliert waren. b) Photostromverlauf mit Minima, welche mit der Herzzell-Kontraktion korreliert waren.

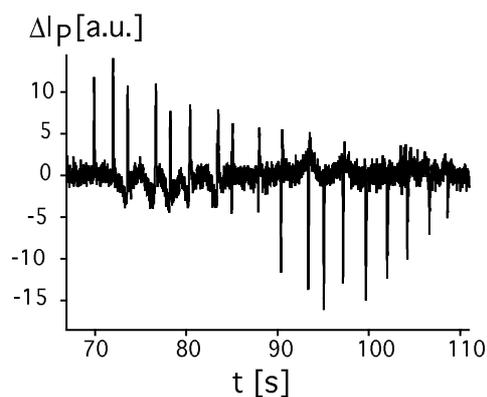


Abbildung 6.1.5: Zeitlicher Verlauf des Photostroms $\Delta I_P(t)$, nach Abzug des konstanten Offsets bei Beleuchtung von Herzmuskelzellen, die auf der Oberfläche des LAPS adhärirt waren. Der konstante Offset-Photostrom betrug dabei um $I_P^{\text{const}} = 10000 - 20000 \text{ a.u.}$ Gezeigt ist ein Beispiel, bei welchem sich die Herzzell-Kontraktion zunächst in Maxima und fließend übergehend in Minima im Photostromverlauf zeigte.

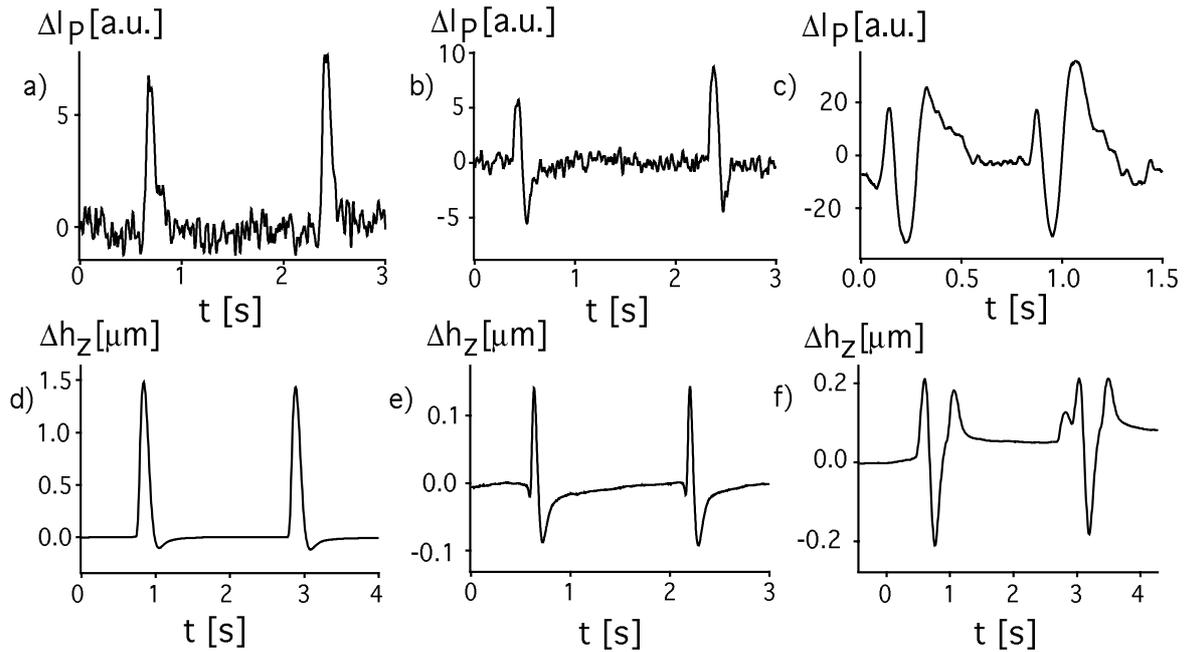


Abbildung 6.1.6: Vergleich des zeitlichen Verlaufs des mit dem LAPS aufgezeichneten Photostroms $\Delta I_P(t)$ (a-c) und der mit dem AFM gemessenen Zellhöhe $\Delta h_Z(t)$ (d-f) an kontrahierenden Herzmuskelzellen. Gezeigt sind Beispiele mit mono- (a, d), bi- (b, e) und triphasischem (c, f) Verlauf.

(c) Messungen mit dem AFM⁶

Um die Vermutung zu überprüfen, daß die mit dem LAPS aufgenommenen Signale auch eine durch mechanische Kontraktion verursachte Komponente enthalten, wurde die mechanische Ausdehnung von Herzmuskelzellen während ihrer Kontraktion mit dem Rasterkraft-Mikroskop (AFM) untersucht [180]. In Abb. 6.1.6 sind Beispiele für die Änderung der Zellhöhe $\Delta h_Z(t)$ während der Zellkontraktion aufgezeichnet. Meistens wurde ein monophasisches Verhalten beobachtet, bei welchem sich die Höhe um $\Delta h_Z \approx 200 - 1900 \text{ nm}$ änderte. Es traten aber auch bi- und tri-phasische Kurvenformen auf.

Zum Vergleich der monophasischen Kurvenformen, welche bei LAPS und AFM-Experimenten aufgenommen wurden, wurden wie in Abb. 6.1.7 gezeigt neue Parameter eingeführt: Die allgemeine Auslenkung Δs steht dabei in den LAPS-Experimenten für Änderungen des Photostroms ΔI_P und in den AFM-Experimenten für Änderungen der Zellhöhe Δh_Z . Die charakteristischen Auslenkungen („peaks“) der Kurven werden durch ihre maximale Höhe Δs_{max} und ihre maximale Steigung während des An- und Abstiegs $d\Delta s_{\text{Anst}}/dt$ bzw. $d\Delta s_{\text{Abf}}/dt$ beschrieben. Um Einheiten-freie Werte zu erhalten, wurden die Steigungen auf die maximale Auslenkung normiert. Die Werte $t_{\text{Anst}} = [(d\Delta s_{\text{Anst}}/dt) / \Delta s_{\text{max}}]^{-1}$ und $t_{\text{Abf}} = [(d\Delta s_{\text{Abf}}/dt) / \Delta s_{\text{max}}]^{-1}$ sind ein Maß dafür, wie lange der Anstieg bzw. der Abfall einer Auslenkung dauert. Der zeitliche Verlauf der Auslenkungen wurde zusätzlich durch Bestimmung ihrer Halbwertsbreite t_{fwhm} und Periode t_p analysiert. Die Ergebnisse dazu sind in Tab. 6.1.1 zusammengestellt.

⁶ Die AFM-Messungen wurden von J. Domke durchgeführt, vgl. [147, 180].

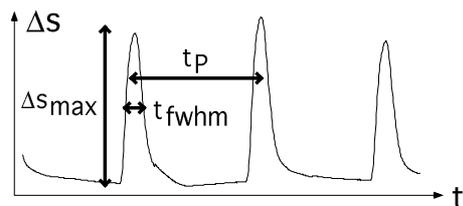


Abbildung 6.1.7: Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs $\Delta s(t)$ einer Kurve mit periodischen Auslenkungen anhand ihrer maximalen Amplitude Δs_{max} , ihrer Periodizität t_p und der Breite der Auslenkungen t_{fwhm} .

	LAPS: $\Delta s \rightarrow \Delta I_P$ (n=8)	AFM $\Delta s \rightarrow \Delta h_Z$ (n=21)
Δs_{max}	30 - 270 [a.u.]	0.2 - 1.9 μm
$d\Delta s_{Anst}/dt$	300 - 5000 [a.u./s]	2 - 65 $\mu\text{m/s}$
$d\Delta s_{Abf}/dt$	200 - 4000 [a.u./s]	1 - 37 $\mu\text{m/s}$
t_p	0.85 ± 0.14 s	1.2 ± 0.6 s
t_{fwhm}	0.16 ± 0.02 s	0.13 ± 0.05 s
t_{Anst}	57 ± 14 ms	43 ± 14 ms
t_{Abf}	72 ± 11 ms	77 ± 18 ms
t_{Anst}/t_{Abf}	0.80 ± 0.20	0.58 ± 0.18

Tabelle 6.1.1: Experimentell bestimmte Werte verschiedener Parameter aus den mit dem LAPS aufgenommenen Photostromkurven ΔI_P und mit dem AFM aufgenommenen Höhenkurven Δh_Z . Δs ist dabei als generalisierte Auslenkung definiert, welche entweder ΔI_P oder Δh_Z entspricht. Angegeben sind die Werte für die maximale Amplitude der Auslenkungen Δs_{max} , die maximale Steigung während der Anstiegs- ($d\Delta s_{Anst}/dt$) und Abfallphase ($d\Delta s_{Abf}/dt$), die Periodizität des Herzschlags t_p und die Halbwertsbreite der „peaks“ t_{fwhm} . Als normierte Werte sind die Anstiegszeit $t_{Anst} = [(d\Delta s_{Anst}/dt) / \Delta s_{max}]^{-1}$ und Abfallszeit $t_{Abf} = [(d\Delta s_{Abf}/dt) / \Delta s_{max}]^{-1}$ der „peaks“ angegeben und zusätzlich deren Verhältnis t_{Anst}/t_{Abf} . Die Werte sind als Mittelwert aus n Messungen \pm ihrer Standardabweichung angegeben.

(d) Diskussion

Die auf LAPS-Wafern kultivierten Herzmuskelzellen zeigten das typische Verhalten, wie es in Standard-Protokollen veröffentlicht wurde [55]. Bereits nach einem Tag in Kultur starteten die Zellen von selbst mit periodischer Kontraktion. Es ist bekannt, daß die mechanische Kontraktion von Herzmuskelzellen durch Aktionspotentiale ausgelöst wird [53], d.h. jeder mechanischen Ausdehnung muß ein elektrisches Signal vorhergegangen sein. Mit dem LAPS sollten daher extrazelluläre Potentiale zu messen sein.

Die in den Photostrom-Messungen beobachteten Maxima und Minima waren in Koinzidenz mit mechanischer Kontraktion der Zellen. Bei sehr negativen Vorspannungen $U_{bias} \ll 0$ ist die Steigung der Photostrom-Spannungs-Kurve sehr klein, $dI_P/dU_{bias} \rightarrow 0$, und der Photostrom wird dort praktisch nicht von Potentialänderungen beeinflusst. Da die während der Kontraktion beobachteten Extrema sowohl am Wendepunkt, als auch bei sehr negativen Vorspannungen in vergleichbarer Größenordnung beobachtet wurden, können sie nicht mit Änderungen im extrazellulären Potential der untersuchten Zellen erklärt werden. Vielmehr müssen sie maßgeblich durch einen anderen Effekt verursacht worden sein.

Als Folge seiner Intensitätsabhängigkeit hängt der Photostrom bei konstanter Leistung P_L von der Querschnittsfläche des Lichtzeigers A_L ab. Die Maxima und Minima in den Photostromkurven könnten deshalb durch Intensitätsänderungen des Lichtzeigers während der mechanischen Kontraktion der Herzmuskelzellen verursacht worden sein. Eine Hypothese dazu ist, daß die Zellen als optische Linse wirken, wodurch sie bei ihrer Kontraktion und Relaxation den Lichtzeiger fokussieren bzw. defokussieren. Wäre der Lichtzeiger gut auf die Oberfläche des LAPS fokussiert, würde er bei einer Kontraktion der Zellen defokussiert werden, wodurch ein höherer Photostrom fließen würde. Dies würde die Kurven erklären, in

denen Kontraktion der Zellen mit einem Maximum im Photostrom einher geht, vgl. Abb. 6.1.4.a. Bei einem leicht defokussierten Lichtzeiger könnte Kontraktion der Zellen umgekehrt einen fokussierenden und damit Intensitäts-erhöhenden Effekt bewirken. Dies würde bei Kontraktion der Zellen Minima im Photostrom erzeugen, vgl. Abb. 6.1.4.b. Mit solch einer Hypothese wären also sowohl Photostromkurven mit Minima, als auch mit Maxima erklärbar. Eine andere Möglichkeit wäre auch, daß bei der Zellkontraktion der Brechungsindex im Inneren der Zelle variiert und somit ebenfalls die Intensität des Lichtzeigers verändert würde. Da derartige, durch mechanische Kontraktion der Zellen hervorgerufene, mechano-optische Effekte unabhängig von der Vorspannung sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß sie Ursache für die gemessenen Maxima und Minima im Photostrom sind. Änderungen des Photostroms aufgrund von Änderungen des extrazellulären Potentials wären dadurch dann verdeckt.

Um diese Hypothese weiter zu testen, wurde die mechanische Ausdehnung von Herzmuskelzellen mit dem AFM untersucht. Während der Depolarisationsphase des Aktionspotentials werden in Herzmuskelzellen Ca^{2+} -Ionen freigesetzt, welche eine Kontraktion und damit Verkürzung der Zelle parallel zu ihrer Unterlage bewirken. Bei Erhaltung des Zellvolumen, muß dabei die Zellhöhe h_z zunehmen. In der nachfolgenden Repolarisationsphase werden die Ca^{2+} -Ionen wieder vom sarcoplasmatischem Reticulum in der Zelle aufgenommen und die Zelle entspannt zu ihrer Ruhe-Länge l_z und Ruhe-Höhe h_z . Längenänderungen Δl_z der Zelle in der x-y-Ebene können mit einem Lichtmikroskop beobachtet werden. Im Gegensatz dazu mißt das AFM Änderungen in der Zellhöhe Δh_z , d.h. Bewegung senkrecht zu x-y-Ebene. In dieser Arbeit wurden mit dem AFM Höhenänderungen bis zu $\Delta h_z = 2 \mu\text{m}$ gemessen, die mittlere Höhenänderung war $\Delta h_z \approx 0.4 \mu\text{m}$, was in guter Übereinstimmung mit Messungen anderer Gruppen liegt⁷. Ein Vergleich mit der mittleren absoluten Zellhöhe von $h_z = 2,89 \pm 0,69 \mu\text{m}$ zeigt, daß die Zellhöhe während Kontraktion im Mittelwert um $\Delta h_z/h_z \approx 13 \%$ zunimmt. Dieser Wert liegt in der selben Größenordnung wie die mittlere Abnahme der Zell-Länge während Kontraktion, siehe Tab. 6.1.2. Dies läßt darauf schließen, daß das Zellvolumen während Kontraktion und Dekontraktion erhalten bleibt.

Ein Vergleich der mit dem LAPS gemessenen monophasischen Maxima und Minima im Photostrom mit den mit dem AFM gemessenen monophasischen Maxima in der Zellhöhe während der Kontraktion der Zellen zeigt eine akzeptable Übereinstimmung, vgl. Tab. 6.1.1. Dies ist starker Hinweis, daß mit beiden Techniken der selben Effekt, Änderung der Zellform während Kontraktion, gemessen wurde.

Wie in Abb. 6.1.5 zu sehen ist, wechselte während Photostrom-Messungen manchmal die Richtung der durch Zellkontraktion verursachten Extrema. In Abb. 6.1.6 sind dazu verschiedene Kurvenformen gegenübergestellt, welche mit dem LAPS und dem AFM aufgenommen wurden. Meistens zeigten sowohl die LAPS Photostrom-, als auch die AFM Auslenkungs-Kurven ein monophasisches Verhalten. Mit beiden Meßmethoden wurden aber auch bi- und triphasische Signale beobachtet. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Änderungen des LAPS-Photostroms durch Änderungen in der Zellform verursacht worden sind.

⁷ Shroff et. al. [181] geben in Abhängigkeit der Calcium-Konzentration folgende Werte für aus erwachsenen Ratten präparierte Herzmuskelzellen an: $\Delta h_z = 0,52 \pm 0,13 \mu\text{m}$ für $c(\text{Ca}^{2+}) = 1,8 \text{ mM}$ und $\Delta h_z = 0,47 \pm 0,11 \mu\text{m}$ für $c(\text{Ca}^{2+}) = 5 \text{ mM}$.

Referenz	Untersuchtes Gewebe	$\Delta h_z/h_z$ [%]	$c(\text{Ca}^{2+})$ [mM]	$t_{\text{Anst}}/t_{\text{Abf}}$	t_{Anst} [ms]	t_{Abf} [ms]
diese Arbeit (LAPS)	Zellen aus Hühnerembryos (7-9d)	-	1.8	0.80	57	72
diese Arbeit (AFM)	Zellen aus Hühnerembryos (7-9d)	13	1.8	0.58	43	77
Referenz	Untersuchtes Herzmuskel-Gewebe	$\Delta l_z/l_z$	$c(\text{Ca}^{2+})$ [mM]	$t_{\text{Anst}}/t_{\text{Abf}}$	t_{Anst} [ms]	t_{Abf} [ms]
[182]	Zellen aus Hühnerembryos (11d)	-	1.8	0.94	-	-
[183]	Zellen aus erwachsenen Ratten	12	1	0.73	58	78
[183]	Zellen aus erwachsenen Ratte	-	8	0.74	58	78
[184]	ganze Herzen aus erwachsenen Ratten	-	1.35	0.65	-	-
[184]	ganze Herzen aus erwachsenen Ratten	-	3.5	0.60	-	-
[183]	Zellen aus erwachsenen Kaninchen	13	1	1,0	75	74
[183]	Zellen aus erwachsenen Kaninchen	-	8	1.3	87	68
[74]	Zellen aus erwachsenen Kaninchen	19	0.5	-	98	-
[74]	Zellen aus erwachsenen Kaninchen	19	1	-	36	-
[185]	Zellen aus erwachsenen Meerschweinchen	2-10	3,6	1.2	-	-

Tabelle 6.1.2: Literaturwerte zur Messungen der Längenänderung von Herzmuskelzellen Δl_z während mechanischer Kontraktion, aufgenommen mit Video-Mikroskopie und digitaler Bildverarbeitung. Alle zitierten Experimente wurden bei einer Temperatur von 37°C unter verschiedenen Calcium-Konzentrationen $c(\text{Ca}^{2+})$ durchgeführt, l_z gibt die Ruhelängen der Zellen an. Der Auslenkungsparameter Δs entspricht hier Δl_z und die Definition der Anstiegs- und Abfallszeiten ist analog zu den vorher definierten.

Eine Möglichkeit die bi- und triphasischen Signale zu erklären ist, sie einer Bewegung der Zellen parallel zur Oberfläche des Substrats zuzuordnen [147, (S.95)]. Übergänge zwischen den einzelnen Signalformen könnten dann durch langsame Zellbewegung und Morphologieänderungen der Zelle auf dem Substrat erklärt werden, d.h. auf einer längeren Zeitskala als die Dauer einzelner Aktionspotentiale. So ist aus Video-mikroskopischen Messungen bekannt, daß Herzmuskelzellen eine langsame Dynamik in der Substratebene besitzen, welche unabhängig von der schnellen Dynamik der rhythmischen Kontraktion ist [174].

Ähnliche Übergänge zwischen einzelnen Signalformen mit mono-, bi- und triphasischem Charakter wurden von anderen Gruppen in Messungen des extrazellulären Potentials von Herzmuskelzellen beobachtet [5, 175-179, 186, 187]. Diese Dynamik könnte eventuell auch

mit langsamer Zellbewegung auf der Oberfläche des Potentialsensors erklärt werden. So wäre es denkbar, daß Zellen sich von der Gate-Elektrode eines FETs wegbewegen und dadurch die Kopplungsparameter verändern. Hinweis dazu sind in Video-Mikroskopie-Experimenten zu finden die zeigen, daß Herzmuskelzellen ihre Morphologie auf einer Zeitskala ändern, welche viel länger als die Periode ihrer Kontraktion ist. In dieser Arbeit wurde mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) -Messungen gefunden, daß die Unterseite von Herzmuskelzellen während deren Kontraktion mit dem Substrat verbunden bleibt. Dies legt nahe, daß bei Messungen des extrazellulären Potentials die Kurzzeitdynamik im Bereich der Dauer eines einzelnen Aktionspotentials während der Zellkontraktion nicht durch Bewegung oder Morphologieänderung entlang der Substratebene beeinflusst wird. Die Langzeitdynamik könnte aber sehr wohl für die Übergängen zwischen unterschiedlichen Kurvenformen verantwortlich sein, welche bei Messungen extrazellulärer Potentiale mit extrazellulären Mikroelektroden gefunden wurden.

Die in diesem Kapitel gefundenen Resultate legen nahe, daß die mit dem LAPS aufgezeichneten Maxima und Minima im Photostrom durch mechano-optische Effekte, wie Intensitätsänderungen des Lichtzeigers aufgrund der rhythmischen Zellkontraktion, verursacht worden sind. Dadurch wurden Änderungen des Photostroms durch Änderungen des extrazellulären Potentials während Aktionspotentialen verdeckt. Für den in dieser Arbeit vorgestellten LAPS-Aufbau sind Herzmuskelzellen deshalb aufgrund ihrer mechanischen Kontraktion kein geeignetes Zellsystem zur Messung extrazelluläre Potentiale. Eine Alternative wäre ein LAPS-System bei welchem von hinten, also nicht durch die Zellen hindurch beleuchtet wird. Für unbewegliche Zellen wie Neurone, sollten mechano-optische Effekte aber keine Rolle spielen.

6.2 Synoviale Fibroblasten⁸

Zell-Halbleiter-Hybride in denen die Kommunikation zwischen Zellen und Sensor über eine elektrische Schnittstelle abläuft sind nur mit elektrisch aktiven Zellen sinnvoll. Um dennoch mit Zellen ohne elektrische Aktivität kommunizieren zu können, muß eine anders geartete Schnittstelle verwendet werden. Das Cytosensor-Mikrophysiometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ist ein nach dem Prinzip des LAPS arbeitendes Gerät, welches empfindlich pH-Werte mißt [2, 145, 190]. Zellen scheiden in ihrem Stoffwechsel „saure“ Produkte, wie Milchsäure, Kohlendioxid oder Protonen aus [3] und erniedrigen dabei den pH-Wert ihrer Umgebung. Werden Zellen auf der Oberfläche eines LAPS kultiviert, sind damit Untersuchungen des Stoffwechsels von Zellen über Messung der Ansäuerungsrate, d.h. der Geschwindigkeit mit welcher „saure“ Moleküle von den Zellen ausgeschieden werden, möglich.

Für viele Untersuchungen mit Zellen ist es wichtig, eine ausreichende Zahl von Zellen zur Verfügung zu haben. Da dies bei Primärkulturen problematisch ist, werden aus einem Organismus entnommene Zellen oft durch Einsetzen eines Krebsgens („Vektor“) zu Zell-Linien transformiert. Es gilt aber zu klären, ob bei dieser Transformation die Rezeptoren der Zelle erhalten bleiben. Dazu wurden Zellen aus dem Knie von Rheuma-Patienten („synoviale Fibroblasten“) und die dazugehörige, durch SV40-Vektor Transformation erzeugte Zell-Linie untersucht. Mit Hilfe des Cytosensor-Mikrophysiometers wurde dazu die Reaktion des Zellstoffwechsels auf die Zugabe verschiedener Testsubstanzen verglichen⁹.

In Abb. 6.2.1 ist die Reaktion der Zellen auf zwei verschiedene Stimuli dargestellt. So reagierten primäre Zellen auf die Zugabe von IL-1 durch Aktivierung ihres Stoffwechsels, nicht aber SV40-transformierte Zellen. Dagegen war die Antwort des Zellstoffwechsels bei primären und transformierten Zellen auf die Zugabe von Phorbolsäureester vergleichbar. Es zeigt sich, daß bei einer SV-40-Vektor-Transformation nicht alle Eigenschaften der Primärzellen konserviert bleiben. Das Cytosensor-Mikrophysiometer, d.h. pH-Messungen von Zellen, die auf der Oberfläche eines Potential-Sensors fixiert sind, bietet also eine gute Möglichkeit, die Reaktion von Zellen auf verschiedene Wirkstoffe zu testen.

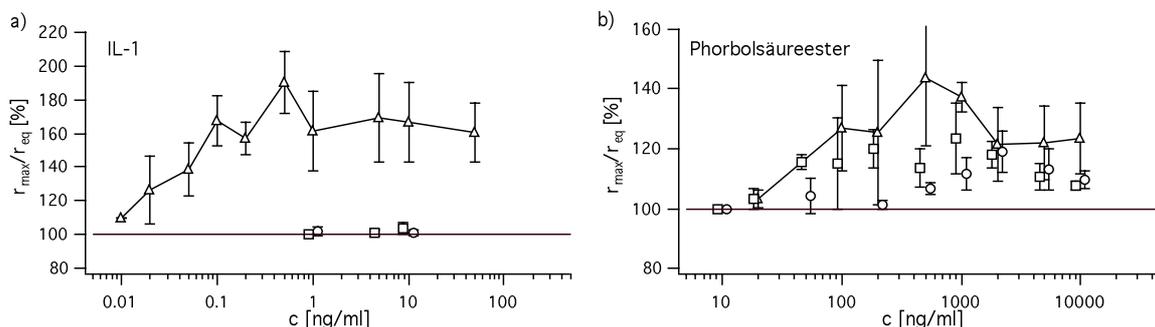


Abbildung 6.2.1: Maximale Ansäuerungsrate von Zellen r_{\max} bei Zugabe eines Wirkstoffes der Konzentration c , normiert auf die Ansäuerungsrate von Zellen ohne Wirkstoff-Zusatz r_{eq} . Die Dreiecke entsprechen dabei Messungen an primären Zellen, Die Kreise und Quadrate Messungen an Zell-Linien. a) Zwar reagieren primäre Zellen auf Zugabe von IL-1, nicht aber SV40-transformierte Zellen. b) Sowohl primäre, als auch SV40-transformierte Zellen aktivieren ihren Stoffwechsel bei Zugabe von Phorbolsäureester.

⁸ Die Ergebnisse aus diesem Kapitel wurden in [188, 189] veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht. Das Projekt wurde in Kooperation mit Dr. W. Aicher und Dr. O. Müller von der Orthopädischen Uniklinik Tübingen durchgeführt. Ein Teil der Messungen wurde von S. Dannöhl [82] und M. George, die SV40-Transformation im Labor von Dr. W. Aicher durchgeführt.

⁹ Die detaillierte Versuchsdurchführung ist im Anhang Kap. 11.6 beschrieben [82].

7 Ausblick

7.1 Vergleich verschiedener Oberflächenpotential-Sensoren

Wie in Abb. 7.1.1 zusammengefaßt ist, werden drei verschiedene physikalische Prinzipien dazu benutzt, um Oberflächenpotentiale in wäßriger Lösung zu messen: (i) direkte Spannungsmessung, (ii) Strommessung senkrecht zur Raumladungszone und (iii) Strommessung parallel zur Raumladungszone. Zu jedem der drei Prinzipien gibt es realisierte Bauelemente, welche im folgenden als „2-dimensionale“ Ausführung bezeichnet werden. Eine Ortsauflösung kann dabei dadurch erreicht werden, in dem ein Sensor mit vielen gleichen, parallel betriebenen Bauelementen aufgebaut wird. Die Oberfläche jedes einzelnen Bauelements entspricht dann einer aktiven Meßposition. Für jede aktive Meßposition, d.h. z.B. für jeden einzelnen FET innerhalb eines FET-Feldes, ist dabei mindestens eine Zuleitung notwendig. Für N_{Akt} aktive Meßpositionen werden damit $N_{\text{Zu}} = N_{\text{Akt}}$ Zuleitungen benötigt. Da aufgrund eingeschränkter Platzverhältnisse nicht beliebig viele Zuleitungen auf einer planaren Oberfläche möglich sind, ist in der Praxis die Zahl aktiver Meßpositionen beschränkt. Derartige Anordnungen werden in dieser Arbeit als „2-dimensional“ bezeichnet, da die Zuleitungen zu den aktiven Meßpositionen sowohl in x-, als auch in y- Richtung geführt werden müssen. Bei FET- und Mikroelektroden-Feldern sind 100 aktive Meßpositionen üblich¹. Dabei ist die Größe einer aktiven Meßposition, z.B. einer Gate-Elektrode in einem FET-Feld, einige Quadratmikrometer und die aktiven Meßpositionen sind üblicherweise einige 10 μm voneinander entfernt. Es gibt auf der Oberfläche derartiger Sensoren deshalb viele Stellen, an welchen kein Potential gemessen werden kann.

In dieser Arbeit wurde an Hand von 2 Beispielen beschreiben, wie durch Veränderung der Geometrie eines Sensors mit demselben physikalischen Prinzip eine erhöhte Anzahl aktiver Meßpositionen möglich ist. Im folgenden werden dazu Oberflächenpotential-Sensoren in „1-“ und „2-dimensionaler“ Ausführung miteinander verglichen.

(i) Direkte Spannungs-Messung: Mit Mikroelektroden werden Potentialfluktuationen $\Delta\Phi_S$ an ihrer Oberfläche direkt als Spannungsfluktuationen $\Delta U(\Delta\Phi_S)$ gemessen. In „2-dimensionaler“ Ausführung, sogenannten Mikroelektroden-Feldern, können mit diesem Prinzip dann Potentialfluktuationen $\Delta\Phi_S$ an allen individuellen aktiven Meßpositionen gemessen werden [31, 39, 137, 191, 192], wofür $N_{\text{Zu}} = N_{\text{Akt}}$ Zuleitungen benötigt werden. In sogenannten Licht-adressierbaren Mikroelektroden-Feldern sind die aktiven Meßpositionen jeder Reihe eines Mikroelektroden-Feldes zu einer einzigen Bahn zusammengefaßt und der Ort der Messung kann innerhalb einer Bahn durch einen Lichtzeiger ausgewählt werden [193]. Die Zahl der nötigen Zuleitungen skaliert deshalb nur noch mit der Wurzel der aktiven Meßpositionen²: $N_{\text{Zu}} = (N_{\text{Akt}})^{1/2}$. Da alle Zuleitungen jetzt parallel, z.B. in x-Richtung verlaufen können, wird diese Anordnung hier als „1-dimensionale“ Geometrie bezeichnet³.

¹ Es sind bereits Mikroelektroden-Felder mit einigen 1000 Meßpositionen in der Erprobung.

² Während für ein Feld mit 10000 aktiven Meßpositionen bei konventionellen („2-dimensionalen“) Mikroelektroden-Feldern 10000 Zuleitungen nötig sind, werden bei („1-dimensionalen“) Licht-adressierbaren Mikroelektroden-Feldern nur 100 Zuleitungen benötigt.

³ Eine nähere Beschreibung von Mikroelektroden-Feldern ist im Anhang Kap. 9.1 nachzulesen.

(ii) Strommessung senkrecht zur Raumladungszone: In Elektrolyt-Isolator-Halbleiter- (EIS) Strukturen ist die Verteilung der Ladungsträger im Halbleiter und damit die Ausbildung einer Raumladungszone Potential-abhängig. Bei konstanter Vorspannung kann durch eine Messung des Stroms I senkrecht durch die Raumladungszone, d.h. parallel zur z -Achse, deren Form bestimmt werden. Potentialfluktuationen $\Delta\Phi_S$ auf der Oberfläche können somit als Stromfluktuationen $\Delta I(\Delta\Phi_S)$ gemessen werden. In EIS-Dioden wird dazu an die EIS-Struktur eine Wechselspannung angelegt und Potentialfluktuationen $\Delta\Phi_S$ werden über den gemessenen Strom als Kapazitätsfluktuationen $\Delta C_{\text{EIS}}(\Delta\Phi_S) \propto \Delta I_{\text{EIS}}(\Delta\Phi_S)$ bestimmt. Ortsauflösende Sensoren in „2-dimensionalen“ Ausführung bestehen dann aus vielen, parallel betriebenen EIS-Dioden [194] und die Zahl der dazu nötigen Zuleitungen ist $N_{\text{Zu}} = N_{\text{Akt}}$. In dieser Arbeit wurde beschrieben, wie auch durch Beleuchtung einer EIS-Struktur mit einem modulierten Lichtzeiger Oberflächenpotentiale gemessen werden können [145, 195, 196]. In dem sogenannten LAPS ist der Licht-generierte Photostrom $I_p(\Delta\Phi_S)$ sensitiv auf Änderungen im Oberflächenpotential $\Delta\Phi_S$ und die Ortsauflösung wird durch Auswahl der Meßposition mit dem Lichtzeiger erreicht [157]. In dieser „1-“ bzw. genau genommen „0-dimensionalen“ Geometrie ist nur ein einziger Anschluß⁴ nötig, d.h. $N_{\text{Zu}} = 1$.

(iii) Strommessung parallel zur Raumladungszone: Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Raumladungszone und damit der Widerstand eines senkrecht dazu liegenden halbleitenden Kanals variiert (Feldeffekt-Prinzip). Potentialfluktuationen $\Delta\Phi_S$ können dann als Widerstandsfluktuationen $\Delta R(\Delta\Phi_S)$ des Feldeffekt-Kanals durch Messung des Stroms parallel zur Raumladungszone, d.h. in der x - y -Ebene, detektiert werden. Bei Feldeffekttransistoren (FET) wird der Widerstand des zwischen Source- und Drain-Anschluß liegenden Kanals durch Messung des Stroms I_{DS} bestimmt⁵ [153, 197-203]. In Feldeffekttransistor-Feldern werden in „2-dimensionalen“ Ausführung $N_{\text{Zu}} = N_{\text{Akt}}$ Zuleitungen benötigt. In dieser Arbeit wurde ein Konzept aufgestellt, welches die Ausnutzung des Feldeffekt-Prinzips für Oberflächenpotential-Messungen in „1-dimensionalen“ Geometrie ermöglicht [143, 161, 162]. Durch geteilte Benutzung von Gate-Elektroden und Feldeffekt-Kanälen, kann hier ebenfalls die Zahl der nötigen Zuleitungen reduziert werden, $N_{\text{Zu}} = 2 \cdot (N_{\text{Akt}})^{1/2}$.

Durch Änderung des geometrischen Aufbaus verschiedener Sensor-Familien kann also die Zahl der nötigen Zuleitungen drastisch reduziert werden kann. Da dadurch eine erhöhte Anzahl aktiver Meßpositionen ermöglicht wird, kann somit die Ortsauflösung erhöht werden. Dies bietet insbesondere für das Ziel extrazelluläre Potentiale zu messen deutliche Vorteile. Es stellt sich nun die Frage, ob die Verbesserung der Ortsauflösung durch einen Verlust in der Potentialempfindlichkeit erkaufte werden muß. Der Grundgedanke einer Reduktion von „2-dimensionalen“ zu „1-dimensionalen“ Geometrie ist die Zusammenfassung mehrere aktiver Meßpositionen zu einer Anordnung, welche mit nur einer Leiterbahn „verdrahtet“ werden kann. Dabei wird zwangsweise die Oberfläche des mit dieser Leiterbahn verknüpften Bereichs vergrößert. Eine Oberflächenvergrößerung ist aber mit einer Vergrößerung der Streukapazität verbunden. Dieses Verhalten wurde klar am Beispiel des LAPS demonstriert. Beim FAPS wird vermutlich das gleiche Verhalten auftreten. Der Übergang von „2-“ zu „1-dimensionalen“ Geometrie verbessert damit zwar die Ortsauflösung eines Sensors, dessen

⁴ neben der für alle Sensoren benötigten Referenz-Elektrode.

⁵ Eine nähere Beschreibung von Feldeffekttransistor-Feldern ist im Anhang Kap. 9.2 nachzulesen.

Potentialempfindlichkeit bleibt dabei aber bestenfalls erhalten und wird vermutlich sogar etwas schlechter werden.

Es ist auf jeden Fall spätestens seit den Arbeiten von Gross und Frommherz eindeutig bewiesen, daß extrazelluläre Potentiale mit Oberflächenpotential-Sensoren gemessen werden können. Während die Ortsauflösung des in dieser Arbeit entwickelten LAPS-Aufbaus ausreichend ist, muß vor allem seine Potentialempfindlichkeit verbessert werden, um die Chancen extrazelluläre Potentiale messen zu können zu erhöhen. Die Eignung des FAPS zur Messung extrazellulärer Potentiale kann erst nach genauerer Charakterisierung beurteilt werden. Um seine Potential-Empfindlichkeit grob abzuschätzen, können die normierten Steigungen der Kennlinien verschiedener Sensoren verglichen werden. Je nach Dotierung wurde für den LAPS $(dI_p/dU_{bias}) / I_p \approx 1 - 7 \text{ V}^{-1}$, für FET-Felder $(dI_{DS}/dU_{bias}) / I_{DS} \approx 1 \text{ V}^{-1}$ und für den FAPS $(dR_c/dU_{bias}) / R_c \approx 20 \text{ V}^{-1}$ bestimmt. Die Potentialempfindlichkeit des FAPS liegt damit im Bereich anderer Sensoren. Die mögliche Ortsauflösung des FAPS im Bereich nur weniger Mikrometer sollte auf jeden Fall ausreichend sein.

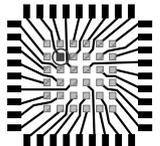
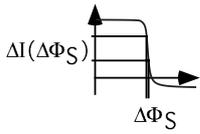
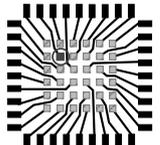
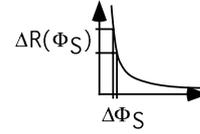
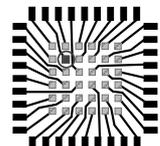
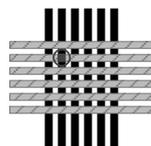
Physikalisches Meßprinzip	"2-dimensionale" Ausführung	"1-dimensionale" Ausführung
(i): direkte Spannungsmessung $\Delta U(\Delta\Phi_S)$	 MEA: $N_{Zu} \propto N_{Akt}$ Messen: $\Delta U(\Delta\Phi_S)$	 Licht-adressierbare MEA: $N_{Zu} \propto N_{Akt}^{1/2}$ Messen: $\Delta U(\Delta\Phi_S)$
(ii): Strommessung senkrecht durch die Raumladungszone  $\Delta I(\Delta\Phi_S)$	 EIS-Diode: $N_{Zu} \propto N_{Akt}$ Messen: $\Delta C_{EIS}(\Delta\Phi_S + U_{bias} + const)$	 LAPS: $N_{Zu} \propto 1$ Messen: $\Delta I_p(\Delta\Phi_S + U_{bias} + const)$
(iii): Widerstandsmessung eines Feldeffekt-Kanals  $\Delta R(\Phi_S)$	 FET: $N_{Zu} \propto N_{Akt}$ Messen: $\Delta I_{DS}(\Delta\Phi_S + U_{bias} + const)$	 FAPS: $N_{Zu} \propto N_{Akt}^{1/2}$ Messen: $\Delta R_c(\Delta\Phi_S + U_{bias} + const)$

Abbildung 7.1.1: Gegenüberstellung verschiedener Meßprinzipien zur Oberflächenpotential-Messung in wäßriger Lösung. Dargestellt ist jeweils eine „2-dimensionale“ und eine „1-dimensionale“ Ausführung. Als Beispiel für „2-dimensionale“ Ausführung ist jeweils ein 6x6 Feld, d.h. ein Sensor mit 36 aktiven Meßpositionen (kleine graue Quadrate) eingezeichnet. Die dunkle und umrandet eingezeichnete Meßposition zeigt eine individuell ausgewählte Meßposition an. Hier ist für jede Meßposition eine separate Zuleitung nötig. MEA ist die Abkürzung für „metal microelectrode array“, d.h. für extrazelluläre Mikroelektroden.

7.2 Wie sieht ein „ideales“ LAPS-System aus

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten LAPS-Aufbauten ist sicher noch nicht die physikalische Leistungsgrenze des LAPS erreicht. Mit den durch Charakterisierungs-Messungen gewonnen Erkenntnissen ist es möglich, neue und verbesserte Konzepte für zukünftige Aufbauten zu erstellen.

Das Hauptproblem des LAPS liegt darin, daß ein sehr kleines Meßsignal (Photostromänderungen ΔI_p) auf einem hohen Trägersignal (konstanter Photostrom am Wendepunkt $I_{p,WP}$) detektiert werden muß. Um den konstanten Anteil des Photostroms am Wendepunkt zu kompensieren, wären zusätzlich zu der in dieser Arbeit beschriebenen Verwendung von zwei Lichtzeigern auch elektronische Techniken möglich. So könnte z.B. in die erste Verstärkerstufe ein Wechselstromsignal mit konstanter Amplitude gespeist werden, welches dem um 180° phasenverschobenen Photostrom am Wendepunkt entspricht. Auch ließe sich das Rauschen durch Verwendung geeigneter Bandpaßfilter vermutlich weiter reduzieren. Bei einer Modulationsfrequenz von $f_L = 30$ kHz wäre z.B. ein Bandpaß um 30 kHz mit einer Bandbreite von 3 kHz möglich, was eine Zeitauflösung von 3 kHz gewährleisten würde. Der Filtereffekt wird um so günstiger sein, je höher die Modulationsfrequenz des Lichtzeigers ist. Mit den zur Zeit verwendeten Laserdioden ist allerdings $f_L = 30$ kHz die absolute Obergrenze, da deren Leistung bei höheren Frequenzen zusammenbricht. Es wäre daher zu überlegen, ob nicht eine Modulation des Laserlichtes mit einem Chopper günstiger wäre. Auch wäre eine Kühlung der ersten Verstärkerstufe zu überlegen, um das Grundrauschen zu reduzieren.

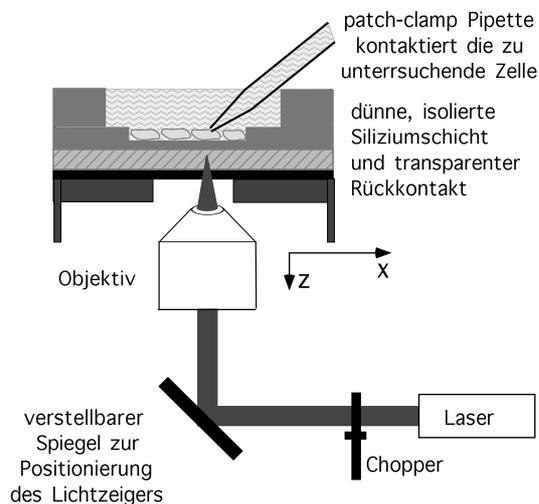


Abbildung 7.2.1: LAPS-Aufbau mit Beleuchtung von unten.

Eine Beleuchtung von unten, d. h. von der Rückseite des Halbleiters her, hätte einige Vorteile. Zum ersten würden damit Fokussierungseffekte des Lichtzeigers durch beweglich Zellen vermieden, wodurch auch kontrahierende Herzmuskel-Zellen mit dem LAPS untersucht werden könnten. Zum anderen stünde damit auf der Oberseite des LAPS mehr Platz für andere Techniken zur Verfügung, wie z.B. für einen kombinierten LAPS-/ AFM- oder LAPS-/patch-clamp -Aufbau. Für eine Beleuchtung von unten müßte aber der verwendete LAPS-Halbleiter,

um eine gute Ortsauflösung zu erhalten, dünn und der ohmsche Rückkontakt transparent sein, d.h. es müßte eine neue Meßkammer entwickelt werden⁶.

Eine Verkleinerung der Halbleiter-Oberfläche A_{akt} (x- und y-Dimension) reduziert aufgrund niedrigerer Streukapazität das Rauschen im Photostrom und gewährleistet damit eine verbesserte Potentialempfindlichkeit. Eine Reduzierung der Halbleiterdicke d_s (z-Dimension) verbessert die Ortsauflösung. Die bisher verwendeten Meßkammern sollten daher in allen Dimensionen so weit wie möglich verkleinert werden.

Ein guter Vorschlag scheint daher ein Halbleitersubstrat mit einer Oberfläche $A_{akt} \approx 1 \text{ mm}^2$ zu sein, vgl. Abb. 7.2.2. Die innerhalb dieser Fläche verfügbare freie Adressierbarkeit der gewünschten Meßposition würde immer noch klare Vorteile zu einer Geometrie mit festgelegten Meßpositionen, wie z.B. FET-Feldern bieten. Um diese Oberfläche, mit einer einigen 10 nm dicken Isolationsschicht, sollte ein ca. 15 mm × 15 mm großer passivierter Bereich mit sehr dicker Isolationsschicht (z.B. 1-5 μm SiO_2 bzw. Si_3N_4) angeordnet sein. In diesem Bereich könnte wegen der dicken Isolation kein Photostrom fließen und er würde auch die Streukapazität nicht erhöhen. Durch die insgesamt große Fläche könnten aber Zellen leichter kultiviert werden, und es würde ein Eintauchen von patch-clamp Pipetten unter geringerem Winkel erlauben. Nach wie vor müßte das für den Elektrolyt zur Verfügung stehende Volumen mit einem Plexiglas-Dichtring eingegrenzt werden.

Als transparenter ohmscher Rückkontakt könnte eine Film aus Indium-Zinn-Oxid (ITO) auf einem Glassubstrat dienen. Als dünnes Halbleitersubstrat wäre eine ca. 5 μm dicke Schicht aus Silizium wünschenswert. Um laterale Diffusion noch besser zu unterdrücken, wäre die Verwendung von amorphem Silizium oder einer Siliziumschicht mit einer, wie in Abb. 7.2.2 eingezeichneten Inselstruktur im Raster von einigen μm zu überlegen.

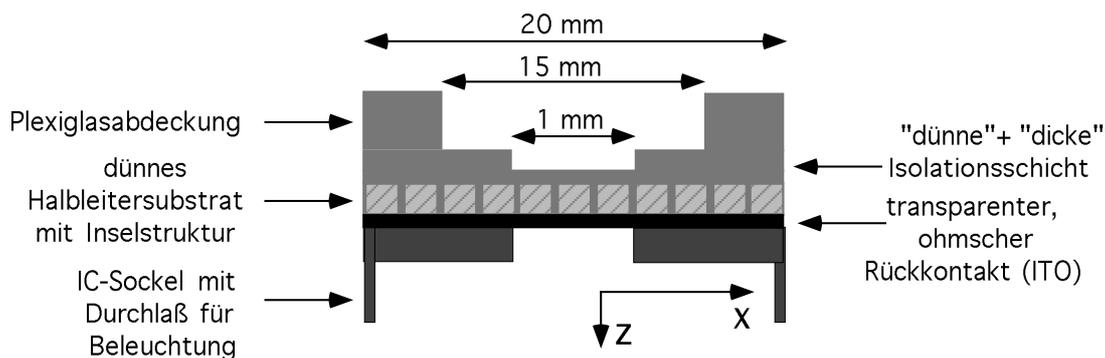


Abbildung 7.2.2: Vorschlag für den Aufbau einer neuen LAPS-Meßkammer.

⁶ Bei dünnen Schichten wäre das Silizium-Substrat für infrarotes Licht nahezu transparent, so daß eine Beobachtung der Zellen und eine kontrollierte Positionierung des Lichtzeigers auch durch den LAPS-Wafer hindurch von unten möglich wäre.

8 Literaturangaben

Eigene Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

- [62] W. J. Parak, J. Domke, M. George, A. Kardinal, M. Radmacher, H. E. Gaub, A. D. G. de Roos, 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*, vol. 76, pp. 1659-1667, 1999.
- [79] W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, and J. C. Behrends, "Effects of Semiconductor Substrate and Glia-Free Culture on the Development of Voltage Dependent Currents in Rat Striatal Neurons", *Journal of Neuroscience Methods*, submitted.
- [83] J. Domke, S. Dannöhl, W. J. Parak, O. Müller, W. K. Aicher, and M. Radmacher, "Substrate Dependent Differences in Morphology and Elasticity of Living Osteoblasts Investigated by Atomic Force Microscopy", *Colloids and Surfaces B*, submitted.
- [143] 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*, in press.
- [157] 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*, vol. 63, pp. 47-57, 1997.
- [174] W. J. Parak, M. George, J. Domke, M. Radmacher, H. E. Gaub, J. C. Behrends, M. C. Denyer, and A. Offenhäusser, "Can the light-addressable potentiometric sensor (LAPS) detect extracellular potentials of cardiac myocytes?", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, submitted.
- [180] J. Domke, W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, and M. Radmacher, "Mapping the Mechanical Pulse of Single Cardiomyocytes with the Atomic Force Microscope", *European Biophysics Journal*, vol. 28, pp. 179-186, 1999.
- [189] W. J. Parak, S. Dannöhl, M. George, M. K. Schuler, J. Schaumburger, H. E. Gaub, O. Müller, and W. K. Aicher, "Comparing Cytokine Expression, Cytokine Responses and Metabolic Activation in Native and Immortalized Synovial Fibroblasts", *Journal of Rheumatology*, submitted.
- [222] U. G. Hofmann, C. Rotsch, W. J. Parak, and M. Radmacher, "Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope", *Journal of Structural Biology*, vol. 119, pp. 84-91, 1997.

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

- [146] W. J. Parak, "Aufbau und Charakterisierung eines LAPS-Systems zur noninvasiven Membranpotentialmessung", Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [150] W. J. Parak, M. George, S. Kölblin, J. C. Behrends, G. t. Bruggencate, and H. E. Gaub, "Spatially resolved surface potential measurements with the light addressable potentiometric sensor (abstract only)", *European Biophysics Journal*, vol. 26, pp. 61 (abstract #3-23), 1997.

- [161] W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, S. Böhm, and A. Lorke, "The Field-Effect-Addressable Potentiometric Sensor (FAPS) - A new concept for a surface potential detector with spatial resolution", *Euroensors XII*, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, vol. 2, pp 1079, 1998.
- [162] S. Böhm, W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, and A. Lorke, "The Field-Effect-Addressable Potentiometric Sensor / Stimulator (FAPS) - Fabrication and Characterisation -", *Euroensors XIII*, The Hague, *submitted*.
- [163] A. Lorke, S. Böhm, J. P. Kotthaus, W. J. Parak, and M. George, "Ortsaufgelöster Potential-Sensor und -Stimulator auf Halbleiterbasis", Deutsches Patent, *submitted*.
- [188] W. J. Parak, S. Dannöhl, N. Fuchs, O. Müller, M. George, H. E. Gaub, W. Küsswetter, and W. K. Aicher, "Comparing cytokine, phorbol ester and ionomycin responses in synovial fibroblasts and immortalized fibroblast lines derived from patients with rheumatoid arthritis (abstract only)", *Immunobiology*, vol. 199, pp. 662, 1998.
- [292] M. George, I. Gerhardt, W. Moritz, H. Geiger, I. Eisele, H. E. Gaub, and W. J. Parak, "Experimental investigation on the spatial resolution of the light-addressable potentiometric sensor (LAPS)", *Euroensors XIII*, The Hague, *submitted*.

Referenzen

- [1] N. Birbaumer and R. F. Schmidt, *Biologische Psychologie*, 3 ed. Berlin: Springer, 1996.
- [2] H. M. Mc Connell, 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*, vol. 257, pp. 1906 - 1912, 1992.
- [3] 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*, vol. 23, pp. 87 - 113, 1994.
- [4] P. Gavazzo, S. Paddeu, M. Sartore, and C. Nicolini, "Study of the relationship between extracellular acidification and cell viability by a silicon-based sensor", *Sensors and Actuators B Chemical*, vol. 18-19, pp. 368-372, 1994.
- [5] M. C. T. Denyer, M. Riehle, S. T. Britland, and A. Offenhäuser, "Preliminary study on the suitability of a pharmacological bio-assay based on cardiac myocytes cultured over microfabricated microelectrode arrays", *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 36, 1998.
- [6] I. Lundström, R. Erlandsson, U. Frykman, E. Hedborg, A. Spetz, H. Sundgren, S. Welin, and F. Winqvist, "Artificial 'olfactory' images from a chemical sensor using a light-pulse technique", *Nature*, vol. 352, pp. 47 - 50, 1991.
- [7] I. Lundström, A. Spetz, F. Winqvist, U. Ackelid, and H. Sundgren, "Catalytic Metals and Field-effect Devices - a Useful Combination", *Sensors and Actuators B*, vol. 1, pp. 15 - 20, 1990.
- [8] T. Sato, Y. Sasaki, H. Uchida, N. Hiratsuka, and T. Katsube, "Suspended Gate SPV Gas Sensor", Technical Digest of the 12th Sensor Symposium, 1994.
- [9] M. J. Schöning, S. Schütz, A. Riemer, B. Weißbecker, A. Steffen, P. Kordos, H. Lüth, and H. E. Hummel, "A BioFET on the basis of intact insect antennae", presented at Euroensors XI, Warschau, Polen, 1997.
- [10] L. P. Tilley, *EKG bei Hund und Katze*, 1 ed. Hannover: Schlütersche, 1997.
- [11] B. Katz, *Nerv, Muskel und Synapse*, 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1971.

- [12] E. Neher and B. Sakmann, "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres", *Nature*, vol. 260, pp. 799 - 802, 1976.
- [13] B. Sakmann and E. Neher, *Single-Channel Recording*, 2 ed. New York: Plenum Press, 1995.
- [14] D. T. Jobling, J. G. Smith, and H. V. Wheal, "Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous system in vitro", *Medical and biological engineering and computing*, vol. 19, pp. 553 - 560, 1981.
- [15] Y. Jimbo and A. Kawana, "Electrical Stimulation and Recording from Cultured Neurons Using a Planar Electrode Array", *Bioelectronics & Bioenergetics*, vol. 29, pp. 193-204, 1992.
- [16] R. M. Fitzsimonds, H.-J. Song, and M.-M. Poo, "Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks", *Nature*, vol. 388, pp. 439-448, 1997.
- [17] M. E. Larkum, J. J. Zhu, and B. Sakman, "A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers", *Nature*, vol. 398, pp. 338-341, 1999.
- [18] L. B. Cohen, R. D. Keynes, and B. Hille, "Light Scattering and Birefringence Changes during Nerve Activity", *Nature*, vol. 218, pp. 438 - 441, 1968.
- [19] B. M. Salzberg, H. V. Davila, and L. B. Cohen, "Optical Recordings of Impulses in Individual Neurons of an Invertebrate Control Nervous System", *Nature*, vol. 246, pp. 508 - 509, 1973.
- [20] H. V. Davila, B. M. Salzberg, and L. B. Cohen, "A Large Change in Axon Fluorescence that Provides a Promising Method for Measuring Membrane Potential", *Nature New Biology*, vol. 241, pp. 159 - 160, 1973.
- [21] A. Kogan, W. N. Ross, D. Zecevic, and N. Lasser-Ross, "Optical recording from cerebellar Purkinje cells using intracellularly injected voltage-sensitive dyes", *Brain Research*, vol. 700, pp. 235-239, 1995.
- [22] P. Fromherz, K. H. Dambacher, H. Ephardt, A. Lambacher, C. O. Müller, R. Neigl, H. Schaden, O. Schenk, and T. Vetter, "Fluorescent Dyes as Probes of Voltage Transients in Neuron Membranes", *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, vol. 95, pp. 1333 - 1345, 1991.
- [23] P. Fromherz and C. O. Müller, "Voltage-sensitive fluorescence of amphiphilic hemicyanine dyes in neuron membrane", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1150, pp. 111 - 122, 1993.
- [24] P. Fromherz and C. O. Müller, "Cable properties of a straight neurite of a leech neuron probed by a voltage-sensitive dye", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 91, pp. 4604 - 4608, 1994.
- [25] E. Meyer, C. O. Müller, and P. Fromherz, "Cable Properties of Dendrites in Hippocampal Neurons of the Rat Mapped by a Voltage-sensitive Dye", *European Journal of Neuroscience*, vol. 9, pp. 778-785, 1997.
- [26] L. B. Cohen and B. M. Salzberg, "Optical Measurement of Membrane Potential", *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, pp. 34 - 88, 1978.
- [27] P. Schaffer, H. Ahammer, W. Müller, B. Koidl, and H. Windisch, "Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes", *Plügers Arch.*, vol. 426, pp. 548-551, 1994.
- [28] 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*, vol. 252, pp. 1290 - 1293, 1991.

- [29] G. W. Gross, E. Rieseke, 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*, vol. 6, pp. 101-105, 1977.
- [30] G. W. Gross, B. K. Rhoades, H. M. E. Azzazy, and M.-C. Wu, "The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 10, pp. 553-567, 1995.
- [31] A. Harsch, "Extrazelluläre Ableitung an neuronalen Netzwerken für die Biosensorik", Dissertation, Universität Tübingen, 1997.
- [32] G. W. Gross, S. Norton, K. Gopal, D. Schiffmann, and A. Gramowski, "Neuronal networks in vitro: applications to neurotoxicology, drug development and biosensors", *Cell Engineering*, vol. 2, pp. 138-147, 1997.
- [33] G. W. Gross, A. Harsch, B. K. Rhoades, and W. Göpel, "Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 12, pp. 373-393, 1997.
- [34] G. Kempermann and F. H. Gage, "Neue Nervenzellen im erwachsenen Gehirn", *Spektrum der Wissenschaft*, vol. Juli 1999, pp. 32-38, 1999.
- [35] *Neurotechnologie-Report Teil 2*. Bonn: Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technik, 1995.
- [36] *Neurotechnologie-Report Teil 1*. Bonn: Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technik, 1995.
- [37] A. Blau, C. Ziegler, M. Heyer, F. Endres, G. Schwitzgebel, T. Matthies, T. Stieglitz, J.-U. Meyer, and W. Göpel, "Characterization and Optimization of Microelectrode Arrays for In-vivo Nerve Signal Recording and Stimulation", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, pp. 883-892, 1997.
- [38] S. Weiss, A. Stett, and H. Hämmerle, "Slow potential of the chicken retina by local electrical stimulation with planar microelectrodes", Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference, 1997.
- [39] U. Egert, W. Nisch, and H. Hämmerle, "Simultaneous recording of the electroretinogram and spike activity with a microelectrode array", Proceedings of the 18th Annual Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 1996.
- [40] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1992.
- [41] G. M. Barrow, *Physikalische Chemie Teil 3: Mischphasenthermodynamik, Elektrochemie, Reaktionskinetik*, 2 ed. Braunschweig: Vieweg Verlag, 1972.
- [42] G. M. Shepherd, *Neurobiologie*, 1 ed. Berlin: Springer, 1993.
- [43] 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.
- [44] M. Lindau and E. Neher, "Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells", *European Journal of Physiology, Plügers Archiv*, vol. 411, pp. 137-146, 1988.
- [45] 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*, vol. 116, pp. 449 - 472, 1952.
- [46] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve", *Journal of physiology*, vol. 117, pp. 500 - 544, 1952.

- [47] J. Dudel, "Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle", in *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt and G. Thews, Eds., 27 ed. Berlin: Springer, 1997, pp. 43-66.
- [48] J. Dudel, "Erregung, Erregungsleitung und synaptische Übertragung", in *Biophysik*, W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler, Eds., 2 ed. Berlin: Springer, 1982.
- [49] B. P. Bean and E. Riós, "Nonlinear charge movement in mammalian cardiac ventricular cells. Components from Na and Ca channel gating", *J. Gen. Physiol.*, vol. 94, pp. 65-93, 1989.
- [50] P. Drapeau, W. B. Kristan, and M. S. Shankland, *Neurobiology and Development of the Leech*. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- [51] R. J. A. Wilson, L. Breckenridge, S. E. Blackshaw, P. Connolly, J. A. T. Dow, A. S. G. Curtis, and C. D. W. Wilkinson, "Simultaneous multisite recordings and stimulation of single isolated leech neurons using planar extracellular electrode arrays", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 53, pp. 101-110, 1994.
- [52] W. G. Regehr, J. Pine, C. S. Cohan, M. D. Mischke, and D. W. Tank, "Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 30, pp. 91 - 106, 1989.
- [53] R. F. Schmidt and G. Thews, *Physiologie des Menschen*, 27 ed. Berlin: Springer, 1997.
- [54] R. L. De Haan, "Regulation of Spontaneous Activity and Growth of Embryonic Chick Heart Cells in Tissue Culture", *Developmental Biology*, vol. 16, pp. 216 - 249, 1967.
- [55] M. Riehle, J. Bereiter-Hahn, and B. Boller, "Effects of ouabain and digitoxin on the respiration of chick embryo cardiomyocytes in culture", *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research*, vol. 41, pp. 378-384, 1991.
- [56] M. Riehle and J. Bereiter-Hahn, "Oubain and digitoxin as modulators of chick embryo cardiomyocytic energy metabolism", *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research*, vol. 44, pp. 943-947, 1994.
- [57] A. D. G. de Roos, "Electrophysiological Aspects of Growth Factor Signaling in NRK Fibroblasts", Dissertation, Katholische Universität Nijmegen, 1997.
- [58] A. D. G. de Roos, P. H. G. M. Willems, P. H. J. Peters, E. J. J. V. Zoelen, and A. P. R. Theuvenet, "Synchronised calcium spiking resulting from spontaneous calcium action potentials in monolayers of NRK fibroblasts", *Cell Calcium*, vol. 22, pp. 195-207, 1997.
- [59] A. D. G. deRoos, P. H. G. M. Willems, E. J. J. V. Zoelen, and A. P. R. Theuvenet, "Synchronized Ca^{2+} signaling by intercellular propagation of Ca^{2+} action potentials in NRK fibroblasts", *American Journal of Physiology C - Cell Physiology*, vol. 42, pp. 1900-1907, 1998.
- [60] G. J. Brewer, J. R. Torricelli, E. K. Evege, and P. J. Price, "Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27-Supplemented Neurobasal, a New Serum-free Medium Combination", *J. Neurosci. Res.*, vol. 35, pp. 567-576, 1993.
- [61] J. C. Behrends and G. ten. Bruggencate, "Changes in Quantal Size Distributions Upon Experimental Variations in the Probability of Release at Striatal Inhibitory Synapses", *The American Physiological Society*, pp. 2999-3011, 1998.
- [63] C. Sprössler, "Extrazelluläre Signalableitung durch ein Sensorfeld mit Feldeffekttransistoren", Dissertation, Universität Tübingen und Max Planck Institut für Polymerforschung Mainz, 1997.
- [64] H. Lippert, *Anatomie*, 6 ed. München: Urban & Schwarzenberg, 1995.
- [65] H. Antoni, "Erregungsphysiologie des Herzens", in *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt and G. Thews, Eds., 27 ed. Berlin: Springer, 1997, pp. 472-497.

- [66] H. M. Piper, I. Probst, P. Schwartz, J. F. Hutter, and P. G. Spieckermann, "Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes", *J. Mol. Cell Cardiol.*, vol. 14, pp. 397-412, 1982.
- [67] J. C. Rüegg, "Muskel", in *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt and G. Thews, Eds., 27 ed. Berlin: Springer, 1997, pp. 67-86.
- [68] J. Dudel, "Grundlagen der Zellphysiologie", in *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt and G. Thews, Eds., 27 ed. Berlin: Springer, 1997, pp. 3-19.
- [69] S. L. Jacobson and H. M. Piper, "Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium", *Journal of molecular and cellular cardiology*, vol. 18, pp. 661-678, 1986.
- [70] I. Kodama and M. Boyett, "Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node", *Pflügers Archiv*, vol. 404, pp. 214-226, 1985.
- [71] R. D. Nathan, "Two electrophysiologically distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node", *Am. J. Physiol.*, vol. 250, pp. H325-H329, 1986.
- [72] E. M. V. Williams, "Relation of extracellular to intracellular potential records from single cardiac muscle fibres", *Nature*, vol. 183, pp. 1341-1342, 1959.
- [73] W. Trautwein, D. G. Kassebaum, R. M. Nelson, and H. H. Hecht, "Electrophysiological study of human heart muscle", *Circ. Res.*, vol. 10, pp. 306-312, 1962.
- [74] J. W. Dow, N. G. L. Harding, and T. Powell, "Isolated cardiac myocytes. II. Functional aspects of mature cells", *Cardiovasc. Res.*, vol. 15, pp. 549-579, 1981.
- [75] J. R. Clay, L. J. De Felice, and R. L. De Haan, "Current Noise Parameters derived from Voltage Noise and Impedance in Embryonic Heart Cell Aggregates", *Biophysical Journal*, vol. 28, pp. 169 - 184, 1979.
- [76] J. R. Clay and R. L. De Haan, "Fluctuations in Interbeat Interval in Rhythmic Heart-Cell Clusters", *Biophysical Journal*, vol. 28, pp. 377 - 389, 1979.
- [77] R. L. De Haan and L. J. De Felice, "Oscillatory Properties and Excitability of the Heart Cell Membrane", *Theoretical Chemistry*, vol. 4, pp. 181 - 233, 1978.
- [78] A. M. Brown, K. S. Lee, and T. Powell, "Voltage clamp and internal perfusion of single rat heart muscle cells", *J. Physiol.*, vol. 318, pp. 455-477, 1981.
- [80] L. Sachs, *Angewandte Statistik*, 8 ed. Berlin: Springer, 1997.
- [81] A. Offenhäusser and J. Rühle, "Neuronal Cells cultured on modified microelectronic device Surfaces", *Journal of Vacuum Science and Technology A*, vol. 13, pp. 2606 - 2612, 1995.
- [82] S. Dannöhl, "Biophysikalische Untersuchungen auf zellulärer Ebene für die Orthopädie", in *Ludwig-Maximilians Universität München*, 1998.
- [84] K. E. Healy, B. Lom, and P. E. Hockberger, "Spatial Distribution of Mammalian Cells Dictated by Material Surface Chemistry", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 43, pp. 792-800, 1994.
- [85] K. Torimitsu and A. Kawana, "Selective growth of sensory nerve fibers on metal oxide patterns in culture", *Dev. Brain Res.*, vol. 51, pp. 128-131, 1990.
- [86] L. Bousse and S. Mostarshed, "The zeta potential of silicon nitride thin films", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 302, pp. 269 - 274, 1991.
- [87] R. Raiteri, B. Margesin, and M. Grattarola, "An atomic force microscope estimation of the point of zero charge of silicon insulators", *Sensors and Actuators B*, vol. 46, pp. 126-132, 1998.

- [88] T. Mikolajick, R. Kühnhold, R. Schnupp, and H. Ryssel, "The influence of surface oxidation on the pH-sensing properties of silicon nitride", *Sensors and Actuators*, submitted.
- [89] T. A. Horbert, J. J. Waldburger, B. D. Ratner, and A. S. Hoffman, "Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 22, pp. 383-404, 1988.
- [90] M. Jenkner and P. Fromherz, "Bistability of neuron-transistors", *European Biophysics Journal*, vol. 26, pp. 83, 1997.
- [91] M. Jenkner and P. Fromherz, "Bistability of Membrane Conductance in Cell Adhesion Observed in a Neuron Transistor", *Physical Review Letters*, vol. 79, pp. 4705-4708, 1997.
- [92] W. G. Regehr, J. Pine, and D. B. Rutledge, "A Long-Term In Vitro Silicon-Based Microelectrode-Neuron Connection", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 35, pp. 1023 -1031, 1988.
- [93] R. Weis, B. Müller, and P. Fromherz, "Neuron adhesion on a silicon chip probed by an array of field-effect transistors", *Physical Review Letters*, vol. 76, pp. 327-330, 1996.
- [94] R. Weis and P. Fromherz, "Frequency dependent signal transfer in neuron transistors", *Physical Review E*, vol. 55, pp. 877-889, 1997.
- [95] J. Bereiter-Hahn, C. H. Fox, and B. Thoreli, "Quantitative reflection contrast microscopy of living cells", *J. Cell. Biol.*, vol. 82, pp. 767-779, 1979.
- [96] K. Burridge, "Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton", *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 487-525, 1988.
- [97] K. Burridge, C. E. Turener, and L. H. Romer, "Tyrosine Phosphorylation of Paxillin and pp125^{FAK} Accompanies Cell Adhesion to Extracellular Matrix: A Role in Cytoskeletal Assembly", *J. Cell Biol.*, vol. 119, pp. 893-903, 1992.
- [98] A. S. G. Curtis, "The mechanisms of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy", *J. Cell. Biol.*, vol. 20, pp. 199-215, 1964.
- [99] D. Gingell and I. Todd, "Interference reflection microscopy - A quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement", *Biophysical Journal*, vol. 26, pp. 507-526, 1979.
- [100] D. Gingell and S. Vinve, "Cell-glass separation depends on salt concentration and valency: measurements on Dictyostelium amoebae by finite aperture interferometry", *J. Cell. Sci.*, vol. 54, pp. 299-310, 1982.
- [101] C. S. Izzard and L. R. Lochner, "Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique", *J. Cell Sci.*, vol. 21, pp. 129-159, 1976.
- [102] J. Rädler and E. Sackmann, "Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces", *Journale de Physique II France*, vol. 3, pp. 727 - 748, 1993.
- [103] M. Schindl, E. Wallraff, B. Deubzer, W. Witke, G. Gerisch, and E. Sackmann, "Cell-Substrate Interactions and Locomotion of Dictyostelium Wild-Type and Mutants Defective in Three Cytoskeletal Proteins: A Study Using Quantitative Reflection Interference Contrast Microscopy", *Biophysical Journal*, vol. 68, pp. 1177 - 1190, 1995.
- [104] H. Verschueren, "Interference Reflection Microscopy in Cell Biology: Methodology and Applications", *J. Cell. Sci.*, vol. 75, pp. 279-301, 1985.

- [105] D. Axelrod, T. P. Burghardt, and N. L. Thompson, "Total Internal Reflection Fluorescence", *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, vol. 13, pp. 247 - 268, 1984.
- [106] D. Gingell, I. Todd, and J. Bailey, "Topography of Cell-Glass Apposition Revealed by Total Internal Reflection Fluorescence of Volume Markers", *The Journal of Cell Biology*, vol. 100, pp. 1334 - 1338, 1985.
- [107] J. Hornung and G. Fuhr, "Total Internal Reflection Microscopy (TIRM) for the Investigation of Dynamic Cell Processes", presented at Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Leipzig, 1996.
- [108] J. Hornung, T. Müller, and G. Fuhr, "Cryopreservation of Anchorage-Dependent Mammalian Cells Fixed to Structured Glass and Silicon Substrates", *Cryobiology*, vol. 33, pp. 260 - 270, 1996.
- [109] J. Hornung and G. Fuhr, "Influence of polylysine on adhesion of fibroblasts to glass substrates visualized by total internal reflection microscopy", *Experimental Biology Online*, vol. 1, 1996.
- [110] A. Lambacher and P. Fromherz, "Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer", *Applied Physics A: Solids and Surfaces*, vol. 63, pp. 207-216, 1996.
- [111] D. Braun, "Untersuchung der Struktur der Silizium-Neuron-Kopplung durch Fluoreszenzfarbstoffe", Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [112] D. Braun and P. Fromherz, "Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon", *Applied Physics A*, vol. 65, pp. 341-348, 1997.
- [113] D. Braun and P. Fromherz, "Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon", *Physical Review Letters*, vol. 81, pp. 5241-5244, 1998.
- [114] G. M. Zeck, "Adhäsion von Lipidvesikeln auf Siliziumchips", in *Technische Universität München, Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried*, 1997.
- [115] M. Rief, "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen", Dissertation, LMU München, 1997.
- [116] M. Radmacher, "Mechanische Experimente mit Zellen, Polymeren und einzelnen Molekülen", Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1997.
- [117] M. Ludwig, "Entwicklung neuer rasterkraftmikroskopischer Betriebsmodi zur Strukturierung von Oberflächen und zur Identifizierung von einzelnen biologischen Molekülen anhand ihrer Topographie, Länge, Elastizität und Funktionalität", Dissertation, Ludwig Maximilians Universität München, 1997.
- [118] A. Schemmel, "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen zur Untersuchung von Proteinfaltung", Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1998.
- [119] H. Clausen-Schaumann, "Polymeradsorption an polyelektrolyten Grenzflächen", Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [120] M. Benoit, "Die supramolekulare Struktur von Nematocysten", Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität München, 1994.
- [121] W. Dettmann, "Lokalisation molekularer Wechselwirkungen -eine Untersuchung mit dem Kraftmikroskop -", Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [122] W. Helfrich, "Steric Interaction of Fluid Membranes in Multilayer Systems", *Z. Naturforsch*, vol. A 33, pp. 305-315, 1978.
- [123] W. Pfeiffer, S. König, J. F. Legrand, T. Bayerl, D. Richter, and E. Sackmann, "Neutron Spin Echo Study of Membrane Undulations in Lipid Multibilayers", *Europhysics Letters*, vol. 23, pp. 457 - 462, 1993.

- [124] J. O. Rädler, T. J. Feder, H. H. Strey, and E. Sackmann, “Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates”, *Physical Review E*, vol. 51, pp. 4526 - 4536, 1995.
- [125] U. Seifert, “Configuration of fluid membranes and vesicles”, *Adv. Physics*, vol. 46, pp. 13-137, 1997.
- [126] H. Hertz, “Über die Berührung fester elastischer Körper”, *J. Reine Angew. Mathematik*, vol. 92, pp. 156-171, 1882.
- [127] J. Domke, “Untersuchung dünner Polymerfilme mittels Rasterkraftmikroskopie”, Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität München, 1997.
- [128] M. Radmacher, “Kraftmikroskopie an weichen Proben”, Dissertation, Technische Universität München, 1993.
- [129] S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. Mc Dermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, and E. Sackmann, “Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular deflection of neutrons”, *Biophys. J.*, vol. 59, pp. 289, 1991.
- [130] E. Donath and D. Gingell, “A sharp cell surface conformational transition at low ionic strength changes the nature of the adhesion of enzyme-treated red blood cells to a hydrocarbon interface”, *J. Cell Sci.*, vol. 63, pp. 113-124, 1983.
- [131] D. Gingell and S. Vince, “Long-range forces and adhesion: an analysis of cell-substratum studies”, in *The Third Symposium of the British Society for Cell Biology: Cell Adhesion and Motility*, A. S. G. Curtis and J. D. Pitts, Eds.: Cambridge University Press, 1979, pp. 1-37.
- [132] D. Gingell and I. Todd, “Red blood cell adhesion. II. Interferometric examination of the interaction with hydrocarbon oil and glass”, *J. Cell Sci.*, vol. 41, pp. 135-149, 1980.
- [133] H. Wolf and D. Gingell, “Conformational response of the glycocalyx to ionic strength and interaction with modified glass surface: a study of live red cells by interferometry”, *J. Cell Sci.*, vol. 63, pp. 101-112, 1983.
- [134] 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*, vol. 13, pp. 613-618, 1998.
- [135] 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*, in press.
- [136] Y. Jimbo, H. P. C. Robinson, and A. Kawana, “Simultaneous Measurements of Intracellular Calcium and Electrical Activity from Patterned Neural Networks in Culture”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 40, pp. 804 - 810, 1993.
- [137] G. W. Gross, W. Y. Wen, and J. W. Lin, “Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures”, *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 15, pp. 243 - 252, 1985.
- [138] M. H. Droge, G. W. Gross, M. H. Hightower, and L. E. Czisny, “Multielectrode analysis of coordinated, multisite, rhythmic bursting in cultured CNS monolayer networks”, *J. Neurosci.*, vol. 6, pp. 1583-1592, 1986.
- [139] A. Offenhäusser, M. Matsuzawa, C. Sprössler, and W. Knoll, “Neuron-Silicon-Junction: Electrical Recordings from Neural Cells Cultured on Modified Microelectronic Device Surfaces”, Proc. EMBS, 1996.

- [140] S. Vassanelli and P. Fromherz, “Neuron-silicon junction with hippocampal neurons (abstract only)”, *European Biophysics Journal*, vol. 26, pp. 83, 1997.
- [141] S. Vassanelli and P. Fromherz, “Neurons from rat brain coupled to transistors”, *Applied Physics A*, vol. 65, pp. 85-88, 1997.
- [142] S. Vassanelli and P. Fromherz, “Transistor-records of excitable neurons from rat brain”, *Applied Physics A*, vol. 66, pp. 459-463, 1998.
- [144] A. F. Holleman and E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101 ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1995.
- [145] D. G. Hafeman, J. W. Parce, and H. M. McConnell, “Light-Addressable Potentiometric Sensor for Biochemical Systems”, *Science*, vol. 240, pp. 1182 - 1185, 1988.
- [147] M. George, “Untersuchungen zur Noninvasiven Membranpotentialmessung mit einem Licht Adressierbaren Potentiometrischen Sensor”, Diplomarbeit, LMU München, 1997.
- [148] S. Kölblin, “Untersuchungen zur Noninvasiven Membranpotentialmessung mit einem Licht Adressierbaren Potentiometrischen Sensor”, Diplomarbeit, LMU München, 1998.
- [149] U. G. Hofmann, “Grundlegende Entwicklungen für die nichtinvasive Membranpotentialmessung”, Dissertation, Technische Universität München, 1996.
- [151] S. M. Sze, *Physics of Semiconductor Devices*, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- [152] J. Boucher and C. Rakotondrazafy, “Analytical Integration of Small-Signal Transport Equations in an MIS Structure at Flat-Band Condition”, *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 33, pp. 385-390, 1986.
- [153] M. Grattarola, G. Massobrio, and P. Antognetti, *Bioelectronics Handbook: MOSFETs, Biosensors, and Neurons*, 1 ed. New York: Mc Graw Hill, 1998.
- [154] M. Grattarola, A. Cambiaso, S. Cenderelli, and M. Tedesco, “Capacitive Measurements in Electrolyte-Insulator-Semiconductor (EIS) Systems Modified by Biological Materials”, *Sensors and Actuators*, vol. 17, pp. 451 - 459, 1989.
- [155] J. Szeponik, W. Moritz, and F. Sellam, “LaF₃ Thin Films as Chemically Sensitive Material for Semiconductor Sensors”, *Berichte der Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie*, vol. 95, pp. 1448-1453, 1991.
- [156] M. Thust, M. J. Schöning, J. Vetter, P. Kordos, and H. Lüth, “A long-term stable penicillin-sensitive potentiometric biosensor with enzyme immobilized by heterobifunctional cross-linking”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 323, pp. 115-121, 1996.
- [158] M. Nakao, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, “Improvement of Spatial Resolution of a Laser-Scanning pH-Imaging Sensor”, *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 33, pp. L 394 - L 397, 1994.
- [159] M. Nakao, S. Inoue, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, “High-resolution pH imaging sensor for microscopic observation of microorganisms”, *Sensors & Actuators B*, vol. 34, pp. 234-239, 1996.
- [160] Y. Ito, “High-spatial resolution LAPS”, *Sensors and Actuators B*, vol. 52, pp. 107-111, 1998.
- [164] J.-P. Colinge, “Silicon-on-Insulator Technology: Past Achievements and Future Prospects”, *MRS Bulletin*, vol. 23, pp. 16-19, 1998.
- [165] A. Black et al., *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 3, pp. 943, 1997.

- [166] J. Kanicki, *Amorphous and Microcrystalline Semiconductor Devices*. Norwood: Artech House, 1991.
- [167] T. A. Skotheim and M. Dekker, *Handbook of Conducting Polymers*. New York: M. Dekker Inc., 1986.
- [168] A. Messiah, *Quantenmechanik (Band 2)*, 2 ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1985.
- [169] A. Messiah, *Quantenmechanik (Band 1)*. Berlin: Walter de Gruyter, 1976.
- [170] C. Weisbuch and B. Vinter, *Quantum Semiconductor Structures*. San Diego: Academic Press, 1991.
- [171] E. Yablonovitch, T. Gmitter, J. P. Harbison, and R. Bhat, "Extreme selectivity in the lift-off of epitaxial GaAs films", *Applied Physics Letters*, vol. 51, pp. 2222-2224, 1987.
- [172] 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*, vol. 56, pp. 2419-2421, 1990.
- [173] S. Böhm, "Elektronische Eigenschaften zweidimensionaler Elektronengase in epitaktisch abgelösten Heterostrukturen", Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität München, 1997.
- [175] C. A. Thomas, P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun, "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells", *Experimental Cell Research*, vol. 74, pp. 61-66, 1972.
- [176] 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*, vol. 247, pp. H669-H674, 1984.
- [177] D. A. Israel, D. J. Edell, and R. G. Mark, "Time delays in propagation of cardiac action potential", *American Journal of Physiology*, vol. 258, pp. H1906-H1917, 1990.
- [178] 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*, vol. 5, pp. 223-234, 1990.
- [179] E. Hofer, G. Urban, M. S. Spach, I. Schafferhofer, G. Mohr, and D. Platzer, "Measuring activation patterns of the heart at a microscopic size scale with thin-film sensors", *American Journal of Physiology*, vol. 266, pp. H2136-H2145, 1994.
- [181] S. G. Shroff, D. R. Saner, and R. Lal, "Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy", *American Journal of Physiology*, vol. 269, pp. C286-C292, 1995.
- [182] M. Riehle and J. Bereiter-Hahn, "Kontraktilität und Sauerstoffverbrauch bei Kardiomyozyten in Kultur", *Mitteilungen für Wissenschaft und Technik*, vol. 10, pp. 226 - 231, 1994.
- [183] S. E. Harding, G. Vescovo, M. Kirby, S. M. Jones, J. Gurden, and P. A. Poole-Wilson, "Contractile Responses of Isolated Adult Rat and Rabbit Cardiac Myocytes to Isoproterenol and Calcium", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 20, pp. 635-647, 1988.
- [184] A. G. de Gende, A. D. P. Alzueta, and H. E. Cingolani, "Effect of isoproterenol on relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation", *Am. J. Physiol.*, vol. 233, pp. H404-409, 1977.
- [185] N. Shepard, M. Vornanen, and G. Isenberg, "Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes", *Am. J. Physiol.*, vol. 258, pp. H452 - H459, 1990.

- [186] M. S. Spach, R. C. Barr, E. A. Johnson, and J. M. Kootsey, "Cardiac extracellular potentials. Analysis of complex wave forms about the Purkinje networks in dogs", *Circ. Res.*, vol. 33, pp. 465-473, 1973.
- [187] M. S. Spach, W. T. Miller (III), E. Miller-Jones, R. B. Warren, and R. C. Barr, "Extracellular potentials related to intracellular action potentials during impulse conduction in anisotropic canine muscle", *Circ. Res.*, vol. 45, pp. 188-204, 1979.
- [190] 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*, vol. 246, pp. 243 - 247, 1989.
- [191] W. Nisch, J. Böck, U. Egert, H. Hämmerle, and A. Mohr, "A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 9, pp. 737-741, 1994.
- [192] J. Pine, "Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes", *J. Neurosci. Methods*, vol. 2, pp. 19-31, 1980.
- [193] W. Nisch, "Mikroelektroden-Anordnung", Deutsches Patent DE 195 29 371 C2, 1998.
- [194] M. J. Schöning, B. Weidenbrück, M. Thust, P. Kordos, and H. Lüth, "A silicon-based sensor array with capacitive EIS structures", presented at Eurosensors XI, Warschau, Polen, 1997.
- [195] M. Nakao, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, "Scanning-laser-beam semiconductor pH-imaging sensor", *Sensors and Actuators B*, vol. 20, pp. 119 - 123, 1994.
- [196] M. Nakao, S. Inoue, R. Oishi, T. Yoshinobu, and H. Iwasaki, "Observation of micriorganism colonies using a scanning-laser-beam pH-sensing microscope", *J. Ferm. Bioeng.*, vol. 79, pp. 163-166, 1995.
- [197] A. Barbaro, C. Colapicchioni, E. Davini, G. Mazzamurro, A. P. Piotta, and F. Porcelli, "CHEMFET Devices for Biomedical and Environmental Applications", *Advanced Materials*, vol. 4, pp. 402-408, 1992.
- [198] P. Bergveld, "Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. BME-19, pp. 342 - 351, 1972.
- [199] P. Bergveld, "Future Applications of ISFETs", *Sensors and Actuators B*, vol. 4, pp. 125 - 133, 1991.
- [200] P. Fromherz, "Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane", *European Biophysics Journal*, vol. 28, pp. 235-242, 1999.
- [201] B. H. van der Schoot and P. Bergveld, "ISFET Based Enzyme Sensors", *Biosensors*, vol. 3, pp. 161 - 186, 1987.
- [202] P. Woias, S. Koch, E. Müller, D. Barrow, J. Cefai, G. Curtis, and H. Hughes, "An ISFET-FIA system for high precision pH recording", *Sensors and Actuators B*, vol. 15-16, pp. 68-74, 1993.
- [203] B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, and M. Kraus, "Monitoring of cellular signaling and metabolism with modular sensor-technique. The PhysioControl-Microsystem (PCM)", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 13, pp. 501-509, 1997.
- [204] D. A. Robinson, "The Electrical Properties of Metal Microelectrodes", *Proceedings of the IEEE*, vol. 56, pp. 1065 - 1071, 1968.
- [205] J. H. Lucas, J. B. Kirkpatrick, and G. W. Gross, "A photoetched cell relocation matrix for long-term, quantitative observations of selected individual neurons in culture", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 14, pp. 211 - 219, 1985.

- [206] H. J. Reitboeck, "Fiber microelectrodes for electrophysiological recordings", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 8, pp. 249 - 262, 1983.
- [207] H. Hämmerle, U. Egert, A. Mohr, and W. Nisch, "Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 9, pp. 691 - 696, 1994.
- [208] 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*, vol. B34, pp. 265-269, 1996.
- [209] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, M. Fejtl, T. Knott, T. Müller, and H. Hämmerle, "A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays", *Brain Research Protocols*, vol. 2, pp. 229-242, 1998.
- [210] P. Horowitz and W. Hill, *The Art of Electronics*, 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- [211] H. Lüth, M. J. Schöning, and M. Thust, "Neue Ansätze für Chemo- und Biosensoren in Siliziumtechnik", *Physikalische Blätter*, vol. 53, pp. 423 - 427, 1997.
- [212] C. D. Fung, P. W. Cheung, and W. H. Ko, "A Generalized Theory of an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Field-Effekt Transistor", *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. ED-33, pp. 8 - 18, 1986.
- [213] A. Offenhäusser, C. Sprössler, M. Matsuzawa, and W. Knoll, "Field-Effect Transistor Array for Monitoring Electrical Activity from Mammalian Neurons in Culture", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 12, pp. 819-826, 1997.
- [214] A. S. Grove, *Physics and technology of semiconductor devices*, 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1967.
- [215] A. Marty and E. Neher, "Tight-Seal Whole-Cell Recording", in *Single-Channel Recording*, B. Sakmann and E. Neher, Eds., 2 ed. New York: Plenum Press, 1995, pp. 31-52.
- [216] N. Fidler and J. M. Fernandez, "Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements", *Biophys. J.*, vol. 56, pp. 1153-1162, 1989.
- [217] E. Neher, "Voltage Offsets in Patch-Clamp Experiments", in *Single-Channel Recording*, B. Sakmann and E. Neher, Eds., 2 ed. New York: Plenum Press, 1995, pp. 147 - 153.
- [218] F. J. Sigworth, *EPC-7 User's Manual*, List-Electronic, Darmstadt, Germany, 1996.
- [219] I. N. Bronstein and K. A. Semendjajew, *Taschenbuch der Mathematik*, 24 ed. Thun und Frankfurt /Main: Verlag Harri Deutsch, 1989.
- [220] E. Kamke, *Differentialgleichungen - Lösungsmethoden und Lösungen I*, 10 ed. Stuttgart: B. G. Teubner, 1983.
- [221] M. R. Spiegel, *Fourier-Analysis*, 1 ed. London: McGraw-Hill, 1990.
- [223] W. O. Gross, E. Schopf-Ebner, and O. M. Buchner, "Technique for the Preparation of Homogenous Cultures of Isolated Heart Muscle Cells", *Experimental Cell. Res.*, vol. 53, pp. 1 - 10, 1968.
- [224] T. Lindl and J. Bauer, *Zell- und Gewebekultur*, 3 ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1994.
- [225] Information booklet Neonatal Cardiomyocyte Isolation System, LOT # 36D247, Worthington biochemical corporation, Halls Mill Road, Freehold, New Jersey, 07728, US 1996.

- [226] B. Blondel, I. Roijen, and J. P. Cheneval, "Heart Cells in Culture: A Simple Method for Increasing the Proportion of Myoblasts", *Experientia*, vol. 27, pp. 356-358, 1971.
- [227] W. C. Claycomb, "Culture of cardiac muscle cells in serum-free media", *Exp. Cell Res.*, vol. 131, pp. 231-236, 1980.
- [228] 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*, vol. 55, pp. 573-583, 1994.
- [229] 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*, vol. 173, pp. 666-672, 1990.
- [230] O. P. Hamill and B. Salman, "Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells", *Nature*, vol. 294, pp. 462-464, 1981.
- [231] R. G. Ham, "An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines", *Exp. Cell Res.*, vol. 29, pp. 515-526, 1963.
- [232] C. L. Chio, R. F. Drong, D. T. Riley, G. S. Gill, J. L. Slightom, and M. H. R., "D4 Dopamine Receptor-mediated Signaling Events Determined in Transfected Chinese Hamster Ovary Cells", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, pp. 11813-11819, 1994.
- [233] C. L. Chio, M. E. Lajiness, and R. M. Huff, "Activation of Heterologously Expressed D3 Dopamine Receptors: Comparison with D2 Dopamine Receptors", *Molecular Pharmacology*, vol. 45, pp. 51-60, 1993.
- [234] S. Lake, H. Gullberg, J. Wahlqvist, A. M. Sjörgren, A. Kinhult, P. Lind, E. Hellström-Lindh, and J. Stjenschantz, "Cloning of the rat and human prostaglandin F_{2a} receptors and the expression of the rat prostaglandin F_{2a} receptor", *FEBS Letters*, vol. 355, pp. 317-325, 1994.
- [235] M. Huber, P. Heiduschka, S. Kienle, C. Pavlidis, J. Mack, T. Walk, G. Jung, and S. Thanos, "Modification of glassy carbon surfaces with synthetic laminin-derived peptides for nerve cell attachment and neurite growth", *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 41, pp. 278-288, 1998.
- [236] P. J. Lein, G. A. Banker, and D. Higgins, "Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture", *Brain Res. Dev. Brain Res.*, vol. 69, pp. 191-197, 1992.
- [237] J. Orly and G. Sato, "Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium", *Cell*, vol. 17, pp. 295-305, 1979.
- [238] J. H. Waite, "Evidence for a Repeating 3,4-Dihydroxyphenylalanine- and Hydroxyproline-containing Decapeptide in the Adhesive Protein of the Mussel, *Mytilus edulis* L.", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, pp. 2911 - 2915, 1982.
- [239] J. H. Waite and M. L. Tanzer, "Polyphenolic Substrates of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline", *Science*, vol. 212, pp. 1038 - 1041, 1981.
- [240] Information booklet Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive, LOT #40240, Collaborate Biomedical Products, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, MA 01730, US 1996.

- [241] F. Braet, R. D. Zanger, T. Sasaoki, M. Baekeland, P. Janssens, B. Smedsrod, and E. Wisse, "Methods in Laboratory Investigation: Assessment of a Method of Isolation, Purification, and Cultivation of Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cells", *Laboratory Investigation*, vol. 70, pp. 944 - 952, 1994.
- [242] F. Braet, W. H. J. Kalle, R. B. D. Zanger, B. G. D. Grooth, A. K. Raap, H. J. Tanke, and E. Wisse, "Comparative atomic force and scanning electron microscopy: an investigation on fenestrated endothelial cells in vitro", *Journal of Microscopy*, vol. 181, pp. 10 - 17, 1996.
- [243] B. S. Jacobson and D. Branton, "Plasma membrane: Rapid Isolation and Exposure of the Cytoplasmic Surface by Use of Positively Charged Beads", *Science*, vol. 195, pp. 302-304, 1977.
- [244] W. L. McKeehan, "Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers", *J. Cell Biol.*, vol. 71, pp. 727-734, 1976.
- [245] E. Yavin and Z. Yavin, "Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surfaces", *J. Cell. Biol.*, vol. 62, pp. 540-546, 1974.
- [246] A. A. Boulton, G. B. Baker, and W. Walz, *Practical Cell Culture Techniques*, vol. 23, 1 ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1992.
- [247] J. M. Davis, *Basic Cell Culture*, 1 ed. Oxford: IRL Press, 1994.
- [248] D. C. Darling and S. J. Morgan, *Animal Cells - Culture and Media*, 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.
- [249] P. M. Conn, *Methods in Neuroscience - Cell Culture*, vol. 2, 1 ed. San Diego: Academic Press, 1990.
- [250] J. Cohen and G. P. Wilkin, *Neuronal Cell Culture - A Practical Approach*, 1 ed. Oxford: IRL Press, 1995.
- [251] S. Risso and L. J. DeFelice, "Ca Channel Kinetics during the Spontaneous Heart Beat in Embryonic Chick Ventricle Cells", *Biophysical Journal*, vol. 65, pp. 1006 - 1018, 1993.
- [252] G. Wiegand, K. R. Neumaier, and E. Sackmann, "Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by reflection interference contrast microscopy (RICM)", *Applied Optics*, vol. 37, pp. 6892-6905, 1998.
- [253] J. R. Brews, "An improved high-frequency MOS capacitance formula", *J. Appl. Phys.*, vol. 45, pp. 1276-1279, 1974.
- [254] E. H. Nicollian and J. R. Brews, *MOS (Metal Oxide Semiconductor) Physics and Technology*, 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1982.
- [255] E. O. Johnson, "Large-Signal Surface Photovoltage Studies with Germanium", *Physical Review*, vol. 111, pp. 153 - 166, 1958.
- [256] W. H. Brattain and J. Bardeen, "Surface Properties of Germanium", *The Bell System Technical Journal*, vol. 32, pp. 1 - 41, 1953.
- [257] P. Chakrabarti, B. R. Abraham, A. Dhingra, A. Das, B. S. Sharan, and V. Maheshwari, "Effect of illumination on the characteristics of a proposed hetero-MIS diode", *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 39, pp. 507-514, 1992.
- [258] M. Madheswaran and P. Chakrabarti, "Frequency dependent characteristics of an optically controlled InP MIS capacitor", *Solid-State Electronics*, vol. 42, pp. 795-801, 1998.

- [259] C. G. B. Garrett and W. H. Brattain, "Physical Theory of Semiconductor Surfaces", *Physical Review*, vol. 99, pp. 376 - 387, 1955.
- [260] K. Dransfeld and P. Kienle, *Physik II: Elektrodynamik*, 3 ed. München: Oldenbourg Verlag, 1989.
- [261] R. Lindner, "Semiconductor surface varactor", *Bell System Technical Journal*, vol. 41, pp. 803-831, 1962.
- [262] M. Gouy, "Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte", *Comptes rendus hebdomadaires des Académies des Sciences*, vol. 149, pp. 654 - 657, 1909.
- [263] M. Gouy, "Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte", *Journal de Physique*, vol. 9, pp. 457 - 468, 1910.
- [264] D. L. Chapman, "A Contribution to the Theory of Electrocapillarity", *Philosophical Magazine*, vol. 25, pp. 475 - 481, 1913.
- [265] E. Gileadi, E. Kirowa-Eisner, and J. Penciner, *Interfacial Electrochemistry*, 1 ed. London: Addison-Wesley, 1975.
- [266] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*. New York: John Wiley and Sons, 1980.
- [267] G. M. Barrow and G. W. Herzog, *Physikalische Prinzipien und ihre Anwendung in der Chemie*, 1 ed. Braunschweig: Vieweg Verlag, 1979.
- [268] H. Helmholtz, "Studien über elektrische Grenzschichten", *Wiedemanns Annalen der Physik und Chemie*, vol. 7, pp. 337 - 382, 1879.
- [269] O. Stern, "Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht", *Zeitschrift für Elektrochemie*, vol. 30, pp. 508 - 516, 1924.
- [270] D. C. Grahame, "The electrical double layer and the theory of electrocapillarity", *Chemical Reviews*, vol. 41, pp. 441 - 501, 1947.
- [271] D. E. Yates and T. W. Healy, "The Structure of the Silica/Electrolyte Interface", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 55, pp. 9 - 19, 1976.
- [272] L. Bousse and P. Bergveld, "The Role of Buried OH Sites in the Response Mechanism of Inorganic-Gate pH-Sensitive ISFET's", *Sensors and Actuators*, vol. 6, pp. 65 - 78, 1984.
- [273] D. L. Harame, L. J. Bousse, J. D. Shott, and J. D. Meindl, "Ion-Sensing Devices with Silicon Nitride and Borosilicate Glass Insulators", *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 34, pp. 1700 - 1707, 1987.
- [274] T. Matsuo and M. Esushu, "Methods of ISFET fabrication", *Sensors & Actuators*, vol. 1, pp. 77-96, 1981.
- [275] T. J. Senden and C. J. Drummond, "Surface chemistry and tip-sample interactions in atomic force microscopy", *Colloids and Surfaces A*, vol. 94, pp. 29-51, 1995.
- [276] L. Bousse, N. F. d. Rooij, and P. Bergveld, "The Influence of Counter-Ion Adsorption on the y_0 /pH Characteristics of Insulator Surfaces", *Surface Science*, vol. 135, pp. 479 - 496, 1983.
- [277] L. Bousse and J. D. Meindl, "Surface Potential-pH Characteristics in the Theory of the Oxide-Electrolyte Interface", in *Geochemical Processes at Mineral Surfaces*, vol. 323, *ACS Symp Series*, J. A. Davies and K. F. Hayes, Eds.: American Chemical Society, 1986, pp. 79 - 98.
- [278] W. M. Siu and R. S. C. Cobbold, "Basic Properties of the Electrolyte-SiO₂-Si-System", *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, pp. 1805 - 1815, 1979.
- [279] S. R. Morrison, *Electrochemistry at Semiconductor and Oxidized Metal Electrodes*, 1 ed. New York: Plenum Press, 1980.

- [280] W. Leimbrock, U. Landgraf, and G. Kampfrath, "An extended site-binding model and experimental results of organic membranes for reference ISFETs", *Sensors and Actuators B*, vol. 2, pp. 1-6, 1990.
- [281] W. Torbicz and Z. Sypniewska, "An extended model of the electrolyte/hydrogen ion-sensitive field-effect transistor system", *Sensors and Actuators B*, vol. 7, pp. 565-571, 1992.
- [282] K. Dransfeld, P. Kienle, and H. Vonach, *Physik I: Newtonsche und relativistische Mechanik*, 5 ed. München: Oldenbourg Verlag, 1988.
- [283] E. Purcell, *Berkeley Physik Kurs 2: Elektrizität und Magnetismus*, 4 ed. Braunschweig: Vieweg, 1985.
- [284] N. E. Yates, S. Levine, and T. W. Healy, "Site-binding Model of the Electrical Double Layer at the Oxide/Water Interface", *Faraday Transactions I*, vol. 70, pp. 1807 - 1818, 1974.
- [285] J. A. Davis, R. O. James, and J. O. Leckie, "Surface Ionization and Complexation at the Oxide/Water Interface", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 63, pp. 480 - 499, 1978.
- [286] H. S. Carslaw and J. C. Jaeger, *Conduction of heat in solids*, 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1959.
- [287] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1979.
- [288] W. Gröbner and N. Hofreiter, *Integraltafel - Bestimmte Integrale*, vol. 2, 2 ed. Wien: Springer-Verlag, 1958.
- [289] S. Wolfram, "Mathematica 3.0 Programme, Wolfram Research", , 1994.
- [290] H. Israel, "Signal aus dem Rauschen", *Funkschau*, vol. Aug. 1981, pp. 67 -69, 1981.
- [291] L. Bousse and W. Parce, "Applying Silicon Micromachining to Cellular Metabolism", *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, vol. June/July 1994, pp. 396 - 401, 1994.

Zell-Halbleiter-Hybride

Anhang

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Lehrstuhl Professor Gaub)

Wolfgang J. Parak
Dachau

München
03.08.1999

Inhaltsverzeichnis

9	Anhang A: Sensoren zur Messung extrazellulärer Potentiale	
9.1	Extrazelluläre Mikroelektroden	3
9.2	Feldeffekttransistoren	8
10	Anhang B: Patch-clamp	
10.1	Ersatzschaltbild	11
10.2	Elektronik	13
10.3	Praktische Durchführung	14
10.4	Datenanalyse	16
10.5	Extrazelluläre Potentiale	19
11	Anhang C: Methoden zur Zellkultur und Zellcharakterisierung	
11.1	Präparationsprotokolle	22
11.2	Beschichtungsprotokolle	30
11.3	Allgemeine Zellkulturtechniken	32
11.4	Chemikalien und Medien	37
11.5	Das Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskop (RICM)	49
11.6	Das Cytosensor-Mikrophysiometer	53
12	Anhang D: Theorie des Licht-adressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS)	
12.1	Die Metall-Isolator-Halbleiter-Diode	56
12.2	Die Elektrolyt-Isolator-Metall-Diode	67
12.3	Die Elektrolyt-Isolator-Halbleiter-Diode	78
12.4	Diffusion Licht-generierter Ladungsträger in Halbleitern	82
13	Anhang E: Aufbau eines Licht-adressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS)	
13.1	Beschreibung des Aufbaus	98
13.2	Halbleiter-Substrate	100

9 Anhang A: Sensoren zur Messung extrazellulärer Potentiale

9.1 Extrazelluläre Mikroelektroden

(a) Funktionsweise

Mit Mikroelektroden können Oberflächenpotentiale in wäßriger Lösung gemessen werden: Planare Mikroelektroden-Felder bestehen aus einem isolierenden Substrat wie Glas, worauf Leiterbahnen aus Metall oder hochdotiertem Halbleiter-Material¹ aufgebracht sind. Diese sind bis auf die aktiven Meßpositionen an ihrem Ende mit einer Isolationsschicht² überzogen, siehe Abb. 9.1.1. Durch Spannungsmessung zwischen dem Leiter und einer Referenzelektrode im Elektrolyt können dann Potential-Änderungen an der Oberfläche der aktiven Meßposition verfolgt werden. In Mikroelektroden-Felder sind viele Leiterbahnen parallel geschaltet und damit orts aufgelöste Messungen möglich.

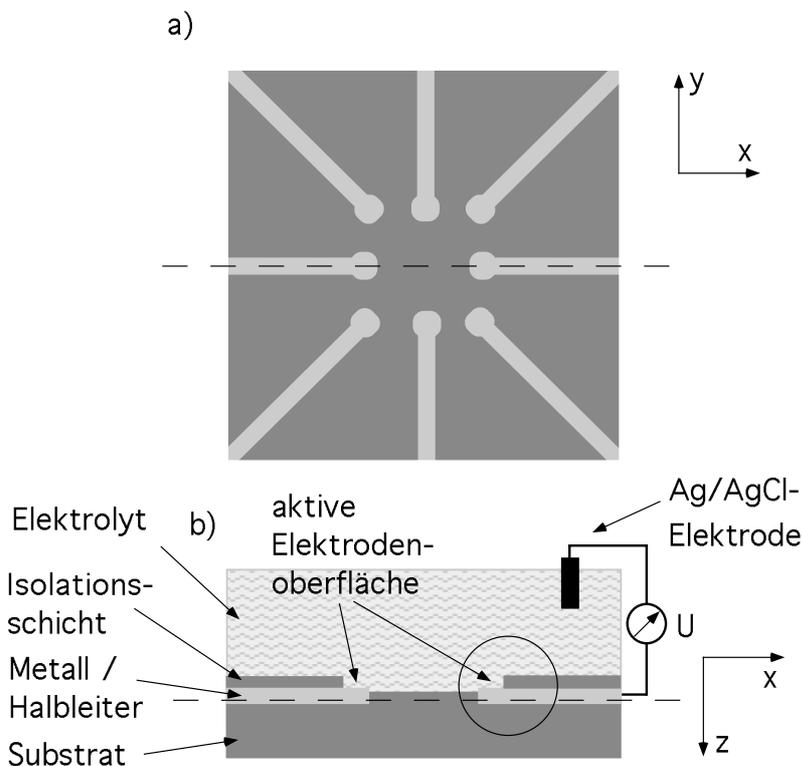


Abbildung 9.1.1:

Schematischer Aufbau eines planaren 8-fach Mikroelektroden-Feldes in wäßriger Lösung. a) Gezeigt sind die Leiterbahnen auf der Oberfläche des isolierenden Substrats (Schnitt entlang der in b) gestrichelt eingezeichneten Linie). b) Schnitt durch das Mikroelektroden-Feld entlang der in a) eingezeichneten gestrichelten Linie. Gezeigt sind zwei Leiterbahnen auf dem isolierenden Substrat, welche bis auf die aktive Meßposition an ihrer Spitze mit einer Isolationsschicht überzogen sind. Nur an den aktiven Meßpositionen besteht ein ohmscher Kontakt zur Elektrolyt-Lösung. Die mit einem Kreis umrandete aktive Meßposition ist in Abb. 9.1.2 im Detail dargestellt.

¹ Z.B. Gold bzw. platinisiertes Gold [175, 178, 204] (Eine galvanische Platinisierung verringert die Impedanz der Elektrode durch eine Vergrößerung der Oberfläche), ITO [15, 205] oder AgCl [179].

² Z.B. photoresistive Polymere [175], SiO₂ [178], Si₃N₄ [179], Al₂O₃ [15] oder PMMA [15].

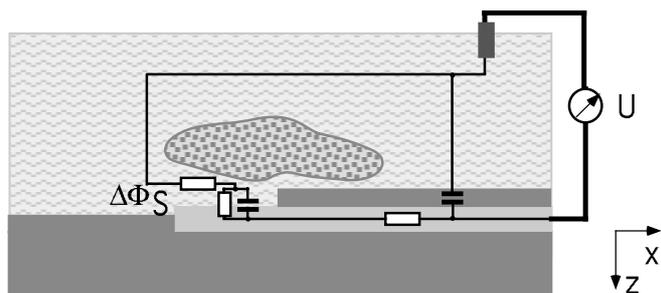
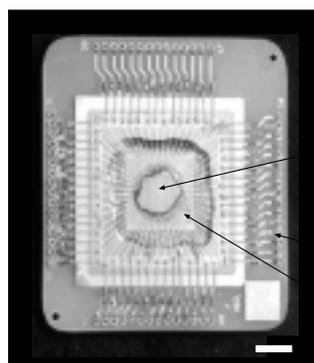


Abbildung 9.1.2: Elektrisches Ersatzschaltbild einer planaren Mikroelektrode [204]. Eingezeichnet sind der Widerstand der metallischen Leiterbahn, die Streukapazität der Isolationsschicht zwischen Leiterbahn und Elektrolyt, der Widerstand des Elektrolyten und Widerstand und Kapazität der elektrischen Abschirmschicht. Potentialänderungen $\Delta\Phi_S$ an der aktiven Meßposition können durch Spannungsmessung U aufgenommen werden.

Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit vorgestellten Bauelementen (FET, LAPS, FAPS) sind die aktiven Meßpositionen bei Mikroelektroden direkt mit dem Elektrolyt verbunden und nicht mit einer Isolationsschicht überzogen. Trotzdem ist die Mikroelektrode aufgrund der Ausbildung einer elektrischen Abschirmschicht („electrical double layer“) an der Leiter / Elektrolyt -Grenzfläche nicht rein ohmsch, sondern auch mit einem kapazitiven Anteil an den Elektrolyt gekoppelt³ [175, 204, 206], vgl. Abb. 9.1.2. Es ist damit nicht trivial, aus der gemessenen Spannung $U(t)$ die absolute Änderung des Oberflächenpotentials $\Delta\Phi_S(t)$ anzugeben. Dies ist nur unter Zuhilfenahme eines Ersatzschaltbildes möglich, welches die Abschirmschicht berücksichtigt [204].

(b) Praktischer Aufbau und Charakterisierung

Aufbau eines Mikroelektroden-Feldes: Felder extrazellulärer Mikroelektroden sind seit kurzer Zeit kommerziell erhältlich. In Abb. 9.1.3 und Abb. 9.1.4 ist als Beispiel ein 60-fach Feld der Firma NMI (Typ 100/10, Naturwissenschaftlich Medizinisches Institut, Reutlingen) abgebildet⁴. In diesem Bauelement sind die aktiven Meßpositionen über ein $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ -Raster verteilt, der Durchmesser einer aktiven Meßposition beträgt $10\ \mu\text{m}$ ⁵. Zum Auslesen der einzelnen Kanäle wurde in dieser Arbeit ein selbstgebauter Spannungsverstärker⁶ verwendet, welcher die Spannung U zwischen einer aktiver Meßposition und der Referenzelektrode 1000-fach verstärkt ausgibt.



Zone mit 60 aktiven Meßpositionen
Anschluss-Kontakte zu den Leiterbahnen
Plexiglas-Dichtring

Abbildung 9.1.3: Oberseite eines 60-fach Feldes extrazellulärer Mikroelektroden. Um in wässriger Lösung messen zu können, ist die Zone des Bauelements mit den 60 aktiven Meßpositionen mit einem Plexiglas-Dichtring umschlossen. Das ganze Bauelement ist mit seinem Glassubstrat auf eine Pertinax-Platine aufgeklebt und die Leiterbahnen der einzelnen Mikroelektroden mit Anschlußkontakten auf der Platine verbunden. Der Skalierungsbalken entspricht 1 mm.

³ Ein vorgeschlagenes Modell erklärt die Potentialeinkopplung über ein Umladen der Abschirmschicht.

⁴ Alle in diesem Kapitel beschriebenen Messungen wurden mit diesem Bauelement durchgeführt. Zu näheren Angaben über die Herstellung des Mikroelektroden-Feldes und Messungen an Zellen mit diesem Bauelement sei auf [191, 207-209] verwiesen.

⁵ Die Ortsauflösung im klassischen Sinn liegt deshalb etwas über $10\ \mu\text{m}$, da das Bauelement nur auf den Flächen aktiver Meßposition Potential-sensitiv ist. Allerdings beschreiben die $10\ \mu\text{m}$ nicht die reale Ortsauflösung, da nur alle $100\ \mu\text{m}$ eine aktive Meßposition vorliegt. Die reale Ortsauflösung wäre $10\ \mu\text{m}$, wenn die gesamte Oberfläche des Bauelementes dicht mit $10\ \mu\text{m}$ großen aktiven Meßpositionen überdeckt wäre.

⁶ Der Spannungsverstärker bestand im wesentlichen aus zwei hintereinander geschalteten invertierenden Verstärkern [210].

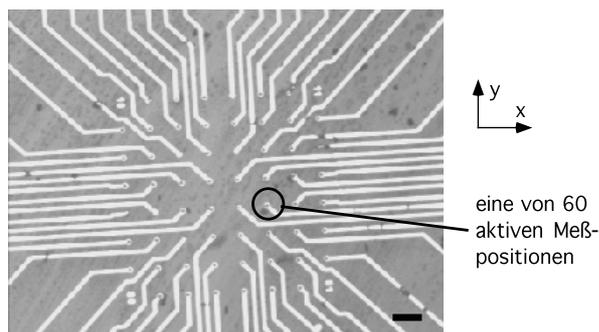


Abbildung 9.1.4: Ausschnitt aus Abb. 9.1.3, welcher die Zone mit aktiven 60 aktiven Meßpositionen auf der Oberfläche des Bauelements zeigt. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μm .

eine von 60 aktiven Meßpositionen

Demonstration der Ortsauflösung: Um die Ortsauflösung an einer aktiven Meßposition zu demonstrieren, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurde mit einer patch-clamp Pipette im Elektrolyt ein Testpotential über einer aktiven Meßposition erzeugt und dieses mit der Mikroelektrode detektiert⁷. Zum anderen von ein von der Mikroelektrode erzeugten Testpotential mit einer sich im Elektrolyt befindenden patch-clamp Pipette⁸ detektiert. Dazu wurde die Spitze der patch-clamp Pipette möglichst dicht an die Oberfläche des Mikroelektrodenfeldes herangefahren und der laterale Abstand Δy zwischen Pipettenspitze und der Mitte der aktiven Meßposition variiert, vgl. Abb. 9.1.5 und Abb. 9.1.6. Es zeigte sich, daß patch-clamp Pipetten aufgrund ihrer ungünstigen Geometrie nicht gut geeignet sind, um Potentiale direkt auf einer planaren, harten Oberfläche zu detektieren oder zu erzeugen.

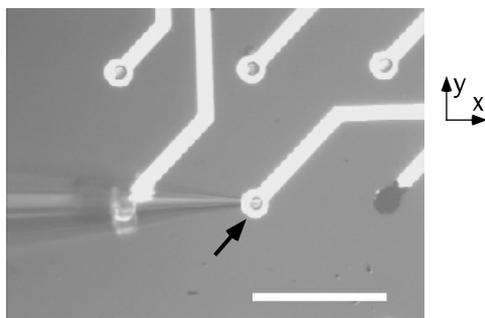


Abbildung 9.1.5: Abbildung einer patch-clamp Pipette in Elektrolyt, welche dicht über einer aktiven Meßposition positioniert ist, siehe Pfeil. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μm .

⁷ Es wurden im voltage-clamp Modus Spannungspulse mit Amplitude $U_{\text{pip}} = 0,5 \text{ V}$ zwischen der Pipettenspitze und der Referenzelektrode appliziert und die Spannung U zwischen der aktiven Meßposition und der Referenzelektrode gemessen. Das Pipettenpotential U_{pip} entsprach dabei einem Testpotential $\Delta\Phi_S$ nahe der Mikroelektrodenoberfläche. Während der Spannungspulse floß ein Strom von $I_{\text{pip}} \approx 100 \text{ nA}$ durch die Pipettenspitze. Nur bei direkter Positionierung $\Delta y = 0$ der Pipette über der aktiven Meßposition konnten Änderungen in U von ca. $0,5 \mu\text{V}$ gemessen werden, d.h. nur ein Millionstel des durch die Pipette applizierten Potentials konnte mit der Mikroelektrode abgeleitet werden. Dies lag vermutlich daran, daß die applizierte Spannung U_{pip} vorwiegend in der Pipettenspitze abfiel, da dort der Widerstand am größten war. Außerdem war der Mittelpunkt der Pipettenspitze so weit von der Oberfläche der aktiven Meßposition entfernt, daß dort nur noch ein kleiner Teil der angelegten Spannung abfiel.

⁸ Es wurden Spannungspulse mit einer Amplitude $\Delta U = 1 \text{ V}$ zwischen einer aktiven Meßposition und einer Referenzelektrode angelegt und der resultierende Potentialabfall im Elektrolyt mit einer Pipette im current-clamp Modus gemessen (U_{pip}). Dabei war das erzeugte Potential direkt über der aktiven Meßposition ($\Delta y=0$) mit ca. 20 mV am größten und fiel für größer werdende laterale Entfernungen Δy ab, vgl. Abb. 9.1.6. Die mittlere Halbwertsbreite der $U_{\text{pip}}(\Delta y)$ -Kurve entspricht nicht der Ortsauflösung, da die Höhe des Mittelpunkts der Pipette Δz über der Oberfläche einige 100 nm betrug und damit nur noch ein abgeschirmtes Coulomb-Potential an der Stelle der Pipettenspitze vorlag. Es zeigte sich, daß Detektion und Stimulation nicht umkehrbar sind: Die Mikroelektrode registrierte nur ein Millionstel des von der Pipette erzeugten Signals, während die Pipette ca. ein Fünfzigstel des von der Mikroelektrode erzeugten Potentials detektieren konnte. Dies liegt an der unterschiedlichen Geometrie von Pipettenspitze und aktiver Meßposition. Für quantitative Experimente wäre daher eine einfache, definierte Geometrie nötig, wie z.B. der direkte Kontakt der Metallspitze einer Metall-Nadelmikroelektrode auf der Mikroelektrodenoberfläche [191].

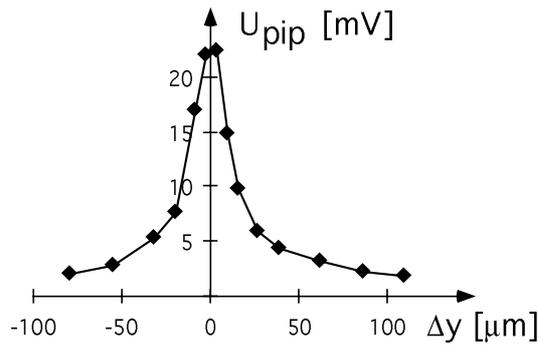


Abbildung 9.1.6: Zwischen Referenzelektrode und einer aktiven Meßposition wurde ein Potentialpuls $U = 1 \text{ V}$ angelegt. Dargestellt ist das mit einer patch-clamp Pipette über der aktiven Meßposition gemessene Potential U_{pip} , in Abhängigkeit des lateralen Abstandes Δy der Pipettenspitze vom Mittelpunkt der aktiven Meßposition.

Abschätzung der Potentialempfindlichkeit: Zur Abschätzung der Potentialempfindlichkeit wurde die Zone mit den aktiven Meßpositionen mit pH=7-Puffer (#109439, Merck, Darmstadt) gefüllt und die Spannung $U(t)$ zwischen einer aktiven Meßposition und der Referenz-Elektrode, einem in KCl elektrolysierten Silberdraht gemessen, vgl. Abb. 9.1.7. Mit Hilfe der Messungen wurde die Standardabweichung der Spannungsfluktuation $\Delta\Delta U$ ⁹ bestimmt.

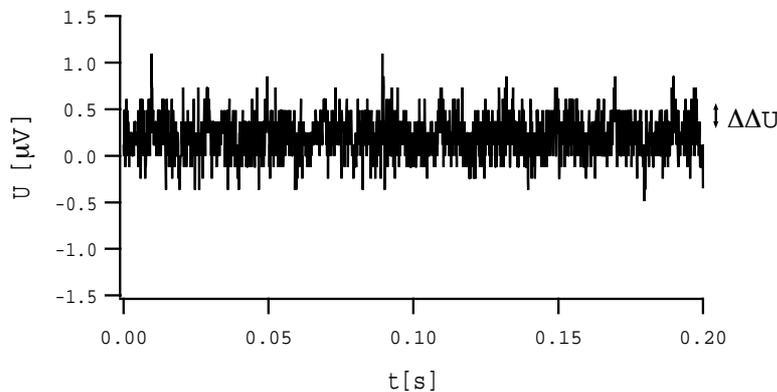


Abbildung 9.1.7: Aufzeichnung der gemessene Spannung $U(t)$ zwischen einer aktiven Meßposition und der Referenzelektrode in Elektrolyt.

In den durchgeführten Experimenten wurde bei einer Bandbreite von 100 kHz $\Delta\Delta U = 7 \pm 2 \mu\text{V}$, nach einem zusätzlichen 3 kHz-Tiefpaß-Filter $\Delta\Delta U = 0,22 \pm 0,05 \mu\text{V}$ gefunden. Da Testpotentiale $\Delta\Phi_S$ nicht rein ohmsch in die Leiterbahn der Mikroelektrode einkoppeln, sondern durch die Ausbildung einer elektrischen Abschirmschicht abgeschwächt werden, können die gemessenen Spannungsfluktuationen $\Delta U(t)$ kleiner sein als die realen Fluktuationen im Oberflächenpotential $\Delta\Phi_S(t)$, d.h. $\Delta\Delta\Phi_S \geq \Delta\Delta U$. Bei 3 kHz Bandbreite beträgt die Potentialauflösung also höchstens $\Delta\Delta\Phi_S \geq 0,22 \mu\text{V}$.

⁹ Als Spannungsfluktuation $\Delta U(t) = U(t) - U^{\text{const}}$ wird der gemessene Spannungsverlauf $U(t)$ minus dessen konstanten Offsets U^{const} bezeichnet. $\Delta\Delta U$ ist die Standardabweichung von $\Delta U(t)$, berechnet über ein Zeitintervall von einer Sekunde.

(c) Licht-adressierbare Mikroelektroden-Felder

Mit Hilfe von Licht-adressierbaren Mikroelektroden-Feldern kann die Zahl der benötigten Leiterbahnen drastisch reduziert werden. Das Prinzip ist in Abb. 9.1.8 skizziert [193]: Auf einem isolierenden Substrat befinden sich n parallele Leiterbahnstreifen, z.B. aus ITO. Diese Anordnung ist mit einer dünnen Schicht aus amorphem Silizium überzogen. Darauf verteilt sind über den Leiterbahnstreifen Gold-Kontakte angebracht, z.B. je n Stück pro Leiterbahnstreifen. Durch diese Goldkontakte sind nun n^2 aktive Meßpositionen definiert. Der Rest der Oberfläche ist mit einer Isolationsschicht bedeckt, z.B. Si_3N_4 . Im Normalfall ist amorphes Silizium nur schlecht leitend, d.h. der Widerstand zwischen den Gold-Kontakten und den darunter liegenden Leiterbahnen ist sehr hoch. Wird dagegen das amorphe Silizium unter einem Gold-Kontakt mit einem Lichtzeiger beleuchtet, so wird durch dessen stark angestiegene Leitfähigkeit ein niederohmiger Kontakt zwischen Gold-Kontakt und darunterliegender Leiterbahn geschlossen. D.h. nur an der beleuchteten aktiven Meßposition ist der Goldkontakt leitend mit der darunterliegenden Leiterbahn verbunden. Bei Messung der Spannung U zwischen der Leiterbahn und einer Referenzelektrode im Elektrolyt können dann Testpotentiale $\Delta\Phi_S$ an der beleuchteten Meßposition analog zu konventionellen Mikroelektroden verfolgt werden. Potentiale an unbeleuchteten aktiven Positionen spielen keine Rolle, da sie nicht leitend mit der Leiterbahn verbunden sind. Auf diese Weise kann mit Hilfe eines Lichtzeigers eine aktive Position zu Messung ausgewählt werden.

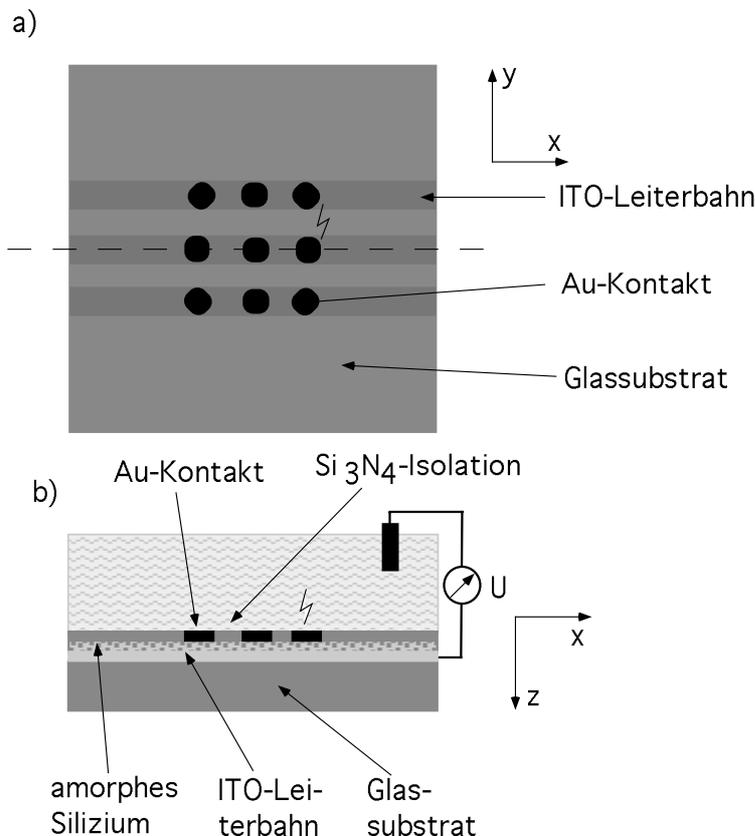


Abbildung 9.1.8: Prinzip eines Licht-adressierbaren 9-fach Mikroelektroden-Feldes. Auf einem Glassubstrat sind 3 Leiterbahnen aus ITO (Indium-Zinn-Oxid) aufgebracht. Darüber befindet sich eine Schicht aus amorphem Silizium. An den aktiven Meßpositionen sind auf der Siliziumschicht Gold-Kontakte angebracht, der Rest der Oberfläche ist mit einer isolierenden Si_3N_4 -Schicht überzogen. Mit Hilfe eines Lichtzeigers (eingezeichnet als Blitz über der rechten Elektrode der mittleren Bahn) kann eine aktive Meßposition ausgewählt werden. a) Blick auf die Oberfläche. Durch die transparente Si_3N_4 - und Silizium-Schicht sind die Leiterbahnen erkennbar. b) Schnitt durch das Bauelement, entlang der in a) eingezeichneten gestrichelten Linie.

9.2 Feldeffekttransistoren

(a) Funktionsweise

Oberflächenpotentiale in wässriger Lösung können mit Feldeffekttransistoren (FET) in Elektrolyt-Isolator-Halbleiter (EIS) - Geometrie detektiert werden („EISFET“, „CHEMFET“). Anstelle der bei MOSFETs üblichen metallischen Gate-Elektrode [151], steht die Isolationsschicht am Gate hier in direktem Kontakt mit dem Elektrolyt, wie in Abb. 9.2.1 skizziert ist [153, 199, 201, 211, 212]. Das auf die Gate-Elektrode wirkende Potential U_{gate} setzt sich dabei aus der angelegten Vorspannung U_{bias} , der zu messenden Potentialänderung auf der Oberfläche $\Delta\Phi_S$ und etwaigen Spannungsabfällen an der Referenz-Elektrode zusammen, es entspricht dem Gate-Source-Potential U_{GS} eines konventionellen FETs (Gl. 1). Änderungen des Oberflächenpotentials $\Delta\Phi_S$ auf der Gate-Isolationsschicht können deshalb durch Messung des Drain-Source-Stroms I_{DS} verfolgt werden (Gl. 1-2). Ortsaufgelöste Messungen sind mit FET-Feldern, d.h. paralleler Anordnung mehrerer FETs entlang einer Oberfläche möglich, siehe Abb. 9.2.2. Natürlich ist das Oberflächenpotential nur an aktiven Meßpositionen meßbar, d. h. an Stellen an denen eine Gate-Elektrode angeordnet ist. Damit ist die Möglichkeit der Ortsauflösung durch die Zahl und Dichte der Gate-Elektroden eingeschränkt.

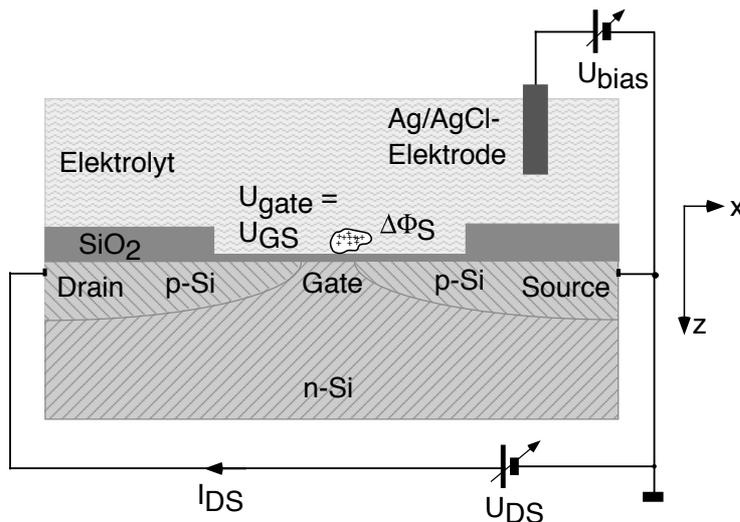


Abbildung 9.2.1: Aufbau eines Feldeffekttransistors in EIS-Geometrie mit drei Anschlüssen (Source, Drain, Gate). Das Potential der Gate-Elektrode wird über eine Referenz (Ag/AgCl)-Elektrode im Elektrolyt eingestellt. Hier ist ein p-Kanal-FET dargestellt, d.h. das Substrat ist n-dotiert, die Kennlinie ist analog zu der eines MOSFETs [151]. Das Oberflächenpotential U_{gate} an der Gate-Elektrode setzt sich aus der angelegten Vorspannung U_{bias} und dem zu untersuchenden Testpotential $\Delta\Phi_S$ zusammen. Unter zusätzlicher Einstellung der Drain-Source-Spannung U_{DS} wird der resultierende Drain-Source-Strom I_{DS} gemessen.

$$U_{\text{gate}} = U_{\text{GS}} = U_{\text{bias}} + \Delta\Phi_S + \text{const} \quad (1)$$

$$I_{\text{DS}} = I_{\text{DS}}(U_{\text{gate}}) \quad (2)$$

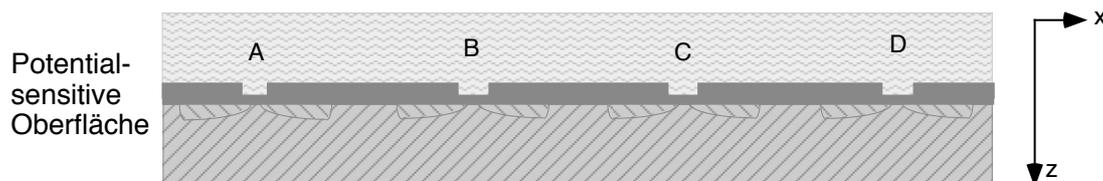


Abbildung 9.2.2: Prinzipieller Aufbau eines FET-Feldes, bestehend aus 4 einzelnen FETs. Detektion von Oberflächenpotentialen ist nur an aktiven Stellen (A,B,C,D) möglich, an welchen Gate-Elektroden angeordnet sind.

(b) Praktischer Aufbau und Charakterisierung¹⁰

Aufbau eines EISFET-Feldes: Ein von Dr. A. Offenhäusser entwickeltes EISFET-Feld mit 16 integrierten FETs ist in Abb. 9.2.3 abgebildet [63, 134, 213]. Die Größe der einzelnen Gate-Elektroden liegt dabei zwischen $28\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$, der Abstand der einzelnen Gates beträgt $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Abb. 9.2.4 zeigt eine Photographie der Oberfläche des FET-Feldes.

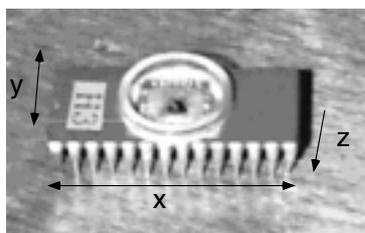


Abbildung 9.2.3: Bauelement mit 16 integrierten Feldeffekttransistoren mit Länge $x = 35\ \text{mm}$ und Breite $y = 15\ \text{mm}$. In den Plexiglasring auf der Oberseite kann eine Zellsuspension gefüllt werden, damit Zellen auf der Oberfläche des FET-Feldes aufwachsen können.

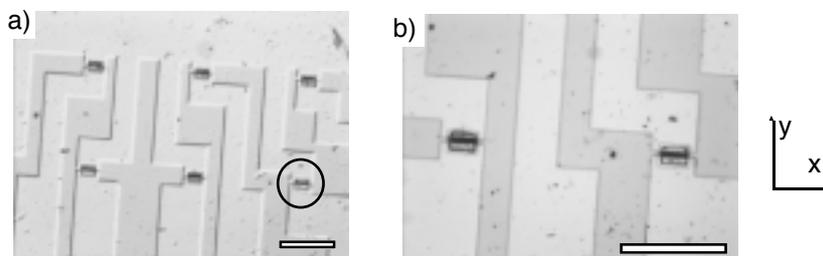


Abbildung 9.2.4: Bild der EISFET-Oberfläche. a) sichtbar sind 6 Gate-Elektroden, wobei eine davon zur Verdeutlichung mit einem Kreis umrandet ist. Weiterhin sind die nötigen Zuleitungen zu den Elektroden erkennbar. b) Detail-Vergrößerung von 2 Gate-Elektroden. Die Balken stellen jeweils $100\ \mu\text{m}$ dar.

Aufnahme von Kennlinien: Die Eigenschaften eines FETs werden durch seine Ausgangs-Kennlinie, in welcher der Drain-Source-Strom gegen die Drain-Source-Spannung und durch seine Transfer-Kennlinie, in welcher der Drain-Source-Strom gegen die Gate-Source-Spannung oder genauer gesagt gegen die Vorspannung aufgetragen wird, beschrieben. In Abb. 9.2.5 ist die Kennlinienschar eines EISFETs dargestellt.

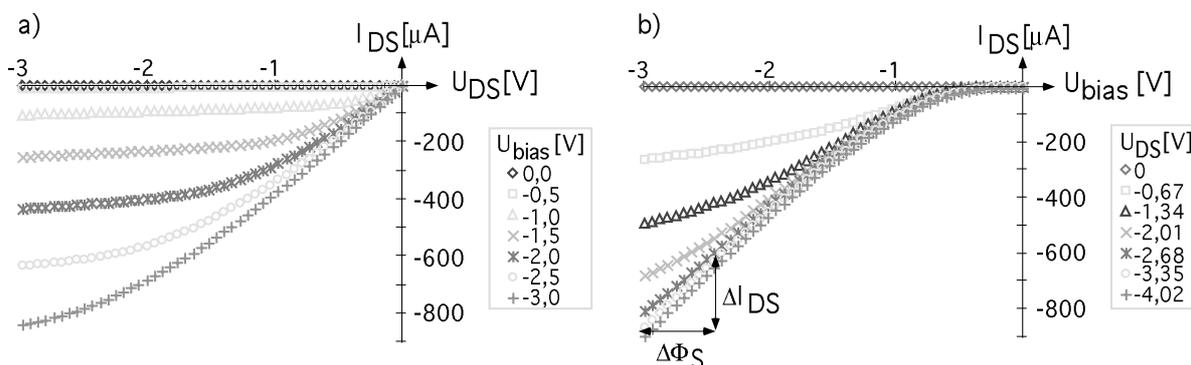


Abbildung 9.2.5: EISFET-Kennlinien. Dargestellt sind exemplarisch a) eine Ausgangs- und b) eine Transfer-Kennlinienschar. Dabei wird der absolute Drain-Source-Strom I_{DS} in Abhängigkeit der Drain-Source- (U_{DS}) bzw. der Vorspannung (U_{bias}) gemessen. Die jeweils andere Spannung ist als Parameter rechts neben den Diagrammen eingetragen. Bei einer Vorspannung von $U_{bias} = -3\ \text{V}$ und einer Drain-Source-Spannung U_{DS} um $-3\ \text{V}$ ist die Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie am höchsten ($dI_{DS}/dU_{bias} \approx 0,4\ \mu\text{A}/\text{mV}$) und der Drain-Source-Strom reagiert maximal sensitiv auf Potentialfluktuationen $\Delta \Phi_S$. Dort ist der geeignete Arbeitspunkt des FETs.

¹⁰ Alle Messungen in diesem Kapitel wurden am Aufbau von Dr. A. Offenhäusser zusammen mit Dr. A. Offenhäusser, Dr. C. Sprössler, M. George und S. Kölblin durchgeführt [147, 148].

Abschätzung der Potentialempfindlichkeit: Zur Messung des Oberflächenpotentials wird die Vorspannung U_{bias} so eingestellt, daß der Drain-Source-Strom I_{DS} maximal sensitiv auf Änderungen im Oberflächenpotential ist, d.h. bei maximaler Steigung der Transfer-Kennlinie $g_m := dI_{\text{DS}}/dU_{\text{bias}}|_{\text{max}}$ [214, (K.11.2, S.321)]. g_m ist typischerweise $0,1 - 0,5 \mu\text{A}/\text{mV}$ [63]¹¹. Um die Empfindlichkeit in der Messung des Drain-Source-Stroms zu erhöhen, wird bei konstanter Vorspannung U_{bias} der konstante Anteil $I_{\text{DS}}^{\text{const}}$ im Drain-Source-Strom direkt im Vorverstärker abgezogen¹². Damit werden nur zeitliche Änderungen des Stroms $\Delta I_{\text{DS}}(t)$, mit $I_{\text{DS}}(t) = I_{\text{DS}}^{\text{const}} + \Delta I_{\text{DS}}(t)$ gemessen [63, 134]. Änderungen im Oberflächenpotential $\Delta\Phi_S$ an der Gate-Elektrode von 1 mV ändern den Drain-Source-Strom dann typischerweise um $\Delta I_{\text{DS}} = 0,1-0,5 \mu\text{A}$.

In Abb. 9.2.6 ist das Ausgangssignal $\Delta I_{\text{DS}}(t)$ eines mit $\text{pH}=7$ Pufferlösung gefüllten FETs bei konstanter Vorspannung gezeigt. Das Rauschen im gemessenen Strom begrenzt dabei die Empfindlichkeit von Oberflächenpotential-Messungen. Als Rauschen $\Delta\Delta I_{\text{DS}}$ wird im folgenden die Standardabweichung der Fluktuationen des Drain-Source-Stroms definiert (Gl. 3). In der in Abb. 9.2.6 gezeigten Messung beträgt das bei 3 kHz Tiefpaß-gefilterte Rauschen im Drain-Source-Strom $\Delta\Delta I_{\text{DS}} = 12 \text{ nA}$. Mit Hilfe der Transfer-Kennlinie kann dieser Wert in ein dazu äquivalentes Rauschen im Oberflächenpotential $\Delta\Delta\Phi_S$ transformiert werden: $\Delta\Delta\Phi_S = \Delta\Delta I_{\text{DS}} / (dI_{\text{DS}}/dU_{\text{bias}}) = 12 \text{ nA} / 0,4 \mu\text{AmV}^{-1} = 30 \mu\text{V}$. Typischerweise beträgt die Potentialempfindlichkeit der FET-Felder von A. Offenhäuser bei 10 kHz Bandbreite $\Delta\Delta\Phi_S \approx 70 \mu\text{V}$ [63].

$$\Delta\Delta I_{\text{DS}} = \sqrt{\frac{1}{1s} \int_{t'}^{t'+1s} (\Delta I_{\text{DS}}(t) - \overline{\Delta I_{\text{DS}}})^2 dt}, \quad \overline{\Delta I_{\text{DS}}} = \frac{1}{1s} \int_{t'}^{t'+1s} \Delta I_{\text{DS}}(t) dt \quad (3)$$

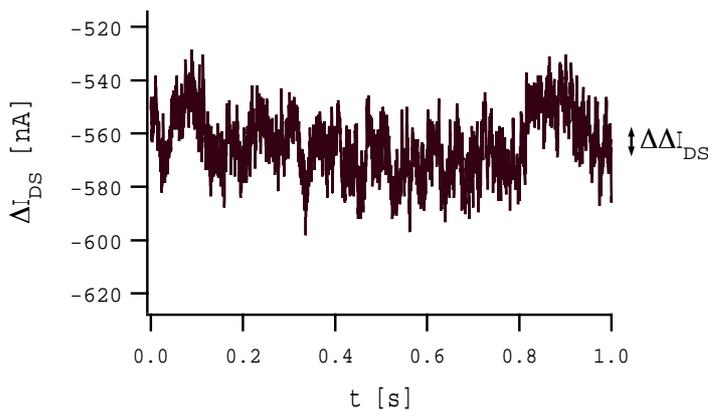


Abbildung 9.2.6: 3 kHz Tiefpaß-gefiltertes Rauschsignal eines FETs bei einer Vorspannung $U_{\text{bias}} = -3 \text{ V}$ und einer Drain-Source-Spannung $U_{\text{DS}} = -3 \text{ V}$ bei einer Abtastrate von 4 kHz . $\Delta I_{\text{DS}}(t) = I_{\text{DS}}(t) - I_{\text{DS}}^{\text{const}}$ ist dabei die zeitliche Änderung des Photostroms, wobei der bei Beginn der Messung ermittelte konstante „offset“ $I_{\text{DS}}^{\text{const}}$ von ca. $900 \mu\text{A}$ (vgl. Abb. 9.2.5.b) im Strom direkt in der ersten Vorverstärkerstufe abgezogen wurde. $\Delta\Delta I_{\text{DS}}$ ist die Standardabweichung der Stromfluktuationen $\Delta I_{\text{DS}}(t)$, gemittelt über einen Zeitraum von 1 s .

¹¹ Die normierte Steilheit einer FET-Kennlinie $(dI_{\text{DS}}/dU_{\text{bias}}) / I_{\text{DS}}$ ist typischerweise $\approx 1 \text{ V}^{-1}$ (vgl. Daten aus [28, 213]).

¹² Dadurch kann im Vorverstärker der Strom höher verstärkt werden. Bei einer Vorspannung U_{bias} um -3 V und U_{DS} um -3 V liegt der konstante Anteil des Photostroms $I_{\text{DS}}^{\text{const}}$ im Bereich von 1 mA , vgl. Abb. 9.2.5, während das Stromrauschen $\Delta\Delta I_{\text{DS}}$ im Bereich um 10 nA liegt, vgl. Abb. 9.2.6. Das Problem eines kleinen Meßsignals auf einem hohen Trägersignal („offset“) ist damit ähnlich wie beim LAPS. Der konstante Gleichstrom-Anteil beim FET läßt sich aber leichter kompensieren, als der konstante anharmonische Wechselstrom-Anteil beim LAPS.

10 Anhang B: Patch-clamp

10.1 Ersatzschaltbild

In diesem Kapitel wird das elektrische Ersatzschaltbild eines Kontakts zwischen einer patch-clamp Pipette und einer Zelle beschrieben. Dabei werden keine aktiven Ionenkanäle berücksichtigt [44, 57, 215]. In dem in Abb. 2.1.2 gezeigten Ersatzschaltbild ist $R_M[\Omega]$ der Membranwiderstand, $C_M[F]$ die Membrankapazität, $R_{ZA}[\Omega] \ll R_M$ der Zugriffswiderstand durch die Pipette („access resistance“), $U_{MH}[V]$ das durch die Pipette angelegte Haltepotential, $I_M[A]$ der gemessene Strom durch Pipette, $U_{MR}[V]$ das Ruhepotential der Zelle („resting potential“), $U_M[V] = \psi_{Zi} - \psi_{Za}$ das Membranpotential der Zelle [40, (K.2, S.24)], $\psi_{Zi}[V]$ das intrazelluläre Potential und $\psi_{Za}[V] = 0$ das als Masse definierte extrazelluläre Potential im Volumen des Elektrolyts. Mit Hilfe der Kirchhoffschen Knoten- und Schleifen-Regel gilt für den in Abb. 2.1.2 gezeigten Schaltkreis:

$$U_{MH} = \psi_{Zi} + R_{ZA}I_M \quad (1)$$

$$I_M = I_1 + I_2 \quad (2)$$

$$I_2 = C_M d\psi_{Zi}/dt \quad (3)$$

$$\psi_{Zi} = R_M I_1 + U_{MR} \quad (4)$$

Zur Bestimmung der passiven Membraneigenschaften (R_M , C_M) wird der Zelle ein Haltepotential $U_{MH}(t)$ aufgeprägt und der dabei durch die Membran fließende Strom $I_M(t)$ gemessen: Der nach einem applizierten Spannungspuls $U_{MR}+U_{M0}$ exponentiell abklingende Strom kann durch die drei Parameter $I_M(\infty)$, $I_M(0)$ und τ_M beschrieben werden, vgl. Abb. 2.1.2. Aus diesen Parametern können R_M , R_{ZA} und C_M bestimmt werden.

Der Zusammenhang zwischen $I_M(\infty)$, $I_M(0)$, τ_M und R_M , R_{ZA} und C_M wird hier nun für einen Spannungssprung von U_{MR} nach $U_{MR}+U_{M0}$ analytisch angegeben. Dazu müssen die 4 Gleichungen (Gl. 1-4) mit 4 Unbekannten I_M , I_1 , I_2 , ψ_{Zi} nach I_M aufgelöst werden:

$$(2, 3, 4) \Rightarrow$$

$$\begin{aligned} I_M &= \psi_{Zi}/R_M - U_{MR}/R_M + C_M d\psi_{Zi}/dt \\ &=(1)= U_{MH}/R_M - R_{ZA}I_M/R_M - U_{MR}/R_M + C_M dU_{MH}/dt - R_{ZA}C_M dI_M/dt \\ \Leftrightarrow I_M(1+R_{ZA}/R_M) + R_{ZA}C_M dI_M/dt &= (U_{MH}-U_{MR})/R_M + C_M dU_{MH}/dt \end{aligned} \quad (5)$$

Gl. 5 entspricht einer inhomogenen linearen Differentialgleichung (DGL.) erster Ordnung, deren Lösung sich aus der Summe der allgemeinen Lösung der homogenen DGL. und einer speziellen Lösung der inhomogenen DGL. zusammensetzt:

Lösung der homogenen DGL.:

$$I_M(1+R_{ZA}/R_M) + R_{ZA}C_M dI_M/dt = 0 \quad (6)$$

$$\text{Gl. 6 } | :I_M(1+R_{ZA}/R_M) |^{-1} | \bullet dt | \int, \text{ mit } \tau_M = \frac{C_M}{\frac{1}{R_{ZA}} + \frac{1}{R_M}} \quad (7)$$

$$\Rightarrow \int \frac{dI_M}{I_M} = -\frac{1}{\tau_M} \int dt$$

$$\Leftrightarrow I_M(t) = I_M^* \exp(-t/\tau_M), \text{ mit } I_M^* = \text{const (durch Randbedingungen gegeben)} \quad (8)$$

Lösung der inhomogenen DGL.:

extern angelegte Spannungsstufe:

$$U_{MH}(t) = U_{MR} + U_{M0}\Theta(t) \quad (\text{mit } \Theta\text{-Funktion: } \Theta(t) = 1 \text{ für } t \geq 0, 0 \text{ für } t < 0) \quad (9)$$

$U_{M0} < 0$, da aktive Kanäle bei einem kleinen hyperpolarisierenden Puls geschlossen bleiben

Zeit $t < 0$: Im Gleichgewicht (GGW.) ist die Impedanz der Membrankapazität unendlich, d.h. es bleibt eine Parallelschaltung aus 2 gleich großen Spannungsquellen $U_{MH} = U_{MR}$ und U_{MR} übrig und es fließt kein Strom:

$$U_{MH} = U_{MR}, \quad dU_M/dt = 0, \quad \text{GGW.} \Rightarrow dI_M/dt = 0, \quad (5) \Rightarrow I_M(t < 0) = 0 \quad (10)$$

Zeit $t \rightarrow \infty$: Im GGW. fließt der Strom über eine Reihenschaltung aus R_M und R_{ZA} , da die Impedanz der Membrankapazität dort unendlich ist:

$$U_{MH} = U_{MR} + U_{M0} = \text{const} \Rightarrow dU_M/dt = 0, \quad \text{GGW.} \Rightarrow dI_M/dt = 0,$$

$$(5) \Rightarrow I_M(\infty) (1 + R_{ZA}/R_M) = U_{M0}/R_M \Rightarrow I_M(\infty) = \frac{U_{M0}}{R_M (1 + \frac{R_{ZA}}{R_M})} = \frac{U_{M0}}{R_M + R_{ZA}} \quad (11)$$

$$(8) \Rightarrow I_M(t) = I_M^* \exp(-t/\tau_M) + U_{M0}/(R_M + R_{ZA}) \quad (12)$$

Zeit $t=0$: Spannungspuls zur Zeit $t = 0$

\Rightarrow Impedanz der Membrankapazität geht gegen 0, d.h. U_{MR} und R_M sind „kurzgeschlossen“

$$\Rightarrow \psi_{Zi} = \psi_{Za} = 0 \Rightarrow I_M(0) = U_{M0}/R_{ZA} \quad (13)$$

$$\Rightarrow I_M(t) = (U_{M0}/R_{ZA} - U_{M0}/(R_M + R_{ZA})) \cdot \exp(-t/\tau_M) + U_{M0}/(R_M + R_{ZA}) \quad (14)$$

Insgesamt gilt:

$$I_M(t) = (I_M(0) - I_M(\infty)) \exp(-t/\tau_M) + I_M(\infty) \quad (15)$$

wobei $I_M(\infty)$, $I_M(0)$ und τ_M Meßgrößen sind, vgl. Abb. 2.1.2. Aus diesen Werten können R_M , R_{ZA} und C_M wie folgt berechnet werden:

$$R_{ZA} = (13) = U_{M0}/I_M(0) \quad (16)$$

$$R_M = (11) = U_{M0}/I_M(\infty) - R_{ZA} \quad (17)$$

$$C_M = (7) = \tau_M (1/R_M + 1/R_{ZA}) \quad (18)$$

In realen Messungen ist der Kapazität der Zelle noch die Kapazität der Meßpipette überlagert. Die Pipettenkapazität kann entweder über einen speziellen Kompensationskreis im patch-clamp Verstärker oder durch Modifikation der Meßmethode unterdrückt werden [216].

10.2 Elektronik

Um die Funktionsweise eines patch-clamp Verstärkers verstehen zu können, wird neben der Kirchhoffschen Knoten- und Maschenregel nur noch das Ersatzschaltbild eines idealen Operationsverstärkers benötigt. Ein idealer Operationsverstärker ist dadurch charakterisiert, daß (i) kein Strom in seine Eingänge fließt, d.h. $I_+ = I_- = 0$ und (ii) seine beiden Eingängen auf demselben Potential liegen, d.h. $U_+ = U_-$. Dazu muß der Operationsverstärker so betrieben werden, daß er mit seinem Ausgang (hier U_∞) über eine Rückkopplung (hier R_{Pot}) seine Eingänge zu den in (i) und (ii) vorausgesetzten Bedingungen steuern kann [210].

Im voltage-clamp Modus wird mit einer Steuerspannung U_{MH} das Potential der Pipette auf U_{MH} gehalten (da $U_{MH} = U_+ = U_-$), vgl. dazu das Ersatzschaltbild in Abb. 10.2.1 [217, (S.96), 218]. Dabei wird der durch die Pipette fließende Strom I_M durch den als Strom-Spannungs-Wandler betriebenen Operationsverstärker [210] in eine Spannung gewandelt und hinter dem Ausgang des Differenzbildners als $I_M R_{Pot}$ ausgegeben (es gilt: $I_- = 0 \Rightarrow I_R = I_M$; $U_A - U_- = I_R R_{Pot}$; $U_B = U_+ = U_- = U_{MH} \Rightarrow U_A - U_B = I_M R_{Pot}$). Es wird also ein Haltepotential U_{MH} eingestellt und der dadurch entstehende Strom I_M gemessen.

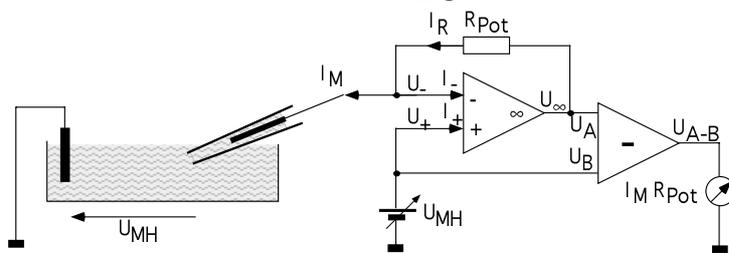


Abbildung 10.2.1:
Ersatzschaltbild des patch-clamp Verstärkers im voltage-clamp Modus.

Etwas komplizierter ist die in Abb. 10.2.2 skizzierte Elektronik für den current-clamp Modus [218]. Über eine Steuerspannung $R_{Pot} I_{MH}$ wird der Pipette ein Strom I_{MH} aufgeprägt und die dadurch an der Pipettenspitze anliegende Spannung U_M gemessen. Wegen $U_{A-B} = U_{2-} = U_{2+} = R_{Pot} \cdot I_{MH}$ (1)

wird der Ausgang $U_{2\infty}$ des zweiten Operationsverstärkers so getrieben, daß am Ausgang des Differenzbildners U_{A-B} das Potential $R_{Pot} \cdot I_{MH}$ anliegt. Aufgrund von

$$U_{2\infty} = U_B = U_{1+} = U_{1-} = U_M, \quad (2)$$

$$U_A - U_{1-} = R_{Pot} I_R \text{ und} \quad (3)$$

$$I_R = (3) = (U_A - U_{1-}) / R_{Pot} = (2) = (U_A - U_B) / R_{Pot} = U_{A-B} / R_{Pot} = (1) = I_{MH} \quad (4)$$

ist dies nur möglich, wenn der Pipette der Strom I_{MH} aufgeprägt wird (Gl. 4). An der Pipette liegt dann das Potential U_M an (Gl. 2). Der patch-clamp Verstärker gibt also das Potential U_M aus welches an der Zelle anliegt, wenn der Zelle ein Strom I_{MH} aufgeprägt wird.

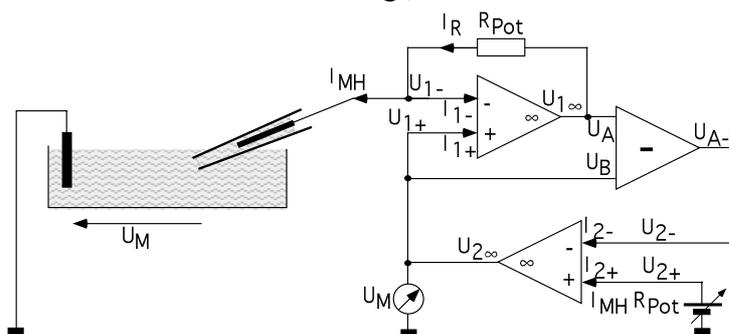


Abbildung 10.2.2:
Ersatzschaltbild des patch-clamp Verstärkers im current-clamp Modus.

10.3 Praktische Durchführung

Der Ablauf einer patch-clamp Messung ist schematisch in Abb. 10.3.1 dargestellt. In a) ist die Aufnahme einer Pipettenspitze mit dem Rasterelektronenmikroskop gezeigt¹. Nach Füllung der Pipette mit extrazellulärer Lösung, wobei die Entstehung von Luftblasen vermieden werden muß, wird die Pipette in den Meßkopf („headstage“) des patch-clamp Verstärkers eingebaut. Über den Meßkopf ist das Innere der Pipette an einen dünnen Schlauch gekoppelt [218]. Mit einer am anderen Schlauchende befestigten Spritze wird nun durch Drücken und wieder Loslassen des Spritzenkolbens ein Überdruck in der Pipette erzeugt. So strömt immer etwas Lösung aus der Pipettenspitze aus, wodurch das Anlagern von „Dreck“ an die Spitze verhindert wird. Der spätere Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zelle ist entscheidend von der Sauberkeit der Pipette abhängig. Deshalb kann jede Pipette auch nur einmal verwendet werden und muß zu jeder weiteren Ableitung gewechselt werden.

Mit einem Mikromanipulator wird die Pipette nun in die extrazelluläre Lösung gefahren, in welcher sich die adhärenen Zellen befinden. Zur genauen Positionierung muß die Spitze der Pipette zuerst in das Blickfeld des zur Beobachtung eingesetzten optischen Mikroskops gesteuert werden. In b) ist eine Mikroskopaufnahme der sich in Lösung befindenden Pipettenspitze gezeigt. Unter Beobachtung im Mikroskop wird nun die Pipettenspitze in die Nähe der abzuleitenden Zelle gefahren, bis sie etwas über der Zelle steht².

Der patch-clamp Verstärker wird zunächst im search Modus betrieben, der sehr ähnlich zu dem voltage-clamp (VC) Modus ist: der Pipettenspitze wird, wie in c) aufgetragen, ein Potential U_{MH} aufgeprägt, welches aus einem periodisch wiederholten Rechteckspuls U_{M0} und einem konstanten Haltepotential U_{MR} zusammengesetzt ist. Im Gegensatz zum VC Modus ist aber das aufgeprägte Potential mit dem resultierenden Pipettenstrom rückgekoppelt, was in etwa einer AC-Kopplung entspricht, so daß nur Pulsänderungen U_{M0} zu einem Pipettenstrom führen [218]. So wird der Pipettenstrom bei konstantem Haltepotential $U_{MH} = U_{MR} \ll 0$ auf Null gehalten und es fließt nur während des Testpulses ein Strom, vgl. d)³. Nach dem ohmschen Gesetz kann aus der Höhe des Stroms während des Testpulses der Widerstand der Pipettenspitze angegeben werden. In dem in c) und d) gezeigten Beispiel beträgt er $R_{Pip} = \Delta U_{MH} / \Delta I_M \approx 10\text{mV} / 3000\text{pA} \approx 3,3\text{ M}\Omega$.

Mit Hilfe von Mikromanipulator und Mikroskop wird die Pipettenspitze nun direkt an die Oberfläche der Zelle positioniert. Dies kann zum einen an einer leichten, halbmondförmigen Eindellung der Zelle unter der Pipettenspitze beobachtet werden, die durch den Überdruck in der Pipette verursacht wird, siehe e). Zum anderen sinkt der Pipettenstrom I_M während des Testpulses U_{MH} um ca. 10%, da sich der Pipettenwiderstand durch die beginnende Bedeckung der Pipettenspitze mit der Zelloberfläche vergrößert. Durch Abnehmen der Spritze von dem an

¹ Für Ableitungen von Nervenzellen wurden in dieser Arbeit patch-clamp Pipetten mit Spitzendurchmessern von ca. 1 μm und damit mit Pipettenwiderständen zwischen 3 und 6 $\text{M}\Omega$ verwendet. Das Bild wurde von Dr. R. Blick und A. Kriele aufgenommen.

² Dabei wird wechselseitig der Fokus des Mikroskops und die Höhe der Pipette über dem Substrat variiert, um die Pipette zerstörungsfrei in Zellnähe bringen zu können.

³ Eine andere Möglichkeit ist es, bei Annähern der Pipette an die Zelle im VC Modus das Haltepotential auf Null und damit gleich dem Potential der Badelektrode zu setzen, $U_{MH} = 0$. Dann fließt ebenfalls nur ein Strom während eines Testpulses U_{M0} . Nach dem erfolgten Kontakt zwischen Pipette und Zelle muß das Haltepotential dann auf das Ruhepotential der Zelle gesetzt werden, $U_{MH} = U_{MR}$.

die Pipette angeschlossenen Schlauch und leichtes Ansaugen am Schlauchende wird ein leichter Unterdruck in der Pipette erzeugt und so die Zellmembran dicht an die Pipettenspitze angeschmiegt, vgl. f). Der Widerstand zwischen dem Inneren der Pipette und der die Zelle umgebenden Lösung liegt dann im Gigaohm-Bereich („gigaseal“: $U_{M0}/\Delta I_M > 1 \text{ G}\Omega$). Bei Anlegen des Testpulses $U_{MH} = U_{MR} + U_{M0}$ fließt dann praktisch kein Strom mehr durch die Pipette, wie in g) gezeigt ist.

Nun wird der patch-clamp Verstärker in den VC Modus umgestellt und das Haltepotential so eingestellt, daß es dem Ruhepotential der Zelle entspricht ($U_{MH} = U_{MR}$), d.h. kein Strom fließt ($I_M = 0$). Aufgrund der Pipettenkapazität gibt es beim An- und Ausschalten des Testpulses jedoch einen kapazitiven, exponentiell abfallenden Strom, vgl. g). Mit Hilfe einer Kompensationsschaltung am patch-clamp Verstärker kann dieser kapazitive Pipettenstrom minimiert werden, siehe h)

Durch erneutes, starkes Ansaugen am Pipetten-Schlauch wird nun die unter der Pipettenspitze liegende Membran zerrissen, d.h. ein ohmscher Kontakt zwischen dem Zellinneren und der Lösung in der Pipette hergestellt (Ganzzell-Ableitung, „whole seal“). Während des Testpulses $U_{MH} = U_{MR} + U_{M0}$ fließt dann wieder ein exponentiell abfallender, kapazitiver Strom I_M durch die mit der Pipettenspitze verbundene Kapazität C_M der gesamten Zelle, siehe i)⁴. Je nach Anforderung können nun Experimente im VC oder CC Modus durchgeführt werden.

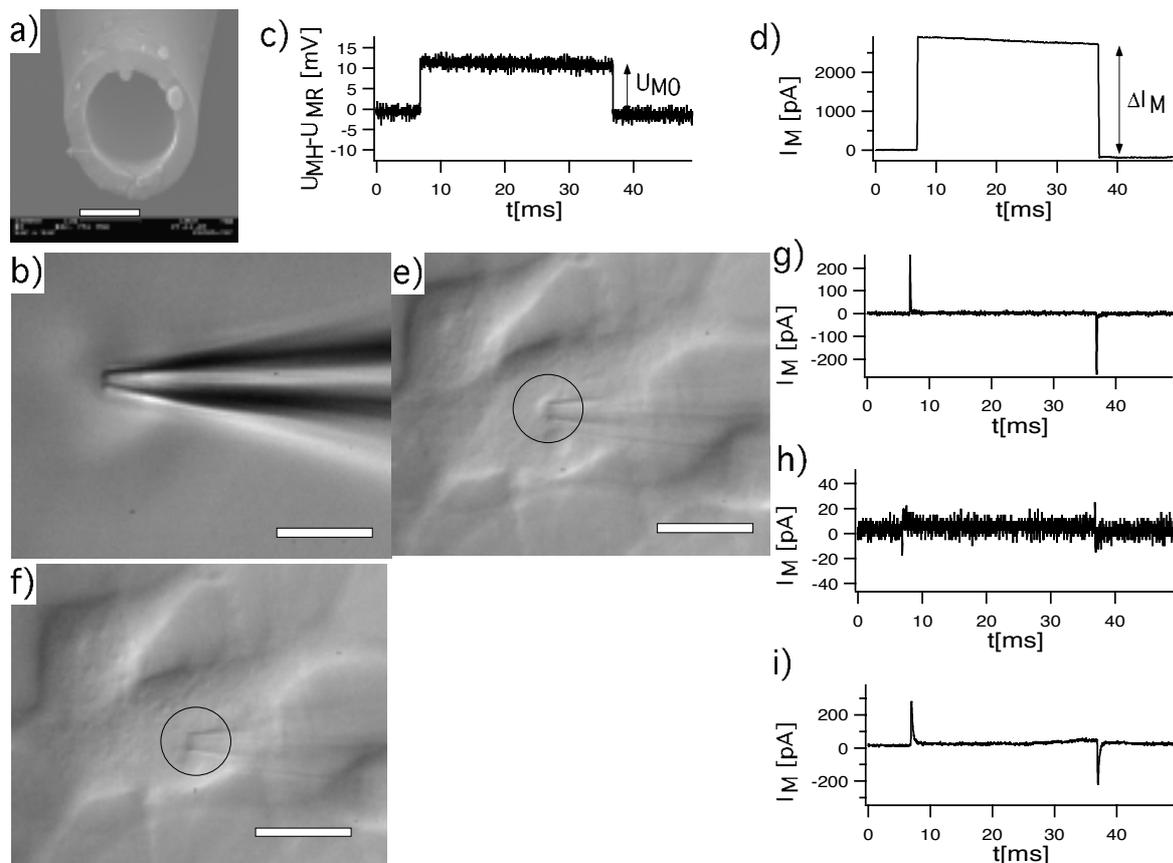


Abbildung 10.3.1: Ablauf einer patch-clamp Messung. Die Skalierungsbalken zeigen in a) $1 \mu\text{m}$ und in b), e) und f) jeweils $10 \mu\text{m}$ an. In e) und f) ist die Spitze der Pipette umkreist.

⁴ Da die Kapazität der Zelle größer als die Pipettenkapazität ist, klingt der kapazitive Strom in i) langsamer als in g) ab.

10.4 Datenanalyse⁵

Es wird hier die Auswertung von voltage-clamp Messungen beschrieben, die in „whole-cell“ Konfiguration an striatalen Neuronen durchgeführt wurden. An jeder Zelle wurde dabei der Membranstrom $I_M(t)$ nach Spannungspulsen $U_{MH}(t)$ verschiedener Amplitude aufgezeichnet, siehe Abb. 10.4.2.a. Anhand dieser Rohdaten können die Kapazität C_M und der Widerstand R_M der Zellmembran, der maximale (Natrium-) Einwärtsstrom und die (Kalium-) Auswärtsstrom-Leitfähigkeit bestimmt werden. Die Querschnittfläche $A_{Z,opt}$ der Zellen kann als zusätzlicher Parameter direkt aus mit dem Mikroskop aufgenommenen Bildern bestimmt werden, vgl. Abb. 10.4.1.

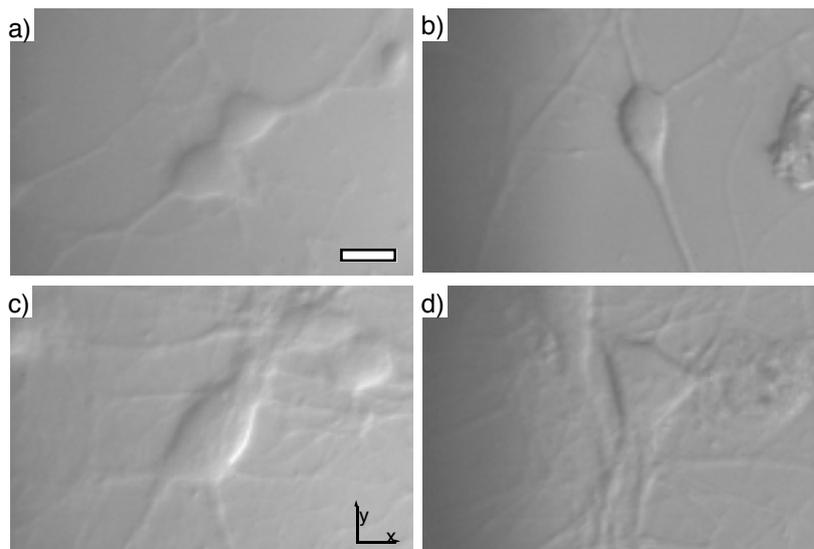


Abbildung 10.4.1:
 Striatale Neurone nach 13 DIV, kultiviert auf verschiedenen Substraten und in verschiedenen Kulturmedien. Der Skalierungsbalken entspricht 10 μm . a) Silizium-Substrat, Neurobasal-Medium (NBM). b) Glas, NBM. c) Silizium-Substrat, serumhaltiges Medium (SCM). d) Glas, SCM.

Wird eine Zelle leicht hyperpolarisiert ($U_{MH} < U_{MR}$), so wird die Leitfähigkeit Potential-gesteuerter Kanäle praktisch nicht beeinflusst, und es fließt nur ein passiver Strom. Dessen Amplitude ist durch den Ruhewiderstand R_M und die Kapazität C_M der Membran bestimmt. Wie in Abb. 10.4.2.a dargestellt ist, wurden in dieser Arbeit an jeder Zelle drei voltage-clamp Messungen mit hyperpolarisierenden Stimulationspulsen durchgeführt. Die dazugehörigen passiven Membranströme zeigen ein typisches exponentielles Verhalten. Die Stromantwort $I_M(t)$ auf einen hyperpolarisierenden Puls mit einer Amplitude von $U_{M0} = -1\text{mV}$ kann nun aus diesen Daten gewonnen werden: Dazu wird angenommen, daß der passive Strom linear mit der Amplitude des hyperpolarisierenden Pulses skaliert. Der mittlere gewichtete Strom I_M auf einen hyperpolarisierenden Puls von $U_{M0} = -x \text{ mV}$ Amplitude ist dann $I_M(t) = \text{Mittelwert}(I_{M,i}/U_{M0,i}) \cdot (-x \text{ mV})$, wobei $I_{M,i}$ die Stromantwort auf die Stimulation $U_{M0,i}$ ist. In Abb. 10.4.2.b ist die so aus den in Abb. 10.4.2.a gezeigten Rohdaten ermittelte passive Stromantwort auf einen Stimulationspuls von -1 mV aufgezeichnet. Aus dieser Kurve kann der Membranwiderstand R_M , die Membrankapazität C_M und der Zugriffswiderstand R_{ZA} der untersuchten Zelle berechnet werden, vgl. Kap. 10.1.

⁵ Dieses Kapitel bezieht sich auf den voltage-clamp Modus, die Ideen sind aber auf den current-clamp Modus übertragbar. Die Auswertesoftware wurde von M. George programmiert.

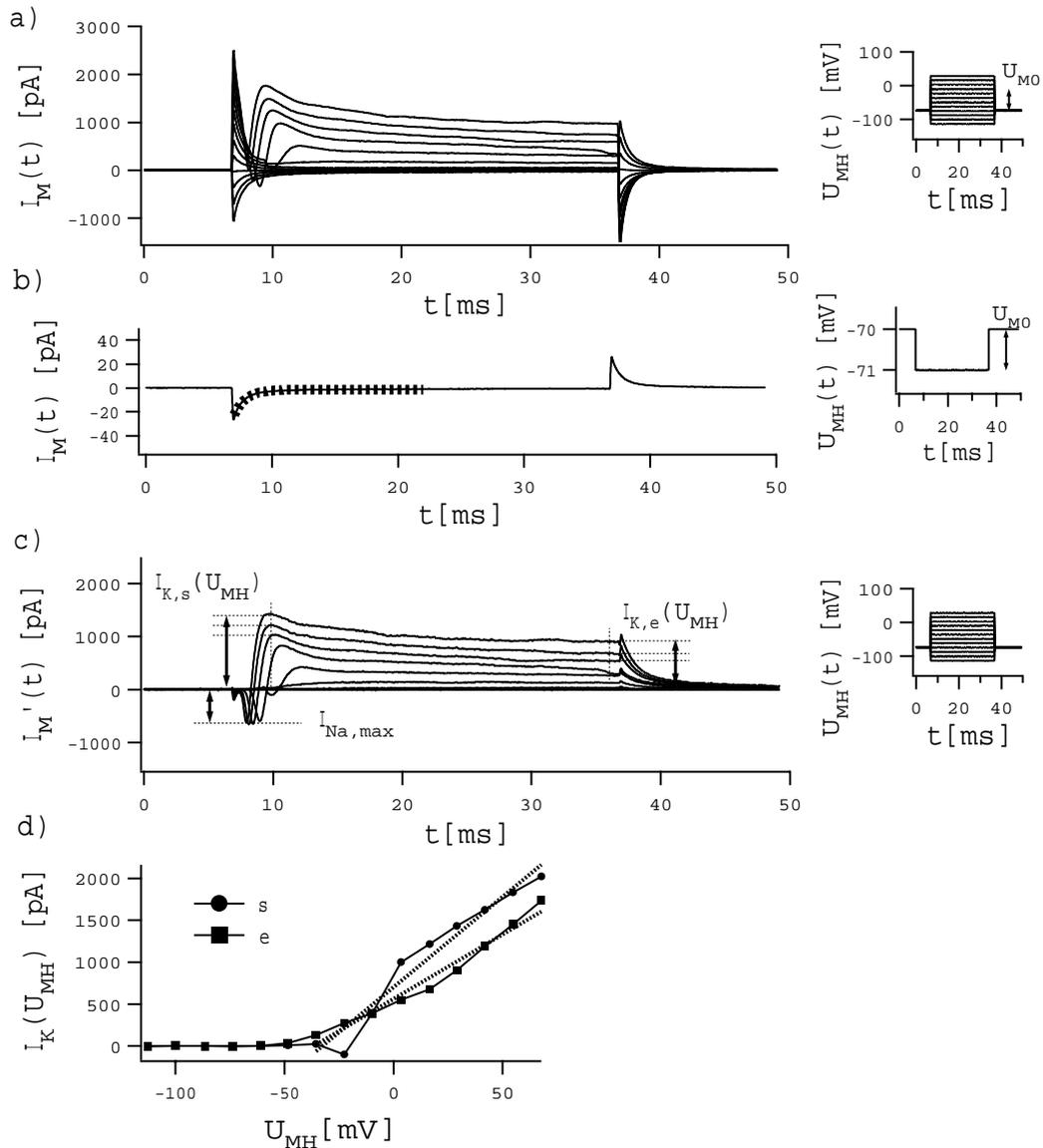


Abbildung 10.4.2: a) Voltage-clamp Messungen an einem striatalen Neuron nach 13 DIV, kultiviert in NBM auf Glas. Aufgetragen ist die Stromantwort $I_M(t)$ (großes Bild) auf verschiedene Stimulationspulse U_{M0} (kleines Bild). b) passive Stromantwort auf einen hyperpolarisierenden Puls mit -1 mV Amplitude. Die Stromantwort wurde aus dem Mittelwert aller gewichteten Stromantworten der in a) dargestellten hyperpolarisierenden Pulse berechnet. Die gestrichelte Kurve zeigt einen exponentiellen Fit. c) Nach Abzug der passiven Antwort von den gemessenen Strömen liegt die aktive Stromantwort $I'_M(t)$ auf Potentialpulse vor. Daraus kann der maximale Einwärtsstrom $I_{Na,max}$ und die Potential-abhängigen Auswärtsströme am Anfang und Ende der Stimulation $I_{K,s}$ bzw. $I_{K,e}$ abgelesen werden. d) Durch Auftragen des Kaliumstroms gegen das Stimulationspotential kann über einen linearen Fit die Kalium-Kanal-Leitfähigkeit berechnet werden. Die gestrichelten Kurven zeigen die gefitteten Werte.

Wenn die passive Komponente des Membranstroms bekannt ist, kann auch dessen aktiver Anteil berechnet werden, was in Abb. 10.4.2.c aufgezeichnet ist. Die aktive Stromantwort I'_M auf einen Stimulationspuls mit der Amplitude U_{M0} ist die Differenz aus gemessener Stromantwort und passivem Anteil. Der passive Anteil ist der mittlere passive Strom auf einen hyperpolarisierenden Puls von -1 mV, multipliziert mit dem Faktor $U_{M0}/(-1$ mV). Deutlich ist in Abb. 10.4.2.c der (Natrium-) Einwärtsstrom für depolarisierende Pulse über dem Schwellwert zur Auslösung eines Aktionspotentials und der (Kalium-) Auswärtsstrom zu erkennen. Aus der so gewonnenen Kurvenschar läßt sich direkt der maximale Einwärtsstrom $I_{Na,max}$ und der Auswärtsstrom in Abhängigkeit des Stimulationspulses $I_{K,s}(U_{MH})$ bzw.

$I_{K,e}(U_{MH})$ bestimmen⁶. In Abb. 10.4.2.d ist die Amplitude des Auswärtsstroms in Abhängigkeit der Stimulationsamplitude aufgezeichnet. Mit einem linearen Fit kann dann für depolarisierende Pulse überhalb des Schwellwerts⁷ die Auswärtsstrom-Leitfähigkeit $G_K = \Delta I_K(U_{MH})/\Delta U_{MH}$ berechnet werden.

Alle bisherigen Parameter sind als absolute Größen, d.h. bezogen auf jeweils eine Zelle bestimmt worden. Sicherlich skalieren aber viele Parameter mit der Größe der Zelle. So wird der Strom bei großen Zellen höher sein, da aufgrund größerer Fläche mehr Ionenkanäle vorliegen. Es gibt prinzipiell zwei einfache Skalierungsmöglichkeiten, um spezifische Größen zu erhalten: Normierung auf die Membrankapazität oder die Oberfläche der Zelle. Für die in Kap. 3.1 beschriebenen Simulationen wird die Normierung pro Oberfläche benötigt. Die Oberfläche $A_{Z,tot}$ von Zellen ist aber nicht ohne weiteres meßbar. Mikroskopaufnahmen liefern die Querschnittsfläche $A_{Z,opt}$ von Zellen, vgl. Abb. 10.4.3. Die Zelloberfläche kann damit grob als $A_{Z,tot} = 3 A_{Z,opt}$ abgeschätzt werden.

Prinzipiell ist die Zelloberfläche auch über die Gesamtkapazität der Zelle abzuschätzen, zu welcher sie proportional ist. Dazu müßte allerdings der Proportionalitätsfaktor, die spezifische Membrankapazität bekannt sein. Doch auch dieser Wert ist unbekannt. Bei abgeschätzter Zelloberfläche ($A_{Z,tot} = 3 A_{Z,opt}$) könnte die spezifische Membrankapazität angegeben werden, da die Gesamtkapazität ja experimentell bestimmt wurde. Nach dieser Methode würden aber zu hohe spezifische Kapazitäten bestimmt, da in die gemessene Zellmembran-Kapazität auch die Kapazität der Membran der Dendriten eingeht. Im Mikroskopbild wird dagegen nur die Fläche des Zellkörpers gemessen. Daher wurde folgende grobe Annahme getroffen: Die Kapazität der Membran des Zellkörpers beträgt ca. 2/3 der Gesamtkapazität C_M . Damit folgt $2/3 C_M = c_M \cdot A_{Z,tot} = c_M \cdot 3 A_{Z,opt}$, d.h. $c_M = 2/9 C_M / A_{Z,opt}$.

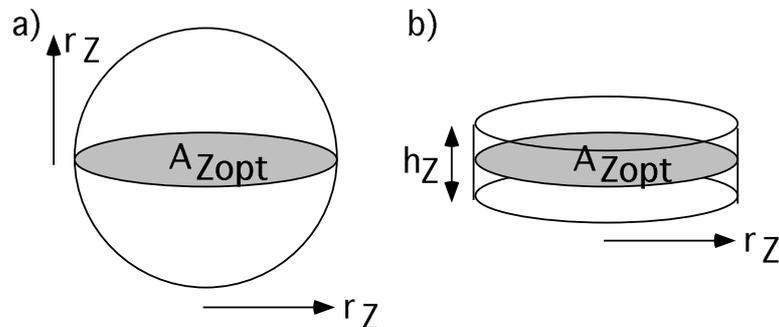


Abbildung 10.4.3: Interpretation der Flächenmessungen: $A_{Z,opt}$ entspricht der optisch gemessenen Querschnittsfläche, $A_{Z,tot}$ der gesamten Zelloberfläche. Wird der Querschnitt einer Zelle als kreisförmig angenommen, $A_{Z,opt} = \pi r_Z^2$, lassen sich folgende Grenzfälle angeben: a) Falls die Zelle als Kugel angenommen wird, folgt für deren Oberfläche $A_{Z,tot} = 4 \pi r_Z^2$ und damit $A_{Z,tot} = 4 A_{Z,opt}$. Wird dagegen eine flache Zelle $h_Z \rightarrow 0$ angenommen, ist deren Oberfläche $A_{Z,tot} = 2(\pi r_Z^2) + h_Z(2\pi r_Z) \rightarrow 2\pi r_Z^2$ und damit $A_{Z,tot} = 2 A_{Z,opt}$. Die Realität wird in der Mitte liegen und die Annahme $A_{Z,tot} = 3 A_{Z,opt}$ bildet einen akzeptablen Schätzwert.

⁶ "s" steht dabei für Beginn oder Start der Stimulation, "e" für Ende.

⁷ In allen Messungen war das Ruhepotential U_{MR} auf ca. -73 mV eingestellt. Als Schwellwert zur Ausbildung eines Aktionspotentials wurde ein Membranpotential von -30 mV angenommen.

10.5 Extrazelluläre Potentiale

In diesem Kapitel wird, basierend auf den Modellen von Fromherz und Mitarbeitern [28, 94, 200], eine Vorhersage des extrazellulären Potentials in der Spalte zwischen einer Zelle und ihrer Unterlage beschrieben, siehe dazu Abb. 3.1.1.

Weicht während eines Aktionspotentials das Membranpotential vom Ruhepotential ab, so fließt durch die Unterseite der Zelle ein passiver Strom i_M [Am^{-2}] mit einem ohmschen und einem kapazitiven Anteil⁸:

$$i_M(t,r) = c_M \frac{d(\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r))}{dt} + \frac{1}{r_M}(\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r)) \quad (0)$$

Φ_S [V] ist dabei das Potential im Spalt zwischen Zelle und Unterlage, d.h. das zu detektierende extrazelluläre Potential. Am Rand der Zelle ist das Potential im Spalt gleich dem Potential des Volumens des Elektrolyten:

$$\Phi_S(t, r \geq r_Z) = \psi_{za} = \text{const} \quad (1)$$

Der aus der Unterseite der Zelle austretende Ionenstrom kann nur durch den Spalt zwischen Zellunterseite und Unterlage in das Volumen des Elektrolyten gelangen. Durch die Stromdichte $i_M(r)$ aus der Zellmembran erhöht sich der radiale Strom entlang der Sensoroberfläche I_{Sr} [A] um den Anteil dI_{Sr} :

$$dI_{Sr}(t,r) = i_M(t,r) 2\pi r dr \quad (2)$$

und es folgt:

$$\frac{dI_{Sr}(t,r)}{dr} = c_M \frac{d(\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r))}{dt} + \frac{1}{r_M}(\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r)) 2\pi r \quad (3)$$

Nach dem Prinzip eines Spannungsteilers und des ohmschen Gesetzes fällt durch den unter der Zelle fließenden Strom ein Potential $\Phi_S(t,r)$ am Elektrolytfilm zwischen Zelle und Unterlage ab. Zwischen zwei Kreissegmenten mit Abstand dr unter der Zelle fällt das Potential $d\Phi_S$ ab:

$$d\Phi_S(t,r) = \Phi_S(t,r+dr) - \Phi_S(t,r) \quad (4)$$

Der Widerstand des Elektrolyts in diesem Kreissegment ist proportional zum Kehrwert der Oberfläche eines Zylinders $2\pi r d_Z(r)$ mit Radius r und Höhe d_Z . Nach dem ohmschen Gesetz ist das dort abfallende Potential das Produkt aus Widerstand und fließendem Strom:

$$d\Phi_S(t,r) = -\rho_E \frac{dr}{2\pi r d_Z(r)} I_{Sr}(t,r) \Rightarrow I_{Sr}(t,r) = -\frac{2\pi r d_Z(r)}{\rho_E} \frac{d\Phi_S(t,r)}{dr} \quad (5)$$

⁸ Während eines Aktionspotentials fließen positive Na^+ -Ionen durch aktive Kanäle in der dem Volumen des Elektrolyts zugewandten Membranoberfläche in die Zelle. Ein Teil dieser Überschubladung fließt durch die Unterseite der Membran passiv ab. D.h. das Vorzeichen beider Ströme ist umgekehrt.

⁹ Gl. 0 in Gl. 2 eingesetzt.

Um soweit wie möglich analytisch rechnen zu können, wird der Abstand zwischen Zelle und Substrat als konstant angenommen, $d_z(r) = d_z = \text{const}$. Wie optische Messungen des Zell-Substrat-Abstandes zeigen, ist diese Annahme durchaus gerechtfertigt [111]. Mit Hilfe der obigen Annahmen kann nun eine Gleichung für das extrazelluläre Potential $\Phi_s(t,r)$ aufgestellt werden:

$$\begin{aligned}
 \frac{d^2\Phi_s(t,r)}{dr^2} & \stackrel{(5)}{=} -\frac{\rho_E}{2\pi} \frac{d}{dr} \left(\frac{1}{r} \frac{1}{d_z} I_{Sr}(t,r) \right) = -\frac{\rho_E}{2\pi} \left(-\frac{1}{r^2 d_z} I_{Sr}(t,r) + \frac{1}{r} \frac{dI_{Sr}(t,r)}{dr} \right) \\
 & \stackrel{(3,5)}{=} -\frac{\rho_E}{2\pi} \left(-\frac{1}{r^2 d_z} \left[-\frac{2\pi d_z}{\rho_E} \frac{d\Phi_s(t,r)}{dr} \right] + \frac{2\pi}{r d_z} \left[c_M \frac{d(\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r))}{dt} + \frac{1}{r_M} (\psi_{zi}(t) - \Phi_s(t,r)) \right] \right) \\
 & = \left(-\frac{1}{r} \frac{d\Phi_s(t,r)}{dr} - \frac{\rho_E c_M}{d_z} \frac{d\psi_{zi}(t)}{dt} + \frac{\rho_E c_M}{d_z} \frac{d\Phi_s(t,r)}{dt} - \frac{\rho_E}{d_z r_M} \psi_{zi}(t) + \frac{\rho_E}{d_z r_M} \Phi_s(t,r) \right) \\
 \Rightarrow \frac{d^2\Phi_s(t,r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\Phi_s(t,r)}{dr} - \frac{\rho_E}{d_z r_M} \Phi_s(t,r) - \frac{\rho_E c_M}{d_z} \frac{d\Phi_s(t,r)}{dt} & = -\frac{\rho_E c_M}{d_z} \frac{d\psi_{zi}(t)}{dt} - \frac{\rho_E}{d_z r_M} \psi_{zi}(t) \quad (6)
 \end{aligned}$$

Diese Differentialgleichung für $\Phi_s(t,r)$ läßt sich mit Hilfe einer Fourier-Transformation [219, (K.4.4.2, S.619)] lösen. Dabei bezeichnet $F(\omega)$ die Fourier-Transformierte im Frequenzraum einer Funktion $f(t)$ im Zeitraum¹⁰:

$$F(f(t), \omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \exp(i\omega t) dt \quad (7)$$

Multiplikation von Gl. 6 mit $(2\pi)^{1/2} \exp(i\omega t)$ und Integration über t unter Verwendung von Gl. 7 ergibt dann:

$$\frac{d^2 F(\Phi_s(t,r), \omega)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dF(\Phi_s(t,r), \omega)}{dr} - \left(\frac{\rho_E}{d_z r_M} - i\omega \frac{\rho_E c_M}{d_z} \right) F(\Phi_s(t,r), \omega) = - \left(\frac{\rho_E c_M}{d_z} - i\omega \frac{\rho_E}{d_z r_M} \right) F(\psi_{zi}(t), \omega) \quad (8)$$

Mit Hilfe einiger Abkürzungen (9) kann (8) dann zu einer vereinfachten Form umgewandelt werden:

$$\Phi_s(\omega, r) = F(\Phi_s(t,r), \omega), \quad \tau_M [s] = r_M c_M, \quad \lambda^2 [m^2] = r_M d_z / \rho_E \quad (9)$$

$$r \frac{d^2 \Phi_s(\omega, r)}{dr^2} + \frac{d\Phi_s(\omega, r)}{dr} - \frac{1}{\lambda^2} (1 - i\omega \tau_M) r \Phi_s(\omega, r) = - \frac{1}{\lambda^2} (1 - i\omega \tau_M) r \psi_{zi}(\omega) \quad (10)$$

Dies ist eine Differentialgleichung in r . Die allgemeine Lösung davon ist die Summe aus der allgemeinen Lösung für die homogene Differentialgleichung¹¹ $\Phi_s(\omega, r)_{\text{hom}}$ und einer speziellen Lösung $\Phi_s(\omega, r)_{\text{spez}}$ der inhomogenen Differentialgleichung. Dabei ist J_0 die Besselfunktion und I_0 die modifizierte Besselfunktion nullter Ordnung.

¹⁰ $F(df(t)/dt, \omega) = -i\omega f(t)$ [219, (K.4.4.2.1, S.620)].

¹¹ Homogene Differentialgleichung: rechte Seite von Gl. 10 ist gleich Null. Lösung nach [219, 220, (S.423, Gl.2.95), 221, (K-6, S.97)]. Da $\Phi_s(\omega, r=0)$ endlich bleiben soll, fällt die Neumannsche Funktion als Lösung aus.

$$\Phi_S(\omega, r)_{\text{hom}} = \text{const } J_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right) = \text{const } J_0\left(i\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right) = \text{const } I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right) \quad (11)$$

$$\Phi_S(\omega, r)_{\text{spez}} = \psi_{Zi}(\omega) \quad (12)$$

$$\Phi_S(\omega, r) = \Phi_S(\omega, r)_{\text{spez}} + \Phi_S(\omega, r)_{\text{hom}} = \psi_{Zi}(\omega) + \text{const } I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right) \quad (13)$$

Die Konstante ist dabei durch die Nebenbedingung Gl. 1 gegeben:

$$(13) \Rightarrow \psi_{Zi}(\omega) + \text{const } I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right) = \psi_{Za}$$

$$\Rightarrow \text{const} = (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) / I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right) \quad (14)$$

$$\Rightarrow \Phi_S(\omega, r) =^{12} \psi_{Zi}(\omega) + (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) \frac{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right)}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)} \quad (15)$$

Das maximale (Fourier-transformierte) extrazelluläre Potential $\Delta\Phi_S(\omega)$ unter der Zelle ist dann:

$$\Delta\Phi_S(\omega) = \Phi_S(\omega, r=0) - \Phi_S(\omega, r=r_z)$$

$$= \psi_{Zi}(\omega) + (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) \frac{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right)}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)} - \psi_{Zi}(\omega) - (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) \frac{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r\right)}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)}$$

$$= (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) \frac{1}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)} - (\psi_{Za} - \psi_{Zi}(\omega)) = U_M(\omega) \left(1 - \frac{1}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)}\right) \quad (16)$$

Dabei ist $U_M(\omega) = F(U_M(t), \omega)$ die Fourier-Transformierte des Membranpotentials. Nach Rücktransformation in den Zeitraum ist so der Verlauf des extrazellulären Potential $\Delta\Phi_S(t)$ unter dem Mittelpunkt der Zelle gegeben. Um das in Abb. 3.1.1 nicht eingezeichnete und daher in Gl. 0 nicht enthaltene Ruhepotential der Zelle U_{MR} mit zu berücksichtigen, wird dazu U_M durch $U_M - U_{MR}$ ersetzt:

$$\Delta\Phi_S(t) = F^{-1}\left(F(U_M(t) - U_{MR}) \cdot \left(1 - \frac{1}{I_0\left(\sqrt{\frac{1-i\omega\tau_M}{\lambda^2}} r_z\right)}\right)\right) \quad (17)$$

¹² Gl.14 in Gl.12 eingesetzt.

11 Anhang C: Methoden zur Zellkultur und Zellcharakterisierung

11.1 Präparationsprotokolle

(a) Herzmuskelzellen¹

Vorbereitung der Substrate zur Besiedelung mit Zellen: Vor dem Aussäen der Zellen werden die Substrate (Petrischalen, Halbleiterwafer, Glas,...) mit Fibronektin beschichtet. Auch Cell-Tak-Beschichtungen liefern gute Ergebnisse [222]. Dagegen wurden mit Poly-D-Lysin-Beschichtungen schlechte Erfahrungen gemacht.

Zellisolation: (vgl. Abb. 11.1.1) [5, 55]

- Zur Präparation nötig (alles steril):
 - 15 Eier mit 7 Tage alten Hühnerembryos (1 Woche lang bebrütete Eier aus lokaler Hühnerbrüterei von Geflügelzucht und Brüterei Ludwig Hölzl, Moosburg) bzw. ein Wurf (ca. 5-7) 1 Tage alter Ratten (trächtige Ratte von Charles River)
 - 3 Glasschälchen auf Kühlakkus, gefüllt mit HBSS-Ca-Mg. In einem werden die Herzen aus den Tieren entnommen, im nächsten gewaschen und im letzten aufbewahrt.
 - bei Präparation von Ratten: Korkplatte und Stecknadeln
 - mehrere Pinzetten
 - Skalpell, Schere
 - Silikongummi-Platte (Sahlberg #135005)
 - Pasteurpipetten (Glas: Roth, # 4518.1) + Pipetten (Plastik: Renner, #06031, #06032) mit Pipettierhilfe (Accu Jet ISO 9001, Brand)
 - Magnetrührer mit sterilem Rührfisch
 - 15 ml Zentrifugenröhrchen (Renner, #38026)
 - 6 mit 4 ml eisgekühltem 40% FCS Herz-Medium gefüllte 15 ml Zentrifugenröhrchen
 - 1 mit eiskaltem HBSS-Ca-Mg gefülltes 15 ml Zentrifugenröhrchen

- Entnahme der Herzen bei Hühnerembryos
 - Hühnererei mit 70% Ethanol besprühen und unter Sterilbank („flowhood“) bringen
 - Hühnererei mit großer runder Seite nach oben (dort befindet sich Luftblase im Ei) über Abfallbehälter halten, mit flacher chirurgischer Pinzette Eischale öffnen und weiße Eihaut entfernen
 - Embryo mit runder, chirurgischer Pinzette an Blutgefäßen an Oberfläche ziehen, sanft am Hals greifen und in Glasschale mit eiskalter HBSS-Ca-Mg -Lösung transferieren, Eirest in Abfallbehälter geben
 - Mit spitzer, gekrümmter Pinzette Kopf vom Rumpf des Embryos trennen („dekapitieren“)
 - Embryo auf Rücken drehen und von der Kopfseite her mit spitzer, flacher Pinzette festhalten
 - mit spitzer, gekrümmter Pinzette Brustkorb des Embryos aufschlitzen, Herz an Aorta fassen, entnehmen und in Glasschale mit eiskalter HBSS-Ca-Mg -Lösung geben, in welcher die Herzen gesäubert werden. Toten Embryo in Abfallbehälter entsorgen. Die Erkennung des Herzens ist nicht einfach: In seltenen Fällen schlägt das Herz noch, dann ist es leicht zu identifizieren. Ansonsten ist das Herz das oberste Organ, direkt am Brustbein, wenn man den Embryo von vorne ansieht. Das Herz ist durchblutet und strukturiert, es sind vier dunkle

¹ nach Dr. M. Riehle und Dr. M. Denyer.

Punkte, d.h. die vier Herzkammern erkennbar. Wird das herausgelöste Herz mit einer sterilen Pinzette berührt, zuckt es häufig und ist somit eindeutig als Herz identifiziert. Nur Herzen verwenden, die sicher als solche identifiziert worden sind. Lieber weniger Herzen, als falsche Zellen in der Kultur!

- Mit Skalpell oder Pinzettschere (WPI #14124) Aortenreste vom Herzen entfernen und durch Drücken mit Pinzette Blut aus Herz pressen, gesäubertes Herz in Glasschale mit eiskalter HBSS-Ca-Mg -Lösung zum Aufbewahren geben
- Dieselben Schritte für alle weiteren Eier durchführen, am Ende sollten ca. 15 Hühnerherzen in der Glasschale mit HBSS-Ca-Mg vorliegen

- Entnahme der Herzen bei 1 Tage alten Ratten

- Ratte mit Ethanol zur Desinfektion absprühen
- mit Skalpell Ratte dekapitieren, Blut aus Körper schnell austropfen lassen
- Rattenkörper mit Rücken nach unten an Extremitäten („Vorder- und Hinterfüßen“) mit Stecknadeln auf Korkplatte fixieren. Achtung: Oft zucken die Körper noch, dies ist aber reiner Reflex, da die Tiere sofort nach der Dekapitation tot sind
- mit spitzer Schere Brustkorb aufschneiden und Aorten durchtrennen
- Herz mit Pinzette entnehmen und analog zu den Hühnerherzen weiterverarbeiten
- Die selben Schritte für alle Ratten durchführen, bis zum Schluß ca. 5 Herzen in Glasschale mit eiskaltem HBSS-Ca-Mg vorliegen

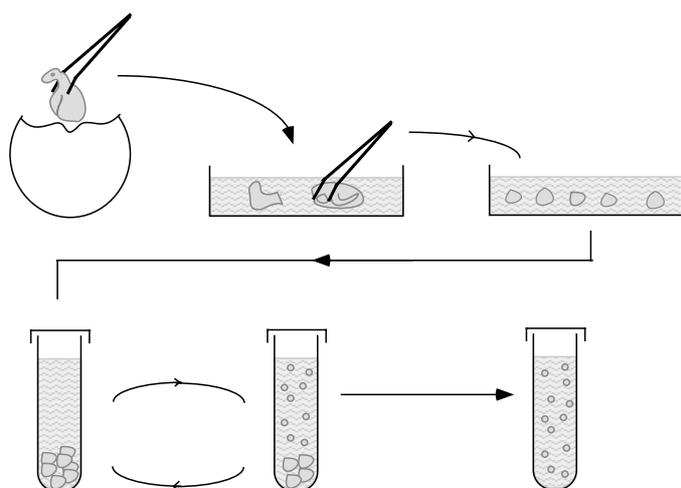


Abbildung 11.1.1: Präparation embryonaler Hühnerherzen. Nach Entnahme des Embryos aus dem Ei und Isolation des Herzens werden die Herzstücke in Enzymlösung dissoziiert, wobei zyklisch die vereinzelt Zellen entnommen werden und die restlichen Gewebestücke weiter in der Enzymlösung verbleiben. Am Schluß sind alle Zellen vereinzelt und in Medium gelöst.

- Weiterverarbeitung der Herzen

- Herzen auf Silikongummi-Platte legen und mit Skalpell in kleine Stücke zerschneiden (Auf dem weichen Silikongummi läßt sich besonders gut schneiden)
- Herzstücke in kleines Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit kaltem HBSS-Ca-Mg übertragen
- leicht schütteln, Herzen absitzen lassen und Überstand abpipettieren, frisches kaltes HBSS-Ca-Mg zugeben und Vorgang 2 mal wiederholen. Durch das Spülen mit HBSS wird dabei das restliche Blut beseitigt. Am Anfang ist das HBSS durch Blut leicht rötlich gefärbt, nach dem Spülen farblos. Die Blutreste müssen beseitigt werden, da sie nach Aussäen der Zellen die Zelladhäsion durch Verklumpung behindern würden [223]
- bis zu diesem Zeitpunkt muß möglichst schnell gearbeitet werden, um die Herzen minimal zu schädigen, es sollten nicht mehr als 30 Minuten dafür benötigt werden. Aus diesem Grund wird auch mit eiskalten Lösungen gearbeitet, damit die Herzfunktion „eingefroren“ wird

- Absaugen des restlichen HBSS über den Herzfragmenten und Zugabe von 8 ml 37° warmer 0.05%-Trypsin/EDTA-Lösung. Zentrifugenröhrchen steril zuschrauben und mit Rührfisch 8 Minuten in 37° C Wärmebad leicht rühren. Durch die enzymatische Wirkung des Trypsins wird das Herzgewebe von außen her langsam aufgelöst und geht als Einzelzellen in Lösung [224, (K.6, S.103)]
- Herzgewebestücke absitzen lassen und Überstand absaugen. Nach der ersten Trypsinierung befindet sich überwiegend undefiniertes Gewebe (Bindegewebe um den Herzmuskel, Aortenreste,..) im Überstand, welcher deswegen verworfen wird
- 0,1 ml 10000 units/ml DNase II-Lösung zu den Herzgewebestücken im Zentrifugenröhrchen geben und ca. 1 min einwirken lassen. Die DNase zerstört die bei der Trypsinierung durch geplatze Zellen freigesetzte DNA. DNA verklebt die Herzstücke zu einem schleimigen Klumpen, was die Zelladhäsion behindern würde und muß deshalb entfernt werden
- Gewebestücke leicht titrieren (Ansaugen und wieder Ausstoßen der Zellsuspension mit einer Pipette [225])
- 2,5 ml 37° warmer 0.05%-Trypsin/EDTA-Lösung zugeben, Zentrifugenröhrchen steril zuschrauben und mit Rührfisch 8 Minuten in 37° C Wärmebad geben. Dabei wird durch das Trypsin der Herzmuskel von außen her immer weiter in Einzelzellen dissoziiert. Durch die gelösten Einzelzellen trübt sich die Lösung
- restliche Herzstücke im Zentrifugenröhrchen absitzen lassen und Überstand in neues Zentrifugenröhrchen mit 4 ml eiskaltem 40% FCS Herz-Medium pipettieren
- zu restlichen Herzstücken („Bodensatz“) wieder neue DNase zugeben und wie oben beschrieben weiter trypsinieren. Der gesamte Vorgang wird solange wiederholt, bis sich alle Herzstücke aufgelöst haben (ca. 3 bis 5 mal). Bei jeder weiteren Trypsinierung wird etwas stärker gerührt. Der Vorteil dieser fraktionierten Trypsinierung ist die besonders schonende Behandlung für die Zellen. Durch das schrittweise Auflösen des Herzmuskels mit hintereinander folgenden Trypsinierungsschritten sterben weit weniger Zellen, als wenn das gesamte Gewebe auf einmal dissoziiert würde
- Durch das Pipettieren des Überstandes in 40% FCS Herz-Medium („Stopp-Medium“) wird durch das fötale Kälberserum die Trypsin-Aktivität gestoppt. Damit dies nachhaltig geschieht wird die Mischung leicht geschüttelt, um praktisch alle Trypsin-Moleküle zu inhibieren. Die Zellsuspension wird bei 1500 RPM unter Kühlung 6 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbleibende Zellpellet in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 1 ml eiskaltem 10% FCS Herz-Medium gelöst (schütteln) und anschließend gekühlt gelagert. Um die Präparation möglichst kurz zu halten, muß parallel trypsinieren und zentrifugiert werden: während den 8 Minuten trypsinieren wird 6 Minuten zentrifugiert
- Nachdem die Herzbruchstücke vollständig aufgelöst worden sind, müssen nun 3-5 (je nach Zahl der Trypsinierungsschritte) Zentrifugenröhrchen mit Zellsuspension in 10% FCS Herz-Medium vorliegen. Der 10% FCS Anteil im Medium fördert durch die in ihm enthaltenen Wachstumsfaktoren die Anlagerung und Entwicklung der Zellen nach Aussäen auf einem Substrat
- Die Zellsuspensionen werden nun gesammelt (ca. 5 ml), in ein kleines Gewebekulturfläschchen gegeben und ca. 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt. Dabei lagern sich bevorzugt Herz-Fibroblasten aus der Zellsuspension am Boden an, während Herzmuskelzellen länger in Lösung bleiben. Gezielten Untersuchungen zu Folge lagern sich Fibroblasten nach ca. 1h, Herzmuskelzellen dagegen erst nach ca. 8h an. Durch diese Methode der selektiven Adhäsion ist es möglich, den Anteil reiner Herzmuskelzellen in

der Zellsuspension auf bis zu 80% zu erhöhen [226]. Nach 1 h wird leicht an die Gewebekulturflasche geklopft um schwach adhärenente Zellen zu lösen, der Überstand mit angereicherten Herzmuskelzellen wird sofort ausgesät. Die in der Flasche bleibenden, am Boden haftenden Fibroblasten können weiter kultiviert werden, siehe b).

- Zu beachten (hier sind noch einmal die kritischen Punkte zusammengefaßt)
 - möglichst schnell arbeiten
 - Herzen beim Herausnehmen möglichst schonend behandeln, z.B. nicht zerquetschen
 - Dichte beim Aussäen einhalten

Zellen aussäen: Die Zellen werden bei einer Dichte von ca. $80 - 120 \cdot 10^4$ Zellen/ml (Zelldichte der Suspension mit Zählkammer bestimmen und vorgegebene Dichte einstellen) ca. 2-3 mm hoch auf Fibronectin beschichtete Substrate (Si-Wafer, Glas, Zellkultur-Petrischalen) ausgesät (d.h. $25-35 \times 10^4$ Zellen/cm²), siehe Abb. 11.1.2 und Abb. 11.1.3. Fibronectin wirkt Adhäsions-unterstützend [227]. Bei zu geringer Zelldichte bilden die einzelnen Zellen keine Kontakte zueinander aus und es gibt keinen zusammenhängenden, synchron pulsenden Rasen. Einzelzellen pulsen auch, aber unregelmäßiger als Zellrasen. Bei zu hoher Dichte bildet sich ein mehrlagiger Zellrasen, der zwar äußerst stark pulsen kann, aber vermutlich nur lose auf dem Substrat fixiert ist.

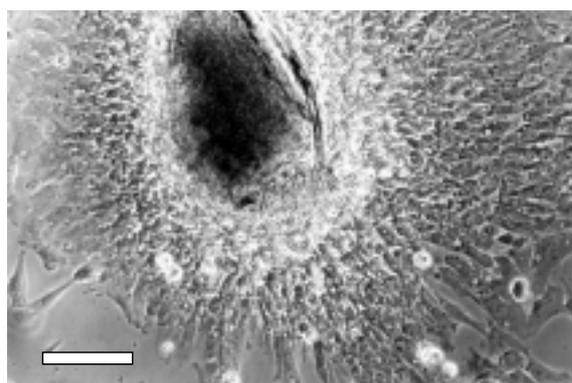


Abbildung 11.1.2: Rasen aus Herzzellen, die aus Hühnerembryos gewonnen wurden, auf Fibronectin-beschichteter Petrischale, 2 Tage in Kultur. In der Bildmitte ist ein „cluster“ aus dicht aneinander gelagerten Zellen zu sehen. Der gesamte Zellrasen hat mechanisch gepulst. Der Skalierungsbalken zeigt 50 µm an.

Medium wechseln: Das Medium wird jeden Tag gegen frisches 3% FCS Herz-Medium ausgetauscht. Der geringe FCS-Anteil stellt sicher, daß sich noch in der Lösung befindliche Fibroblasten nicht zu stark vermehren und die Herzmuskelzellen überwuchern. Achtung: das alte Medium muß möglichst sanft abgesaugt und das neue extrem vorsichtig zugegeben werden, sonst rollt sich der Zellrasen durch die mechanische Belastung von der Unterlage ab! Am ersten Tag nach der Präparation pulst bereits ein kleiner Anteil der Muskelzellen, ab dem 2. Tag pulsen immer größere Bereiche zusammenhängend. Die mechanische Bewegung der Zellen kann schön mit einem Lichtmikroskop mit 20x Objektiv verfolgt werden. Das simultane Pulsen über Flächen von 1 mm² ist keine Seltenheit. Nach ca. 1 Woche wird die mechanische Kontraktion immer schwächer.

Messungen: Das mechanische Pulsen der Zellen ist stark temperaturabhängig. So kontrahieren die Zellen bei Raumtemperatur meist nicht, fangen jedoch bei Heizung auf 37° C wieder zu schlagen an. Dafür ist die pH-Abhängigkeit eher gering. Alle Messungen können deshalb in CO₂-gepufferten Herz-Medium an Raumluft ohne CO₂-Reglung durchgeführt werden. Falls die Zellen mechanisch aktiv sein sollen, muß geheizt werden.

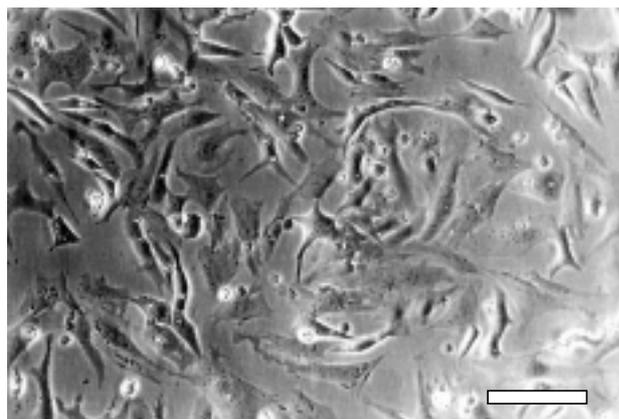


Abbildung 11.1.3: Einzelne Herzzellen, die aus Hühnerembryos gewonnen wurden, auf Fibronectin-beschichteter Petrischale, 3 Tage in Kultur. Der Skalierungsbalken zeigt 100 μm an.

(b) Bindegewebezellen aus dem Herzen

Neben Muskelzellen (Cardiomyocyten) sind im Herzen auch Bindegewebezellen (Fibroblasten) enthalten, d.h. bei der Vereinzelung von Herzgewebe ist immer auch ein gewisser Anteil von Fibroblasten enthalten, welche durch die bei der Präparation von Herzmuskelzellen beschriebene Methode der selektiven Adhäsion von den Muskelzellen getrennt werden können [226]. Das „Abfallprodukt“ Fibroblasten bei der Herzmuskelpräparation kann jedoch auch kultiviert werden. Dazu wird den bei der Herzmuskelpräparation im Gewebekulturfläschchen verbleibenden Fibroblasten 10% FCS Herzmedium zugegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Die Fibroblasten sind noch bedingt Proliferations-fähig, d.h. teilen und vermehren sich in der Zellkultur. Sie wachsen aber viel langsamer als beispielsweise NRK-Fibroblasten. Nachdem sich nach einigen Tagen ein konfluenter Zellrasen in der Gewebekulturflasche gebildet hat, können die Zellen in eine andere Gewebekulturflasche passagiert werden (analog der Trypsinierung von NRK-Fibroblasten), oder eingefroren werden. Die Herz-Fibroblasten teilen sich jedoch nicht beliebig oft, stellen also nach ein paar Tagen ihr Wachstum ein und können nur einmal eingefroren werden.

(c) NRK-Fibroblasten²

Kultur der Fibroblasten: NRK-Fibroblasten sind eine recht schnell wachsende Zell-Linie. Deshalb müssen die Zellen ca. 2 mal pro Woche passagiert werden, spätestens wenn sich ein konfluenter Zellrasen am Boden der Gewebekulturflasche gebildet hat. Dazu wird 0.25%-Trypsin als Dissoziationslösung bei einer Inkubationszeit von ca. 10 Minuten verwendet. Die frisch dissoziierten Zellen werden in NRK-Kulturmedium gelöst und die Zellsuspension mit einer Konzentration von ca. $3 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 2-3 mm hoch in neue Zellkulturflaschen ausgesiedelt (d.h. ≈ 10000 Zellen pro cm^2 Bodenfläche) und im Inkubator bei 37° und 5% CO₂ aufbewahrt.

Vorbereitung der Petrischalen bzw. Wafer zur Besiedelung mit Zellen: Da die Fibroblasten ausreichend auf SiO₂- und Petrischalen-Oberflächen haften wird auf eine Beschichtung verzichtet. Es reicht aus, die Wafer mit Ethanol zu sterilisieren.

Zellen aussäen: Für Experimente werden die Zellen von der Gewebekulturflasche gelöst und die frisch dissoziierten Zellen in NRK-Kulturmedium gelöst, so daß sich eine Konzentration

² nach Dr. A. de Roos.

von ca. $3 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ergibt. Die Zellsuspension wird 2-3 mm hoch auf Wafern bzw. Petrischalen ausgesiedelt und diese im Inkubator bei 37° und 5% CO_2 aufbewahrt. Nach zwei bis drei Tagen hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet und das weitere Wachstum der Fibroblasten muß gehemmt werden, vgl. Abb. 11.1.4. Dazu wird das NRK-Kulturmedium durch NRK-SATO-BIC-Medium ersetzt [57]. Dieses Bikarbonat-gepufferte Medium ist zur Hemmung des Zellwachstums serumfrei, wobei das Überleben der Zellen durch Serumersatzstoffe gewährleistet wird. In diesem Medium sind die Zellen einige Tage lang haltbar und können für Experimente verwendet werden.

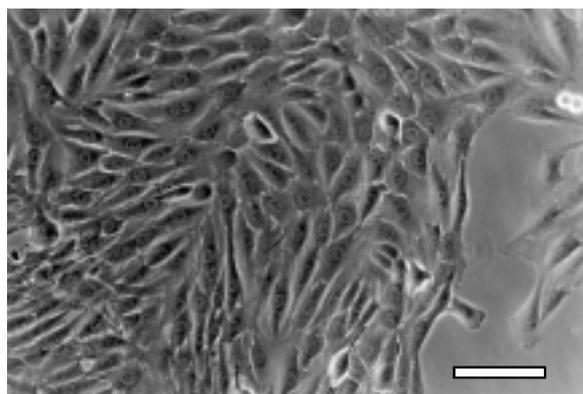


Abbildung 11.1.4: Konfluenter Rasen von NRK-Fibroblasten, adhärirt auf einer Petrischale. Der Skalierungsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$.

Membranpotential-Messungen: Zu den Messungen wird anstelle des NRK-SATO-BIC-Mediums DF-Salzlösung verwendet, welche die essentiellen Salze des DF-BIC Mediums, aber keine Aminosäuren und Zusatzstoffe enthält. Da das Auswiegen der kompletten Mediumbestandteile mit sehr viel Arbeit verbunden wäre und die Zellen sowieso nur während der Messung den Salzlösungen ausgesetzt sind, reicht ein Minimalmedium bestehend aus einer Salzlösung mit den essentiellen Ionen aus. Alle Messungen können bei Raumtemperatur und Raumluft durchgeführt werden.

Durch lokale Injektion einer mit K^+ angereicherten Salzlösung oder von Bradykinin (je $5 \mu\text{l}$ 1mM Bradykinin-Lösung pro 10 ml Medium, d.h. $0,5 \mu\text{mol/l}$) können die Fibroblasten depolarisiert werden [57]. Dabei ist zu beachten, daß die Depolarisation mit Bradykinin irreversibel ist. Da die Injektion allerdings lokal appliziert wird, können weiterhin andere Zellen depolarisiert werden. Als Kalium-angereicherte Salzlösung wird DF+K-Na-Salzlösung verwendet, diese entspricht DF-Salzlösung, bei welcher NaCl durch KCl substituiert ist. Zwischen zwei Depolarisationen mit hohem Kaliumgehalt an der selben Stelle sollten ca. fünf Minuten gewartet werden, bis die Zellen wieder ihr übliches Ruhepotential eingestellt haben. Es können sowohl einzelne Zellen als auch Bereiche eines Zellrasens depolarisiert werden.

Falls dem Medium Calcium entzogen wird (Medium durch DF-Ca-Salzlösung ersetzen), gibt es die Möglichkeit der Ausbildung spontaner Aktionspotentiale, welche mit 6 mm/s über einen Zellrasen propagieren können [57]. Eine größere Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung spontaner Aktionspotentiale ergibt sich, wenn Calcium gegen Strontium substituiert wird (DF-Ca+Sr-Salzlösung, CaCl_2 ist durch SrCl_2 ersetzt). Aktionspotentiale können auch gezielt durch lokale Depolarisation mit K^+ oder Bradykinin ausgelöst werden. Die Ausbildung von Aktionspotentialen ist nur an dichten Zellrasen möglich.

(d) Purkinje und Striatum-Zellen aus dem Hirn embryonaler Ratten³:

Purkinje Zellen (benannt nach ihrem Entdecker, einem polnischen Anatom) sind Nervenzellen aus dem Kleinhirn (Cerebellum). Striatum-Zellen sind Nervenzellen aus einer anderen Gehirnregion. Um den Abstand zwischen Zelle und Substrat möglichst gering zu halten, werden die Zellen in sogenannter Glia-freier Kultur gehalten. D.h. Wachstum von Gliazellen, welche üblicherweise unter den Nervenzellen die Haftung zum Substrat vermitteln, muß vermieden werden. Dazu wird mit serumfreiem Medium gearbeitet, welchem nur spezielle Wachstumsfaktoren für die Nervenzellen beigemischt sind. Da die Kulturen außerdem noch Antibiotika-frei gehalten werden, damit Wechselwirkungen zwischen Zellen und Antibiotika ausgeschlossen sind, muß auf äußerste Sterilität geachtet werden.

Vorbereitung der Petrischalen bzw. Wafer zur Besiedelung mit Zellen:

- in Laminin-beschichtete Wafer bzw. Poly-L-Ornithin/ Laminin beschichtete Petrischalen mit Sylgardring ca. 2 mm hoch Neuro-Präparationsmedium in Mitte des Sylgardringes füllen (über Spritze mit Sterilfilter)
- im Inkubator bei 37°C vorwärmen

Zellpräparation⁴: Zu jeder Präparation wird eine schwangere Ratte (Charles River, weibl. Wistar) mit 17 Tage alten Embryonen ("E17") benötigt. Nach Betäubung der Ratte mit Äther und Dekapitieren wird der Bauchraum der Ratte aufgeschnitten und die aneinandergereihten Embryos entnommen. Den Embryonen wird nun das Hirn entnommen und in Neuro-Präparationsmedium gegeben. Unter einem Operationsmikroskop werden aus den Hirnen nun die Regionen von Interesse heraus-präpariert, also entweder das Cerebellum (Purkinje-Zellen) oder das Striatum. Durch wiederholtes Titrieren mit selbstgezogenen Glaspipetten mit abnehmendem Durchmesser der Spitze (zuerst ca. 1000, dann 800, 600 und 400 µm) wird das Hirngewebe in Einzelzellen aufgelöst [61]. Die Dissoziation durch besseres Titrieren hat gegenüber einer Dissoziation mit Trypsin den Vorteil, weniger schädigend für die Zellen zu sein. So wird z.B. durch Einwirkung von Trypsin die Inaktivierung von Na⁺-Strömen leicht verändert⁵. Es liegt nun eine Zellsuspension in Neuro-Präparations-Medium vor, deren Zelldichte ausgezählt werden muß. Es folgt nun das Aussäen der Zellen⁶.

Zellen aussäen:

- Zellsuspension liegt in Konzentration $\approx 50-100 * 10^4$ Zellen/ml auf Eis vor
- soviel Zellsuspension auf Neuro-Präparationsmedium im Inneren des Sylgardringes geben, daß Zellkonzentration ca. $7-10 * 10^4$ Zellen / cm² beträgt⁷
- 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in Inkubator geben, Zellen lagern sich dabei an Wafer bzw. Petrischale an
- pro kleiner Petrischale (Durchmesser = 33 mm) 2 ml Neurokulturmedium (vorgewärmt) zugeben

³ nach Dr. J. Behrends.

⁴ Präparation im Physiologischen Institut von Dr. J. Behrends und Dr. E. Rumpel.

⁵ persönlich Mitteilung Dr. J. Behrends.

⁶ Um die Zellsuspension zwischen 2 Instituten zu transportieren, kann sie eisgekühlt ohne Bedenken ca. 30 Minuten lang vor dem Aussäen in einem Behälter aufbewahrt werden.

⁷ Beispiel: Sylgardring mit Durchmesser 6 mm, d.h. Bodenfläche $A = \pi(6\text{mm}/2)^2 = 0,28 \text{ cm}^2$, Konzentration der Zellsuspension $c = 100 * 10^4$ Zellen/ml; $V = 25 \text{ µl}$ der Zellsuspension auf Neuro-Präparationsmedium geben \Rightarrow Zelldichte = $cV/A = 100 * 10^4 \text{ Zellen/ml} * 25 \text{ µl} / 0,28 \text{ cm}^2 \approx 90 \text{ 000 Zellen / cm}^2$.

- vorsichtig Sylgardringe von Wafer bzw. Petrischale abziehen
- im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahren

Medium wechseln: Ungefähr einmal alle 1 bis 2 Wochen 2/3 des alten Mediums absaugen und frisches Neurokulturmedium zugeben. Die Zellen halten sich über Wochen! Achtung, es muß besonders auf Sterilität geachtet werden, da das Medium keinerlei Antibiotika enthält.

(e) Nervenzellen aus dem Hirn embryonaler Hühnchen

In ähnlicher Weise können Nervenzellen aus dem Hirn embryonaler Hühnchen gewonnen werden. Dazu werden ca. 7 Tage alte Hühnerembryos dekapitiert und das Gehirn (weißliche Masse) aus deren Kopf entnommen. Mit zwei spitzen Pinzetten muß dann zunächst die durch Äderchen rötlich gefärbte Hirnhaut entfernt werden. Durch Trypsinierung kann dann das Hirn analog zu (d) in Einzelzellen aufgelöst werden.

(f) CHO-Zellen⁸

„Chinese hamster ovarium“ (CHO)-Zellen [228-234] werden in CHO-K/M-Medium in Kultur gehalten. Ca. einmal pro Woche müssen die Zellen passagiert werden. Dabei werden die Zellen 10 min lang mit 0,02% EDTA als Dissoziationslösung behandelt. Dissoziation mit Trypsin könnte Rezeptoren in der Zellmembran zerstören und wird deshalb nicht verwendet. Neben Wildtyp-Zellen wurde eine gentechnisch transfizierte Zell-Line mit Charbachol-Rezeptoren verwendet. Um eine Selektion der transfizierten Zellen zu erreichen, wurde neben dem Gen für Charbachol-Rezeptoren ein Gen für eine Resistenz gegen Geneticin eingebaut. Einen Zusatz dieses Antibiotikums zum Medium können dann nur transfizierte Zelle überleben.

(g) SaOS2- und SW1353-Zellen⁹

Die Osteosarkom-Zelllinie SaOS2 (Knochenzellen) und die Chondrosarkom-Zelllinie SW 1353 (Knorpelzellen) werden in Knochenzellmedium in Kultur gehalten. Passagiert wird analog zum Protokoll für NRK-Fibroblasten.

⁸ nach N. Fuchs.

⁹ nach Dr. W. Aicher.

11.2 Beschichtungsprotokolle

(a) Laminin-Beschichtung¹⁰ [235, 236]

- Substrate sterilisieren
- sterile Sylgardringe (Innendurchmesser \approx 6 mm) dicht auf zu beschichtende Substrate aufdrücken (mit steriler Pinzette, kleben von selbst). Es wird immer nur der Teil der Substratoberfläche beschichtet, auf welchem nachher Zellen ausgesät werden, da Laminin teuer ist
- Inneres der Sylgardringe ca. 1 mm hoch mit 1% Laminin-Lösung bedecken, 1 - 3 h bei Raumtemperatur einwirken lassen („länger ist tendentiell besser“)
- Laminin absaugen
- sofort Zellen aussäen

(b) Poly-L-Ornithin / Laminin - Beschichtung¹¹

- zuerst Poly-L-Ornithin-Beschichtung (hält im Kühlschrank ca. 2-3 Wochen)
- vor Zellbesiedlung Laminin-Beschichtung darüber (nicht mit 70% Ethanol spülen!)

(c) Poly-L-Ornithin - Beschichtung¹² [224]

- Substrate sterilisieren
- Substrate mit 1,0 mg/ml Poly-L-Ornithin-Lösung bedecken
- über Nacht bei Raumtemperatur einwirken lassen
- dreimal mit sterilem Millipore-Wasser spülen
- Wasser absaugen und lufttrocknen lassen
- Beschichtung ist im Kühlschrank ca. 2-3 Wochen haltbar

(d) Fibronectin-Beschichtung [227, 237]

- Substrate sterilisieren
- Substrate ca. 1 mm hoch mit 0,01 mg/ml Fibronectin-Lösung beschichten
- ca. 1 h bei Raumtemperatur einwirken lassen
- zwei mal mit sterilem Millipore-Wasser spülen
- lufttrocknen lassen

(e) Cell-Tak-Beschichtung [238, 239]

Prinzip:

Cell-Tak wird in Essigsäure bei 4°C aufbewahrt („stock solution“), durch Erhöhung des pHs auf 6.5-8.0 fällt es aus und haftet auf Oberflächen [240].

¹⁰ nach Dr. J Behrends, L. Kargel.

¹¹ nach Dr. J. Behrends, L. Kargel.

¹² nach Dr. J. Behrends, L. Kargel.

optimale Cell-Tak-Beschichtungs-Konzentration[240]: Cell-Tak-Konzentration $\rho = m/A = 3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; Konzentration der Cell-Tak-Lösung: $c = 40 \mu\text{g}/\text{ml} = 40 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \Rightarrow$ Substrate $h=c/\rho = 3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 / 40 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \approx 1 \text{ mm}$ hoch beschichten

Protokoll:

- Substrate sterilisieren
- sterile Substrate mit frisch angesetzter (!) $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ Cell-Tak -Lösung ca. 1 mm hoch bedecken (Cell-Tak-Lösung: stock solution wird mit Bikarbonat-Puffer neutralisiert, Cell-Tak fällt aus und die Lösung muß sofort für die Beschichtung verwendet werden)
- mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren („unter steriler Flowhood stehen lassen“)
- Lösung absaugen
- zwei mal mit sterilem Millipore-Wasser spülen (um Bikarbonat zu entfernen)
- Zellen aussäen
- oder, falls beschichtete Substrate aufbewahrt werden sollen (einige Wochen): unter steriler Werkbank lufttrocknen lassen und bei 4°C aufbewahren

(f) Collagen-S-Beschichtung¹³ [241, 242]

- Substrate sterilisieren
- pro 35 mm Durchmesser der zu beschichtenden Fläche $300 \mu\text{l}$ $0,3 \text{ mg}/\text{ml}$ Collagen-S-Lösung auf Substrat geben (1 Tropfen aus Pasteurpipette entspricht ca. $50 \mu\text{l}$)
- mit Bunsenbrenner Spitze einer Pasteurpipette zu Glaskugel schmelzen
- damit Collagen-S-Lösung gut auf Substrat verstreichen
- über Nacht im Kühlschrank (ca. 4°C) lagern
- Collagen-S-Lösung absaugen
- einmal mit Medium spülen
- vor Besiedlung mit Zellen ca. 30 min zum Vorwärmen in Inkubator ($37,5^\circ\text{C}$)
- Zellen aussäen

(g) Poly-D-Lysin-Beschichtung [224, (K.2.6, S.34), 243-245]

- Substrate sterilisieren
- Substrate mit $0,1 \text{ mg}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin-Lösung zu $1 \text{ ml}/1000 \text{ mm}^2$ beschichten¹⁴
- ca. 30 min bei $37,5^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubieren
- Lösung absaugen und 3 mal mit sterilem Millipore-Wasser spülen
- Substrate anschließend sofort besiedeln

(h) Gelatine-Beschichtung¹⁵ [224]

- Substrate sterilisieren
- Substrate mit 2% Gelatine bedecken, meiste Gelatine absaugen und Rest lufttrocknen lassen

¹³ nach Dr. F. de Braet.

¹⁴ Petrischale mit 35 mm Durchmesser \Rightarrow zu beschichtende Fläche = $908 \text{ mm}^2 \Rightarrow$ mit $1 \text{ ml}/1000 \text{ mm}^2 \cdot 908 \text{ mm}^2 \approx 0,9 \text{ ml}$ Lösung beschichten; Wafer in Meßkammer mit 10 mm Durchmesser \Rightarrow zu beschichtende Fläche = $79 \text{ mm}^2 \Rightarrow$ mit $1 \text{ ml}/1000 \text{ mm}^2 \cdot 79 \text{ mm}^2 \approx 0,08 \text{ ml}$ Lösung beschichten

¹⁵ nach Dr. A. de Roos.

11.3 Allgemeine Zellkulturtechniken [224, 246-250]

(a) Kultur einer Zell-Linie

Zell-Linien sind Zellen aus Krebsgeschwüren, die im Gegensatz zu Primärkulturen weiterhin die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen. Sie können *in vitro* wachsen und sich vermehren¹⁶. Adhärenente Zellen sind dazu während der Zucht im Brutschrank (z.B. Heraeus B220 #5100 8049) an der Bodenfläche von Gewebekulturflaschen (z.B. Renner #38000, 38001, 38002) angewachsen, wo sie sich teilen und weiterwachsen können. Wenn die Zellen so dicht gewachsen sind, daß die gesamte Bodenfläche mit einem dichten Zellrasen überzogen ist („konfluenten Zellrasen“), müssen sie mit verringerter Dichte in neue Gewebekulturflaschen überführt werden („Zellen passagieren“), vgl. Abb. 11.3.1. Bei zu hoher Dichte sterben die Zellen sonst ab. Zum Passagieren der Zellen müssen diese zunächst vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst (siehe b) und dann in frischem Medium gelöst werden. Mit einer Zählkammer kann dann die Zelldichte bestimmt (siehe c) und durch die Menge der Medium-Zugabe damit die Konzentration der Zellen in der Lösung eingestellt werden. Die Zellsuspension wird anschließend in neue Gewebekulturflaschen gegeben, wo sich die Zellen erneut an der Bodenfläche anlagern und dort weiterwachsen („Zellen aussiedeln, aussäen“). Die Zelldichte beim Aussäen wird dabei üblicherweise so gewählt, daß die Bodenfläche nach ca. 3 Tagen wieder zugewachsen ist. Auf diese Weise können die Zellen in Kultur gehalten werden, weil immer frische Zellen nachwachsen. Für Experimente können die Zellen wie beschrieben von der Gewebekulturflasche gelöst und auf das vorgesehene Substrat (Petrischalen (z.B. Nunc # 153066, Renner # 38020), Silizium-Wafer, Glas-Plättchen,...) ausgesät werden. Üblicherweise werden Zell-Linien bis zu ca. 20-30 mal passagiert, bei weiteren Generationen könnten die Zellen schon so mutiert sein, daß sie nicht mehr den Ursprungszellen entsprechen. Um Zellen für längere Zeit aufzubewahren, können sie eingefroren werden (siehe e). Bei -200° C finden praktisch keine Reaktionen in den Zellen mehr statt, der Metabolismus ist gestoppt. In diesem Zustand können Zellen für Jahre aufbewahrt werden. Werden die Zellen wieder benötigt, müssen sie aufgetaut und in frischem Medium neu ausgesiedelt werden (siehe e).

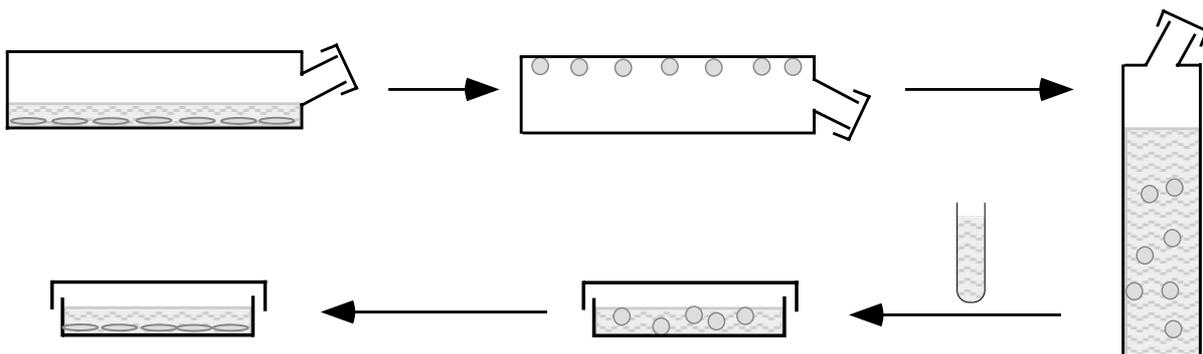


Abbildung 11.3.1: Passagieren von Zellen: Durch Zugabe eines Dissoziationsmediums lösen sich Zellen vom Boden einer Gewebekulturflasche, was durch Abrunden der Zellen zu verfolgen ist. Die losgelösten Zellen werden in frischem Medium aufgenommen und auf ein neues Substrat ausgesiedelt. Bei guter Adhäsion liegen die Zellen flach auf dem Substrat.

¹⁶ Zell-Linie können auch durch Einpflanzung eines Tumorgens in eine Primärkultur erzeugt werden oder durch natürliche Mutation entstehen.

(b) Zellen von Gewebekulturflasche lösen

- Altes Medium absaugen
- Gewebekulturflasche zweimal mit Calcium- und Magnesium-freiem Puffer spülen (HBSS-Ca-Mg oder DPBS-Ca-Mg); kein Ca^{2+} , Mg^{2+} , da dieses die Zelladhäsion unterstützt; durch Spülen werden nicht adhärenente „Zell-Leichen“ und nicht-definierte umherschwimmende Zellreste entfernt; alle Lösungen werden dabei mit einer elektronischen Pipettierhilfe (Accu-Jet, ISO 9001, Renner) und Plastikpipetten (1,2,5,10,25 ml, # 06029, 06030, 06031, 06032, 06028, Renner) zugegeben und entfernt
- Spülpuffer absaugen
- Dissoziationsmedium zugeben, so daß der Boden damit bedeckt ist, Dissoziationsmedium durch leichtes Schwenken über den Zellen gut verteilen (Das Dissoziationsmedium ist je nach verwendetem Zelltyp auszuwählen. z.B. Trypsin-Lösungen verschiedener Konzentration, Trypsin-EDTA-Gemische, reines EDTA. EDTA bindet die zur Zelladhäsion notwendigen Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), was ausreicht um schwach adhärenente Zellen von ihrer Unterlage zu lösen. Trypsin ist ein Enzym, welches die für die Zelladhäsion verantwortlichen Proteine an der Zelloberfläche außer Funktion setzt. Trypsin-EDTA-Lösungen kombinieren beide Wege und sind somit für stark adhärenente Zellen zu verwenden)
- nach kurzem Schwenken Dissoziationsmedium gut absaugen (nach Ablösen der Zellen werden die dadurch entstandenen Einzelzellen wieder in Medium gelöst. Je weniger Reste des Dissoziationsmedium dabei noch vorhanden sind, um so besser)
- Flasche umdrehen, so daß „Zellen auf dem Kopf stehen“ und für 5 bis 10 Minuten bei 37°C in Inkubator stellen (Dadurch stehen die Zellen mit möglichst wenig Dissoziationsmedium im Kontakt, da überschüssige Dissoziationslösung nach unten abtropft; Generell ist eine möglichst schonende Dissoziation vorzuziehen), vgl. Abb. 11.3.2
- an Wand der Gewebekulturflasche klopfen; die Zellen beginnen sich dann von der Bodenfläche zu lösen und rinnen in den Unterteil der Gewebekulturflasche. Dies ist optisch sichtbar: beim Loslösen der Zellen nimmt die Trübung der Flaschenwand durch die adhärenierten Zellen ab, wenn alle Zellen abgeschwommen sind wird die Wand klar
- Zell-Lösung im Unterteil der Flasche in frischem Medium lösen. Eventuell Zell-Lösung ein paar mal leicht mit einer Pasteurpipette ansaugen und wieder ausblasen („titrieren“), um noch vorhandenen Zellcluster in Einzelzellen aufzulösen. Mediummenge für die gewünschte Zelldichte zuerst grob abschätzen und dann nach Bestimmung der Zellkonzentration genau ausrechnen

Ergebnis: Zell-Lösung der gewünschten Konzentration, welche nun auf neuer Unterlage ausgesiedelt werden muß.

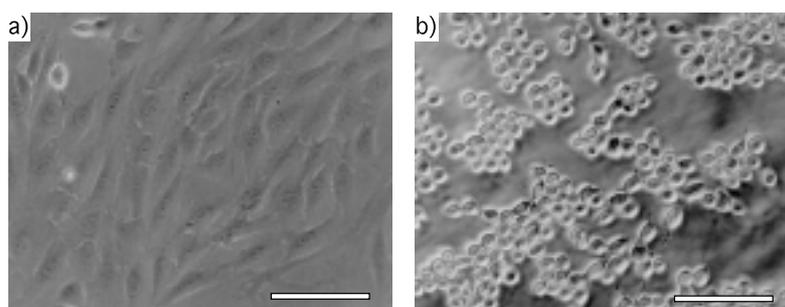


Abbildung 11.3.2: Am Boden einer Gewebekulturflasche adhärenierte NRK-Fibroblasten, a) vor und b) nach Zugabe von Dissoziationslösung. Vor Lösung der Zellen vom Substrat sind diese stark adhärenent, was an der langgestreckten flachen Form erkennbar ist. Nach Lösung der Zellen vom Substrat sind sie kugelförmig. Die Skalierungsbalken zeigen je $100\ \mu\text{m}$ an.

(c) Zellkonzentration bestimmen

- Falls tote Zellen markiert werden sollen (Vitabilitätstest), zu Zellsuspension 1:10 Volumenanteil Trypan-Blau zugeben
- Einen Tropfen Zellsuspension in Neubauer-Zählkammer (z.B. #616 510 78, Fischer Scientific) pipettieren. Dies ist im wesentlichen ein definiertes Volumen von 1 mm^2 Bodenfläche und $0,1 \text{ mm}$ Höhe, d.h. $0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$
- Alle Zellen, welche sich innerhalb dieses markierten Volumens befinden unter Mikroskop auszählen, tote Zellen sind blau angefärbt und werden nicht mit gezählt.
- Werden x Zellen gezählt, so ist die Zelldichte $x \cdot 10^4$ Zellen/ml

(d) Vitabilitätstest

Ziel des Vitabilitätstestes ist die Markierung toter Zellen. Dazu wird einem kleinen Teil der zu untersuchenden Zellsuspension 1:10 Volumenanteil Trypan-Blau zugeben. Tote Zellen werden dadurch blau gefärbt, lebende Zellen bleiben ohne Färbung. Die gefärbte Zellsuspension wird anschließend verworfen.

(e) Zellen einfrieren und wieder auftauen

einfrieren:

- Zellen in Konzentration $2 \cdot 10^7 / \text{ml}$ in Einfriermischung lösen
- je 1 ml in Cryotubes (Roth, # E310.1) abfüllen
- möglichst langsam abkühlen (ideal: $1^\circ \text{ C} / \text{min}$): entweder: 30 min in $0-5^\circ \text{ C}$ Kühlschrank, dann über Nacht in Styroporbox in -70° Gefriertruhe lagern oder: ohne Styroporbox für 2 h in -30° Kühlschrank lagern
- Cryotubes in flüssigem Stickstoff (-200° C) aufbewahren

auftauen:

- möglichst schnell in 37° C Wasserbad auftauen (Einfriermedium ist cytotoxisch)
- frisches Medium zugeben und zentrifugieren (z.B. Beckmann Avanti J-25 Zentrifuge), Einfriermittel ist dann im Überstand
- Pellet in frischem Medium lösen
- Zellen aussäen

(f) Zellen fixieren¹⁷

Die Fixierung dient zur Konservierung von Zellen. Dabei werden mit einem Fixativ Querverbindungen zwischen den Zellproteinen erzeugt. Fixierte und damit tote Zellen sind wochenlang im Kühlschrank aufbewahrbar. Fixiert werden müssen Zellen z.B. vor Anfärbungen oder Abbildung im Elektronenmikroskop.

- Medium über Zellen absaugen
- ca. 1 mm hoch Fixativ bei Raumtemperatur auf Zellen geben, 30 Minuten einwirken lassen
- Fixativ absaugen und 2 mal gut mit 0.2 M PB spülen
- ca. 1 mm hoch 0.2 M PB auf Zellen geben
- Zellen in Kühlschrank aufbewahren

¹⁷ nach Dr. J. Behrends.

(g) Substrate sterilisieren

Substrate durch Baden in 70% Ethanol sterilisieren, Ethanol absaugen und dreimal mit autoklaviertem und sterilgefiltertem Millipore-Wasser spülen (Sterilfilter auf Spritze), Wasser absaugen

(f) Silizium-Wafer reinigen¹⁸

- Wafer manuell mit fuselfreiem Tuch und Ethanol abwischen
- falls Siliconfett-Reste auf Waferoberfläche vorhanden sind, 5 min Ultraschallbad mit Ethyl-Essigsäureester + spülen mit Millipore-Wasser
- 5 min Ultraschallbad in Ethanol
- 20 mal mit Millipore-Wasser spülen
- 5 min Ultraschallbad in 2% Hellmanex II - Lösung („optimierte Seifenlauge“, löst Fettreste)
- 20 mal mit Millipore-Wasser spülen

basische Reinigung:

- 5 min Ultraschallbad in gesättigter KOH/Ethanol -Lösung (KOH-Plätzchen in Ethanol gelöst) (KOH ätzt Siliziumoxid-Oberfläche leicht an; KOH anstelle NaOH und Lösung in Ethanol statt in Wasser, da dann Ätzwirkung nicht zu stark ist. Bei zu starkem Ätzen würden Krater in der Oberfläche entstehen)

saure Reinigung:

- Wafer für 1 h bei 80° C in 20% Schwefelsäure geben (frisch angesetzt: 20% Schwefelsäure auf 80% Wasser geben, nicht umgekehrt!)
- 20 mal mit Millipore-Wasser spülen
- 5 min Ultraschallbad in Millipore-Wasser
- 20 mal mit Millipore-Wasser spülen
- 5 min Ultraschallbad in Millipore-Wasser
- 20 mal mit Millipore-Wasser spülen

(g) Sylgardringe¹⁹

gießen:

Sylgard 184 Binder und Härter (Sylgard 184 von Dow Corning, über Karmann & Droll, München) im Verhältnis 10:1 mischen und ca. 2-3 mm hoch in Petrischalen gießen, ca. 1 Woche härten lassen. Mit einer Metallstanze können Ringe in verschiedenen Durchmessern hergestellt werden. Zur Haftunterstützung können die Ringe leicht mit Siliconfett eingerieben werden.

reinigen + sterilisieren:

mit Millipore-Wasser und anschließend in 70% Ethanol spülen, dann bei 180°C im Heißluftschrank sterilisieren

(h) Patch-clamp Lösungen ansetzen

Die Lösung in der patch-clamp Pipette sollte möglichst der intrazellulärer Lösung entsprechen, damit es zu keiner Diffusion von Ionen aus der Zelle in die Pipette oder umgekehrt kommt.

¹⁸ saure Reinigung nach Dr. A. Offenhäusser, basische nach H. Clausen-Schaumann.

¹⁹ nach L. Kargl.

Zusätzlich wird der Pipetten-Lösung meist ATP und EGTA zugesetzt, um die Energieversorgung der Zelle sicherzustellen und intrazelluläres Calcium zu puffern. Für einen guten Pipetten-Zell-Kontakt („seal“) sollte die Osmolarität der Pipetten-Lösung immer um ca. 15-20% kleiner als die des extrazellulären Zellmediums sein²⁰

Verwendete Lösungen:

Zelltyp	intrazellulär (patch-clamp Pipette)	extrazellulär (Medium)
Herzmuskelzellen	Herzzell-patch-clamp-Lösung: 270 mOsm	3% FCS Herz-Medium (mit M199): 314 mOsm
NRK-Fibroblasten	NRK-Fibroblasten-patch-clamp-Lösung: 272 mOsm	DF-Salzlösung: 297 mOsm
Knochenzellen		Knochenzell-Medium: 305 mOsm
Purkinje-Zellen	Neuron-patch-clamp-Lösung: 240 mOsm	physiologische Salz - Lösung für Neurone: 265 mOsm

Bei den zu intrazellulären Ableitungen verwendeten Glasmikroelektroden ist der Durchmesser der Pipettenspitze so klein (Pipettenwiderstand 20-30 M Ω im Vergleich zu 4-6 M Ω bei patch-clamp Pipetten), daß Diffusion von Lösung aus der Zelle in die Pipette vernachlässigt werden kann. Typischerweise sind intrazelluläre Mikroelektroden mit 3M Kaliumacetat-Lösung gefüllt [5].

(i) Osmolarität bestimmen

entweder: mit Leitfähigkeits-Meßgerät bestimmen (in [mOsm])

oder: direkt aus Salzkonzentrationen des Mediums bestimmen: Einzelleitfähigkeiten aller Ionen aufaddieren; Leitfähigkeit pro 1 mmol z-wertiger Ionen ist z mOsm; nicht-ionische Zusätze oder kleinere Salzmengen werden vernachlässigt; Beispiel: physiologische Salz - Lösung für Neurone: Osmolarität = $2 \cdot 125$ mOsm (Na⁺, Cl⁻ aus NaCl) + $2 \cdot 1$ mOsm (K⁺, Cl⁻ aus KCl) + $4 \cdot 1$ mOsm (Mg²⁺, Cl⁻ aus MgCl₂) + $4 \cdot 1$ mOsm (Ca²⁺, Cl⁻ aus CaCl₂) = 260 mOsm

(j) Ag/AgCl-Elektroden herstellen

Mit Schleifpapier blank geriebenen Silberdraht über 1-2 k Ω Widerstand an Pluspol einer 9 V Blockbatterie, beliebigen anderen Draht an Minuspol der Batterie anschließen. Ein bis zwei Minuten in 150 mM NaCl-Lösung (ca. 8800 mg NaCl mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen) elektrolysieren, bis ein durchgängiger dünner bräunlicher Film entsteht.

²⁰ persönliche Mitteilung Dr. J Behrends.

11.4 Chemikalien und Medien

(a) Kulturmedien

- 3% FCS Herz-Medium²¹:

Medium zur Kultur von Cardiomyocyten

pro 200 ml:

für Hühnerherzen: 20 ml 10-fach M199; für Rattenherzen: 20 ml 10-fach Ham's F10

4 ml 1M HEPES

1 ml 7,5% Natriumbikarbonat

5 ml Herz-Antibiotika-Mischung

1 ml ITS

6 ml FCS

mit Millipore-Wasser auf 200 ml auffüllen

pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und sterilfiltern

Sterilfilter (Satorius # 16534, Nalgene 237,060-6, Corning F9893)

- 10% FCS Herz-Medium:

Medium zur Präparation von Cardiomyocyten und Kultur von Fibroblasten aus dem Herzen

pro 100 ml:

93 ml 3% FCS Herz-Medium

7 ml FCS

- 40% FCS Herz-Medium:

Stopp-Medium zur Trypsin-Inaktivierung bei der Präparation von Cardiomyocyten

pro 4 ml:

3 ml 10% FCS Herz-Medium

1 ml FCS

- 10-fach M199: Medium 199 (10x)

Medium zur Kultur von Herzzellen

mit modifizierten Earle's Salzen, L-Glutamin, 1,25 g/l Natriumbikarbonat (Gibco 21183)

- M199: Medium 199 (Pulvermedium)

mit Earle's Salzen, L-Glutamin, ohne Natriumbikarbonat (Gibco 31100)

- NRK-Kulturmedium²²: Bikarbonat gepuffertes Kultur-Medium für NRK-Fibroblasten

90 % DMEM-BIC

10 % NCS (besser als FCS für Fibroblasten-Wachstum nach Albert de Roos)

1 % Penstrep

- NRK-SATO-BIC: Bikarbonat gepuffertes serumfreies Medium für NRK-Fibroblasten

pro 100 ml:

98 ml DF-BIC

²¹ nach Dr. M. Denyer, Dr. M. Riehle.

²² nach Dr. A. de Roos.

1 ml ITS (Serum-Substitution für serumfreie Kultur)

1 ml Penstrep

(Originalrezept: statt 1 ml ITS pro 100 ml (entspricht 5,5 µg/ml Transferrin, 30 nM Natriumselenit, 10 µg/ml Insulin) wird 10 µg/ml Transferrin und 30 nM Natriumselenit verwendet)

- NRK-SATO-SUBS: Bikarbonat freies, serumfreies Medium für NRK-Fibroblasten, bei welchem NaHCO₃ durch NaCl substituiert ist

pro 100 ml:

98 ml DF-SUBS

1 ml ITS (Serum-Substitution für serumfreie Kultur)

1 ml Penstrep (⇔ 1%) oder 0,5 ml Getamizin (⇔ 0,5%)

- DMEM-BIC: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Bikarbonatgepuffert
with 4500 mg/l glucose, L-glutamine, pyridoxine, HCl and NaHCO₃ (Sigma D-5796)
oder: High Glucose mit GLUTAMAX I, 4500 mg/l D-Glucose, Na-Pyruvat (Gibco 31966)
oder: je 1 l DMEM (Pulvermedium) + 3700 mg NaHCO₃ mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und sterilfiltern

- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Pulvermedium)
with 4500 mg/l glucose, L-glutamine, without NaHCO₃ (Sigma D-5648 oder D-6655)

- DF-BIC: Dulbecco's MEM / HAM's F-12 (1:1) Bikarbonat gepuffert
mit L-Glutamin, Pyridoxin•HCl, ohne HEPES-Puffer (Gibco 11321)
oder: je 1 l DF (Pulvermedium) + 2438 mg NaHCO₃ (⇔ 29 mM) mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH auf 7,3 einstellen und sterilfiltrieren

- DF-SUBS: Dulbecco's MEM / HAM's F-12 (1:1) Natriumbikarbonat durch NaCl ersetzt
je 1 l DF (Pulvermedium) + 1695 mg NaCl (⇔ 29 mM) mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH auf 7,3 einstellen und sterilfiltrieren

- DF: Dulbecco's MEM / HAM's F-12 (1:1) bikarbonatfrei; Pulvermedium (Gibco 32500)

- Neuro-Präparationsmedium²³:

serumfreies Medium zur Präparation von Nervenzellen

für 100 ml:

99 ml BME

0,55 ml 40% Glucose-Lösung (⇔ 2,2 mg/ml)

0,5 ml 200 mM L-Glutamin (⇔ 1 mmol/ml)

0,3 ml 1,25% Insulin-Lösung (⇔ 37,5 µg/ml)

- Serumfreies Neuro-Kulturmedium (NBM)²⁴:

serumfreies Medium für die Kultur von Nervenzellen, unterdrückt Glia-Wachstum

²³ nach Dr. J. Behrends.

²⁴ nach Dr. J. Behrends.

für 100 ml Medium:

98 ml Neurobasalmedium

2 ml Wachstumsfaktor B 27

0,25 ml 200 mM L-Glutamin

- Serumhaltiges Neuro-Kulturmedium (SCM)²⁵:

serumhaltiges Medium für die Kultur von Nervenzellen

für 100 ml Medium:

90 ml BME

10 ml Pferdeserum (HS)

0,55 ml 40% Glucose-Lösung (\Leftrightarrow 2,2 mg/ml)

0,5 ml 200 mM L-Glutamin (\Leftrightarrow 1 mmol/ml)

0,3 ml 1,25% Insulin-Lösung (\Leftrightarrow 37,5 μ g/ml)

- Neurobasalmedium:

ohne L-Glutamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure (Gibco 21103)

Basal-Medium speziell für die Kultur von Neuronen des Zentralen Nerven Systems. Es ermöglicht Langzeitkultivierung und Wachstum neuronaler Zellen. Gibco-interne Mischung

- CHO-K-Medium²⁶:

Medium für Wildtyp CHO-Zellen, Bikarbonat-gepuffert

für 100 ml Medium:

89 ml HAM's F12 BIC

10 ml FCS (\Leftrightarrow 10%)

1 ml Penstrep (\Leftrightarrow 1%) oder 0,5 ml Getamizin (\Leftrightarrow 0,5%)

statt HAM's F12 wären auch DMEM oder HAM's F10 möglich, HAM's F12 ist aber speziell für CHO-Zellen entwickelt worden

- CHO-M-Medium:

Medium für genmanipulierte CHO -Zellen, Bikarbonat-gepuffert

für 100 ml Medium:

89 ml HAM's F12 BIC

10 ml FCS (\Leftrightarrow 10%)

1 ml Penstrep (\Leftrightarrow 1%)

0.5 ml Geneticin (\Leftrightarrow 250 μ g/ml)

Geneticin wirkt als Selektionsmarker: nur mutierte CHO-M-Zellen sind durch Genmanipulation gegen Geneticin immun, Wildtypzellen werden abgetötet. Dies stellt sicher, daß nicht CHO-M-Zellen zu CHO-K-Zellen rückmutieren, nur wirkliche CHO-M-Zellen werden kultiviert.

- HAM's F12 BIC: Bikarbonat gepuffertes HAM's F12 Medium [231]

pro Liter:

1000 ml HAM's F12 (Pulvermedium)

²⁵ nach Dr. J. Behrends.

²⁶ nach N. Fuchs.

1180 mg NaHCO₃ (⇔ 14 mM)

mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,3 einstellen und sterilfiltern

• HAM's F12 SUBS:

Bikarbonat- freies Medium, bei welchem Natriumbikarbonat durch Natriumchlorid substituiert ist, um Osmolarität zu erhalten, d.h. 14 mM NaCl statt 14 mM NaHCO₃ wie bei HAM's F12 BIC

pro Liter:

1000 ml HAM's F12 (Pulvermedium)

820 mg NaCl (⇔ 14 mM)

mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH oder HCl auf 7,3 einstellen und sterilfiltern

• Ham's F12: Nutrient Mixture Ham's F-12 (Pulvermedium!)

mit L-Glutamin, ohne Natriumbikarbonat (Sigma N-6760)

• HAM's F10 BIC: Bikarbonat gepuffertes HAM's F10 Medium [231]

pro Liter:

100 ml 10-fach HAM's F10 (10-fach Konzentrat)

1200 mg NaHCO₃

mit Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,3 einstellen und sterilfiltern

• 10-fach Ham's F10: Nutrient Mixture Ham's F-10 (10x)

mit L-Glutamin, ohne Natriumbikarbonat (Gibco 21955)

• BME: Basal Medium (Eagle) mit Earle's Salzen, ohne L-Glutamin (Gibco 41010)

• Knochenzell-Medium²⁷:

pro ca. 600 ml:

500 ml DF

1540 mg HEPES

600 mg NaHCO₃

50 ml FCS

10 ml Penstrep

10 ml MEM-Vitaminlösung

6 ml Amphotericin B

pH mit NaOH auf 7,4 einstellen + sterilfiltern

²⁷ nach Dr. W. Aicher.

(b) Salzlösungen, Puffer

• NRK-Fibroblasten-patch-clamp-Lösung

	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/0,1 l]
NaCl	58,44	25	146
KCl	74,55	110	820
CaCl ₂	111	1	11
MgCl ₂	95,22	1	10
EGTA	380,4	3,5	133
Tris	121,1	10	121

$$m[\text{mg}/0,1 \text{ l}] = 0,1 \cdot M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}]$$

mit KOH auf pH = 7,4 einstellen

(Hoher K⁺, niedriger Na⁺-Gehalt, entspricht intrazellulärer Lösung)

DF-Salzlösungen für Membranpotentialmessungen an Fibroblasten²⁸

Bikarbonat-gepuffert

- DF-Salzlösung: Lösung mit Salzen von DF-Medium
- DF+K-Na-Salzlösung: DF-Salzlösung, bei welcher NaCl durch KCl substituiert ist
- DF-Ca-Salzlösung: Calcium-freie DF-Salzlösung
- DF-Ca+Sr-Salzlösung: DF-Salzlösung, bei welcher CaCl₂ durch SrCl₂ ersetzt ist

Salzlösung:			DF	DF+K-Na	DF-Ca	DF-Ca+Sr
Salz	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/l]	m[mg/l]	m[mg/l]	m[mg/l]
CaCl ₂	111	1	116	116	0	0
KCl	74,56	4 bzw. 124	312	9252	312	312
MgCl ₂	95,22	0,3	29	29	29	29
MgSO ₄	120,4	0,4	49	49	49	49
NaCl	58,44	120	6995	0	6995	6995
NaHCO ₃	84,01	29	2438	2438	2438	2438
NaH ₂ PO ₄ bzw. NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O bzw. NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	119,98 bzw. 137,0 bzw. 156,01	0,45	54 bzw. 62 bzw. 71	54 bzw. 62 bzw. 71	54 bzw. 62 bzw. 71	54 bzw. 62 bzw. 71
Na ₂ HPO ₄ bzw. Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	141,96 bzw. 268,07	0,5	71 bzw. 134	71 bzw. 134	71 bzw. 134	71 bzw. 134
SrCl ₂ bzw. SrCl ₂ •6H ₂ O	158,5 bzw. 266,6	3	0	0	0	476 bzw. 800
Phenolrot	376,4	0,02	8	8	8	8
D-Glucose	180,2	17,5	3151	3153	3153	3153
Na-Pyruvat	110,0	0,5	55	55	55	55

$$(m[\text{mg}/\text{l}] = M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}])$$

²⁸ nach Dr. A. de Roos.

• Neuron-patch-clamp-Lösung:

	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/0,1 l]
KCl	74,55	110	820
MgCl ₂ bzw. MgCl ₂ •6H ₂ O	95,22 bzw. 203,3	5	48 bzw. 102
EGTA	380,4	0,6	23
HEPES	238,31	10	238
Na-ATP	551,1	1	55

$m[\text{mg}/0,1 \text{ l}] = 0.1 \cdot M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}]$; mit KOH auf pH = 7,3 einstellen
(Achtung: Auf keinen Fall Natrium-Salze von HEPES und EGTA verwenden!)

• Physiologische Salzlösung für Neurone

	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/l]
NaCl	58,44	125	7305
KCl	74,55	1	75
MgCl ₂ bzw. MgCl ₂ •6H ₂ O	95,22 bzw. 203,3	1	95 bzw. 203
CaCl ₂	110,99	1	111
D-Glucose	180,2	10	1800
HEPES	238,31	20	4766

$m[\text{mg}/\text{l}] = M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}]$; mit NaOH auf pH = 7,35 einstellen

• Herzzell-patch-clamp-Lösung [251]

	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/0,1 l]
KCl	74,55	120	895
CaCl ₂	111	0,1	1
MgCl ₂ bzw. MgCl ₂ •6H ₂ O	95,22 bzw. 203,3	2	19 bzw. 41
EGTA	380,4	1,1	42
HEPES	238,31	10	238
D-Glucose	180,2	30	541

$m[\text{mg}/0,1 \text{ l}] = 0.1 \cdot M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}]$; mit KOH auf pH = 7,35 einstellen

• Versene Puffer²⁹:

	M[g/mol]	c[mM]	m[mg/l]
NaCl	58,44	140	8182
KCl	74,56	5	373
EDTA	292,25	0,5	146
HEPES	238,31	10	2383
D-Glucose	180,2	5	901
Phenolrot	376,4	0,025	9

$m[\text{mg}/\text{l}] = M[\text{g}/\text{mol}] \cdot c[\text{mM}]$; mit NaOH auf pH = 7,5 einstellen
oder: 0,2 g/l = 0,53 mM in isotonisch gepufferter Kochsalzlösung (Gibco 15040)

²⁹ nach Dr. M. Denyer.

- DPBS-Ca-Mg: Dulbecco's phosphate buffered saline, calcium- and magnesium free, without phenolred, Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH = 7,3 (Sigma D 5527, Gibco 14190)
- HBSS-Ca-Mg: Hanks' balanced salt solution, Hanks gepufferte Salzlösung modified with sodium bicarbonate, without calcium chloride and magnesium sulfate, pH = 7,3; Herstellung aus 10-fach Konzentrat: 100 ml 10*HBSS-Ca-Mg mit sterilem Millipore-Wasser auf 1 l auffüllen (Sigma H 6648, Gibco 14175)
- 10-fach HBSS-Ca-Mg: 10-fach konzentriertes HBSS-Ca-Mg (Gibco 14185)
- GBSS: Gey's gepufferte Salzlösung (Gibco 24260)

Konzentrations-Angaben für Salzlösungen in g/l:

	DPBS-Ca-Mg	HBSS-Ca-Mg	10-fach HBSS-Ca-Mg	GBSS
anorganische Salze:				
CaCl ₂ •2H ₂ O	0	0	0	0,22
KCl	0,20	0,40	10*0,40	0,37
KH ₂ PO ₄	0,20	0,06	10*0,06	0,03
MgCl ₂ •6H ₂ O	0	0	0	0,21
MgSO ₂ •7H ₂ O	0	0	0	0,07
NaCl	8	8	10*8	8
NaHCO ₃	0	0,35	0	0,227
Na ₂ HPO ₄	1,15	0,048	0	0,12
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	0	0	10*0,09	0
andere Komponenten:				
D-Glucose	0	1	10*1	1,00

- 0,2 M PB: 0,2 molarer Phosphat-Puffer
6,63 g/l NaH₂PO₄ + 21,56 g/l Na₂HPO₄
pH mit NaOH_{konz} bzw. HCl_{konz} auf 7,2 einstellen
- 0,15 M Boratpuffer³⁰: 9,28 g Borsäure pro 1 l Millipore-Wasser lösen; sterilfiltern!
- Borsäure: H₃BO₃ 61,83 g/mol (Sigma B 0252)
- 7,5% Natriumbikarbonat-Lösung: 7,5 g NaHCO₃ mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt
M = 84,01 g/mol (entspricht 0,89 M Natriumbikarbonat) (Sigma S-8761, Gibco 25080)
- 0,1 M Natriumbikarbonat-Lösung: M(NaHCO₃) = 84,01 g/mol
je 0,42 g Natriumbikarbonat (Natriumhydrogenkarbonat, sodiumhydrogencarbonate, sodium bicarbonate) mit Millipore-Wasser auf 50 ml auffüllen + sterilfiltern

³⁰ nach L. Kargel.

- 2 M Natriumkarbonat-Lösung: $M(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 106,0 \text{ g/mol}$
je 10,6 g Natriumkarbonat (sodium carbonate) Na_2CO_3 mit Millipore-Wasser auf 50 ml auffüllen + sterilfiltern
- 1 M HEPES: (Sigma H-0887)
- HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure, (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$; $M = 238,3 \text{ g/mol}$ (Aldrich 16,371-6, Sigma H-3375); pH-Puffer
- Tris: Trizma® Base, Tris[hydroxymethyl]aminomethane $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$; $M = 121,1 \text{ g/mol}$ (Sigma T6791); pH-Puffer
- 0,02% EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt prepared in DPBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Sigma E-8008)
- EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylenediaminetetraacetic acid, [Ethylenedinitrilo]tetraacetic acid; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$; $M = 292,25 \text{ g/mol}$ (Roth 8040.1, Sigma E-9884); puffert Calcium und Magnesium
- EGTA: Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$; $M = 380,4 \text{ g/mol}$ (Sigma E-4378); puffert Calcium, aber nicht Magnesium

(c) Seren

- FCS: Fetal Bovine Serum (Sigma F-7524, Gibco 10108 hitzeinaktiviert)
- NCS: Newborn Calf Serum (Sigma N-4637)
- HS: Pferdeserum (Sigma oder Gibco)

(d) Enzymlösungen

- Trypsin: 1300 units/mg (Sigma T-7409)
Enzym zur Dissoziation von Zellgewebe
- 0.25%-Trypsin/EDTA: 0.25% Trypsin-EDTA Solution (Sigma T-4049)
2.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA•4 Na in HBSS
- 0.25%-Trypsin: Trypsin 1x Solution (Sigma T-4424)
2.5 g/l porcine trypsin in HBSS
- 0.05%-Trypsin/EDTA: 0.5 g/l Trypsin in Versene Puffer
0.05% Trypsin in Versene Puffer lösen:
je 50 mg Trypsin pro 100 ml Versene Puffer auflösen und sterilfiltern

- 10000 units/ml DNase II-Lösung:
670 mg DNase II (entspricht 300 000 units) in 30 ml HBSS-Ca-Mg lösen
- DNase II: Deoxyribonuclease II, Deoxyribonucleate 3'-oligonucleotidohydrolase Typ VI
450 units / mg; lyophilized powder, essentially salt free
1 Flasche enthält 670 mg (Sigma DN-II-B); Baut DNA ab

(e) Antibiotika

- Amphotericin B: 250 µg/ml
Amphotericin B Solution (Sigma A-2942)
oder: Fungizone (Amphotericin B) (Gibco 15290); Pilz- / Hefen-Gift
- Penstrep: Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma P-7539 oder Gibco 15140)
10000 units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin-Sulfat in 0.9% NaCl
- Gentamizin: Gentamizin-Sulfat
10 mg/ml (Sigma G-1272 oder Gibco 15710)
- Geneticin: Antibiotika G418
50 mg/ml (Sigma G-7034)
- Herz-Antibiotika-Mischung:³¹
Antibiotika / L-Glutamin -Gemisch für die Kultur von Herzmuskelzellen
pro 26 ml:
15 ml 200mM L-Glutamin
1,25 ml Amphotericin B
10 ml Penstrep

(f) Zelladhäsionsunterstützer:

- 1% Laminin-Lösung:
20 µl Laminin in je 2 ml sterilem GBSS lösen
- Laminin: Unterstützt Zellanhaftung
Natural Mouse Laminin, in 0,05 M Tris-HCl und 0,15 M NaCl gelöst, pH = 7,2; keine Konservierungsstoffe, ohne Fibronectin
c = 1 mg/ ml (Gibco 23017)
oder: Laminin from basement membrane of Engelbreth -Holm-Swarm Mouse sarcoma
1 mg/ml in Tris buffered NaCl (Sigma L-2020)
- 1,0 mg/ml Poly-L-Ornithin-Lösung:
1,0 mg/ml Poly-L-Ornithin in 0,15 M Boratpuffer lösen und sterilfiltern

³¹ nach Dr. M. Denyer, Dr. M. Riehle.

- Poly-L-Ornithin: Poly-L-Ornithine Hydrobromide
($C_5H_{10}N_2O \cdot HBr$)_n; M = 15000 - 30000 g/mol (Sigma P-3530)
- 0,01 mg/ml Fibronektin-Lösung:
je 1 mg Fibronektin mit HBSS-Ca-Mg auf 100 ml auffüllen und sterilfiltern
- Fibronektin:
from Bovine plasma, lyophilized from 0,05 M Tris buffered saline, pH = 7,5 (Sigma F-4759)
- 0,3 mg/ml Collagen-S-Lösung:
je 0,3 ml Collagen-S mit 3 ml Zell-Medium gut mischen und sterilfiltern
- Collagen-S: Collagen-S (Type I) from calf skin, aqueous solution (pH 3); 3 mg/ml
(Boehringer Mannheim 1098292)
- 40 µg/ml Cell-Tak-Lösung:
je 0.1 mg Cell-Tak (entspricht 0.15 ml) mit 0,1 M Natriumbicarbonat-Lösung (NaHCO₃) auf 2.5 ml auffüllen und sterilfiltern
- Cell-Tak: Zelladhäsionsprotein
stock solution: 1,5 mg/ml in Essigsäure
(#40240 Collaborative Biomedical Products, über Labor Schubert)
- 0.1 mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung:
10 mg Poly-D-Lysin Hydrobromid mit HBSS-Ca-Mg auf 100 ml auffüllen und sterilfiltern
- Poly-D-Lysin Hydrobromid:
mit Molekulargewicht ≈ 70000 - 150000 g/mol!! (nur lange Poly-D-Lysin-Moleküle vermitteln Zelladhäsion) (Sigma P-0899)
- 2% Gelatine-Lösung: (Sigma G-1393)

(g) Farbindikatoren

- Phenolrot: C₁₉H₁₃O₅SNa Natrium Salz, kristallin (Sigma P-5530: 10g)
pH-Indikator (sauer ⇒ gelb, basisch ⇒ violett)
- Trypan-Blau 0,5% (w/v) trypan blue in physiological saline (Seromed L 6323: 100 ml)
Vitabilitätstest: färbt tote Zellen blau

(h) Nährsubstanzen, Zellstoffwechsel, Wachstumsfaktoren:

- 200 mM L-Glutamin: C₅H₁₀N₂O₃ L-2-Aminoglutaramic acid, M = 146,1 g/mol
(Sigma G-7513, Gibco 25030: 100x¹)
Aminosäure, nötig für Zellwachstum, sehr Temperatur-instabil!

- 40% Glucose-Lösung: 4 g D-Glucose pro 10 ml Millipore-Wasser lösen
- D-Glucose: D-(+)-Glucose, Dextrose C₆H₁₂O₆ (Sigma G-6152)
Zellnahrung
- Na-Pyruvat: Pyruvic Acid, Natrium Salz, C₃H₃O₃Na (Sigma P-8574)
- Na-ATP: Adenosine 5'-Triphosphate, Natrium Salz, C₁₀H₁₄N₅O₁₃P₃Na₂ (Sigma A-2383)
- 1,25% Insulin-Lösung : 125 mg Insulin in je 10 ml 0,01 M HCl lösen (⇔ 12,5 mg/ml)
- Insulin: From Bovine pancreas ≥ 27 USP units per mg, anhydrous, 5807,6 g/mol (Sigma I-5500); zur Glucose-Verdauung
- Wachstumsfaktor B27 : B 27 serumfreies Supplement (50x³²) (Gibco 17504)
für das Überleben und das Wachstum fötaler Neurone
- ITS: Insulin-Transferrin-Selenium Supplemente
100x¹ ITS liquid media supplement (Sigma I-3146)
oder: 100x GMS-G Supplement (ITS-G) (Gibco 41400)

Wirkstoff	100x Sigma	100x Gibco
Insulin	1000 mg/l	1000 mg/l
Transferrin	550 mg/l	550 mg/l
Selen bzw. Na-Selenit Na ₂ SeO ₃ (172,9 g/mol)	0,5 mg/l ≈ 3 μmol/l	0,67 mg/l ≈ 4 μmol/l

- MEM-Vitaminlösung: (Gibco 11120: 100x)
- BSA: Bovine Serum Albumin (#8076.2, Roth, Karlsruhe)

(i) Pharmaka

- 10 mg/ml Dantrolen Lösung:
Dantrolen ist bis zu 10 mg/ml in 1:1 Methanol-DMF-Gemisch löslich
- Dantrolen: (1-[(5-[p-Nitrophenyl] furfurylidene)-amino]hydantoin), Dantrolene,
1-[[[5-(4-Nitrophenyl)-2-furanyl]-methylene]imino]-2,4-imidazolidinedione sodium salt;
Natrium-Salz: C₁₄H₉N₄O₅Na; M = 336,2 g/mol (Sigma D-9175, RBI D-145)
Verhindert Freisetzung von intrazellulärem Calcium aus dem sarcoplasmatischen Reticulum
und „lähmt“ dadurch Zellen
- 1 mM Bradykinin-Lösung: je 1 mg Bradykinin in 0,943 ml Ethanol lösen

³² Achtung: 100x heißt, daß Substanz für durchschnittliche Anwendung um Faktor 100 verdünnt werden soll: 200 mM L-Glutamin (100x) bedeutet z.B., daß die Konzentration in der Flasche 200 mM ist, im fertigen Medium sollte die Konzentration 1/100 davon, d.h. 2 mM sein.

- Bradykinin: (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) Acetate Salt
M = 1060,2 g/mol (Sigma B-3259)

- 10 mM Charbachol-Lösung:

je 183 mg Charbachol (\Leftrightarrow 1mM) in 100 ml Medium (je nach verwendetem Zelltyp) lösen und sterilfiltern

- Charbachol: Charbamylcholine Chloride

$C_6H_{15}ClN_2O_2$; 182,6 g/mol (Sigma C-4382)

bindet an Acetylcholin-Rezeptoren, Wirkung ab ca. 1 μ M

- Halothan: 2-Bromo-2-Chloro-1,1,1-Trifluorethan

$C_2HBrClF_3$; M = 197,4 g/mol (Sigma B-4388); zerstört elektrische Kopplung zwischen Zellen

- TTX: Tetrodotoxin

$C_{11}H_{17}N_3O_8$; M=319,3 g/mol (Sigma T-5651); blockiert Natrium-Kanäle; höchst giftig!

(j) Lösungsmittel:

- Millipore-Wasser:

doppelt deionisiertes Wasser, Widerstand < 18 M Ω cm (Milli-Q plus 185, Millipore)

- DMSO: Dimethyl Sulfoxide, Methyl Sulfoxide; C_2H_6SO ; M = 78,12 g/mol; 1,10 g/ml (Sigma D-5879)

- Hellmanex II: Detergens; (#320.001, Hellma GmbH)

- Glycerin: Glycerol; $C_3H_8O_3$; M=92,09 g/mol; (Sigma G-2025)

- DMF: N,N-Dimethylformamide

C_3H_7NO ; M=73,09 g/mol; (Sigma D-4551, Fluka 40248, Lancaster 3000)

(k) Sonstiges

- Fixativ: 4% Paraformaldehyd in 0,12 molarer Sucrose-Lösung³³

für 100 ml:

4 g Paraformaldehyd (PFA, giftig!) in 50 ml Millipore-Wasser lösen, in Abzug auf 60°C erhitzen. 1 NaOH-pellet (ca. 100 mg) zugeben, Lösung wird daraufhin klar. 50 ml 0.2 M PB zugeben, nach Abkühlen 4.11 g Sucrose (\Leftrightarrow 0.12 M) zufügen.

- Gefriermischung:

10 % DMSO + 90 % FCS³⁴ oder 95% Medium + 5% Glycerin³⁵

³³ nach Dr. J. Behrends.

³⁴ nach A. Kardinal.

³⁵ nach N. Fuchs.

11.5 Das Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskop (RICM)³⁶

Mit Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) kann die Kontaktzone zwischen einer einzelnen Zelle und dem unterliegenden Glassubstrat untersucht werden. Das Prinzip des Aufbaus ist in Abb. 11.5.1 dargestellt: Wird die Zelle durch das Glassubstrat beleuchtet, so werden die Lichtstrahlen an den Grenzflächen aller Licht-brechenden Schichten reflektiert. Durch Überlagerung aller Reflexe entsteht ein Interferenzbild, aus welchem prinzipiell die Dicke des Mediumfilms zwischen Zelle und Substrat bestimmt werden kann.

Alle Versuche wurden mit einem umgebauten Zeiss Axiomat durchgeführt [62]. Als Lichtquelle wurde eine unpolarisierte 100 W Lampe mit einem vorgeschalteten $\lambda=546.1$ -Monochromator (nicht eingezeichnet) verwendet. Die Feld- und Apperturblenden (nicht eingezeichnet) wurden auf eine Beleuchtungsappertur (INA, „illuminating numerical aperture“) von 0,75 eingestellt. Mit Hilfe eines 63-fach Ölimmersions-Antiflex-Objektivs wurde die Zelle durch das Glassubstrat hindurch beleuchtet. Damit nur Reflexe die von oberhalb des Mikroskopobjektivs stammen von der zur Beobachtung eingesetzten CCD-Kamera aufgenommen werden, wurde die Beleuchtung mit einem Polarisator polarisiert³⁷, und unter Verwendung eines Antiflex-Objektivs mit aufgebracht $\lambda/4$ Schicht die reflektierte Strahlung nach einem Analysator aufgenommen. Durch diese Antiflex-Technik werden Störeffekte durch Streulicht im Mikroskop stark verringert [103]. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurde dann das totale, aus der Reflexion resultierende Intensitätsbild $I(x,y)$ aufgenommen und von einer nachfolgenden Computer-gesteuerten Videokarte in ein Graustufenmuster $I(x,y)$ [Graustufen] umgesetzt.

Wie in Abb. 11.5.1 dargestellt ist, wird ein Teil eines unter dem Winkel ϑ_0 mit der Intensität I_0 durch das Objektiv tretenden Lichtstrahls³⁸ an den Grenzflächen aller brechenden Schichten reflektiert. Das unter den Winkeln ϑ_i reflektierte Licht mit den Intensitäten I_1, I_2, \dots entstehende Interferenzbild wird vom Objektiv als Gesamtintensität $I(x,y)$ aufgenommen. In Abb. 11.5.1 sind z.B. die Grenzflächen zwischen Glas und Medium, Medium und Zellmembran und zwischen Zellmembran und Cytoplasma als Licht-brechende Schichten eingezeichnet. Multireflexionen zwischen den einzelnen Schichten wurden in dieser Arbeit vernachlässigt. Die Intensitäten der Reflexe von den verschiedenen Grenzflächen hängen dabei von der Reflektivität der jeweiligen Schicht ab und die Brechungswinkel folgen nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz: $n_i \cdot \sin(\vartheta_i) = n_{i+1} \cdot \sin(\vartheta_{i+1})$. Dabei bezeichnet n_i den Brechungsindex der i-ten Schicht. Wegen der endlichen numerischen Beleuchtungs-Appertur (INA), setzt sich jeder Reflex aus einem Lichtkegel mit maximalem Winkel $\Theta_i = \max(\vartheta_i)$

³⁶ Die in diesem Kapitel beschriebene Apparatur wurde von G. Wiegand am Institut von Prof. Dr. E. Sackmann aufgebaut. Alle Auswertungen wurden gemeinsam mit G. Wiegand durchgeführt.

³⁷ In der Abbildung entsprechen "s" und "p" den beiden Polarisationsrichtungen.

³⁸ Dieser exemplarisch eingezeichnete, unter dem Winkel ϑ_0 einfallende Lichtstrahl ist ein Teil des mit dem Winkel $\Theta_0 = \max(\vartheta_0)$ aus dem Objektiv kommenden Beleuchtungskegels. Es gilt $INA = n_0 \sin(\Theta_0) = 0.75$.

zusammen, wobei für alle Schichten $n_i \sin(\Theta_i)$ gilt. In Abb. 11.5.1 sind exemplarisch die unter den Winkeln Θ_i reflektierten Strahlen eingezeichnet. Das resultierende Interferenzbild $I(x,y)$ ist damit durch die Dicken $d_i(x',y')$ und Brechungsindizes $n_i(x',y')$ der optischen Schichten eindeutig bestimmt³⁹.

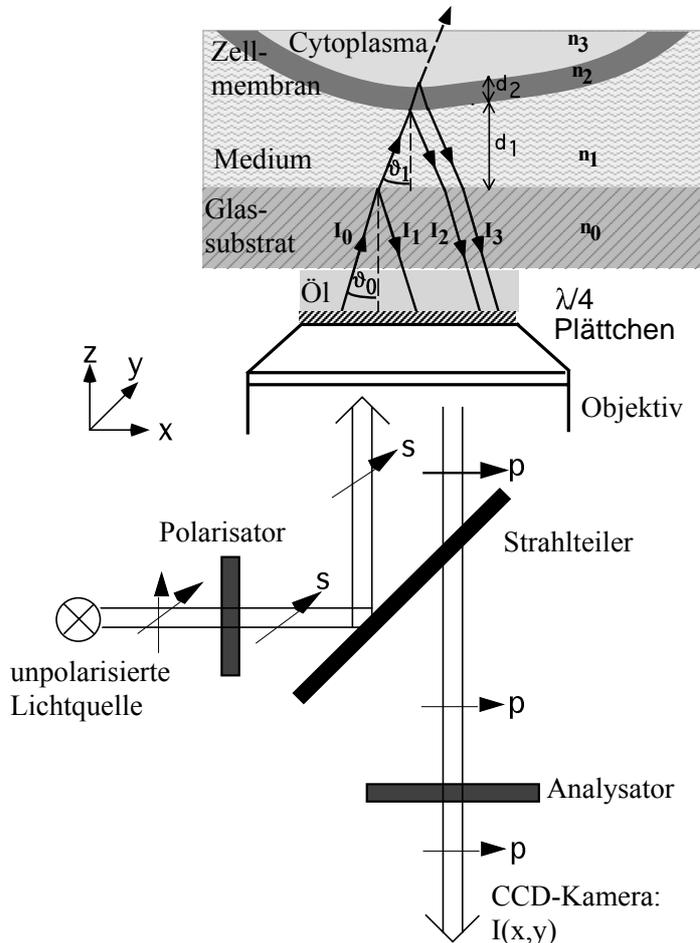


Abbildung 11.5.1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der Funktionsweise.

Bei einer, wie in dieser Arbeit gewählten, hohen numerischen Beleuchtungs-Appertur, wird das aufgezeichnete Interferenzbild $I(x,y)$ maßgeblich von den Reflexen I_i der Schichten i bestimmt, welche sich möglichst nah am Objektiv befinden [99, 104, 252]. D.h. Reflexe an der Oberseite der Zelle sind in erster Näherung zu vernachlässigen, das Interferenzbild wird vorwiegend durch Reflexe an der Zellunterseite bestimmt. Falls in erster Näherung angenommen wird, daß nur von der Medium / Zellmembran-Grenzfläche mit Intensität I_2 reflektiertes Licht mit dem an der Glas / Medium - Grenzfläche mit Intensität I_1 reflektierten Licht interferiert, d.h. unter Vernachlässigung von I_3, I_4, \dots , und unter der Voraussetzung paralleler optischer Schichten, ist die aufgenommene Intensität $I(x,y)$ eine Cosinus-Funktion des lokalen Abstandes $d_z(a,y) = d_1(x,y)$ zwischen Zellunterseite und Glassubstrat [252]. Da der Brechungsindex der Zellmembran n_2 größer als der des Mediums n_1 ist, ist die Phase des an der Medium / Zellmembran - Grenzfläche reflektierten Lichts um 180° zu der des einfallenden Lichts verschoben. Deshalb erscheint das Interferenzbild $I(x,y)$ der Zelle an den Stellen (x,y)

³⁹ Die detaillierten Gleichungen dazu sind in [252] veröffentlicht.

dunkel (destruktive Interferenz), an welchen die Zelle sehr dicht auf dem Substrat haftet, d.h. d_1 klein gegen die Wellenlänge der Beleuchtung ist.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden an Zellen durchgeführt, die auf Deckgläschen adhärirt waren. Zur Messung wurde jeweils ein Deckgläschen auf eine Halterung in einem x-y-Tisch über dem Objektiv eingesetzt.

Zu Beginn eines Experimentes ist es nötig, die Graustufen der zur Beobachtung eingesetzten Videokarte zu kalibrieren. Dazu wird das Interferenzbild $I(x,y)$ [Graustufen] an einer Stelle (x,y) aufgenommen, an welcher keine Zellen auf dem Deckglas adhärirt sind. Zur Kalibrierung werden verschiedene Filter mit bekannter Transmission $I_{rel}[\%]$ vor die CCD-Kamera gehalten. Nacktes Glas entspricht dabei 100% relative Intensität. In Abb. 11.5.2 ist die in dieser Arbeit gefundene Kalibrierkurve $I_{rel}[\%] \leftrightarrow I[\text{Graustufen}]$ dargestellt⁴⁰. Mit Hilfe des x-y-Tisches können nun verschiedene Zellen mit dem Mikroskopobjektiv beobachtet und die dazugehörigen Interferenzbilder aufgenommen werden.

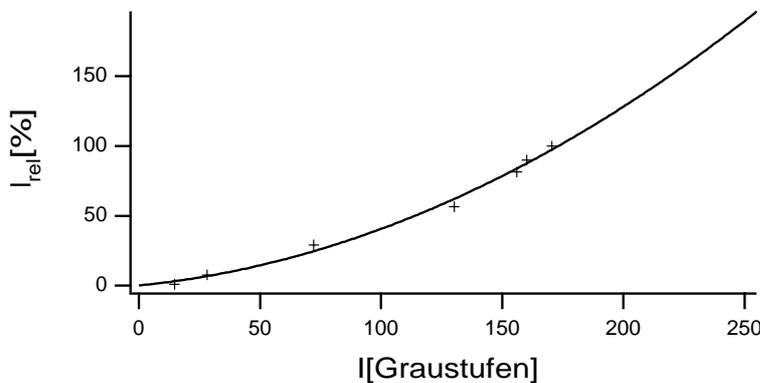


Abbildung 11.5.2: Kalibrierung des aufgenommenen Graustufenmusters $I[\text{Graustufen}]$.

Die lokale Intensität $I(x,y)$ in den Interferenzbildern ist eindeutig durch die Dicken d_i und Brechungsindizes n_i der Licht-brechenden Schichten bestimmt. Zur Auswertung der Daten muß daher ein optisches Modell aus brechenden Schichten mit den Parametern n_i und d_i aufgestellt werden. In dieser Arbeit wurde die Adhäsionszone durch die 4 in Tab. 11.5.1 aufgelisteten optischen Schichten⁴¹ charakterisiert, siehe dazu auch Abb. 11.5.1.

Schicht-Nummer i	Schicht	Brechungs-Index n_i	Dicke $d_i[\text{nm}]$
0	Glas	1,532	-
1	Medium	1,33	d_1
2	Membran	1,45	10
3	Cytosol	1,35	-

Tabelle 11.5.1: Optisches Modell für die Zell-Glas-Kontaktzone

⁴⁰ Aus der Abbildung folgt, daß eine Verringerung der aufgenommenen Intensität ΔI von 170,5 auf 160,1 eine relative Intensitätsschwächung ΔI_{rel} von 10% (100%-90%) bedeutet.

⁴¹ Die Dicken der ersten und der letzten Schicht gehen nicht in die Rechnung ein.

Mit dem beschriebenen Modell kann nun durch Festhalten der Parameter n_0 , n_1 , n_2 , d_2 und n_3 die Intensität I_{rel} in Abhängigkeit von d_1 berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abb. 11.5.3 aufgezeichnet.

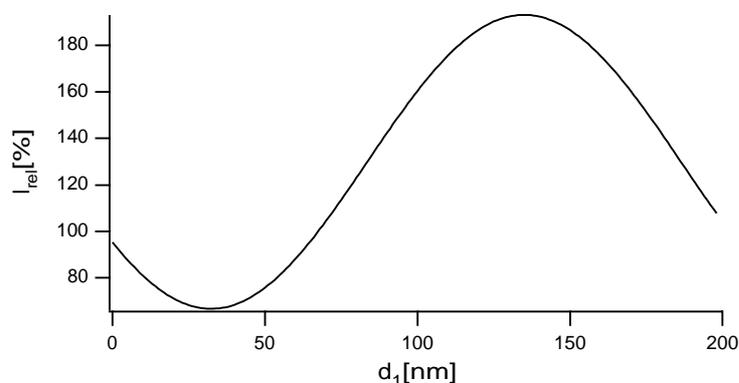


Abbildung 11.5.3:
Modellberechnung der Intensität I_{rel} in Abhängigkeit der Dicke d_1 des Elektrolytfilms.

Nun könnte prinzipiell aus der aufgenommenem Intensitätsverteilung $I(x,y)$ [Graustufen] nach Umrechnung in relative Intensitäten $I_{\text{rel}}[\%]$ (x,y) mit Hilfe des optischen Modell aus Abb. 11.5.3 das Höhenprofil des Wasserfilms d_1 [nm] angegeben werden. Wie aber aus der Abbildung erkennbar ist, ist $I_{\text{rel}}(d_1)$ eine periodische Funktion, d.h. es gibt keine eindeutige Zuordnung $I_{\text{rel}} \Rightarrow d_1$. Deshalb können weitere Auswertungen nur unter gewissen Annahmen und Einschränkungen getroffen werden. So wurde in dieser Arbeit angenommen, daß Punkte der Zelle mit guter Adhäsion, wie die sogenannten „focal adhesions“, vor dem ersten Maximum in der $I_{\text{rel}}(d_1)$ -Kurve liegen, d.h. näher als ca. 150 nm an der Substratoberfläche sind. Allerdings kann z.B. aus einem Kontakt der Zelle an „focal adhesions“ mit gemessener Intensität von I_{rel} ca. 90% aus der Theorie-Funktion aus Abb. 11.5.3 nicht herausgelesen werden, ob er links oder rechts vom ersten Minimum, d.h. bei $d_1 = 20$ oder 40 nm liegt. Aufgenommene Daten sind also mit Vorsicht zu interpretieren und die Auswertung muß an die genauen experimentellen Bedingungen angepaßt werden.

11.6 Das Cytosensor-Mikrophysiometer

Das Cytosensor-Mikrophysiometer besteht aus einem hochempfindlichen pH-Sensor⁴², welcher nach dem Prinzip des Licht-adressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS) arbeitet⁴³ und ein computergesteuertes Perfusionssystem enthält (Abb. 11.6.1) [2, 3, 190]: Unter modulierter Beleuchtung des in eine Meßkammer eingebauten LAPS-Wafers werden Photostrom-Spannungs-Kurven $I_p(U_{\text{bias}})$ aufgenommen (Abb. 11.6.2.a). Der Wendepunkt $U_{\text{bias,WP}}$ dieser sigmoidalen Kurven ist proportional zum pH-Wert des den Chip umgebenden Mediums: $\text{pH} \propto U_{\text{bias,WP}}$, wobei nach dem site-binding-Modell einer Änderung des pH-Wertes um eine Einheit eine Änderung in $U_{\text{bias,WP}}$ von ≈ 60 mV entspricht [190]. Durch Aufnahme einer Photostrom-Spannungs-Kurve $I_p(U_{\text{bias}})$ alle $\Delta t = 1$ s und Bestimmung des jeweiligen Wendepunktes $U_{\text{bias,WP}}(t)$, sind zeitaufgelöste pH-Messungen $\text{pH}(t)$ möglich.

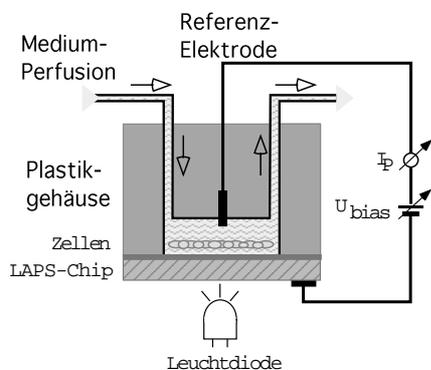


Abbildung 11.6.1: Schematischer Aufbau einer Meßkammer mit eingesetzten Zellen. Die Zellen sind an einer Polycarbonat-Membran adhärirt, welche nicht mit eingezeichnet ist. Unter den Zellen befindet sich ein LAPS-Chip. Über den ohmschen Kontakt an der Chip-Rückseite und eine Referenzelektrode im Medium ist ein geschlossener Stromkreis gegeben. Während einer Messung werden unter modulierter Beleuchtung laufend Photostrom-Spannungs-Kurven $I_p(U_{\text{bias}})$ aufgezeichnet.

Während eines Experiments werden permanent ($\Delta t = 1$ s) Strom-Spannungs-Kurven aufgenommen und dabei laufend der folgende, $\Delta t' = 2$ Minuten dauernde Meßzyklus wiederholt (Abb. 11.6.2.b): Zu Anfang des Meßzyklus werden die Zellen über das Perfusionssystem mit frischem Medium umspült („Perfusion an“; 1,5 min), während am Ende die Mediumzufuhr gestoppt ist („Perfusion aus“; 0,5 min). Durch Bestimmung der mittleren Steigung $r_{\text{AZ}} = -\langle \partial U_{\text{bias,WP}} / \partial t \rangle$ der $U_{\text{bias,WP}}(t)$ -Kurve während gestoppter Mediumzufuhr, kann die Rate der Ansäuerung des Mediums $r_{\text{AZ}}(t)$ durch die Zellen bestimmt werden. D.h. pro Meßzyklus $\Delta t' = 2$ wird ein Wert r_{AZ} berechnet und wiederholte Durchführung des Meßzyklus ergibt den Zeitverlauf der Ansäuerungsrate $r_{\text{AZ}}(t')$, vgl. Abb. 11.6.2.c.

Auf diese Weise ist es möglich, metabolische Antworten der Zelle auf dem Medium zugesetzte Wirkstoffe zu beobachten. So steigt z.B. die in Abb. 11.6.2.c aufgezeichnete Ansäuerungsrate aufgrund einer 30 Minuten dauernden Wirkstoff-Zugabe zu dem Medium an. Zur Auswertung solcher zeitabhängigen Ansäuerungsraten wird jeweils das Maximum $r_{\text{AZ,max}}$ und der Gleichgewichtswert $r_{\text{AZ,eq}}$ der Ansäuerungsrate nach Zugabe eines Wirkstoffes ermittelt und das Verhältnis $r_{\text{AZ,max}}/r_{\text{AZ,eq}}$ daraus berechnet⁴⁴.

⁴² pH-Sensitivität ca. 0,5 - 1 mV [2].

⁴³ Im Cytosensor-Mikrophysiometer wird die Fähigkeit zur Ortsauflösung nicht benutzt. Mit einer Leuchtdiode als großflächige Lichtquelle wird der LAPS-Chip von seiner Rückseite her beleuchtet. Als LAPS-Chips werden die in Kap. 13.2 als „Typ 1A“ bezeichneten Silizium-Substrate verwendet.

⁴⁴ Ein Wert von 100% bedeutet also, daß sich die Azidifizierungsrate nach Wirkstoff-Zugabe nicht verändert. Ist die Wirkung eines Wirkstoffes auf schneller Zeitskala reversibel, können mit den selben Zellen hintereinander

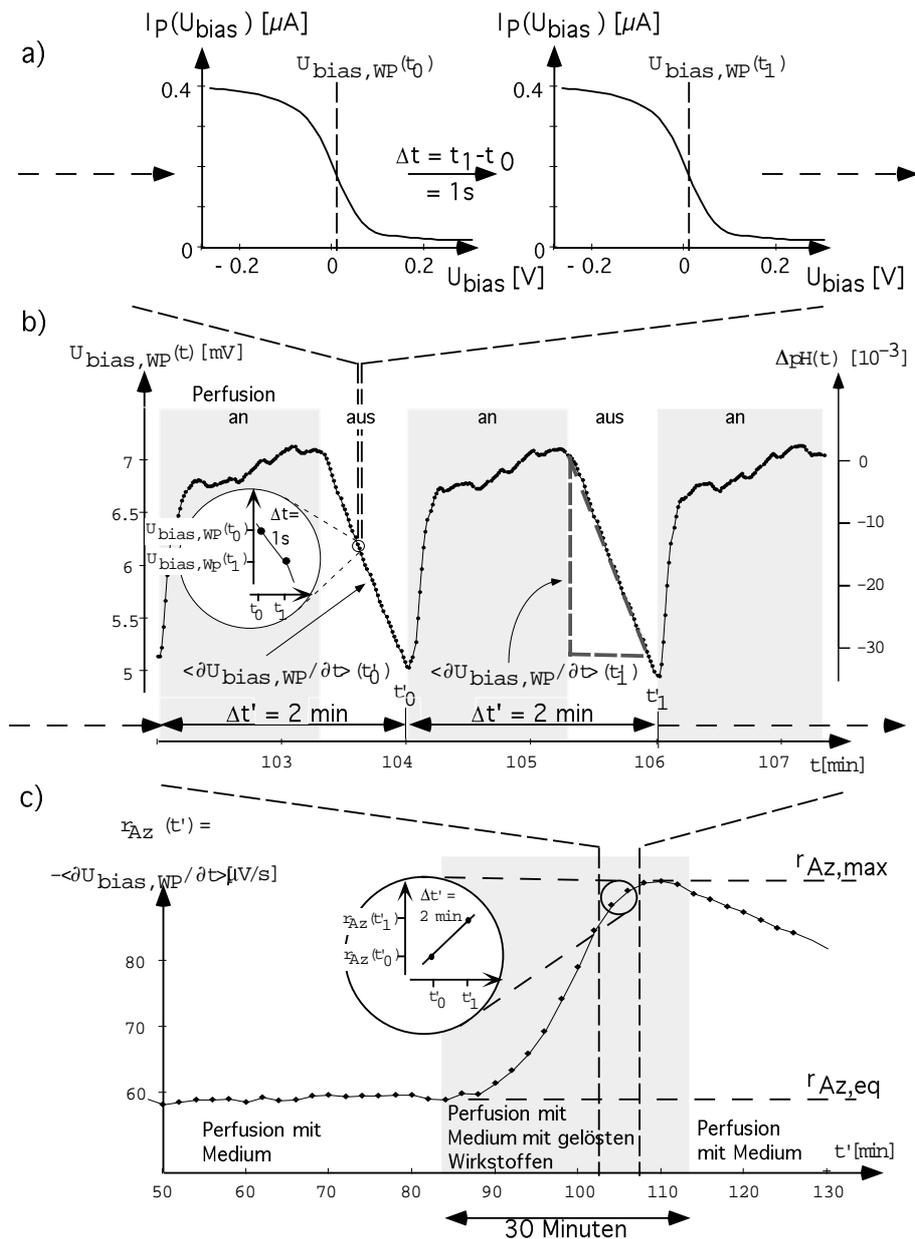


Abbildung 11.6.2: Arbeitsprinzip des Cytosensor-Mikrophysiometers. Dargestellt ist exemplarisch eine Messung mit synovialen Fibroblasten, denen nach 84 Minuten für 30 Minuten 10 ng/ml TNF- α als Wirkstoff zugegeben wurde.

Zwei Tage vor jeder Messung werden die Zellen in Medium gelöst (ca. 300000 Zellen/ml in Medium mit 10% FCS-Zusatz) und zu je 1 ml in Polycarbonat-Membran-Siebe (Transwell 3402, 3 μ m Porengröße, Corning Costar, Bodenheim) ausgesiedelt. Einen Tag vor der Messung wird das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht⁴⁵. Für das eigentliche Experiment werden die Membransiebe mit den daran adhärenierten Zellen in Meßkammern eingebaut, in welchen sich je ein LAPS-Chip befindet, vgl. Abb. 11.6.1. Das Cytosensor-Mikrophysiometer enthält insgesamt 8 solcher Meßkammern, d.h. 8 Experimente können

mehrere Experimente durchgeführt werden. Ansonsten müssen für jedes Experiment frische Zellen verwendet werden.

⁴⁵ So wird sichergestellt, daß nicht ein Teil der Zell-Rezeptoren mit Bestandteilen des Serums blockiert ist, da Serum unter anderem Wachstumsfaktoren enthält. Soll aber die Auswirkung von Wachstumsfaktoren auf Zellen mit dem Cytosensor-Mikrophysiometer bestimmt werden muß sichergestellt sein, daß vor Beginn der Messung die Rezeptoren der Zelle noch frei von Wachstumsfaktoren sind.

parallel durchgeführt werden. Das Volumen einer Meßkammer ist dabei ca. 1 ml und das Perfusionssystem führt auf 37° C vorgewärmtes Medium mit einer Rate von 50 µl/min zu. Als Meßmedium wird Serum- und Puffer-freies Medium⁴⁶ (DF-SUBS, vgl. Kap. 11.4) mit 1 mg/ml BSA-Zusatz verwendet.

Zur Illustration des Meßprinzips sind hier 4 parallel durchgeführte Messungen an CHO-Zellen beschrieben. Dabei wurden in drei Meßkammern genetisch transfizierte⁴⁷, in einer Meßkammer Wildtyp-Zellen untersucht. In Abb. 11.6.3.a ist die gemessene zeitabhängige Ansäuerungsrate der Zellen dargestellt. Den Zellen wurde dabei hintereinander jeweils für 2 Minuten Charbachol in verschiedenen Konzentrationen als Wirkstoff zugegeben. Wie aus Abb. 11.6.3.a ersichtlich ist, reagierten die Wildtypzellen nicht auf Charbachol, bei transfizierten Zellen stieg jedoch kurzzeitig die Ansäuerungsrate [228]. D.h. Charbachol kann spezifisch an den Acetylcholin-Rezeptor binden. Zur quantitativen Auswertung der Konzentrations-abhängigen Wirkung von Charbachol auf die transfizierten Zellen wurde der Mittelwert aus den drei Messungen der normierten maximalen Ansäuerung $r_{Az,max}/r_{Az,eq}$ berechnet, siehe Abb. 11.6.3.b. Darin ist zu erkennen, daß die Wirkung von Charbachol auf die Zellen mit dessen Konzentration zunimmt. Nach dieser hier beschriebenen Methode können also Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedenster Wirkstoff experimentell bestimmt werden.

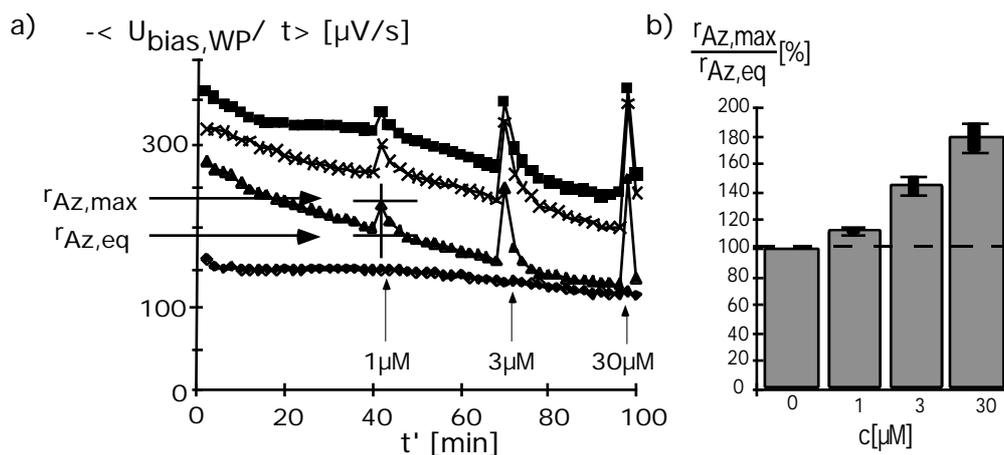


Abbildung 11.6.3: a) Dargestellt ist die zeitabhängige Ansäuerungsrate des Mediums durch CHO-Zellen während eines Cytosensor-Mikrophysiometer-Experiments. Die vier Kurven wurden parallel an vier Meßkammern aufgenommen. Die unterste Kurve zeigt eine Messung mit Wildtyp-Zellen, wogegen die oberen drei Kurven mit transfizierten Zellen aufgenommen wurden. Durch Pfeile sind die Zeitpunkte der jeweils 2 Minuten andauernden Zugaben von Charbachol gekennzeichnet. An der zweiten Kurve von unten ist die Bestimmung von $r_{Az,max}$ und $r_{Az,eq}$ dargestellt. An dem Bild fällt zum einen die starke Drift, als auch die unterschiedliche absolute Ansäuerungsrate in den vier Kammern auf. Die Drift wurde dadurch verursacht, daß nach dem Einbau der Zellen sofort mit dem Experiment begonnen worden ist und nicht ca. eine Stunde gewartet wurde, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte. Bei großen Änderungen der Ansäuerungsrate bei Zugabe von Wirkstoffen spielt Drift jedoch praktische keine Rolle, da die Maxima trotzdem noch klar ausgewertet werden können. Die unterschiedlichen absoluten Ansäuerungsraten in den verschiedenen Meßkammern wurden durch eine unterschiedliche Zahl von Zellen in den Kammern verursacht, denn trotz einheitlicher Zellsuspension beim Aussäen sind nie gleich viele Zellen in jeder Kammer enthalten. Durch Normierung der maximalen Ansäuerungsrate $r_{Az,max}$ auf den Gleichgewichtswert $r_{Az,eq}$ ist aber der absolute Wert nicht von Bedeutung. b) Aufgetragen ist hier der Mittelwert und die Standardabweichung der normierten maximalen Azidifizierungsrate aus den drei Messungen mit transfizierten Zellen. Je höher die zugegebene Konzentration an Charbachol, um so stärker säuerten die Zellen das Medium an.

⁴⁶ Das Medium muß Puffer-frei sein, da kleinste pH-Änderungen verfolgt werden sollen. Um eine Anlagerung von Wirkstoffen an die Schläuche des Perfusionssystems zu verhindern, wird dem Medium BSA zugesetzt, welches die Schlauchoberfläche überziehen soll.

⁴⁷ Diese Zellen waren mit einem Acetylcholin-Rezeptor transfiziert.

12 Anhang D: Theorie des Licht-adressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS)

12.1 Die Metall-Isolator-Halbleiter-Diode

(a) Zielsetzung

Ziel dieses Kapitels ist es, die Spannungs-abhängige Ladungsverteilung in einem Metall-Isolator-Halbleiter (MIS)-Kontakt und damit auch dessen Kapazität soweit wie möglich analytisch zu bestimmen. Dazu werden zuerst (b) die Auswirkungen auf die Ladungsträgerverteilung in einem Halbleiter untersucht, wenn dessen Volumeneigenschaften durch die Einführung einer Oberfläche erweitert werden. Danach (c) werden diese Erkenntnisse auf eine Schichtstruktur Metall-Isolator-Halbleiter übertragen und deren Spannungs-abhängige Kapazität bestimmt.

(b) Diskussion der Ladungsträger-Verteilung an ein Halbleiter-Oberfläche

Um die Potential-abhängige Anordnung freier Ladungsträger (Elektronen, Löcher) in einem Halbleiter zu beschreiben, muß die Ladungsträgerdichte anhand des Energieband-Schemas diskutiert werden. Im folgenden wird dazu ein n-dotierter Halbleiter angenommen, d.h. Elektronen sind Majoritäts- und Löcher Minoritäts-Ladungsträger. $n_{n0}[\text{m}^{-3}]$ und $p_{n0}[\text{m}^{-3}]$ sind dabei die Dichten der freien Elektronen und Löcher im Volumen des n-dotierten Halbleiters.

$$n_{n0} \gg p_{n0} \quad (0)$$

Im Volumen ($z \rightarrow \infty$) des Halbleiters ist dabei Zahl der freien Elektronen im wesentlichen durch Zahl der Donatoren gegeben, die als vollständig ionisiert angesehen werden [151, (K.1.4, S.27), 214, (S.104)]. Dabei ist $n_i[\text{m}^{-3}]$ die intrinsische Ladungsträgerdichte im Volumen des Halbleiters, d.h. die Dichte der „Eigen“-Ladungsträger ohne Dotierung, $n_A[\text{m}^{-3}]$ bzw. $n_D[\text{m}^{-3}]$ die Dichte der Akzeptoren bzw. Donatoren, wobei im n-dotierten Halbleiter $n_D \gg n_A$ gilt.

$$n_{n0} = n_n(z \rightarrow \infty) \approx n_D - n_A \approx n_D \quad (1)$$

$$p_{n0} = p_n(z \rightarrow \infty) \approx \frac{n_i^2}{n_D - n_A} \approx \frac{n_i^2}{n_D}$$

Es werde nun ein Halbleiter angenommen, der einen unendlich großen Halbraum füllt, wie der in Abb. 12.1.1 dargestellte. Dabei sei Vakuum für $z < 0$ und Halbleiter für $z \geq 0$.

Wird nun eine positive Testladung Q_T [C] an die Halbleiter-Oberfläche gebracht¹, werden die Energiebänder im Halbleiter verbogen: Die positive Testladung bewirkt eine Anreicherung von Elektronen an der Halbleiteroberfläche ($z=0$) („Akkumulation“), d.h. die potentielle Energie E_{pot} für Elektronen an der Grenzfläche ist abgesenkt und die Energiebänder sind nach unten gebogen, siehe Abb. 12.1.1. Durch Annäherung einer negative Testladung² verarmt dagegen die

¹ Dies ist gleichbedeutend mit einem positiven Oberflächenpotential an der Halbleiteroberfläche.

² D.h. das Oberflächenpotential an der Halbleiteroberfläche ist negativ.

Halbleiteroberfläche an freien Elektronen („Verarmung“) bzw. bewirkt im Extremfall eine Anreicherung freier Löcher („Inversion“). Die potentielle Energie für Elektronen ist an der Grenzfläche also erhöht, d.h. die Energiebänder nach oben gebogen.

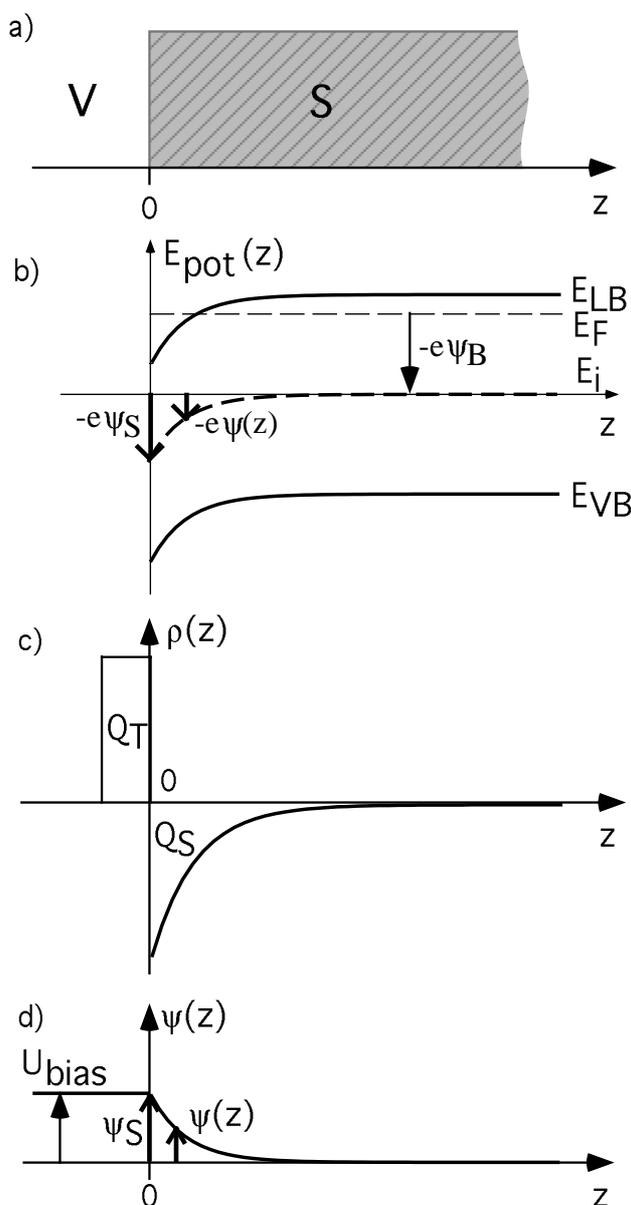


Abbildung 12.1.1: a) Grenzfläche eines Halbleiters (S, $z > 0$) zum Vakuum (V, $z < 0$) [151, (K.7.2.1, S.366)]. b) Verlauf der potentiellen Energie $E_{\text{pot}}[J]$ freier Elektronen an der Grenzfläche. Für Elektronen sind Orte mit möglichst niedriger potentieller Energie am energetisch günstigsten. Hier ist ein Fall eingezeichnet, an welchem sich an der Halbleitergrenzfläche eine positive Testladung Q_{T} befindet. D.h. Elektronen werden angezogen und die potentielle Energie an der Grenzfläche ist erniedrigt. In dem Diagramm sind das Leitungsband-Energieniveau $E_{\text{LB}}[J]$, das Valenzband-Energieniveau $E_{\text{VB}}[J]$ und das intrinsische Energieniveau $E_{\text{i}}[J]$ eingezeichnet [151]. Für einen n-dotierten Halbleiter liegt das Fermi-niveau $E_{\text{F}}[J]$ wie hier eingezeichnet energetisch dicht unter dem des Leitungsbandes. $E_{\text{g}}[J]$ ist die Bandlücke des Halbleiters [151] und $\psi_{\text{B}}[V]$ die Potentialdifferenz zwischen Fermi-niveau und intrinsischem Energieniveau³. c) Eine positive Testladung Q_{T} bewirkt eine Anreicherung von Elektronen mit Ladung Q_{S} an der Oberfläche, was in der Ladungsträgerverteilung $\rho[\text{Cm}^{-3}]$ sichtbar ist. d) Eine positive Testladung an der Vakuum-Halbleiter-Grenzfläche entspricht einem positiven Oberflächenpotential $\psi(z=0) = \psi_{\text{S}}$. Eingezeichnet ist hier der Verlauf des elektrischen Potentials $\psi[V]$ im Halbleiter. Dieses ist proportional zu der Bandverbiegung des intrinsischen Energieniveaus, wobei der Proportionalitätsfaktor die negative Elementarladung ist. Das Potential im Volumen des Halbleiters wird hier auf Null gesetzt, $\psi(z \rightarrow \infty) = 0$, das Potential im Vakuum ist konstant. Die Annäherung einer Testladung ist im wesentlichen äquivalent zum Anlegen einer Spannung U_{bias} .

Im thermischen Gleichgewicht sind die Ladungsträger Boltzmann-verteilt [151, (K.7.2.1, S.366)] und für die Dichte-Verteilung der Majoritätsladungsträger bzw. Minoritätsladungsträger folgt:

$$n_n(z) = n_{n0} \exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \quad (2a)$$

$$p_n(z) = p_{n0} \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \quad (2b)$$

³ ψ_{B} gibt damit die Stärke der Dotierung an, keine Dotierung bedeutet $\psi_{\text{B}} = 0$, da dann das Fermi-niveau in der Mitte der Bandlücke liegt.

Bei einem positiven Oberflächenpotential⁴ $\psi_S > 0$ ist also eine Anreicherung von Elektronen an der Halbleiteroberfläche energetisch günstig. Bei einem negativen Oberflächenpotential $\psi_S < 0$ findet eine Verarmung an Elektronen bzw. eine Anreicherung von Löchern an Halbleiteroberfläche statt.

Nun müssen äußere Einflüsse auf die Ladungsträger-Verteilung durch Störungen des thermischen Gleichgewichts einbezogen werden. In diesem Kapitel werden dazu 2 Störungen berücksichtigt:

(i) AC-Modulation der Testladung (d.h. eine Vorspannung mit Wechselspannungs-Anteil): Dem Gleichgewichts-Potential ψ_S sei ein hochfrequentes Signal $\delta\psi_S$ mit wechselnder Amplitude überlagert, wodurch die Ladungsträgerverteilung um δn^{AC} und δp^{AC} von der Gleichgewichts-Verteilung abweicht. Diese Störung des Gleichgewichtes wird hier unter den beiden folgenden Annahmen beschrieben: der hochfrequente Teil der Testladung zeigt keinen Effekt im Volumen des Halbleiters, da die Modulation direkt an Oberfläche angelegt wird und die Modulation der Vorspannung hat keinen Effekt auf die Majoritätsladungsträger-Verteilung, da $\delta n^{AC} \ll n_{n0}$:

$$\begin{aligned} \delta n^{AC}(z) &= 0 \\ \delta p^{AC}(z \rightarrow \infty) &= 0 \\ \delta p^{AC}(z=0) &= \delta p_S^{AC} \end{aligned} \quad (3)$$

(ii) Der Halbleiter wird beleuchtet, wodurch zusätzliche freie Ladungsträger δn^{ill} , δp^{ill} durch Generation von Elektron-Loch-Paaren entstehen. Dabei werden immer gleich viele Löcher wie Elektronen generiert. Es wird weiter die Annahme getroffen, daß der Halbleiter so beleuchtet wird, das bei $z \rightarrow \infty$ keine Effekte durch Beleuchtung zu spüren sind und daß die Beleuchtung statisch erfolgt.

$$\begin{aligned} \delta n^{ill}(z \rightarrow \infty) &= 0 \\ \delta p^{ill}(z \rightarrow \infty) &= 0 \\ \delta n^{ill}(z=0) &= \delta n_S^{ill} \\ \delta p^{ill}(z=0) &= \delta p_S^{ill} \\ \delta n^{ill}(z) &= \delta p^{ill}(z) \end{aligned} \quad (4)$$

Diese Abweichungen in der Ladungsträgerverteilung durch AC-Kleinsignale [253, 254, (K.4.4.1, S.157)] und durch Beleuchtung [255-258] müssen nun in die Boltzmann-Statistik (2) mit einbezogen werden⁵:

$$n_n(z) = n_{n0} \left(1 + \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \right) \exp\left(+ \frac{e\psi(z)}{k_B T} \right) \quad (5)$$

⁴ $\psi_S > 0$ bedeutet, daß das Potential an der Oberfläche positiver als das des Volumens im Halbleiter ist, was gleichbedeutend zu einer positiven Spannung zwischen Oberfläche und Volumen des Halbleiters ist.

⁵ In [257] werden die durch Dotierung und durch statische, räumlich konstante Beleuchtung verursachten Ladungsträgerkonzentrationen zu Gleichgewichtskonzentrationen $(n_{n0} + \delta n^{ill})$, $(p_{n0} + \delta p^{ill})$ zusammengefaßt. Dies hier nicht möglich, da eine ortsabhängige Beleuchtung und damit räumlich verteilte Ladungsträgeranordnung $\delta n^{ill}(z)$, $\delta p^{ill}(z)$ diskutiert wird.

$$p_n(z) = p_{n0} \left(1 + \frac{\delta p^{AC}(z)}{p_{n0}} + \frac{\delta p^{ill}(z)}{p_{n0}} \right) \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)$$

Ziel ist es nun, aus dieser Ladungsträgerverteilung die Kapazität des Halbleiters in Abhängigkeit der Testladung Q_T [C] bzw. der Vorspannung U_{bias} anzugeben. Dabei wird die Kapazität davon abhängen, wie groß die Dichte der freien Ladungsträger bei der jeweiligen Bandverbiegung an der Oberfläche des Halbleiters ist. Die Rechnung ist hier an die Ausführungen von [151, (K.7.2.1, S.366), 254, (K.3, S.71), 259] angelehnt und wird in vier Schritten durchgeführt.

1. Schritt: Ladungsdichteverteilung $\rho(z)$ aufschreiben. Ergebnis: $\rho(\psi(z), z)$.

Zu beachtende Ladungsträger sind freie Elektronen und Löcher und ionisierte Dotieratome. Dabei wird angenommen, daß alle Donatoren und Akzeptoren vollständig ionisiert und räumlich fixiert sind. ρ [Cm⁻³] ist dabei die Ladungsträgerdichte.

$$\rho(z) = e (n_D - n_A + p_n(z) - n_n(z)) \quad (6)$$

Im Volumen des Halbleiters herrscht Ladungsträger-Neutralität [214, (S.97)]:

$$\rho(z \rightarrow \infty) = e (n_D - n_A + p_{n0} - n_{n0}) = 0 \Rightarrow n_D - n_A = -p_{n0} + n_{n0} \quad (7)$$

und es folgt:

$$\rho(z)$$

$$=(6,7) = e (-p_{n0} + n_{n0} + p_n(z) - n_n(z))$$

$$=(5) = e \left[-p_{n0} + n_{n0} + p_{n0} \left(1 + \frac{\delta p^{AC}(z)}{p_{n0}} + \frac{\delta p^{ill}(z)}{p_{n0}} \right) \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - n_{n0} \left(1 + \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \right) \exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right]$$

$$=(4) =$$

$$en_{n0} \left[\left(1 - \exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) - \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) - \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) \right] \quad (8)$$

2. Schritt: Poisson-Gleichung (Zusammenhang Potential $\psi(z)$ /Ladungsverteilung $\rho(z)$) aufstellen und lösen⁶. Ergebnis: $d\psi(z)/dz$.

$$\text{Poisson-Gleichung: } \frac{\partial^2 \psi(z)}{\partial z^2} = -\frac{\rho(z)}{\epsilon_0 \epsilon_s} \quad (9)$$

Hier ist ϵ_0 [Fm⁻¹] die Dielektrizitätskonstante und ϵ_s [1] die Permittivität im Halbleiter. Es wird nun das elektrische Feld E [Vm⁻¹] im Halbleiter bestimmt, welches als negativer Potentialgradient definiert ist:

$$E(z) = -\frac{\partial \psi(z)}{\partial z} \quad (10)$$

Integration von (9) nach $d\psi$ unter Benutzung von (10) liefert dann [259]

⁶ Statt $\psi(z)$ wird hier nur die erste Ableitung $d\psi(z)/dz$ berechnet, dies spart einen Intergrationschritt.

$$\begin{aligned}
 E^2(z) &= (10) = \left(-\frac{\partial\psi(z)}{\partial z}\right)^2 \stackrel{7}{=} 2 \int_{\psi(z \rightarrow \infty)=0}^{\psi(z)} \frac{\partial^2\psi(z)}{\partial z^2} d\psi \stackrel{(9)}{=} -\frac{2}{\epsilon_0 \epsilon_s} \int_0^{\psi(z)} \rho(z) d\psi(z) \\
 &= (8) = \\
 &= -\frac{2en_{n0}}{\epsilon_0 \epsilon_s} \int_0^{\psi(z)} \left[\left(1 - \exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)\right) \cdot \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)\right) - \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)\right) + \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}} \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right] d\psi(z) \\
 &= -\frac{2en_{n0}}{\epsilon_0 \epsilon_s} \left[\left(\psi(z) \cdot \frac{k_B T}{e} \exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\psi(z) + \frac{k_B T}{e} \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)\right) - \frac{\delta n^{ill}(z) k_B T}{n_{n0} e} \left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right)\right) - \frac{\delta p^{AC}(z) k_B T}{n_{n0} e} \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right]_0^{\psi(z)} \\
 &= \frac{2k_B T n_{n0}}{\epsilon_0 \epsilon_s} \left(\left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \frac{e\psi(z)}{k_B T} - 1\right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) + \frac{e\psi(z)}{k_B T} - 1\right) + \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - 2\right) + \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - 1\right) \right) \\
 &= \frac{2k_B^2 T^2}{e^2 L_{Dn}^2} F^2 \left(\frac{e\psi(z)}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}}, \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}} \right) \tag{11}
 \end{aligned}$$

$$\text{mit der Debye-Länge für Elektronen}^8 \lambda_S [\text{m}] = L_{Dn} = \sqrt{\frac{k_B T \epsilon_0 \epsilon_s}{n_{n0} e^2}} \tag{12}$$

und dem dimensionslosen Raumladungsfaktor $F[1] \geq 0$

$$\begin{aligned}
 F\left(\frac{e\psi(z)}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}}, \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}}\right) &= \\
 \sqrt{\left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \frac{e\psi(z)}{k_B T} - 1\right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) + \frac{e\psi(z)}{k_B T} - 1\right) + \frac{\delta n^{ill}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(+\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - 2\right) + \frac{\delta p^{AC}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - 1\right)} & \tag{13}
 \end{aligned}$$

Einzelne Grenzfälle davon sind bereits in der Literatur angegeben, so z.B. der Gleichgewichtsfall [151, (S.368), 259], der Fall konstanter Beleuchtung [255, 257] und der Fall von AC-modulierter Vorspannung [253, 254]. Für den reinen Gleichgewichtsfall können die Grenzwerte für verschiedene Oberflächenpotentiale vereinfacht angegeben werden [151, (S.368), 254, (K.2.3.2, S.54-57)]:

Akkumulation: $\psi_S > 0$

$$\frac{e\psi_S}{k_B T} \gg 1 \stackrel{(13)}{\Rightarrow} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, 0, 0\right) \rightarrow + \sqrt{\exp\left(+\frac{e\psi_S}{k_B T}\right)} = \exp\left(\frac{e\psi_S}{2k_B T}\right)$$

Flachband-Bedingung: $\psi_S = 0$

$$\frac{e\psi_S}{k_B T} = 0 \stackrel{(13)}{\Rightarrow} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, 0, 0\right) = 0$$

Verarmung: $\psi_B < \psi_S < 0$

„midgap“: $\psi_B = \psi_S \Leftrightarrow n_n(z=0) = p_n(z=0) = n_i$

schwache Inversion: $2\psi_B < \psi_S < \psi_B < 0$

$$\frac{e\psi_B}{k_B T} < \frac{e\psi_S}{k_B T} < 0 \stackrel{(13)}{\Rightarrow} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, 0, 0\right) \rightarrow + \sqrt{-\frac{e\psi_S}{k_B T}}$$

⁷ Kettenregel für Differenziation $\Rightarrow \frac{\partial}{\partial\psi} \left(\frac{\partial\psi}{\partial z}\right)^2 = 2 \frac{\partial\psi}{\partial z} \frac{\partial}{\partial\psi} \frac{\partial\psi}{\partial z} = 2 \frac{\partial^2\psi}{\partial z^2}$.

⁸ Dies entspricht der Abschirmlänge im Halbleiter, nur daß im n-dotierten Halbleiter freie Elektronen die bewegliche Ladungsträger sind, anstelle der Ionen im Elektrolyt. (Vgl. λ_E aus dem Debye-Hückel bzw. Gouy-Chapman-Modell Kap. 12.2).

starke Inversion: $\psi_S < 2\psi_B \ll 0$

$$\frac{e\psi_S}{k_B T} \ll \frac{e\psi_B}{k_B T} \Rightarrow F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, 0, 0\right) \rightarrow +\sqrt{\frac{p_{n0}}{n_{n0}} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right)} = \sqrt{\frac{p_{n0}}{n_{n0}}} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{2k_B T}\right) \quad (14)$$

d.h Inversion ab: $\psi_S < 2\psi_B = \frac{2k_B T}{e} \ln\left(\frac{n_i}{n_D}\right)$, da nach Boltzmann-Verteilung

$$n_D = n_i \exp\left(-\frac{e\psi_B}{k_B T}\right) \quad (15)$$

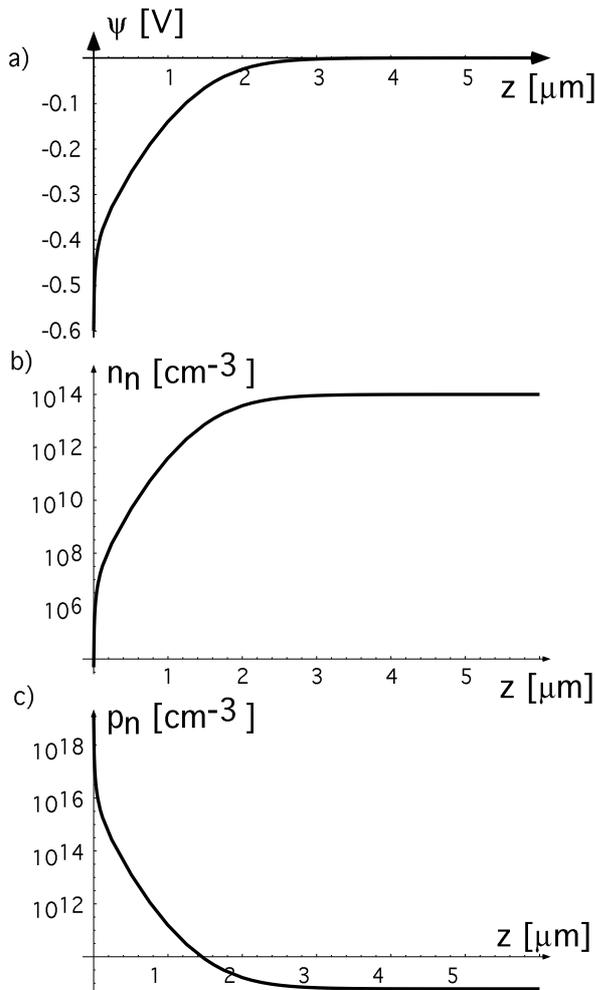


Abbildung 12.1.2: Aufgezeichnet⁹ ist der numerisch berechnete Verlauf a) des Potentials im Halbleiter bei einer Vorspannung $U_{bias} = -2,5 V$, womit das Oberflächenpotential $\psi_S = -0,6 V$ ist, b) der Elektronenverteilung und c) der Löcherverteilung bei der selben Vorspannung. Hier wird deutlich sichtbar, daß die negative Ladung der Oberfläche durch Anreicherung von Löchern an der Grenzfläche abgeschirmt wird, wogegen die Elektronenkonzentration an der Grenzfläche verarmt ist.

Durch (11) ist eine Differentialgleichung für $\psi(z)$ gegeben, d.h. durch numerische Lösung von (11) unter der Randbedingung $\psi(z=0) = \psi_S$ kann der Verlauf des elektrischen Potentials im Halbleiter dargestellt werden. Durch Einsetzen dieses Ergebnisses in (5) läßt sich damit auch der Verlauf der Ladungsträgerdichten numerisch darstellen, siehe Abb. 12.1.2. Zur Berechnung der Kapazität soll aber so weit wie möglich analytisch vorgegangen werden, wie im folgenden dargestellt wird.

⁹ Hier und bei allen weiteren in diesem Kapitel dargestellten Simulationen wurden folgende Parameter verwendet: $\epsilon_S = \epsilon(\text{Si}) = 11,9$, $\epsilon_i = \epsilon(\text{SiO}_2) = 3,9$ [214, (S.103)], $n_i(\text{Si}) = 1,45 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ [151, (S.850)], $n_D = 10^{14} \text{ cm}^{-3}$, $d_i = 20 \text{ nm SiO}_2$, $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$, $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$, $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$, $T = 293 \text{ K} (\Rightarrow n_{n0} = (0) = 10^{21} \text{ m}^{-3} = 10^{15} \text{ cm}^{-3})$, $p_{n0} = (0) = 2,1 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-3} = 2,1 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-3}$, $L_{Dn} = (7) = 0,13 \cdot 10^{-12} \text{ m} = 130 \text{ nm}$, keine Beleuchtung $\delta n^{ill} = 0$ und LF-Grenzfall $B=0$ (falls nicht anders gekennzeichnet).

3. Schritt: Nach Gauß'schem Satz aus E -Feld [V/m] ($\propto d\psi/dz$) an Oberfläche $z=0$ Oberflächenladung im Halbleiter Q_S bestimmen. Ergebnis: $Q_S(\psi_S)$.

An der Oberfläche gilt:

$$E_S^{10} = E(z=0) = (10) = -\frac{\partial\psi(z=0)}{\partial z} = (11,12,13) = \pm \frac{\sqrt{2}k_B T}{eL_{Dn}} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n_S^{ill}}{n_{n0}}, \frac{\delta p_S^{AC}}{n_{n0}}\right) \quad (16)$$

mit + für $\psi_S > 0$ und - für $\psi_S < 0$.

Mit Hilfe des Gauß'schen Satzes [260, (K.2.6, S.48)] kann dann die durch die Bandverbiegung an der Oberfläche des Halbleiters gesammelte Ladung $Q_S[C]$ bzw. $q_S [Cm^{-2}]$ angegeben werden, vgl. dazu Abb. 12.2.5 und Abb. 12.1.3.

$$\oint_A \vec{E} d\vec{A} = \frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_S} \int_V \rho dV \Rightarrow \frac{q_S}{\epsilon_0 \epsilon_S} = -E(z=0) + E(z \rightarrow \infty) = -E_S + 0 \quad (17)$$

$$\Rightarrow q_S = \mp \frac{\sqrt{2} \epsilon_0 \epsilon_S k_B T}{eL_{Dn}} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n_S^{ill}}{n_{n0}}, \frac{\delta p_S^{AC}}{n_{n0}}\right), \text{ -/+ für } \psi_S > / < 0 \quad (18)$$

Dies bestätigt die anfängliche getroffene qualitative Vorhersage: ein positives Oberflächenpotential ($\psi_S > 0$) bewirkt Akkumulation negativer Ladung an der Halbleiteroberfläche ($Q_S < 0$).

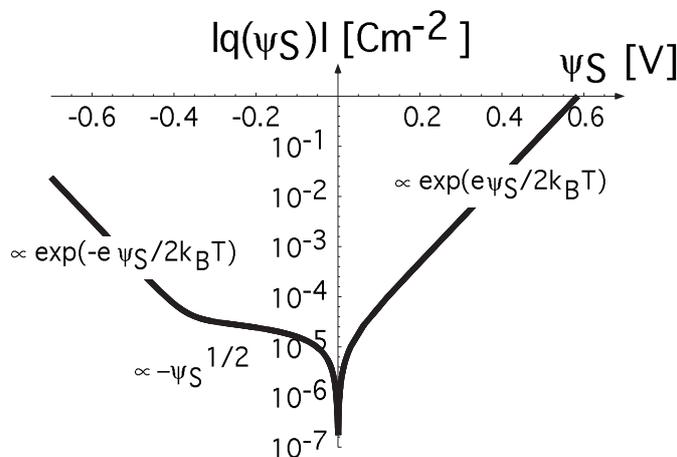


Abbildung 12.1.3: Oberflächenladungsdichte q_S in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential ψ_S nach Gl. 18. Die gewählten Parameter entsprechen denen von Abb. 12.1.2.

4. Schritt: Kapazität als Ableitung der Oberflächenladung nach dem Oberflächenpotential berechnen. Ergebnis: $c_S(\psi_S)$.

Um AC-Modulation der Vorspannung zu berücksichtigen wird eine Kleinsignal-Analyse durchgeführt [253]. Dabei wird das Oberflächenpotential in einen konstanten Gleichgewichtswert ψ_S^{DC} und einen schnell variierenden Wechselspannungs-Anteil $\delta\psi_S^{AC}$ zerlegt:

$$\psi_S = \psi_S^{DC} + \delta\psi_S^{AC} \quad (19)$$

$$|\psi_S^{DC}| \gg |\delta\psi_S^{AC}|$$

¹⁰ Die Richtung des elektrischen Feldes E_S zeigt von positivem zu negativem Potential, d.h. in die Richtung, in welcher die Kraft auf eine positive Testladung wirkt.

Damit kann die Kapazität der Oberflächen-Raumladungszone im Halbleiter C_S [F] bzw. c_s [Fm^{-2}] als Ladung Q_S bzw. q_S pro Oberflächenpotential ψ_S angegeben werden:

$$C_S^{\text{LF}}(\psi_S) = -\frac{\partial Q_S(\psi_S)}{\partial \psi_S^{\text{DC}}} \quad (\text{Gleichgewicht, niederfrequenter Grenzfall, } \delta p_S^{\text{AC}}=0)$$

$$C_S^{\text{HF}}(\psi_S) = -\frac{\partial Q_S(\psi_S)}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \quad (\text{hochfrequenter Grenzfall}) \quad (20)$$

Zuerst wird der Niederfrequenz („low frequency“, LF)- Grenzfall ausgerechnet [257]:

$$c_s^{\text{LF}}(\psi_S) = (13,20) =$$

$$-\frac{\partial}{\partial \psi_S^{\text{DC}}} \left(\mp \frac{\sqrt{2} \epsilon_0 \epsilon_S k_B T}{e L_{Dn}} \right) \times \left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 2 \right) \right]$$

$$= (19) =$$

$$\pm \frac{\sqrt{2} \epsilon_0 \epsilon_S k_B T}{e L_{Dn}} \times \frac{\left(\frac{e}{k_B T} \exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e}{k_B T} \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(-\frac{e}{k_B T} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \frac{e}{k_B T} \right) + \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\frac{e}{k_B T} \exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e}{k_B T} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right)}{2 \left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 2 \right) \right]}$$

$$= \pm \frac{\epsilon_0 \epsilon_S}{\sqrt{2} L_{Dn}} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}}, 0\right) \times \left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right) \right] \quad (21)$$

Die Rechnung für den Hochfrequenz („high frequency“, HF) -Grenzfall ist analog. Hier liegt aber noch ein durch die AC-Modulation verursachter zusätzlicher Term vor [253]:

$$\frac{\partial}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \left(\frac{\delta p_S^{\text{AC}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) \right) \stackrel{11}{=} \frac{\partial \delta p_S^{\text{AC}}}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \frac{1}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{\delta p_S^{\text{AC}}}{n_{n0}} \left(-\frac{e}{k_B T} \right) \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \quad (22)$$

$$\Rightarrow c_s^{\text{HF}}(\psi_S) = (13,19,20) = -\frac{\partial}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \left\{ (\dots) \times \sqrt{\dots + \frac{\delta p_S^{\text{AC}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right)} \right\}$$

$$= (21,22) = (\dots) \times \frac{\dots + \frac{e}{k_B T} \frac{1}{n_{n0}} \left(\frac{\partial \delta p_S^{\text{AC}}}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \frac{k_B T}{e} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) - \delta p_S^{\text{AC}} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right)}{2 \sqrt{\dots}}$$

$$= \pm \frac{\epsilon_0 \epsilon_S}{\sqrt{2} L_{Dn}} F\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}}, \frac{\delta p_S^{\text{AC}}}{n_{n0}}\right) \times$$

$$\left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta n_S^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right) + \frac{1}{n_{n0}} \left(\frac{\partial \delta p_S^{\text{AC}}}{\partial \delta \psi_S^{\text{AC}}} \frac{k_B T}{e} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 1 \right) - \delta p_S^{\text{AC}} \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) \right) \right] \quad (23)$$

¹¹ Produktregel.

Eine Zusammenfassung beider Grenzfälle in eine Formel ist möglich, wobei zu beachten ist, daß für den LF-Grenzfall $\partial\delta p_s^{AC}/\partial\delta\psi_s^{AC} = 0$ und $\delta p_s^{AC} = 0$ gilt:

$$\begin{aligned}
 c_s(\psi_s) &= (21,23) = \pm \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_s}{\sqrt{2} L_{Dn}} F\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}, \frac{p_{n0}}{n_{n0}}, \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}}, \frac{\delta p_s^{AC}}{n_{n0}}\right) \times \\
 &\left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) + \frac{1}{n_{n0}} \left(\frac{\partial\delta p_s^{AC}}{\partial\delta\psi_s^{AC}} \frac{k_B T}{e} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right) - \delta p_s^{AC} \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) \right] \\
 &= \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_s}{\sqrt{2} L_{Dn}} \frac{\left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) - \frac{1}{n_{n0}} \left(\frac{\partial\delta p_s^{AC}}{\partial\delta\psi_s^{AC}} \frac{k_B T}{e} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) + \delta p_s^{AC} \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right)}{\left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_s}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_s}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 2 \right) + \frac{\delta p_s^{AC}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right)}
 \end{aligned} \quad (24)$$

Für den HF-Fall müßte noch $\partial\delta p_s^{AC}/\partial\delta\psi_s^{AC}$ und δp_s^{AC} soweit wie analytisch angegeben [253] oder andere Näherungen [257, 261] verwendet werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich¹². Die Kapazität für den Niederfrequenz-Grenzfall ist in Abb. 12.1.4 dargestellt.

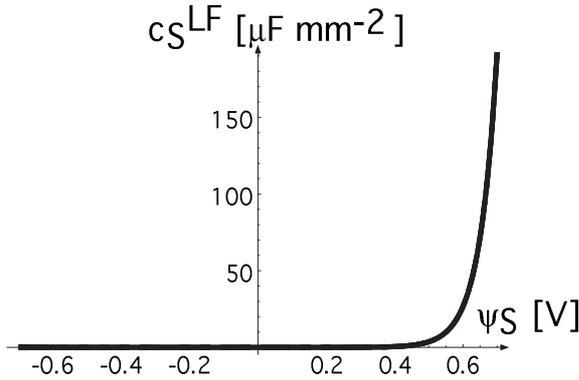


Abbildung 12.1.4: Potential-abhängige Kapazität der Halbleiterraumladungszone für den Gleichgewichtsfall.

Insgesamt wurde damit in den vier Schritten ein analytischer Ausdruck für die Potentialabhängigkeit der Ladung und der Kapazität der Raumladungszone erzielt:

$$\begin{aligned}
 q_s &= q_s(\psi_s) \\
 c_s &= c_s(\psi_s)
 \end{aligned} \quad (25)$$

¹² Um dennoch in grober Näherung den Potentialverlauf der Kapazität für den Hochfrequenzfall angeben zu können, wurde folgende grobe Näherung eingeführt: Im Hochfrequenzgrenzfall sind während Inversion die Ladungsträger an der Halbleiteroberfläche (Löcher) aufgrund der Raumladungszone von den Ladungsträgern im Volumen des Halbleiters (Elektronen) entkoppelt, d.h. können sich während Änderungen des Oberflächenpotentials nicht schnell genug zu einem neuen Gleichgewicht umlagern. Sie fallen daher für den kapazitiven Verschiebungsstrom aus. D.h. eine praktikable Näherung ist es, die Löcher-Terme im Falle hochfrequenter Modulation zu vernachlässigen. Dies ist im folgenden durch den Faktor B realisiert ($0 \leq B \leq 1$), wobei $B=0$ den Niederfrequenz-Grenzfall und $B=1$ den Hochfrequenzgrenzfall beschreibt. Diese Näherung ist nur für den Fall ohne Beleuchtung sinnvoll:

$$c_s(\psi_s) = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_s}{\sqrt{2} L_{Dn}} \frac{\left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) + \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right) - B \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) \right)}{\left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_s}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_s}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_s^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 2 \right) - B \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_s}{k_B T}\right) - 1 \right)}$$

(c) Metall Isolator Halbleiter (MIS) -Kontakt

Mit den in (b) gewonnenen Ergebnissen kann nun der Fall einer MIS-Struktur untersucht werden, wie sie in Abb. 12.1.5 aufgezeichnet ist. Durch Vorspannung erzeugte Ladungen im Metall werden dabei durch entgegengesetzte Ladungen im Halbleiter abgeschirmt.

Es gilt Ladungsneutralität $Q_M + Q_S = 0$, bzw. $q_M + q_S = 0$ (26)

und das Gesetz des Spannungsteilers $U_{bias} = U_I + \psi_S$ (27)

Die Raumladung im Halbleiter aufgrund einer Bandverbiegung durch eine Vorspannung wurde in (b) berechnet:

$q_s = q_s(\psi_s)$ (28)

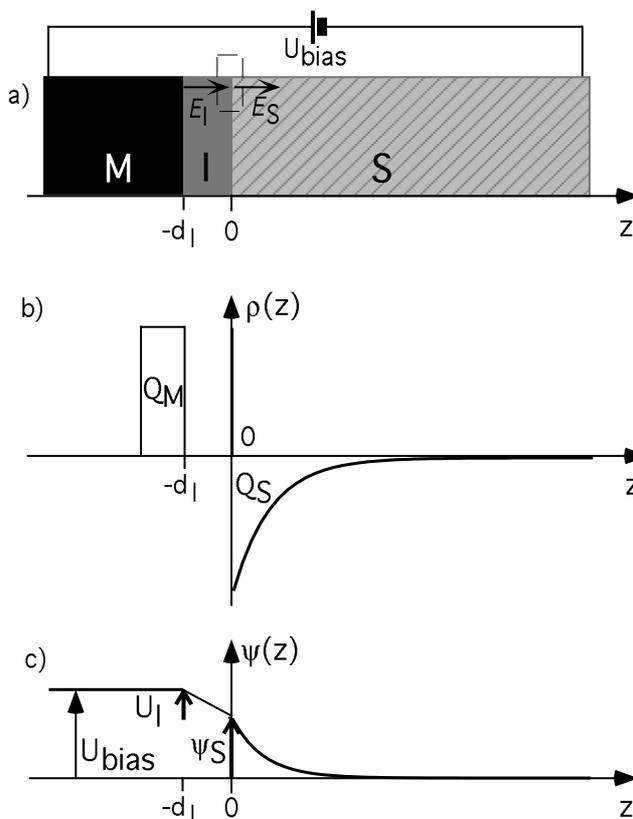


Abbildung 12.1.5: a) MIS-Struktur mit angelegter Vorspannung $U_{bias}[V]$. b) Durch die Vorspannung erzeugte Ladung Q_M im Metall wird durch Ladungsansammlung Q_S im Halbleiter abgeschirmt. c) Verlauf des elektrischen Potentials. Die angelegte Vorspannung U_{bias} teilt sich in einen Spannungsabfall am Isolator $U_I[V]$ und das Oberflächenpotential ψ_S im Halbleiter auf.

Es gibt keine feste Ladung an der Isolator-Halbleiter-Grenzfläche. Damit folgt nach dem Gauß'schem Satz für eine Hüllfläche um die Grenzfläche:

$$0 = \oint_V \rho dV = -\epsilon_0 \epsilon_I E_I + \epsilon_0 \epsilon_S E_S \Rightarrow E_I = \frac{\epsilon_S}{\epsilon_I} E_S$$

Weiter folgt nach dem Gauß'schem Satz für eine Hüllfläche um den Halbleiter, welche die Raumladung q_s einschließt (vgl. (b)):

$$\Rightarrow E_I = \frac{\epsilon_S}{\epsilon_I} E_S = \frac{\epsilon_S}{\epsilon_I} \left(-\frac{q_s}{\epsilon_0 \epsilon_S} \right) = \frac{q_s}{\epsilon_0 \epsilon_I} \quad (29)$$

Dabei ist $E_I[V/m]$ das konstante elektrische Feld im Isolator und E_S das statische elektrische Feld im Halbleiter an Grenzfläche $z = 0$.

Das statische elektrische Feld im Isolator ist analog dem eines Plattenkondensators:

$$E_I = U_I/d_I \quad (30)$$

$$(29,30) \Rightarrow U_I = - \frac{d_I q_S}{\epsilon_0 \epsilon_I} \quad (31)$$

$$(28,31) \Rightarrow U_I(\psi_S) = - \frac{d_I}{\epsilon_0 \epsilon_I} q_S(\psi_S) \quad (32)$$

$$(27,32) \Rightarrow U_{\text{bias}}(\psi_S) = - \frac{d_I}{\epsilon_0 \epsilon_I} q_S(\psi_S) + \psi_S \quad (\text{statisches Feld, d.h. } \partial \delta p_S^{\text{AC}} / \partial \delta \psi_S^{\text{AC}} = 0, \partial \delta p_S^{\text{AC}} = 0)$$

$$\Rightarrow \psi_S = \psi_S(U_{\text{bias}}) \quad (33)$$

(33) ist eine implizite Gleichung für das Oberflächenpotential des Halbleiters ψ_S in Abhängigkeit der extern angelegten Spannung U_{bias} .

Die Kapazität der gesamten MIS-Anordnung ist eine Reihenschaltung der Kapazitäten von Isolator und Halbleiter:

$$\frac{1}{c_{\text{MIS}}} = \frac{1}{c_I} + \frac{1}{c_S} \Rightarrow c_{\text{MIS}} = \frac{c_I c_S}{c_I + c_S} \quad (34)$$

Dabei ist die Kapazität des Isolators durch das Plattenkondensator-Modell gegeben:

$$c_I = \frac{\epsilon_0 \epsilon_I}{d_I} \quad (35)$$

Die Kapazität der Raumladung im Halbleiter wurde in (b) angegeben, siehe Gl. 24:

$$c_S = c_S(\psi_S(U_{\text{bias}})) \quad (36)$$

deshalb gilt (siehe Abb. 12.1.6):

$$c_{\text{MIS}}(U_{\text{bias}}) = \frac{c_I \cdot c_S(\psi_S(U_{\text{bias}}))}{c_I + c_S(\psi_S(U_{\text{bias}}))} \quad (37)$$

Dabei ist die kleinere Kapazität bestimmend ($c_I \gg c_S \Rightarrow c_{\text{MIS}} = c_S$, $c_I \ll c_S \Rightarrow c_{\text{MIS}} = c_I$). Achtung, die Gesamtkapazität c_{MIS} hängt von der gesamten angelegten Spannung U_{bias} ab, die darin enthaltene Kapazität der Raumladungszone des Halbleiters c_S aber vom Oberflächenpotential ψ_S . Deshalb muß in (37) ψ_S durch U_{bias} ausgedrückt werden (33).

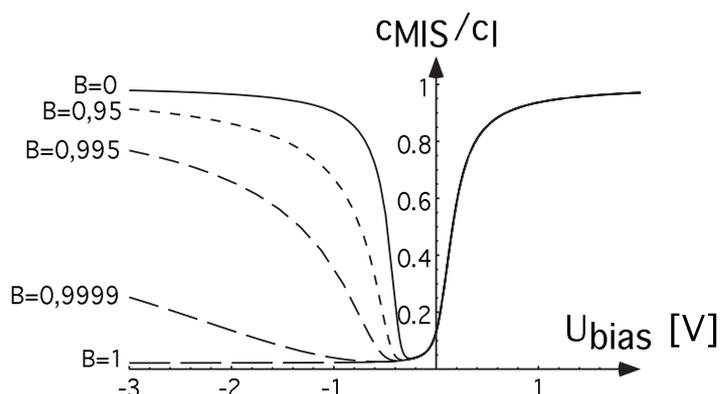


Abbildung 12.1.6: Aufgezeichnet ist die Potential-abhängige Kapazität einer MIS-Struktur, normiert auf die Isolator-Kapazität für verschiedene Frequenzen. Siehe dazu die Fußnote von Gl. 24.

12.2 Die Elektrolyt-Isolator-Metall-Diode

(a) Aufgabenstellung

Ziel dieses Abschnitts ist es, die Potential-abhängige Ladungsträgerverteilung der Ionen im Elektrolyt und damit die Kapazität eines EIM-Kontakts zu bestimmen.

(b) Elektrostatische Abschirmung im Elektrolyt

Im Elektrolyt liegen Ionen als frei bewegliche Ladungsträger vor. Anders als bei Metallen, wo nur Elektronen als negative Ladungen frei beweglich sind, tragen im Elektrolyt sowohl Anionen als auch Kationen zum Ladungstransport bei. Wird ein geladener Körper in eine Elektrolyt-Lösung getaucht oder mit anderen Worten ein Testpotential an einer Elektrolyt-Grenzfläche erzeugt, werden Ionen entgegengesetzter Ladung elektrostatisch angezogen und schirmen das Testpotential ab [260, (K.3.11, S.74)]. Zur quantitativen Beschreibung ist es nötig, ein Modell für den Elektrolyt aufzustellen. In einem einfachen, von Gouy und Chapman stammenden Ansatz werden die Ionen als Punktladungen angenommen, welche sich nach der Boltzmann-Statistik im Feld der Testladung verteilen [262-264, 265, (S.3), 266, (K.12.3, S.501), 267, (K.10.1, S.310)]. Wie in (d) gezeigt wird, fällt dann das Potential $\psi(z')$ der Testladung im Elektrolyten exponentiell ab (vgl. Abb. 12.2.1) [266, (K.12.3, S.505)]:

$$\psi(z') = \psi_E \exp(z'/\lambda_E), \quad \lambda_E = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_E RT}{2Z^2 F^2 c_E}} \quad (1)$$

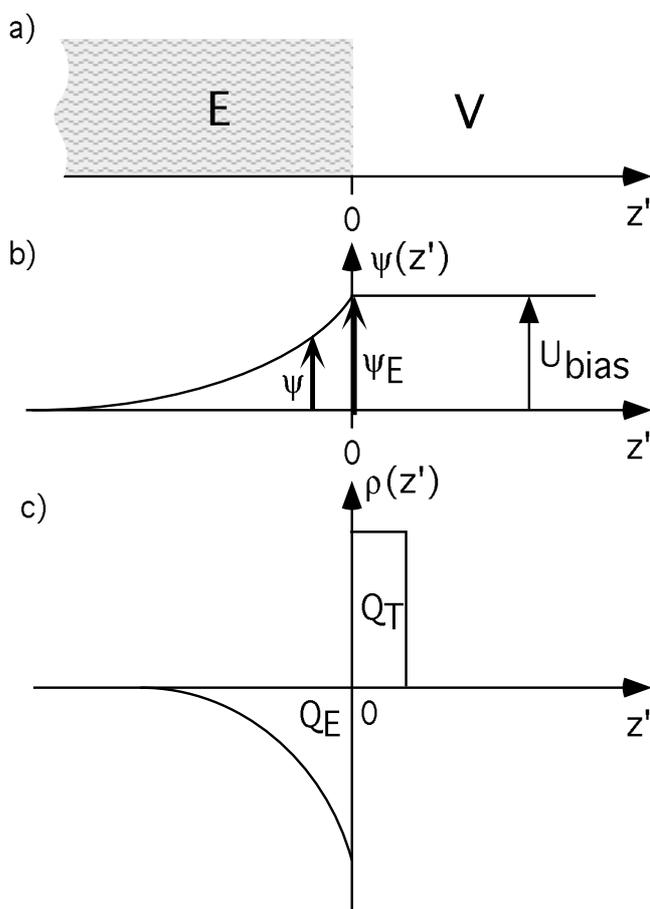


Abbildung 12.2.1: a) An einer fiktiven Elektrolyt (E)- Vakuum (V) - Grenzfläche befindet sich durch Anlegen eines Potentials U_{bias} eine Testladung Q_T . b) Dadurch werden im Elektrolyt Ionen der entgegengesetzten Ladung Q_E angezogen, bis sich ein elektrostatisches Gleichgewicht gebildet hat. Alle Betrachtungen sind rein statisch, d.h. es fließt kein Strom. Wegen der Ladungsneutralität gilt $Q_E = -Q_T$. c) Durch die angezogenen Ionen wird das Oberflächenpotential $\psi_E = U_{bias}$ der Testladung abgeschirmt. Das Volumen des Elektrolyts ist damit feldfrei.

Dabei ist ψ_E [V] das Testpotential an der Elektrolyt-Oberfläche und λ_E [m] die Abschirmlänge. Je höher die Konzentration des Elektrolyten c_E [mol/l] und die Wertigkeit Z [1] der Ionen, desto effektiver ist die Abschirmung und um so kleiner λ_E . F [Cmol⁻¹] ist die Faraday-Konstante, $\epsilon_0\epsilon_E$ [Fm⁻¹] die Dielektrizitätskonstante des Elektrolyts, R [Jmol⁻¹K⁻¹] die Gaskonstante und T [K] die Temperatur. Bei kleinen Oberflächenpotentialen $|\psi_E| \ll 2RT/ZF$ ist die Abschirmladung im Elektrolyt Q_E [C] bzw. q_E [Cm⁻²] $\propto \psi_E$ (vgl. (d)) [266, (K.12.3, S.507)]:

$$q_E(\psi_E) = -\sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \approx -\sqrt{\frac{2c_E Z^2 F^2 \epsilon_0 \epsilon_E}{RT}} \psi_E \quad (2)$$

Das positive Potential ($\psi_E > 0$) einer positiven Testladung ($Q_T > 0$) wird also durch negativ geladene Ionen ($Q_E < 0$) abgeschirmt.

Andere Modelle [146] berücksichtigen die reale Größe der Ionen (Helmholtz-Modell [265, (S.1), 266, (K.12.3, S.500), 267, (K.10.1, S.310), 268], Stern-Modell [265, (S.6), 266, (K.12.3, S.507), 269], die Solvation der Ionen durch Wassermoleküle und chemische Adsorption von Ionen an der Grenzfläche [265, (S.7), 266, (K.1.2, S.8, K.12.3, S.511), 267, (K.10.1, S.305), 270].

(c) Die Elektrolyt-Isolator (EI)-Grenzfläche

Im Gegensatz zum Elektrolyt (E) ist ein Isolator (I) dadurch gekennzeichnet, daß er keine frei beweglichen Ladungsträger enthält. Wird eine Spannung angelegt, so fällt das elektrische Potential über dem Isolator linear ab, in völliger Analogie zu einem Plattenkondensator. Der Isolator ist dabei im wesentlichen durch seine Dicke d_I und seine Dielektrizitätskonstante $\epsilon_0\epsilon_I$ charakterisiert. Steht der Isolator in Kontakt mit Elektrolyt-Lösung (EI-Grenzfläche), muß zwischen 2 Fällen unterschieden werden. Bei reaktiven Isolatoroberflächen sind chemische Reaktionen zwischen den Isolatormolekülen und den Ionen des Elektrolyts möglich, bei inerten Isolatoren nicht.

(i) Inerte Isolatoren: Wie in Abb. 12.2.2 dargestellt, wird das externe Potential U_{bias} [V] einer Testladung Q_T [C] auch im Falle einer EI-Schichtstruktur durch Ionen des Elektrolyts Q_E [C] bzw. q_E [Cm⁻²] abgeschirmt. Allerdings fällt nach dem Prinzip des Spannungsteilers nur ein Teil ψ_E [V] über dem Elektrolyt ab, der Rest U_I fällt linear über dem Isolator ab: $U_E = \psi_E + U_I$. Unter Berücksichtigung der Ladungsneutralität $Q_T + Q_E = 0$ kann dann, wie in (e) gezeigt wird, der genaue Potentialverlauf in Elektrolyt und Isolator angegeben werden.

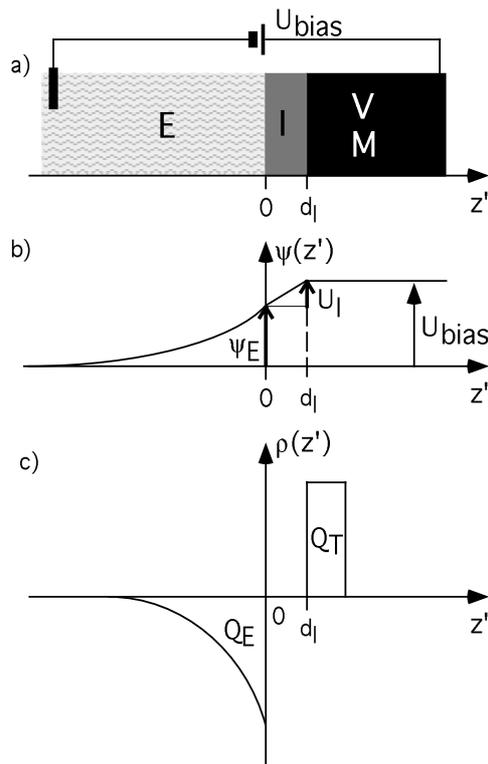


Abbildung 12.2.2: a) An einer fiktiven Elektrolyt (E) -Isolator (I) -Vakuum (V)- Schichtstruktur befindet sich an der IV-Grenzfläche eine Testladung Q_T . Dies ist praktisch z.B. durch ein Metall (M) anstelle des Vakuums realisiert, in welchem durch Anlegen eines externen Potentials U_{bias} eine Ladungsansammlung Q_T erzeugt wird. b) Über den Isolator kann kein Strom fließen, es stellt sich ein elektrostatisches Gleichgewicht ein, in welchem das Potential der Testladung Q_T durch Ionen des Elektrolyts Q_E abgeschirmt wird. c) Allerdings fällt nur ein Teil ψ_E des Potentials U_{bias} über dem Elektrolyt ab, der Rest U_I liegt am Isolator an.

(ii) Reaktive Isolatoren (Site-binding-Modell): Spezielle Isolatoren können mit Ionen des Elektrolyts reagieren. So kann z.B. das für Halbleitersensoren relevante Siliziumoxid SiO_2 , welches in Kontakt mit wässriger Lösung als Silanol SiOH vorliegt, Protonen binden und abgeben („Site-binding-Modell“) [271, 272]:



Siliziumnitrid Si_3N_4 liegt in Kontakt mit wässriger Lösung an der Kontaktfläche hauptsächlich als Silanol-Gruppen (SiOH) und nur zu einem kleinen Teil als Silamin (SiNH_2) vor, d.h. es bildet sich eine native Oxidschicht an der Oberfläche aus [86, 273, 274]. Auch die basischen Silamingruppen sind Bindungsstellen für Protonen [275]:



Da aber sowohl bei SiO_2 , als auch bei Si_3N_4 , Silanolgruppen den chemisch aktiven Teil der Oberfläche ausmachen, ist es in erster Näherung sinnvoll, alle weiteren Betrachtungen auf diesen wichtigen Spezialfall einzuschränken. Durch Bindung bzw. Abgabe von Protonen wird der Isolator an der EI-Schnittstelle aufgeladen. Dabei ist die Oberflächenladung $Q_I[\text{C}]$ bzw. $q_I[\text{Cm}^{-2}]$ abhängig vom pH-Wert des Elektrolyten, der Zahl der Silanol-Bindungsgruppen $n_0(\text{Si})[\text{mol m}^{-2}]$, den die Reaktion beschreibenden Konstanten $\text{pH}_{\text{pzc}}[1]$, $\delta[1]$, sowie vom Oberflächenpotential $\psi_E[\text{V}]$ (vgl. Gl. 33):

$$\ln(10) \cdot (\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH}) = \frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{q_I}{F\delta n_0(\text{Si})}\right) \quad (5)$$

Die Site-binding-Theorie liefert mit Gl. 5 also eine implizite Gleichung für $q_I = q_I(\psi_E, \text{pH})$. Allerdings ist das Modell nur für schwach geladene Oberflächen gültig, d.h. nicht im Sättigungsladungs-Bereich. Die Isolator-Oberfläche ist dann neutral geladen, falls genauso viele Silanol-Bindungsstellen ein Proton abgegeben wie aufgenommen haben, d.h. $n(\text{SiOH}_2^+) = n(\text{SiO}^-)$. Dann ist $Q_I = 0$ und für $\psi_E = 0$ gilt nach Gl. 5 $\text{pH} = \text{pH}_{\text{pzc}}$. pH_{pzc} ist deshalb der pH-

Wert am Ladungsneutral-Punkt („point of zero charge“). Für $\psi_E = 0$ ist die Oxidfläche bei einem $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$ also negativ, bei $\text{pH} < \text{pH}_{\text{pzc}}$ positiv aufgeladen. Die Konstante δ beschreibt die Tendenz der Silanolgruppen Protonen abzugeben oder aufzunehmen. Je größer δ , um so höher die Reaktivität. Sowohl pH_{pzc} als auch δ gehen direkt aus den Reaktionskonstanten des Massenwirkungsgesetzes hervor (vgl. Gl. 24 und Gl. 25). Wie in Abb. 12.2.3 dargestellt, schirmen die Ionen des Elektrolyts Q_E dann sowohl die Ladung der Oxidoberfläche Q_I , als auch das Potential einer angelegten Testladung Q_T ab. Wichtig dabei ist, daß Q_E und Q_I unterschiedliches Vorzeichen besitzen. Sind viele Protonen im Elektrolyt enthalten (pH niedrig bzw. $c_0(\text{H}^+)$ hoch), wird die Oberfläche positiv geladen. Dadurch werden negative Ionen (OH^- , Cl^- , ...) des Elektrolyts angezogen und schirmen das Potential auf dem Oxid ab. Während die Aufladung der Oberfläche spezifisch durch Reaktion von Protonen mit Silanolgruppen erfolgt, ist die Abschirmung durch negative Ionen völlig unspezifisch. Die Abschirmlänge λ_E der abschirmenden Ionenwolke im Elektrolyt hängt von der Gesamtkonzentration c_E des Elektrolyten und nicht von der Protonenkonzentration $c_0(\text{H}^+)$ ab¹³.

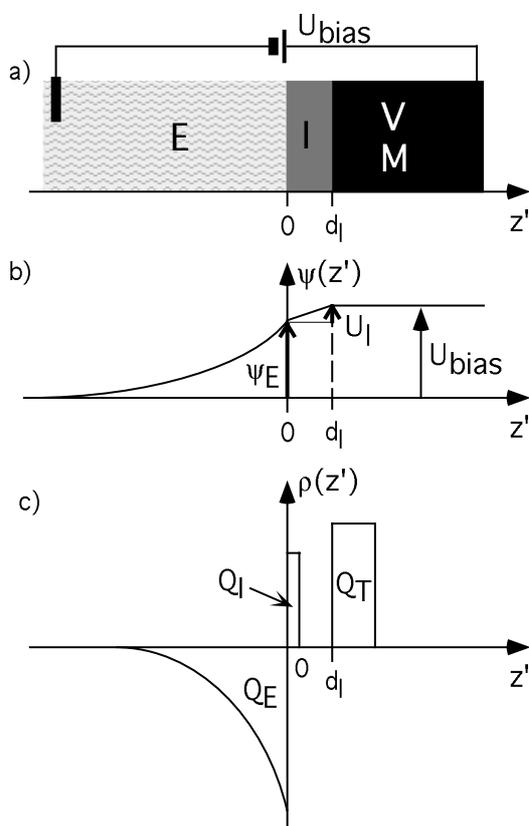


Abbildung 12.2.3: a) Testladung Q_T an einer EI-Schichtstruktur durch ein angelegtes Potential U_{bias} . b) Durch Reaktion der Protonen des Elektrolyts mit der Isolatoroberfläche wird diese geladen (Q_I). Die Ladung der Ionen des Elektrolyts Q_E schirmt Q_T und Q_I ab. c) Potentialverlauf in Elektrolyt und Isolator.

Bisher wurden nur die Protonen („potential determining ions“) im Elektrolyt berücksichtigt. In einem erweiterten Modell müssen aber auch spezifische Reaktionen anderer Gegenionen („counter ions“) mit der Oxidoberfläche betrachtet werden, da sie ebenfalls die Oberfläche aufladen können, z.B. $\text{SiO}^- + \text{Na}^+ \leftrightarrow \text{SiONa}$, $\text{SiOH}_2^+ + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{SiOH}_2\text{Cl}$. [212, 276-278]. Die Oberflächenladung ist die Differenz zwischen positiv und negativ geladenen Bindungsstellen, wobei jetzt die Reaktionen aller Ionen berücksichtigt werden müssen. Der allgemeine pH-Wert, bei welchem die Oberfläche neutral ist ($Q_I=0$) heißt pH_{IEP} („Isoelektrischer Punkt“). Falls gleich viele Protonen adsorbiert wie freigesetzt werden, d.h. $n(\text{SiOH}_2^+) = n(\text{SiO}^-)$, liegt der

¹³ Z.B. ist in einem Elektrolyt mit 1 molarem NaCl und $\text{pH}=7$: $c_E = 1 \text{ mol/l}$ und $c_0(\text{H}^+) = 10^{-7} \text{ mol/l}$, dagegen gilt für 1 molares HCl: $c_E = c_0(\text{H}^+) = 1 \text{ mol/l}$.

Ladungsneutral-Punkt pH_{pzc} vor. pH_{IEP} und pH_{pzc} sind dann unterschiedlich, falls neben H^+ bzw. OH^- noch andere Ionen berücksichtigt werden [279, (K.2 S.53)].

Je nach Anwendung sind noch weitere Erweiterungen des Site-binding-Modells möglich. So existieren z.B. Theorien für Polymermembranen auf der Isolatoroberfläche [280] oder die Physi- und Chemisorption verschiedenster Gegenionen [281].

(iii) Vergleich der beiden Grenzfälle: In Abb. 12.2.4 sind nun beide Grenzfälle gegenübergestellt. Die Gleichungen für den Potentialverlauf sind in Gl. 18 und Gl. 41 beschrieben. Für die simulierte SiO_2 -Oberfläche wurden die experimentell bestimmten Konstanten $n_0(Si^-) = 8 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ ¹⁴, $pH_{pzc} = 2,2$ und $\Delta pK = -\log(\delta^2/4) = 6,9$ verwendet¹⁵ [277].

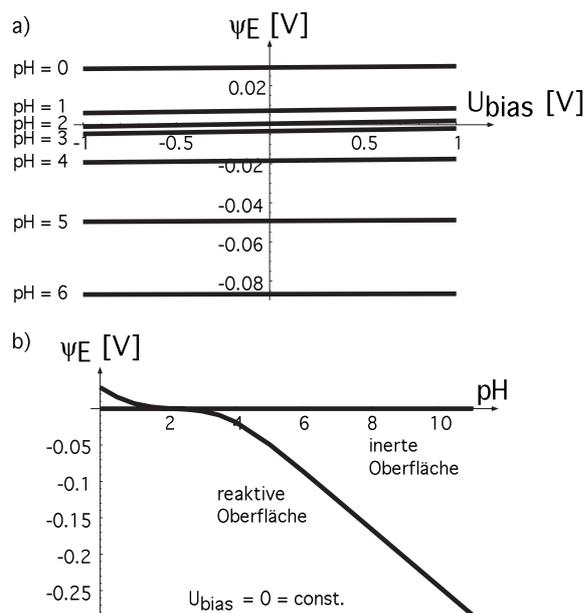


Abbildung 12.2.4: a) Aufgetragen ist das Oberflächenpotential ψ_E in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} für verschiedene pH-Werte an einer reaktiven Oberfläche¹⁶. b) Dargestellt ist die Abhängigkeit des Oberflächenpotentials ψ_E vom pH-Wert, an einer EIM-Struktur ohne Vorspannung $U_{bias} = 0$, für eine reaktive und eine inerte Oberfläche. Ohne Vorspannung ist die inerte Oberfläche ungeladen, $\psi_S = 0$. Dagegen ist durch Adsorption von Ionen aus dem Elektrolyt an eine reaktive Isolationsschicht diese auch ohne Vorspannung geladen.

(d) Anhang: Formale Lösung des Gouy-Chapman-Modells

Es wird ein symmetrischer Elektrolyt mit punktförmigen Ionen angenommen. Jedes Ion kann mit der Testladung und den anderen Ionen elektrisch wechselwirken. Es stellt sich dann eine räumliche Ladungsverteilung $\rho(z')$ [C/m^3] und damit ein räumliches Konzentrationsprofil $c(z')$ [mol/l] ein:

$$\rho(z') = \sum_i Z_i F c_i(x) = ZF (c_+(z') - c_-(z')) \tag{6}$$

c_+ ist dabei die Kationen-, c_- die Anionen-Konzentration und Z die Wertigkeit der Ionen, welche im symmetrischen Elektrolyt für Anionen und Kationen gleich ist (z.B. $Z=2$ für $CuSO_4$, $Z=1$ für HCl). Die Ladungsträger sind analog zur barometrische Höhenformel [282,

¹⁴ Mit der Avogadro-Konstanten $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ folgt: $n_0(Si^-) = 1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

¹⁵ Dies entspricht $pK_{a1} = -1,3$, $pK_{a2} = 5,7$, wobei $pK = -\log(K)$ bzw. $\delta = 0,00071$ [277].

¹⁶ Die hierbei in Gl. 40 und Gl. 17 eingesetzten Parameter sind: $d_l = 30 \text{ nm} = 30 \times 10^{-9} \text{ m}$, $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ AsV}^{-1} \text{ m}^{-1}$, $\epsilon_1 = 3,9$ (SiO_2), $\epsilon_E = 81$ (statischer Wert von Wasser), $R = 8,31 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 300 \text{ K}$, $F = 96485 \text{ Cmol}^{-1}$, $0,1 \text{ molar NaCl}$, d.h. $c_E = 0,1 \text{ mol/l} = 0,1 \times 10^3 \text{ mol m}^{-3}$ ($pH = 0 \Leftrightarrow c_0(H^+) = 1 \text{ mol/l} \gg c_E(NaCl) \Rightarrow c_E = 1 \text{ mol/l}$; $pH = 3 \Leftrightarrow c_0(H^+) = 0,001 \text{ mol/l} \ll c_E(NaCl) \Rightarrow c_E = 0,1 \text{ mol/l}$), $Z = 1$, $pH_{pzc} = 2,2$, $\delta = 0,00071$, $n_0(Si^-) = 1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} = 1,3 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2}$.

(K.7.5, S.237)] Boltzmann-verteilt: Die Wahrscheinlichkeit für ein Ion sich an einem Ort z' mit elektrostatischem Potential $\psi(z')$ zu befinden ist:

$$c_{\pm}(z') = c_{E\pm} \exp\left(\mp \frac{Z_{\pm} F \psi(z')}{RT}\right) \quad (7)$$

$\mp Z_{\pm} F \psi(z')$ ist dabei die benötigte Energie, um innerhalb einer Phase ein Mol Teilchen aus dem potentialfreien Volumen an einen Ort z' mit Potential $\psi(z')$ zu bringen, $c_{E\pm}$ die Volumen-Konzentration der Ionen, wobei beim symmetrischen Elektrolyten Anionen und Kationen dieselbe Volumen-Konzentration c_E haben. Potential und Ladungsverteilung stellen sich im Gleichgewicht so ein, daß alle Teilchen im Mittel kräftefrei sind, also eine statische Verteilung vorliegt. Der Zusammenhang zwischen Ladungsverteilung $\rho(z')$ und Potential $\psi(z')$ ist durch die Poisson-Gleichung [260, (K.3.11, S.77), 283, (K.2.10, S.43)] gegeben:

$$\frac{d^2\psi(z')}{dz'^2} = -\frac{\rho(z')}{\epsilon_0 \epsilon_E} \quad (8)$$

Einsetzen von Gl. 6 und Gl. 7 in Gl. 8 gibt eine Differentialgleichung 2. Ordnung für $\psi(z')$ [266, (K.12.3, S.503)]:

$$\frac{d^2\psi(z')}{dz'^2} \stackrel{(6,7)}{=} -\frac{ZFc_E}{\epsilon_0 \epsilon_E} \left(\exp\left(-\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) - \exp\left(+\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) \right) \stackrel{17}{=} +\frac{2ZFc_E}{\epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right)$$

$$\frac{d^2\psi(z')}{dz'^2} = \frac{1}{2} \frac{d}{d\psi} \left(\frac{d\psi(z')}{dz'} \right)^2 \Rightarrow d\left(\left(\frac{d\psi(z')}{dz'} \right)^2 \right) = 2 \frac{d^2\psi(z')}{dz'^2} d\psi$$

$$\Rightarrow \left(\frac{d\psi(z')}{dz'} \right)^2 = \frac{4ZFc_E}{\epsilon_0 \epsilon_E} \int \sinh\left(\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) d\psi = \frac{4c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E} \cosh\left(\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) + \text{const}$$

$$\stackrel{18}{=} \frac{4c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E} \left(\cosh\left(\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) - 1 \right)$$

$$\Rightarrow \frac{d\psi(z')}{dz'} = \pm \sqrt{\frac{4c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E} \left(\cosh\left(\frac{ZF\psi(z')}{RT}\right) - 1 \right)} \stackrel{19}{=} \pm \sqrt{\frac{8c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi(z')}{2RT}\right)} \quad (9)$$

$$\Rightarrow \int \frac{d\psi}{\sinh\left(\frac{ZF\psi}{2RT}\right)} = \pm \int \sqrt{\frac{8c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E}} dz' \Rightarrow \frac{2RT}{ZF} \ln\left(\tanh\left(\frac{ZF\psi(z')}{4RT}\right)\right) = \pm \sqrt{\frac{8c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E}} z' + \text{const.}$$

$$\Rightarrow \ln\left(\tanh\left(\frac{ZF\psi(z')}{4RT}\right)\right) = \pm \sqrt{\frac{2Z^2 F^2 c_E}{\epsilon_0 \epsilon_E RT}} z' + \text{const.} := \pm z' / \lambda_E + \text{const.}$$

Die Konstante wird so gewählt, daß $\psi(z'=0) = \psi_E$

¹⁷ $\sinh(x) = 1/2 (+\exp(x) - \exp(-x))$.

¹⁸ Potential im Volumen des Elektrolyts auf Null gesetzt, dort Feldfreiheit: $d\psi(\psi=0)/dz' = 0$.

¹⁹ $\sqrt{\cosh(x) - 1} = \pm \sqrt{2} \sinh\left(\frac{x}{2}\right)$ für $x \geq 0$.

²⁰ $\frac{\partial}{\partial x} \left(\ln\left(\tanh\left(\frac{x}{2}\right)\right) \right) = \frac{1}{\sinh(x)}$.

$$\Rightarrow \ln\left(\tanh\left(\frac{ZF\psi(z')}{4RT}\right)\right) = \pm z'/\lambda_E + \ln\left(\tanh\left(\frac{ZF\psi_{Es}}{4RT}\right)\right) \Rightarrow \ln\left(\frac{\tanh\left(\frac{ZF\psi(z')}{4RT}\right)}{\tanh\left(\frac{ZF\psi_{Es}}{4RT}\right)}\right) = \pm z'/\lambda_E$$

für kleine Oberflächenpotentiale $|\psi(z')| \ll 4RT/ZF \Rightarrow^{21} \psi(z') = \psi_E \exp(\pm z'/\lambda_E)$

Physikalisch sinnvolle Lösung: Potential im Volumen ($z' \rightarrow \infty$) des Elektrolyts $\rightarrow 0 \Rightarrow$

$$\psi(z') = \psi_E \exp(z'/\lambda_E), \quad \lambda_E = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_E RT}{2Z^2 F^2 c_E}} \quad (10)$$

λ_E [m] ist die Abschirmlänge. Anwendung des Gauß'schen Satzes [260, (K.2.6, S.46), 283, (K.2.8, S.39)] liefert dann die Abschirmladung Q_E [C] bzw. q_E [Cm⁻²] und die Kapazität c_E' [Fm⁻²] in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential ψ_{Es} (vgl. Abb. 12.2.5):

$$q_E = \epsilon_0 \epsilon_E \frac{1}{A} \oint \vec{E} d\vec{A} =^{22} \epsilon_0 \epsilon_E \{E_{z'}(-\infty)(-1) + E_{z'}(0)(+1)\} =^{23} \epsilon_0 \epsilon_E E_{z'}(0) = -\epsilon_0 \epsilon_E d\psi_E/dz'$$

$$= (9) = -\epsilon_0 \epsilon_E \left(+ \sqrt{\frac{8c_E RT}{\epsilon_0 \epsilon_E}} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \right) = -\sqrt{8c_E \epsilon_0 \epsilon_E RT} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \quad (11)$$

$$c_E' = \frac{\partial q_E}{\partial \psi_E} = \sqrt{8c_E \epsilon_0 \epsilon_E RT} \cosh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \frac{ZF}{2RT} = \sqrt{\frac{2c_E \epsilon_0 \epsilon_E Z^2 F^2}{RT}} \cosh\left(\frac{ZF}{2RT} \psi_E\right)$$

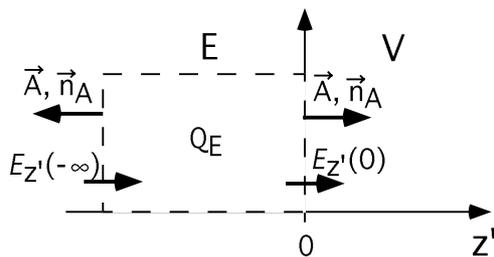


Abbildung 12.2.5: Um den Elektrolyt werde eine umschließende Hüllfläche A [m²] gelegt. Nach dem Gauß'schen Satz ist die eingeschlossene Ladung Q_E durch das Volumenintegral über das Skalarprodukt aus dem elektrischen Feld $E_{z'} = -d\psi/dz'$ der Ladung Q_E und dem Flächenvektor \vec{A} der Hüllkurve. $\vec{n}_A = \vec{A} / A$ ist der dimensionslose Flächenvektor.

(e) Anhang: EI-Grenzfläche bei inerten Isolatoren

$$\text{Spannungsteiler: } U_{\text{bias}} = U_I + \psi_E \quad (12)$$

$$\text{Ladungsneutralität: } Q_T + Q_E = 0, \text{ bzw. } q_T + q_E = 0 \quad (13)$$

$$\text{Kapazität des Isolators (vgl. Plattenkondensator): } c_I = q_T/U_I = \epsilon_0 \epsilon_I/d_I \Leftrightarrow q_T(U_I) = \epsilon_0 \epsilon_I U_I/d_I \quad (14)$$

$$\text{Abschirmladung im Elektrolyt (vgl. (2)): } q_E(\psi_E) = -\sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \quad (15)$$

²¹ $\tanh(x) \rightarrow x$ für $|x| \ll 1$.

²² Das aus der gedachten Hüllfläche austretende Feld ist nur an der Stelle $z'=0$, d.h. an der Grenzfläche ungleich Null. Dort steht der Flächenvektor \vec{A} nach rechts gerichtet, d.h. $n_A=+1$.

²³ Elektrolyt feldfrei.

$$\text{Gl. 14 und 15 in Gl. 13} \Rightarrow \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_I}{d_I} U_I = \sqrt{8c_E RT \varepsilon_0 \varepsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right)$$

$$U_I(\psi_E) = \frac{d_I}{\varepsilon_0 \varepsilon_I} \sqrt{8c_E RT \varepsilon_0 \varepsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \quad (16)$$

$$\text{Gl. 16 in Gl. 12} \Rightarrow U_{\text{bias}} = \frac{d_I}{\varepsilon_0 \varepsilon_I} \sqrt{8c_E RT \varepsilon_0 \varepsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) + \psi_E \quad (17)$$

Gl. 17 ist eine implizite Gleichung für $\psi_E = \psi_E(U_{\text{bias}})$.

Mit Gl. 16 und Gl. 17 kann nun der Potentialverlauf in Abhängigkeit der Vorspannung U_{bias} angegeben werden:

Elektrolyt (vgl.(1)): $\psi(z') = \psi_E \exp(z'/\lambda_E)$ mit $\psi_E(U_{\text{bias}})$ aus Gl. 17

Isolator: $\psi(z') = \psi_E + z'U_I/d_I$ mit $U_I(U_{\text{bias}})$ aus Gl. 12 und Gl. 17 (18)

(f) Anhang: EI-Grenzfläche bei reaktiven Isolatoren (Site-binding-Modell)

Alle folgenden Betrachtungen gelten speziell für SiO_2 ! Nach dem Site-binding-Modell [284], (vgl. auch [146]) reagieren Protonen mit den amphoteren Silanolgruppen an der Elektrolyt-Isolator-Grenzfläche und laden diese dadurch auf.



Dabei kann der Verlauf der Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz mit den Gleichgewichtskonstante $K_{\alpha 1}$ und $K_{\alpha 2}$ [mol/l] beschrieben werden [212, 277]:

$$K_{\alpha 1} = \frac{c(\text{H}^+, z'=0) n(\text{SiOH})}{n(\text{SiOH}_2^+)}, K_{\alpha 2} = \frac{c(\text{H}^+, z'=0) n(\text{SiO}^-)}{n(\text{SiOH})}, c(\text{H}^+, z'=0) = c_0(\text{H}^+) \exp\left(-\frac{F\psi_E}{RT}\right) \quad (20)$$

$n(\text{SiO}^-)$, $n(\text{SiOH})$ und $n(\text{SiOH}_2^+)$ [mol m⁻²] sind dabei die Dichten negativ (SiO^-), neutral (SiOH) und positiv (SiOH_2^+) geladener Silanolgruppen, $c(\text{H}^+, z'=0)$ [mol l⁻¹] die Protonenkonzentration des Elektrolyts an der Oxidoberfläche. Wie im Gouy-Chapman-Modell (d) beschrieben, ist die Protonenkonzentration Boltzmann-verteilt, wobei $c_0(\text{H}^+)$ die Konzentration im Volumen ist. Sie wird mit dem pH-Wert $\text{pH} = -\log(c_0(\text{H}^+))$ des Elektrolyts angegeben.

Alle Bindungsstellen („sites“) $n(\text{Si-})$ [m⁻²] sind entweder negativ (SiO^-), neutral (SiOH) oder positiv (SiOH_2^+) geladen. Die resultierende Ladung auf der Oxidoberfläche q_I [Cm⁻²] ist deshalb proportional zur Differenz der Anzahl positiv und negativ geladener Gruppen:

$$n(\text{Si-}) = n(\text{SiO}^-) + n(\text{SiOH}) + n(\text{SiOH}_2^+) \quad (21)$$

$$q_I = F (n(\text{SiOH}_2^+) - n(\text{SiO}^-)) \quad (22)$$

Zusammenfassung von Gl. 20 gibt : $K_{\alpha 1} K_{\alpha 2} = \frac{c_0^2(H^+) n(SiO^-)}{n(SiOH_2^+)} \exp^2\left(-\frac{F\psi_E}{RT}\right)$

$$\Leftrightarrow \ln((K_{\alpha 1} K_{\alpha 2})^{1/2}) = \ln(c_0(H^+)) + \ln\left(\sqrt{\frac{n(SiO^-)}{n(SiOH_2^+)}}\right) - \frac{F\psi_E}{RT}$$

$$\Leftrightarrow^{24} \ln(10) [\log(c_0(H^+)) - \log((K_{\alpha 1} K_{\alpha 2})^{1/2})] = \frac{F\psi_E}{RT} + \ln\left(\sqrt{\frac{n(SiOH_2^+)}{n(SiO^-)}}\right)$$

$$\Leftrightarrow \ln(10) [pH_{pzc} - pH] = \frac{F\psi_E}{RT} + \ln\left(\sqrt{\frac{n(SiOH_2^+)}{n(SiO^-)}}\right) \quad (23)$$

mit $pH = -\log(c_0(H^+))$ pH-Wert und

$$pH_{pzc} = -\log((K_{\alpha 1} K_{\alpha 2})^{1/2}) = \text{const} = \text{pH-Wert am „point of zero charge“ [277]} \quad (24)$$

Außerdem: Anteil geladener Gruppen: $\frac{\delta^2}{4} := \frac{K_{\alpha 1}}{K_{\alpha 2}} = \frac{n(SiOH_2^+) n(SiO^-)}{n^2(SiOH)} = \text{const.} \quad (25)$

$\delta[1]$ ist um so höher, je leichter neutrale Silanolgruppen sich nach Gl. 19 positiv oder negativ laden lassen [277].

nun kann $\ln\left(\sqrt{\frac{n(SiOH_2^+)}{n(SiO^-)}}\right)$ aus Gl.21,22,25 bestimmen werden [277]:

Abkürzungen: (26)

$n^- := n(SiO^-) / n_0(Si^-)$, $n^0 := n(SiOH) / n_0(Si^-)$, $n^+ := n(SiOH_2^+) / n_0(Si^-)$:

Anteil negativ, neutral, positiv geladener Oberflächengruppen

$\chi := n^+ - n^- = q_l / F n_0(Si^-)$

$F(\chi, \delta) := \sqrt{\frac{n^+}{n^-}} = \sqrt{\frac{n(SiOH_2^+)}{n(SiO^-)}} = \text{F-Funktion}$

$$\text{Gl.25} \Leftrightarrow \frac{\delta^2}{4} = \frac{n^+ n^-}{(n^0)^2} \Leftrightarrow n^0 = \pm \sqrt{\frac{4n^+ n^-}{\delta^2}} = +\frac{2}{\delta} \sqrt{n^+ n^-}, \text{ da physikalisch } n > 0 \quad (27)$$

$$\text{Gl.21} \Leftrightarrow 1 = n^+ + n^0 + n^- | : n^- \Rightarrow \frac{n^+}{n^-} + \frac{n^0}{n^-} + 1 - \frac{1}{n^-} = 0$$

$$\text{Gl.26} \Rightarrow \frac{n^+}{n^-} + \frac{n^0}{n^-} + 1 - \frac{1}{\chi} \left(\frac{n^+}{n^-} - 1\right) = 0 \Rightarrow \frac{n^+}{n^-} \left(1 - \frac{1}{\chi}\right) + \frac{n^0}{n^-} + \left(1 + \frac{1}{\chi}\right) = 0 \quad | \cdot \chi$$

$$\Rightarrow \frac{n^+}{n^-} (\chi - 1) + \chi \frac{n^0}{n^-} + (\chi + 1) = 0, \text{ Gl.27} \Rightarrow \frac{n^+}{n^-} (\chi - 1) + \frac{2\chi}{\delta} \sqrt{\frac{n^+}{n^-}} + (\chi + 1) = 0$$

$$\text{Gl.26} \Rightarrow F^2 (\chi - 1) + F \frac{2\chi}{\delta} + (\chi + 1) = 0 \Rightarrow F^2 + \frac{2}{\delta} \frac{\chi}{\chi - 1} F + \frac{\chi + 1}{\chi - 1} = 0 \quad (28)$$

Lösung der quadratischen Gleichung:

$$F = -\frac{1}{2} \frac{2}{\delta} \frac{\chi}{\chi - 1} \pm \sqrt{\frac{1}{4} \frac{4}{\delta^2} \frac{\chi^2}{(\chi - 1)^2} - \frac{\chi + 1}{\chi - 1}} \stackrel{25}{=} -\frac{1}{\delta} \frac{\chi}{\chi - 1} \pm \sqrt{\frac{1}{\delta^2} \frac{\chi^2}{(\chi - 1)^2} - \frac{\chi^2 - 1}{(\chi - 1)^2}}$$

²⁴ $x = \exp(\ln(x)) = 10^{\log(x)} \Rightarrow \ln(x) = \log(x) \cdot \ln(10) \approx 2,303 \cdot \log(x)$.

²⁵ $(a+b)(a-b) = a^2 - b^2$.

$$= \frac{-\frac{\chi}{\delta} \pm \sqrt{\left(\frac{\chi}{\delta}\right)^2 - \chi^2 + 1}}{\chi - 1} \stackrel{26}{=} \frac{\chi/\delta + \sqrt{1 + (\chi/\delta)^2} (1 - \delta^2)}{1 - \chi} \quad (29)$$

Dies ist die allgemeine F-Funktion. Sie kann leicht auf zusätzliche Reaktionsgleichgewichte wie $\text{SiO}^- + \text{Na}^+ \leftrightarrow \text{SiONa}$ erweitert werden [212, 276].

Näherungen:

(i) Messungen der realen Gleichgewichts-Konstante δ zeigen [285], daß $\delta^2 \ll 1$,

$$\text{d.h. } 1 - \delta^2 \approx 1 \quad (30)$$

(ii) Kleine Oberflächenladungen, d.h. $q_I \rightarrow 0 \Leftrightarrow \chi \ll 1 \Rightarrow 1 - \chi \approx 1$ (31)

$$\Rightarrow F(\chi, \delta) = \frac{n^+}{n^-} + \frac{n^0}{n^-} + 1 - \frac{1}{\chi} \left(\frac{n^+}{n^-} - 1 \right) \Rightarrow \ln(F(\chi, \delta)) = \ln\left(\frac{n^+}{n^-} + \frac{n^0}{n^-} + 1 - \frac{1}{\chi} \left(\frac{n^+}{n^-} - 1 \right) \right)$$

$$\stackrel{27}{=} \sinh^{-1}(\chi/\delta)$$

$$\text{Gl.26} \Rightarrow \ln\left(\sqrt{\frac{n(\text{SiOH}_2^+)}{n(\text{SiO}^-)}} \right) = \sinh^{-1}\left(\frac{q_I}{F\delta n_0(\text{Si}^-)} \right) \quad (32)$$

$$\text{Gl.23,32} \Rightarrow \ln(10) [\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH}] = \frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{q_I}{F\delta n_0(\text{Si}^-)} \right) \quad (33)$$

\Rightarrow Implizite Gleichung für $q_I(\psi_E)$ in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Nun kann der Potentialverlauf in Elektrolyt und Oxidschicht analog zu inerten Isolatoren angegeben werden.

$$\text{Spannungsteiler: } U_{\text{bias}} = U_I + \psi_E \quad (34)$$

$$\text{Ladungsneutralität: } Q_E + Q_I + Q_T = 0, \text{ bzw. } q_E + q_I + q_T = 0 \quad (35)$$

Isolatorkapazität (Plattenkondensator: Ladung „links“ neben Oxid = $Q_E + Q_I = -Q_T$, „rechts“ = Q_T):

$$q_T(U_I) = c_I U_I = \epsilon_0 \epsilon_I U_I / d_I \quad (36)$$

Abschirmung im Elektrolyt: $q_I(\psi_E)$ vgl. Gl.15

Ladung auf Isolatoroberfläche: $q_I(\psi_E)$ vgl. Gl.33

$$\text{Gl. 34, Gl. 36} \Rightarrow q_T = (U_{\text{bias}} - \psi_E) \epsilon_0 \epsilon_I / d_I \quad (37)$$

$$\text{Gl. 35} \Rightarrow q_I(\psi_E) = -q_E - q_T \stackrel{(37)}{=} -q_E - (U_{\text{bias}} - \psi_E) \epsilon_0 \epsilon_I / d_I$$

$$= +\sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT} \right) - (U_{\text{bias}} - \psi_E) \epsilon_0 \epsilon_I / d_I \quad (38)$$

²⁶ [277].

²⁷ $\sinh^{-1}(x) = \ln(x + (x^2 + 1)^{1/2})$.

Gl. 33, Gl. 38 $\Rightarrow \ln(10) \cdot (\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH}) =$

$$\frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{+\sqrt{8c_E RT \varepsilon_0 \varepsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) - (U_{\text{bias}} - \psi_E) \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_I}{d_I}}{F\delta n_0(\text{Si-})}\right) \quad (39)$$

bzw. umgeformt

$$U_{\text{bias}}(\psi_E) = \psi_E + \frac{d_I}{\varepsilon_0 \varepsilon_E} \left\{ \sqrt{8c_E RT \varepsilon_0 \varepsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) - \sinh(\ln(10) \cdot (\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH})) - \frac{F\psi_E}{RT} \cdot F\delta n_0(\text{Si-}) \right\} \quad (40)$$

Ein Vergleich mit Gl. 17 zeigt, daß im Vergleich zum inerten Isolator das Site-binding-Modell den Zusatzterm $-\frac{d_I}{\varepsilon_0 \varepsilon_E} \left\{ \sinh(\ln(10) \cdot (\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH})) - \frac{F\psi_E}{RT} \cdot F\delta n_0(\text{Si-}) \right\}$ in $U_{\text{bias}}(\psi_E)$ bewirkt.

Gl. 39 ist eine implizite Gleichung für $\psi_E = \psi_E(U_{\text{bias}})$

Potentialverlauf:

Elektrolyt: $\psi(z') = \psi_E \exp(z'/\lambda_E)$ mit $\psi_E(U_{\text{bias}})$ aus Gl. 39

Isolator: $\psi(z') = \psi_E + z'U_I/d_I$ mit $U_I(U_{\text{bias}})$ aus Gl. 34 und Gl. 39 (41)

12.3 Die Elektrolyt-Isolator-Halbleiter-Diode

Mit den Ergebnissen aus Kap. 12.1 und Kap. 12.2 kann nun der Potential-Verlauf in einer EIS-Struktur, wie in Abb. 12.3.1 dargestellt, berechnet werden. Das Problem setzt sich dabei aus 7 Unbekannten U_{bias} , ψ_E , U_I , ψ_S , q_E , q_I , q_S und 6 Gleichungen Gl. 1 bis Gl. 6 zusammen. Damit ist es möglich das Gleichungssystem nach U_{bias} aufzulösen und damit die Potentialverhältnisse der als Spannungsteiler wirkenden EIS-Schichtstruktur zu bestimmen.

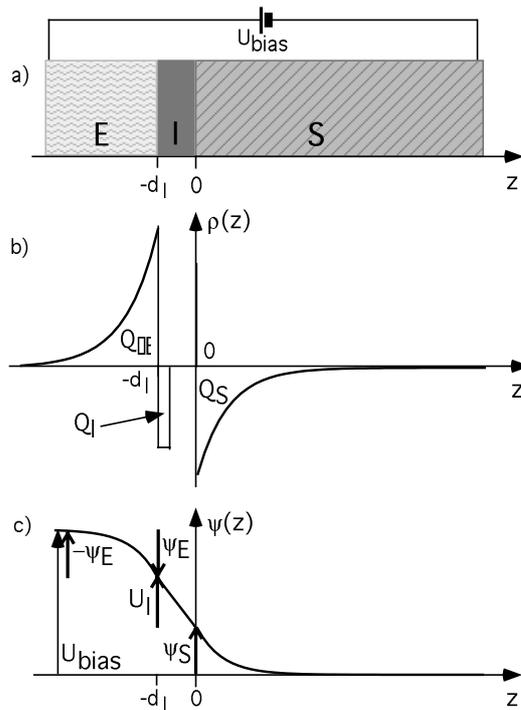


Abbildung 12.3.1: a) Schematische Darstellung einer EIS-Schichtstruktur mit angelegter Vorspannung U_{bias} . b) Ladungsverhältnisse in der Schichtstruktur, bei Annahme einer reaktiven Oxidschicht als Isolator und einem Elektrolyt mit $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$. Nach dem site-binding-Modell ist die Grenzfläche zwischen Elektrolyt und Oxidschicht dann negativ geladen ($q_I < 0$). Die negative Ladung der EI-Grenzfläche wird durch positive Ionen aus dem Elektrolyt abgeschirmt ($q_E > 0$). Die insgesamt positive Ladung auf der linken Seite der Oxidschicht wird dann durch Elektronen im Halbleiter abgeschirmt ($q_S < 0$). c) Eingezeichnet ist der Potentialverlauf in der Schichtstruktur. Am Elektrolyt fällt die Spannung ψ_E , am Isolator U_I und am Halbleiter ψ_S ab.

$$U_{\text{bias}} \stackrel{28}{=} -\psi_E + U_I + \psi_S \quad (1)$$

$$q_E + q_I + q_S \stackrel{29}{=} 0 \quad (2)$$

$$q_S = \mp \frac{\sqrt{2\epsilon_0\epsilon_s k_B T}}{eL_{\text{Dn}}} \left[\left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_s^{\text{ill}}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 2 \right) \right]$$

wobei $-/+$ für $\psi_S > / < 0$; siehe Gl.18 aus Kap. 12.1 (3)

$$q_E(\psi_E) = -\sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) \text{ siehe Gl. 2}^{30} \text{ aus Kap. 12.2} \quad (4)$$

$$\ln(10) \cdot (\text{pH}_{\text{pzc}} - \text{pH}) = \frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{q_I}{F\delta n_0(\text{Si}^-)}\right) \text{ siehe Gl. 33 aus Kap. 12.2} \quad (5)$$

$$-q_S/U_I = \epsilon_0 \epsilon_I / d_I \text{ siehe Gl. 31 aus Kap. 12.1} \quad (6)$$

Einsetzen der Gleichungen und Auflösen nach U_{bias} liefert

$$(3,6) \Rightarrow U_I = U_I(\psi_S)$$

²⁸ Spannungsteiler.

²⁹ Ladungsneutralität.

³⁰ Achtung, das Vorzeichen von U_{bias} ist in Kap. 12.1, 12.2 und 12.3 unterschiedlich.

$$= \pm \frac{\sqrt{2} d_I \epsilon_s k_B T}{e L_{Dn} \epsilon_I} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(\exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \frac{e\psi_S}{k_B T} - 1 \right) + \frac{\delta n_S^{ill}}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{e\psi_S}{k_B T}\right) - 2 \right)$$

wobei +/- für $\psi_S > / < 0$ (7)

$$(2,5) \Rightarrow \ln(10) \cdot (pH_{pzc} - pH) = \frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{-q_E - q_S}{F\delta n_0(Si-)}\right)$$

$$=(4,6) = \frac{F\psi_E}{RT} + \sinh^{-1}\left(\frac{\sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) + \frac{\epsilon_0 \epsilon_I U_I}{d_I}}{F\delta n_0(Si-)}\right) \text{ bzw.}$$

$$U_I(\psi_E) = -\frac{d_I}{\epsilon_0 \epsilon_I} \left\{ \sqrt{8c_E RT \epsilon_0 \epsilon_E} \sinh\left(\frac{ZF\psi_E}{2RT}\right) - \sinh\left(\ln(10) \cdot (pH_{pzc} - pH) - \frac{F\psi_E}{RT}\right) \cdot F\delta n_0(Si-) \right\}$$

\Rightarrow implizite Gleichung für $\psi_E = \psi_E(U_I)$ (8)

$$\Rightarrow U_{bias} = (1) = -\psi_E(U_I(\psi_S)) + U_I(\psi_S) + \psi_S \quad (9)$$

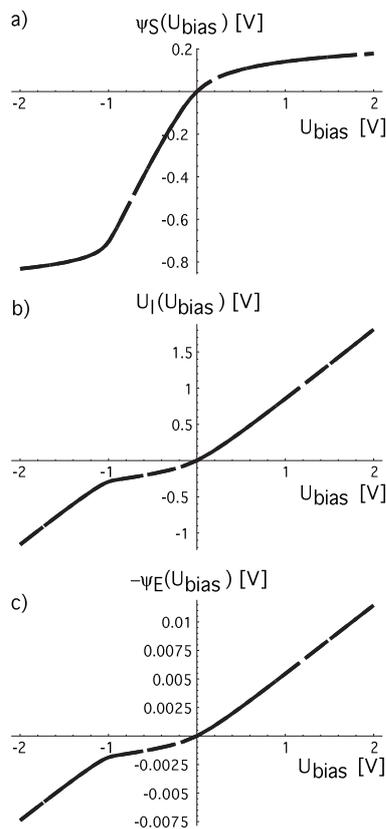


Abbildung 12.3.2: Bei Anlegen einer Vorspannung U_{bias} an eine EIS-Struktur³¹, fällt nach dem Gesetz des Spannungsteilers an jeder der drei Teilschichten ein Teil des Potentials ab: a) Potentialabfall im Halbleiter ψ_S , b) Potentialabfall am Isolator U_I und c) Potentialabfall im Elektrolyt ψ_E . Im hier eingezeichneten Fall ist die Isolator-Oberfläche nicht durch Reaktion mit Protonen aus dem Elektrolyt geladen ($pH = pH_{pzc}$).

Mit (7, 8, 9) sind damit implizite Gleichungen gegeben, die angeben, wieviel Spannung an welcher Schicht abfällt.

³¹ Für alle in diesem Kapitel vorgestellten Simulationen wurden folgende Parameter gewählt: $\epsilon_E = 81$ (statischer Wert von Wasser), $c_E = 0,01 \text{ mol/l}$, $Z = 1$, $pH = 2,2$, $pH_{pzc} = 2,2$, $\delta = 0,00071$, $n_0(Si-) = 1,3 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, $d_I = 20 \text{ nm}$, $\epsilon_I = 3,9$ (SiO_2), $\epsilon_S = 11,9$ (Si), $n_i = 1,45 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ (Si), $n_D = 10^{16} \text{ cm}^{-3}$, keine Beleuchtung $\delta n^{ill} = 0$, HF-Grenzfall $B = 1$, $T = 293 \text{ K}$, $R = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$, $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ As V}^{-1} \text{ m}^{-1}$, $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$, $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$.

$$\begin{aligned}\psi_E &= \psi_E(U_{\text{bias}}) \\ U_I &= U_I(U_{\text{bias}}) \\ \psi_S &= \psi_S(U_{\text{bias}})\end{aligned}\tag{10}$$

Der Potentialverlauf in den verschiedenen Schichten kann ebenfalls numerisch angegeben werden:

im Elektrolyt ($z \leq -d_I$):

$$\psi(z) = U_{\text{bias}} - \psi_E(U_{\text{bias}}) \cdot \exp((z+d_I)/\lambda_E) \text{ vgl. Gl. 1 aus Kap. 12.2}$$

im Isolator ($-d_I \leq z \leq 0$):

$$\psi(z) = \psi_S + U_I(U_{\text{bias}}) \cdot (-z/d_I)\tag{11}$$

im Halbleiter ($0 \leq z$):

$$\begin{aligned}\psi(z) &\text{ ist durch die Differentialgleichung Gl. 11 aus Kap. 12.1 mit der Nebenbedingung } \psi(z=0) \\ &= \psi_S(U_{\text{bias}}) \text{ implizit definiert}\end{aligned}$$

Ebenso ist es bei Kenntnis des Potentialverlaufs möglich, die Ladungsträgerdichte darzustellen. Allerdings ist dies nicht für die Ladung an der Elektrolyt-Oxid-Schicht möglich, da über die Ausdehnung der an der Oxid-Oberfläche gebundenen Ladungen keine Aussage gemacht werden kann. Diese ist als atomare Schicht nicht mehr mit einer Kontinuumslösung beschreibbar.

im Elektrolyt ($z \leq -d_I$):

$$\rho(z) = {}^{32} ZFc_E \left(\exp(-ZF[\psi(z)-\psi(z \rightarrow -\infty)]/RT) - \exp(+ZF[\psi(z)-\psi(z \rightarrow -\infty)]/RT) \right)\tag{12}$$

im Halbleiter ($0 \leq z$):

$$\rho(z) = {}^{33} n_{n0} \left[\left(1 - \exp\left(\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) - \frac{p_{n0}}{n_{n0}} \left(1 - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) - \frac{\delta n^{\text{ill}}(z)}{n_{n0}} \left(\exp\left(\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\psi(z)}{k_B T}\right) \right) \right]$$

Des weiteren kann die Gesamtkapazität der Struktur als Reihenschaltung der Einzelkapazitäten angegeben werden:

$$\frac{1}{C_{\text{EIS}}(U_{\text{bias}})} = \frac{1}{C_E(\psi_E(U_{\text{bias}}))} + \frac{1}{C_I(U_I(U_{\text{bias}}))} + \frac{1}{C_S(\psi_S(U_{\text{bias}}))}\tag{13}$$

wobei $C_S(\psi_S)$ mit Kap. 12.1, Gl. 24, $C_I(U_I)$ mit Kap. 12.1, Gl. 35 und $C_E(\psi_E)$ mit Kap. 12.2, Gl. 11 berechnet werden kann.

³² Siehe Kap. 12.2, Gl. 6, Gl. 7.

³³ Siehe Kap. 12.1, Gl. 8.

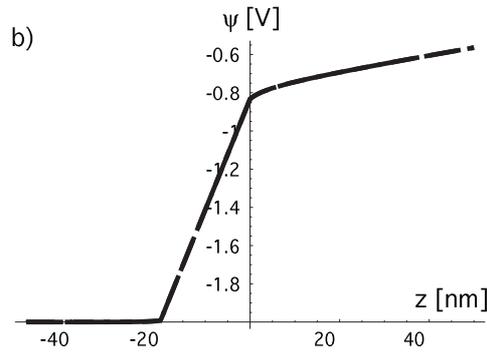


Abbildung 12.3.3: Aufgezeichnet ist b) der Potentialverlauf $\psi(z)$ und c) die Ladungsdichte $\rho(z)$ entlang der in a) skizzierten EIS-Struktur.

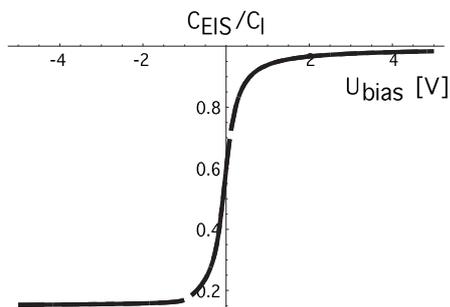
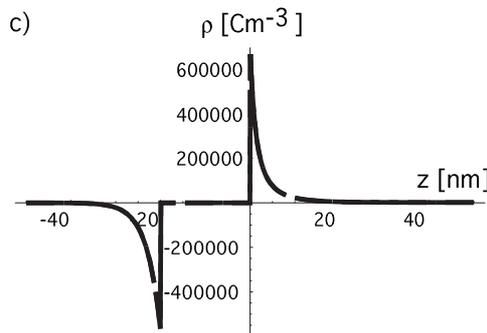


Abbildung 12.3.4: Hochfrequenz-Kapazität einer unbeleuchteten EIS-Struktur.

12.4 Diffusion Licht-generierter Ladungsträger in Halbleitern

(a) Konzept

Ziel dieses Kapitels ist es, die Diffusion der bei einem Lichtblitz auf einen LAPS erzeugten freien Löcher im Halbleiter zeitaufgelöst zu verfolgen und dabei die Ausdehnung der Ladungsträgerwolke zu bestimmen. Aus der Ausdehnung kann dann die Ortsauflösung abgeschätzt werden.

Dazu muß die allgemeine Diffusionsgleichung (1), mit einem zusätzlichem Rekombinationsterm gelöst werden. Bei einem n-dotierten Halbleiter sind Löcher die Minoritätsladungsträger und es reicht aus für diese die Diffusionsgleichung zu lösen.

$$\frac{\partial}{\partial t} \Delta p(x, y, z, t, \tau_{sp}) = D_{sp} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \Delta p(x, y, z, t, \tau_{sp}) - \frac{1}{\tau_{sp}} \Delta p(x, y, z, t, \tau_{sp}) \quad (1)$$

Dabei sind x, y, z [m] die Ortskoordinaten (x, y radial, z axial), t [s] die Zeitvariable, τ_{sp} [s] die Volumen-Rekombinationszeit für Löcher, D_{sp} [m²s⁻¹] der Volumen-Diffusionskoeffizient für Löcher und Δp [m⁻³] die Überschuß-Konzentration an Löchern, welche durch Beleuchtung erzeugt wurde³⁴. Beide Halbleitereigenschaften D_{sp} und τ_{sp} können zur Diffusionslänge L_{sp} [m] zusammengefaßt werden:

$$L_{sp} = \sqrt{\tau_{sp} D_{sp}} \quad (2)$$

Um (1) einfacher lösen zu können, bietet sich eine Abspaltung des Rekombinationsterms an, um die Standard-Diffusionsgleichung (4) zu erhalten. Zu (4) sind viele Lösungen für verschiedene Randbedingungen tabelliert.

$$\Delta p(x, y, z, t, \tau_{sp}) := \exp\left(-\frac{t}{\tau_{sp}}\right) \Delta p(x, y, z, t, \infty) \quad (3)$$

(3) in (1) \Rightarrow Standard-Diffusionsgleichung (4) :

$$\frac{\partial}{\partial t} \Delta p(x, y, z, t, \infty) = D_{sp} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \Delta p(x, y, z, t, \infty) \quad (4)$$

Entscheidend zur realitätsnahen Beschreibung der Verhältnisse im LAPS ist Wahl der Nebenbedingungen. Hier werden dazu drei Annahmen getroffen.

1. Annahme: Alle Löcher, welche im Halbleiter durch Diffusion getrieben in die Nähe der Verarmungszone an der Grenzfläche zum Isolator gelangen, werden dort im elektrischen Feld sofort zur Grenzfläche gezogen und sind dadurch für den Diffusionsprozeß im Volumen des

³⁴ Es ist $\Delta p(t=0) = \delta p$ ^{III}. In diesem Kapitel wird eine zeitabhängige Berechnung durchgeführt, während in Kap. 12.1 statische Rechnungen vorgestellt wurden.

Halbleiters verloren. Deshalb gibt es an der Grenze der Verarmungsschicht bei $z=0$ ³⁵ keine freien Überschußlöcher³⁶.

$$\Delta p(x, y, z = 0, t) = 0 \quad \forall t \quad (5)$$

2. Annahme: Für den Fall, daß der Halbleiter nur endliche Dicke hat³⁷ wird angenommen, daß alle Überschuß-Löcher, welche über Diffusion den ohmschen Kontakt an der Rückseite des Halbleiters erreichen, dort sofort rekombinieren und damit für den Diffusionsprozeß verloren sind. An der hinterer Grenzfläche des Halbleiters ist deshalb die Überschuß-Löcher-Konzentration gleich Null.

$$\Delta p(x, y, z = z_s, t) = 0 \quad \forall t \quad (6)$$

3. Annahme: Die Anfangsverteilung der Überschuß-Löcher ist durch das Strahlprofil des Lichtblitzes und damit durch die durch Beleuchtung erzeugte Lochkonzentration gegeben.

$$\Delta p(x, y, z, t = 0) = \Delta p_0(x, y, z) \quad (7)$$

mit der ursprünglichen Gesamtzahl von Überschußlöchern (enthält Grenzfall $d_s \rightarrow \infty$)

$$\int_0^{+d_s} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x, y, z) dx dy dz = \Delta P_0 = \Delta P(t = 0) \quad (8)$$

$\Delta P_0[1]$ ist dabei die Gesamtzahl an Überschußlöchern direkt nach dem Lichtblitz bei $t = 0$ und $\Delta P[1]$ die zeitabhängige Zahl an Überschußlöchern, da die Zahl der Überschußlöcher durch Rekombination und Absaugen in die Grenzfläche abnimmt. Der axiale Löcherstrom j_{pz} kann aus der Überschuß-Löcher-Verteilung mit Hilfe des 1. Fick'schen Gesetzes angegeben werden:

$$j_{pz}(x, y, z, t, \tau_{sp}) = -D_{sp} \frac{\partial}{\partial z} \Delta p(x, y, z, t, \tau_{sp}) \quad (9)$$

Der gesamte Diffusionsstrom $J_{P,diff}[1]$ ist dann das Integral über die Löcherstromdichte j_{pz} [$s^{-1}m^{-2}$] an der Grenzfläche zum Isolator:

$$J_{P,diff}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} j_{pz}(x, y, z = 0, t, \tau_{sp}) dx dy \quad (10)$$

Unter Kenntnis der Stromdichte gibt es Möglichkeit die Zahl der Ladungsträger zu bestimmen, die zum Photostrom beigetragen haben, d.h. diejenigen, welche durch Diffusion die

³⁵ Die Wahl des Nullpunktes der z-Achse entspricht nicht den Definitionen der übrigen Kapitel, wo $z=0$ als Grenzfläche zwischen Isolator und Halbleiter definiert wurde. Das in diesem Kapitel gewählte $z=0$ ist einige μm von der Isolator-Halbleiter-Grenzfläche entfernt und als Ende der Verarmungsschicht im Halbleiter definiert.

³⁶ Auf der selben Annahme basiert auch die Theorie von Nakao et al. Dort wird die Diffusionsgleichung ohne Randbedingungen gelöst und die Lösung für Δp dann abschnittsweise zusammengesetzt. Für $z \geq 0$ wird für Δp die Lösung der Diffusionsgleichung ohne Randbedingungen, für $z < 0$ (Verarmungszone) $\Delta p=0$ verwendet. Der Löcherstrom in die Grenzschicht $z < 0$ hinein wird dann als Gradient der Löcherdichte an dem Beginn der Grenzschicht berechnet, d.h. $j_{pz} \propto \Delta p(z=0) - 0$, vgl. [158, 159].

³⁷ Im Fall eines unendlich dicken Halbleiters ist diese Annahme ohne Bedeutung. In der Praxis würde sie natürlich erfüllt, da bei Beleuchtung von vorne kein Loch von der Vorderseite des Halbleiters bis an das unendliche Ende diffundieren kann, ohne vorher zu rekombinieren. Bei Beleuchtung von hinten darf der Halbleiter aber sowieso nicht als unendlich ausgedehnt angenommen werden.

Raumladungszone $z < 0$ erreichen, dort im elektrischen Feld zur Grenzfläche fließen und nicht bereits im Volumen des Halbleiters rekombinieren. Dabei sei $\Delta P_j(\tau_{sp})$ [1] die Zahl freier Löcher, die aus dem Volumen des Halbleiters in die Raumladungszone fließen und damit Urheber des Photostroms sind und $\Delta P_0 - \Delta P_j$ die Zahl der freien Löcher, die im Volumen des Halbleiters rekombinieren und damit nicht zum Photostrom beitragen.

$$\Delta P_j(\tau_{sp}) = - \int_0^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} j_{pz}(x, y, 0, t, \tau_{sp}) dx dy dt \quad (11)$$

$$\Delta P_j(\tau_{sp} \rightarrow \infty) = \int_{z=0}^{d_s} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') dx' dy' dz' = \Delta P_0 \quad (12)$$

$$\Delta P_j(\tau_{sp} \rightarrow 0) = 0$$

Die Ortsauflösung wird nun als mittlere radiale Ausdehnung der Stromdichteverteilung am Beginn der Raumladungszone $z=0$ definiert:

$$r_{min}^2 [m^2] = \langle x^2 + y^2 \rangle = \frac{\int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} (x^2 + y^2) j_{pz}(x, y, 0, t, \tau_{sp}) dx dy dt}{\int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} j_{pz}(x, y, 0, t, \tau_{sp}) dx dy dt} \quad (13)$$

Ziel ist nun eine allgemeine Berechnung von (13) für die beiden Spezialfälle

- dicker Halbleiter, d.h. $d_s \rightarrow \infty$, d.h. in der Praxis $d_s \gg L_{sp}$

- dünner Halbleiter, d.h. $d_s \approx L_{sp}$

unter jeweiliger Betrachtung von drei speziellen Lichtpuls-Verteilungen:

(i) Delta-Puls bei $(0,0,z_L)$:

$$\Delta p_0(x,y,z) = \Delta P_0 \delta(x) \delta(y) \delta(z-z_L) \quad (14)$$

(ii) Exponentiell abfallende Beleuchtung von der Vorderseite mit Eindringtiefe λ_L [m] und Radius r_L [m]:

$$\Delta p_0(x,y,z) = \frac{2\Delta P_0}{\pi\lambda_L r_L^2 (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \exp(-\frac{2(x^2 + y^2)}{r_L^2} - \frac{z}{\lambda_L}) \quad (15)$$

(iii) Exponentiell abfallende Beleuchtung von der Hinterseite:

(dies ist nur für dünne Halbleiter relevant, da ein unendlich dicker Halbleiter keine Rückseite hat)

$$\Delta p_0(x,y,z) = \frac{2\Delta P_0}{\pi\lambda_L r_L^2 (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \exp(-\frac{2(x^2 + y^2)}{r_L^2} - \frac{(d_s - z)}{\lambda_L}) \quad (16)$$

(b) Lösung der Diffusionsgleichung und Berechnung der Ortsauflösung für einen dicken Halbleiter

Es muß nun die Diffusionsgleichung (4) mit den Nebenbedingungen (5), (6) und (7) gelöst werden. Ansätze zur Lösung der eindimensionalen Diffusionsgleichung können in

Formelsammlungen gefunden werden³⁸. Die dreidimensionale Diffusionsgleichung kann unter Verwendung dieser separate Ansätze für die drei Raumkoordinaten x, y und z gewonnen werden, da die Diffusion zwischen den einzelnen Richtungen nicht gekoppelt ist³⁹:

$$\Delta p(x, y, z, t, \infty) = \frac{1}{(4\pi D_{Sp} t)^{3/2}} \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \left\{ \exp\left(-\frac{(z-z')^2}{4D_{Sp} t}\right) - \exp\left(-\frac{(z+z')^2}{4D_{Sp} t}\right) \right\} dx' dy' dz' \quad (17a)$$

(17a) in (3) und in (9) \Rightarrow

$$j_{pz}(x, y, 0, t, \tau_{Sp}) = -\frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{(4\pi D_{Sp})^{3/2} t^{5/2}} \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2}{4D_{Sp} t}\right) dx' dy' dz' \quad (18a)$$

$$r_{min}^2 [m^2] = (13, 18a) =$$

$$\frac{\int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \left(-\frac{(x^2 + y^2) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{(4\pi D_{Sp})^{3/2} t^{5/2}} \right) \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2}{4D_{Sp} t}\right) dx' dy' dz' dx dy dt}{\int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \left(-\frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{(4\pi D_{Sp})^{3/2} t^{5/2}} \right) \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2}{4D_{Sp} t}\right) dx' dy' dz' dx dy dt} =_{40}$$

$$\frac{\int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right) \exp\left(-\frac{z'^2}{4D_{Sp} t}\right)}{t^{5/2}} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \int_{x=-\infty}^{+\infty} (x^2 + y^2) \exp\left(-\frac{x^2 - 2xx' + x'^2}{4D_{Sp} t}\right) dx dy dt dx' dy' dz'}{\int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right) \exp\left(-\frac{z'^2}{4D_{Sp} t}\right)}{t^{5/2}} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \int_{x=-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{x^2 - 2xx' + x'^2}{4D_{Sp} t}\right) dx dy dt dx' dy' dz'} =_{41}$$

$$\frac{\int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{t^{5/2}} \exp\left(-\frac{z'^2}{4D_{Sp} t}\right) \sqrt{4\pi D_{Sp} t} \int_{y=-\infty}^{+\infty} (2D_{Sp} t + x'^2 + y'^2) \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) dy dt dx' dy' dz'}{\int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{t^{5/2}} \exp\left(-\frac{z'^2}{4D_{Sp} t}\right) \sqrt{4\pi D_{Sp} t} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) dy dt dx' dy' dz'}$$

³⁸ $\Delta p_x(x) = \frac{1}{(4\pi D_{Sp} t)^{1/2}} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_{x0}(x') \exp\left(-\frac{(x-x')^2}{4D_{Sp} t}\right) dx'$, ($-\infty < x < +\infty$) ist Lösung der freien Diffusionsgleichung

$\partial \Delta p_x(x,t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_x(x,t) / \partial x^2$ mit der Anfangsbedingung $\Delta p_x(x,t=0) = \Delta p_{x0}(x)$ [286, (K.2.2, S.56, Gl.8)] und

$\Delta p_z(z) = \frac{1}{(4\pi D_{Sp} t)^{1/2}} \int_{z'=0}^{+\infty} \Delta p_{z0}(z') \left\{ \exp\left(-\frac{(z-z')^2}{4D_{Sp} t}\right) - \exp\left(-\frac{(z+z')^2}{4D_{Sp} t}\right) \right\} dz'$, ($0 \leq z < +\infty$) ist Lösung der

Diffusionsgleichung $\partial \Delta p_z(z,t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_z(z,t) / \partial z^2$ mit der Anfangsbedingung $\Delta p_z(z,t=0) = \Delta p_{z0}(z)$ und der Randbedingung $\Delta p_z(z=0,t) = 0$ [286, (K.2.4, S.59, Gl.1)].

³⁹ Falls $\Delta p_x(x,t)$ die Diffusionsgleichung $\partial \Delta p_x(x,t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_x(x,t) / \partial x^2$

und $\Delta p_y(y,t)$ die Diffusionsgleichung $\partial \Delta p_y(y,t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_y(y,t) / \partial y^2$

und $\Delta p_z(z,t)$ die Diffusionsgleichung $\partial \Delta p_z(z,t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_z(z,t) / \partial z^2$ löst,

dann ist $\Delta p(x,y,z,t) = \Delta p_x(x,t) \times \Delta p_y(y,t) \times \Delta p_z(z,t)$ eine Lösung der Diffusionsgleichung

$\partial \Delta p(x,y,z,t) / \partial t = D_{Sp} (\partial^2 / \partial x^2 + \partial^2 / \partial y^2 + \partial^2 / \partial z^2) \Delta p(x,y,z,t)$.

⁴⁰ Vertauschen der Integrale.

⁴¹ Integration über x; vgl.(B), (C).

=42

$$\begin{aligned}
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp(-\frac{t}{\tau_{Sp}})}{t^{5/2}} \exp(-\frac{z'^2}{4D_{Sp}t}) \sqrt{4\pi D_{Sp}t} \sqrt{4\pi D_{Sp}t} (2D_{Sp}t + x'^2 + 2D_{Sp}t + y'^2) dt dx' dy' dz' \\
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} \frac{\exp(-\frac{t}{\tau_{Sp}})}{t^{5/2}} \exp(-\frac{z'^2}{4D_{Sp}t}) \sqrt{4\pi D_{Sp}t} \sqrt{4\pi D_{Sp}t} dt dx' dy' dz' \\
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \{ 4D_{Sp} \int_{t=0}^{+\infty} t^{-1/2} \exp(-\frac{1}{\tau_{Sp}}t - \frac{z'^2}{4D_{Sp}t}) dt + (x'^2 + y'^2) \int_{t=0}^{+\infty} t^{-3/2} \exp(-\frac{1}{\tau_{Sp}}t - \frac{z'^2}{4D_{Sp}t}) dt \} dx' dy' dz' \\
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \int_{t=0}^{+\infty} t^{-3/2} \exp(-\frac{1}{\tau_{Sp}}t - \frac{z'^2}{4D_{Sp}t}) dt dx' dy' dz'
 \end{aligned}$$

=43

$$\begin{aligned}
 & \sqrt{4\pi D_{Sp}} \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \{ 2\sqrt{D_{Sp}} \tau_{Sp} z' + (x'^2 + y'^2) \} \exp(-\frac{z'}{\sqrt{D_{Sp}} \tau_{Sp}}) dx' dy' dz' \\
 & \sqrt{4\pi D_{Sp}} \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \exp(-\frac{z'}{\sqrt{D_{Sp}} \tau_{Sp}}) dx' dy' dz'
 \end{aligned} \tag{19a}$$

$$r_{\min}^2 = (2 \text{ in } 19a) = \langle x^2 + y^2 \rangle$$

$$\begin{aligned}
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \{ 2L_{Sp} z' + (x'^2 + y'^2) \} \exp(-\frac{z'}{L_{Sp}}) dx' dy' dz' \\
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \exp(-\frac{z'}{L_{Sp}}) dx' dy' dz'
 \end{aligned} \tag{20a}$$

$$\Delta P_j(\tau_{Sp}) = (11, 18a) =$$

$$\begin{aligned}
 & - \int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \left(-\frac{\tau_{Sp}}{(4\pi D_{Sp})^{3/2} t^{5/2}} \right) \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') z' \exp(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2}{4D_{Sp}t}) dx' dy' dz' dx dy dt \\
 & \int_{z=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \exp(-\frac{z'}{L_{Sp}}) dx' dy' dz' = \Delta P_j(L_{Sp})
 \end{aligned} \tag{21a}$$

Mit (21a) können Lösungen von (20a) für spezielle Anfangsverteilungen $\Delta p_0(x, y, z)$ angegeben werden:

(i) Delta-Puls bei $(0, 0, z_L)$:

Zeitliche Verteilung der Überschußlöcher: (14) in (17a), (3) \Rightarrow

$$\Delta p(x, y, z, t, \tau) = \frac{\Delta P_0}{(4\pi D_{Sp} t)^{3/2}} \exp(-\frac{t}{\tau_{Sp}}) \exp(-\frac{x^2 + y^2}{4D_{Sp}t}) \left\{ \exp(-\frac{(z-z_s)^2}{4D_{Sp}t}) - \exp(-\frac{(z+z_s)^2}{4D_{Sp}t}) \right\} \tag{22a}$$

⁴² Integration über y; vgl. (B), (C).

⁴³ Integration über t; vgl. (E), (F).

⁴⁴ Analog obigen Rechnungen.

Ortsauflösung: (14) in (20a) \Rightarrow

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 &= \frac{\int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta P_0 \delta(x') \delta(y') \delta(z'-z_L) \{2L_{Sp} z' + (x'^2 + y'^2)\} \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz'}{\int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta P_0 \delta(x') \delta(y') \delta(z'-z_L) \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz'} \\
 &= \frac{2L z_L \exp\left(-\frac{z_L}{L_{Sp}}\right)}{\exp\left(-\frac{z_L}{L_{Sp}}\right)} = 2 L_{Sp} z_L \quad (23a)
 \end{aligned}$$

Zahl der am Photostrom beteiligten Ladungsträger: (14), (2) in (21a) \Rightarrow

$$\begin{aligned}
 \Delta P_j(L_{Sp}) &= \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta P_0 \delta(x') \delta(y') \delta(z'-z_S) \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz' \\
 &= \Delta P_0 \exp\left(-\frac{z_S}{L_{Sp}}\right) \quad (24a)
 \end{aligned}$$

$$\Rightarrow \Delta P_j \rightarrow \Delta P_0 \text{ für } L_{Sp} \rightarrow \infty \text{ bzw. } \Delta P_j \rightarrow 0 \text{ für } L_{Sp} \rightarrow 0$$

(ii) Exponentiell abfallende Beleuchtung von der Vorderseite:

$$\text{Polarkoordinaten: } r^2 = x^2 + y^2 \Rightarrow dx dy = 2\pi r dr \quad (25)$$

Ortsauflösung: (15) in (20a) \Rightarrow

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 &= \frac{\int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L r_L^2} \exp\left(-\frac{2(x'^2 + y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \{2L_{Sp} z' + (x'^2 + y'^2)\} \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz'}{\int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L r_L^2} \exp\left(-\frac{2(x'^2 + y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz'} \\
 &\stackrel{45}{=} \frac{\int_{z'=0}^{+\infty} \exp\left(-\left(\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}\right)z'\right) \int_{r'=0}^{+\infty} \{2L_{Sp} z' + r'^2\} \exp\left(-\frac{2r'^2}{r_L^2}\right) r' dr' dz'}{\int_{z'=0}^{+\infty} \exp\left(-\left(\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}\right)z'\right) \int_{r'=0}^{+\infty} \exp\left(-\frac{2r'^2}{r_L^2}\right) r' dr' dz'} \\
 &\stackrel{46}{=} \frac{\int_{z'=0}^{+\infty} \exp\left(-\left(\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}\right)z'\right) \left\{2L_{Sp} z' \frac{r_L^2}{2 \cdot 2} + \frac{r_L^4}{2 \cdot 4}\right\} dz'}{\int_{z'=0}^{+\infty} \exp\left(-\left(\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}\right)z'\right) \frac{r_L^2}{2 \cdot 2} dz'} \\
 &\stackrel{47}{=} \frac{2L_{Sp} \frac{1}{\left(\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}\right)^2} + \frac{r_L^2}{2} \frac{1}{L_{Sp} + \frac{1}{\lambda_L}}}{\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}} = \frac{2L_{Sp}}{\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}} + \frac{r_L^2}{2} = \frac{2L_{Sp}^2 \lambda_L}{L_{Sp} + \lambda_L} + \frac{r_L^2}{2} \quad (26a)
 \end{aligned}$$

⁴⁵ Umordnen und Transformation in Polarkoordinaten (25).

⁴⁶ Integration über r' vgl. (A).

⁴⁷ Integration über z' vgl. (D).

Grenzwerte für perfekten Lichtblitz $r_L \rightarrow 0$:

$$* \lambda_L \ll L_{Sp} \Rightarrow r_{\min}^2 = 2L_{Sp}\lambda_L$$

$$* \lambda_L \gg L_{Sp} \Rightarrow r_{\min}^2 = 2L_{Sp}^2 \quad (27a)$$

Zahl der am Photostrom beteiligten Ladungsträger: (15), (2) in (21a) \Rightarrow

$$\begin{aligned} \Delta P_j(L_{Sp}) &= \int_{z'=0}^{+\infty} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi\lambda_L r_L^2} \exp\left(-\frac{2(x'^2+y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \exp\left(-\frac{z'}{L_{Sp}}\right) dx' dy' dz' \\ &\stackrel{48}{=} \frac{2\Delta P_0}{\pi\lambda_L r_L^2} 2\pi \frac{r_L^2}{4} \frac{1}{\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}} = \frac{\Delta P_0}{\lambda_L} \frac{1}{\frac{1}{L_{Sp}} + \frac{1}{\lambda_L}} = \frac{\Delta P_0 L_{Sp} \lambda_L}{\lambda_L (L_{Sp} + \lambda_L)} = \Delta P_0 \frac{L_{Sp}}{L_{Sp} + \lambda_L} \end{aligned} \quad (28a)$$

$$\Rightarrow \Delta P_j \rightarrow \Delta P_0 \text{ für } L_{Sp} \rightarrow \infty \text{ bzw. } \Delta P_j \rightarrow 0 \text{ für } L_{Sp} \rightarrow 0$$

(c) Lösung der Diffusionsgleichung und Berechnung der Ortsauflösung für einen dünnen Halbleiter

Auch hier kann die dreidimensionale Diffusionsgleichung unter Zuhilfenahme von Lösungen der eindimensionalen Diffusionsgleichung angegeben werden⁴⁹:

$$\Delta p(x, y, z, t, \infty) = \frac{1}{(4\pi D_{Sp} t)^{3/2}} \frac{2}{d_s} \sum_{n=1}^{\infty} \sin\left(\frac{n\pi z}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \times \quad (17b)$$

$$\int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz'$$

und damit (17b) in (3) und in (9) \Rightarrow

$$\begin{aligned} &j_{pz}(x, y, 0, t, \tau_{Sp}) \\ &= -\frac{D_{Sp}}{4\pi D_{Sp} t} \frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{\tau_{Sp}} \frac{2}{d_s} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n\pi}{d_s} \cos\left(\frac{n\pi z}{d_s}\right) \Big|_{z=0} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \\ &\quad \times \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' \\ &= -\frac{\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right)}{2d_s^2 t} \sum_{n=1}^{\infty} n \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \\ &\quad \times \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{Sp} t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' \end{aligned} \quad (18b)$$

⁴⁸ Analog obigen Rechnungen.

⁴⁹ $\Delta p_z(z) = \frac{2}{d_s} \sum_{n=1}^{\infty} \sin\left(\frac{n\pi z}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \int_{z'=0}^{d_s} \Delta p_{z0}(z') \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dz'$, ($0 \leq z \leq d_s$) ist Lösung der

eindimensionalen Diffusionsgleichung $\partial \Delta p_z(z, t) / \partial t = D_{Sp} \partial^2 \Delta p_z(z, t) / \partial z^2$ mit der Anfangsbedingung $\Delta p_z(z, t=0) = \Delta p_{z0}(z)$ und der Randbedingungen $\Delta p_z(z=0, t) = 0$, $\Delta p_z(z=d_s, t) = 0$ [286, (K.3.4, S.100, Gl.1), 287, (K.4.3, S.47, Gl.4.16)].

Ortsauflösung

$$r_{\min}^2 [\text{m}^2] = (13,18\text{b}) =$$

$$\frac{\int_{t=0}^{\infty} \int_{y=-\infty}^{\infty} \int_{x=-\infty}^{\infty} \frac{(x^2 + y^2) \exp(-\frac{t}{\tau_{\text{Sp}}})}{2d_s^2 t} \sum_{n=1}^{\infty} n \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}} t}{d_s^2}\right) \int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{\text{Sp}} t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' dx dy dt}{=50}$$

$$\frac{\int_{t=0}^{\infty} \int_{y=-\infty}^{\infty} \int_{x=-\infty}^{\infty} \frac{\exp(-\frac{t}{\tau_{\text{Sp}}})}{2d_s^2 t} \sum_{n=1}^{\infty} n \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}} t}{d_s^2}\right) \int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \times \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{\text{Sp}} t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' dx dy dt}{=50}$$

$$\frac{\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \int_{t=0}^{\infty} \frac{\exp\left(-\left(\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}\right) t\right)}{t} \sqrt{4\pi D_{\text{Sp}} t} \int_{y=-\infty}^{\infty} (2D_{\text{Sp}} t + x'^2 + y'^2) \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{\text{Sp}} t}\right) dy dt dx' dy' dz'}{=51}$$

$$\frac{\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \int_{t=0}^{\infty} \frac{\exp\left(-\left(\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}\right) t\right)}{t} \sqrt{4\pi D_{\text{Sp}} t} \int_{y=-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{(y-y')^2}{4D_{\text{Sp}} t}\right) dy dt dx' dy' dz'}{=51}$$

=51

$$\frac{\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \int_{t=0}^{\infty} 4\pi D_{\text{Sp}} t (4D_{\text{Sp}} t + x'^2 + y'^2) \frac{\exp\left(-\left(\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}\right) t\right)}{t} dt dx' dy' dz'}{=52}$$

$$\frac{\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \int_{t=0}^{\infty} 4\pi D_{\text{Sp}} t \frac{\exp\left(-\left(\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}\right) t\right)}{t} dt dx' dy' dz'}{=52}$$

=(I)=52

$$\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4D_{\text{Sp}}}{\left(\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}\right)^2} + \frac{x'^2 + y'^2}{\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}} \right\} dx' dy' dz' \quad (19\text{b})$$

$$\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{\frac{1}{\tau_{\text{Sp}}} + \frac{n^2 \pi^2 D_{\text{Sp}}}{d_s^2}} dx' dy' dz'$$

$$r_{\min}^2 = {}^{53} \langle x^2 + y^2 \rangle =$$

$$\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4L_{\text{Sp}}^4}{\left(1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}\right)^2} + \frac{L_{\text{Sp}}^2 (x'^2 + y'^2)}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}} \right\} dx' dy' dz'$$

$$\int_{z=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{L_{\text{Sp}}^2}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}} dx' dy' dz'$$

⁵⁰ Vertauschen der Integrale und Integration über x analog (α).

⁵¹ Integration über y analog (α).

⁵² Integration über t.

⁵³ Multiplikation des Zählers und Nenners von (19b) mit D_{Sp} , und Einsetzen von (2).

$$\begin{aligned}
 & \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} + \frac{(x'^2 + y'^2)}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \right\} dx' dy' dz' \\
 = & \frac{\int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} dx' dy' dz'}{\quad} \quad (20b)
 \end{aligned}$$

$$\Delta P_j(L_{Sp}) = (11, 18b) =$$

$$\begin{aligned}
 & \int_{t=0}^{+\infty} \int_{y=-\infty}^{+\infty} \int_{x=-\infty}^{+\infty} \sum_{n=1}^{\infty} n \frac{\exp\left(-\left(\frac{1}{\tau_{Sp}} + \frac{n^2\pi^2 D_{Sp}}{d_s^2}\right)t\right)}{2d_s^2 t} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \exp\left(-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4D_{Sp}t}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' dx dy dt \\
 & \text{(Rechnungen analog oben bei (19b))} \\
 = & \frac{2\pi D_{Sp}}{d_s^2} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{\frac{1}{\tau_{Sp}} + \frac{n^2\pi^2 D_{Sp}}{d_s^2}} dx' dy' dz' \\
 = & \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sum_{n=1}^{\infty} 2\pi n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{n^2\pi^2 + \frac{d_s^2}{L_{Sp}^2}} dx' dy' dz' \\
 \xrightarrow{L_{Sp} \gg d_s} & \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi n} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta p_0(x', y', z') \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' \quad (21b)
 \end{aligned}$$

Lösungen von (20b) für spezielle Anfangsverteilungen $\Delta p_0(x, y, z)$:

(i) Delta-Puls bei $(0, 0, z_L)$:

(14) in (17b), (3) \Rightarrow

$$\begin{aligned}
 \Delta p(x, y, z, t, \tau) &= \frac{\Delta P_0}{2\pi d_s D_{Sp} t} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \sin\left(\frac{n\pi z}{d_s}\right) \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{4D_{Sp}t}\right) \exp\left(-\frac{n^2\pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \\
 = (K) &= \frac{\Delta P_0}{4\pi d_s D_{Sp} t} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Sp}}\right) \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{4D_{Sp}t}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left[\cos\left(\frac{n\pi(z - z_L)}{d_s}\right) - \cos\left(\frac{n\pi(z + z_L)}{d_s}\right) \right] \exp\left(-\frac{n^2\pi^2 D_{Sp} t}{d_s^2}\right) \quad (22b)
 \end{aligned}$$

(14) in (20b) \Rightarrow

$$r_{\min}^2 = 4L_{Sp}^2 \times \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) \frac{1}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2}}{\sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}}} \quad (0 < z_L < d_s) \quad (29)$$

Grenzfall $L_{Sp} \gg d_s$, d.h. dünner Halbleiter; der andere Grenzfall $L_{Sp} \ll d_s$ dicker Halbleiter ist durch (23a) beschrieben

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 &\xrightarrow{L_{\text{Sp}} \gg d_s, (29)} 4L_{\text{Sp}}^2 \times \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) \frac{1}{\left(\frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}\right)^2}}{\sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) \frac{1}{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}} = \frac{4}{\pi^2} d_s^2 \times \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^3} \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right)} \\
 = (J) &= \frac{4}{\pi^2} d_s^2 \times \frac{\frac{\pi^3 \left(\frac{z_L}{d_s}\right)^3 - 3\pi^3 \left(\frac{z_L}{d_s}\right)^2 + 2\pi^3 \frac{z_L}{d_s}}{12}}{\frac{\pi - \pi \frac{z_L}{d_s}}{2}} = \frac{d_s^2}{6} \frac{\left(\frac{z_L}{d_s}\right)^3 - 3\left(\frac{z_L}{d_s}\right)^2 + 2\frac{z_L}{d_s}}{1 - \frac{z_L}{d_s}} \\
 &= \frac{d_s^2}{6} \left(-\left(\frac{z_L}{d_s}\right)^2 + 2\frac{z_L}{d_s} \right) = \frac{d_s z_L}{3} - \frac{z_L^2}{6} \quad (0 < z_L < d_s) \tag{23b}
 \end{aligned}$$

Grenzfall $z_L \ll d_s \ll L_{\text{Sp}}$

$$\rightarrow r_{\min}^2 = \frac{d_s z_L}{3} \rightarrow 0 \text{ für } z_L \rightarrow 0$$

Grenzfall $z_L \rightarrow d_s \ll L_{\text{Sp}}$

$$\Rightarrow r_{\min}^2 = \frac{d_s^2}{3} - \frac{d_s^2}{6} = \frac{d_s^2}{6}$$

Zahl der am Photostrom beteiligten Ladungsträger:

$$\begin{aligned}
 \Delta P_j(L_{\text{Sp}}) &= (21b, 14) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi m} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \Delta P_0 \delta(x') \delta(y') \delta(z' - z_L) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' \\
 &= \Delta P_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi m} \sin\left(\frac{n\pi z_L}{d_s}\right) = (J) = \frac{2\Delta P_0}{\pi} \frac{\pi - \pi \frac{z_L}{d_s}}{2} = \Delta P_0 \left(1 - \frac{z_L}{d_s}\right) \tag{24b}
 \end{aligned}$$

d.h. es gibt kaum eine Chance für Volumen-Rekombination, da $L_{\text{Sp}} \gg d_s \gg z_L$

(ii) Exponentiell abfallende Beleuchtung von der Vorderseite:

Ortsauflösung: (15) in (20b) \Rightarrow

$$r_{\min}^2 = \frac{\int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L r_L^2} \exp\left(-\frac{2(x'^2 + y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4L_{\text{Sp}}^2}{\left(1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}\right)^2} + \frac{(x'^2 + y'^2)}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}} \right\} dx' dy' dz'}{\int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{\infty} \int_{x'=-\infty}^{\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L r_L^2} \exp\left(-\frac{2(x'^2 + y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{\text{Sp}}^2}{d_s^2}} dx' dy' dz'}$$

$$\begin{aligned}
 & \int_{z'=0}^{d_s} \int_{r'=0}^{\infty} \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} r' + \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} r'^3 \right\} \exp\left(-\frac{2(r'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) dr' dz' \\
 = (25) = & \frac{\int_{z'=0}^{d_s} \int_{r'=0}^{\infty} \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} r' \exp\left(-\frac{2(r'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) dr' dz'}{\int_{z'=0}^{d_s} \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \left\{ \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} \frac{r_L^2}{4} + \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \frac{r_L^4}{8} \right\} \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'} \\
 = (A) = & \frac{\int_{z'=0}^{d_s} \sum_{n=1}^{\infty} n \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \frac{r_L^2}{4} \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'}{\sum_{n=1}^{\infty} n \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} \int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'} \\
 = & \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'}{\sum_{n=1}^{\infty} n \frac{1}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'} + \frac{r_L^2}{2} \tag{30}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \frac{4L_{Sp}^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n^2}{\left(1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{n^2}{1 + \frac{n^2\pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)} + \frac{r_L^2}{2} \\
 =_{54} & \frac{4L_{Sp}^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \frac{d_s^4}{\pi^4 L_{Sp}^4} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{d_s^2}{\pi^2 L_{Sp}^2} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)} + \frac{r_L^2}{2} \\
 =_{55} & \frac{4L_{Sp}^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \frac{d_s^4}{\pi^4 L_{Sp}^4} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{d_s^2}{\pi^2 L_{Sp}^2} \frac{1}{1 + n^2\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)} + \frac{r_L^2}{2}
 \end{aligned} \tag{31}$$

$$\int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(\pm \frac{z'}{\lambda_L}\right) dz' = (L) = \frac{\frac{n\pi}{d_s}}{\frac{1}{\lambda_L^2} + \frac{n^2\pi^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(\pm \frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)$$

⁵⁵ Fall dünner Halbleiter: $L_{Sp} \gg d_s$.

$$\begin{aligned}
 & 4d_s^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{1+n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi) \right) \\
 = & \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{1+n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi) \right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{1+n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}}} + \frac{r_L^2}{2} \quad (26b)
 \end{aligned}$$

1. Fall $\lambda_L \gg d_s$

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 = (24a) &= \frac{4d_s^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} (1 - \cos(n\pi))}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} (1 - \cos(n\pi))} + \frac{r_L^2}{2} = \frac{4d_s^2}{\pi^4} \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^4} - \frac{1}{n^4} \cos(n\pi) \right) + \frac{r_L^2}{2} \\
 &= (M) = \frac{4d_s^2}{\pi^4} \left(\frac{\pi^4}{90} + \frac{7\pi^4}{720} \right) + \frac{r_L^2}{2} = \frac{4d_s^2}{720} \frac{15}{3} + \frac{r_L^2}{2} = \frac{d_s^2}{12} + \frac{r_L^2}{2} \quad (32)
 \end{aligned}$$

2. Fall $\lambda_L \ll d_s$

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 = (24a) &= 4d_s^2 \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \frac{1}{n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} (1-0)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2 \pi^2} \frac{1}{n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} (1-0)} + \frac{r_L^2}{2} = (N) = \frac{4d_s^2}{\pi^2} \frac{\pi}{3} \sqrt{\pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} + \frac{r_L^2}{2} = \frac{4}{3} d_s \lambda_L + \frac{r_L^2}{2} \quad (33)
 \end{aligned}$$

Zahl der am Photostrom beteiligten Ladungsträger:

$$\Delta P_j(L_{Sp}) = (21b, 15) =$$

$$\begin{aligned}
 & \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{\pi n} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L r_L^2 (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \exp\left(-\frac{2(x'^2+y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) dx' dy' dz' \\
 = & \frac{4\Delta P_0}{\pi^2 \lambda_L r_L^2 (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \int_{z'=0}^{d_s} \int_{y'=-\infty}^{+\infty} \int_{x'=-\infty}^{+\infty} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{2(x'^2+y'^2)}{r_L^2} - \frac{z'}{\lambda_L}\right) dx' dy' dz' \\
 = (B') &= \frac{4\Delta P_0}{\pi^2 \lambda_L r_L^2 (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \frac{\pi}{2} r_L^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz' \\
 = (L) &= \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L (1 - \exp(-\frac{d_s}{\lambda_L}))} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \left[\frac{\exp\left(-\frac{z'}{\lambda_L}\right)}{\frac{1}{\lambda_L^2} + \frac{n^2 \pi^2}{d_s^2}} \left(\frac{1}{\lambda_L} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) + \frac{n\pi}{d_s} \cos\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \right) \right]_0^{d_s}
 \end{aligned}$$

$$= \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right) \quad (28b)$$

1. Fall: $\lambda_L \gg d_s$

$$\Delta P_j(L_{Sp}) = \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{d_s^2}{\pi^2 \lambda_L^2} \frac{1}{n^2} (1 - \cos(n\pi)) \stackrel{(M)}{=} \frac{\Delta P_0 \frac{d_s}{\lambda_L}}{2 \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)\right)} \quad (34)$$

2. Fall: $\lambda_L \ll d_s$

$$\Delta P_j(L_{Sp}) = \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \stackrel{(N)}{=} \frac{\Delta P_0}{1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)} \quad (35)$$

(iii) Exponentiell abfallende Beleuchtung von der Rückseite:

Ortsauflösung: (16) in (20b), Rechnung analog (30) \Rightarrow

$$\begin{aligned} r_{\min}^2 &= \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} \int_{z=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(+\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'}{\sum_{n=1}^{\infty} n \frac{1}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \int_{z=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(+\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz'} + \frac{r_L^2}{2} \stackrel{(L, \text{vgl. 31})}{=} \\ &= \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n^2 \frac{4L_{Sp}^2}{\left(1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}\right)^2} \frac{1}{\lambda_L^2 + \frac{n^2 \pi^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} n^2 \frac{1}{1 + \frac{n^2 \pi^2 L_{Sp}^2}{d_s^2}} \frac{1}{\lambda_L^2 + \frac{n^2 \pi^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)} + \frac{r_L^2}{2} \stackrel{(vgl. 24a, \text{dünner Halbleiter})}{=} \\ &= \frac{4d_s^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\pi^2 n^2} \frac{1}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)\right)} + \frac{r_L^2}{2} \quad (36) \end{aligned}$$

1. Fall: $\lambda_L \gtrsim d_s$

$$r_{\min}^2 \stackrel{(36, \text{vgl. 32})}{=} = \frac{d_s^2}{12} + \frac{r_L^2}{2} \quad (37)$$

2. Fall: $\lambda_L \ll d_s$

$$\begin{aligned}
 r_{\min}^2 &= (36) = \frac{4d_s^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^4 \pi^4} \frac{d_s^2}{\lambda_L^2} \left(-\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi) \right)}{\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2 \pi^2} \frac{d_s^2}{\lambda_L^2} \left(-\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi) \right)} + \frac{r_L^2}{2} = \frac{4d_s^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(n\pi)}{n^4}}{\frac{1}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(n\pi)}{n^2}} + \frac{r_L^2}{2} \\
 &= (M) = \frac{7}{15} d_s^2 + \frac{r_L^2}{2} \quad (38)
 \end{aligned}$$

Zahl der am Photostrom beteiligten Ladungsträger:

$\Delta P_j(L_{Sp}) = (21b, 16, \text{ analog exponentieller Abfall von vorne}) =$

$$\begin{aligned}
 & \frac{2\Delta P_0 \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)}{\pi \lambda_L \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)\right)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \int_{z'=0}^{d_s} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \exp\left(+\frac{z'}{\lambda_L}\right) dz' \\
 &= (L) = \frac{2\Delta P_0}{\pi \lambda_L \left(\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1\right)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \left[-\frac{\exp\left(+\frac{z'}{\lambda_L}\right)}{\frac{1}{\lambda_L^2} + \frac{n^2 \pi^2}{d_s^2}} \left(-\frac{1}{\lambda_L} \sin\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) + \frac{n\pi}{d_s} \cos\left(\frac{n\pi z'}{d_s}\right) \right) \right]_0^{d_s} \\
 &= \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} \left(1 - \exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi) \right) \quad (39)
 \end{aligned}$$

1. Fall: $\lambda_L \gg d_s$

$$\begin{aligned}
 \Delta P_j(L_{Sp}) &= \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1} \frac{d_s^2}{\lambda_L^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2 \pi^2} (1 - \cos(n\pi)) \\
 &= (M) = \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1} \frac{d_s^2}{\lambda_L^2} \frac{1}{\pi^2} \left(\frac{\pi^2}{6} + \frac{\pi^2}{12} \right) = \frac{\Delta P_0 \frac{d_s}{\lambda_L} \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right)}{2 \left(1 - \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \right)} \quad (40)
 \end{aligned}$$

2. Fall: $\lambda_L \ll d_s$

$$\Delta P_j(L_{Sp}) = \frac{2\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{-\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) \cos(n\pi)}{1 + n^2 \pi^2 \frac{\lambda_L^2}{d_s^2}} = (N) = \frac{\Delta P_0 \frac{\lambda_L}{d_s}}{\exp\left(+\frac{d_s}{\lambda_L}\right) - 1} \quad (41)$$

(d) Anhang: Einige Integrale und mathematische Formeln

$$\int_0^{\infty} \exp(-ax^2) dx = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \quad \int_0^{\infty} x^{2n+1} \exp(-ax^2) dx = \frac{n!}{2a^{n+1}} \quad (n=0,1,2,\dots; a>0) \quad (A)$$

$$n=0 \Rightarrow \int_0^{\infty} x \exp(-ax^2) dx = \frac{1}{2a}, \quad n=1 \Rightarrow \int_0^{\infty} x^3 \exp(-ax^2) dx = \frac{1}{2a^2}$$

[288, (K.314, S.64-65, Gl.1b,2b)]

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-ax^2 - 2bx - c) dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}} \exp\left(\frac{b^2 - ac}{a}\right) \quad (a > 0) \quad (\text{B})$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \exp(-ax^2) dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}} \quad (a > 0) \quad (\text{B}')$$

[288, (K.314, S.65, Gl.6a)]

$$\int_{-\infty}^{+\infty} x^2 \exp(-ax^2 - 2bx - c) dx = \frac{a + 2b^2}{2a^2} \sqrt{\frac{\pi}{a}} \exp\left(\frac{b^2 - ac}{a}\right) \quad (a > 0) \quad (\text{C})$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} x^2 \exp(-ax^2) dx = \frac{1}{2a} \sqrt{\frac{\pi}{a}} = \frac{\sqrt{\pi}}{2a^{3/2}} \quad (a > 0) \quad (\text{C}')$$

[288, (K.314, S.65, Gl.6d)]

$$\int_0^{\infty} x^n \exp(-bx) dx = \frac{n!}{b^{n+1}} \quad (n=0,1,2,\dots; b > 0) \quad (\text{D})$$

$$n=0 \Rightarrow \int_0^{\infty} \exp(-bx) dx = \frac{1}{b}, \quad n=1 \Rightarrow \int_0^{\infty} x \exp(-bx) dx = \frac{1}{b^2}$$

[288, (K.312, S.55, Gl. 2a)]

$$\int_0^{\infty} x^{-1/2} \exp(-bx - \frac{c}{x}) dx = \sqrt{\frac{\pi}{b}} \exp(-2\sqrt{bc}) \quad (b > 0, c \geq 0) \quad (\text{E})$$

[288, (K.314, S.66, Gl. 9a)]

$$\int_0^{\infty} x^{-3/2} \exp(-bx - \frac{c}{x}) dx = \sqrt{\frac{\pi}{c}} \exp(-2\sqrt{bc}) \quad (b \geq 0, c > 0) \quad (\text{F})$$

[288, (K.314, S.66, Gl.9c)]

$$\int_0^{\infty} \exp(-ax^2 - 2bx - c) f(x) dx = \frac{1}{\sqrt{a}} \exp\left(\frac{b^2 - ac}{a}\right) \int_{b/\sqrt{a}}^{\infty} \exp(-X^2) f\left(\frac{X}{\sqrt{a}} - \frac{b}{a}\right) dX \quad (a > 0) \quad (\text{G})$$

$$f(x) = 1 \Rightarrow \int_0^{\infty} \exp(-ax^2 - 2bx - c) dx = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{a}} \exp\left(\frac{b^2 - ac}{a}\right) \left[1 - \Phi\left(\frac{b}{\sqrt{a}}\right)\right]$$

$$f(x) = x \Rightarrow \int_0^{\infty} x \exp(-ax^2 - 2bx - c) dx = \frac{1}{\sqrt{a}} \exp\left(\frac{b^2 - ac}{a}\right) \left\{ \frac{\exp(-\frac{b^2}{a})}{2\sqrt{a}} - \frac{\sqrt{\pi}b}{2a} \left[1 - \Phi\left(\frac{b}{\sqrt{a}}\right)\right] \right\}$$

[288, (K.314, S.65, Gl.5a,6b)]

$$\int_0^{\infty} x \exp(-ax) dx = \left[\frac{\exp(-ax)}{a^2} (-ax - 1) \right]_0^{\infty} = \frac{1}{a^2} \quad (a > 0) \quad (\text{H})$$

[219, (K.1.1.3.3, S.61)]

$$\int_0^{\infty} \exp(-ax) dx = \left[-\frac{\exp(-ax)}{a} \right]_0^{\infty} = \frac{1}{a} \quad (a > 0) \quad (\text{I})$$

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin(nx) = \frac{\pi - x}{2} \quad (0 < x < 2\pi), \quad \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^3} \sin(nx) = \frac{x^3 - 3\pi x^2 + 2\pi^2 x}{12} \quad (0 \leq x \leq 2\pi)$$

[219, (K.4.4.1.2, S.614)] (J)

$$\sin(x)\sin(y) = \frac{1}{2} (\cos(x-y) - \cos(x+y)) \quad (\text{K})$$

[219, (K.2.5.2.1.3)]

$$\int \sin(bx) \exp(-ax) = -\frac{\exp(-ax)}{a^2 + b^2} (a \sin(bx) + b \cos(bx)) \quad (\text{L})$$

[219, (K.1.1.3.3, S.62)]

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^4} = \frac{\pi^4}{90}, \quad \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^4} \cos(n\pi) = -\frac{7\pi^4}{720}, \quad \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} = \frac{\pi^2}{6}, \quad \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cos(n\pi) = -\frac{\pi^2}{12}$$

[219, (K.1.1.3.1, S.30)] (M)

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \frac{1}{1+an^2} \stackrel{[289]}{=} \frac{\sqrt{a} \left\{ -3\sqrt{a}\pi \cosh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) + (3a + \pi^2) \sinh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) \right\}}{3 \left\{ \pi \cosh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) - \sqrt{a} \sinh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) \right\}}$$

$$\xrightarrow{a \rightarrow 0} \frac{\sqrt{a}\pi}{3} \frac{-3\sqrt{a} \exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) + \pi \exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)}{\pi \exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) - \sqrt{a} \exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)} = \frac{\sqrt{a}\pi}{3} \frac{-3\sqrt{a} + \pi}{-\sqrt{a} + \pi} \xrightarrow{a \rightarrow 0} \frac{\pi}{3} \sqrt{a}$$

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{1+an^2} \stackrel{[289]}{=} \frac{1}{2\sqrt{a} \sinh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)} \left(\pi \cosh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) - \sqrt{a} \sinh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) \right)$$

$$\xrightarrow{a \rightarrow 0} \frac{1}{2\sqrt{a}} \left(\pi \frac{1}{2} \frac{\exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)}{\exp\left(+\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)} - \sqrt{a} \right) = \frac{1}{2\sqrt{a}} (\pi - \sqrt{a}) \xrightarrow{a \rightarrow 0} \frac{\pi}{2\sqrt{a}} \quad (\text{N})$$

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(n\pi)}{1+an^2} \stackrel{[289]}{=} \frac{1}{4\sqrt{a} \cosh\left(\frac{\pi}{2\sqrt{a}}\right) \sinh\left(\frac{\pi}{2\sqrt{a}}\right)} \left(\pi - \sqrt{a} \sinh\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) \right)$$

$$\xrightarrow{a \rightarrow 0} \frac{1}{4\sqrt{a} \frac{1}{2} \exp\left(\frac{\pi}{2\sqrt{a}}\right) \frac{1}{2} \exp\left(\frac{\pi}{2\sqrt{a}}\right)} \left(\pi - \sqrt{a} \frac{1}{2} \exp\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right) \right) = \frac{\pi}{\sqrt{a} \exp\left(\frac{\pi}{\sqrt{a}}\right)} - \frac{1}{2}$$

$$\xrightarrow{a \rightarrow 0} -\frac{1}{2}$$

mit $\cosh(x) = 1/2 (\exp(+x) + \exp(-x))$ und $\sinh(x) = 1/2 (\exp(+x) - \exp(-x))$

13 Anhang E: Aufbau eines Licht-adressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS)

13.1 Beschreibung des Aufbaus

Ein LAPS-System besteht im wesentlichen aus den folgenden Komponenten: Meßkammer, Lichtzeiger und Elektronik zur Messung des Photostroms. Diese Komponenten werden nun im einzelnen kurz beschrieben. Der Aufbau wurde so konzipiert, daß hintereinander Kapazitäts-Spannungs und Photostrom-Spannungs-Kurven aufgenommen werden konnten.

Jede Meßkammer bestand in dieser Arbeit aus einem n-dotierten Silizium-Wafer, welcher an seiner Vorderseite mit einer Oxid/- Nitridschicht überzogen war und auf seiner Rückseite einen ohmschen Kontakt hatte, vgl. Abb. 13.1.1 und Abb. 13.1.2. Die maximal mögliche Oberfläche der verwendeten LAPS-Wafer war $A_{\text{akt}} = \pi(15\text{mm}/2)^2/2 \approx 90 \text{ mm}^2$. Auf die Oberseite der Wafer wurde ein 1 mm hoher Plexiglas-Dichtring mit einem Innendurchmesser von 15 mm geklebt¹. Der Innenraum des Dichtrings konnte so mit elektrolytischer Lösung befüllt werden². Mit ihrer Unterseite wurden die Wafer mit einem leitfähigen Silber-Epoxy-Kleber (Epotek H20E, WPI #4898, Berlin) auf IC-Sockel geklebt. Mit dem IC-Sockel konnte jeder Halbleiter-Chip dann schnell direkt in einen im Vorverstärker integrierten Sockel³ gesteckt werden, vgl. Abb. 13.1.3.

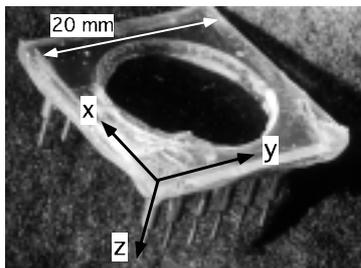


Abbildung 13.1.1: Photographie eines Halbleiterchips. Für Messungen wurde der Innenraum des Plexiglasrings mit elektrolytischer Lösung gefüllt. Bei Messungen mit Zellen wurden diese direkt auf der Oberfläche des Halbleiters ausgesät. Zur Kontaktierung wurde der Chip auf einen IC-Sockel aufgeklebt.

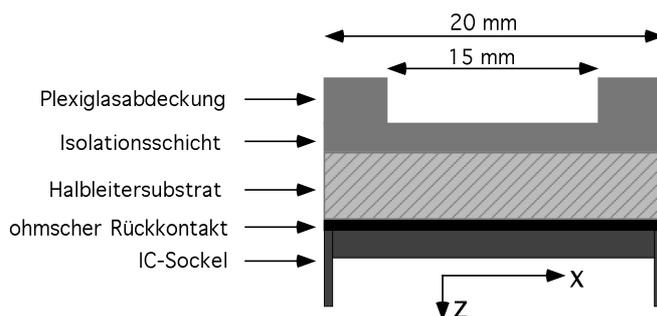


Abbildung 13.1.2: Schnitt durch einen LAPS-Chip. An seiner Vorderseite ist das Halbleitersubstrat (n-dotiertes Silizium) mit einer Isolationsschicht (Silizium-oxid /-nitrid) bedeckt und seine Rückseite hat einen ohmschen Kontakt. Auf der Vorderseite des Chip ist ein Plexiglasdichtring aufgeklebt. Der ganze Chip ist auf einen IC-Sockel geklebt.

¹ Dazu wurde der biokompatible Silikon-Kleber Kwik-Sil (silicon elastomer cure, WPI, Berlin) verwendet. Innerhalb des Dichtrings ist die Oberfläche des Halbleiter völlig unstrukturiert.

² Durch den großen Durchmesser und die geringe Höhe des Dichtringes ist es möglich, mit einer patch-clamp Pipette Zellen auf der Halbleiteroberfläche im Mittelpunkt des Dichtringes zu kontaktieren.

³ TEXTTOOL Dip II, 32 polig mit Pinabstand 2,54 mm, Bürklin #14B743, München.

Als Lichtquellen wurden 2 rote Halbleiter-Laserdioden (Toshiba TOLD 9150, Leistung 30 mW, Wellenlänge 690,9 nm) verwendet. Für den Lichtzeiger wurde das Licht der Laserdiode mit einem Wasser-Mikroskopobjektiv (Zeiss Achroplan 40× bzw. 20×) und einem Mikroskop (Zeiss Axiotech, Zeiss, Oberkochen) auf die Oberfläche des Halbleiterchips fokussiert. Zu den Differenzmessungen mit 2 Lichtzeigern wurde das Licht des zweiten Lasers mit einer Linse (Schäfter & Kirchoff Basisgehäuse SK9650 mit Kollimationslinse SK9650.T5, Schäfter & Kirchoff, Hamburg) direkt auf einen Bereich der Halbleiteroberfläche gebündelt.

Die Laserdioden wurden mit einem Laserdiodentreiber (SK9716 Laser Diode Supply, Schäfter & Kirchoff, Hamburg) gesteuert, in welchen über einen Funktionsgenerator die Modulationsfrequenz eingespeist wurde. Dabei wurden die Laserdioden mit einer Leistungsregelung betrieben: Mit einer in der Laserdiode integrierten Monitordiode wurde permanent die Ausgabeleistung der Laserdiode gemessen und dieses Signal in den Laserdiodentreiber rückgekoppelt. Dabei war es sehr wichtig, eine schöne sinusförmige Modulation der Leistung zu erhalten, da Oberwellen das LAPS-Signal verformen würden. Mit der Monitordiode konnte - nach einmaliger Kalibrierung mit einem externen „Powermeter“ - auch jeweils die Leistung des Lichtzeigers P_L direkt auf der Halbleiteroberfläche bestimmt werden.

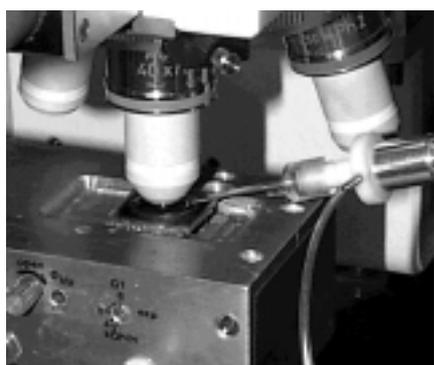


Abbildung 13.1.3: Ein LAPS-Chip ist in den Sockel im Vorverstärker zur Messung eingebaut. Über ein Mikroskopobjektiv können gezielt Teile der Halbleiteroberfläche beleuchtet werden (Lichtzeiger). Rechts ist eine patch-clamp Pipette zu sehen, mit welcher eine Zelle unter der Mikroskopobjektiv kontaktiert wird.

Um den Licht-generierten Photostrom möglichst empfindlich zu messen, wurde der Vorverstärker möglichst nahe an der Meßkammer, d.h. gleich neben dem IC-Sockel angeordnet. Ebenso konnte, bei Modulation der Vorspannung, auch der kapazitive Wechselstrom durch den Halbleiter-Chip und damit dessen Kapazität gemessen werden⁴. Der Vorverstärker bestand im wesentlichen aus einem Strom-Spannungs-Wandler auf Basis des Operationsverstärkers OPA 111 (Burr Brown)⁵ mit einem Rückkopplungs-Widerstand von 10^4 bzw. $10^5 \Omega$. Am Ende des Vorverstärker lag dann eine Wechselspannung im Volt-Bereich an. Bei Photostrom-Spannungs-Messungen entsprach die Frequenz der Spannung dabei der Modulationsfrequenz des Lichtzeigers, bei Kapazitäts-Spannungs-Messungen der Modulationsfrequenz der Vorspannung. Mit einem Lock-In-Verstärker [210, (K.15.15, S.1031-1033), 290] welcher mit der Modulationsfrequenz getaktet wurde, wurde die Amplitude der Wechselspannung nach dem Vorverstärker bestimmt [146].

⁴ Bei den Kapazitäts-Spannungs-Messungen ist keine Modulation des Lichtzeigers erforderlich.

⁵ Die Elektronik in ihrem endgültigen Zustand wurde von J. Wieser (Elektroniklabor, Sektion Physik, LMU München) entwickelt und aufgebaut. Der prinzipielle Aufbau wurde bereits in [146] beschrieben.

13.2 Halbleiter-Substrate

In dieser Arbeit wurden zum Aufbau des LAPS n-dotierte Silizium (n-Si) - Substrate verschiedener Dotierungen n_D und Dicken d_S verwendet, siehe Tab. 13.2.1:

Nr ⁶	ρ_S [Ωcm]	n_D [cm^{-3}]	d_S [mm]	ohmscher-Rückkontakt	Hersteller
6	900-1800	$\approx 3 \cdot 10^{12}$	0,375	TiW/Pt ⁷	CrysTec
3	64-77	$\approx 6 \cdot 7 \cdot 10^{13}$	0,18	TiW/Pt	CrysTec
7	64-77	$\approx 6 \cdot 7 \cdot 10^{13}$	0,375	TiW/Pt	CrysTec
8	15	$\approx 2,5 \cdot 10^{14}$	1,0	TiW/Pt	CrysTec
1	10-15	$\approx 2,5 \cdot 4 \cdot 10^{14}$	0,5	Au ⁸	Molecular Devices
13	10 0,005-0,02	$\approx 4 \cdot 10^{14}$	0,003 0,380	TiW/Pt	Int. Wafer Service
5	5-10	$\approx 4 \cdot 9 \cdot 10^{14}$	0,375	TiW/Pt	CrysTec
4	0.014	$\approx 2 \cdot 10^{18}$	0,18	TiW/Pt	CrysTec

Tabelle 13.2.1: Verwendete Halbleiter-Substrate.

Die Vorderseite der Substrate war mit einer Schicht aus SiO_2 (Dicke $d_1(\text{SiO}_2)$) und darauf mit einer Schicht aus Si_3N_4 (Dicke $d_1(\text{Si}_3\text{N}_4)$) bedeckt, siehe Tab. 13.2.2:

Nr ⁹	$d_1(\text{SiO}_2)$ [nm]	$d_1(\text{Si}_3\text{N}_4)$ [nm]	Hersteller
D ¹⁰	12	31	Uni. d. Bundeswehr
B	19	18	Uni. d. Bundeswehr
G	30	56	Uni. d. Bundeswehr
E	30	59	Uni. d. Bundeswehr
A ¹¹	30	60	Molecular Devices

Tabelle 13.2.2: Verwendete Isolationsschichten.

⁶ Die Numerierung der Halbleiter-Substrate wurde so gewählt, daß sie mit [147, 148] konsistent ist.

⁷ Nach CF_4 -Plasmareinigung zur Beseitigung von Oxid- und Nitrid-Rückständen wurde auf die Rückseite des Halbleiter-Substrats $30 \mu\text{m}$ TiW und anschließend $500 \mu\text{m}$ Pt aufgesputtert (von Dr. F. Käsen und H. Geiger am Lehrstuhl Prof. I. Eisele, Universität der Bundeswehr, Neubiberg). Titan dient dabei als Haftvermittler, Wolfram verhindert Diffusion von Ionen aus dem Rückkontakt in den Halbleiter und Platin bildet den eigentlichen ohmschen Rückkontakt.

⁸ In den von der Firma Molecular Devices bezogenen Substraten wurde der ohmsche Rückkontakt durch Dotierung der Rückseite und anschließendem Aufdampfen einer Goldschicht hergestellt [291].

⁹ Die Numerierung der Isolationsschichten wurde so gewählt, daß sie mit [147, 148] konsistent ist. Durch Kombination von Halbleitersubstrat-Nummer und Isolationsschicht-Nummer ist dann ein LAPS-Wafer eindeutig gekennzeichnet (z.B. „Typ 8E“).

¹⁰ Die Herstellung der Isolationsschicht wurde mit einem modifizierter RCA - Clean (nacheinander ätzen in $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, HF und $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}_2$) zur Reinigung der Silizium-Oberfläche begonnen. Dann wurde mit einer Trockenoxidation bei ca. 800°C eine Oxidschicht aufgebracht. Anschließend wurde darauf nach dem LPCVD-Verfahren bei 750°C und $0,5 \text{ mbar}$ eine Nitridschicht abgeschieden.

¹¹ Das von Molecular Devices verwendete Verfahren zur Herstellung der Isolationsschicht ist in [291] beschrieben. Die Isolationsschicht ist dabei im Gegensatz zu allen anderen Isolationsschichten strukturiert. Auf der Halbleiter-Oberfläche befinden sich neun ca. $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ große Bereiche mit der in der Tabelle beschriebenen dünnen Isolationsschicht (aktive Bereiche). Die restliche Oberfläche ist zusätzlich mit einer ca. $1 \mu\text{m}$ dicken Siliziumnitrid-Schicht überzogen (passivierte Bereiche, vgl. [157]).

Lebenslauf Wolfgang Johann Parak

Geboren am: 22.02.1970 in Dachau bei München

Eltern: Prof. Dr. Fritz Parak und Edeltraud Parak (geb. Unterstaller)

Schullaufbahn und Studium:

1976 - 1980: Grundschule Dachau

1980 - 1983: Josef-Effner-Gymnasium Dachau

1983: Umzug nach Münster

1983 - 1989: Immanuel-Kant-Gymnasium Münster-Hiltrup
Abschluß mit dem Abitur

1989: Umzug nach Ingelheim bei Mainz und anschließend nach Dachau

1989 - 1997: Studium der Allgemeinen Physik
an der Technischen Universität München

1991: Vordiplom TU München

1993 - 1995 Werkstudent bei

* Dr. Walter Potzel

(Physikdepartment E15 TU München)

* Prof. Dr. Gregor Alefeld

(Physikdepartment E19 TU München)

* Dr. Otto Müller / Prof. Manfred Schliwar

(Institut für Zellbiologie LMU München)

1996: Diplomarbeit "Noninvasive Membranpotentialmessung" bei
Prof. Dr. Hermann Gaub

(Physikdepartment E22 TU München)

1996: Umzug mit der Arbeitsgruppe Prof. Gaub ans
Institut für Angewandte Physik der LMU München

1997: Abschluß Diplom Physik TU München

1997-1999: Doktorarbeit bei Prof. Gaub an der LMU München