

Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN)
Bioelektronik (IBN-2)

Extrazelluläre Ableitung elektrisch erregbarer Zellen

Bastian Lieck

Extrazelluläre Ableitung elektrisch erregbarer Zellen

Bastian Lieck

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4324
ISSN 0944-2952
Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN)
Bioelektronik (IBN-2)
Jül-4324

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
2 Theorie.....	2
2.1 Elektrisch erregbare Zellen.....	2
2.1.1 Membran-/Ruhepotenzial.....	2
2.1.2 Das Aktionspotenzial.....	4
2.2 Elektrische Messmethoden.....	6
2.2.1 Impedanz.....	6
2.2.2 Lock-In Verstärker.....	7
3 Extrazelluläre Ableitung elektrisch erregbarer Zellen.....	10
3.1 Multielektrodenarray.....	10
3.2 MEA Verstärkersystem.....	12
3.3 BioMAS.....	13
3.3.1 MEA Headstage und Head.....	13
3.3.2 Hauptverstärker.....	14
3.3.3 Software.....	15
3.4 Chipaufbau.....	17
3.5 HL-1 Zellkultur.....	18
3.6 Reinigung der MEAs und Zellimmobilisierung.....	19
4 Experimentelles.....	21
4.1 Rauschmessung.....	21
4.1.1 Messaufbau und Durchführung.....	21
4.2 Lock-In Messung.....	22
4.2.1 Messaufbau und Durchführung.....	22
4.3 Impedanzmessung.....	23
4.3.1 Messaufbau und Durchführung.....	24
4.4 Zellmessung.....	24
4.4.1 Messaufbau Durchführung.....	25
5 Ergebnisse und Diskussion.....	26
5.1 Impedanzmessung.....	26
5.2 Rauschmessung.....	29

5.3	Lock-In Messung.....	31
5.4	Zellmessung.....	35
6	Zusammenfassung und Ausblick	39
7	Literaturverzeichnis	41
	Danksagung	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	(9) Vier Phasen des Aktionspotenzials einer Herzzelle. Bei Phase „4“ befindet sich die Zelle im nicht erregten Zustand. Phase „0“ stellt die Schwellspannung dar, bei der sich die Na ⁺ -Kanäle kurzzeitig öffnen und das Membranpotenzial ansteigt. Nach der Schließung der Na ⁺ -Kanäle öffnen sich die Ca ²⁺ -Kanäle und sorgen für einen overshoot (Phase „1“). Die Phase „2“ ist die so genannte Plateauphase in der weiter Kalzium-Ionen in die Zelle, allerdings auch Kalium-Ionen aus der Zelle strömen. Phase „3“ ist die die Repolarisationsphase, bei der die Zelle wieder in den nicht erregten Zustand zurückgeführt wird (Phase „4“).	5
Abbildung 2.2	(11) Darstellung der Impedanz Z mit Real- und Imaginärteilkomponenten R und X und dem Phasenwinkel φ	7
Abbildung 2.3	(13) Schematischer Aufbau eines Lock-In Verstärkers. Herzstück des Verstärkers ist der phasenempfindliche Detektor (PED), in dem Mess- und Referenzsignal zusammengeführt werden.	8
Abbildung 2.4	(14) Entwicklung des Ausgangssignals aus der Multiplikation eines sinusförmigen Messsignals („signal“) mit einem Rechteck-Referenzsignal („reference“). Daraus ergibt sich für das Ausgangssignal („switch output“) des PED ein moduliertes Signal, das durch den nachfolgenden Tiefpassfilter in einen Gleichstrom über geht... ..	9
Abbildung 3.1	(16) Aufbau eines MEA Chips in drei Vergrößerungsstufen. Bild a) Der gesamte Chip, so wie er in die Headstage eingespannt wird. Bild b) Elektrodenarray aus 8x8 Goldelektroden mit den jeweiligen Leiterbahnen. Bild c) Eine einzelne Goldelektrode mit einem Durchmesser von 20 μm	11
Abbildung 3.2	Bild a): Headstage des MEA Verstärkersystems mit Chiphalterung „1“ und Halterung zur Fixierung der Headstage „2“ am Stativ. Bild b): Komponenten des Hauptverstärkers des MEA Verstärkersystems mit Stromversorgung „1“ und Hauptverstärker „2“.	12
Abbildung 3.3	Bild a): BioMAS MEA Headstage mit dem Head im oberen Einschub. Bild b): Head des BioMAS Messsystems, in den der MEA Chip eingesetzt wird.....	14
Abbildung 3.4	Vorderseite des BioMAS Hauptverstärkers mit externe Stromversorgung „5“. Über vier „MainAmpSWI OUTPUT“ Anschlüsse „3“ können Signale am Hauptverstärker und über zwei „HSswi OUTPUT“ Anschlüsse „4“ Signale an der Headstage abgegriffen werden. Die Stromversorgung und Kontrolle der Headstage erfolgt über den Anschluss „Steering Headstage“ „1“. Der darunter liegende Anschluss „Input Headstage“ „2“ ermöglicht die Datenübertragung von der Headstage zum Hauptverstärker.....	15
Abbildung 3.5	Benutzeroberfläche der BioMAS Software „MEA64“.....	16
Abbildung 3.6	Bild a): Apparatur zum Auftragen des Silberleitklebers. Der Carrier wird in die Kunststoffhalterung „1“ gelegt und mit Hilfe des Mikroskops „4“ unter der Folie „2“ platziert. Diese dient als Schablone für das Auftragen des Klebers. In der Folie sind, exakt in der Anordnung der Bondpads auf dem Carrier, Löcher durch die der Silberleitkleber mit dem Rakel „3“ gedrückt wird. Im nächsten Schritt werden Carrier und Chip mit Hilfe des Fine-Placers, Bild b), zusammengefügt.	17
Abbildung 3.7	HL-1 Zellen, gewachsen auf einem „Standard“ Gold MEA.	20

Abbildung 4.1	Schematische Darstellung des Messaufbaus für die Lock-In Messung.	22
Abbildung 4.2	Benutzeroberfläche des LabView Programms mit den für die Durchführung der Lock-In und Impedanzmessung (Kapitel 4.2 und 4.3) verwendeten Parametereinstellungen. Über „Amplitude in V“ lässt sich die Amplitude des Eingangssignals festlegen (4 mV). „Start freq.“ und „Stop freq.“ geben den Frequenzbereich an, über den gemessen wird (1 Hz-10.000 Hz). Über „Nth AGain“ wird festgelegt, wie oft die einzelnen Frequenzen auf den Chip gegeben werden sollen (6 Mal).	23
Abbildung 4.3	Ersatz des Heads für das BioMAS Messsystem bei der Impedanzmessung. Auf der Platine sind die Steckplätze für den Widerstand aufgelötet „1“.....	24
Abbildung 5.1	Schaltbild des Messaufbaus für die Impedanzmessung. RTEST ist der 100 MΩ Testwiderstand, über den gemessen wurde, ZIMP die Eingangsimpedanz des Verstärkers, U ₀ das Eingangssignal und U _i das gemessene Ausgangssignal.....	26
Abbildung 5.2	Ergebnisse der Impedanzmessung für das MEA Verstärkersystem. Gemessen wurden drei Kanäle über eine Frequenz von 1 Hz bis 10 kHz. Aufgetragen ist die Impedanz über der Frequenz.	27
Abbildung 5.3	Ergebnisse der Impedanzmessung für das BioMAS Messsystem. Gemessen wurden drei Kanäle über eine Frequenz von 1 Hz bis 10 kHz. Aufgetragen ist die Impedanz über der Frequenz.	28
Abbildung 5.4	Gegenüberstellung der gemittelten Werte der drei Kanäle des MEA Verstärkersystems und des BioMAS Messsystems.	28
Abbildung 5.5	Ergebnisse der Rauschmessung für das MEA Verstärkersystem. Gemessen wurden drei Kanäle des Chips (siehe Legende). Aufgetragen ist die Signalstärke in Volt auf der Ordinate und die Frequenz in Herz auf der Abszisse.	30
Abbildung 5.6	Ergebnisse der Rauschmessung für das BioMAS Messsystem. Gemessen wurden drei Kanäle (siehe Legende) eines Chips und die Werte der Kanäle übereinander geplottet. Auf der Ordinate ist die Signalstärke in Volt und auf der Abszisse die Frequenz in Herz zu finden.	31
Abbildung 5.7	Ergebnisse der Lock-In Messung ohne Chip. Auf der Abszisse ist logarithmisch der Frequenzbereich dargestellt über den gemessen wurde, die Ordinate gibt den Verstärkungsfaktor an, der erreicht wurde.....	32
Abbildung 5.8	Übersicht der Ergebnisse der Lock-In Messung für das BioMAS Messsystem, für MEAs mit den Elektroden durchmessern 8 μm, 10 μm und 15 μm.	33
Abbildung 5.9	Ergebnisse der Lock-In Messung für die 50 μm IrOx MEAs	34
Abbildung 5.10	Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Elektrodengröße.....	34
Abbildung 5.11	Aktionspotenziale von HL-1 Zellen, gemessen mit dem BioMAS Messsystem, Bild a) und dem MEA Verstärkersystem, Bild b) auf jeweils den gleichen Chips und Kanälen.	36
Abbildung 5.12	Drei Aktionspotenziale von HL-1 Zellen mit der typischen Signalfom. Bei „1“ findet der schnelle Natriumeinstrom in die Zelle statt und die Zelle depolarisiert. Bei „2“ folgt ein langsamer Ca ²⁺ -Einstrom in die Zelle und sorgt für einen weiteren Anstieg des Potentials bis zum overshoot „3“ Bei „4“ findet der repolarisierende K ⁺ -Ausstrom aus der Zelle statt.....	37
Abbildung 5.13	Ableitung von Zellsignalen nach der Zugabe von 5 μl Adrenalin in das Zellmedium. .	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Konzentration und Verhältnis verschiedener Ionen im Intra- und Extrazellulärraum (5).....	3
Tabelle 3.1	In den Experimenten verwendete MEA Chips.....	10
Tabelle 5.1	Messergebnisse der Lock-In Messung für die verschiedenen MEAs (Elektrodenanordnung- Beschichtung- Elektrodendurchmesser) mit der mittleren maximalen Frequenz („FreqMaxMean“) und der mittleren Verstärkung („Mean Amp“)......	32
Tabelle 5.2	Messergebnisse der Zellmessung für BioMAS und den MEA Verstärker.....	36
Tabelle 5.3	Vergleich der Signalstärke und Frequenz mit und ohne Zugabe von Adrenalin.	37

1 Einleitung

Die Grundlagen für die extrazelluläre Ableitung von Zellsignalen wurden im Jahre 1972 gelegt, als es C.A. Thomas, Jr. und seinem Team erstmalig gelang, in vitro Zellsignale von Herzzellen mit Hilfe eines Mikroelektrodenarrays zu visualisieren (1).

Knapp 20 Jahre später, Anfang der neunziger Jahre, gelang es Peter Fromherz und seinem Team erstmals, die Veränderung des elektrischen Feldes einer Zelle mit Hilfe von Feldeffekttransistoren zu messen (2). Seitdem ist die Forschung im Bereich der Bioelektronik weit vorangeschritten und bietet der klinischen Diagnostik und der Prothetik immer neue Möglichkeiten. Ein Beispiel, das den Fortschritt der Forschung zeigt ist, dass es erstmals gelungen ist, einen Blinden wieder sehen zu lassen, indem ein Chip im Auge des Patienten die Aufgaben der Sehsinneszellen übernimmt (3). Diese Kombination aus biologischen und elektronischen Komponenten ist eine enorme Herausforderung, der man sich am Institut für Bio- und Nanosysteme im Forschungszentrum Jülich stellt.

In verschiedenen Arbeitsgruppen wird versucht, immer neue Möglichkeiten zu finden, um bioelektronische Systeme zu entwickeln. Die Kombination reicht dabei von einzelnen Biomolekülen, über Zellen bis hin zu ganzen Organismen, die mit elektronischen Bauteilen gekoppelt werden. Die neuesten Entwicklungen sind dabei mikroelektronische Bauelemente zur Stimulation und Ableitung von Neuronen (Mi-BeSAN). Diese Chips kombinieren die Vorteile von Multielektrodenarrays (MEA) und Feldeffekttransistoren (FET) in einem Chip. Dadurch lassen sich sowohl Zellen extrazellulär stimulieren als auch die Signale mit Hilfe der FETs ableiten. Diese Kombination aus Feldeffekttransistoren und Elektroden ist eine enorme technische Herausforderung in Bezug auf die Herstellung der Chips. Um diese Chips aber auch in vollem Umfang nutzen zu können, wurde die Entwicklung neuer Hardware und Software notwendig.

In dieser Arbeit wird das neue Bioelectronic Multifunctional Amplifier System (BioMAS) vorgestellt (Kapitel 3.3) und ein Vergleich zum alten MEA-Chip-basierten Verstärkersystem (im Weiteren MEA Verstärkersystem) (Kapitel 3.2) gezogen. Dabei werden sowohl der Verstärker selbst, als auch die dazugehörigen Headstages und Software vorgestellt. In diversen Experimenten, die allerdings noch nicht mit den neuen Mi-BeSAN Chips, sondern mit MEAs durchgeführt wurden, fand der Test des Systems für Zellmessungen statt. Dabei wurden Zellsignale von HL-1 Zellen aufgezeichnet, von Zellen also, deren phänotypische Eigenschaften denen von Herzzellen ähneln.

Vor der Durchführung der Zellmessungen wurden sowohl für das BioMAS System als auch für das MEA Verstärkersystem, Impedanz- und Rauschmessungen durchgeführt, um die Elektronik zu überprüfen und einen Vergleich in Sachen Signalqualität herzustellen.

2 Theorie

In diesem Kapitel sollen zunächst die theoretischen Grundlagen für die in dieser Arbeit ausgeführten Themen gelegt werden. Zu Beginn werden die Vorgänge an elektrisch erregbaren Zellen im Ruhezustand und im erregten Zustand beschrieben. Im Anschluss daran wird im Hinblick auf die durchgeführten Impedanzmessungen (Kapitel 4.3) erklärt, worum es sich bei der Impedanz handelt. Den Abschluss bildet die Beschreibung des Aufbaus und des Prinzips des Lock-In Verstärkers.

2.1 Elektrisch erregbare Zellen

An allen Zellen liegt ein Membranpotenzial an, jedoch sind ausschließlich Nerven- und Muskelzellen in der Lage, ihr Membranpotenzial aktiv zu verändern. Deshalb werden sie als elektrisch erregbar bezeichnet (4). Die Eigenschaft der elektrischen Erregbarkeit dient unterschiedlichen Funktionen. Neuronen nehmen elektrische Impulse auf und leiten sie weiter. Für Muskelzellen ist eine elektrische Erregung hingegen ein Befehl zur Kontraktion. Im weiteren Verlauf wird nun auf die Zelle im Ruhezustand (Ruhepotenzial) und im gereizten Zustand (Aktionspotenzial) eingegangen und die Vorgänge, die dabei innerhalb und außerhalb der Zelle ablaufen, erläutert.

2.1.1 Membran-/Ruhepotenzial

Wie schon erwähnt, liegt an jeder Zelle ein Membranpotenzial an. Dieses ist zurückzuführen auf die unterschiedlichen Konzentrationen bestimmter Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle. Dabei enthält die intrazelluläre Flüssigkeit hauptsächlich Kalium-Ionen (K^+) und negativ geladene anorganische Ionen (A^-), die nicht durch die Membran diffundieren können. In weitaus geringeren Anteilen sind noch Natrium- (Na^+), Chlorid- (Cl^-) und Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) in der intrazellulären Flüssigkeit enthalten. In der extrazellulären Flüssigkeit hingegen befinden sich zum Großteil Natrium- und Chlorid-Ionen und eine geringe Anzahl Kalium- und Kalzium-Ionen (siehe Tabelle 2.1) (5). Die Zellmembran ist selektiv permeabel was bedeutet, dass sie nur für bestimmte Ionen passierbar ist. Durch spezielle Poren in der Zellmembran - den Ionen-Kanälen - können die Ionen zwischen Extra- und Intrazellulärraum hin und her „wandern“ (abhängig vom chemischen und elektrischen Gradienten, siehe unten). Dabei unterscheidet man zwischen spannungsabhängigen und spannungsunabhängigen Ionen-

Kanälen. Erstgenannte spielen vor allem beim Aktionspotenzial eine entscheidene Rolle (mehr dazu in Kapitel 2.1.2).

Tabelle 2.1 Konzentration und Verhältnis verschiedener Ionen im Intra- und Extrazellulärraum (5).

Ion	Ionenkonzentration		Verhältnis \cong
	Intrazellulär (mmol/l)	Extrazellulär (mmol/l)	
K^+	145	5,19	28:1
Na^+	9,81	140	1:14
Cl^-	10	120	1:12
Ca^{2+}	$1,17 \cdot 10^{-4}$	1,8	$15 \cdot 10^3:1$

Für das Ruhepotenzial sind zunächst nur die spannungsunabhängigen Kanäle von Interesse. Diese in der Membran sitzenden Kanäle sind selektiv permeabel und lassen entweder nur K^+ -Ionen, nur Na^+ -Ionen oder nur Cl^- -Ionen passieren. Die Leitfähigkeit der Membran für die genannten Ionen ist abhängig von der Anzahl ihrer Ionen-Kanäle (5). So ist beispielsweise die Anzahl der Kalium-Kanäle, im Gegensatz zu den Natrium- oder Chlorid-Kanälen, sehr hoch. Da, wie Tabelle 2.1 zeigt, außerhalb der Zelle eine geringere Konzentration an Kalium-Ionen herrscht als in der Zelle, können diese entlang des Konzentrationsgefälles (chemischer Gradient) aus der Zelle hinaus diffundieren. Die dafür verantwortliche Kraft heißt Diffusionskraft (F_{diff}). Allerdings gibt es auch eine Kraft, die der Diffusionskraft entgegenwirkt, nämlich die elektrische Kraft (F_{el}). Je mehr Kalium-Ionen nach außen diffundieren, umso negativer wird das Zellinnere und desto größer wird die Potenzialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Dies hat zur Folge, dass die elektrische Kraft nun überwiegt ($F_{el} > F_{diff}$) und die Kalium-Ionen wieder in die Zelle „hineingezogen“ werden (Diffusion entlang des elektrischen Gradienten). Somit sorgt das Zusammenspiel von Diffusions- und elektrischer Kraft für ein dynamisches Gleichgewicht von Kalium-Ionen ($F_{diff} = F_{el}$).

Die Zellmembran ist, wie zuvor erwähnt, aber nicht nur permeabel für Kalium-Ionen sondern auch zu einem geringen Teil für Natrium-Ionen. Dadurch kommt es zu einem zwar geringen, aber ständigen Einstrom von Natrium-Ionen, die sowohl dem elektrischen als auch dem chemischen Gradienten folgen (Intrazellulärraum ist negativ geladen und es sind nur wenige Natrium-Ionen enthalten). Würde diesem Einstrom nichts entgegengesetzt, würde dies zu einem Anstieg des Membranpotenzials führen und zu einem weiteren Ausstrom von Kalium-Ionen. Dies hätte zur Folge, dass der chemische Gradient nach und nach verschwinden würde. Dem entgegen wirkt die Natrium-Kalium-Pumpe, die ebenfalls in der Zellmembran sitzt und zur Aufrechterhaltung des Ruhepotenzials unter

Verbrauch von Energie, in Form von Adenosintriphosphat (ATP), Natrium-Ionen aus der Zelle und Kalium-Ionen in die Zelle pumpt (Verhältnis 3:2) (6).

Die Spannung des Ruhepotenzials ist zelltypabhängig und lässt sich über die Goldmanngleichung berechnen:

$$\frac{U}{V} = \frac{R \cdot T}{F} * \ln \frac{p_K * [K^+]_{\text{außen}} + p_{Na} [Na^+]_{\text{außen}} + p_{Cl} [Cl^-]_{\text{außen}}}{p_K * [K^+]_{\text{innen}} + p_{Na} [Na^+]_{\text{innen}} + p_{Cl} [Cl^-]_{\text{innen}}} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Für R gilt der Wert der allgemeinen Gaskonstanten ($R = 8,314 \frac{\text{J}}{\text{mol} * \text{K}}$) und für F der Wert der Faradaykonstanten ($F = 96485,34 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$). Die Variable T steht für die absolute Temperatur, die in Kelvin angegeben wird. Die Permeabilitätskonstanten p_K , p_{Na} und p_{Cl} sind die Werte für die Permeabilität der Membran für Kalium- (K^+), Natrium- (Na^+) und Chlorid-Ionen (Cl^-).

Da beim Ruhepotenzial die Permeabilität für Natrium und Chlorid im Gegensatz zu Kalium sehr gering ist, kann für die Permeabilitätskonstanten p_{Cl} und p_{Na} der Einfachheit halber der Wert Null angenommen werden. Daraus ergibt sich dann für das Membranpotenzial U folgende Gleichung:

$$U = \frac{R \cdot T}{F} * \ln \frac{[K^+]_{\text{außen}}}{[K^+]_{\text{innen}}} \quad [\text{V}] \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Durch Einsetzen der Werte von R, T, F und der Ionenkonzentration von Kalium innerhalb und außerhalb der Zelle (siehe Tabelle 2.1) ergibt sich für U ein Wert von ca. -90 mV.

2.1.2 Das Aktionspotenzial

Nachdem erläutert wurde, welche Prozesse bei der Zelle im Ruhezustand ablaufen, wird nun auf die Zelle im erregten Zustand eingegangen. Da bei den für diese Arbeit durchgeführten Zellmessungen Zellen verwendet wurden, deren phänotypische Eigenschaften denen von adulten Myokardzellen gleichen (7), wird hier speziell auf das Aktionspotenzial von Herzmuskelzellen eingegangen.

Der Herzschlag ist in zwei Phasen unterteilt. Während der Systole kontrahieren die Herzmuskelzellen und pumpen so das Blut aus dem Herzen hinaus. Während der Diastole entspannen sich die Muskelzellen und die Herzkammern füllen sich wieder mit Blut. Damit dieser Ablauf rhythmisch erfolgen kann, gibt es so genannte Schrittmacherzellen. Diese Zellen sind autonom erregbar und erzeugen in regelmäßigen Abständen Aktionspotenziale, die entsprechend der Erregungsleitung des Herzens die nachfolgenden Zellen stimulieren (8). Der Ablauf der Aktionspotenziale lässt sich in vier Phasen ein-

teilen (9) und ist in Abbildung 2.1 dargestellt. In Phase 4 befinden sich die Zellen in einem nicht erregten Zustand, das Ruhepotenzial liegt an (siehe Kapitel.2.1.1). Die Membran besitzt, neben den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen spannungsunabhängigen Kanälen, auch spannungsabhängige Kanäle. Bei Herzmuskelzellen sind dies die Natrium- und Kalzium-Kanäle.

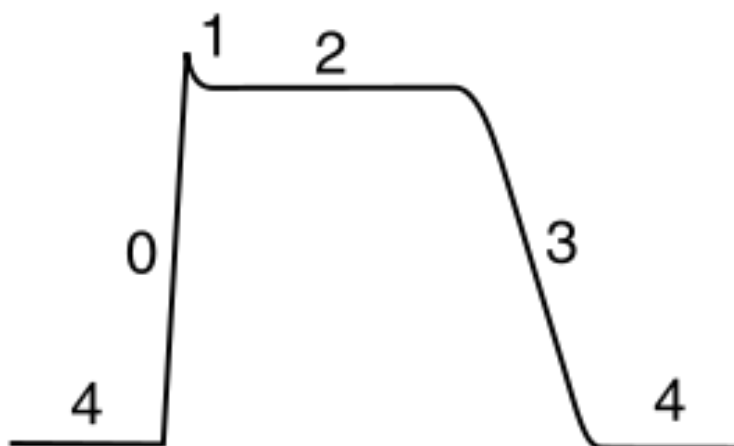


Abbildung 2.1 Vier Phasen des Aktionspotenzials einer Herzzelle. Bei Phase „4“ befindet sich die Zelle im nicht erregten Zustand. Phase „0“ stellt die Schwellenspannung dar, bei der sich die Na^+ -Kanäle kurzzeitig öffnen und das Membranpotenzial ansteigt. Nach der Schließung der Na^+ -Kanäle öffnen sich die Ca^{2+} -Kanäle und sorgen für einen overshoot (Phase „1“). Die Phase „2“ ist die so genannte Plateauphase in der weiter Kalzium-Ionen in die Zelle, allerdings auch Kalium-Ionen aus der Zelle strömen. Phase „3“ ist die die Repolarisationsphase, bei der die Zelle wieder in den nicht erregten Zustand zurückgeführt wird (Phase „4“) (9).

Befindet sich die Zelle im Ruhezustand, liegt also das Membranpotenzial bei ca. -90 mV, so werden bei einem ankommenden Reiz die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle geöffnet und Natrium strömt in die Zelle hinein (Phase „0“). Die Kanäle sind allerdings nur einige Millisekunden geöffnet und schließen dann wieder. Mit der Schließung der Natrium-Kanäle beginnt Phase „1“, in der die Kalzium-Kanäle öffnen, Kalzium in die Zelle strömt und das Membranpotenzial weiter ansteigt. Dies führt zu einem so genannten „overshoot“ (Peak siehe Abbildung 1)). Parallel zu den Kalzium-Kanälen öffnen auch Kalium- und Chlorid-Kanäle, wodurch Kalium- und Chlorid-Ionen aus der Zelle hinausströmen und im Zusammenspiel mit dem Kalziueinstrom für die Plateauphase sorgen, in der das Membranpotenzial konstant bleibt (Phase „2“). Am Ende dieser Phase schließen die Kalzium-Kanäle wieder, wohingegen die Kalium-Kanäle noch geöffnet bleiben (Phase „3“), bis das Ruhepotenzial wieder erreicht ist (9). Jetzt sorgt erneut die Na^+/K^+ -Pumpe, wie in Kapitel. 2.1.1 beschrieben, für die richtigen Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle.

2.2 Elektrische Messmethoden

In diesem Kapitel werden die theoretischen Hintergründe für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erläutert. Dabei wird zunächst erklärt, worum es sich bei der Impedanz elektronischer Bauteile handelt und wie diese mathematisch zu betrachten ist. Der zweite Teil dieses Kapitels gibt Aufschluss über die Funktionsweise des Lock-In Verstärkers. Dabei wird auf den Aufbau des Verstärkers eingegangen und die Funktion der einzelnen Elemente erläutert.

2.2.1 Impedanz

Die Impedanz oder der Scheinwiderstand \underline{Z} ist grundsätzlich betrachtet ein elektrischer Widerstand und wird, wie ein ohmscher Widerstand R , mit der Einheit Ohm (Ω) angegeben (10):

$$R = \frac{U}{I} [\Omega] \quad (\text{Gl. 2.3a}) \qquad \underline{Z} = \frac{\underline{U}(t)}{\underline{I}(t)} [\Omega] \quad (\text{Gl. 2.3b})$$

Der Unterschied zum reinen ohmschen Widerstand liegt allerdings darin, dass der Scheinwiderstand frequenzabhängig ist, also mit einer Änderung der Frequenz auch eine Widerstandsänderung einhergeht. Die Impedanz \underline{Z} setzt sich aus einem reinen ohmschen Widerstand R und einem Blindwiderstand X zusammen und wird meist als komplexe Funktion angegeben:

$$\underline{Z} = R + iX \qquad (\text{Gl. 2.4})$$

Dabei steht der ohmsche Widerstand R für den Realteil und der Blindwiderstand X für den Imaginärteil (siehe Abbildung 2.2).

Wie Gleichung 2.3b zeigt, gibt die Impedanz das Verhältnis der komplexen Wechselspannung $\underline{U}(t)$ zum komplexen Wechselstrom $\underline{I}(t)$ an. Betrachtet man Gleichung 2.4 in einer anderen komplexen Darstellungsweise, zeigt sich, dass auch die Phasenverschiebung φ zwischen Wechselspannung und Wechselstrom durch die Impedanz angegeben wird:

$$\underline{Z} = |\underline{Z}| * e^{i\varphi} \qquad \text{mit } -90^\circ < \varphi < +90^\circ \qquad (\text{Gl. 2.5})$$

Hierbei ist $|\underline{Z}|$ der Betrag des Scheinwiderstandes und lässt sich über die komplexe Addition von Ohm'schen- und Blindwiderstand berechnen:

$$|\underline{Z}| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

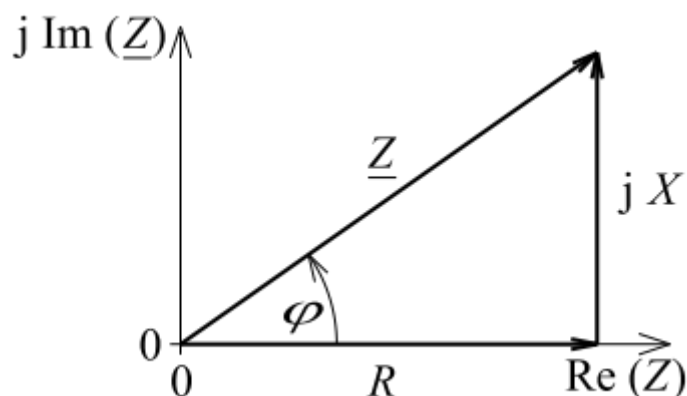


Abbildung 2.2 Darstellung der Impedanz \underline{Z} mit Real- und Imaginärteilkomponenten R und X und dem Phasenwinkel φ (11).

2.2.2 Lock-In Verstärker

Lock-In Verstärker sind phasenempfindliche Messgeräte und stellen schmalbandige Bandpassfilter dar, mit deren Hilfe sich selbst sehr kleine Wechselstrom-Signale (bis in den Nanovoltbereich) messen lassen (12). Bei solch kleinen Signalen ist es häufig schwer, ohne die richtigen Messgeräte aussagekräftige Messwerte zu erhalten, da das Signal von Störsignalen (Rauschen) überlagert wird. Bei Messungen kommt es aber immer darauf an, ein möglichst hohes „Signal-Rausch-Verhältnis“ (SNR) zu bekommen, was bedeutet, dass das Nutzsignal gegenüber dem Rauschsignal immer möglichst groß sein soll. Um dieses Verhältnis zu verbessern, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Möglichkeit beispielsweise, besteht darin, den Messaufbau möglichst gut gegen Störquellen abzuschirmen. Dazu eignet sich das Arbeiten im so genannten Faraday'schen Käfig, der vor elektromagnetischen Wellen abschirmt. Reichen die Mittel jedoch nicht aus, um den Messaufbau genügend vor Störquellen zu schützen, kann das SNR durch phasenempfindliche Messgeräte verbessert werden. Genau so ein Messgerät ist der Lock-In Verstärker. Er ermöglicht das Erfassen solch kleiner Signale durch gezieltes Filtern von Störsignalen.

Mathematisch gesehen ist die Filtermethode des Lock-In Verstärkers eine Hin- und Rücktransformation einer Fourierreihe. Deshalb ist es auch nur möglich, periodische Signale mit einer festen

Phasenbeziehung zu verarbeiten (12). Anhand von Abbildung 2.3 lässt sich der Verlauf der Signale im Lock-In Verstärker verfolgen. Zunächst gelangt das Messsignal über den Eingang des Lock-In Verstärkers zu einem Vorverstärker, der sowohl das Nutzsignal als auch das Rauschsignal verstärkt. Anschließend wird das Signal durch einen Bandpassfilter geleitet, der nur die Frequenzbereiche des Nutzsignals passieren lässt und somit für eine Verbesserung des SNR sorgt. Durch Phasenschieber, phasempfindlichen Detektor (PED) und nachgeschaltetem Tiefpassfilter wird das eigentliche Prinzip des Lock-In Verstärkers realisiert.

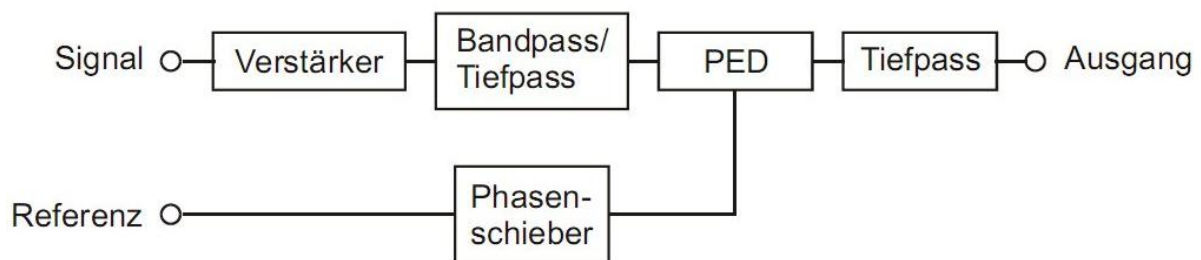


Abbildung 2.3 Schematischer Aufbau eines Lock-In Verstärkers. Herzstück des Verstärkers ist der phasempfindliche Detektor (PED), in dem Mess- und Referenzsignal zusammengeführt werden (13).

In Abbildung 2.4 ist die Entwicklung des Signals im Lock-In Verstärker dargestellt. Das Messsignal („signal“) ist als Sinusschwingung mit der Amplitude V und der Frequenz ω angegeben und kann über die Gleichung (Gl. 2.7) beschrieben werden (14).

$$S = V \sin(\omega t) \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Das dargestellte Rechtecksignal ist das Referenzsignal („reference“) und kann als Fourierreihe dargestellt werden (Gl. 2.8).

$$REF = \frac{4}{\pi} \left(\sin(\omega t) + \frac{1}{3} \sin(3\omega t) + \frac{1}{5} \sin(5\omega t) + \dots \right) \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Im PED werden nun Messsignal S und Referenzsignal REF miteinander multipliziert („switch output“) und es ergibt sich folgende Gleichung:

$$S * REF = \frac{2}{\pi} \left(1 - \frac{2}{3} \cos(2\omega t) - \frac{2}{15} \cos(4\omega t) - \frac{2}{35} \cos(6\omega t) - \dots \right) \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Zu sehen ist jetzt, dass sich durch die Multiplikation von Referenz- und Messsignal ein Produkt gebildet hat, das alle geraden Harmonischen der Grundfrequenz ω enthält (2,4,6,...). Passiert das Signal nun den Tiefpassfilter, werden die Harmonischen herausgefiltert und es bleibt ein Gleichstromsignal übrig (Gl. 2.10), das proportional zur Signalamplitude ist.

$$S_{\text{OUT}} = \frac{2}{\pi} V \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Analog zu dieser Herleitung funktioniert auch die Herleitung für die Phasenverschiebung zwischen Mess- und Referenzsignal. Das Sinussignal wird nun durch die Phase φ erweitert, woraus sich folgende Gleichung für das Messsignal ergibt:

$$S = V \sin(\omega t + \varphi) \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Über eine Multiplikation mit dem Referenzsignal ergibt sich dann für das Gleichstrom-Ausgangssignal:

$$S_{\text{OUT}} = \frac{2}{\pi} V \cos \varphi \quad (\text{Gl. 2.12})$$

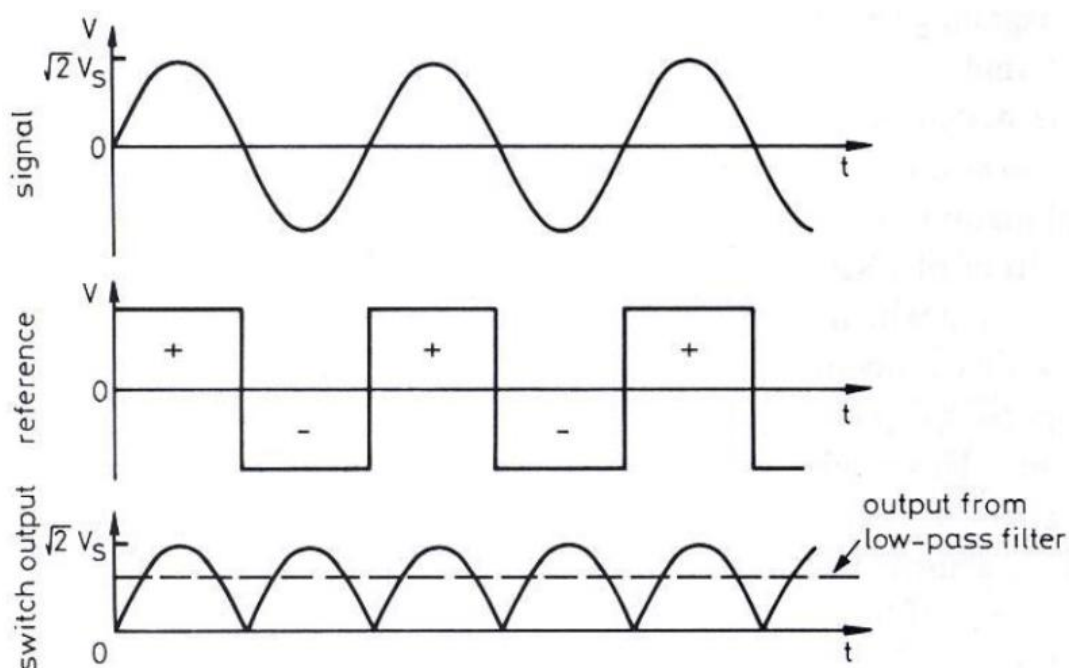


Abbildung 2.4 Entwicklung des Ausgangssignals aus der Multiplikation eines sinusförmigen Messsignals („signal“) mit einem Rechteck-Referenzsignal („reference“). Daraus ergibt sich für das Ausgangssignal („switch output“) des PED ein modulierte Signal, das durch den nachfolgenden Tiefpassfilter in einen Gleichstrom über geht (14).

3 Extrazelluläre Ableitung elektrisch erregbarer Zellen

In diesem Kapitel wird zunächst auf die in den Experimenten verwendeten MEAs eingegangen und deren Aufbau beschrieben. Anschließend erfolgt die Vorstellung der Messsysteme, mit denen bei der Durchführung der Experimente gearbeitet wurde, nämlich das MEA Verstärkersystem und das BioMAS Messsystem. Im Anschluss daran wird erläutert, mit welchen Zellen gemessen wurde, wie sie kultiviert und auf die Chips gebracht wurden.

3.1 Multielektrodenarray

Multielektrodenarrays (MEAs) sind spezielle Chips mit einer Vielzahl an Elektroden; sie dienen als Schnittstelle zwischen Zellen und der Elektronik. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, liegt an Zellmembranen ein gewisses Potenzial an, das je nach Zustand der Zelle (erregt oder in Ruhe) variiert. Das Grundprinzip der Messung solcher Zellsignale mittels Sensorchip beruht auf den Ionenströmen und einem damit verbundenen Potenzialabfall im Spalt zwischen Zellmembran und Elektrode (15).

Die für diese Arbeit verwendeten MEAs sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Alle Chips besitzen 64 Elektroden, die in einem 8x8 Array angeordnet sind, allerdings gibt es Unterschiede in der Anordnung der Leiterbahnen. Bei den „Cross MEAs“ verlaufen die Leiterbahnen der Elektroden wie ein Kreuz über den Chip. Dabei liegen die Leiterbahnen dicht beieinander (siehe Abbildung 3.1 b).

Tabelle 3.1 In den Experimenten verwendete MEA Chips.

Elektrodengröße in μm	Anordnung der Elektroden	Beschichtung der Elektroden
8	Cross	Gold
8	Star	Gold
10	Star	Gold
15	Star	Gold
50	Star	IrOx

Bei den „Star MEAs“ verlaufen die Leiterbahnen sternförmig von außen nach innen und haben somit den größtmöglichen Abstand voneinander. In Bezug auf die Elektrodengröße wurden MEAs mit einem Elektrodendurchmesser von 8 μm , 10 μm , 15 μm und 50 μm verwendet; Unterschiede bestanden jedoch in der Beschichtung der Elektroden. Die „Standard“ Gold-Elektroden sind planare

Elektroden und besitzen keine Beschichtung. Sie weisen eine hohe mechanische und chemische Stabilität auf und zeigen eine gute Biokompatibilität. Nachteilig ist jedoch, dass durch die fehlende Beschichtung der Elektrode der Spalt zwischen Elektrode und Zelle sehr groß ist. Bemerkbar macht sich das dadurch, dass das SNR kleiner ist als bei den beschichteten Elektroden (16).

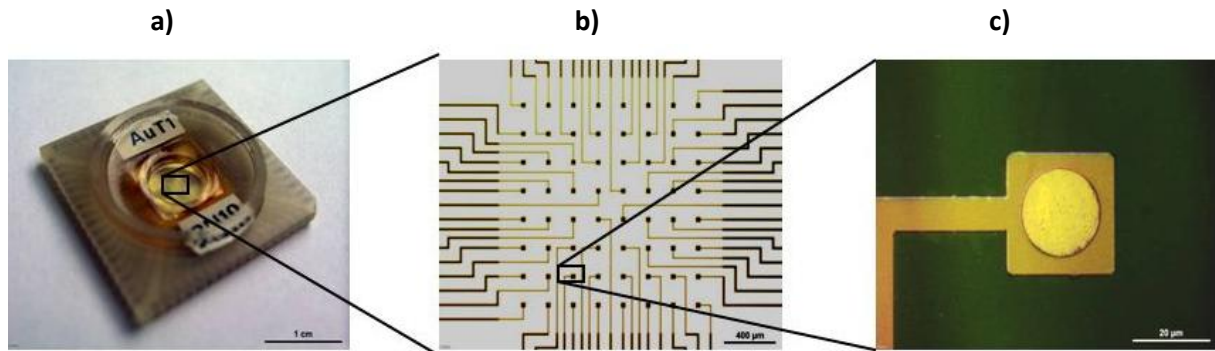


Abbildung 3.1 Aufbau eines MEA Chips in drei Vergrößerungsstufen. Bild a) Der gesamte Chip, so wie er in die Headstage eingespannt wird. Bild b) Elektrodenarray aus 8x8 Goldelektroden mit den jeweiligen Leiterbahnen. Bild c) Eine einzelne Goldelektrode mit einem Durchmesser von 20 µm (16).

Bei den Iridiumoxid-Elektroden hingegen wurde auf die Goldelektrode eine Schicht Iridiumoxid (IrOx) aufgetragen, um die Oberfläche der einzelnen Elektroden weiter zu vergrößern. Dadurch erreicht man eine geringere Impedanz und höhere Kapazität, weshalb sich beschichtete Chips besonders gut zum Messen von kleinen Signalen eignen (16).

Der Aufbau der MEAs ist im Prinzip bei den „Standard“ Gold-Elektroden und IrOx MEAs gleich. Die Grundlage der Chips bildet ein Silizium-Wafer, auf den in verschiedenen lithografischen Prozessen die einzelnen Schichten aufgetragen werden. Zunächst wird eine 30 nm dicke Schicht Titan aufgedampft, um eine bessere Haftung der nachfolgenden Schicht zu gewährleisten. Auf die Titanschicht werden dann, mit einer Dicke von ca. 300 nm, die Goldelektroden und Leiterbahnen aufgebracht. Als Passivierung dienen eine ca. 500 nm dicke Schicht aus Siliziumdioxid (SiO_2) und eine ca. 500 nm dicke Schicht aus Siliziumnitrid (Si_3N_4) (17). Der Unterschied zwischen den „Standard“ Gold MEAs und den IrOx MEAs besteht nun darin, dass bei den IrOx MEAs auf die Goldelektroden zunächst eine Schicht Platin aufgebracht wird, auf die dann in einem weiteren Schritt das IrOx aufgebracht wird, um die Oberfläche der Elektrode weiter zu vergrößern. Des Weiteren besteht die Passivierungsschicht der IrOx MEAs aus jeweils drei, abwechselnd aufgetragenen Schichten aus SiO_2 und Si_3N_4 . Dabei betragen die Schichtdicken für SiO_2 100 nm (die oberste Schicht ist 200 nm) und für Si_3N_4 150 nm (18).

3.2 MEA Verstärkersystem

Das MEA Verstärkersystem ist das aktuelle Messsystem für elektrophysiologische Messungen und eignet sich für Messungen mit MEAs und FETs. Bestandteile des Messsystems sind die Headstage, der Hauptverstärker und die Stromversorgung (Abbildung 3.2). Die Headstage besitzt zwei D-SUB Buchsen an der Rückseite, über die die Verbindung zum Hauptverstärker hergestellt wird. Für eine direkte Erdung der Referenzelektrode befindet sich auf der Verschlusskappe ein Steckplatz. Über eine eigens für die Headstage hergestellte Halterung ist es möglich, sie für Messungen fest an einem Stativ zu fixieren. Die Headstage ist in sich geschlossen und die Chiphalterung nicht entfernbar, sodass bei Beschädigungen, beispielsweise durch Kurzschlüsse, die Headstage in einem aufwändigen Verfahren repariert werden muss.

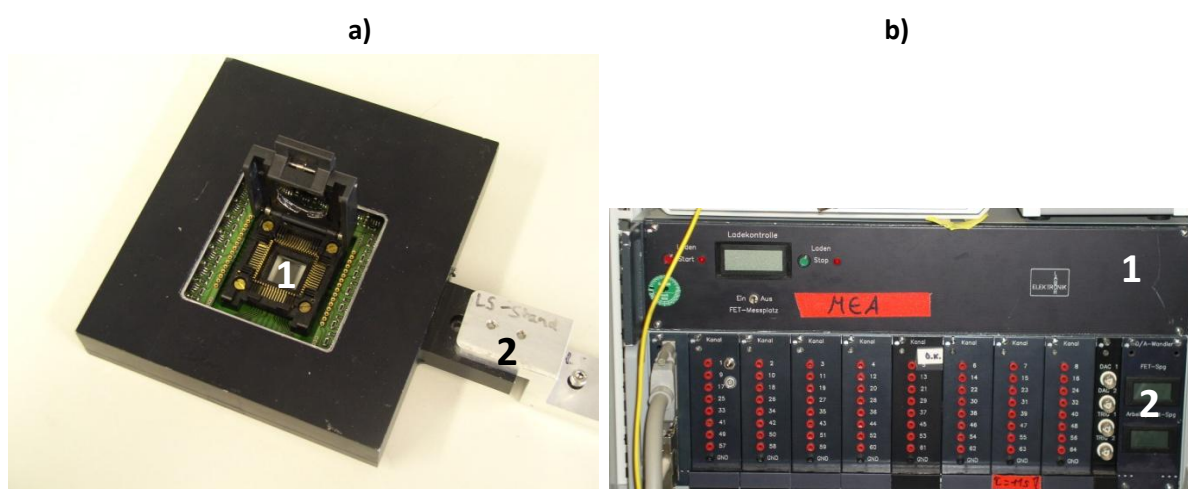


Abbildung 3.2 Bild a): Headstage des MEA Verstärkersystems mit Chiphalterung „1“ und Halterung zur Fixierung der Headstage „2“ am Stativ. Bild b): Komponenten des Hauptverstärkers des MEA Verstärkersystems mit Stromversorgung „1“ und Hauptverstärker „2“.

Die Headstage ist der Vorverstärker des MEA Verstärkers und erzeugt eine 10-fache Verstärkung des Signals. Im Hauptverstärker integriert ist eine weitere 100-fache Verstärkung, sodass man eine Gesamtverstärkung von 1000 gegenüber dem Ausgangssignal erhält. In Abbildung 3.2 b) sind die beiden Elemente des Hautverstärkers dargestellt. Die untere Einheit („2“) beinhaltet die Anschlüsse zum Auslesen der 64 Kanäle, aufgeteilt auf acht Steckkarten mit jeweils acht Anschlüssen. Des Weiteren enthält die untere Einheit auch die Elektronik für die 100-fache Nachverstärkung des Signals. Auf der Rückseite befinden sich zwei 100 Pin SCSi (Small Computer System Interface) Anschlüsse, über die die Verbindung zur Data Acquisition (DAQ)-Karte des Computers hergestellt wird. Die Stromversorgung des Verstärkers erfolgt über die obere Einheit („1“). Über eine Tuchelstecker-Verbindung wird die untere mit der oberen Einheit verbunden und mit Strom versorgt. Wichtig ist, dass der MEA Verstärker bei Messungen geerdet ist, was über zwei Anschlüsse auf der Rückseite des

Verstärkers sichergestellt werden kann. Zur Datenaufnahme und Visualisierung der aktuellen Messung wird die Software Med64 verwendet. Hier lassen sich die Vorgänge an den einzelnen Elektroden in Echtzeit verfolgen und die Daten speichern. Dabei können einzelne Kanäle ausgewählt oder weggeschaltet werden und die Signale durch Veränderung der x-Achsen- oder y-Achsen-Auflösung bearbeitet werden.

3.3 BioMAS

In diesem Kapitel soll der Fokus auf das Anfang des Jahres im IBN-2 neu eingeführte Bioelectronic Multifunctional Amplifier System (BioMAS) gelegt werden. Die Motivation zur Entwicklung des neuen Verstärkersystems lag darin, die verschiedenen Verstärkersysteme für MEAs, FETs und mikroelektronische Bauelemente zur Stimulation und Ableitung von Neuronen (Mi-BeSAN) in einem Verstärker zu vereinen, um unnötige Verwirrungen durch verschiedene Software und daraus resultierenden Dateiformaten zu umgehen. Kurz gesagt, soll das BioMAS Messsystem die Experimente und Auswertungen so weit wie möglich vereinfachen, weshalb versucht wurde, so viele Funktionen wie möglich in einem Verstärkersystem und der dazugehörigen Software zu vereinen.

Das BioMAS Messsystem besteht aus einem Hauptverstärker mit eigener Stromversorgung und verschiedenen Vorverstärkerboxen (Headstages), die je nach Chiptyp (MEA, FET, Mi-BeSAN) verwendet werden und über zwei Kabel mit dem Hauptverstärker verbunden sind. Die Chiphalterung (Head) befindet sich auf einer Platine, die in den PCI-Port (Peripheral Component Interconnect) der Headstage hineingeschoben wird und leicht wieder zu entfernen ist. Der Hauptverstärker ist sowohl an einen USB-Port, zur Bedienung mit der Software, als auch an eine DAQ-Karte, zur Aufnahme der Daten angeschlossen.

3.3.1 MEA Headstage und Head

Die MEA Headstage ist in Abbildung 3.3 dargestellt und hat an der Vorderseite zwei PCI-Ports, an die die verschiedenen Heads angeschlossen werden können. An der Rückseite der Headstage befinden sich zwei D-Sub-Buchsen über die die Headstage mit dem Hauptverstärker verbunden ist. In Abbildung 3.3 ist der Standardhead für das BioMAS Messsystem dargestellt. Die Heads sind variabel einsetzbar und mit jeder BioMAS Headstage kombinierbar. Die Verbindung von Head und Headstage erfolgt, wie schon erwähnt, über einen PCI-Anschluss. Der Head enthält neben 64 Goldkontakten, die die Verbindung zwischen Chip und Head herstellen, noch zwei gesonderte Anschlüsse für die

Referenzelektrode. Die Anschlüsse befinden sich neben der Verschlussklappe, die für die Fixierung des Chips auf dem Head sorgt. Der eine Anschluss dient der Erdung der Referenzelektrode und wird beispielsweise bei der Ableitung von Zellsignalen verwendet. Über den zweiten Anschluss ist es möglich, externe Signale über die Referenzelektrode in den Elektrolyten zu leiten.



Abbildung 3.3 Bild a): BioMAS MEA Headstage mit dem Head im oberen Einschub. Bild b): Head des BioMAS Messsystems, in den der MEA Chip eingesetzt wird.

Um das Arbeiten sowohl mit aufrechten als auch mit invertierenden Mikroskopen zu ermöglichen, ist eine Aussparung in der Chiphalterung vorhanden. Eine weitere Neuerung ist das Heizkissen, das so in den Head integriert ist, dass der eingesetzte Chip immer ein Kontakt zu dem Kissen hat. Dieses kann über die Software gesteuert werden und dient der Temperierung des Chips, um bei Zellmessungen optimale Temperaturbedingungen zu gewährleisten.

3.3.2 Hauptverstärker

In Abbildung 3.4 ist die Vorderseite des BioMAS Hauptverstärkers dargestellt. Über zwei D-Sub-Buchsen (Steering Headstage und Input Headstage) wird die Verbindung zwischen Hauptverstärker und Headstage hergestellt. Dabei dient die 25 Pin D-Sub-Buchse (Steering Headstage) der Stromversorgung und der Steuerung der Kontroll-LEDs für die Headstage, die darunterliegende 78 Pin D-Sub-Buchse (Input Headstage) zur Datenübertragung von der Headstage zum Hauptverstärker. Des Weiteren befinden sich am Hauptverstärker vier Koaxialkabel-Anschlüsse (MainAmpSWI OUTPUT 1-4), über die mittels Software (MEA64) jeder der 64 Kanäle vom Hauptverstärker ausgelesen werden kann. Über die daneben liegenden Koaxialkabelanschlüsse (HSwi OUTPUT 1-2) kann ebenfalls jeder der 64 Kanäle ausgelesen werden, allerdings wird hier das Signal an der Headstage abgegriffen, es findet also keine 100-fache Hauptverstärkung des Signals mehr statt. An der Rückseite des BioMAS

Hauptverstärkers befinden sich noch der USB-Anschluss für die Verbindung des Verstärkers mit dem Computer, ein 100 Pin SCSI-Anschluss für die Verbindung mit der DAQ-Karte und ein Anschluss (Tuchelstecker) für die Stromversorgung (Power). Es sei darauf hingewiesen, dass in diesem Abschnitt nur auf Anschlüsse eingegangen wurde, die im Laufe der Experimente für diese Arbeit verwendet wurden.

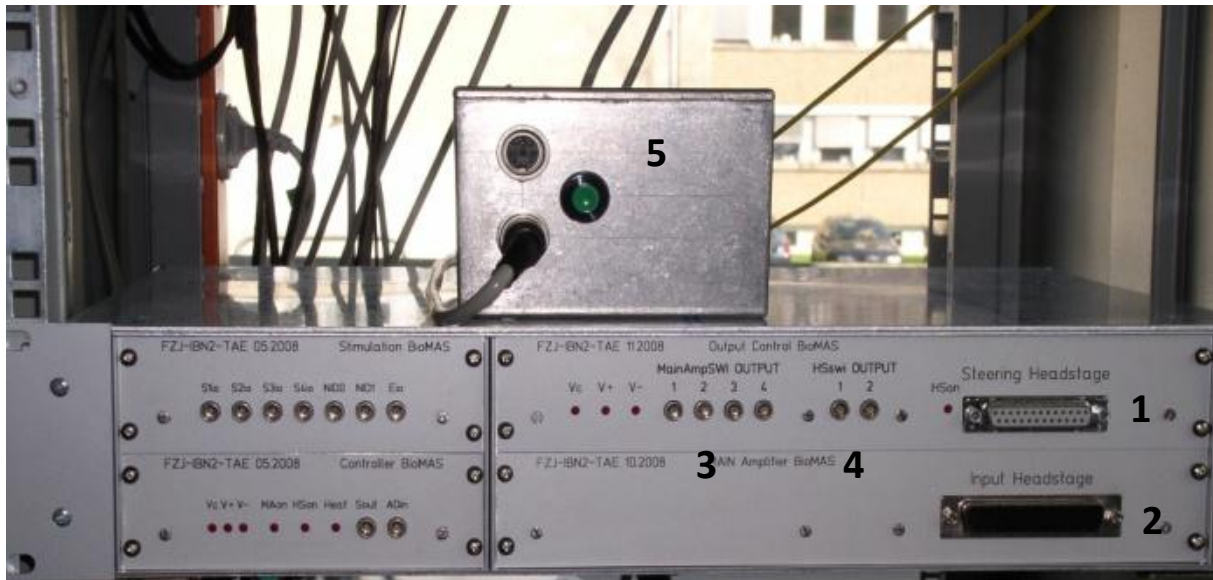


Abbildung 3.4 Vorderseite des BioMAS Hauptverstärkers mit externe Stromversorgung „5“. Über vier „MainAmpSWI OUTPUT“ Anschlüsse „3“ können Signale am Hauptverstärker und über zwei „HSwi OUTPUT“ Anschlüsse „4“ Signale an der Headstage abgegriffen werden. Die Stromversorgung und Kontrolle der Headstage erfolgt über den Anschluss „Steering Headstage“ „1“. Der darunter liegende Anschluss „Input Headstage“ „2“ ermöglicht die Datenübertragung von der Headstage zum Hauptverstärker.

3.3.3 Software

Die Steuerung des BioMAS Messsystems erfolgt ausschließlich über die eigens dafür in LabView 8 programmierte Software MEA64. Sie dient sowohl zur Steuerung des Systems als auch zur Visualisierung der Messsignale. In Abbildung 3.5 ist die Benutzeroberfläche des MEA64 dargestellt. Dabei kann über die Reiter „Measure“ und „Stimulation“ zwischen den beiden Programmteilen hin und her geschaltet werden. Hier wird allerdings nur auf die Oberfläche des „Measure“ eingegangen, da keine Stimulationen bei den Experimenten durchgeführt wurden. Die 64 Kanäle des Chips werden einzeln dargestellt, wodurch es möglich ist, die Aktivitäten an den einzelnen Elektroden in Echtzeit zu verfolgen. Für eine genauere Sicht auf einen bestimmten Kanal kann über einen Doppelklick der einzelne Kanal im Vollbildmodus angezeigt werden. Im linken Teil der Benutzeroberfläche befinden sich die Einstellmöglichkeiten.

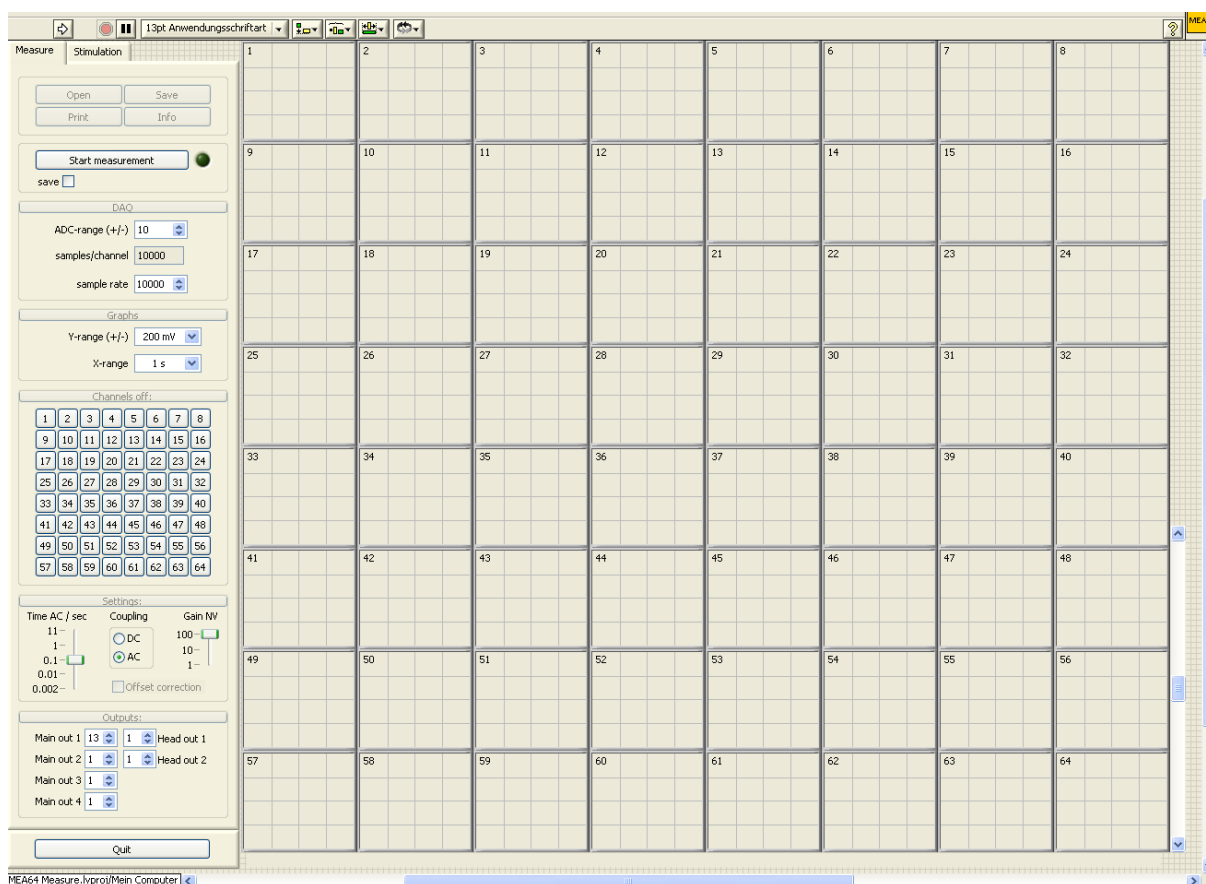


Abbildung 3.5 Benutzeroberfläche der BioMAS Software „MEA64“.

Über die Schaltfläche „Start measurement“ wird die Messung gestartet und gestoppt. Durch Markieren des darunter liegenden „save“ Buttons kann die aktuelle Messung aufgezeichnet werden. In diesem Fall erzeugt das Programm eine *.dat Datei mit den Messwerten sowie eine *.xml Datei mit den bei der Messung verwendeten Parametern. Die Auflösung der Graphen kann über die Schaltflächen „Y-range(+/-)“ und „X-range“ verändert werden. Bisher noch nicht in die Software integriert war die Einstellmöglichkeit für den ADC-Range, über den eine gewisse Glättung der Messsignale durch das Erzeugen von mehr Bildpunkten vorgenommen werden kann. In den Schaltflächen des „Channels off:“ Bereichs können einzelne Kanäle hinzu oder weggeschaltet werden. Um das Signal zu bearbeiten, kann über die Schaltflächen unter „Settings:“ sowohl eine Verstärkung des Signals um das 10- oder 100-fache durchgeführt („Gain NV“) als auch zwischen Gleich- (AC) und Wechselstrom (DC) gewählt werden („Coupling“). Über die Schaltfläche „Time AC/Sec“ lässt sich der Bandpassfilter auf die gewünschte Breite einstellen, allerdings erfolgt die Beschränkung der Bandbreite lediglich für höhere Frequenzen.

3.4 Chipaufbau

Der Aufbau der Chips erfolgte durch das „Flip-Chip“ Verfahren. Dabei wurden in verschiedenen Arbeitsschritten die einzelnen Komponenten, bestehend aus dem eigentlichen MEA Chip, einem Carrier und einem Glasring, zusammengefügt (siehe dazu Abbildung 3.6). Der Carrier dient als „Träger“ für den MEA Chip und ermöglicht den Anschluss des Chips an die Elektronik. In der Mitte des Carriers befindet sich eine Aussparung, um die herum die 64 Goldkontaktstellen liegen, auf die exakt die Elektroden des MEAs passen.

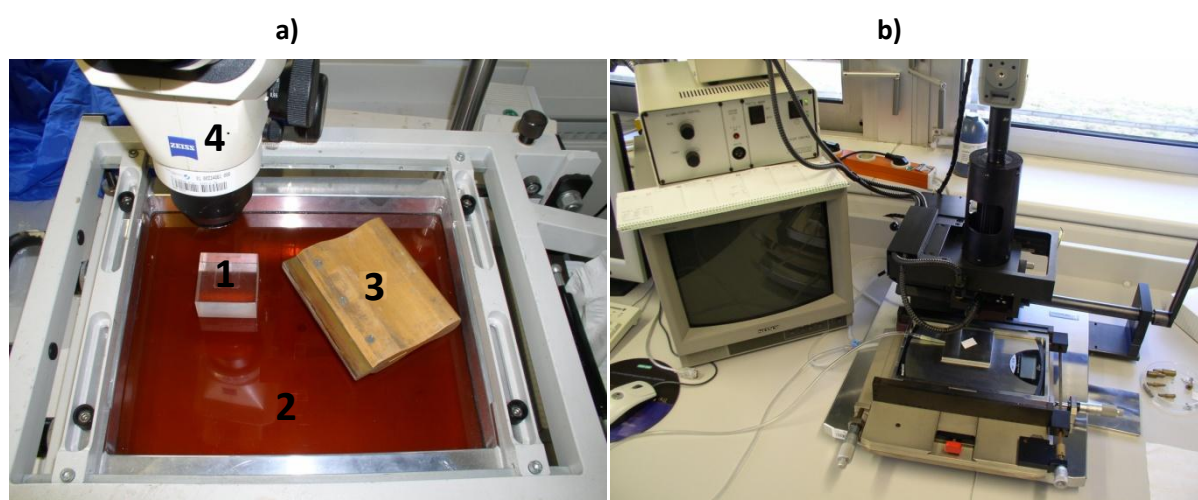


Abbildung 3.6 Bild a): Apparatur zum Auftragen des Silberleitklebers. Der Carrier wird in die Kunststoffhalterung „1“ gelegt und mit Hilfe des Mikroskops „4“ unter der Folie „2“ platziert. Diese dient als Schablone für das Auftragen des Klebers. In der Folie sind, exakt in der Anordnung der Bondpads auf dem Carrier, Löcher durch die der Silberleitkleber mit dem Rakel „3“ gedrückt wird. Im nächsten Schritt werden Carrier und Chip mit Hilfe des Fine-Placers, Bild b), zusammengefügt.

Im ersten Schritt des Chipaufbaus wurde der Carrier mit Ethanol gereinigt, um grobe Schmutzpartikel zu entfernen. Anschließend konnte mit Hilfe eines Rakels (siehe Abbildung 3.6a) Silberleitkleber (Zweikomponentenkleber EPO TEK H20 E-PFC) auf die Goldkontakte des Carriers aufgetragen werden. Der Kleber dient sowohl der Fixierung als auch als Leiter zwischen den Bondpads des MEAs und dem Carrier. Nach der Aufbringung des Klebers auf die Goldkontakte des Carriers erfolgte die Fixierung des Chips. Dazu wurde der Carrier im Fineplacer platziert (Abbildung 3.6b) und spiegelverkehrt dazu der MEA ausgerichtet, sodass die Bondpads des MEAs exakt auf die Goldkontakte des Carriers passten. Im Anschluss daran musste der Kleber im Ofen bei 80 °C für 60 Minuten getrocknet werden. Der nächste Schritt bestand darin, den „Underfill“ (Epo-Tek zwei Komponenten U300 80Z KIT und U302-3M 80Z) aufzutragen. Dieser hat die Funktion, die Klebestellen zwischen MEA und Carrier abzudichten. Nach dem Aushärten des Underfill im Ofen, bei 150 °C für 60 Minuten, konnte die „Arbeitsfläche“ innerhalb des Glas-Rings mit PDMS (Polydimethylsiloxan) (Sylgard 96-083) ver-

sehen werden. Dadurch wurde eine geeignete Oberfläche für das spätere Kultivieren der Zellen auf dem Chip geschaffen.

3.5 HL-1 Zellkultur

Bei den für diese Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um HL-1 Zellen. Dies sind Zellen, die aus im Mäuseherz sitzenden Tumoren gewonnen werden und deren phänotypische Eigenschaften denen von adulten Myokardzellen ähneln (7). Die Zellen eignen sich sehr gut für Zellmessungen, da sie einfach zu kultivieren sind und gut auf den präparierten Chipoberflächen wachsen. Außerdem haben sie den Vorteil, dass sie autonom erregbar sind und somit keine externe Stimulation notwendig ist, um Zellsignale abzuleiten. Die Zellkulturen wurden in T-25 Flaschen kultiviert und meist alle zwei bis drei Tage gesplittet (Flaschenboden sollte zu ca. 80% von Zellen bedeckt sein).

Zu Beginn wird das Nährmedium (Claycomb Medium¹) mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 1 ml PBS (phosphate buffered saline) zum „Waschen“ hinzugegeben, um das restliche Medium zu entfernen, da dies sonst die Wirkung des Trypsins (Sigma Aldrich) blockiert. Anschließend wird das PBS erneut abgesaugt, 1 ml Trypsin hinzugegeben und die Flasche auf eine 37 °C warme Heizplatte gestellt. Durch das Trypsin wird der Zellverbund aufgelöst und die Zellen lösen sich vom Flaschenboden. Im nächsten Schritt werden 5 ml Claycomb Medium in die Flasche gegeben, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Das Gemisch wird anschließend in ein Falcon-Tube pipettiert und zusammen mit einem Gegengewicht für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert.

Im Anschluss daran wird das Gemisch aus Trypsin und Nährmedium vorsichtig aus dem Tube abgesaugt und auf das am Boden klebende Zell-Pellet 1 ml frisches Nährmedium gegeben, um die Zellen erneut zu vereinzeln. Die Lösung kann nun sowohl zur Zellzählung als auch zum Aussäen der Zellen auf Chips oder zur Fortführung der Kultur verwendet werden. Auf die Zellzählung und das Aussäen auf Chips wird im folgenden Kapitel weiter eingegangen. Für die Fortführung der Kultur werden in zwei neue T-25 Flaschen jeweils 300 µl der Zelllösung gegeben und 5 ml Claycomb Medium hinzugefügt. Nun kann die neue Kultur in den Inkubator gegeben werden, wo sie bei 37 °C Umgebungstemperatur und 5% CO₂ erneut wachsen kann.

¹ Gemisch aus: fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, norepinephrine, ascorbic acid, L-glutamine

3.6 Reinigung der MEAs und Zellimmobilisierung

Um auf den Chips HL-1 Zellen kultivieren zu können, müssen diese zunächst gereinigt und sterilisiert werden. Dazu werden im ersten Schritt die Chips mit Ethanol und einem Wattestäbchen grob vorgeeignet. Die eigentliche Reinigung erfolgt im Ultraschallbad und zwar zunächst für fünf Minuten in einer Lösung aus bidestilliertem Wasser und Hellmanex (2% Hellmanex II, Hellma GmbH), um Zellreste vom Chip zu entfernen. Danach erfolgt erneut eine fünfminütige Reinigung im Ultraschallbad mit bidestilliertem Wasser und das anschließende Trocknen der Chips mit einer Stickstoff-Pistole.

Der nächste Schritt ist die Aktivierung der Chipoberfläche durch ein Sauerstoffplasma im Plasmaofen (PICO, Diener Elektronik GmbH & Co. KG), um für eine bessere Adhäsion der später folgenden Proteinbeschichtung zu sorgen. Die Chips werden für fünf Minuten bei einem Sauerstoffdruck von ca. 0,7 bar und 40% der Maximalleistung in den Plasmaofen gegeben. Im letzten Arbeitsschritt erfolgt die Sterilisation. Dazu werden die Chips unter einem sterilen Abzug für ca. eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Ab diesem Zeitpunkt sind die Chips steril und die weitere Vorbereitung der Chips muss unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Der zweite Schritt der Chipvorbereitung für die Immobilisierung von HL-1 Zellen besteht in der Proteinbeschichtung. Hierzu wurde auf die sterile Chipoberfläche ein Gemisch aus 50 µl einer 0,2%-Gelatinlösung und in bidestilliertem Wasser gelöstes Fibronectin (5 µg/ml) (Sigma Albrich) gegeben, um eine gute Adhäsion der Zellen auf dem Chip zu gewährleisten. Nach ca. einer Stunde Wartezeit konnte die Lösung entfernt und der Chip mit PBS abgespült werden. Für ein optimales Wachstum der Zellen auf den Chips ist eine gewisse Zelldichte erforderlich. Der Vorgang der Zellkultivierung verläuft zunächst nach der gleichen Vorgehensweise wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Der Unterschied besteht aber darin, dass nach dem Zentrifugieren und Vereinzeln der Zellen diese gezählt werden. Hierzu wird eine Probe der Zelllösung auf die Zählkammer gegeben und in den gegenüberliegenden Quadranten die Zellen pro Kästchen gezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen ergibt dann die Zelldichte in der Zelllösung. Dementsprechend kann dann die Menge der Zelllösung mit 50.000-100.000 Zellen auf den Chip pipettiert werden. Im Anschluss muss ungefähr vier Stunden gewartet werden, bis sich die Zellen auf dem Chip gesetzt haben und der Chip mit weiteren 500 bis 600 µl Nährmedium versehen werden kann. Der Austausch des Nährmediums muss täglich durchgeführt werden. Nach 3-4 Tagen sollten genügend Zellen auf der Chipoberfläche vorhanden sein (Abbildung 3.7), um die Messungen zu starten. Zwei bis drei Stunden vor Messbeginn ist das Nährmedium zu erneuern.

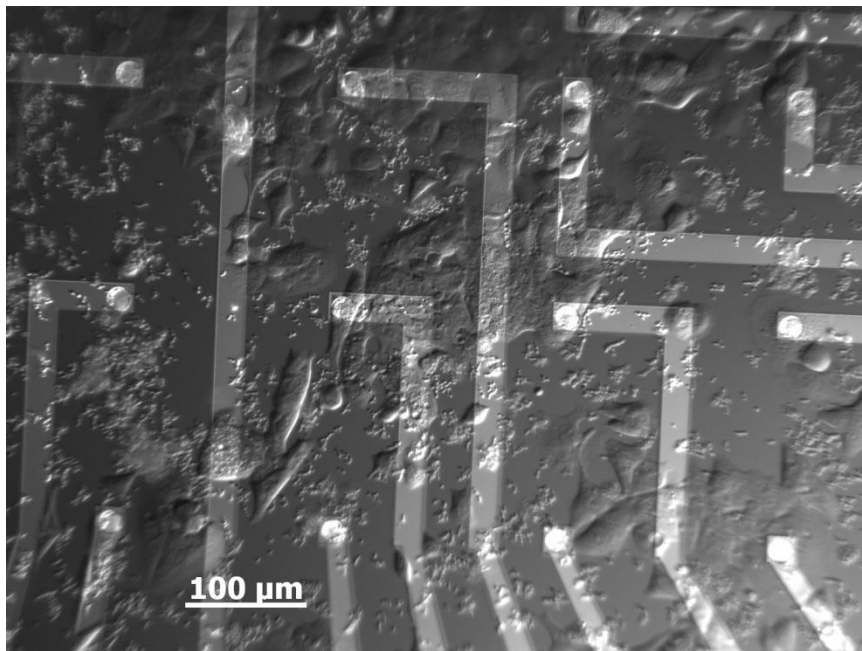


Abbildung 3.7 HL-1 Zellen, gewachsen auf einem „Standard“ Gold MEA.

4 Experimentelles

In diesem Kapitel werden die bei dieser Arbeit durchgeführten Messungen und Experimente beschrieben. Die Messungen wurden, soweit möglich, sowohl für das MEA Verstärkersystem als auch für das BioMAS Messsystem durchgeführt, um einen Vergleich in Bezug auf die Signalqualität zwischen dem „alten“ und „neuen“ System zu bekommen.

4.1 Rauschmessung

Die erste Messreihe, die durchgeführt wurde, war die Rauschmessung. Hier sollte sich zeigen, ob es beim BioMAS Messsystem auf Grund der technischen Neuerungen oder eventuell fehlerhafter Elektronik zu erhöhten Rauschsignalen kommt.

4.1.1 Messaufbau und Durchführung

Der Messaufbau war für den MEA Verstärker und das BioMAS Messsystem gleich. Vor Beginn der Messung musste zunächst die Referenzelektrode durch Elektrolyse angefertigt werden. Hierzu wurde ein Silberdraht mit feinem Schmirgelpapier aufgeraut, in einer Halterung, die mit einer Stromquelle verbunden war, fixiert, und für wenige Sekunden in 2 M Salzsäure getaucht, um die Silberchloridbeschichtung für die Referenzelektrode zu erhalten. Anschließend wurde die Elektrode mit Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt, um lose Partikel und Reste der Salzsäure zu entfernen, damit diese nicht in die Elektrolytlösung gelangten.

Die Headstages der Messsysteme wurden im Faraday'schen Käfig mit dem dazugehörigen Verstärker verbunden. Der zu messende Chip wurde in der Headstage des jeweiligen Systems fixiert und auf den MEA phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) als Elektrolytlösung gegeben. In die Elektrolytlösung wurde ringförmig um die Elektroden des MEAs die Ag/AgCl-Referenzelektrode gegeben, die geerdet wurde und so ein definiertes stabiles Potenzial mit dem Elektrolyten bildete. Die Verstärker waren mit dem PC verbunden. Die Aufnahme der Daten erfolgte für BioMAS mit der MEA Software und für den MEA Verstärker mit Med64. Nachdem der Chip korrekt eingelegt und alles verbunden war, wurde die Messung über die Software gestartet. Ohne Impulse oder andere Signale auf den Chip zu geben, wurde ca. 20 Sekunden lang gemessen und aufgezeichnet.

4.2 Lock-In Messung

Die weiteren Testreihen bestanden in der Durchführung von Lock-In Messungen. Die Lock-In Messungen wurden lediglich mit dem BioMAS Messsystem durchgeführt (siehe auch Kapitel 5.3).

4.2.1 Messaufbau und Durchführung

Für die Messungen wurde die Headstage des BioMAS Messsystems zur Abschirmung von Stör-signalen in einem Faraday'schen Käfig platziert und über ein Kabel mit dem BioMAS Hauptverstärker verbunden („Steering Headstage“ und „Input Headstage“). Vom BioMAS Hauptverstärker („MainAmpSWI OUTPUT“) aus führte ein Kabel über einen Spannungsteiler zum Eingang des Lock-In Verstärkers. Der Ausgang des Verstärkers wurde mit der Ag/AgCl-Referenzelektrode verbunden (siehe Abbildung 4.1) (Herstellung der Elektrode siehe Kapitel 4.1.1).

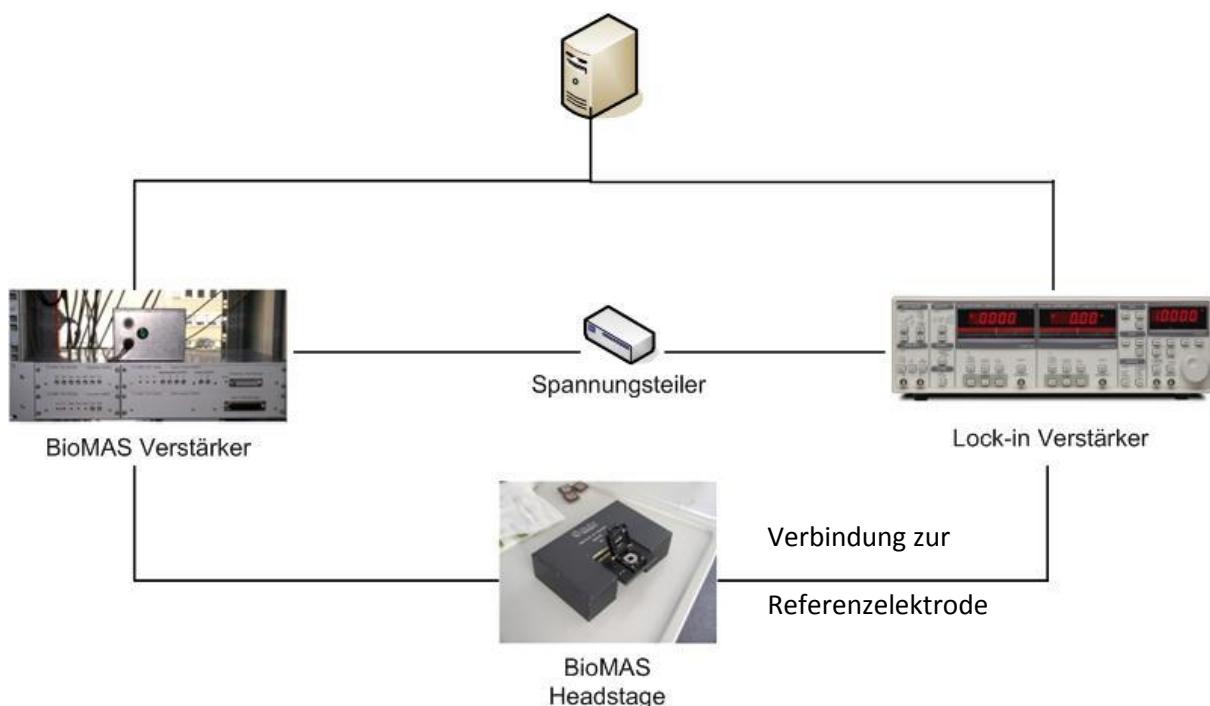


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des Messaufbaus für die Lock-In Messung.

Auf der Headstage wurde dann der MEA Chip fixiert und auf diesen die Elektrolytlösung gegeben. PBS diente dabei als Elektrolyt, in den die Referenzelektrode gegeben wurde, sodass sie kreisförmig um die Elektroden lag. Wichtig war, dass der Teil der Referenzelektrode, der um die Elektroden lag, vollständig von der Elektrolytlösung bedeckt war. Alle weiteren Einstellungen konnten nun über die Software (siehe dazu Abbildung 4.2) vorgenommen werden. Für die Messung wurden bei jedem Chip

repräsentativ sieben funktionsfähige Elektroden gewählt. Auf die Referenzelektrode wurde ein AC-Signal mit einer Amplitude von 4 mV über einen Frequenzbereich von 1 Hz bis 10 kHz gegeben. Auch hier wurden für die Visualisierung die Verstärkungen der Amplitude über der jeweiligen Frequenz dargestellt. Für alle Chips und Elektroden wurden die gleichen Einstellungen verwendet.

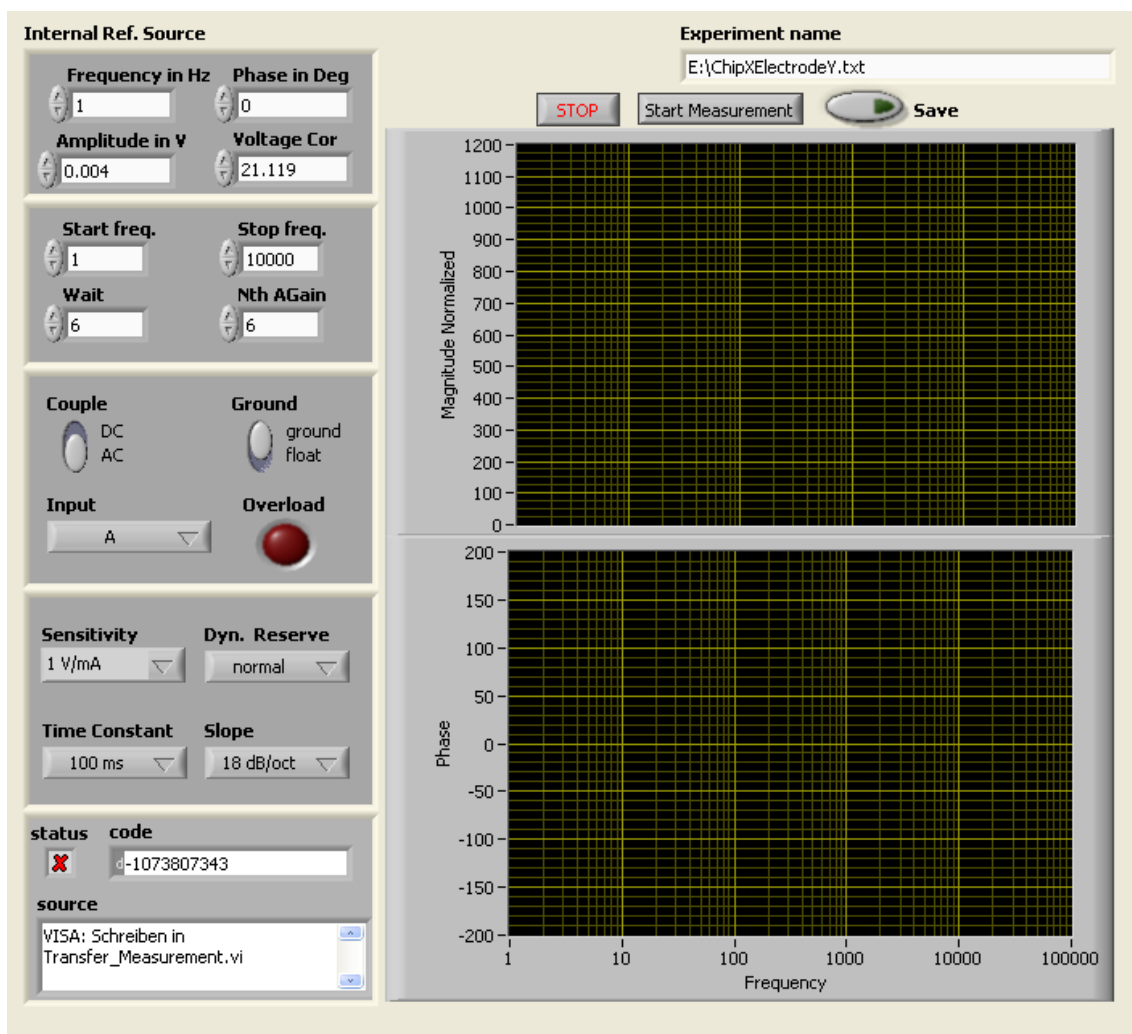


Abbildung 4.2 Benutzeroberfläche des LabView Programms mit den für die Durchführung der Lock-In und Impedanzmessung (Kapitel 4.2 und 4.3) verwendeten Parametereinstellungen. Über „Amplitude in V“ lässt sich die Amplitude des Eingangssignals festlegen (4 mV). „Start freq.“ und „Stop freq.“ geben den Frequenzbereich an, über den gemessen wird (1 Hz-10.000 Hz). Über „Nth AGain“ wird festgelegt, wie oft die einzelnen Frequenzen auf den Chip gegeben werden sollen (6 Mal).

4.3 Impedanzmessung

In weiteren Testreihen wurden Impedanzmessungen durchgeführt, um ein Vergleich der Eingangs-impedanzen beider Systeme zu bekommen.

4.3.1 Messaufbau und Durchführung

Für das BioMAS Messsystem wurde die Chiphalterung für die MEA Chips aus der Headstage entfernt und durch eine Platine (siehe Abbildung 4.3), auf der Steckplätze für einen Messwiderstand angelötet wurden, ersetzt.

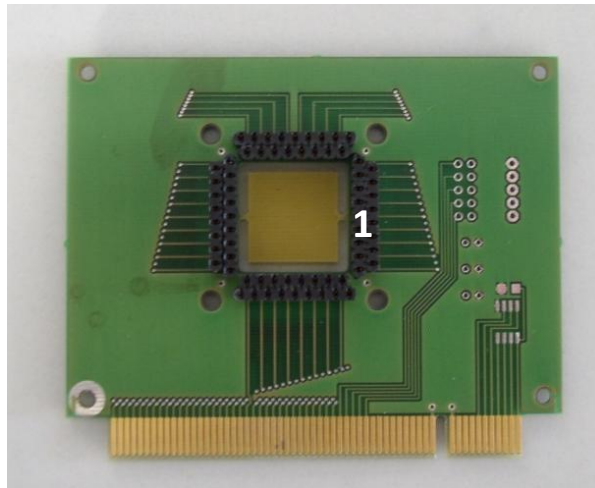


Abbildung 4.3 Ersatz des Heads für das BioMAS Messsystem bei der Impedanzmessung. Auf der Platine sind die Steckplätze für den Widerstand aufgelötet „1“.

Die Headstage wurde über ein Kabel mit dem BioMAS Hauptverstärker, der wiederum an den PC angeschlossen ist, verbunden. Der Ausgang des Lock-In Verstärkers war mit einem $100\text{ M}\Omega$ Widerstand verbunden, der auf der Platine platziert werden konnte. Zum Schluss musste die Platine noch geerdet werden. Der Aufbau für die Impedanzmessung beim MEA Verstärker war, bis auf ein paar kleine Unterschiede, analog zum BioMAS Messsystem. Da die Headstage des MEA Verstärkers aber über eine feste Platine verfügt, auf der der Chip fixiert wurde, musste der $100\text{ M}\Omega$ Widerstand direkt mit den Goldkontakten der Headstage verbunden werden. Ermöglicht wurde dies durch eine Hakenklemme, die eine sichere Verbindung zwischen Goldkontakt und Widerstand herstellte.

Für die Impedanzmessung war die Durchführung der Experimente bezogen auf das BioMAS Messsystem analog zur Lock-In Messung. Für das MEA Verstärkersystem wurden die einzelnen Kanäle über die Steckplätze im Hauptverstärker angesprochen. Die verwendete Software und Parameter waren ebenfalls identisch mit denen der Lock-In Messung.

4.4 Zellmessung

Für die Durchführung der Zellmessungen wurde eine Kultur von HL-1 Zellen verwendet. Dies sind Zellen, die aus Herzmuskeltumorzellen einer Maus gewonnen werden. Der Vorteil dieser Zellen liegt darin, dass sie leicht zu kultivieren und auf Grund ihrer phänotypischen Eigenschaften autonom er-

regbar sind (7). Die Kultivierung und Immobilisierung der Zellen sind in Kapitel 3.5 und 3.6 beschrieben.

4.4.1 Messaufbau Durchführung

Um den Vergleich für beide Messsysteme zu haben, wurden die Messungen direkt hintereinander durchgeführt. Die Chips wurden also immer direkt nach einer Messung in die Headstage des anderen Messsystems eingespannt und eine weitere Messung durchgeführt. Der Messaufbau war analog zu dem in Kapitel 4.1.1. Die Chips mit den Zellen wurden in der jeweiligen Headstage fixiert und die Ag/AgCl-Elektrode geerdet, um ein definiertes Potenzial zu erhalten. Für die Visualisierung diente wiederum die MEA Software für das BioMAS Messsystem und Med64 für den MEA Verstärker. Für die Messung wurden erneut, über einen Zeitraum von 20 Sekunden, die an den Elektroden ankommenden Signale gemessen. Für den Fall, dass Zellsignale nicht oder nur gering erkennbar waren, konnten die Zellen über die Zugabe von Adrenalin angeregt werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der in Kapitel 4 beschriebenen Experimente präsentiert und diskutiert.

5.1 Impedanzmessung

Der erste Schritt im Vergleich der beiden Verstärkersysteme BioMAS und MEA bestand darin, die Eingangsimpedanzen des jeweiligen Verstärkers zu bestimmen. Da das BioMAS Messsystem eine Reihe technischer Neuerungen besitzt, war es interessant, herauszufinden, ob mit der Steigerung der Funktionalität des Systems auch eine Abnahme der Eingangsimpedanz einhergeht.

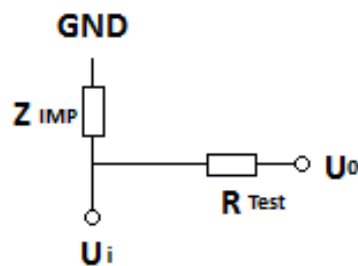


Abbildung 5.1 Schaltbild des Messaufbaus für die Impedanzmessung. R_{TEST} ist der 100 M Ω Testwiderstand, über den gemessen wurde, Z_{IMP} die Eingangsimpedanz des Verstärkers, U_o das Eingangssignal und U_i das gemessene Ausgangssignal.

Gemessen wurde über einen 100 M Ω Testwiderstand, der direkt mit einem Kanal auf der Headstage des jeweiligen Systems verbunden wurde. Durch den Lock-In Verstärker wurden dann Frequenzen von 1 Hz bis 10 kHz bei einer Amplitude von 4 mV auf den Widerstand gegeben und die Verstärkung des Signals über der Frequenz gemessen.

Aus Abbildung 5.1 lässt sich über die Spannungsteilerformel die Gleichung zur Berechnung des Ausgangssignals U_i erstellen:

$$U_i = \frac{U_o * Z_{IMP}}{Z_{IMP} + R_{TEST}} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Durch Umstellen der Gleichung 5.1 nach Z_{IMP} , erhält man die Gleichung zur Berechnung der Eingangsimpedanz des Verstärkers:

$$Z_{IMP} = \frac{U_i * R_{TEST}}{(U_o - U_i)} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Beide Messsysteme weisen eine interne 1000-fache Verstärkung auf, weshalb $U_0 = 1000$ angenommen wird, also die volle Signalstärke des Eingangssignals. Da auch der Widerstand, über den gemessen wurde, bei beiden Messsystemen der gleiche war, gilt für beide Systeme $R_{\text{Test}} = 100 \text{ M}\Omega$. Als Werte für U_i wurden die, bei den jeweiligen Frequenzen gemessenen Verstärkungen des Eingangssignals gewählt und darüber die Impedanzen bei den entsprechenden Frequenzen berechnet. Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3 zeigen die Ergebnisse der Impedanzmessung der einzelnen Verstärkersysteme für jeweils drei repräsentativ gewählte Kanäle. In Abbildung 5.4 sind die Mittelwerte der Kanäle beider Systeme gegenübergestellt.

Zu erkennen ist, dass der Abfall der Impedanz beim BioMAS Messsystem früher erfolgt als beim MEA Verstärker. Der Grund dafür ist, dass für das BioMAS Messsystem bei der Entwicklung festgelegt wurde, dass der Bandpassfilter schmäler eingestellt wird, um Störsignale bei höheren Frequenzen effizienter filtern zu können. Die Bandbreite des Filters lässt sich über die Software MEA64 einstellen, allerdings kann nur eine Erhöhung der Bandbreite für höhere Frequenzen vorgenommen werden. Für die Experimente wurde der Filter so eingestellt, dass die Bandbreite mit der des MEA Verstärkers übereinstimmt.

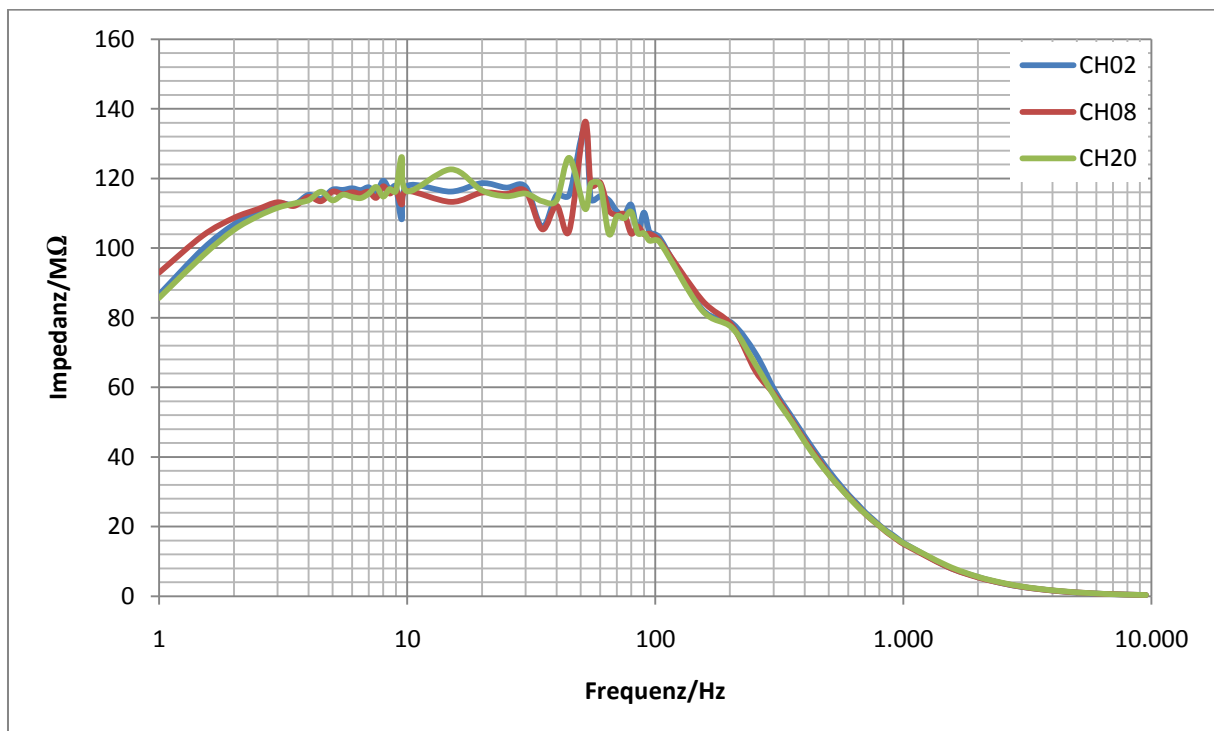


Abbildung 5.2 Ergebnisse der Impedanzmessung für das MEA Verstärkersystem. Gemessen wurden drei Kanäle über eine Frequenz von 1 Hz bis 10 kHz. Aufgetragen ist die Impedanz über der Frequenz.

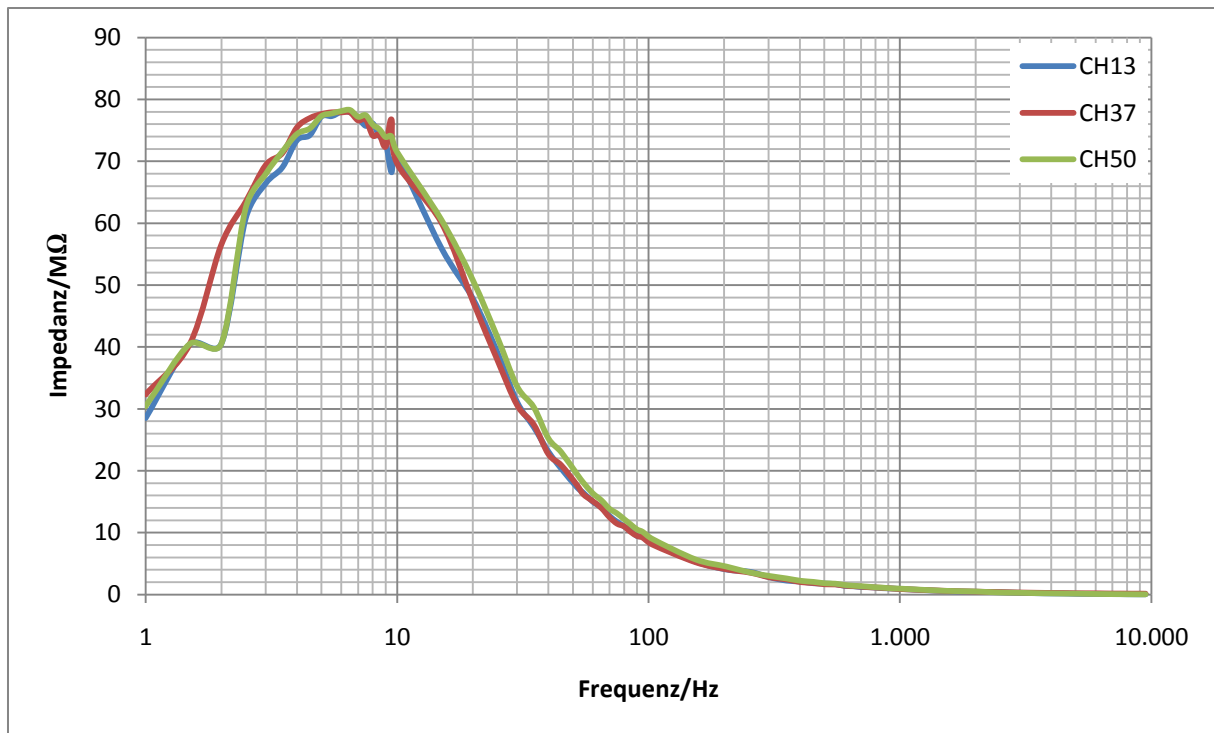


Abbildung 5.3 Ergebnisse der Impedanzmessung für das BioMAS Messsystem. Gemessen wurden drei Kanäle über eine Frequenz von 1 Hz bis 10 kHz. Aufgetragen ist die Impedanz über der Frequenz.

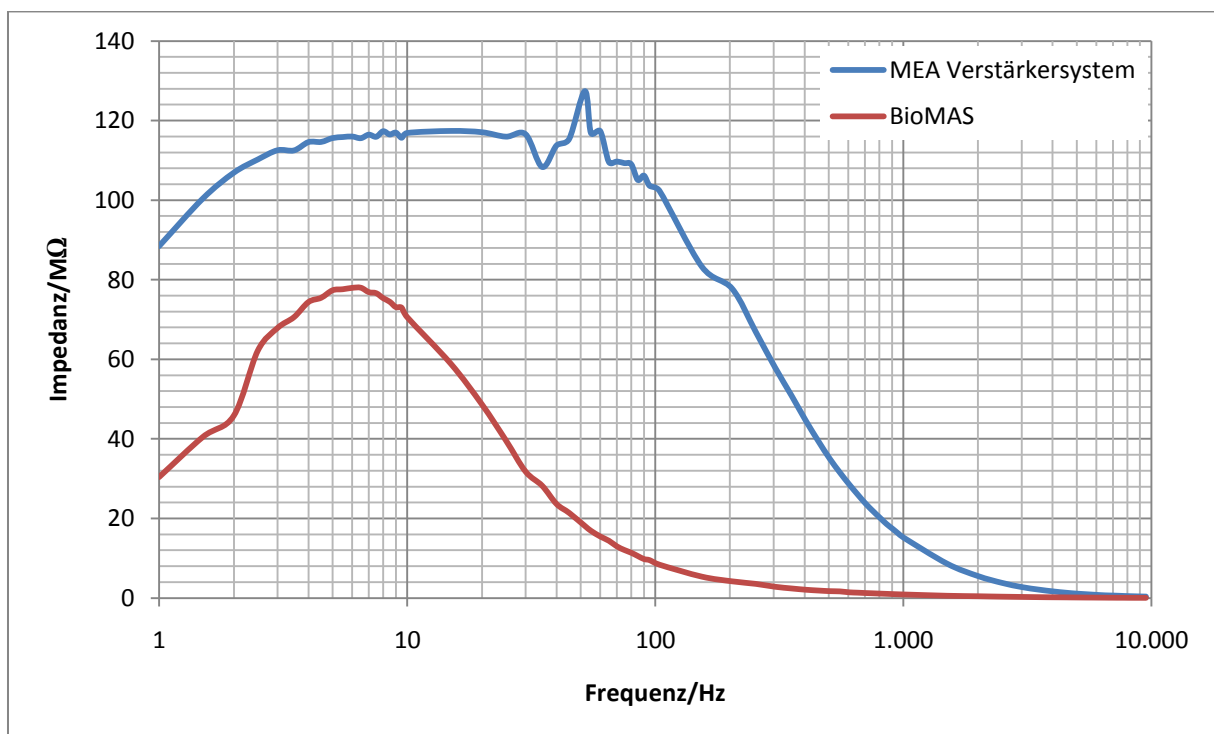


Abbildung 5.4 Gegenüberstellung der gemittelten Werte der drei Kanäle des MEA Verstärkersystems und des BioMAS Messsystems.

Betrachtet man die Gegenüberstellung der Impedanzen in Abbildung 5.4, so lässt sich erkennen, dass die Eingangsimpedanz des „alten“ MEA Verstärkersystems deutlich höher liegt, als die des BioMAS

Messsystems. Zu erklären ist dies durch die Funktionalität der beiden Systeme. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, sollten in das neue Messsystem möglichst viele Funktionen integriert werden.

Durch die neu hinzugekommene Elektronik, die es beispielsweise ermöglicht Stimulationimpulse auf die Chips zu geben, ist es nicht mehr möglich, eine ähnlich hohe Eingangsimpedanz zu erzielen wie bei dem MEA Verstärker. Somit lässt sich festhalten, dass mit der Steigerung der Funktionalität eine Einbuße bei der Impedanz einhergeht.

5.2 Rauschmessung

Als die ersten Testmessungen mit dem neuen BioMAS Messsystem durchgeführt wurden, gab es, trotz Arbeitens im Faraday'schen Käfig, immer wieder Probleme durch einen zu großen Rauschanteil im Messsignal. Eine Rauschmessung sollte dann Aufschluss darüber geben, in welchen Frequenzen das Rauschen auftritt. Als Testchip diente ein IrOx MEA mit einem Elektrodendurchmesser von 50 μm , mit dem über eine Zeit von 20 Sekunden die Signalstärke (in Volt) gemessen wurde. Für die Auswertung der Messung wurden die Daten in die für diese Arbeit benutzte Analysesoftware MATLAB eingelesen und über eine Fast Fourier Transformation (FFT) aus dem Zeitraum in den Frequenzraum transformiert:

$$X(k) = \sum_{j=1}^N x(j) * e^{(-2\pi i)j/N} \quad (\text{Gl. 5.3})$$

Dabei ist $X(k)$ die transformierte Funktion und $x(j)$ die Funktion des Signals im Zeitraum. Durch die Transformation des zeitabhängigen Signals in den Frequenzraum ergibt sich ein Frequenzspektrum, bei dem logarithmisch die Signalstärke (in Volt) über der Frequenz (in Herz) aufgetragen ist.

Das Ergebnis der Rauschmessung für das MEA Verstärkersystem ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Dabei lässt sich erkennen, dass das Rauschen bei niedrigen Frequenzen mit 0,1 V sehr hoch ist, mit steigender Frequenz jedoch abnimmt, bis es sich bei einer Frequenz von ca. 20 Hz im Bereich von 0,04 mV einpendelt. Betrachtet man im Gegensatz dazu Abbildung 5.6, die das Ergebnis der Rauschmessung für das BioMAS Messsystem zeigt, ist ein deutlich höheres Rauschsignal zu erkennen. Auch hier tritt anfangs sehr hohes Rauschen auf, jedoch erfolgt keine wirkliche Minderung des Störsignals. Auffallend ist dabei, dass die Peaks bei 50 Hz, 100 Hz, 200 Hz, ..., auftreten, also bei den Frequenzen, auf die das Netzauschen fällt. Da die Messungen alle im Faraday'schen Käfig durchgeführt wurden und für beide Messsysteme die gleichen Voraussetzungen galten, ist ein Fehler im Messaufbau auszuschließen. Ein möglicher Grund für das höhere Rauschen beim BioMAS Messsystem könnte sein, dass über das Heizkissen Störsignale erzeugt werden, da die Kabelanschlüsse für das Kissen direkt an

den Goldkontaktstellen liegen. Bei den ersten Testmessungen mit dem System war das Problem, dass das Heizkissen bei dem Versuch, den Chip aus der Halterung zu nehmen, an diesem kleben blieb und die Anschlussdrähte an den Goldkontakten entlangrieten, wobei möglicherweise die Isolierung beschädigt wurde. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass die Störungen auch auftraten, als das Heizkissen nicht genutzt wurde. Eine weitere Möglichkeit, die das Rauschen erklären würde, wäre, dass die Isolierung des Verstärkers am Übergang des Netzsteckers in den Verstärker nicht ausreichend oder beschädigt ist und sich somit das Netzrauschen auf die elektronischen Bauteile fortpflanzt. Eine endgültige Erklärung für das Rauschen kann nicht gegeben werden, da aus zeitlichen Gründen keine weiteren Rauschmessungen, zur Problemeinschränkung, durchgeführt werden konnten.

Die Analyse der Messung zeigt aber, dass der Verlauf des Rauschens bei beiden Systemen dem des $1/f$ Rauschens entspricht. Dabei nimmt das Rauschsignal mit steigender Frequenz immer weiter ab.

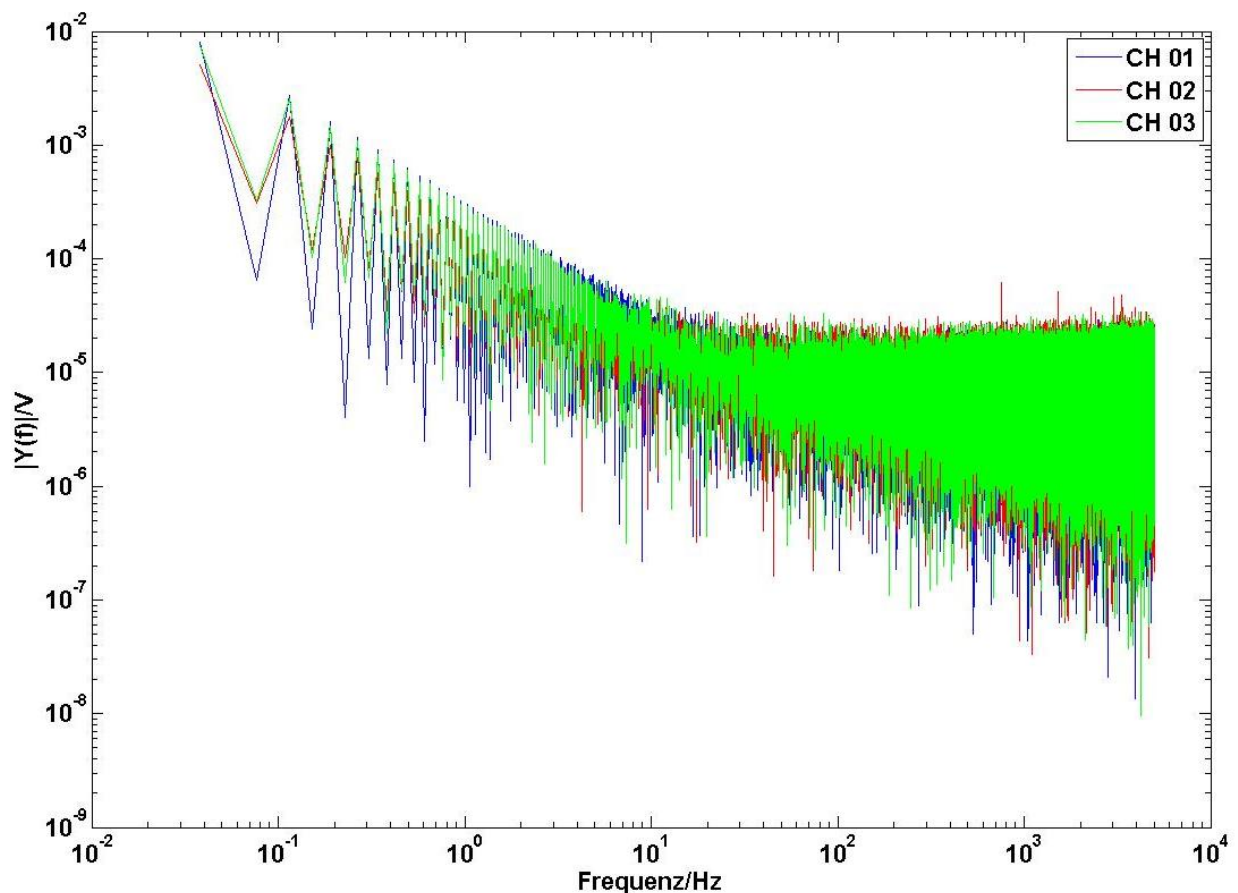


Abbildung 5.5 Ergebnisse der Rauschmessung für das MEA Verstärkersystem. Gemessen wurden drei Kanäle des Chips (siehe Legende). Aufgetragen ist die Signalstärke in Volt auf der Ordinate und die Frequenz in Herz auf der Abszisse.

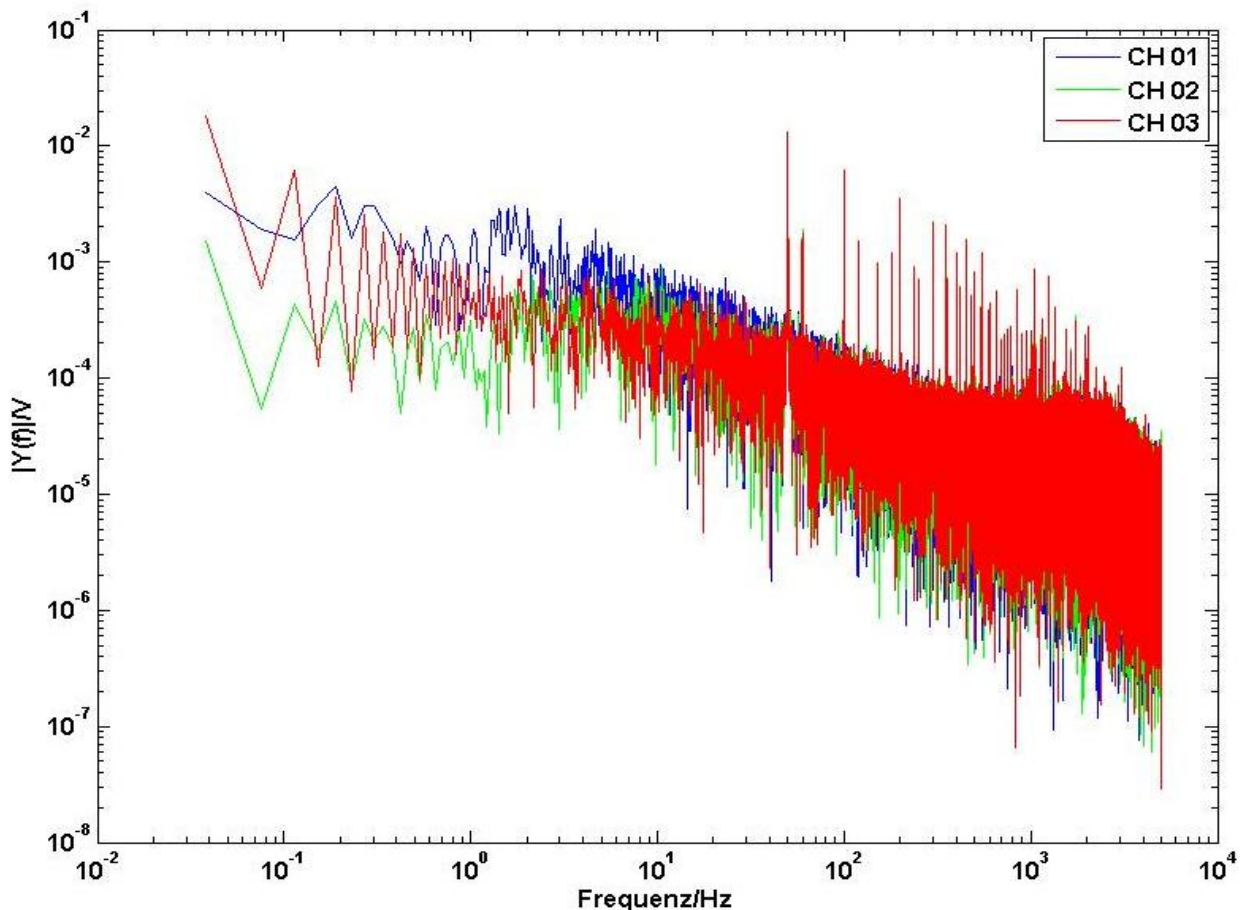


Abbildung 5.6 Ergebnisse der Rauschmessung für das BioMAS Messsystem. Gemessen wurden drei Kanäle (siehe Legende) eines Chips und die Werte der Kanäle übereinander geplottet. Auf der Ordinate ist die Signalstärke in Volt und auf der Abszisse die Frequenz in Herz zu finden.

5.3 Lock-In Messung

Bei den durchgeführten Lock-In Messungen wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten MEAs verwendet. Gemessen wurden sieben Kanäle pro Chip und für die Auswertung die gemittelten Werte des jeweiligen Chips verwendet. Bei allen Messungen wurde über einen Frequenzbereich von 1 Hz bis 10 kHz und einem Signal von 4 mV die jeweilige Verstärkung des Signals gemessen. Der genaue Messaufbau und die Durchführung der Messung sind in Kapitel 4.2 erläutert.

Abbildung 5.7 zeigt die erste Messreihe, die ohne Chip durchgeführt wurde. Diese Messreihe sollte zum Einen prüfen, ob die Verstärkung des Messsignals dem Verstärkungsfaktor des Messsystems entsprach und zum Anderen sollte sie einen Vergleichswert für die weiteren Messungen mit Chip liefern. In diesem Diagramm sind die Verstärkung des Ausgangssignals auf der Ordinate und die Messfrequenz auf der Abszisse dargestellt. Wie in Kapitel 3.2 und 3.3 erwähnt, liegt bei beiden Messsystemen eine ca. 1000-fache Verstärkung gegenüber dem Eingangssignal an, was durch die Messung

bestätigt wird. Für die weiteren Messungen mit Chip galten die gleichen Bedingungen in Bezug auf Frequenzbereich und Signalstärke, wie für die Messungen ohne Chip.

Tabelle 5.1 Messergebnisse der Lock-In Messung für die verschiedenen MEAs (Elektrodenanordnung- Beschichtung- Elektrodendurchmesser) mit der mittleren maximalen Frequenz² („FreqMaxMean“) und der mittleren Verstärkung („Mean Amp“).

Chip	FreqMaxMean in Hz	Mean Amp.
Cross - Gold – 8 µm	3535,70	167,01
Star - Gold – 8 µm	4500,00	167,08
Star - Gold – 10 µm	4243,05	225,20
Star - Gold – 15 µm	4521,62	311,64
Star - IrOx – 50 µm	5607,13	948,28

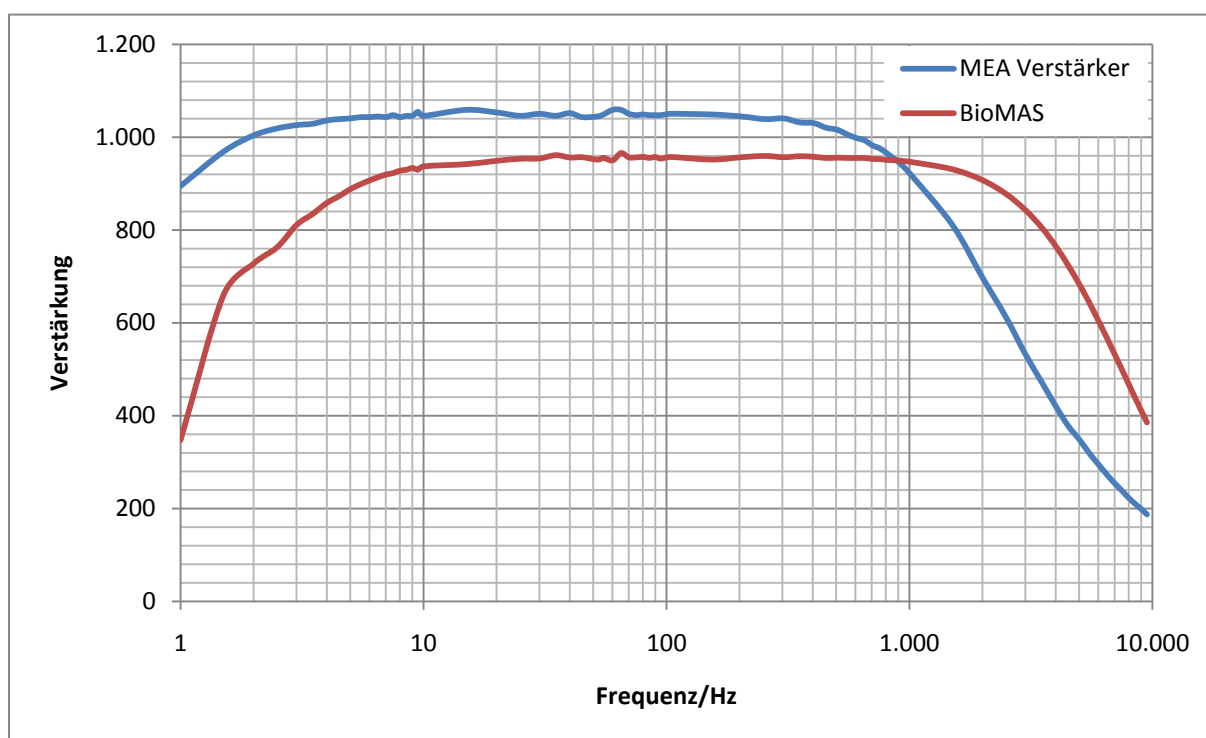


Abbildung 5.7 Ergebnisse der Lock-In Messung ohne Chip. Auf der Abszisse ist logarithmisch der Frequenzbereich dargestellt über den gemessen wurde, die Ordinate gibt den Verstärkungsfaktor an, der erreicht wurde.

Da es bei Messungen mit Chip nicht mehr möglich war, mit dem MEA Verstärkersystem Signale aufzunehmen, stammen die hier präsentierten Ergebnisse lediglich aus Messungen mit dem BioMAS Messsystem. Ein Grund dafür, weshalb die Messungen mit Chips nicht funktionierten, wurde nicht gefunden. Zunächst lag der Verdacht darin, dass die Elektronik, also Headstage oder Verstärker, das Problem darstellten. Dies konnte allerdings nach der Messung ohne Chip ausgeschlossen werden.

² Als „FreqMaxMean“ wurden Werte im Bereich von 30% oberhalb und unterhalb der Frequenz bei der Maximalverstärkung verwendet.

Auch die Möglichkeit, dass die Chips eventuell defekt waren, konnte ausgeschlossen werden, da zum einen mit einer Vielzahl an sowohl neu aufgebauten als auch mit schon verwendeten MEAs gemessen wurde, zum anderen mit den gleichen Chips auf dem BioMAS Messsystem erfolgreich gemessen werden konnte. Auch der Messaufbau wurde diverse Male überprüft und Kabel getauscht, allerdings ohne Erfolg.

Die Ergebnisse der Messungen mit Chip sind in Abbildung 5.8 und Abbildung 5.9 dargestellt. Abbildung 5.8 zeigt die Gegenüberstellung der Messwerte für die MEAs mit Elektrodendurchmessern von 8 μm , 10 μm und 15 μm . Schon hier lässt sich gut erkennen, dass die Verstärkung des Signals maßgeblich mit der Größe der Elektrode zusammenhängt (Vergleiche dazu auch Abbildung 5.10). Interessant zu sehen ist allerdings der Vergleich zwischen den Chips mit 8 μm großen Elektroden, die sich lediglich durch die Anordnung der Elektroden auf dem Chip unterscheiden. Der „Cross MEA“ weist dabei aber einen nur in etwa halb so großen Verstärkungsfaktor auf wie der „Star MEA“. Der Grund für den Unterschied könnte sein, dass beim „Cross MEA“ die Leiterbahnen parallel und nah aneinander verlaufen und sich so bei Stromfluss die Kapazität der Leiterbahnen erhöht. Beim „Star MEA“ hingegen verlaufen die Leiterbahnen sternförmig und der Abstand nimmt zum Rand hin immer mehr zu, sodass sie keinen Kondensator bilden können.

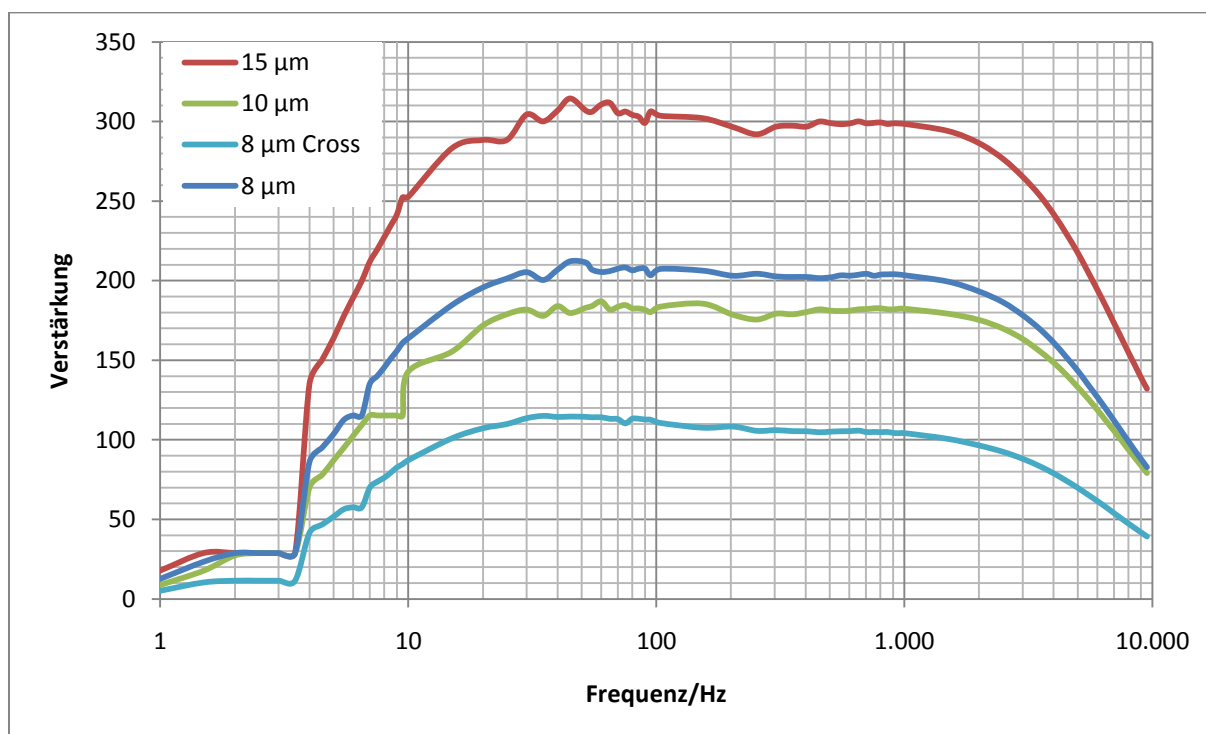


Abbildung 5.8 Übersicht der Ergebnisse der Lock-In Messung für das BioMAS Messsystem, für MEAs mit den Elektrodendurchmessern 8 μm , 10 μm und 15 μm .

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der 50 μm IrOx MEAs (Abbildung 5.9) fällt auf, dass der Verstärkungsfaktor fast der gleiche ist, wie bei den Messungen ohne Chip. Somit lässt sich festhalten,

dass Chips mit größeren Elektroden als 50 μm keine weiteren Verbesserungen der Verstärkung liefern. Vergleicht man einmal die Kurven für die Elektrodengrößen, lässt sich eine Proportionalität im Zusammenhang zwischen Verstärkungsfaktor und Elektrodengröße (Abbildung 5.10) erkennen.

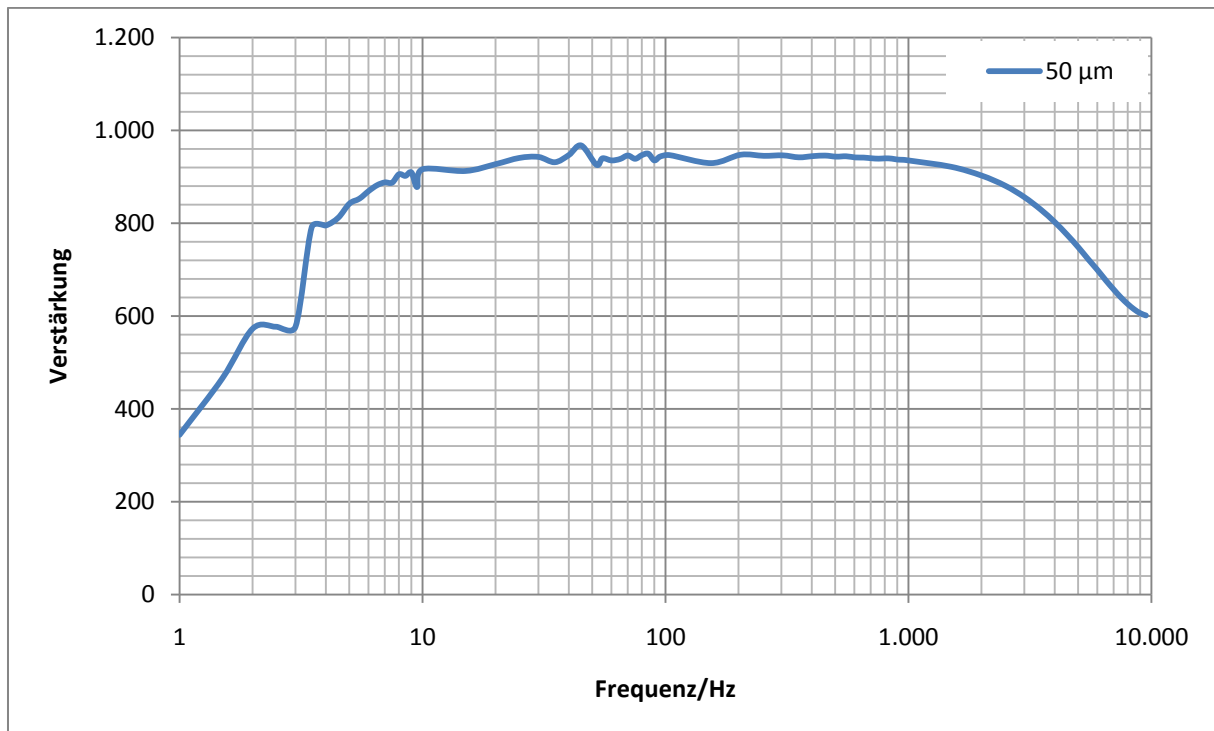


Abbildung 5.9 Ergebnisse der Lock-In Messung für die 50 μm IrOx MEAs

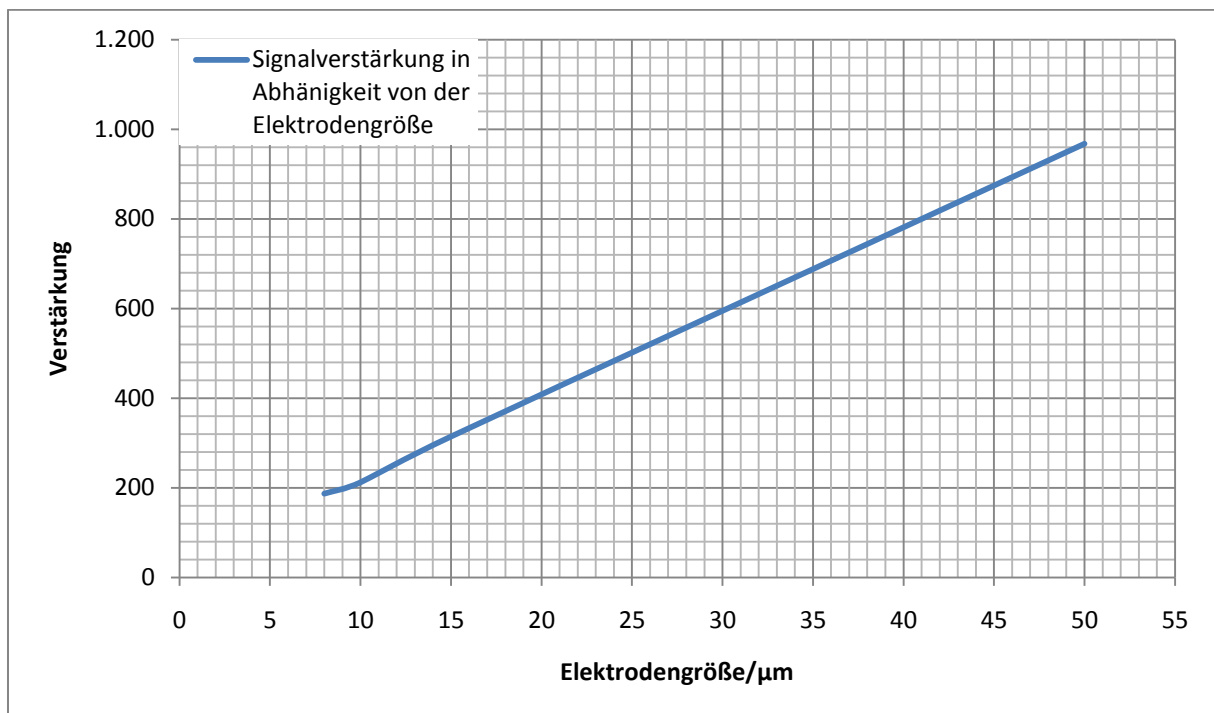


Abbildung 5.10 Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Elektrodengröße.

5.4 Zellmessung

Für die Zellmessungen wurden MEAs mit verschiedenen Elektrodengrößen verwendet und die Chips, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, vorbereitet. Da ein Vergleich der Zellsignale für das BioMAS Messsystem und das MEA Verstärkersystem hergestellt werden sollte, wurden die Messungen, um möglichst die gleichen Voraussetzungen in Bezug auf die Zellaktivität zu haben, direkt hintereinander durchgeführt. Das Experiment sollte zeigen, ob es Unterschiede in der Signalstärke und -qualität zwischen den beiden Messsystemen gibt. Die Vorbereitung der Chips für die Zellmessung und die Zellkultivierung auf den Chips sind in Kapitel 3.6 erläutert.

Die erste Messreihe wurde mit 50 μm IrOx MEAs durchgeführt und ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Das Ergebnis der Peak-to-Peak Messung zeigt, dass die Zellsignale auf beiden Systemen, mit 0,21 mV für BioMAS und 0,32 mV für den MEA Verstärker ähnlich hoch sind. Auch die Frequenz, mit der die Signale auftauchen ist mit 0,4 Hz für das BioMAS Messsystem und den MEA Verstärker gleich. Betrachtet man jedoch die Signalqualität, lassen sich starke Unterschiede zu Gunsten des MEA Verstärkers feststellen. Der Grund liegt zum Einen in der Auflösung der Graphen, zum Anderen aber auch in dem erhöhten Rauschanteil im Signal des BioMAS Messsystems. Diese Tendenz hatte sich bereits bei den Rauschmessungen gezeigt (Kapitel 5.2) und wird durch die Zellmessungen nochmals bestätigt. Allerdings ist der Rauschanteil nicht so hoch, dass die Aktionspotenziale in ihm „untergehen“. Da das mittels MEA Verstärker gemessene Signal etwas schwingt, konnte die Auflösung der Ordinate nicht für beide Systeme gleich gewählt werden. Allerdings hat das schwingende Signal keine Auswirkung auf die Messergebnisse der Signalstärke, da hierfür immer die Weite zwischen Maximal- und Minimalwert verwendet wurde.

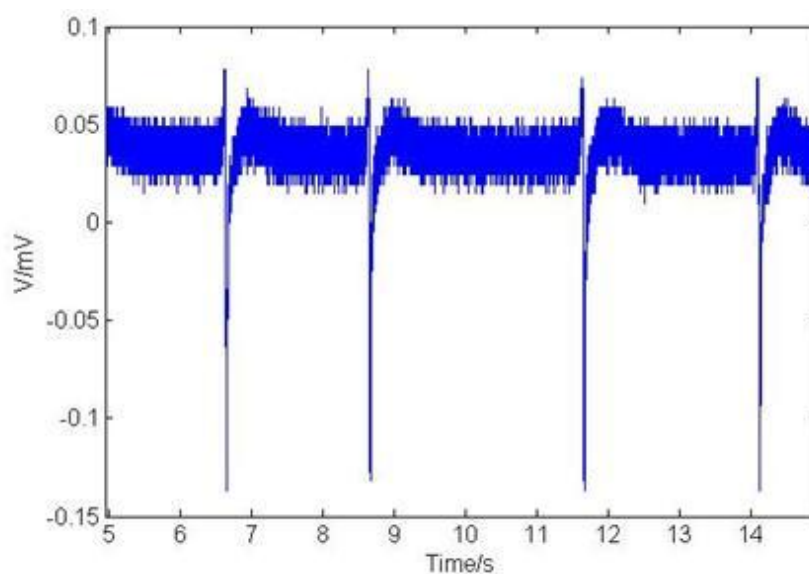


Abbildung 5.11 Aktionspotenziale von HL-1 Zellen, gemessen mit dem BioMAS Messsystem. Chip: IrOx Kanal 56.

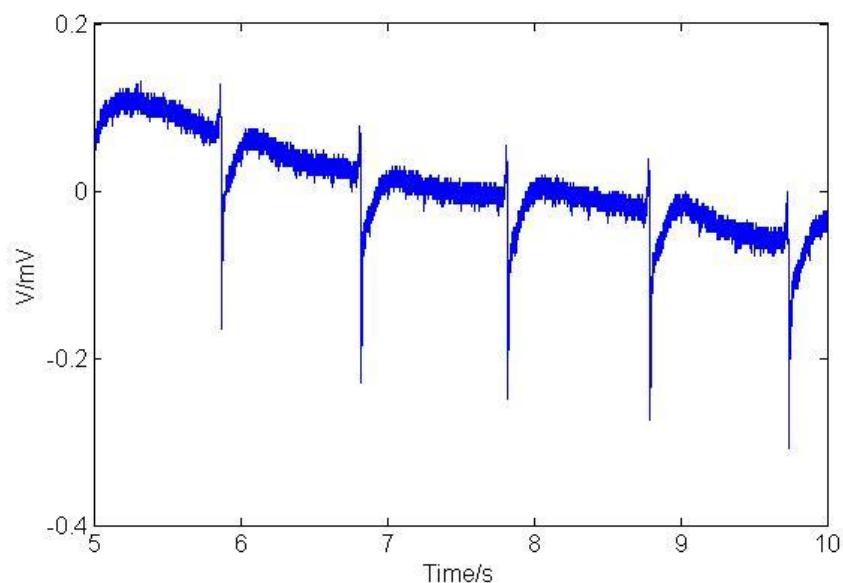


Abbildung 5.12 Aktionspotenziale von HL-1 Zellen, gemessen mit dem MEA Verstärkersystem. Chip: IrOx Kanal 56.

In Tabelle 5.2 sind die Messwerte für beide Systeme dargestellt. Auffallend ist, dass sich bei der Signalstärke keine Tendenz in Bezug auf das Messsystem erkennen lässt, im Gegensatz zu den anderen durchgeführten Messungen (Kapitel 5.3). Im Vergleich der Chips sind die Signalstärken im Schnitt bei den 50 μm IrOx-Elektroden am größten, so wie es sich auch bei vorherigen Messungen abgezeichnet hatte. Durch die großen Elektroden ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle direkt über die Elektrodenoberfläche gewachsen ist, um einiges höher als bei den kleineren Elektroden.

Tabelle 5.2 Messergebnisse der Zellmessung für BioMAS und den MEA Verstärker.

Messsystem	Elektrodengröße in μm	Peak-to-Peak in mV	Signalfrequenz in Herz
MEA	8	1,4	0,4
BioMAS	8	0,14	0,3
MEA	10	0,19	0,3
BioMAS	10	0,8	0,4
MEA	50	0,32	0,5
BioMAS	50	0,21	0,4

Betrachtet man die Ergebnisse der kleineren Elektroden, so ist auffällig, dass die Signalstärken der Messsysteme stark voneinander abweichen. Dadurch, dass die Chips bei jeder neuen Messung aus der Headstage des einen in die Headstage des anderen Systems gelegt werden mussten, kann es beispielsweise passiert sein, dass sich die Zelle durch die Erschütterung beim Einsetzen des Chips von

der Oberfläche gelöst hat. Damit würden lediglich periphere Signale aufgezeichnet werden, deren Signalstärke weitaus schwächer ist, als die Signale der Zellen. Ein weiteres Problem bei Zellmessungen ist, dass die Zellen mit zunehmender Dauer schwächer werden. Trotz Aufbewahrung der Chips auf einer 37 °C warmen Herdplatte überleben die Zellen nicht sehr lange. Um allerdings doch noch Zellsignale zu bekommen, kann Adrenalin zum Zellmedium hinzu gegeben werden. Der Effekt ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Die Zellsignale stammen von den gleichen Zellen wie in Abbildung 5.13. Vergleicht man die Signalstärken ist kein großer Unterschied zu erkennen. Die Frequenz jedoch liegt nach Zugabe von Adrenalin etwa drei Mal so hoch wie ohne Adrenalin (siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Vergleich der Signalstärke und Frequenz mit und ohne Zugabe von Adrenalin.

	Peak-to-Peak in mV	Frequenz in Hz
Zellkultur ohne Adrenalin	0,18	0,4
Zellkultur mit Adrenalin	0,2	1,25

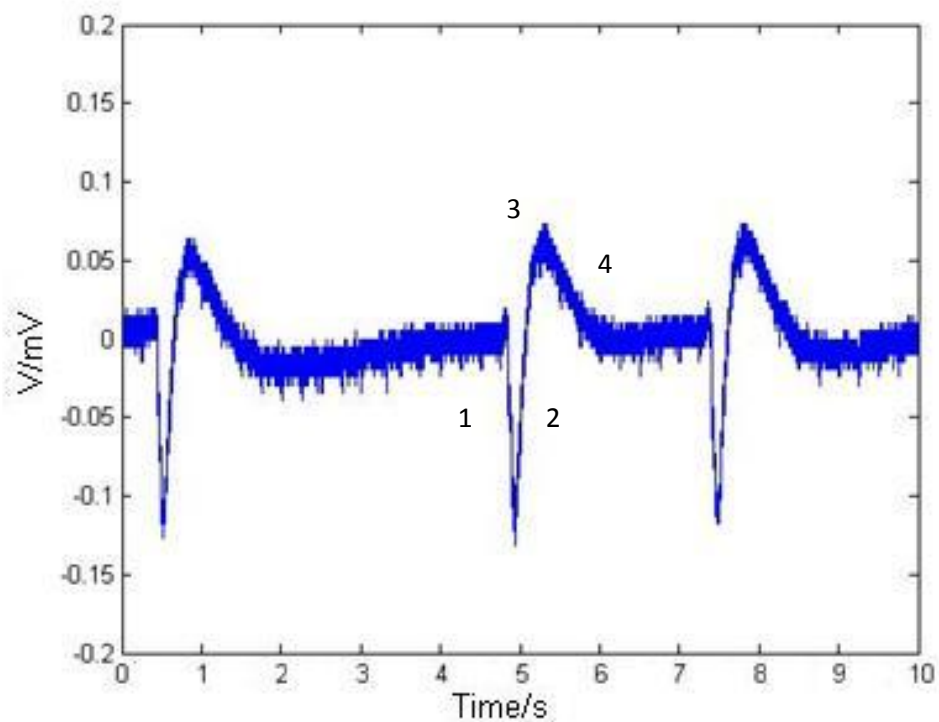


Abbildung 5.13 Drei Aktionspotenziale von HL-1 Zellen mit der typischen Signalform. Bei „1“ findet der schnelle Natriumeinstrom in die Zelle statt und die Zelle depolarisiert. Bei „2“ folgt ein langsamer Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und sorgt für einen weiteren Anstieg des Potentials bis zum overshoot „3“ Bei „4“ findet der repolarisierende K^+ -Ausstrom aus der Zelle statt.

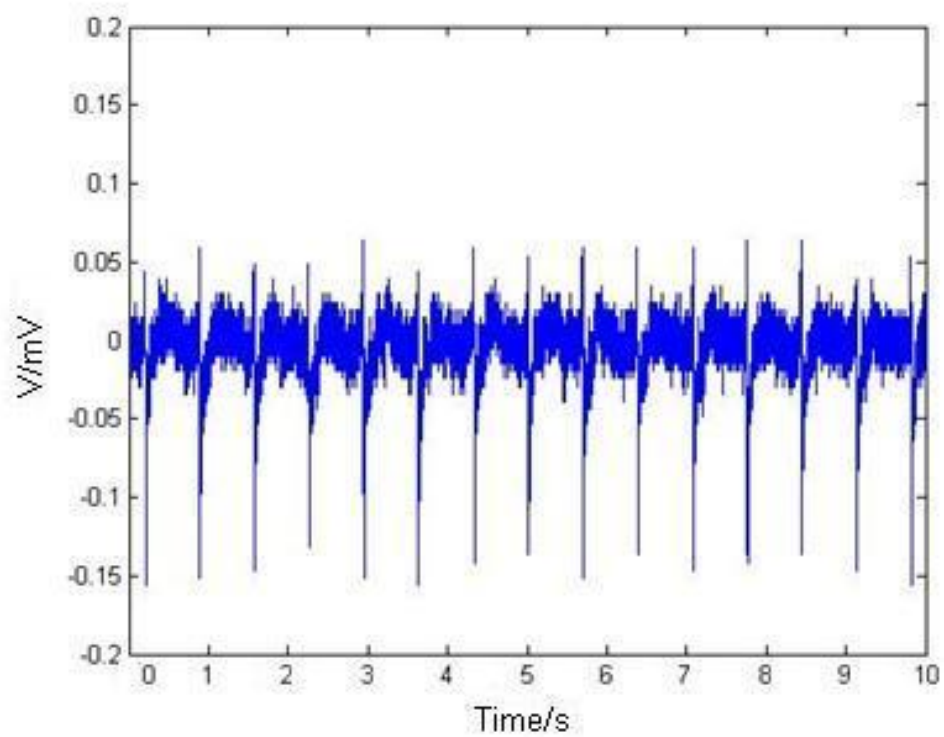


Abbildung 5.14 Ableitung von Zellsignalen nach der Zugabe von 5 μl Adrenalin in das Zellmedium.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Messsysteme zur extrazellulären Ableitung von Zellsignalen vorgestellt und die damit durchgeführten Experimente erläutert. Dabei wurden verschiedene MEAs mit unterschiedlichen Elektrodengrößen und Beschichtungen verwendet.

Die „Standard“ Gold MEAs werden immer weiter modifiziert, um die Elektroden möglichst klein zu halten, dafür aber immer größere Elektrodenoberflächen zu schaffen. Möglich ist dies zum Beispiel durch das Beschichten der Elektroden, wie es bei den IrOx MEAs der Fall ist. Eine weitere Möglichkeit ist die Wahl des Materials für die Elektroden. Verwendet man statt Gold speziell beschichtete Diamanten, lassen sich die Elektroden weiter verkleinern.

In verschiedenen Experimenten wurden die Systeme in Bezug auf Impedanz, Rauschen und Zellsignale miteinander verglichen. Für die Impedanzmessung lässt sich sagen, dass das BioMAS Messsystem schlechter abgeschnitten hat als sein Vorgänger, was allerdings darauf zurückzuführen ist, dass in dem neuen Messsystem sehr viele Funktionen integriert wurden. Es bieten sich jetzt viel mehr Einstellmöglichkeiten über die eigens für das System entwickelte Software MEA64. Dadurch, dass beispielsweise die Verstärkungsstufen variiert werden können oder die Bandbreite des Filters einstellbar ist, ist man bei der Messung viel flexibler.

In Bezug auf die Rauschmessung war ebenfalls zu erkennen, dass das BioMAS Messsystem noch Schwächen aufweist. Auch wenn noch nicht geklärt werden konnte, ob das hohe Rauschsignal auf einen Fehler in der Elektronik oder der Abschirmung zurückzuführen ist. Durch weitere Messungen sollte das Problem allerdings eingegrenzt werden können.

Die Zellmessungen ergaben, dass es trotz des erhöhten Rauschsignals möglich ist, Zellsignale abzuleiten. Große Unterschiede zwischen den Systemen fielen nicht auf. Einzig die Auflösung des Messsignals des BioMAS Messsystems ist verbesserungswürdig, was aber mit der Fertigstellung der Einstellung für die ADC-Range behoben sein sollte.

In der näheren Zukunft werden die ersten Tests mit den neuen Mi-BeSAN Chips durchgeführt und somit das neue System mit allen Funktionen getestet werden können. Die Möglichkeit der Stimulation und gleichzeitigen Ableitung von Zellsignalen mit einem Chip werden die Experimente enorm vereinfachen.

7 Literaturverzeichnis

1. **C.A. Thomas Jr., P.A. Springer, G.E. Loeb, Y. Berwald-Netter, L.M. Okun.** A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells, *experimental cell research*, 74, academic press, 1972, S. 61-66.
2. **P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter, J. Weis.** A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor, *Science*, 252, 1991, S. 1290-1293.
3. **P. Bethge, G. Traufetter.** digitales wiedersehen, *Spiegel*, 52, 2009, S. 126-128.
4. Uni-Protokolle, *Elektrisch erregbar*, [Online] Januar 2010. http://www.uni-protokolle.de/Lexikon/Elektrisch_erregbar.html.
5. **N.A. Campbell, J.B. Reece,** Die Zelle, *Biologie*, 6. Pearson Studium, 2006, S. 1229-1230.
6. **N.A. Campbell, J.B. Reece,** Nervensysteme, *Biologie*, 6. Pearson Studium, 2006, S. 175-167.
7. **W.C. Claycomb, N.A. Lanson Jr., B.S. Stallworth, D.B. Egeland, J.B. Delcarpio, A. Bahinski, N.J. Izzo Jr.** HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retracts phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 1998, S. 2979-2981.
8. **N.A. Campbell, J.B. Reece,** Kreislauf und Gasaustausch, *Biologie*, 6. Pearson Studium, 2006, S. 1051-1052.
9. Wikipedia, *Cardiac Action Potential*, [Online] April 2010. http://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac_action_potential.
10. **A. Kern,** Grundlagen der Elektrotechnik, *Vorlesungsskript*, FH-Aachen, 2006, S. 97.
11. **Wikipedia,** Widerstand als Zeiger in der komplexen Ebene, [Online] Juni 2009, http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Widerstand_Zeiger.svg&filetimestamp=20090608105337.
12. **Stanford Research Systems,** Lock-In Amplifier SR530, *Manual*, Stanford Research Systems, 2001, S. 28-29.
13. TU-Berlin, *Signalverarbeitung mit Lock-In Verstärker*, [Online] Januar 2010. http://sol.physik.tu-berlin.de/htm_group/teaching/scripte/LockIn_2004.pdf , S. 9.
14. Humboldt Universität Berlin, *Versuchsbeschreibung Projekt: Lock-In Verstärker*, [Online] Dezember 2008. <http://www.physik.hu-berlin.de/studium/vlv/f-praktikum/elektronik/anleitungen/lock-in-ver.pdf> , S. 3.
15. **P. Fromherz,** Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane, *European Biophysics Journal*, 28. Springer, 1998, S. 254-258.
16. **D. Brüggemann,** *Nanostructured gold microelektrodes for functional coupling with electrogenic cells*, IBN-2, Jülich, Forschungszentrum Jülich, 2009.

17. **S. Eick**, Extracellular stimulation of individual electrogenic cells with micro-scaled electrodes. *Doktorarbeit*, Jülich, Forschungszentrum Jülich, 2010, S. 157-158.

18. **S.Eick**, Extracellular stimulation of individual electrogenic cells with micro-scaled electrodes. *Doktorarbeit*, Jülich, Forschungszentrum Jülich, 2010, S. 161-162.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt und somit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Offenhäusser, ohne den die Anfertigung der Arbeit im Forschungszentrum Jülich, am Institut für Bio- und Nanosysteme, nicht möglich gewesen wäre. Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. M.J. Schöning für die Betreuung in der Zeit der Anfertigung der Arbeit.

Ein ebenfalls großer Dank gilt meinem Betreuer Dipl.-Phys. M. Jansen, der mich während der gesamten Zeit großartig unterstützt und bei Fragen und Problemen gerne beraten hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. B. Wolfrum für die Unterstützung und Beratung bei der Auswertung der Experimente bedanken.

Ein weiterer Dank gilt V. Maybeck, für ihre Hilfe in Bezug auf biologische Fragen und das Einweisen in die Arbeit mit Zellen.

Im Allgemeinen nochmals ein Dank an das Team des IBN-2 für die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das gute Arbeitsklima.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder, sowie meiner Freundin, für die Unterstützung in der Zeit der Anfertigung der Arbeit.

Jül-4324
Juni 2010
ISSN 0944-2952