

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Membran- und Neurophysik

Raumzeitliche Abbildung neuronaler Feldpotentiale
in akuten Hirnschnitten des Hippocampus
mittels Multi-Transistor Arrays

Christian Stangl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Peter Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. Andreas Bausch

Die Dissertation wurde am 30.11.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 13.01.2010 angenommen.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Kopplung akuter hippocampaler Hirnschnitte an Siliziumchips, um mit Feldeffekt-Transistoren (FETs) neuronale Signale zu detektieren. Mit dieser Methode gilt es, neuronale Strukturen im Hirngewebe mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung abzubilden.

Bereits in [Bes 02] wurden Hirnschnitte auf Transistorchips kultiviert, um mit sehr guten Kopplungsbedingungen neuronale Feldpotentiale (extrazelluläre Summenpotentiale) zu messen. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit erstmals auf akute, d.h. frisch präparierte, hippocampale Hirnschnitte von Ratten und Mäusen übertragen. Der Vorteil liegt in der deutlicheren Nähe zu in-vivo Bedingungen, da sie – anders als Hirnschnittkulturen – keine artifizielle Strukturen ausbilden. Die Herausforderung des hier verfolgten Ansatzes besteht in präparationsbedingten Schichten inaktiver Zellen und der lockeren Bindestelle zwischen Hirngewebe und Chip, die mit Elektrolyt angefüllt ist. Beides sorgt für eine prinzipielle Abschwächung der zu detektierenden Signale.

In einem ersten Schritt wurden das Ausmaß dieser Abschwächung, sowie weitere Bedingungen für eine erfolgreiche Kontaktierung mit den Chips studiert. Die theoretische Verteilung neuronaler Feldpotentiale im Hirngewebe auf dem isolierenden Substrat wurde mittels eines Volumenleitermodells numerisch berechnet und experimentell verifiziert. Die neuronalen Signale wurden gleichzeitig mit Transistoren im Chipsubstrat aufgezeichnet. Trotz der Schicht inaktiver Zellen fanden sich am Substrat noch ca. 40% der maximalen Signalamplituden. Die elektrolytische Zwischenschicht erwies sich bei guten Kopplungsbedingungen als vernachlässigbar. Im Rahmen der Signal/Rausch-Verhältnisse der in dieser Arbeit verwendeten Transistoren ist eine Detektion von Feldpotentialen an der Unterseite der Hirnschnitte prinzipiell möglich. Es zeigte sich außerdem, dass die mit Transistoren gemessenen neuronalen Signale perfekt mit konventionellen Messungen mit Mikroelektroden übereinstimmen.

Die Messmethode wurde auf Transistorchips sehr hoher räumlicher Auflösung übertragen. In diesen, auf CMOS-Basis gefertigten Chips, war ein Multi-Transistor Array (MTA) von 128×128 Transistoren auf einer Fläche von $1 \times 1 \text{ mm}^2$ integriert. Als Anwendungsdemonstration konnten in ersten Versuchen mit dieser neuartigen Methode elementare neuronale Strukturen in hippocampalen Schnitten mit sehr hoher raumzeitlicher Auflösung abgebildet werden.

Abschließend wurden, diesen Ansatz verfolgend, neuronale Netzwerkoszillationen in Hippocampusschnitten untersucht. Dazu wurden zum einen epileptiforme Signale, zum anderen langanhaltende neuronale Oszillationen pharmakologisch ausgelöst und mit den MTAs detektiert. Mit der vorliegenden Methodik wurden Kartierungen spektraler Amplituden sowie der Phasenbeziehungen der gemessenen Signale erstellt, die ein klares Bild der Oszillation entwarfen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die entwickelte Messmethode besonders eignet, die Dynamik komplexer neuronaler Vorgänge in ausgedehnten Bereichen akuter Hirnschnitte mit bisher unerreichter Auflösung abzubilden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Anatomie und Funktion des Hippocampus	5
2.1. Anatomie hippocampaler Slices	5
2.2. Neuronale Oszillationen im Hippocampus	8
2.2.1. Epileptiforme Aktivität und ihre Modellsysteme	10
2.2.2. Persistente Oszillationen in Hippocampusschnitten	11
3. Theorie der Feldpotentiale in akuten Hirnschnitten auf Silizium-Chips	15
3.1. Feldpotentiale und Volumenleiter	15
3.2. Randbedingungen für Hirnschnitte auf isolierenden Substraten	20
3.2.1. Recording mit Transistoren	20
3.2.2. Stimulation mit Kondensatoren	23
3.3. Kopplungsmodelle akuter Hirnschnitte auf Siliziumchips	25
3.3.1. Recording: Hirnschnitt auf Chip ohne Spalt	26
3.3.2. Recording: Hirnschnitt auf Chip mit zusätzlichem Spalt	30
3.3.3. Stimulation: Auswirkung inaktiver Zellen und möglicher Spalt	36
4. Materialien und Methoden	41
4.1. Akute hippocampale Hirnschnitte	41
4.1.1. Präparation	42
4.1.2. Aufbewahrung der Hirnschnitte	43
4.1.3. Verwendung von Agonisten und Antagonisten	43
4.2. Prinzip des Transistorrecordings neuronaler Feldpotentiale	44
4.3. Verwendete Chips	46
4.3.1. Chips mit hochauflösenden linearen Arrays	46
4.3.2. Loop-Chips mit Transistor- und Stimulationsarray	48
4.3.3. CMOS-Chip mit Multi-Transistor-Array	49
4.4. Aufbau der Messapparaturen	52
4.4.1. Setup für einfache FET-Chips	52
4.4.2. Setup für CMOS-Chips	54
5. Kopplung akuter Hirnschnitte an Silizium-Chips	59
5.1. Profil von Feldpotentialen entlang eines Transistorarrays	59
5.2. Vertikales Profil von Feldpotentialen im Hirnschnitt auf einem Substrat	62
5.3. Recording neuronaler Feldpotentiale: Transistor im Vergleich mit Mikro-	
pipette	70

5.4. Experimente zur Stimulation akuter Hirnschnitte	72
5.5. Diskussion	73
6. Kartierung hippocampaler Strukturen mit CMOS-Chips	75
6.1. Messanordnung und Messdurchführung	75
6.2. Stimulation des CA3	76
6.3. Stimulation der Schaffer Kollateralen	78
6.4. Die Schaffer-Kollateralen und die Projektion von CA3-CA1	80
6.5. Diskussion	85
7. Raumzeitliche Abbildung Epileptiformer Aktivität	87
7.1. Messung mit Mg-freiem Medium: Raumzeitliche Kartierung	87
7.2. Synchronität und Lokalisierung der Ripples	90
7.3. Messung mit Bicucullin	96
7.4. Diskussion	98
8. Raumzeitliche Abbildung neuronaler Oszillationen im beta- und gamma- Bereich	99
8.1. Messanordnung und Messdurchführung	99
8.2. Synchrone Oszillationen im CA3 und CA1	101
8.3. Kartierung der Oszillation durch räumliche Verteilung spektraler Leistungsdichten	105
8.4. Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit	111
8.4.1. Variation der CCH-Konzentration	111
8.4.2. Kurzzeitige Änderung der Grundfrequenz	113
8.5. Diskussion	114
9. Zusammenfassung und Ausblick	115
A. Anhang	117
A.1. Zur Signalform extrazellulärer Feldpotentiale im CA1	117
A.2. Ergänzungen zu Experimenten mit MTA-Chips	118
A.2.1. Orte der postsynaptischen population Spikes	118
A.2.2. Ergänzung zur Messung epileptiformer Aktivität	120
A.2.3. Aktivität im Gyrus Dentatus unter Mg-freier ACSF	123
A.2.4. Ergänzung zu Messungen persistenter Oszillationen	125
A.3. Geräte und Materialien	128
A.4. Lösungen	129
A.5. Chemikalien	130
A.6. Software	130
B. Abkürzungsverzeichnis	131
C. Abbildungsverzeichnis	133
D. Literaturverzeichnis	137

1. Einführung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Kopplung akuter Hirnschnitte mit Siliziumchips, um mit Feld-Effekt Transistoren (FET) neuronale Vorgänge nichtinvasiv detektieren zu können. Ziel ist, die raum-zeitliche Dynamik wichtiger Schaltkreise in frisch präparierten, sog. *akuten Hirnschnitten* des Hippocampus sowohl in hoher räumlicher, als auch hoher zeitlicher Auflösung abzubilden. Halbleitertechnologien ermöglichen dabei die Fertigung von Chips mit Transistorarrays sehr kleiner Schrittweiten.

Um diesen Ansatz verfolgen zu können, ist, neben der Etablierung notwendiger Techniken, ein eingehendes Studium des Systems erforderlich, um das Prinzip eines Interfacing frisch geschnittenen Hirngewebes mit Siliziumchips verstehen zu können. Es soll darüber hinaus gezeigt werden, dass mit dieser Methodik die Strukturen komplexer neuronaler Netzwerkaktivitäten – wie z.B. epileptische Zustände und neuronale Oszillationen – untersucht werden können. Da die vorliegende Arbeit methodischer Ausrichtung ist, ist deren Studium vorerst phänomenologischer Natur.

Ausgangssituation und Motivation

Messungen neuronaler Signale wurden bereits in früheren Arbeiten erfolgreich durchgeführt ([Fro 91], [Sch 98]). Eine kapazitive Kopplung von Hirngewebe mit Transistorchips wurde anschließend anhand von *Hirnschnitt-Kulturen* in [Bes 02] realisiert, wo man Hirngewebe im Brutschrank für mehrere Tage mit dem Chipsubstrat verwachsen ließ. Mit Feldeffekt-Transistoren konnte die elektrische Aktivität neuronaler Ensembles – in der Neurobiologie Feldpotential genannt – von der Unterseite der Schnitte aus gemessen werden. Eine chipseitige Stimulation kultivierter Hirnschnitte folgte in [Hut 04].

Die Schnittkulturen – auch *organotypische Hirnschnitte* genannt – garantierten zwar durch Festwachsen am Substrat ideale Kopplungsbedingungen. Sie besitzen jedoch einen entscheidenden Nachteil, während der 1 bis 3-wöchigen Kulturphase artifizielle Strukturen hinsichtlich ihrer Netzwerkarchitektur auszubilden. Wünschenswert ist jedoch die Etablierung von Modellsystemen, die in-vivo Messungen sehr nahe kommen.

Abhilfe schafft hier die Verwendung von akuten Hirnschnitten, bei denen direkt nach der Präparation neuronale Signale für bis zu 12 h messbar sind. Wenn diese an Chips gekoppelt werden können, ist es möglich, mit Hilfe von Halbleitertechnologien in hoher raum-zeitlicher Auflösung neuronale Strukturen zweidimensional zu detektieren. So können möglichst realitätsnah funktionelle Eigenschaften neuronaler Netzwerke in Hirnschnitten studiert werden zu untersuchen (siehe Abbildung 1.1).

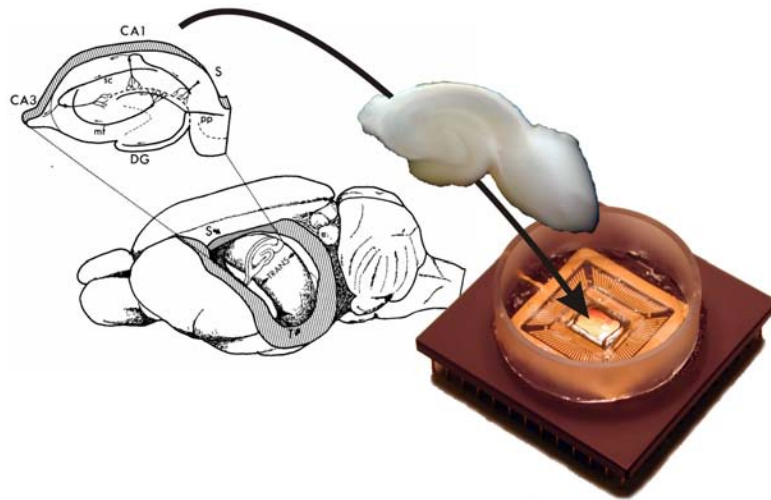


Abbildung 1.1. Akuter Hirnschnitt auf Transistorchip: aus einer Präparation des Hippocampus aus dem Gehirn von Ratten oder Mäusen wird ein transversaler Hirnschnitt mit einer Dicke von 350 bis 400 μm angefertigt. Dieser wird auf die Chipoberfläche geeignet aufgebracht, so dass neuronale Signale an der Unterseite des Hirnschnitts durch die Transistoren im Chip aufgezeichnet werden können. Hier: CMOS-gefertigter MTA-Chip, gebondet auf einem Keramikpackage. Die Kontaktstellen sind durch Silikonkleber geschützt. Ein Stützring aus PMMA bildet die Recordingkammer, die bei der Messung mit elektrolytischem Medium (ACSF) gefüllt ist. Dieses ist sowohl für die Kontaktierung der Transistoren, als auch für die Versorgung des Hirnschnitts zuständig (Zeichnung des Hippocampus nach [She 03]).

Dass dies möglich ist, zeigt diese Arbeit. Die Anforderung besteht darin, ein Interfacing mit akuten, d.h. frisch geschnittenen Hirnschnitten mit Transistorchips zu etablieren. Im Anschluss ist das System auf CMOS-gefertigte Chips anzuwenden, die eine räumlich hochauflösende Sensorstruktur von 128×128 Transistoren auf 1 mm^2 mit sich bringen [Eve 03], und deren Vorgängerversion bereits in [Lam 04] und [Hut 06a] eingesetzt wurde.

Die Herausforderung bei der Messmethode „akuter Hirnschnitt auf Chip“ steckt im Detail: da mit den Hirnschnitten direkt nach der Präparation experimentiert wird, befindet sich zwischen ihren aktiven neuronalen Elementen und den Transistoren auf den Chips eine Schicht inaktiver Zellen, die durch den Schneidprozess entsteht. Bei organotypischen Hirnschnitten würden diese während des Kulturprozesses abgebaut werden. Während diese in dieser Zeit zusätzlich am Substrat festzuwachsen beginnen, liegen im vorliegenden Fall akute Hirnschnitte lose auf dem Substrat auf. Eine mögliche, zusätzliche Schicht aus Elektrolyt zwischen Schnitt und Substrat erschwert demnach die kapazitive Kopplung an die Feld-Effekt Transistoren. Die Ausmaße und Auswirkungen der inaktiven Zellen sowie einer elektrolytischen Zwischenschicht gilt es näher zu bestimmen.

Gliederung dieser Arbeit

Um oben genannte Ziele zu realisieren, wurden folgende einzelne Schritte unternommen. Damit kann gleichsam der Aufbau dieser Arbeit skizziert werden.

Vorerst erfolgt in **Kapitel 2** eine kurze Übersicht über den Aufbau und die Funktion des Hippocampus. Die Mechanismen der später zu messenden Netzwerkoszillationen werden dort ebenfalls kurz umrissen.

Anschließend wird in **Kapitel 3** das Interfacing akuter hippocampaler Hirnschnitte mit Siliziumchips theoretisch untersucht. Anhand eines Volumenleitermodells werden Kopplungsbedingungen bezüglich o.g. Gesichtspunkte abgeschätzt, die eine Verwendung akuter Hirnschnitte mit sich bringt. Leitfragen sind, unter welchen Voraussetzungen sowohl die Detektion als auch Stimulation mittels Siliziumchips möglich ist, und mit welchen Verlusten man in den Versuchen zu rechnen hat.

Im Anschluss werden in **Kapitel 4** experimentelle Methoden vorgestellt, die nötig waren, um die Kopplung akuter Hirnschnitte an Halbleiterchips zu realisieren. Hier werden sowohl die Präparation der Hirnschnitte, als auch alle verwendeten Chiptypen und Versuchsaufbauten beschrieben.

Erste experimentelle Ergebnisse erfolgen in **Kapitel 5**, wo die prinzipielle Durchführung der Hirnschnitt-Chip Kopplung vorgestellt wird. Ebenso werden dort theoretisch gewonnene Erfahrungen hinsichtlich der passiven Signalausbreitung in Hirnschnitten experimentell verifiziert. Es wird außerdem gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendete Messmethode mit etablierten Messvorrichtungen äquivalent ist. Abschließend wird die experimentelle Durchführbarkeit einer Stimulation mit planaren Kondensatoren auf Siliziumchips diskutiert.

Die Messmethode kann nun in **Kapitel 6** auf die hochauflösenden MTAs übertragen werden: es wird gezeigt, dass es damit prinzipiell möglich ist, intrinsische neuronale Strukturen in akuten Hirnschnitten raum-zeitlich aufzulösen. Dies geschieht exemplarisch anhand der Lokalisierung wichtiger Schaltkreise des Hippocampus. Dazu werden geeignete Darstellungen eingeführt, anhand derer die raum-zeitlichen Ausprägungen der gemessenen neuronalen Signale aufgezeigt und kartiert werden können.

In **Kapitel 7** wird – in einer ersten Anwendung – dieser vorteilhafte Ansatz der raum-zeitlichen Kartierungen in einem Studium komplexer hippocampaler Netzwerkaktivitäten fortgesetzt. Es werden epileptiforme Aktivitäten in Hirnschnitten ausgelöst und mit den MTAs abgebildet. Es werden auch schnelle Oszillationen, die für Epilepsien typisch sein können, studiert.

In ähnlicher Weise können in **Kapitel 8** funktionell unterschiedliche, synchronisierte Netzwerkoszillationen abgebildet werden, die pharmakologisch induziert werden. Hauptaugenmerk ist, jene Regionen zu identifizieren, die als Generatoren die Netzwerkoszillation verursachen.

Den Schluss bildet **Kapitel 9** mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit, sowie einem kurzen, experimentellen Ausblick.

1. Einführung

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits vor der Fertigstellung in [Sta 08] veröffentlicht.

2. Anatomie und Funktion des Hippocampus

Folgendes Kapitel soll einen Überblick über Aufbau und Funktionsweise des Hippocampus verschaffen. Es werden auch Mechanismen bestimmter Netzwerkoszillationen vorgestellt, die mit Multi-Transistor Arrays (MTAs) gemessen wurden und in den Kapiteln 7 und 8 studiert werden.

Der Hippocampus zählt zu den ältesten Arealen in den Gehirnen der Säugetiere und ist ein Teil des entwicklungsgeschichtlich frühen Archicortex, der sich durch einen gleichförmigen, dreischichtigen Aufbau auszeichnet. Im weiteren Sinne werden vier benachbarte Areale zur hippocampalen Formation zusammengefasst: (i) der Gyrus dentatus (GD), (ii) das Ammonshorn (Cornu ammonis, CA), (iii) das daran anschließende Subiculum, sowie (iv) der Gyrus parahippocampalis, der den entorhinalen Cortex (EC) enthält. In der Literatur werden mit dem Hippocampus oft die Teile (i) bis (iii) bezeichnet. Abbildung 2.1 (A) zeigt seine Lage und Orientierung im Gehirn der Ratte.

Die Hauptfunktion des Hippocampus liegt in der Gedächtnisbildung, z.B. um Inhalte aus dem Kurzzeit- ins deklarative Langzeitgedächtnis überzuführen (Konsolidierung). In Verbindung mit dem EC steht die hippocampale Formation auch für ein funktionierendes Orientierungsvermögen. Bereits in den 50er Jahren des 20. Jhds. zeigte sich, dass ein Totalausfall des Hippocampus in beiden Hemisphären mit einer anterograden Amnesie einhergeht, also keine neuen Informationen im deklarativen Langzeitgedächtnis abgespeichert werden können. Auch ein fortschreitender Verlust von Neuronen im EC wird für frühe Symptome der Alzheimer-Krankheit verantwortlich gemacht [Han 01]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten hippocampalen Hirnschnittpräparate bzgl. ihrer Anatomie sowie intrinsischen Netzwerkfähigkeit vorgestellt.

2.1. Anatomie hippocampaler Slices

Die Etablierung des Hippocampus als beliebtes Studienobjekt liegt v.a. an seinem *lamellaren Aufbau*. Entlang der septotemporalen Achse (von dorsal nach ventral in Abb. 2.1 A) zeigen transversale Schnitte stets dieselbe Struktur aus den 2 ineinandergreifenden Windungen, dem Cornu ammonis (CA, Ammonshorn) und dem Gyrus dentatus (GD). Da die synaptischen Projektionen hauptsächlich entlang der transversalen Ebene verlaufen, bleiben diese bei entsprechenden Hirnschnittpräparationen näherungsweise

2. Anatomie und Funktion des Hippocampus

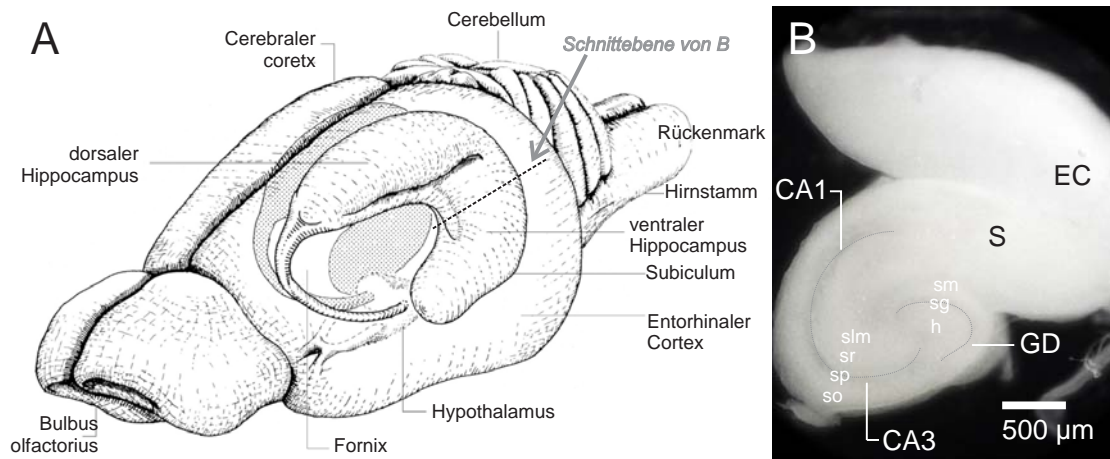


Abbildung 2.1. Der Hippocampus im Gehirn der Ratte und als akut präparierter Hirnschnitt. **(A)** Lage des Hippocampus im Gehirn der Ratte mit benachbarten Arealen (nach [Ama 04]). **(B)** Akut präparierter transversaler Hirnschnitt aus dem medialen Teil der Hippocampusformation nach horizontalem Schnitt durch das Hirn gemäß Linie in (A). Gut zu erkennen ist das Cornu Ammonis (CA1 – CA3) sowie der Gyrus dentatus (GD). Weitere Bezeichnungen: Subiculum (S) sowie Entorhinaler Cortex (EC); Schichtung entlang des CA: Stratum oriens (so), Stratum pyramidale (sp), Stratum radiatum (sr) sowie Stratum lacunosum moleculare (slm); analog GD: Stratum moleculare (sm), Stratum granulare (sg) sowie Hilus (h). (eigene Präparation)

erhalten (typische Dicken: 350 – 400 µm).

Anatomischer Aufbau Abb. 2.1 (B) zeigt einen akuten Hirnschnitt der hippocampalen Formation nach einem koronalen Schnitt durch die Mitte des Gehirns einer Maus. Er enthält einen Teil des Entorhinalen Cortex (EC), sowie den eigentlichen Hippocampus mit dem Gyrus Dentatus (GD), dem Subiculum (S), sowie dem CA-Bogen. Aufgrund morphologischer Unterschiede wurde dieser früher in 4 Teile unterschieden, wobei in neuerer Literatur meist nur noch der CA3 und CA1 funktionell voneinander abgegrenzt werden. Beim Gyrus dentatus sind als vorherrschender Zelltyp (Prinzipalzellen) die Körnerzellen zu nennen (Durchmesser ca. 10 µm), beim CA-Bogen hingegen handelt es sich um Pyramidenzellen (bis zu 30 µm). Senkrecht zu den Zellschichten sind sowohl der GD, sowie der CA-Bogen mehrschichtig und kolumnenartig aufgebaut. Letztere beide, CA1 und CA3 bestehen je aus dem Stratum pyramidale (sp, dem Ort der pyramidalen Zellkörper), dem je benachbarten Stratum oriens und Stratum radiatum (so, bzw sr, den Orten der Axone sowie z.T. bipolar ausgebildeten Dendritenbäumen), sowie dem Stratum lacunosum moleculare (slm, hauptsächlich von Interneuronen dominiert). Beim GD werden analog das Stratum moleculare (sm, außerhalb liegende Dendritenbäume), das Stratum granulare (sg, Schicht der Körnerzellen) sowie der Hilus unterschieden (h, innerhalb liegende Dendritenbäume sowie eine dichte Schicht von Interneuronen).

Sämtliche Schichten sind zusätzlich von einer großen Anzahl unterschiedlicher Inter-

neurone durchzogen, die sowohl auf Axone, Somata und Dendriten der Prinzipalzellen inhibitorisch projizieren, als auch aufeinander. Darunter hervorzuheben sind die Korbzellen (Basketcells), welche in einem Geflecht die Pyramidenzellen des CA umgeben. Sie bilden sowohl mit den Dendriten der Pyramidenzellen als auch mit deren Zellkörpern Synapsen; die Somata werden z.T. jeweils von über 20 verschiedenen Korbzellen innerviert. Diese wiederum sind untereinander durch Parvalbumin-exprimierende inhibitorische Synapsen verbunden, die sich durch besondere Schnelligkeit auszeichnen.

Synaptische Organisation Abbildung 2.2 zeigt schematisch die exzitatorischen neuronalen Projektionen innerhalb des Hippocampuschnittes. Die Haupterregungswege zwischen den Arealen EC – GD – CA – Subiculum werden durch drei (exzitatorische) Synapsenstufen zum sog. „trisynaptischen Erregungsweg“ zusammengefasst. Die breiteste Projektion in den Hippocampus – vom EC kommend – ist der Tractus perforans (perforant pathway, pp), der an der äußeren Seite des Stratum moleculare Synapsen mit den Körnerzellen bildet. An der inneren Seite des Stratum moleculare enden Faserbündel der kommissural/assoziativen Afferenzen (AC) aus dem kontralateralen Hippocampus [Frs 06], über die die limbischen Systeme beider Hemisphären miteinander verbunden sind. Die Axone des Stratum granulare des GD bilden die Moosfasern, die als Hauptinput in den CA3 projizieren (Afferenz). In dessen Dendritenregion, dem Stratum radiatum, lösen die Aktionspotentiale (APs) der Axone an den Synapsen exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) aus. Sind diese groß genug, kommt es im Stratum pyramidale, wo sich die Pyramidenzellen des CA3 befinden, zu postsynaptischen APs. Diese propagieren entlang der Axone der CA3 Zellen. Ein gewisser Teil der CA3-Pyramidenzellen ist autoassoziativ organisiert. Der größte Anteil jedoch projiziert über die zu den sog. Schaffer-Kollateralen gebündelten Axone in den CA1. Dessen Neurone werden zusätzlich über die Fimbria hippocampi ¹ von einer weiteren kommissural/assoziativen Afferenz kontaktiert (AC, in Fig. 2.2), die aus entsprechenden hippocampalen Regionen der gegenüberliegenden Hemisphäre (contralateral) kommen. Nach dieser dritten Synapsenstufe bildet die Projektion der CA1-Pyramidenzellen – über das Subiculum in den EC – die Hauptefferenz (Output) aus dem Hippocampus heraus.

Besonderheiten bei Hirschnittpräparaten Bei der Präparation von akuten, d.h. frisch präparierten 350 – 400 µm dicken Hirschnitten, die am gleichen Tag bei Experimenten zum Einsatz kommen, werden trotz des lamellaren Aufbaus einige Funktionen zerstört. Die an den Schnittflächen liegenden neuronalen Schichten sind aufgrund der Präparation entweder direkt zerstört oder nicht mehr aktivierbar, weil die Verbindungen zu ihnen durchtrennt sind. Literaturangaben zufolge weist diese Lage inaktiver Zellen eine Schichtdicke von bis zu 50 – 70 µm auf ([Heu 02], [Tey 80]). In [Gei 02] wurden mit verbesserter Technik in den ersten 10 µm aktive Zellen für patch-clamp Experimente

¹Die Fimbria hippocampi ist direkt neben dem CA3 gelegen.

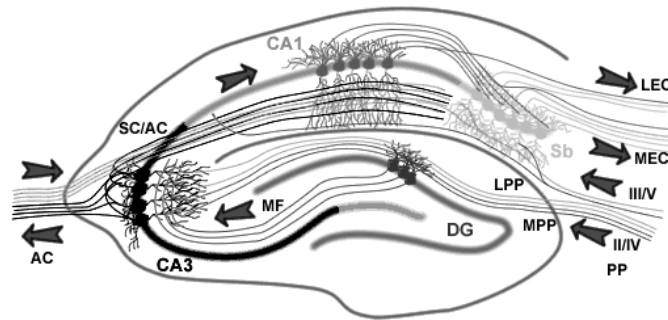


Abbildung 2.2. Neuronale Projektionen im hippocampalen Hirnschnitt im hippocampalen Hirnschnitt. Am breitesten ist der trisynaptische Erregungsweg ausgebildet, über den entorhinaler Cortex, Gyrus Dentatus, CA3 und CA1 miteinander verbunden sind. Die entsprechenden axonalen Faserbündel sind der Tractus perforans (perforant pathway, PP), die Moosfasern (MF) und die Schaffer-Kollateralen (SC). Nach [Syn 03]

gefunden (diese wurde auch in dieser Arbeit umgesetzt). Dennoch wird an den Schnittträgern keine sehr gute, sogenannte „open field“-Architektur² vorzufinden sein, wie in der Mitte des Schnittes: dort werden durch synchrone Aktivität parallel aktivierter neuronaler Elemente hohe Feldpotential-Amplituden erzeugt (siehe Abschnitt 3). Deshalb ist die Beschaffenheit dieser Schicht inaktiver Zellen an den Schnittoberflächen ein entscheidendes Merkmal für die Güte der Kopplung akuter Schnitte mit Siliziumchips.

Generell ist im Übrigen davon auszugehen, dass diejenigen Neurone im Schnitt, deren Axone durchtrennt werden, nicht mehr aktiviert werden können. Dabei sind sowohl kommissural / assoziative Fasern als auch Fasern des trisynaptischen Erregungsweges betroffen, welche nicht unbedingt perfekt in einer Ebene verlaufen. In Experimenten stellt es sich deshalb als besonders schwer heraus, Projektionen über zwei oder drei Synapsenstufen hinweg nachzuweisen. Es ist an dieser Stelle auch anzumerken, dass in den meisten Slice-Präparaten, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, der EC entfernt wurde. Dadurch wurden kompaktere Schnitte mit einer möglichst kleinen intrinsischen Oberflächenkrümmung erreicht, um schlechten Kontakt zum Substrat zu vermeiden. Allerdings konnte in den Experimenten der GD nur noch schwer direkt stimuliert werden.

2.2. Neuronale Oszillationen im Hippocampus

Ziel dieser Arbeit ist nicht nur, einzelne intrinsische neuronale Verbindungen, wie sie eben angesprochen wurden, mittels Chipmessungen nachzuweisen. Ein interessanter Aspekt darüber hinaus ist, neuronale Netzwerkaktivitäten des Hippocampus abzubilden und zu studieren. Ein besonderes Augenmerk gilt neuronalen Oszillationen. Deshalb

²„open field“: Menge wohlgeordneter neuronaler Ensembles gleicher Art, die synchron aktiv sind (EPSPs, prä- und postsynaptische APs) und deren extrazelluläre Signale sich positiv überlagern und verstärken; siehe auch Anhang, Kap. A.1.

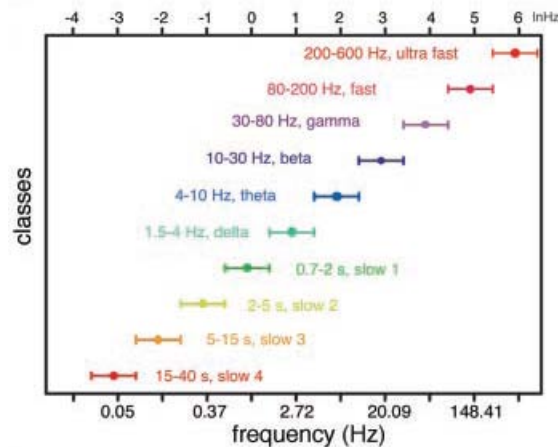


Abbildung 2.3. Klassen neuronaler Oszillationen im Cortex von Ratten (aus: [Buz 04]).

seien im Folgenden einige Aspekte angesprochen, die uns später in den Messungen begegnen werden.

Neuronale Oszillationen sind seit der Entdeckung der Alpha-Wellen (8 bis 12 Hz) in Elektroenzephalogrammen (EEGs) durch Hans Berger bekannt. Bei Testpersonen sind diese exemplarisch bei völliger Entspannung im hinteren Teil des Kopfes messbar und werden durch Öffnen der Augen sofort beendet oder wechseln ihre Frequenz ([Ber 29], [Han 01]). Seitdem wurden viele andere Rhythmen in EEGs gefunden, funktionell in Klassen, ihren Frequenzbändern entsprechend, geordnet und mit verschiedenartigen Zuständen des Gehirns in Verbindung gebracht (siehe Abb.2.3; siehe auch [Buz 04]). Die mittlere Frequenzen bilden jeweils eine Gerade auf der natürlich logarithmischen Skala mit nahezu konstantem Verhältnis benachbarter Frequenzen. Hierdurch separierte benachbarte Frequenzbänder können auch funktionell verschiedenartigen Hirnzuständen zugewiesen werden und stehen oft in Konkurrenz zueinander. Die Periode der Oszillationen wird dabei durch die Größe des Ensembles beteiligter Neuronen bestimmt. Höhere Frequenzen sind somit auf kleinere neuronale Strukturen begrenzt, wohingegen bei langwelligen Oszillationen große Netzwerke beteiligt sind.

Im Folgenden werden einige Modellsysteme vorgestellt, welche besonders in Hippocampusschnitten neuronale Oszillationen verursachen und in eigenen Experimenten dieser Arbeit studiert wurden (Kapitel 7 und 8): zuerst für Epilepsien, die in dieser Arbeit zusätzlich mit Stimulation getriggert wurden. Beim anschließend vorgestellten Modell handelt es sich dagegen um persistente, d.h. lang anhaltende und spontane Oszillationen im Sinne der eben erwähnten Rhythmen im Gehirn.

2.2.1. Epileptiforme Aktivität und ihre Modellsysteme

Unter epileptiformer Aktivität versteht man typische neuronale Feldpotentiale, welche als sogenannte „Krampfpotentiale“ bei epileptischen Anfällen in EEGs sichtbar werden: diese haben eine charakteristische, nämlich sehr lange Zeitdauer und eine sehr typische Morphologie. Ausgangspunkt ist dabei extrem synchronisierte Neuronenaktivität aufgrund niedriger Krampfschwellen, die oft im Hippocampus ihren Ausgangsort haben. Durch einen Mangel an kontrollierender Hemmung durch Interneurone ist die Folge ein pathologisch massiv synchrones Feuern von Prinzipal- und / oder Motoneuronen, was sich in den unterschiedlichen Erscheinungsformen der Epilepsien niederschlägt (Verkrampfungen, rhythmische Zuckungen, visuelle Beeinträchtigungen, die sog. Aura, Bewusstseinspausen, etc.).

In vitro können Krampfpotentiale studiert werden, indem man (i) NMDA-vermittelte synaptische Exzitation stärkt, oder (ii) GABA_A-vermittelte synaptische Inhibition reduziert. Ersteres wurde in dieser Arbeit mittels Mg-freiem Medium, letzteres durch das Alkaloid Bicucullin ausgelöst.

Sharp Wave-Ripple Komplexe Ein wichtiger Bestandteil der epileptiformen Signale sind „ripples“, schnelle Oszillationen (150 – 250 Hz), die sogenannte „sharp waves“ überlagern und damit die *Sharp Wave-Ripple Komplexe* (SWR) bilden [Buz 92]. Sharp waves sind extrem steil ansteigende (bzw. abfallende) extrazelluläre Signale hoher Amplitude und mit langer Dauer; sie kommen jedoch nicht nur bei Epilepsien vor: sie wurden bei Versuchstieren oftmals bei hinreichend geringer Aktivität beobachtet. Sie scheinen damit zusammen mit den ripples auch eine Art Ruhezustand des Hippocampus bei gleichzeitiger Absenz anderer typischer Funktionen zu repräsentieren; hierfür sei z.B. der „theta-Zustand“ (4 – 10 Hz) genannt, der bei Erkundungsgängen bei Ratten im dorsalen Bereich des Hippocampus gefunden wurde ([And 07]). Sharp wave-ripple Komplexe werden v.a. mit Prozessen der Gedächtniskonsolidierung in Verbindung gebracht. In vivo Experimente zeigen darüber hinaus, dass sie synchron über weite Teile des CA1 entlang der septotemporalen Achse des Hippocampus auftreten mit umgekehrter Polarität jeweils im Stratum pyramidale bzw. Stratum radiatum. In [Csi 00] wurde aufgrund von Messungen bereits vorgeschlagen, dass sharp waves im CA3 entstehen und die im CA1 einhergehenden Signale Feld-EPSPs darstellen, die über die Schaffer-Kollaterale durch synchrones Feuern der CA3-Neurone ausgelöst werden. In [Bra 99] wird betont, dass im Unterschied zu o.g. funktionellen SWRs die pathologischen Pendanten bei Epilepsien viel höhere Burst-Raten dieser ripples aufweisen (z.T. über 500 Hz).

Bezüglich der Frage, wie weit sich SWR-Komplexe in andere Hirnareale ausbreiten, fand man bei in vivo-Experimenten während hippocampaler SWR-Aktivität gleichzeitiges Auftreten von sharp waves im Subiculum und in tiefen Schichten des entorhinalen Cortex. In [Chr 96] wird dabei eine Verzögerung von 5 bis 30ms genannt. Auch im Gyrus Dentatus werden die Prinzipalneurone (Körnerzellen) von SWR-Komplexen, die im

CA3 aktiv sind, beeinflusst. In [And 07] wird betont, dass die anatomische Basis hierfür noch unklar sei. Vermutlich sind es Projektionen vom CA3 in die polymorphe Schicht des Hilus, wo Mooszellen aktiviert werden, die wiederum die Körnerzellen des Gyrus Dentatus erregen können.

2.2.2. Persistente Oszillationen in Hippocampusschnitten

In jüngerer Zeit wurden besonders Netzwerkoszillationen im beta- (10–30Hz) sowie gamma-Bereich (30–80 Hz) studiert, abgegrenzt von langsamen Oszillationen (delta (1.5–4 Hz) und theta (4–10 Hz) Bereich³) und den „ultrafast oscillations“ (90–300 Hz), zu denen auch die oben erwähnten Ripples zählen. Da zudem langsame Oszillationen (delta und theta- Bereich) in den Experimenten nicht beobachtet wurden, wird auf sie nicht explizit eingegangen.

Bedeutung für höhere Hirnfunktionen Rhythmische neuronale Aktivitäten im beta- und gamma- Bereich sind von besonderem Interesse, weil sie bereits früh bei kognitiven Prozessen beobachtet wurden (40 Hz Oszillationen im visuellen Cortex der Katze [Gra 89]). Feld-Oszillationen im gamma-Bereich werden z.B. als essentieller Mechanismus für räumliche Navigation und episodisches Lernen angesehen und koexistieren dabei mit Wellen im theta-Bereich [Chr 98]. Sie werden auch in der Sinnesverarbeitung als Lösung für das sog. Bindungsproblem genannt [Sin 93]: d.h. die Frage, wie sich bei der Verarbeitung von Sinneseindrücken individuelle Zellen an verschiedenen, sich nicht überlappenden Merkmalen beteiligen können; es ist also zu klären, wodurch die Merkmale getrennt weiterverarbeitet oder wieder abgerufen werden können, ohne dass Mehrdeutigkeiten entstehen. Als Lösung wird ein Aggregat aus Zellen (cell assembly) pro Merkmal vermutet, welches durch Synchronisation ihrer Aktivität zusammengefasst wird. Dem sogenannten gamma-Frequenzbereich um 40 Hz wird dabei die Schlüsselrolle zugeschrieben. Tatsächlich stehen Wahrnehmungsprozesse in direkter Verbindung mit derartigen neuronalen Netzwerkoszillationen.

Insgesamt ist hervorzuheben, dass Feld-Oszillationen im gamma-Bereich als funktionell wichtiges Referenzsignal gelten: Wenn eine größere Anzahl Neuronen gleichzeitig APs ausbildet, werden deren Ausgangssynapsen periodisch aktiviert; damit geht auch eine periodische Veränderung des intrazellulären Membranpotentials der postsynaptischen Zellen einher. Je mehr Eingangsneurone beteiligt sind und je synchroner diese aktiv sind, desto schärfer bildet sich postsynaptisch ein räumlich kohärentes Zeitfenster aus, welches eine erhöhte, bzw. verminderte Erregbarkeit innerhalb einer großen Population von Neuronen bewirkt [Bar 07].

³Oft wird in der Literatur der beta- Bereich vom theta-Bereich nicht scharf getrennt und zum theta-Band hinzugenommen.

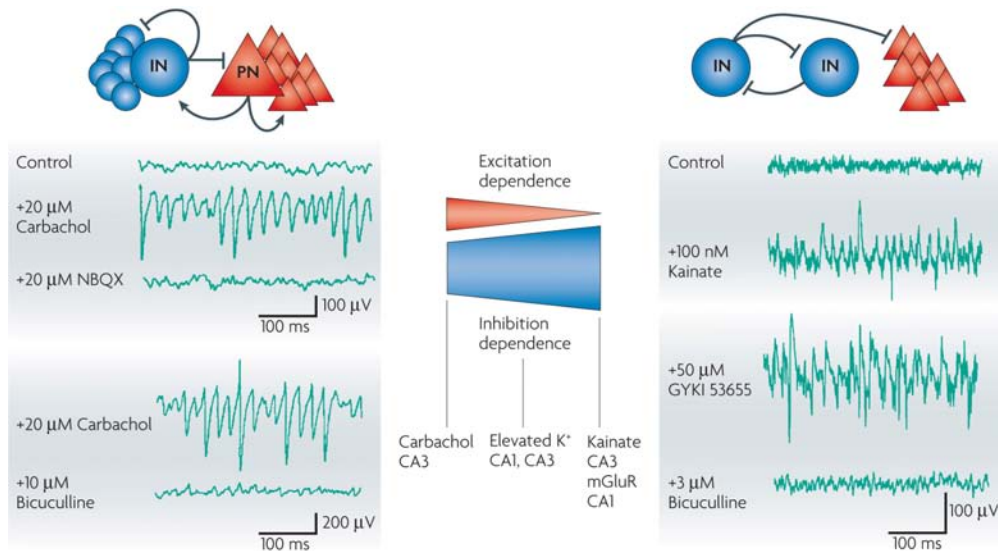


Abbildung 2.4. Generation von Gamma Oszillationen im Hippocampus durch Netzwerke von Interneuronen. Aus [Bar 07]

Mechanismen der Netzwerkoszillationen Netzwerkoszillationen im gamma Bereich wurden v.a. anhand von Hippocampusschnitten studiert, da aufgrund deren laminarer Architektur die Amplituden extrazellulärer Feldpotentiale während Netzwerkoszillationen relativ groß ausfallen. Bislang wurden verschiedenartige Mechanismen entdeckt, um Aktivität im gamma Bereich auszulösen. In [Whi 95] wurde erstmals nach tetanischer Stimulation (Stimulustrain von 1 sec bei 100 Hz) in Pyramidenzellen des CA1 intrazellulär Oszillationen bei 40 Hz gemessen. Sie werden durch ein Netzwerk von Interneuronen schneller, GABA-A vermittelter inhibitorischer Synapsen getragen, nachdem durch die Stimulation metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) aktiviert wurden.

Insgesamt treiben Agonisten metabotroper oder ionotoper Rezeptoren gamma Oszillationen an, welche sich aber teilweise fundamental voneinander unterscheiden: als erfolgreich zeigte sich die Stimulation über entsprechende Agonisten von metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), Kainat Rezeptoren [Fis 04], sowie muscarinen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) [Fis 98]. Oszillationen können auch durch eine Kaliumangereicherte Lösung angetrieben werden [LeB 02].

Die Lokalisation ist jedoch verschieden: mittels mGluR-Agonisten induzierte Oszillationen werden vorwiegend im CA1 beobachtet, Kainat-, sowie durch mAChR-Agonist Carbachol (CCH) getriebene Oszillationen hauptsächlich im CA3. Kalium-induzierte Aktivität wurde sowohl im CA1 als auch im CA3 beobachtet [Bar 07]. Zugabe von Blockern lässt abschätzen, in welchem Verhältnis exzitatorische und inhibitorische Komponenten des Netzwerks bei der Erzeugung jeweiliger Oszillationen notwendig sind (siehe Abb. 2.4). Sowohl mGluR- als auch Kainat- induzierte Aktivität (im CA1, bzw CA3)

wird nach Zugabe von GABA-A Rezeptor Antagonist Bicucullin (BIC) vollständig geblockt, jedoch nicht mittels AMPA-Rezeptor Antagonisten. Im Gegensatz dazu werden Carbachol-induzierte Oszillationen sowohl durch Bicucullin gestoppt (konzentrationsabhängig evtl. auch nur geschwächt), als auch durch AMPA-Rezeptor Antagonist NBQX. Selber Sachverhalt findet sich im Falle Kalium-induzierter Oszillationen, nur dass Zugabe von NBQX die Oszillation lediglich schwächte [LeB 02] (wenn auch um ca. 90% bzgl. der spektralen Leistungsdichte).

Somit benötigen die Modelle mit metabotropen Glutamat-Rezeptoren sowie die des Kainat-Typs keine rhythmische, exzitatorische Aktivierung, die oszillatorische Aktivität wird also hauptsächlich von Interneuronen direkt aufrecht erhalten. Im Gegensatz dazu sind CCH-getriebene Oszillationen, bei denen Interneurone nur indirekt aktiviert werden, auch von ihrer exzitatorischen Erregung durch Pyramidenzellen abhängig. Tatsächlich aktivieren erstere Rezeptoren (mGluR und Kainat R.) hauptsächlich Interneurone, wohingegen die muscarinen Acetylcholin-Rezeptoren hauptsächlich an den Pyramidenzellen vermutet werden.

Synchronisation oszillatorischer Aktivität im Netzwerk Applikation von gap-Junction Inhibitoren führte bei oben genannten Modellen teilweise zu einer Reduktion oder gar zur Blockade der Oszillationen (CCH- sowie Kalium-Modell). Gerade dendritische gap-Junctions zwischen den Interneuronen sind wichtig für eine Stabilisierung der Oszillationen [Tra 01], indem sie Heterogenitäten innerhalb des Interneuronen Netzwerks kompensieren. Im Falle der Aktivierung von mGluR nach elektrischer Stimulation scheinen gap-Junctions weniger relevant zu sein.

Die durch die unterschiedlichen Rezeptoren aktivierten Netzwerke von Interneuronen tragen ebenfalls zur Synchronisation der Oszillationen bei. Eine entscheidende Rolle spielen dabei schnell spikende Basket-Zellen. Sie sind um die Pyramidenzellen herum lokalisiert und bilden dabei ein ausgedehntes, wechselseitig verknüpftes Netzwerk aus inhibitorischen Synapsen, das ihre Aktionspotentiale synchronisieren kann. Beide genannten Mechanismen stabilisieren die einzelnen Oszillatoren, deren Summenaktivität folglich durch kohärente Superposition in extrazellulären Feldpotentiale gemessen werden können.

2. Anatomie und Funktion des Hippocampus

3. Theorie der Feldpotentiale in akuten Hirnschnitten auf Silizium-Chips

In dieser Arbeit wird extrazelluläre, neuronale Aktivität in frisch präparierten, sog. akuten Hirnschnitten des Hippocampus detektiert. Die Messungen erfolgen an der Unterseite der akuten Hirnschnitte durch Feldeffekttransistoren (FETs), die sich im Substrat befinden. An der Grenzfläche zum Chip befindet sich jedoch im Hirngewebe eine präparationsbedingte Schicht inaktiver Zellen d_i , die sich abschwächend auf die Ausbreitung neuronaler Signale im Hirngewebe auswirkt.

Koppelt im Idealfall ein akuter Schnitt kapazitiv an einen Siliziumchip, messen die Feldeffekttransistoren – relativ zu einer Referenzelektrode im Bad – die Spannung oberhalb der Gatefläche. Dabei handelt es sich um neuronal generierte Spannungen, die sich im Extrazellulärraum des Hirngewebes bis zum Chip hindurch ausbreiten. Die detektierten Potentialdifferenzen werden durch Superposition von Aktionspotentialen (AP) und exzitatorischen, sowie inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP, IPSP) im Extrazellulärraum gebildet und werden in der Neurobiologie *Feldpotential* genannt.

Das folgende Kapitel stellt eine theoretische Beschreibung dieser makroskopischen Messgröße vor und untersucht deren stationäre Verteilung im passiven Extrazellulärraum eines Hirnschnitts auf einem Substrat. Damit werden folgende Fragestellungen berücksichtigt: Wie wirkt sich (i) im wesentlichen die Existenz inaktiver Zellschichten, die bei der Schneideprozedur entstehen, auf die Güte des Recordings aus? Wie wird (ii) dieses von weniger idealen Kopplungsbedingungen in Form elektrolytischer Schichten zwischen Hirngewebe und Substrat beeinträchtigt? Wie wirken sich letztlich (iii) beide Faktoren auf die Möglichkeit einer Stimulation neuronaler Elemente mittels planarer Kondensatoren aus? Um dies abzuschätzen, werden verschiedene Szenarien theoretisch betrachtet und deren Lösungen diskutiert.

3.1. Feldpotentiale und Volumenleiter

Neuronal aktives Gewebe erzeugt eine Vielzahl mikroskopischer transmembraner Ionenströme, die im Extrazellulärraum elektrische Felder generieren (siehe auch [Joh 99]). Diese neuronale Aktivität kann – wie es auch in dieser Arbeit geschieht – als Potentialunterschied¹ zwischen zwei Punkten im Extrazellulärraum gemessen werden, wobei sich

¹Typischerweise im Bereich von 1 bis 3 mV.

die Referenzelektrode in der Regel außerhalb des zu untersuchenden Gewebes befindet. Im Gegensatz dazu stünden intrazelluläre Messungen, bei denen auf mikroskopischer Ebene transmembrane Potentiale *eines* neuronalen Elements relativ zum Referenzpotential außerhalb der Zelle untersucht würden.

Im vorliegenden Fall fällt die mikroskopische Betrachtung weg, da die gemessenen Signale Summenpotentiale vieler verschiedener, neuronal aktiver Elemente darstellen. Die Messmethodik – etabliert ist eine Spannungsmessung mit Mikropipetten – ist demnach im Sinne einer *mean-field* Approximation zu verstehen. Die gemessene Größe wird in der Neurobiologie aufgrund ihres makroskopischen Charakters *extrazelluläres Feldpotential* (auch local field potential, LFP) genannt²; der Raum, in dem sie sich ausbreiten, ist das extrazelluläre Hirngewebe, welches als Volumenleiter beschrieben werden kann.

Wie hängen die makroskopischen extrazellulären Feldpotentiale mit den zugrundeliegenden Ionenströmen zusammen, und wie lässt sich der Übergang von feinstrukturiertem Hirngewebe hin zu einem Volumenleiter rechtfertigen?

Das Volumenleitermodell

Die Membranen neuronaler Elemente sind innerhalb eines Gewebes in einer extrazellulären Matrix, angereichert mit cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF), eingebettet. Da relativ zum spezifischen Widerstand im Extrazellulärraum des Zellverbands (ca. 300 Ωcm [Hol 87]) der Widerstand der Zellmembranen sehr hoch ist (einige $\text{k}\Omega\text{cm}$), können Extra- und Intrazellulärraum als unabhängig voneinander betrachtet werden (siehe [Mit 85]).

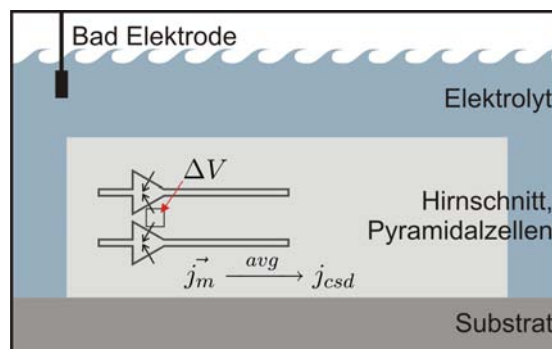


Abbildung 3.1. Entstehung von Feldpotentialen im Hirnschnitt als Volumenleiter aufgrund aktiver Pyramidenzellen. Der Schnitt befindet sich in einem Elektrolyt, in dem sich zugleich die auf Massepotential geklemmte Referenzelektrode befindet. Im Falle von APs kommt es an den Somata zu einwärtsgerichteten transmembranen Ionenströmen. Im Extrazellulärraum stellt dies – abhängig von der zeitlichen Korrelation dieser Ereignisse – eine entsprechend große und lokalisierte Ionenstromsenke dar. Im Volumenmittel ergibt sich dort aus den vielfachen mikroskopischen Stromdichten \vec{j}_m die effektive Stromquellendichte j_{csd} (current source density, CSD).

Wenn eine Zelle neuronal aktiv ist (AP, EPSP, IPSP), fließt ein transmembraner

²Diese Bezeichnung der zu messenden Spannungen wird in dieser Arbeit beibehalten.

Netto-Ionenstrom I_m mit der Stromdichte \vec{j}_m durch geeignete Ionenkanäle über die Membran. Dies stellt, je nachdem ob es sich um ein AP, EPSP oder IPSP handelt, im Extrazellulärraum eine Stromquelle bzw. -senke dar. Wenn im Hirngewebe ein größeres Ensemble neuronal aktiv ist, handelt es sich wiederum um eine Summe verschieden großer und verschieden gerichteter mikroskopischer Transmembranströme. Befindet sich nun in unmittelbarer Nähe eine Mikroelektrode, so verursacht z.B. ein Aktionspotential transmembrane einwärtsgerichtete Ströme, die als negative Potentialdifferenz relativ zu einer Referenzelektrode messbar werden. Bei diesem Punkt ist im realen Experiment bereits ein makroskopisches Level erreicht, da die Spitze der Elektrode im Extrazellulärraum nur Rückschlüsse auf die Gesamtbilanz der Transmembranströme geben kann.

Um dem Rechnung zu tragen, wird, zurückgehend auf Pitts [Pit 52], eine current source density (CSD) j_{csd} eingeführt, die dem Mittel einzelner (ein- oder auswärts gerichteter) Transmembranströme in einem betrachteten Volumen ΔV entspricht. Sie gibt also die mittlere Stromquellendichte wieder und besitzt die Dimension A/m^3 . Zur Erläuterung sei dazu in einem Hirnschnitt nahe von Neuronen ein Teilvolumen ΔV betrachtet, mit der enthaltenen Gesamt-Membranfläche $\Delta \mathcal{A}$. Der resultierende extrazelluläre Gesamtstrom $\vec{j}_{extra}(\vec{r})$ in diesem Volumen ΔV um die Stelle \vec{r} bildet sich aus der darin enthaltenen endlichen Anzahl N von (beliebigen) transmembranen Ionenkanäle der Stromdichte \vec{j}_{m_i} mit

$$\sum_i^N \vec{j}_{m_i} = \vec{j}_{extra}(\vec{r}). \quad (3.1)$$

Die current source density j_{csd} steht für ein Volumenmittel einwärts- und auswärtsgerichteter Ströme durch die gesamte Membranfläche $\Delta \mathcal{A}$ pro betrachtetes Segment ΔV , welches man formulieren kann als

$$\frac{1}{\Delta V} \int_{\Delta \mathcal{A}} \vec{j}_{extra} d\vec{f} = j_{csd_{\Delta V}}, \quad (3.2)$$

wobei $d\vec{f}$ die infinitesimale Flächennormale auf dem betrachteten Gebiet darstellt.

Lässt man nun die betrachteten Volumina ΔV infinitesimal klein werden, so steht Gl. 3.2 für die Divergenz der extrazellulären Stromdichte \vec{j}_{extra} an der Stelle \vec{r} :

$$\lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta V} \int_{\Delta \mathcal{A}} \vec{j}_{extra} d\vec{f} = \text{div } \vec{j}_{extra} \quad (3.3)$$

Für infinitesimal kleine ΔV geht also die current source density $j_{csd_{\Delta V}}$ über in $j_{csd}(\vec{r})$, wobei analog zur Kontinuitätsgleichung gilt:

$$\text{div } \vec{j}_{extra}(\vec{r}) = j_{csd}(\vec{r}) \quad (3.4)$$

Dass hier Werte ungleich 0 zu erwarten sind, reflektiert die reine Beschränkung auf den

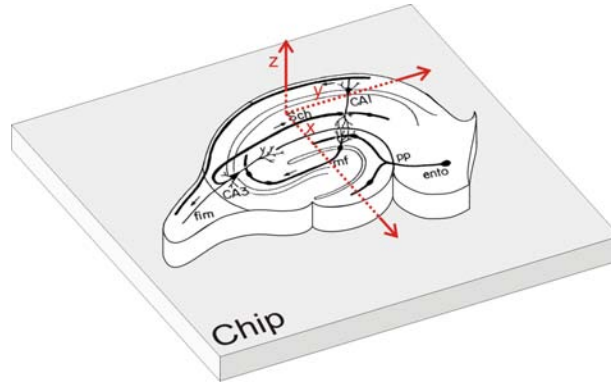


Abbildung 3.2. Orientierung des gewählten Koordinatensystems im CA1 des Hippocampus. Die (in lokaler Näherung) lamellare Organisation des Hippocampus zusammen mit kolumnenartiger Anordnung der Pyramidenzellen legen eine open field Struktur fest, durch die sich z.B. synchron ausgelöste EPSPs kohärent überlagern (Bild modifiziert nach [And 71]).

Extrazellulärraum innerhalb des Gewebes.

Ist ΔV hinreichend klein und nahe an den Membranflächen, steckt im Prinzip noch mikroskopische Information in der CSD j_{csd} . Für eine entsprechende experimentelle Messung würde eine sehr kleine räumliche Abtastrate erforderlich sein, die in der Realität aber nicht erfüllbar ist. In einer makroskopischen Näherung, die in realen Experimenten faktisch geschieht, wird dagegen einer mean-field Näherung entsprechend das Volumengemittel aus Gl. 3.2 anzusetzen sein.

Man erhält folglich eine Verteilung der Stromquellendichten im Hirnschnitt, die in makroskopischer Näherung alle transmembranen Ströme im Mittel beschreibt. Das Hirngewebe selbst ist damit rein auf den Extrazellulärraum zu reduzieren, der einen Volumenleiter bildet. Sind mikroskopisch gesehen transmembrane Ströme im Mittel einwärtsgerichtet, bildet das betreffende Volumensegment makroskopisch eine Stromsenke ($j_{csd} < 0$), falls auswärtsgerichtet, entsprechend eine Stromquelle ($j_{csd} > 0$).

Innerhalb des Bereiches physiologisch relevanter Signale (0–1 kHz) können kapazitive, induktive und magnetische Effekte im Extrazellulärraum vernachlässigt werden ([Plo 69]). Man kann folglich das resultierende elektrische Feld \vec{E} im linearen Extrazellulärraum mit dem Ohmschen Gesetz quasistatisch als

$$\vec{j}_{extra} = \bar{\sigma} \vec{E} \quad (3.5)$$

beschreiben, wobei die Leitfähigkeit $\bar{\sigma}$ tensoriell ist. Da durch obige Annahmen $\text{rot} \vec{E} = 0$ ist, folgt $\vec{E} = -\vec{\nabla} \varphi$ mit der skalaren Potentialfunktion φ , so dass gilt:

$$-\nabla (\bar{\sigma} \nabla \varphi) = j_{csd} \quad (3.6)$$

Die resultierende, im Extrazellulärraum gegen Massepotential messbare Spannung

wird in der Neurobiologie *Feldpotential* genannt und mit φ identifiziert³. Gl. 3.6 beschreibt damit *quasistationär* die Verteilung des Feldpotentials φ im Hirngewebe, verursacht durch die Stromquelllichtefunktion j_{csd} (statistischen Charakters). Das Hirngewebe ist dabei auf einen ohmschen Volumenleiter reduziert, der diese Stromquellichten generiert. Neuroanatomische Eigenschaften schlagen sich im Detail in $\bar{\sigma}$ nieder.

Für den Fall eines akuten Hirnschnitts des Hippocampus gilt trotz der inhärenten Krümmung entlang seiner septo-temporalen Achse (senkrecht zur Schnittfläche) in sehr guter Näherung die Annahme eines *lamellaren Aufbaus*. Falls man als zu untersuchende Region den CA1 wählt, findet man die Pyramidenzellen kolumnenartig in einer sog. „open field“ Struktur⁴ vorliegen ([Joh 99], [And 71]), durch die sich Summen-APs oder -EPSPs kohärent zu Feldpotentialen superponieren, anstatt sich auszulöschen. Wählt man ein kartesisches Koordinatensystem wie in Abbildung 3.2, so reduziert sich $\bar{\sigma}$ auf die 3 Hauptkomponenten, da die Leitfähigkeit des Extrazellulärmediums als isotrop angenommen werden kann. Wenn sie in lokaler Näherungen zusätzlich als homogen angenommen wird, reduziert sich die Leitfähigkeit innerhalb des Hirnschnitts zum Skalar mit

$$\sigma = 1/\rho. \quad (3.7)$$

Da in lokaler Näherung die intrinsische Krümmung im CA1 relativ gering ist, folgt eine Symmetrie entlang des CA-Bogens, und nach der Lage des Koordinatensystems nach Abb. 3.2, eine Symmetrie entlang der y -Achse. Gleichung 3.6 reduziert sich dort zu:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \varphi(x, z) = -\rho_{slice} \cdot j_{csd}(x, z) \quad (3.8)$$

Diese Wahl des Koordinatensystems sei im Folgenden wie in Abb. 3.2 beibehalten⁵.

Zusammenfassend sei nochmals auf den statistischen Charakter der Feldpotentiale hingewiesen. In der Praxis erweisen sie sich als schwer interpretierbar, da sie die mittlere Aktivität einer Vielzahl synchroner sowie asynchroner neuronaler Vorgänge reflektieren. Der Volumenleiter agiert zudem wie ein räumlicher Tiefpassfilter, weshalb sich im Extrazellulärraum Signale räumlich hochfrequenter Art (z.B. Einzelspikes) weniger weit ausbreiten, als kohärente Summenpotentiale größerer neuronaler Ensembles (EPSPs, IPSPs), die in gemessenen Signalen oft dominieren⁶.

³Dieser Begriff wird in dieser Arbeit beibehalten, wobei das Feldpotential stets als Potentialdifferenz relativ zum Massepotential verstanden wird.

⁴Siehe Anhang, A.1.

⁵Bei Untersuchungen zur Stimulation werden hingegen zylindrische Koordinaten verwendet.

⁶Typische Signalförmungen hippocampaler Feldpotentiale finden sich im Anhang A.1.

3.2. Randbedingungen für Hirnschnitte auf isolierenden Substraten

Die Verteilung des Feldpotentials φ im akuten Hirnschnitt wird im Experiment durch die intrinsischen Randbedingungen beeinflusst [Fro 02]. Dies wird sich direkt auf die Detektion sowie Stimulation mittels Chip auswirken. Vier Aspekte sind dabei zu beachten: (i) die neuronal aktiven Regionen innerhalb des Hirnschnitts werden durch präparationsbedingte Schichten inaktiver Zellen begrenzt; (ii) durch die Kopplung an das nahezu auf Masse liegende Bad wird die Verteilung der Feldpotentiale ebenso beeinflusst, wie (iii) durch die Kopplung an das isolierende Substrat des Chips (Feld- und Gateoxid, sowie planare Kondensatoren zur Stimulation); (iv) es ist denkbar, dass sich zwischen Schnitt und Substrat ein Film aus Elektrolyt befindet, dessen Schichtdicke die Güte einer Kopplung bzw. Stimulation zusätzlich einschränkt. Da der Hirnschnitt nicht wie bei Schnittkulturen festwächst und aufgrund Verletzungsrisiken nicht festgedrückt werden sollte, ist diese Schichtdicke schwer beeinflussbar. Um den Effekt schärfer abzugrenzen, wird das Kopplungsmodell explizit ohne und mit dieser elektrolytischen Zwischenschicht betrachtet.

Als Messsituationen werden im Folgenden die Detektion (Recording) mit Transistoren, sowie die Stimulation mit Kondensatoren beschrieben: einmal im einfachen Fall ohne, und anschließend mit explizitem Einbeziehen des umgebenden Bades. Besonders die letzten beiden oben genannten Faktoren (iii, iv) werden diesbezüglich direkt Einfluss ausüben.

3.2.1. Recording mit Transistoren

Als Modellsystem sei ein akut präparierter Hippocampusschnitt der Höhe h betrachtet, der mit dem Chip derart kontaktiert ist, dass der Schnitt exakt auf dem isolierendem Substrat liegt. Die Messkammer ist dabei mit leitfähigem Medium (ACSF) gefüllt, in dem sich eine Referenzelektrode befindet, welche mit Massepotential kontaktiert ist. Der Schnitt wird durch eine Wolframelektrode stimuliert, so dass Aktionspotentiale in den Schaffer-Kollateralen ausgelöst werden. APs propagieren entlang dieser Axone zum Stratum radiatum des CA1, wo sich die Dendritenbäume der nachgeschalteten CA1 Neurone befinden. In diesen werden EPSPs ausgelöst, die mit einem Transistor an der Oberfläche des Chip-Substrats detektiert werden sollen.

Zur Vereinfachung wird ein quasistatischer Fall für ein Summen-EPSP im CA1 betrachtet. Die transversale Krümmung des CA-Bogens (also von CA3 nach CA1) kann hier lokal vernachlässigt werden, so dass sich gemäß Abb. 3.2 in lokaler Näherung eine Symmetrie entlang des CA1, d.h. der y -Achse, ergibt.

Anfangs wird ein eventueller Elektrolytfilm zwischen Schnitt und Substrat vernachlässigt. Im Anschluss wird das zu berechnende Gebiet um das Bad ausgeweitet, um einen Spalt zwischen Schnitt und Substrat miteinzubeziehen.

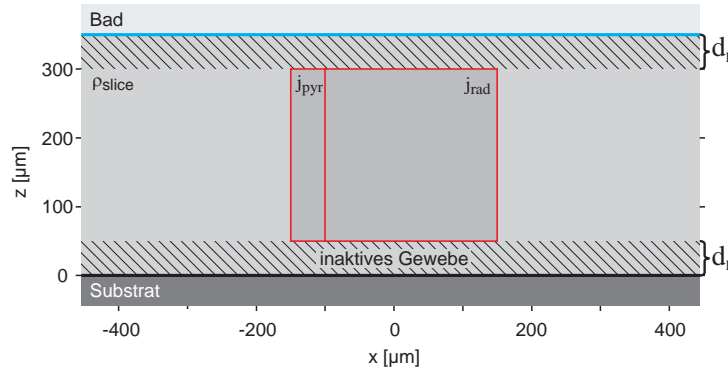


Abbildung 3.3. Geometrie des Hirnschnittmodells auf isolierendem Substrat. Die zu berechnende Region erstreckt sich über die gesamte Querschnittsfläche des Hirnschnitts (Breite von $x = -2000 \mu\text{m}$ bis $2000 \mu\text{m}$, Höhe von $z = 0 \mu\text{m}$ bis $350 \mu\text{m}$). Dem Einfluss der Umgebung wird durch die Randbedingungen Rechnung getragen (Kopplung an das Substrat, von-Neumannsche Rdb., schwarz; sonst Kopplung an das Bad, Dirichletsche Rdb., blau). Durch die (gleich dicken) Schichten inaktiver Zellen beschränkt sich die aktive Region auf die dunkelgrau markierten, rot umrandeten Strata pyramidale / radiatum ($j_{pyr}, j_{rad} \neq 0$).

Direkte Kopplung an das Substrat

Da die Verteilung von Feldpotentialen nur im Hirnschnitt betrachtet wird, ist die spezifische Leitfähigkeit σ im ganzen Gebiet konstant, so dass aus Gleichung 3.6 die Poissongleichung mit

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \varphi(x, z) = -\rho_{slice} \cdot j_{csd}(x, z) \quad (3.9)$$

folgt, wobei $\rho_{slice} = 1/\sigma_{slice}$. Das zu betrachtende Gebiet ergibt sich dann wie in Abb. 3.3 gezeigt. Die EPSPs verursachen eine CSD j_{rad} im Stratum radiatum mit einer die Strombilanz ausgleichenden CSD j_{pyr} im Stratum pyramidale.

Wie wirkt sich die vorhandene Kopplung an Bad (auf nahezu Massepotential) und isolierendem Chipsubstrat auf die Feldpotentiale im Volumenleiter aus? Mit obiger Gleichung lässt sich für eine heuristisch gegebene CSD j_{csd} der Verlauf des resultierenden Feldpotentials φ abschätzen. Dazu sind aufgrund der Messanordnung folgende Randbedingungen einzuführen ([Fro 02], [Sta 08]):

1. Die Unterseite des Schnitts ist direkt an das Substrat gekoppelt. Da ein faradayscher Strom durch die Feld- und Gateoxide vernachlässigt werden kann, gilt dort eine von-Neumannsche Randbedingung mit

$$\frac{\partial}{\partial z} \varphi(x, z) = 0, \text{ für } z = 0 \quad (3.10)$$

2. Da die Ausdehnung des Schnitts deutlich größer ist als das simulierte aktive Gebiet, können die seitlichen Kanten vernachlässigt werden. In weiter Entfernung kann ein

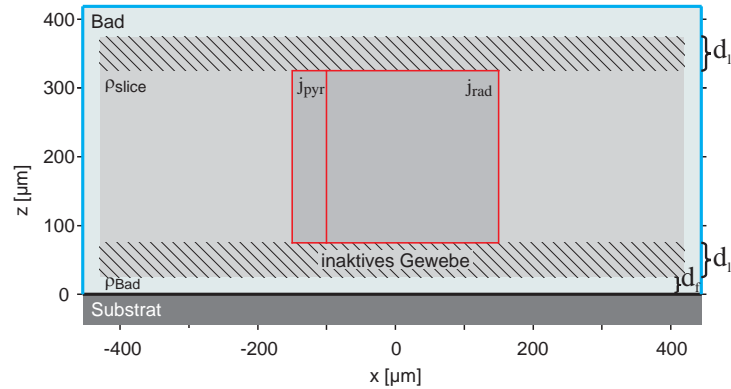


Abbildung 3.4. Geometrie des Hirnschnittmodells mit zusätzlichem Film Elektrolyt zwischen Schnitt und isolierendem Substrat. Die zu berechnende Region wird um das Bad erweitert (schematisch; tatsächliche Breite des Schnitts 2 cm). Ein zusätzlicher Film mit Elektrolyt der Dicke d_f befindet sich nun zwischen Schnitt und Substrat (Kopplung an das Substrat, von-Neumannsche Rdb., schwarz; Bad auf Massepotential, Dirichletsche Rdb., blau). Die aktive Region liegt wieder im rot umrandeten Stratum radiatum bzw. Stratum pyramidale (j_{rad} , $j_{pyr} \neq 0$).

Verschwinden des Feldpotentials angenommen werden:

$$\varphi(x, z) = 0, \text{ für } x \rightarrow \pm\infty \quad (3.11)$$

3. Die Oberseite des Hirnschnitts ($z = h$) ist großflächig ohmsch an das Bad gekoppelt. In erster Näherung kann man den spezifischen Widerstand des Elektrolyts (für ACSF typischerweise $64 \Omega\text{cm}$) gegenüber den des Hirnschnitts ($300 \Omega\text{cm}$, [Hol 87]) vernachlässigen; zugleich wird eine perfekte Kontaktierung an das Massepotential durch die Referenzelektrode angenommen, die demnach direkt an die Schnittoberfläche übertragen wird; damit ergibt sich eine Dirichletsche Randbedingung mit:

$$\varphi(x, z) = 0, \text{ für } z = h \quad (3.12)$$

Kopplung an das Substrat mit Spalt und umgebendem Bad

Ein denkbarer zusätzlicher Film von niederohmigen Elektrolyt unterhalb des Hirnschnitts schwächt die am Substrat ankommende Signalamplitude zusätzlich ab. Um diesen Effekt zusätzlich abzuschätzen, wird deshalb im Modell das betrachtete Gebiet um das Bad in der Recordingkammer erweitert; ein zusätzlicher Film aus Elektrolyt der Dicke d_f zwischen Schnitt und Substrat wird berücksichtigt. Der Hirnschnitt selbst habe eine feste Breite b und Höhe h und liege mit seiner Mitte bei $x = 0$. Die Substratoberfläche befinde sich wieder bei $z = 0$.

Die Geometrie des zu berechnenden Modells ergibt sich gemäß schematischer Abb.

3.4. Die spezifische Leitfähigkeit hat in Elektrolyt und Hirnschnitt nun jeweils einen verschiedenen Wert mit $\rho = \rho_{slice}$ innerhalb des Schnitts, bzw. $\rho = \rho_{Bad}$ außerhalb. Gleichung 3.6 ist in zwei Domänen zu lösen mit der zusätzlichen Randbedingung, dass an deren Grenzflächen das Feldpotential $\varphi(r, z)$ gleiche Werte annimmt. Die übrigen Randbedingungen sind an die neuen Grenzen (die des Bades) zu übertragen. Es gilt demnach:

1. Das isolierende Substrat bildet wieder die untere Systemgrenze, an der unter Vernachlässigung faradayscher Ströme eine von Neumannsche Randbedingung angenommen wird mit

$$\frac{\partial}{\partial z} \varphi(x, y, z) = 0, \quad (3.13)$$

für alle im Lösungsgebiet liegende Punkte mit $z = 0$.

2. Zwischen dem Substrat und dem Hirnschnitt (Höhe h , Breite b) befindet sich nun ein Film Elektrolyt mit der Dicke d_f . An allen Grenzflächen Hirnschnitt – Elektrolyt gilt

$$\varphi(x, z) \Big|_{slice} = \varphi(x, z) \Big|_{Bad} \quad (3.14)$$

sowie

$$\vec{\nabla} \varphi(x, z) \Big|_{slice} \cdot \sigma_{slice} \cdot \vec{n} = \vec{\nabla} \varphi(x, z) \Big|_{Bad} \cdot \sigma_{Bad} \cdot \vec{n} \quad (3.15)$$

für alle $(x, y, z) \in \partial V_{slice}$, wobei ∂V_{slice} der Rand des Hirnschnittvolumens V_{slice} sei.

3. Der Elektrolyt in der Messkammer mit dem Volumen V_{Kammer} enthält im Experiment eine Referenzelektrode, deren Kontakt mit Masse verbunden ist. Deshalb wird für die äußeren Grenzen des Lösungsgebietes (Ränder der Messkammer und Oberfläche des Mediums) Massepotential angenommen mit

$$\varphi(x, y, z) = 0, \quad (3.16)$$

für $(x, y, z) \in \partial V_{Kammer}$.

Die Lösungen werden Aufschluss geben über die Verschlechterung des Kontaktes zwischen Schnitt und Substrat sowie über den Spannungsabfall innerhalb des Bades, der oben vernachlässigt wurde.

3.2.2. Stimulation mit Kondensatoren

In Abschnitt 3.2.1 wurde für das Evozieren der betrachteten Feldpotentiale Wolfram-elektroden angenommen, deren nahezu punktförmige Spitzen im Hirngewebe ohmsch stimulieren. Durch Injizieren von Strom wird dabei eine Änderung der extrazellulären Spannung V erreicht, die wiederum ab einem Schwellwert V_{th} neuronale Aktivität auszulösen vermag. Im Folgenden soll ein planarer Kondensator, der sich an der Substratober-

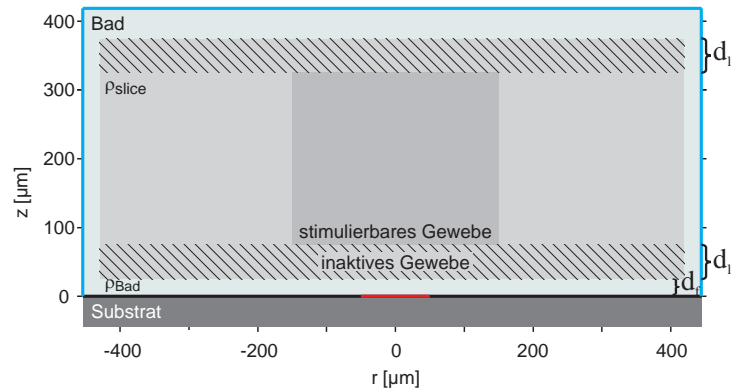


Abbildung 3.5. Geometrie des Hirnschnittmodells auf isolierendem Substrat mit Stimulationspot. Der Kondensator (rot, Durchmesser $100\ \mu\text{m}$) liegt unter einer Region mit stimulierbarem Gewebe, z.B. den Schaffer-Kollateralen (dunkelgrau; Abb. nicht maßstabsgetreu; tatsächliche Breite des Schnitts $2\ \text{cm}$). Die am Spot angelegte Spannung muss – über einen darüber liegenden, etwaigen Wasserfilm und über Schichten inaktiver Zellen hinweg – in der dunkelgrau markierten Region eine Spannungsänderung, ausreichend für eine Stimulation, erzeugen. (Kopplung an das Substrat: von-Neumannsche Rdb., schwarz; Kopplung des Bads an Massepotential: Dirichletsche Rdb., blau).

fläche befindet, das Feldpotential im darüber liegenden Hirnschnitt beeinflussen (siehe Abb. 3.5): hierfür wird über eine Änderung von $V_{stim}(t)$ – der an den Kondensator angelegten Spannung (z.B. Stufen oder Rampen) – ein kapazitiver Ionenstrom I_{stim} im Elektrolyt erzeugt.

Die resultierende Spannungsänderung im Hirnschnitt ist abhängig von der Güte der kapazitiven Kopplung – d.h. der Abdichtung durch den Schnitt – und dem Abstand des zu stimulierenden neuronalen Elements zum Kondensator. Will man z.B. an einem Axonbündel mit dem Kondensator Membranen depolarisieren und Aktionspotentiale auslösen, muss an jenem Ort im Extrazellulärraum ein vergleichbares V_{th} (relativ zum Referenzpotential) erzielt werden, wie die zuanfangs angenommene Wolframelektrode.

Für am Chip festgewachsene Hirnschnittkulturen wurde dies in [Hut 04] realisiert. Um die Möglichkeit einer erfolgreichen Stimulation auch bei akuten Hirnschnitten abzuschätzen, soll bei der Modellierung erneut eine Schicht Elektrolyt zwischen Gewebe und Chip nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse werden dann mit einem Modell für kultivierte Schnitte verglichen (Kap. 3.3.3).

Die Geometrie des zu lösenden Gebiets zeigt Abb. 3.5. Aufgrund kreisförmiger Kondensatoren werden im Folgenden Zylinderkoordinaten angenommen. Der planare Kondensator hat dabei einen Durchmesser von $r_0 = 100\ \mu\text{m}$ und befindet sich mit seinem Mittelpunkt in $(r, z) = 0$. Der jetzt zylinderförmige Hirnschnitt habe erneut die Höhe h und den relativ zur Spotfläche sehr großen Durchmesser $r_b \gg 2r_0$ (Abb. 3.5 nicht maßstabsgetreu). Intrinsische neuronale Aktivität des Hirnschnitts wird vernachlässigt

($j_{csd} = 0$), so dass aufgrund der Zylindersymmetrie aus Gleichung 3.6 folgt:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \varphi(r, z) = -\rho \cdot j_{stim}(r, z), \quad (3.17)$$

wobei innerhalb des Schnitts $\rho = \rho_{slice}$, bzw. außerhalb $\rho = \rho_{Bad}$ gilt. Die Gleichung ist entsprechend domänenweise zu lösen mit der Bedingung, dass an den Grenzflächen der zwei Domänen $\varphi(r, z)$ gleiche Werte annimmt.

Die Randbedingungen für das System sind analog dem Fall in Kapitel 3.2.1, nur dass nun an der Grenzfläche Substrat – Schnitt der Stimulation Rechnung getragen wird:

1. An der Grenzfläche Substrat-Bad gilt für $r \leq r_0$

$$\frac{\partial}{\partial z} \varphi(r, z) = -\rho \cdot j_{stim}, \quad (3.18)$$

mit $j_{stim} = c_s dV_{stim}(t)/dt$. Dabei ist c_s die spezifische Kapazität des Dielektrikums und $V_{stim}(t)$ das Stimulations-Spannungsprofil. Für $r > r_0$ gilt entsprechend

$$\frac{\partial}{\partial z} \varphi(r, z) = 0. \quad (3.19)$$

- 2.-3. Übrige Randbedingungen analog Gleichungen (3.14) – (3.16).

Die Gleichung (3.17) wurde ebenfalls numerisch gelöst, wobei die bereits existierenden Programme entsprechend modifiziert wurden.

3.3. Kopplungsmodelle akuter Hirnschnitte auf Siliziumchips

Die verschiedenen Modelle für die kapazitive Kopplung von Hirnschnitt und Chip wurden mit variierenden Parametern numerisch berechnet. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert. Für Schichten inaktiver Zellen werden die Fälle $d_l = 50 \mu\text{m}$ sowie $100 \mu\text{m}$ betrachtet, wobei ersterer im Folgenden als realistischer Fall anzusehen ist ([Heu 02], [Tey 80]).⁷ Zum Vergleich wird zusätzlich der Idealfall mit $d_l = 0 \mu\text{m}$ hinzugezogen.

Dass der Hirnschnitt direkt mit dem Substrat koppelt, ist ebenso ein Idealfall. Die Oberfläche ist durchaus rau und faserig. Da der Schnitt in den Experimenten oft nicht angedrückt werden kann – und aus physiologischer Sicht auch nicht soll, ist es möglich, dass sich an der Grenzfläche Hirnschnitt – Substrat ein mit Elektrolyt angefüllter Spalt bildet⁸.

⁷Mit verbesserter Technik wird in [Gei 02] von patchbaren Zellen innerhalb der ersten $10 \mu\text{m}$ ab Schnittgrenze berichtet. Die Dicke d_l wird im Mittel dennoch größer ausfallen.

⁸Experimentelle Ergebnisse vorwegnehmend sei erwähnt, dass sich einige Hippocampusschnitte nach der Präparation zusätzlich krümmten, so dass oft keine Kopplung beobachtet wurde. Die Dicke des Spalts wurde außerdem nicht explizit gemessen, sondern indirekt abgeschätzt (Kap. 5).

Deshalb wird im zweiten Schritt (Kap. 3.3.2) die Elektrolytumgebung mit einem zusätzlichen Film Elektrolyt der Dicke d_f miteinbezogen. Als unterschiedlich gute Kopplungsszenarien gelten 3 denkbare Fälle $d_f = 10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$, wobei ersterer wiederum als realistischer Fall anzusehen ist [Sta 08].

3.3.1. Recording: Hirnschnitt auf Chip ohne Spalt

Parameter Im Folgenden wird aufgrund der Symmetrie in y -Richtung der 2-dimensionale Querschnitt entlang der (x, z) -Ebene betrachtet (siehe Abb. 3.3). Die Ausdehnung für Stratum pyramidale und -radiatum wurde von Schnittpräparaten abgeschätzt, so dass sich das zu berechnende Gebiet wie in Abb. 3.3 schematisch gezeigt, ergibt. Für das Stratum radiatum ergibt sich eine negative CSD mit $j_{csd} = j_{rad}$, für das Stratum pyramidale eine der Strombilanz entsprechende positive CSD j_{pyr} . Die Stromquellichten (CSD) wurden heuristisch so gesetzt, dass das resultierende Feldpotential im Bereich experimentell zu erwartender Werte liegt (vgl. Kap. 5). An beiden Schnittflächen werden gleich große Schichtdicken d_l inaktiver Zellen mit $j_{csd} = 0$ angenommen, die variiert werden. Die Parameter ergeben sich wie folgt:

- Höhe und Breite des Slices: $h = 350 \mu\text{m}$, bzw. $b = 4000 \mu\text{m}$
- Breite Stratum pyramidale: $50 \mu\text{m}$; Breite Stratum radiatum: $250 \mu\text{m}$
- Stromquellichte (CSD):

$$j_{csd}(x, z) = j_{csd}(x) * \vartheta(z), \quad (3.20)$$

mit

$$j_{csd}(x) = \begin{cases} j_{pyr} & \text{im Stratum pyramidale mit } j_{pyr} = 0.375 \text{ pA}/\mu\text{m}^3 \\ j_{rad} & \text{im Stratum radiatum mit } j_{rad} = -0.075 \text{ pA}/\mu\text{m}^3 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

sowie

$$\vartheta(z) = \begin{cases} 0 & \text{für } z \leq h_l \\ 1 & \text{für } h_l < z \leq h - h_l \\ 0 & \text{für } h - h_l < z \end{cases}$$

- Spezifischer Widerstand im Slice: homogen, isotrop mit $\rho_{slice} = 1/\sigma_{slice} = 300 \Omega\text{cm}$
- Dicke der Schichten inaktiver Zellen: d_l , später näher zu spezifizieren

Die Randbedingungen ergeben sich gemäß Gl. 3.12 bis 3.10. Das zu berechnende Gebiet erstreckt sich über die gesamte Querschnittsfläche des Hirnschnitts. Mit obiger Verteilung für $j_{csd}(x, z)$ (3.20) wurde Gleichung 3.9 mit dem SOR-Algorithmus gelöst werden [Pre 97], wobei ein quadratisches Gitter entlang des Lösungsgebiets mit einer

Gitterkonstanten von $1\ \mu\text{m}$ verwendet wurde. Das Gitter war groß genug, dass Randeffekte an den lateralen Gittergrenzen vernachlässigt werden konnten.

Lösungen der partiellen Differentialgleichung In Abb. 3.6 sind Lösungen des Modells für drei verschiedene dicke Schichten inaktiver Zellen $d_l = 0\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$, sowie $100\ \mu\text{m}$ gezeigt. Das errechnete Feldpotential $\varphi(x, z)$ ist in der (x, z) -Ebene farbkodiert eingezeichnet und mit zusätzlichen Isopotentiallinien versehen (Inkrement je $0.2\ \text{mV}$).

Der Fall $d_l = 0\ \mu\text{m}$ entspricht – bis auf die Gesamtdicke des Schnitts – dem Idealfall kultivierter Hirnschnitte auf Transistorchips, die direkt am Substrat festwachsen, während tote Zellen infolge Degeneration verschwinden (siehe [Bes 02], [Hut 04]). Obwohl alle Zellschichten gleich aktiv sind, ist aufgrund der Kopplung des Schnitts an Bad und Substrat die Aktivität oberhalb der Chipoberfläche am größten und klingt mit wachsendem z ab.

Aufgrund der Eigenschaft des Hirngewebes als Volumenleiter breitet sich das Feldpotential φ über die Grenzen aktiven Gewebes hinweg aus. Die 2 Extrema φ_{max} für Stratum pyramidale und -radiatum wandern mit steigender Dicke inaktiver Zellen (d_l) vom Substrat weg in die Mitte des Schnitts, allerdings mit verschiedenen Werten z_{max} für Stratum pyramidale und -radiatum. Näherungsweise kann man jedoch von maximaler Aktivität in der Mitte des Schnitts ausgehen.

Am Substrat klingt die mit planaren Sensoren messbare Amplitude infolge der isolierenden Schicht inaktiver Zellen und der insgesamt schwächer werdenden Aktivität ab, erreicht aber durch die kapazitive Kopplung stets einen Wert ungleich 0. Eine kapazitive Messung mit planaren Sensoren ist an der Unterseite eines akuten Hirnschnitts prinzipiell möglich, jedoch stark abhängig von deren Signal/Rausch Verhältnis (s.u.).

z-Profile, senkrecht zum Substrat Um die Frage nach Verlusten der Signalamplituden in Abhängigkeit von den Dicken d_l zu klären, werden Amplitudenprofile parallel zur z -Achse betrachtet. Dazu wurde im Stratum radiatum diejenige Position ausgewählt, an der für $d_l = 0$ am Substrat das EPSP mit höchster Amplitude erreicht wurde⁹. Abbildung 3.7 zeigt diese Querschnitte aus oben diskutierten Beispielen 3.6, für $d_l = 0, 50$ und $100\ \mu\text{m}$; die Regionen aktiver Zellen sind durch gestrichelte Linien markiert. Aufgrund ohmscher Kopplung an das Bad gehen die Amplitudenprofile nahe der oberen Schnittgrenze linear gegen 0. Der Wechsel in der Krümmung reflektiert jeweils die Grenzen zu den aktiven Zellen. Das (sinkende) Amplitudenextremum wandert mit größer werdendem d_l zunehmend in die Mitte des Schnitts. Nahe dem Substrat ($z = 0$) strebt das Profil aufgrund der kapazitiven Kopplung gegen einen konstanten Wert.

⁹Nach Abb. 3.3 bei $x = 106\ \mu\text{m}$; diese Position wurde für alle z-Profile in diesem Kapitel beibehalten, die Abweichung durch Schichten inaktiver Zellen ist minimal.

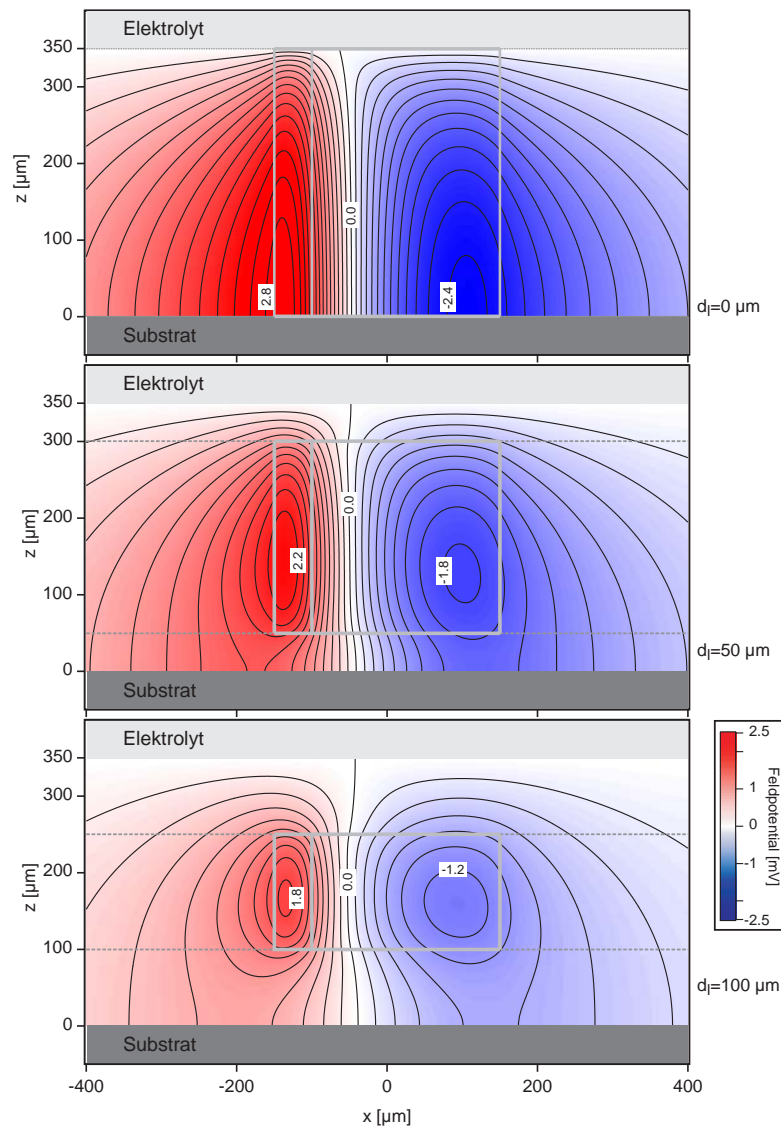


Abbildung 3.6. Auswirkung verschiedener Schichtdicken inaktiver Zellen (d_i) auf die Verteilung der Feldpotentiale im akuten Hirnschnitt auf isolierendem Substrat (Geometrie wie in Abb. 3.3, Dicken $d_i = 0 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, sowie $100 \mu\text{m}$). Der Schnitt wird von Substrat und Bad (jeweils unten, dunkelgrau, bzw. oben, hellgrau) begrenzt, was die von-Neumannsche, bzw. Dirichletsche Randbedingung vorgibt. Mit steigender Dicke inaktiver Zellen wandert das Zentrum maximaler Aktivität in die Mitte des Schnitts bei gleichzeitig sinkender Gesamtamplitude; das messbare Signal am Substrat unterhalb des Schnitts wird infolgedessen zunehmend abgeschwächt (Gestrichelte, graue Linien: Grenzen inaktiver Zellschichten; durchgezogene, graue Linien: Regionen aktiver Zellen (links: Stratum pyramidale, rechts: Stratum radiatum); Stromquellendichten $j_{csd_{pyr}}$ bzw. $j_{csd_{rad}}$ in allen 3 Fällen gleich; Inkrement der Isopotentiallinien jeweils 0.2 mV).

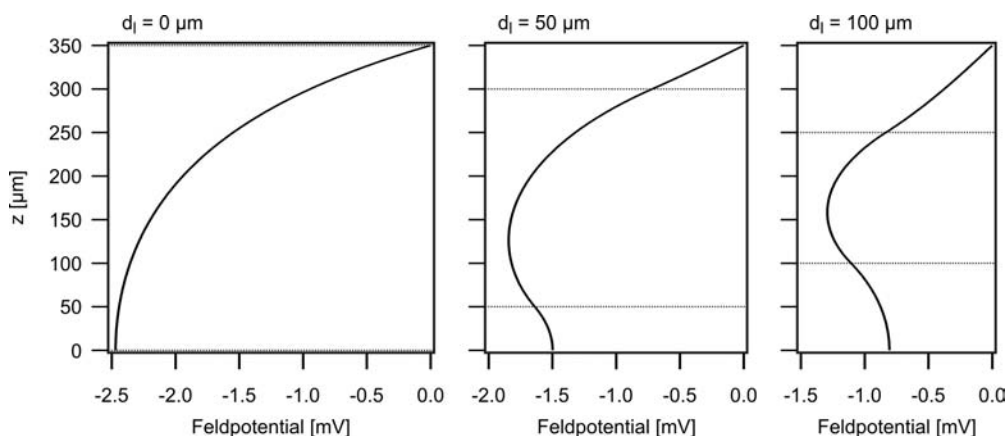


Abbildung 3.7. Profile von Feldpotentialen maximaler (negativer) Amplitude entlang eines Querschnitts senkrecht zum Substrat für verschiedene Dicken d_l inaktiver Zellen. Die Werte stammen aus den Modellen in Abb. 3.6, jeweils für $x = 106 \mu\text{m}$. Die gestrichelten Linien markieren die Grenzen inaktiver Zellen an den Schnittoberflächen.

Wie sich die Existenz inaktiver Zellen für die Messbarkeit von Feldpotentialen auswirkt, ist in Abb. 3.8 für die Stelle der entnommenen Profile zu sehen. Teilabb. 3.8 A zeigt das am Substrat messbare Signal in Abhängigkeit von der Schichtdicke d_l . Da die Maximalamplitude des Feldpotentials sinkt, während die dicker werdenden, isolierenden Zellschichten die Signale zum Substrat hin zusätzlich abschwächen, ist der Signalabfall extrem. Abb. 3.8 B zeigt die relativen Signaleinbußen, gemessen vom Substrat zur Mitte des Schnitts. Die Signaleinbußen, die durch die inaktive Zellschicht hervorgerufen werden, betragen demnach maximal 50%. Ist im Experiment das intrinsische Rauschen der planaren Sensoren im Substrat klein genug, muss also eine Detektion mit FETs möglich sein. Es ist an dieser Stelle zu betonen, dass es sich um ein Modell mit hypothetisch angenommenen Werten für zugrundeliegende CSD handelt. Zugleich setzt es einen völlig intakten Schnitt – natürlich bis auf die inaktiven Zellschichten – voraus.

x-Profil, parallel zum Substrat Wie wirken sich Schichten inaktiver Zellen auf die Schärfe der Feldpotentialverteilung am Substrat aus? Ist die räumliche Auflösung neuronaler Strukturen dort überhaupt möglich? In Abb. 3.9 sind hierfür Profile gezeigt, diesmal am Substrat entlang der x -Achse, d.h. entlang der betrachteten CA1-Dendritenbäume, entsprechend vom Stratum pyramidale zum Stratum radiatum. Es werden wieder die 3 Fälle $d_l = 0 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, sowie $100 \mu\text{m}$ behandelt. Die x -Profile sind jeweils an den Stellen $z = 175 \mu\text{m}$ nahezu maximaler Amplituden, sowie $z = 0 \mu\text{m}$, entsprechend einem Recording am Substrat, entnommen¹⁰.

In der Mitte der Schnitte markieren die Krümmungen der Feldpotentiale $\varphi(x)$ die

¹⁰Die Abweichung für $z = 175 \mu\text{m}$ relativ zu den Positionen z maximaler Amplitude ist gering.

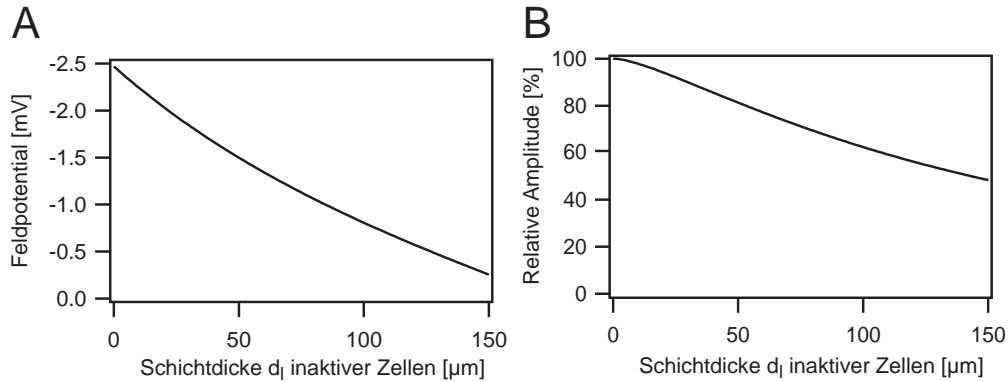


Abbildung 3.8. Abnahme maximal am Substrat messbarer Signale des EPSPs im Stratum radiatum, abhängig von verschiedenen Schichtdicken d_l inaktiver Zellen. **(A)** Abnahme messbarer Signalamplituden, sowie **(B)** Relativer Signalanteil im Vergleich zur Maximalamplitude im Schnitt. (Messposition jeweils $x = 106$ μm , $z = 0$ μm , im Sinne von Abb. 3.9).

Regionen aktiver neuronaler Elemente und geben das Abbild der CSD wieder, welche der neuronalen Aktivität zugrunde liegt. Dieser Verlauf des Profils ist für $d_l = 0$ μm am Substrat in ähnlicher Schärfe sichtbar.

Für größere Schichtdicken d_l geraten die aktiven Zonen aus dem Fokus und die an $z = 0$ messbaren Profile verschwimmen immer mehr. Die Orte der Feldpotentialmaxima bzgl. Str.pyr. und Str.rad. rücken zunehmends aus den Zentren der sie verursachenden, aktiven Regionen, wobei der Fehler bei $d_l = 100$ μm beträchtlich wird. Es ist zu erwarten, dass durch diese, einem Tiefpass vergleichbare Eigenschaft des Hirnschnitts die gemessenen Feldpotentiale bei größeren d_l zunehmend an Schärfe verlieren. Besonders räumlich eng begrenzte, neuronal aktive Strukturen würden weggefiltert werden und mit planaren Sensoren nicht mehr messbar sein. Beispiel hierfür wäre spontane Aktivität einzelner Neuronen oder kleiner Neuronpopulationen. Aus diesen Gründen ist es dennoch nötig, durch geeignete Präparationstechniken möglichst kleine Schichten inaktiver Zellen zu erzielen, um Strukturen sinnvoll auflösen zu können.

3.3.2. Recording: Hirnschnitt auf Chip mit zusätzlichem Spalt

Wird der Hirnschnitt nicht angedrückt¹¹, ist allein aufgrund der rauen Schnittflächen ein Spalt zwischen Schnitt und Substrat, angefüllt mit Elektrolyt, denkbar. Im Folgenden werden die Auswirkungen verschiedener Elektrolytfilm-Dicken d_f diskutiert. Es wurde erneut eine Symmetrie in Richtung der y -Achse angenommen.

Parameter Für Modellrechnungen wird der vorige Fall in Kap. 3.3.1 um das umgebende Bad erweitert, wobei die Parameter des vorigen Modells ohne Bad beibehalten

¹¹Ein gleichmäßiges, flächiges Andrücken ist schwer realisierbar; lokales Andrücken wurde vorerst vermieden, um den Hirnschnitt nicht zu schädigen.

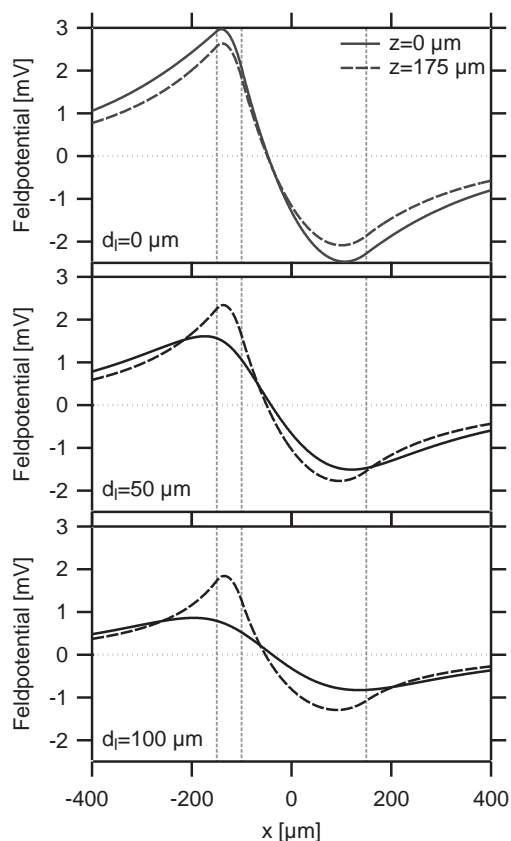


Abbildung 3.9 Profile von Feldpotentialen entlang der x -Achse unterhalb, sowie mittig des Schnittes (jeweils durchgezogene, bzw. gestrichelte Linie). Die Schichtdicken inaktiver Zellen betragen $d_l = 0 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, sowie $100 \mu\text{m}$. Während im Fall $d_l = 0 \mu\text{m}$ nur geringfügige Abweichung zwischen beiden Profilen besteht, wird das Profil mittig im Schnitt zusätzlich in Amplitude und Form durch die wachsende Schicht inaktiver Zellen d_l verändert. Unterhalb des Schnitts befindliche Sensoren werden mit zunehmender Schichtdicke d_l nur ein abgeflachtes, verwaschenes Abbild der Feldpotentiale relativ zur Hirnschnittmitte messen können. Die räumliche Auflösung geht für hohe d_l verloren, so dass sehr eng begrenzte Extrema, z.B. APs einzelner Zellen, herausgefiltert werden können. (Grau gestrichelten Markierungen: Begrenzung der aktiven Regionen des Stratum pyramidale, links, sowie -radiatum, rechts).

wurden (siehe Kap.3.3.1). Es gilt zusätzlich:

- Höhe und Breite des umgebenden Bades: $1 \times 2 \text{ cm}^2$
- Breite des Hirnschnitts in Richtung x : $2000 \mu\text{m}$
- Spezifischer Widerstand Elektrolyt: $\rho_{\text{Bad}} = 64 \Omega\text{cm}$ (Wert für ACSF¹²)
- Schichtdicke für Film Elektrolyt zwischen Schnitt und Bad: d_f

Diese Größe d_f stelle nun den zweiten freien Parameter zur bisherigen Dicke d_l inaktiver Zellschichten an den Schnittoberflächen. Als numerisches Verfahren wurde aufgrund des Sprungs in der Leitfähigkeit die Methode Finiter Elemente (FEM) verwendet, um bessere Konvergenz der gesuchten Lösungen zu erzielen. Das Lösungsgebiet erstreckt sich über die Querschnittsfläche des Bades.

Lösungen der partiellen Differentialgleichung In Abb. 3.10 ist, analog zu oben diskutiertem Fall, die Verteilung der Feldpotentiale entlang der (x, z) -Ebene über die Schnittgrenzen hinweg, für drei die verschiedenen Schichtdicken $d_f = 10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, sowie

¹²Siehe Anhang A.4.

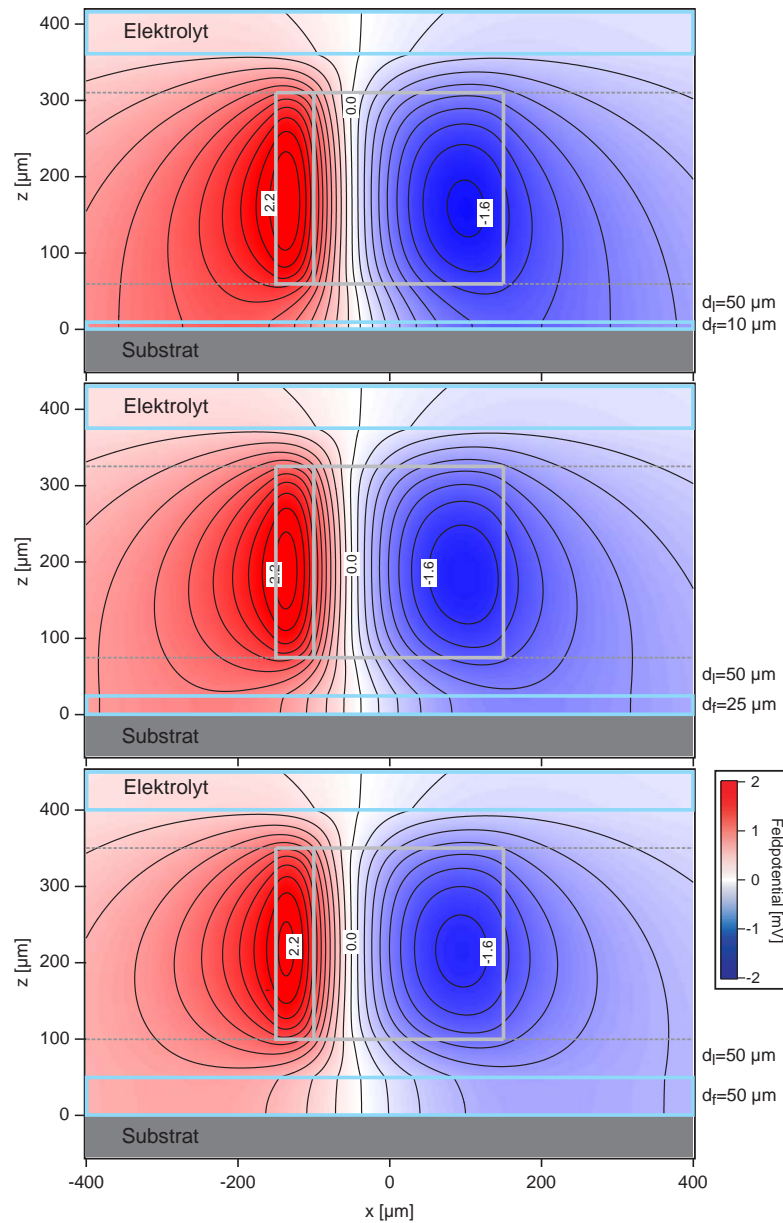


Abbildung 3.10. Theoretische Verteilung der Feldpotentiale im Hirnschnitt auf isolierendem Substrat mit umgebendem Elektrolyt, abhängig von der Dicke der Wasserschicht zwischen Schnitt und Substrat (Dicke inaktiver Zellen $50\ \mu\text{m}$). Es werden für den Elektrolytfilm 3 verschiedene Dicken angenommen: $d_f = 10\ \mu\text{m}$, $25\ \mu\text{m}$, sowie $50\ \mu\text{m}$ (von oben nach unten). Der Schnitt liegt auf dem Substrat (dunkelgrau) und wird beidseitig von Elektrolyt (blau) begrenzt. An den Schnittgrenzen folgt bei Eintreten der Elektrolytumgebung entsprechend ein Sprung der Leitfähigkeit. Mit steigender Dicke der unteren Elektrolytschicht d_f sinkt die Gesamtamplitude mittig im Schnitt nur geringfügig. Das messbare Signal, am Substrat unterhalb des Schnitts, wird dagegen durch den Elektrolyt, der sich direkt oberhalb des Substrats befindet, erheblich abgeschwächt (Geometrie wie in Abb. 3.6).

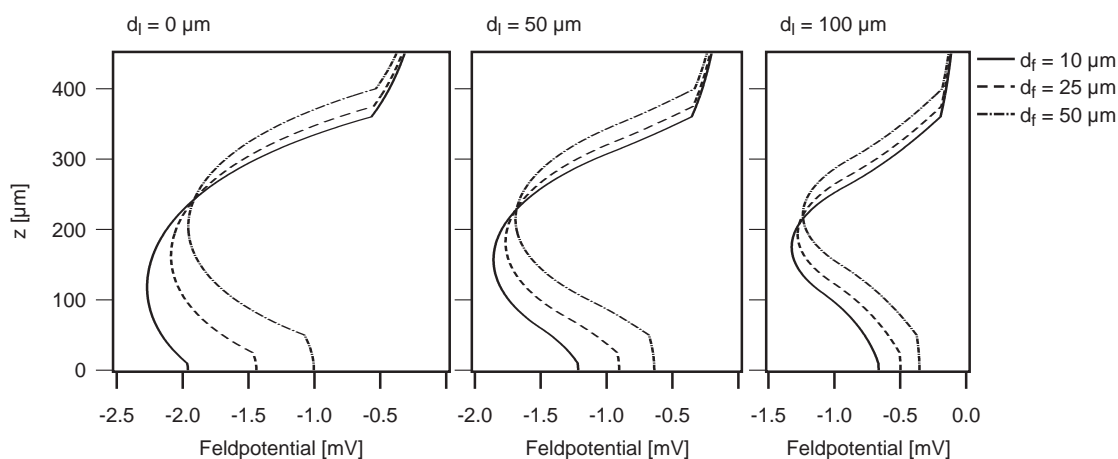


Abbildung 3.11. Einfluss des Wasserfilms unterhalb des Slices auf Feldpotentiale: Profile entlang der z -Achse. Gezeigt sind z -Profile für jeweils 3 Schichtdicken d_f des Elektrolyt-Films bei 3 Dicken d_l inaktiver Zellen ($d_f = 10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, sowie $50 \mu\text{m}$, bzw. $d_l = 0 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, sowie $100 \mu\text{m}$). Die Profile sind stets an der Stelle maximaler Amplitude im Stratum radiatum, für den Fall ohne inaktiver Zellen sowie ohne Wasserfilm, entnommen.

$50 \mu\text{m}$ gezeigt. Die Schichten inaktiver Zellen sind vorerst konstant bei $d_l = 50 \mu\text{m}$, was einem realistischen Wert entspricht.

An der Grenze zum Substrat herrscht nach wie vor kapazitive Kopplung. Obwohl der Hirnschnitt nun beiderseits ohmsch mit dem (idealerweise) auf Masse befindlichem Elektrolyt kontaktiert ist, sinkt die Gesamtamplitude mittig im Schnitt nur geringfügig. Am Substrat sorgt der Film niederohmigeren Elektrolyts jedoch für einen erheblich größeren Abfall in der Signalamplitude als die Existenz inaktiver Zellen.

z -Profile, senkrecht zum Substrat Die Auswirkung der zusätzlichen Schicht Elektrolyt ist in Abb. 3.11 erneut anhand von Profilen parallel zur z -Achse zu sehen. Für je 3 Schichten inaktiver Zellen $d_l = 0 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$ wurde die Elektrolytschicht zu $d_f = 10 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$, sowie $50 \mu\text{m}$ verändert. Die Profile sind den gleichen Stellen $x = 106 \mu\text{m}$ entnommen wie jene in Kap. 3.3.1.

Bereits im Fall ohne inaktiver Zellen beträgt der Signalverlust der Maximalamplitude (jetzt mittig im Schnitt) aufgrund der zusätzlichen, beiderseitigen ohmschen Kopplung ca. 15% ($d_l = 10 \mu\text{m}$) bis 25% ($d_l = 10 \mu\text{m}$) relativ zu den 2.5 mV ohne Film. Das am Substrat messbare Signal sinkt um 20% bis 60%. Für größere d_l schwindet die Aktivität, so dass die am Substrat messbaren Signalamplituden zusätzlich einbrechen. Die relativen Signaleinbußen bleiben in etwa gleich. In Abb. 3.12 ist die an $z = 0$ erreichte Amplitude für die gesamte Kurvenschar der z -Profile gezeigt, wenn d_f Werte von 0 bis $50 \mu\text{m}$ einnimmt, sowie d_l Werte von 0 bis $150 \mu\text{m}$. Für den realistischen Wert inaktiver Zellen von ca. $50 \mu\text{m}$ sollten bei einem sehr groß gewählten Spalt von $25 \mu\text{m}$ noch mit einer

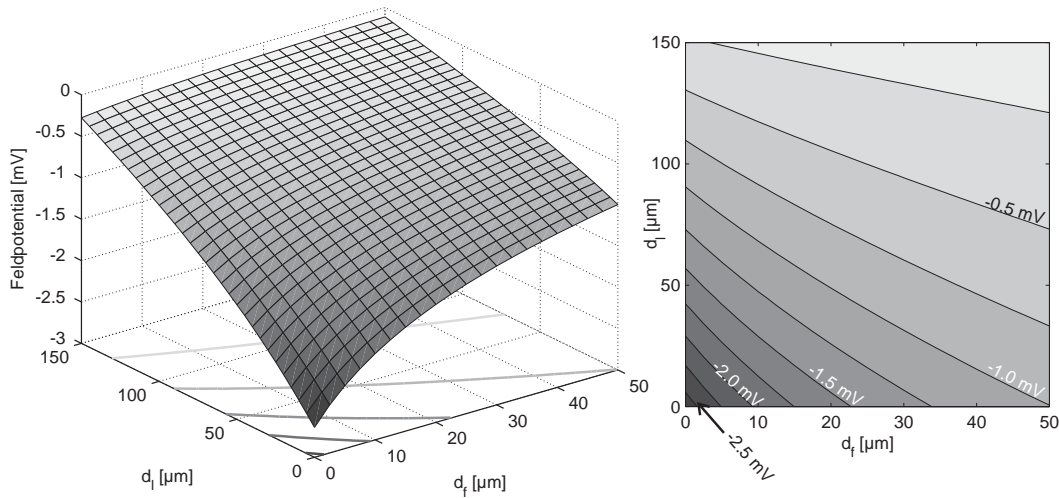


Abbildung 3.12. Maximal erreichbare EPSP-Amplitude, abhängig von Wasserfilm sowie Schicht inaktiver Zellen (Feldpotential φ jeweils für Position $(x, z) = (106, 0) \mu\text{m}$) bei verschiedenen d_f und d_l (rechts zusätzliche Aufsicht; Inkrement der Isopotentiallinien 0.25 mV).

Signalausbeute von ca. 50%, relativ zur Amplitude von ca. $-1.5 \mu\text{V}$ für $d_f = 0$, zu rechnen sein.

x-Profil, parallel zum Substrat Obwohl sich die Feldpotentiale trotz zusätzlichem Film Elektrolyt in gewissem Rahmen als detektierbar erweisen, stellt sich die Frage, wie sich die zusätzliche Abschwächung auf die räumliche Auflösung auswirkt. Analog zu Kap. 3.3.1 sind in Abb. 3.13 Profile entlang der x-Achse parallel zum Substrat ($z = 0$, durchgezogene Linien) gezeigt, sowie Profile mittig im Schnitt (gestrichelte Linien); dabei wird das Modell ohne Film und ohne Schichten inaktiver Zellen (A, rot) direkt verglichen mit dem Fall $d_l = 50 \mu\text{m}$ inaktiver Zellen (B): zu sehen ist hier (i) das Profil ohne Elektrolytfilm, wie es am Substrat vorherrscht (grau), sowie (ii) die Profile für den Fall eines Elektrolytfilms von $d_f = 10 \mu\text{m}$, jeweils wieder am Substrat, sowie mittig im Schnitt (durchgezogen, bzw. gestrichelt).

In der Mitte des Schnitts ist im Vergleich zu Abb. 3.9 nur ein geringer Signalverlust zu verzeichnen; dies gilt auch für steigende Elektrolytschichten bis $d_f = 50 \mu\text{m}$ (nicht explizit gezeigt). Das am Substrat gemessene Profil ($z = 0 \mu\text{m}$) ist dagegen bereits bei $d_f = 10 \mu\text{m}$ stark abgeschwächt. Zusätzlich zeigen sich die Konturen des Profils zusätzlich verschwommen. Im Zuge dessen verschieben sich beide Extrema, relativ zum Profil in der Mitte des Schnitts, zusätzlich aufgrund der Existenz des Elektrolytfilms¹³.

Zusammenfassend ist für die räumliche Abbildung neuronaler Strukturen demnach die Qualität der Schnitte und deren kapazitive Kontaktierung mit dem Chip in zwei-

¹³Verschiebung der Extrema relativ zum mittigen x-Profil: für Str. pyr. $37 \mu\text{m}$ ($d_f = 0$) bzw. $70 \mu\text{m}$ ($d_f = 10 \mu\text{m}$); für Str. rad. $22 \mu\text{m}$ ($d_f = 0$) bzw. $51 \mu\text{m}$ ($d_f = 10 \mu\text{m}$);).

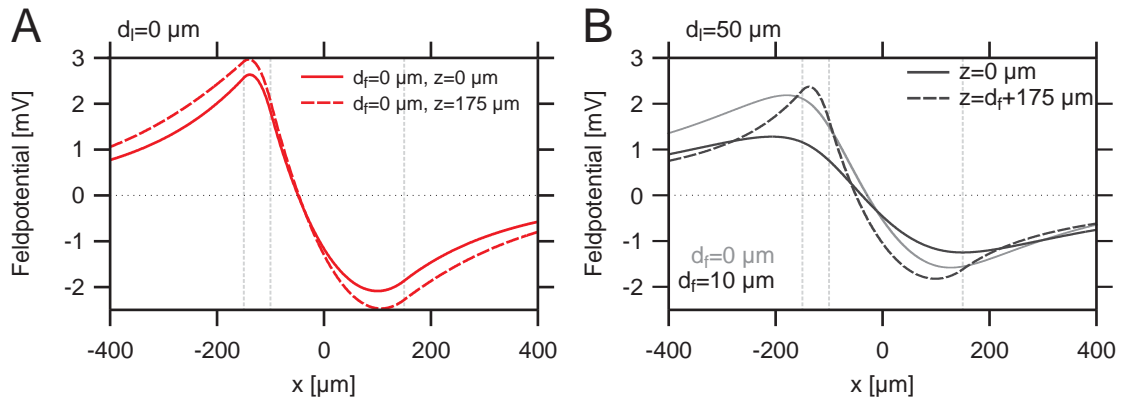


Abbildung 3.13. Profile von Feldpotentialen entlang der x-Achse am Substrat, sowie durch Mitte des Schnitts, mit und ohne Film aus Elektrolyt zwischen Schnitt und Substrat (jeweils durchgezogene Linien entnommen am Substrat ($z = 0$); gestrichelte Linie mittig im Schnitt) **(A)** Profile für direkt koppelnden Schnitt ohne inaktive Zellen (rot; ohne zusätzlichem Elektrolyt; intakter Schnitt bis auf Schnittdicke vergleichbar mit Schnittkultur). Im direkten Vergleich dazu: **(B)** Profile für das Modell mit Schichtdicke inaktiver Zellen $d_i = 50 \mu\text{m}$, einmal ohne ($d_f = 0 \mu\text{m}$, grau), und einmal mit zusätzlichem Elektrolyt der Schichtdicke $d_f = 10 \mu\text{m}$ (schwarz).

erlei Hinsicht entscheidend: (i) einmal in Bezug auf das zu erzielende Signal/Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von den Feldeffekttransistoren auf den Chips, die die in dieser Arbeit verwendet wurden¹⁴. Zum anderen (ii) jedoch auch, um eine noch sinnvolle Abbildung auch eng begrenzter neuronaler Strukturen durchführen zu können. Aus diesem Grund wurde einige Arbeit investiert, um die Schnittqualitäten zu verbessern, sowohl hinsichtlich der Vitalität als auch der Schnittoberflächen.

¹⁴RMS Werte von 25 bis 100 μV (Eigenbauchips), bzw. 100 bis 150 μV (CMOS-Chips); siehe Kap. 4.4.1, bzw. 4.4.2.

3.3.3. Stimulation: Auswirkung inaktiver Zellen und möglicher Spalt

In Abschnitt 3.2.2 wurde bereits der Ansatz beschrieben, mit dem im Folgenden die Möglichkeit einer Stimulation akuter Schnitte diskutiert werden soll.

Es zeigte sich in [Hut 04], dass mit der schnellen fallenden Flanke von Spannungsrampen Aktionspotentiale in Hirnschnittkulturen ausgelöst werden können. Um die Frage zu beantworten, ob mit dieser Methode auch akute Schnitte kapazitiv vom Chip stimuliert werden können, ist zu klären, wie dick die Schicht inaktivierbarer Zellen d_l maximal sein darf. Erst jenseits dieser Zone werden im akuten Hirnschnitt genug intakte Zellen und Axone vorzufinden sein, um Aktionspotentiale auszulösen. Es sei darauf hingewiesen, dass der Mechanismus der Stimulation für diese Betrachtung unerheblich ist und deshalb nicht explizit behandelt wird (siehe [Hut 06b]).

Nach den Erfahrungen in [Wie 09] sind bei kultivierten Schnitten an der Grenzfläche Gewebekultur – Substrat bis $z = 10 \mu\text{m}$ erregbare Neurone nur ausgedünnt vorhanden, wohingegen vermehrt nicht-aktivierbare Zellen (Gliazellen) auftreten. Kulturbedingt ist jedoch davon auszugehen, dass darüber befindliche Zellen komplett für eine Erregung zur Verfügung stehen.

Das Problem ist nun, dass die durch die Kultur abflachenden Hirnschnitte (ca. $70 \mu\text{m}$ in [Hut 06b], [Wie 09]) in etwa genauso dick ausfallen wie die zu erwartenden Schichten toter/inaktiver Zellen bei akuten Hirnschnitten. Es ist also im Folgenden zu klären, wie stark das durch den Kondensator erzeugte Spannungsprofil innerhalb des akuten Schnittes abfällt, so dass dessen aktivierbare Zellen mit vergleichbarer Reizstromstärke erreicht werden können, wie es bei kultivierten Schnitten der Fall ist.

Als Ansatz wird das Szenario direkt mit den Erfahrungen der Stimulation kultivierter Schnitten verglichen, womit insgesamt 3 Modelle berechnet werden. Da durchaus denkbar ist, dass akute Schnitte durch ihre faserig ausfallenden Oberflächen weniger ideal an das Substrat koppeln könnten, sind für einen akuten Hirnschnitt zwei Grenzfälle zu betrachten: (i) einmal ein ideal koppelnder akuter Hirnschnitt, der direkt an das Substrat grenzt, und (ii) zweitens ein Fall mit zusätzlichem Elektrolytfilm der Schichtdicke d_f zwischen Gewebe und Substrat. Dies ist dann (iii) mit dem Modell eines ideal koppelnden kultivierten Hirnschnitts zu vergleichen.

Parameter Da in dieser Arbeit dieselben Chips und ein ähnlicher Versuchsaufbau wie in [Hut 04] verwendet wurden, wurde gemäß Abschnitt 3.2.2 als Referenz das Szenario einer Stimulation einer ideal koppelnden Hirnschnittkultur berechnet. Alle oben erwähnten drei Modelle wurden im Anschluss normiert mit Bezugnahme auf den maximal erreichbaren Wert φ_{max} des Kulturmodells.

Für die Dicke der Hirnschnittkultur wurde $h = 70 \mu\text{m}$ gewählt ([Hut 06b] [Wie 09]), für die Fälle akuter Schnitte $h = 350 \mu\text{m}$. Bzgl. des (als Grenzwert anzusehenden)

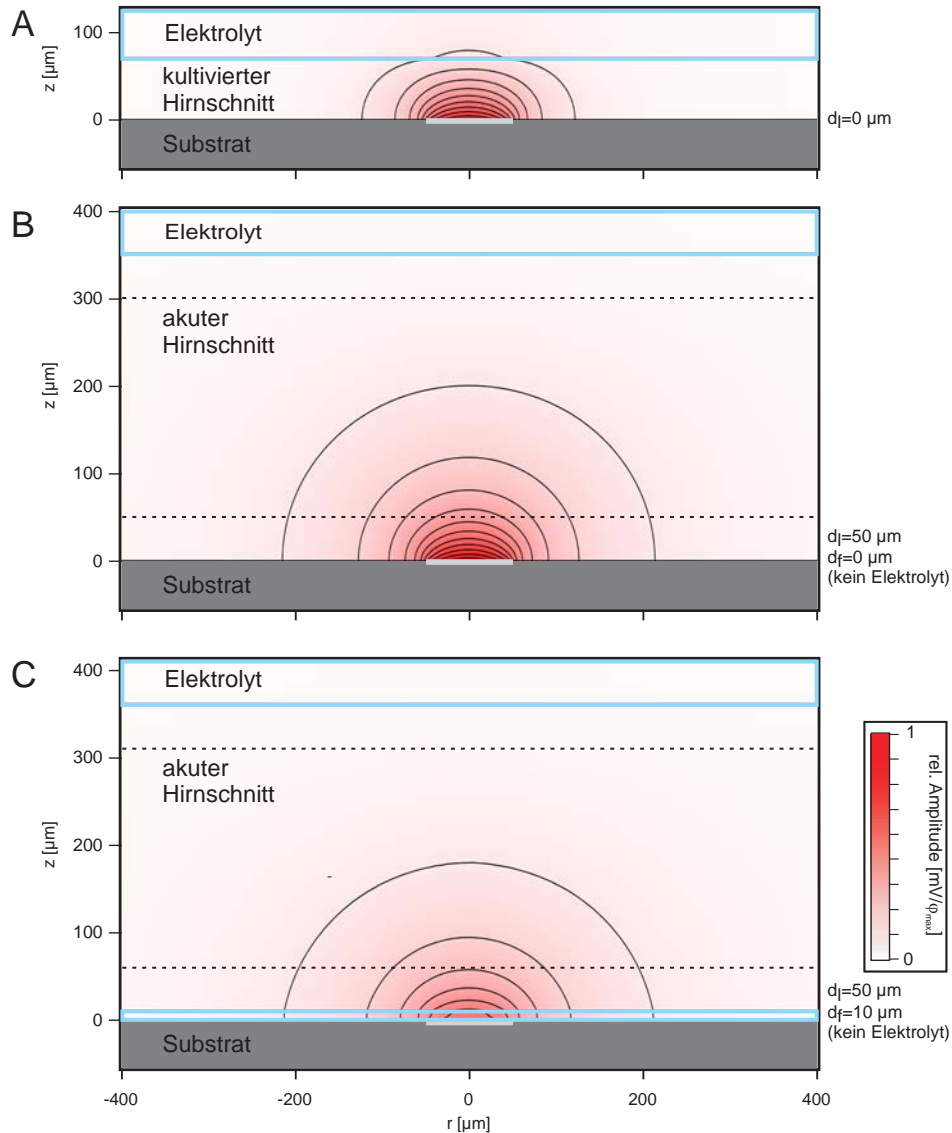


Abbildung 3.14. Lösungen des Stimulationsmodells für **(A)** kultivierten Schnitt ($70\ \mu\text{m}$), **(B)** akuten Hirnschnitt ($350\ \mu\text{m}$), sowie **(C)** akuten Schnitt mit zusätzlicher Zwischenschicht Elektrolyt (Dicke $d_f = 10\ \mu\text{m}$). Der Durchmesser des Stimulationsspot beträgt $100\ \mu\text{m}$ (grau markiert). Die Stimulationsparameter sind jeweils identisch. Die berechneten Amplituden sind auf die Maximalamplitude φ_{max} für den Fall des kultivierten Schnitts normiert. Die Isopotentiallinien betragen jeweils 10% der maximalen Amplitude.

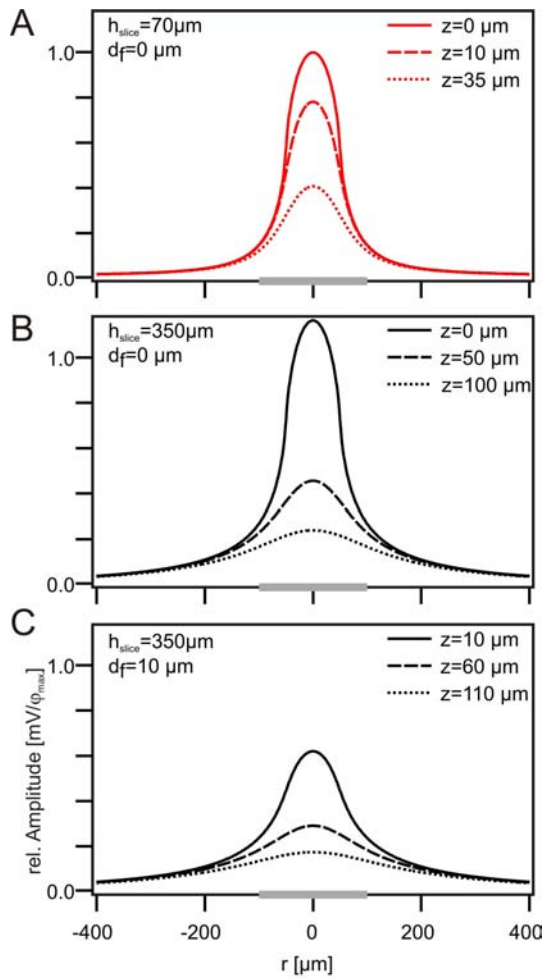


Abbildung 3.15 Stimmulationsprofile entlang der radialen Achse für einen kultivierten Hirnschnitt (rot) im Vergleich mit akuten Schnitten (schwarz). Die Profile sind normiert bzgl. der Maximalamplitude φ_{max} der Lösung für den kultivierten Schnitt. Der Durchmesser des Stimmulationsspots (100 μm , grau markiert) sowie die übrigen Stimmulationsparameter sind jeweils identisch. **(A)** Profil für Stimulation eines kultivierten Schnitts parallel der Substratoberfläche (für Positionen $z = 0, 10$, sowie 35 μm ; Schnittdicke $h = 70 \mu\text{m}$). **(B)** Profile verschiedener Höhen z für Stimulation eines akuten Hirnschnitts ohne Elektrolytfilm zwischen Schnitt und Chip (für Positionen $z = 0 \mu\text{m}$, 50 sowie 100 μm ; Schnittdicke $h = 350 \mu\text{m}$; Schichtdicke Elektrolyt $d_f = 0 \mu\text{m}$). **(C)** wie (B), nur mit zusätzlichem Film aus Elektrolyt zwischen Schnitt und Chip (Schichtdicke $d_f = 10 \mu\text{m}$).

zusätzlichen Wasserfilms wird die Schichtdicke $d_f = 10 \mu\text{m}$ eingesetzt¹⁵. Die Stimmulationsparameter in j_{stim} sind in Modellrechnungen (i) – (iii) jeweils gleich, konnten aber vorerst beliebig gewählt werden, da auf den Fall der Hirnschnittkultur referenziert wurde.

Lösungen der partiellen Differentialgleichung In Abbildung 3.14 sind die Lösungen der Gleichung (3.17) für oben genannte drei Parametersätze gezeigt: (A) der Fall des kultivierten Hirnschnitts gilt als Referenz, Fälle (B) und (C) zeigen die Lösungen für einen 350 μm dicken akuten Hirnschnitt, jeweils ohne, bzw. mit zusätzlichem Film zwischen Substrat und Schnitt. Alle drei Lösungen basieren auf denselben Stimmulationsparametern und wurden auf die Maximalamplitude φ_{max} des Kulturmodells normiert. Anhand der Isopotentiallinien (Schrittweite 10%) wird ersichtlich, wie stark die generierte Reizspannung φ im ideal koppelnden akuten Schnitt (B, $d_f = 0$) in den unteren 50 μm

¹⁵Ergebnisse vorwiegend liegt der Wert zwischen 0 und max. 10 μm ; siehe Kap. 5, bzw. [Sta 08].

abfällt. Im Falle einer zusätzlichen 10 μm dicken Elektrolytschicht (C) fließt ein großer Teil des kapazitiven Reizstroms über das niederohmige Medium ab.

Abbildung 3.15 zeigt entsprechend Profile parallel zum Substrat (also entlang radialer Achse) für verschiedene Höhen z innerhalb der Schnitte. Der Idealfall (A), die Stimulation einer 70 μm dicken, ideal koppelnden Hirnschnittkultur, gelte wieder als Referenzsystem. Wie oben erwähnt, kann in den ersten 10 μm mit vermehrter Gliazellbildung gerechnet werden. Für $z = 10 \mu\text{m}$ werden noch ca. 78% von φ_{max} erreicht. Wird angenommen, dass in Lösung (A) genau die Schwelle φ_{thr} einer erfolgreichen Stimulation erreicht wurde, kann also in erster Näherung $\varphi_{max} \leq \varphi_{thr} \leq \varphi|_{z=10 \mu\text{m}}$ angenommen werden. Der zugehörige kapazitive Stimulationsstrom sei I_{thr}

Auf den Fall eines ideal koppelnden akuten Hirnschnitts (B) übertragen muss für eine erfolgreiche Stimulation ein vergleichbares φ_{thr} an den unterst gelegenen aktivierbaren Zellen erreicht werden: als erste Schätzung werden diese an jener Stelle im Schnitt angenommen, wo erste aktive Zellen jenseits der Schädigungen durch die Präparation existieren; als Richtwert sei hierfür das Gewebe ab $z = 50 \mu\text{m}$ genannt, wo $\varphi < 0.46 \cdot \varphi_{max}$ erreicht wird. Für eine erfolgreiche Stimulation ist also mindestens das doppelte des oben angenommenen kapazitiven Stimulationsstrom I_{thr} notwendig.

Aufgrund bereits oben ausgeführter Gründe kann für akute Hirnschnitte auf Siliziumchips nicht zwangsläufig eine vergleichbar perfekte Kopplung wie bei Schnittkulturen angenommen werden. Als weitere Abschätzung sei das Profil in Abb. 3.15 (C) genannt mit einem zusätzlichen Elektrolytfilm 10 μm Dicke. Am Ort erster reizbarer neuronaler Elemente ($z > 10 + 50 \mu\text{m}$) beträgt $\varphi < 29\% \cdot \varphi_{max}$. In diesem Fall ist analog obiger Abschätzung ein Reizstrom von mindestens $2.7 \approx 3 \cdot I_{thr}$ notwendig.

Bei dieser Abschätzung sei darauf hingewiesen, dass die Neuronen im kultivierten Schnitt anders gepackt sind wie im akuten Schnitt. Durch die kulturbedingte Verflachung der Zellschicht (z.B. des CA3 oder Faserbündel der Schaffer Kollateralen) sind zudem mehr Neurone gleicher Entfernung für die flächenabhängige Stimulation mittels Kondensator zugänglich. Für experimentelle Konsequenzen dieser Abschätzung bzgl. der Frage nach der Stimulierbarkeit akuter Hippocampuschnitte sei auf Abschnitt 5.4 verwiesen.

4. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden alle in dieser Arbeit verwendeten und entwickelten Materialien sowie Methoden vorgestellt¹. Zuerst werden Einzelheiten zur Präparation akuter Hirnschnitte und deren Handhabung beschrieben, zusammen mit pharmakologischen Substanzen, die für einige Experimente wichtig waren. Danach folgt eine Übersicht über verwendete Chiparten und die jeweiligen Messapparaturen, die aufgebaut wurden, um die Experimente durchzuführen.

4.1. Akute hippocampale Hirnschnitte

Zur Präparation akuter hippocampaler Hirnschnitte wurden sowohl Mäuse (C57 BL/6, Wildtyp) als auch Ratten (chbb:THOM, Wistar) verwendet. Der Vorteil von Maushirnschnitten ist die kleinere transversale Querschnittsfläche des Hippocampus im Vergleich zu der von Ratten. Gerade für die Messungen mit den CMOS-Chips (siehe Kapitel 6, 7 und 8) war die Verwendung kleiner Hirnschnitte aufgrund der sehr kleinen Grundfläche des Chipsubstrats notwendig. Für Messungen evozierter und epileptiformer Feldpotentiale (Kapitel 6 und 7) wurden juvenile Mäuse verwendet, die (postnatal) 40 – 60 Tage alt waren (p40 – p60). Hirnschnitte von Ratten wurden ausschließlich für die Messungen persistenter neuronaler Oszillationen herangezogen (Kap. 8). Dabei wurden relativ junge Tiere verwendet (ca. p15), so dass sich die Größe dieser Schnitte als gerade noch passend erwies. Die Präparationen wurden selbst durchgeführt, wobei auf Erfahrungen zurückgegriffen werden konnten, die in [Sta 04] gemacht wurden. Das Größenverhältnis hippocampaler Schnitte zwischen Ratte und Maus illustriert Figur 4.1. Das Gewebe der Maus (A, p50) ist um einiges dichter als beim transparenter wirkenden Hirnschnitt der Ratte (B, p14), was auf das unterschiedliche Alter der Tiere zurückzuführen ist.

Als Präparations- und Messmedium diente Carbogen-begaste, artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF), in welcher die Schnitte auch in einer Aufbewahrungskammer bis zur Messung gelagert wurden (Carbogen Gasgemisch: O₂ 95%, CO₂ 5%; Zusammensetzung ACSF: siehe Kapitel A.4). Die Hirnschnitte sind ca. 12 h (maximal u.U. bis zu 24h) überlebensfähig in dem Sinne, als dass noch vernünftige Feldpotentiale evoziert und gemessen werden können². Die Präparation ist also am selben Tag wie das Messvorhaben anzusetzen.

¹Für genaue Namen und Bezugsquellen siehe Anhang, Kap. A.3, S. 128.

²D.h. evozierte Feldpotentiale mit Amplituden von 500 μ V bis 1.5 mV; bei Oszillationen ± 250 μ V.

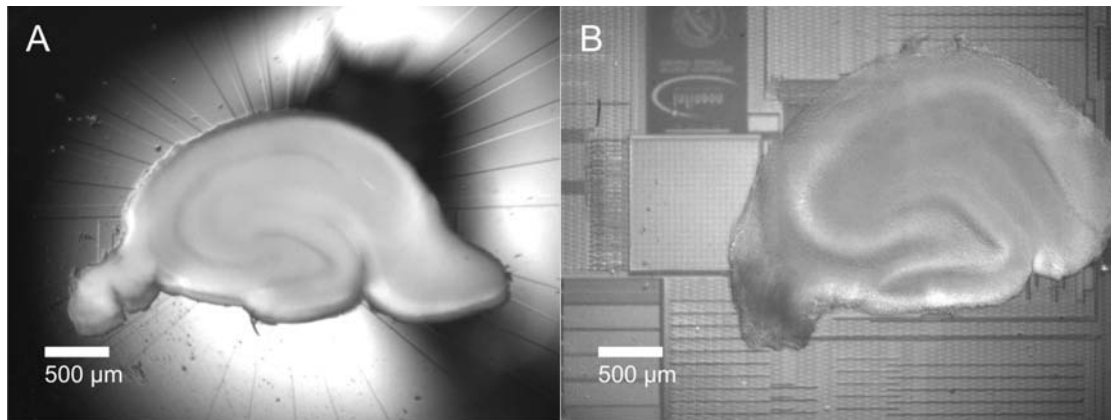


Abbildung 4.1. Akute Hirnschnittpräparate aus dem Hippocampus einer Maus (**A**) und einer Ratte (**B**). Das Alter der Maus betrug 50 Tage, das der Ratte hingegen 14 Tage.

4.1.1. Präparation

Die Hirnschnittpräparation folgt einem Standardprotokoll, das in wesentlichen Teilen von [Kor 96] übernommen wurde. Die Tiere wurden anfangs unter Diethyl Ether-, später unter Isoflouran-Atmosphäre betäubt und anschließend dekapitiert. Die Betäubung mit Isoflouran ist besonders für Tiere mit höherem Körpergewicht besser geeignet. Nach Öffnen des Schädelknochens erfolgte die Hirnentnahme durch Abtrennen des Kleinhirns und des Frontalhirns. Danach konnte das verbleibende Hirngewebe leicht mit einer Spatel herausgenommen und in eiskaltem Präparationspuffer (Carbogen-begaste ACSF) gekühlt werden, um den Metabolismus zu verlangsamen. Um hypoxische Schäden zu minimieren, sind für die Hirnentnahme maximal 60sec ab Dekapitation des Tieres zu veranschlagen, für die anschließende Kühlung ca. 2 bis 3min.

Die anschließende Präparation sollte aus selbigem Grund schnell und wenn möglich, auf eisgekühltem, mit ACSF durchtränktem Filterpapier durchgeführt werden: dazu wurde das Hirn in seine beiden Hemisphären durchtrennt und weitere Teile des Klein- und Frontalhirns abgeschnitten; anschließend wurde der komplette Hippocampus herauspräpariert. Größere Teile des Hippocampus, welche keine allzu große intrinsische Krümmung besitzen, wurden auf einem speziellen metallenen Träger mit Cyanacrylatkleber hochkant aufgeklebt und mit einem Agar-Agar-Block stabilisiert. Der Träger wurde anschließend in einer Pufferwanne an einem Vibratom (anfangs VT1000S, Leica, Wetzlar, Deutschland, später Leica VT1200S) montiert und mit diesem 350 µm bis 400 µm dicke Hirnschnitte angefertigt. Der horizontale Schneidvorgang dieser Geräte mit ihren vibrierenden Messern gewährleistete bei sehr kleinem Vorschub äußerst glatte Schnittoberflächen mit möglichst geringer Dicke an inaktiven Zellschichten. Während für die Messungen des Tiefenprofils von Feldpotentialen im Hirnschnitt noch das etwas ältere Modell (VT1000S) verwendet wurde (siehe Kap. 5, , sowie [Sta 08]), kam für die Messungen mit den hochauflösenden CMOS-Chips das neuere Modell (VT1200S) zum

Einsatz, mit dessen Prototyp in [Gei 02] eine geschädigte Zellschicht von stellenweise ca. 10 μm erreicht werden konnte.

4.1.2. Aufbewahrung der Hirnschnitte

Nach dem Schneidevorgang mit dem Vibratom wurden die Hirnschnitte, falls erforderlich, noch zurecht geschnitten. Nicht benötigte Areale, wie z.B. der entorhinale Cortex wurden entfernt, um später nicht den erforderlichen Platz in der Messkammer zu beanspruchen. Kompaktere Schnitte erwiesen sich zudem geeigneter für eine erfolgreiche Kopplung an das Chipsubstrat. Anschließend wurden die Schnitte aus dem eiskalten Medium in eine Aufbewahrungskammer (Eigenbau aus Plexiglas) gegeben; diese war mit ACSF gefüllt welches ständig mit Carbogen begast wurde. Im Medium befanden sich Inserts auf die die Hirnschnitte platziert wurden, so dass sie vollständig mit Medium umgeben wurden. So wurden sie, in der Regel bei Raumtemperatur, bis zur eigentlichen Messung in der Aufbewahrungskammer belassen, mindestens jedoch ca. 1 1/2 h.

Für die Messungen persistenter Oszillationen (Kap. 8) erwies es sich als notwendig, dass die Hirnschnitte, sowohl bei der Aufbewahrung als auch beim eigentlichen Experiment, optimal mit Sauerstoff versorgt werden [Huc 08]. In der Literatur werden bei dieser Art von Experimenten für die Aufbewahrung und Messung von Schnitten „Interface Chambers“ verwendet: die Schnitte werden dabei an der Grenzfläche Medium/Sauerstoff gehalten, so dass sie besser mit zusätzlichem Sauerstoff versorgt werden können (i.d.R. mit angefeuchtetem Carbogen). Dies steht im Gegensatz zur „submerged-Anordnung“ (auch „Oslo-Chamber“ genannt), wo die Slices komplett mit begastem Medium bedeckt sind. Zu diesem Zweck wurde die Aufbewahrungskammer mit permeablen Filtern (Millicell-CM, Millipore) und zusätzlicher Begasung auf den Interface-Typ umgerüstet und bis zum Experiment in einen Brutschrank gegeben (32 °C)³.

4.1.3. Verwendung von Agonisten und Antagonisten

Für das Auslösen epileptiformer Signale wurden Mg-freie Lösungen, sowie Bicucullin (Bicucullin-Methiod (BMI)) verwendet. Gamma Oszillationen wurden durch Zugabe von Carbachol evoziert. Die Pharmaka wurden als Stammlösungen in Wasser gelöst und direkt dem Messmedium in entsprechender Menge zugegeben.

Magnesium wirkt in Form von Mg^{2+} bei einigen Ionenkanälen als spannungsabhängiger Verschluss des Kanals. Unter den Glutamatrezeptoren ist dies ist beim NMDA-Typ der Fall, wo im Ruhezustand und auch noch im leicht depolarisierten Zustand extrazelluläres Mg^{2+} an einer spannungsabhängigen Bindungsstelle die Kanalpore verschließt. Bei hinreichend hoher Depolarisation, z.B. durch starke Aktivierung von AMPA Kanälen, wird die Pore freigegeben, so dass der Kanal durch Glutamat aktiviert werden kann (siehe [Now 84] sowie [And 07]). Ein Fehlen des extrazellulären Mg^{2+} , z.B. bei Mg-freier

³Weitere Maßnahmen werden in Abschnitt 8.1 diskutiert.

ACSF, erhöht also die Exzitationsbereitschaft bei gleichbleibender inhibitorischer Stärke.

Das Alkaloid **Bicucullin** ist ein Krampfgift und konkurriert mit GABA um die Bindungsstelle an den GABA-A Rezeptoren des ligandengesteuerten Chlorid-Ionenkanals. Der Kanal wird dabei direkt gehemmt, im Unterschied bei der Verwendung von Picrotoxin und Benzodiazepine.

Das auch als Arzneistoff bekannte **Carbachol** (Carbamoylcholin, CCH) ist ein Strukturanalogon des Neurotransmitters Acetylcholin und weist diesem gegenüber eine erhöhte chemische Stabilität auf. Als Agonist bindet es direkt an muscarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Diese sind metabotroper Natur (G-Protein-gekoppelt), im Gegensatz zu den ionotropen, nicotinischen AChR (ligandengesteuert; [Han 01]).

4.2. Prinzip des Transistorrecordings neuronaler Feldpotentiale

Chipseitig werden neuronale Feldpotentiale durch p-Kanal EOSFETs (electrolyte oxide silicon field-effect transistor) kapazitiv detektiert. Messungen neuronaler Signale wurden bereits in früheren Arbeiten erfolgreich durchgeführt ([Sch 98], [Bes 02], [Hut 06a]). Über die genaue Funktionsweise von Feldeffekttransistoren sei auf [Pie 96] sowie [Sze 06] verwiesen. Es soll dennoch kurz auf das Messprinzip eingegangen werden, da es in Kap. 5 der etablierten Methode des Recordings neuronaler Feldpotentiale mit Mikropipetten gegenübergestellt wird und beiderlei Signale verglichen werden.

Wie bei einem MOSFET (metal oxide silicon field-effect transistor) wird der source-drain Strom I_D durch die Spannung V_{DS} zwischen drain und source kontrolliert, sowie durch die Spannung V_{GS} zwischen Gate und source (siehe auch [Fro 05]). Das Gate ist nicht wie bei MOSFETs über einen Metallkontakt, sondern über die Oxidschicht kapazitiv an den Elektrolyt mittels einer externen Ag/AgCl Elektrode kontaktiert ($V_{GS} = V_{ES}$). Eine zusätzliche bias-Spannung zwischen Bulk und der Ag/AgCl-Elektrode im Bad legt mit V_{DS} und V_{ES} den Arbeitspunkt des Transistors fest; oberhalb der effektiven Schwellspannung $V_{ES} > V_T$, jedoch unterhalb des Abschnür-Punktes (Pinch-Off), kann der Drainstrom durch

$$I_D = \underbrace{\left(\frac{W}{L} \mu_p c_{ox}\right)}_{=\beta} \left[V_{DS}(V_{ES} - V_T) - V_{DS}^2/2 \right] \quad (4.1)$$

beschrieben werden, wobei die Geometrie des Kanals (Breite W und Länge L) und die Beweglichkeit μ_p der darin diffundierenden Löcher, sowie die Kapazität des Gateoxids c_{ox} die Proportionalitätskonstante β festlegen⁴.

⁴Ab dem Pinch-Off wird V_{SD} so groß, dass das erzeugte Feld der Drain-Diode den Kanal abschnürt. Es fließen noch Majoritätsträger, jedoch stehen nicht genug zur Verfügung, um Strom wachsen zu lassen. Es kommt zur Sättigung, unabhängig von V_{DS} und konstant für festes V_{SG} , mit $I_D = (\beta/2)(V_{ES} - V_T)^2$.

Moduliert nun über der Gatefläche ein wie auch immer geartetes neuronal aktives Element mit ΔV_{ext} die gate-Spannung V_{ES} und damit den resultierenden source-drain Strom I_D , so gilt:

$$\Delta I_D = \underbrace{\left[\frac{\partial I_D}{\partial V_{ES}} \right]_{V_{SD}=\text{konst}}}_{=g_m} \Delta V_{ext} \quad (4.2)$$

Bei einer Messung von Feldpotentialen im Hirnschnitt mit FETs sind nun 2 Schritte voneinander abzugrenzen:

- (i) Die Steilheit g_m in 4.2 muss vor der eigentlichen Messung ermittelt werden, z.B. durch Modulation der Gatefläche über das Badpotential. In dieser Arbeit geschah das bei allen Chiptypen mittels einer kleinen, sinusförmigen Spannungsänderung V_{FET} zwischen Badpotential (der Ag/AgCl-Elektrode) und Masse, was zu einer Spannungsänderung $\Delta\varphi = \Delta V_{FET}$ im Elektrolyt, und damit über der Gatefläche führt und den source-drain Strom moduliert:

$$\Delta I_D = g_m \Delta V_{FET}. \quad (4.3)$$

Der Transistor wird damit kalibrierbar, wobei ein kleiner Spannungsabfall im Elektrolyt vernachlässigt wird ([Fro 93], [Sta 08]).

- (ii) Im Falle des recordings liegt der Hirnschnitt direkt über der Gatefläche mit vernachlässigbarem Abstand im Elektrolytbad, die darin befindliche Ag/AgCl-Elektrode ist auf Masse geklemmt. Neuronale Aktivität im Schnitt verursacht im Extrazellulärraum Ionenströme, welche das elektrische Potential im Gewebe relativ zum Bad ändern. Dies führt auch zu einer mittleren Spannungsänderung $\langle \Delta\varphi \rangle$ über der gesamten benachbarten Gatefläche, was wiederum den source-drain Strom ändert, äquivalent zur obigen Potentialänderung mit

$$\Delta V_{FET} = \frac{1}{g_m} \Delta I_D. \quad (4.4)$$

Da das Badpotential als nahezu Massepotential angenommen werden kann, wird damit das mittlere neuronale Feldpotential $\langle \varphi \rangle$ durch

$$\langle \varphi \rangle = \Delta V_{FET} \quad (4.5)$$

messbar. Die Lokalisierbarkeit der Feldpotentiale ist dabei auf die Fläche des Gates limitiert, da der FET über diese mittelt. Die Gateflächen der in dieser Arbeit verwendeten Chips waren $22 \times 24 \mu\text{m}^2$ groß (Kap. 4.3 / [Sta 08]), bzw. besaßen einen Durchmesser von $6.5 \mu\text{m}$ (Kap. 6 – 8).

Dieser zweistufige Ansatz gilt für alle Chiptypen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. In 5.1 wird gezeigt, dass die mit dieser Methode gewonnenen Signale gut mit

Signalen herkömmlicher Messtechnik übereinstimmen.

4.3. Verwendete Chips

In dieser Arbeit wurden verschiedene Chips unterschiedlicher Bauart verwendet. Zur Charakterisierung des Recording- bzw. des Stimulationsprinzips kamen Siliziumchips zum Einsatz, die im abteilungseigenen Reinraum prozessiert wurden (z.T. selbst, zum Teil aus [Voe 06]). In anschließenden Experimenten für hochaufgelöstes Mapping neuronaler Feldpotentiale (Kapiteln 6 – 8) wurden Multi-Transistor Arrays auf CMOS-Basis verwendet, die von der Abteilung Membran- und Neurophysik zusammen mit Infineon Technologies entwickelt wurden.

4.3.1. Chips mit hochauflösenden linearen Arrays

Für die Charakterisierung der Chip-Hirnschnitt Kopplung wurden Chips verwendet, welche in einer früheren Arbeit im abteilungseigenen Reinraum hergestellt und selbst gebondet wurden [Voe 05], [Voe 06]. Sie beherbergen 2 lineare Arrays extrem rauscharmer FETs mit hoher räumlicher Auflösung. Ihr Layout zeigt Abb. 4.2. Der Abstand der 2 Arrays beträgt $500\ \mu\text{m}$, die Transistor-Transistor Periodenweite $30\ \mu\text{m}$ bei einer Gategröße von $22 \times 24\ \mu\text{m}^2$. Die Dicke des Gateoxids (SiO_2) betrug $6\ \text{nm}$.

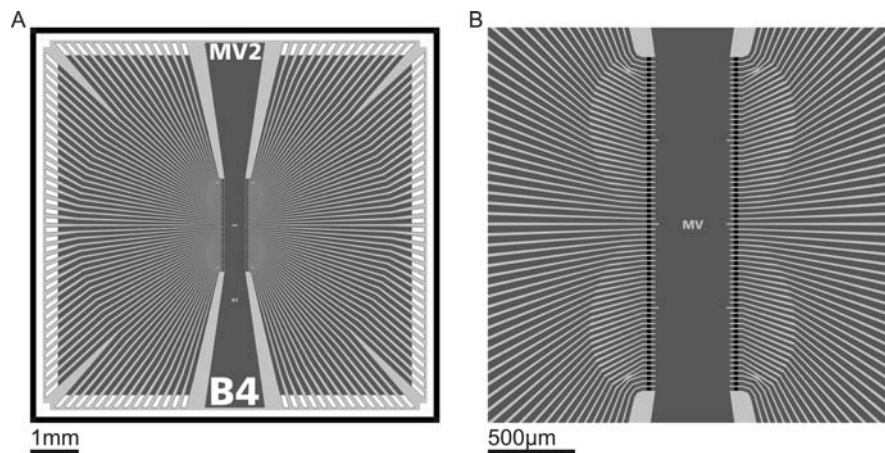


Abbildung 4.2. Schema des 128-FET Chips. **(A)** Gesamtansicht des Chips. Über die metallisierten Bondpads (weiß) werden die Source- und Drainzuleitungen (dunkelgrau), sowie das Bulk (weißer äußerer Rahmen) kontaktiert. **(B)** Schematische Detailansicht der beiden Arrays. Die Sourcezuleitung verläuft mittig, die Drainzuleitungen seitlich (dunkelgrau). Der Abstand zwischen den Arrays beträgt $500\ \mu\text{m}$, der zwischen den einzelnen Transistor $30\ \mu\text{m}$. Die Fläche der Gates (schwarz) beträgt $22 \times 24\ \mu\text{m}^2$.

Die Bauform dieser Chips folgt der buried-channel Konfiguration [Voe 05],

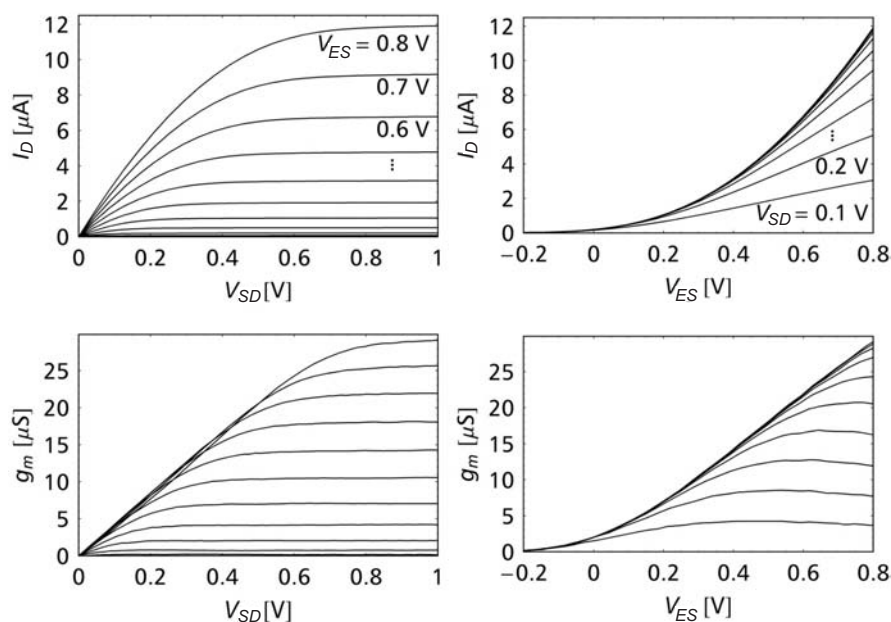


Abbildung 4.3. Kennlinien eines p-Kanal Transistors der buried-channel Konfiguration mit einer Gategröße von $6 \times 7 \mu\text{m}^2$ und einer Oxiddicke von $10 \mu\text{m}$. Aus [Voe 06].

[Voe 06]. Die maximale Ladungsträgerdichte, die den Kanal bildet, befindet sich dabei nicht direkt unter dem Gateoxid, sondern liegt etwas tiefer im Substrat. Dadurch verringert sich der Einfluss des oftmals mit Defekten und Einfangzentren behafteten Oxids auf die Majoritätsladungsträger, was in einem geringeren Rauschen resultiert. In Abb. 4.3 sind beispielhaft die Kennlinien eines buried-channel Transistors dargestellt, die charakteristisch für Feldeffekttransistoren aussehen.

Die einzelnen Chips wurden nach Sägen des Wafers mit Aceton / Isopropanol / Wasser von Photolack befreit, mit Bondwachs (Aquabond S-55) auf ein Keramikpackage (Kyocera KD-P88639) geklebt und anschließend gebondet. Danach wurden die Bonddrähte sowie große Teile des Packages mit einem Silikonkleber (Elastosil E 41) zur Isolierung abgedeckt, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst wenig Fläche an den Chiprändern zugeklebt wurden. Dies erzielte möglichst große nutzbare Chipflächen, was im Experiment für die Positionierung der Hirnschnitte unabdingbar ist. Zuletzt wurde das Package um dem Chip mit einem PMMA-Stützring versehen, der als Kammer für den Elektrolyt dient. Auf ein spezielles PMMA-Insert, wie es üblicherweise innerhalb der Kammer verwendet wird, um die Bonddrähte zu schützen, konnte demnach verzichtet. Abb. 4.4 zeigt einen ungeklebten, sowie einen fertig geklebten Chip mit zusätzlicher Messkammer.

Die geklebten Chips wurden direkt nach ihrer Fertigstellung mit Caro'scher Säure ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$) gereinigt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Stellen mit Silikonkleber nicht benetzt wurden. Später, nach einem Experiment, wurden die Chips

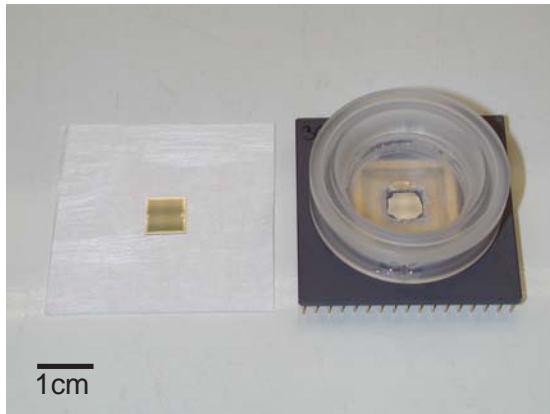


Abbildung 4.4 Ungeklebter bzw. fertig geklebter Chip mit Kammer: links einzelner Chip, rechts fertig auf Keramiksockel geklebt mit zusätzlicher PMMA-Messkammer. Die Bonddrähte wurden mit sehr wenig Silikonkleber abgeklebt, um möglichst große Chipflächen zu erzielen.

immer mit etwas Spülmittel gereinigt (FOR, Schnell-Chemie, München), nach mehrmaliger Nutzung erneut mit Caro'scher Säure. Nach den Reinigungsvorgängen wurden die Chips intensiv mit Reinstwasser gespült und trockengeblasen.

4.3.2. Loop-Chips mit Transistor- und Stimulationsarray

Die Chips dieser Bauart wurden für erste Recording- sowie Stimulationsexperimente verwendet. Sie wurden selbst im abteilungseigenen Reinraum prozessiert, nach dem selben Prinzip, wie in [Hut 04] vorgestellt. Abb. 4.5 A, B zeigen das Layout der Chips, Abb. 4.5 C zeigt den schematischen Aufbau im Querschnitt.

Die Chips beherbergen jeweils zwei 3×4 Arrays aus Transistoren und Kondensatoren für Recording und Stimulation. Die Gateflächen betragen $78 \times 10 \mu\text{m}^2$, mit einem Mitte-Mitte-Abstand von $220 \mu\text{m}$ horizontal und $130 \mu\text{m}$ vertikal. Der Durchmesser der Kondensatoren betrug $100 \mu\text{m}$ mit einem Mitte-Mitte-Abstand von $200 \mu\text{m}$ horizontal und $140 \mu\text{m}$ vertikal. Mit diesen Chips wurde versucht, den Hirnschnitt zu stimulieren und gleichzeitig evozierte, neuronale Signale im Sinne einer Schleife wieder abzuleiten (siehe Abschnitte 3.3.3 bzw. 5.4). Um dafür notwendige, hohe Kapazitäten bei niedrigen elektrochemischen Leitfähigkeiten zu erhalten, wurden die p-dotierten Kontaktflächen im ALD-Prozess mit ca. 10 nm TiO_2 beschichtet (analog zu [Wal 06]).

Anfangs wurden diese Chips auch für die Charakterisierung der Hirnschnitt-Chip Kopplung verwendet (siehe Kapitel 5). In einem Experiment galt es u.a., Messungen einer Mikropipettenelektrode, die sich direkt über der Gatefläche eines Transistors befand, mit dessen simultan gemessenen Signalen zu vergleichen. Hierfür erwiesen sich diese Chips jedoch als eher ungeeignet: bereits bei geringen räumlichen Variationen der Messposition zeigten die Signale der Mikropipette große Diskrepanzen zu den Transistorsignalen, bei denen über die relativ große Gatefläche integriert gemessen wird ($78 \times 10 \mu\text{m}^2$). Eine Übereinstimmung beider Messvarianten konnte demnach nur ungenügend nachgewiesen werden. Erst später zeigte sich, dass bei akuten Hirnschnitten die räumlichen Gradienten neuronaler Feldpotentiale deutlich geringer sind als Gateflächen

und Transistor-Schrittweiten dieser Chips. Aus diesem Grund wurde der Messaufbau umgerüstet, um die bereits oben eingeführten, hochauflösenden Chips mit 2 linearen Arrays betreiben zu können.

4.3.3. CMOS-Chip mit Multi-Transistor-Array

Im Anschluss an die Charakterisierung der Hirnschnitt-Chip Kopplung wurden Chips mit einem $1 \times 1 \text{ mm}^2$ großen, hochauflösenden Multi-Transistor Array (MTA) verwendet, das aus 128×128 Sensorelektroden besteht. Abb. 4.6 A zeigt ein Foto der Chipoberfläche, Teilabb. B den fertig gebondeten und geklebten Chip auf dem Keramikpackage mit der PMMA-Messkammer. Mit diesen MTAs wurden Kartierungen verschiedener neuronaler Netzwerkaktivitäten in Hippocampuslices durch Messungen von Feldpotentialen durchgeführt (s. Kap. 6, 7 und 8). Dieser Chiptyp ist im Rahmen eines früheren Projekts mit Infineon Technologies AG entwickelt, (Typenbezeichnung Typ G1183) und dort in CMOS (complementary metal oxide semiconductor) Technologie prozessiert worden [Eve 05]. Er ist direkter Nachfolger des Chips mit Typenbezeichnung G1182, welcher in [Eve 03] und [Lam 04] vorgestellt, und in [Hut 06a] auch bereits für Messungen mit Hirnschnittkulturen eingesetzt wurde.

Der Unterschied zum Design der neueren Version besteht neben einigen Verbesserungen hauptsächlich in einem zusätzlichen Stimulationsarray (20×20 Kondensatoren), welches aber in dieser Arbeit nicht verwendet wurde. Entscheidend war jedoch die Mög-

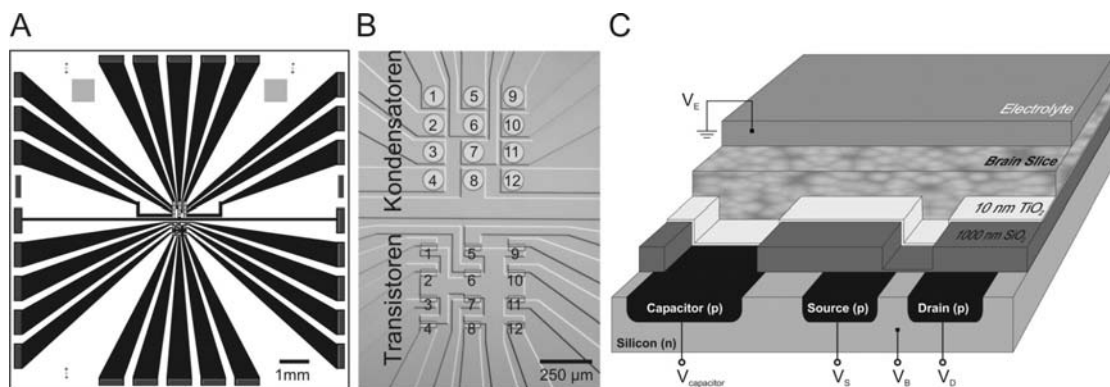


Abbildung 4.5. Layout und Aufbau des Loopchips. **(A)** Überlappende 4 Maskenlayouts des Chips (Chipfläche: $12 \times 12 \text{ mm}^2$). **(B)** Ausschnitt des Zentrums mit je 12 Kondensatoren und Transistoren für Stimulation und Recording. Der Durchmesser der Kondensatoren beträgt 100 µm mit einem Mitte-Mitte-Abstand von 200 µm horizontal und 140 µm vertikal. Die Gateflächen betragen $78 \times 10 \text{ µm}^2$ mit einem Mitte-Mitte-Abstand von 220 µm horizontal und 130 µm vertikal. **(C)** Schematischer Aufbau: auf dem n-dotierten Substrat befinden sich Kondensatoren zur Stimulation sowie p-Kanal Feldeffekttransistoren für das Recording. Die Oberfläche ist mit ca. 10 nm TiO_2 beschichtet und dient als einziges Dielektrikum der Kondensatoren; weiterhin: SiO_2 als Gateoxid (10 nm) bzw. Feldoxid (1000 nm). Nach [Hut 06b].

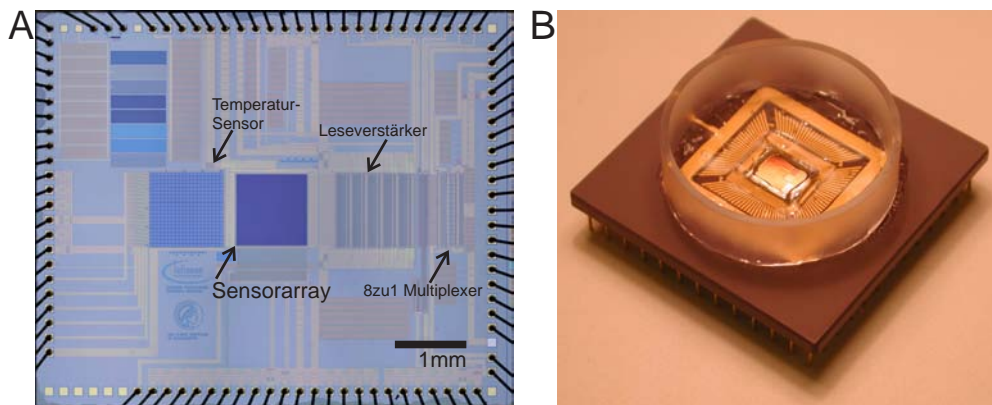


Abbildung 4.6. Layout des MTA Chips. **(A)** Foto der Chipoberfläche mit Bondkontakten. Hervorzuheben sind das Sensorarray, sowie Temperatursensor, die Leseverstärker- und Multiplexer-Einheit. Links neben dem Sensorarray befindet sich das Stimulationsarray, welches in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet wurde. **(B)** Chip, gebondet auf Keramikpackage mit PMMA-Messkammer. Die Bonddrähte sowie alle metallischen Flächen des Packages innerhalb der Kammer wurden mit möglichst wenig Silikonkleber abgeklebt, um die nutzbare Chipoberfläche so groß wie möglich zu halten. Es wurden daher keine Inserts verwendet.

lichkeit, mittels Hochtakten der Chipansteuerung höhere Samplingraten zu erzielen (in dieser Arbeit: bis ca. 5744 Hz), was bei gleicher Tiefpassfilterung ein besseres Anti-Aliasing ermöglicht. Zugleich ist die Wahl des Arbeitspunkts für den Chip und die Elektronik für die Chipansteuerung verbessert worden, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis insgesamt günstiger ausfällt als bei der in [Hut 06a] verwendeten Vorgängerversion. Neben dem verwendeten Chip G1183 wurde auch eine dazu gespiegelte Version verwendet, die sich nur im Aufbau, nicht in der Funktion unterscheidet.

Aufbau des Chips Die 16384 Sensorelektroden des verwendeten Chiptyps G1183 besitzen jeweils einen Durchmesser von $6.5 \mu\text{m}$ und eine Schrittweite von $7.8 \mu\text{m}$. Die Verschaltung des großen Arrays ist durch CMOS-Prozessierung realisiert. Die Oberflächenstruktur ist im Foto in Fig. 4.6 (A) zu sehen: in der Mitte befindet sich das $1 \times 1 \text{ mm}^2$ große Array mit den 16384 Sensoren, links daneben das Stimulationsarray (20×20 Kondensatoren). Oberhalb dessen befindet sich ein Polysiliziumwiderstand als Temperatursensor (s.u.) Der Chip beherbergt im Gegensatz zu oben genannten Eigenbauchips bereits zusätzliche Komponenten für Signalkonditionierung und -Auslese.

Abb. 4.7 zeigt schematisch als wesentliches Element einen Sensorpixel im MTA. Der eingezeichnete Hirnschnitt koppelt wieder kapazitiv an ein Oxid, das die Halbleiterstrukturen vom Elektrolyt trennt. Darunter befindet sich eine Elektrode aus Platin, die über eine Verbindung aus Metall direkt mit dem Gate eines Feldeffekt-Transistors verbunden ist. Im Gegensatz zu oben erwähnten EOSFETs handelt es sich hier um Transistoren der Elektrolyt-Oxid-Metall-Oxid-Silizium-Konfiguration (EOMOS). Zu erwähnen

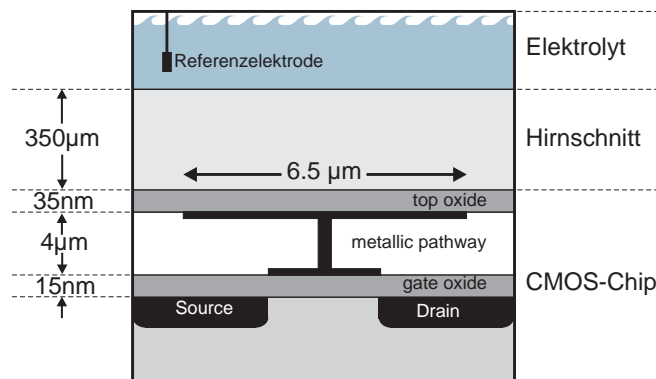


Abbildung 4.7 Schematische Zeichnung eines CMOS Pixels mit Hirngewebe, Elektrolyt und Ag/AgCl-Referenzelektrode (nach [Hut 06a], nicht maßstabsgetreu).

sind noch zusätzliche Schalttransistoren (nicht eingezeichnet), mit denen spaltenweise in einen Mess- oder Autokalibriermodus geschaltet werden kann. In letzterem wird dafür gesorgt, dass alle Messtransistoren bzgl. ihrer Ausgangsspannungen ohne großer Drift innerhalb des Messfensters gehalten werden.

Messmethodik Für eine detaillierte Beschreibung sei auf [Eve 05] verwiesen. Im wesentlichen sei dennoch zunächst das Multiplexing hervorzuheben, das die 128×128 Transistoren auf 16 Messkanäle verteilt: jede der aus 128 Sensoren bestehenden Zeilen besitzt je einen Leseverstärker, die gemeinsam über den Weg von 8:1-Multiplexern in 16-fachen Zeilenblöcken über chipseitige Ausgangstreiber ausgelesen werden. Die Adressierung des gesamten MTAs erfolgt somit spaltenweise und sequentiell (Spaltenadressierung fullframe mittels 128:1-Multiplexing). Nach Aufschaltung einer Spalte benötigen die Zeilenverstärker eine gewisse Einschwingzeit, bevor mit dem zeilenweisen 8:1-Multiplexing begonnen werden kann. In [Eve 03] wurden $1.92 \mu\text{s}$ sowohl für Einschwing- als auch den Messvorgang veranschlagt, so dass für alle 128 Spalten, und damit für die Auslese des gesamten Arrays, $492 \mu\text{s}$ benötigt wurden. Diese Limitierung der Samplingraten auf 2 kHz (fullframe) konnte jedoch aufgebrochen werden [Zei 09], indem die Taktrate für die Chipansteuerung hochgesetzt wurde und man geringere Einschwingzeiten für die Zeilenverstärker in Kauf nahm (640 ns , bei den in dieser Arbeit üblich verwendeten 6 kSamples).

Abbildung 4.6 (B) zeigt einen fertig gebondeten und geklebten Chip; wie bereits bei oben beschriebenen Chips wurde lediglich ein Stützring (ohne Insert) als Messkammer aufgeklebt, innerhalb derer die Bonddrähte und alle Teile des Packages mit Silikonkleber abgeklebt wurden. Dadurch konnte die sehr kleine Chipfläche wesentlich besser ausgenutzt werden. Im Experiment konnte ein Chip für mehrere Hirnschnittmessungen verwendet werden, da die Schnitte wieder nicht festgeklebt, sondern lediglich in die Kammer pipettiert wurden. Nach jedem Experiment wurden die Chips intensiv mit Reinstwasser gespült und trockengeblasen. Nach einigen Anwendungen wurden sie zusätzlich mit herkömmlichen Spülmittel geputzt. Obwohl die Chips sehr berührungsempfindlich sind, wurde die Lebensdauer wesentlich von der Qualität der Abdichtung

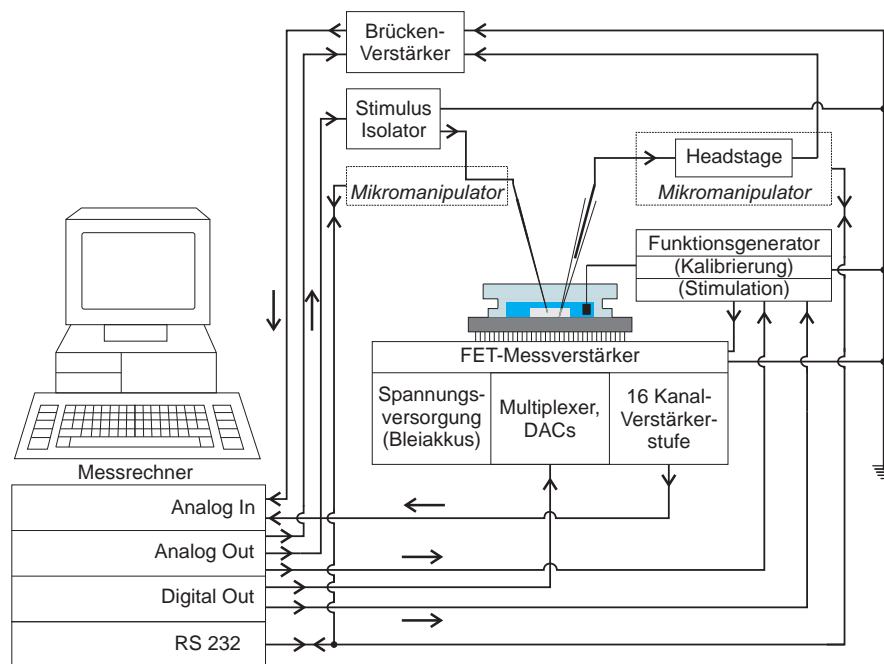


Abbildung 4.8. Vereinfachter schematischer Aufbau der Messapparatur für die in der Abteilung gefertigten Chips. Stimulations- und Glaselektrode wurden mit Manipulatoren bewegt, die mit dem Messcomputer angesteuert werden konnten. Der Funktionsgenerator wurde nur für die Kalibrierung der Transistoren zugeschaltet.

der Bonddrähte bestimmt.

4.4. Aufbau der Messapparaturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chips wurden an verschiedenen Messapparaturen betrieben, deren prinzipielle Aufbauten nun beschrieben werden.

4.4.1. Setup für einfache FET-Chips

Die Messapparatur für die Charakterisierung der Hirnschnitt-Chip Kopplung kombiniert die elektrophysiologischen Methoden zur Ableitung extrazellulärer Feldpotentiale mit Mikropipetten mit der Ansteuerung und Auslese der Siliziumchips für das Transistorrecording. Die folgende Beschreibung beschränkt sich hauptsächlich auf den Aufbau für die Betreibung der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Chips. Die Betreibung der Loop-chips (Abschnitt 4.3.2) ist in [Hut 06b] ausführlich beschrieben, relevante Informationen werden in dieser Arbeit an entsprechenden Stellen ausgeführt.

In Abb. 4.8 ist der Messaufbau skizziert. Der Chip mit der Messkammer wurde mit einem selbstgebauten Verstärker betrieben. Für dessen Spannungsversorgung kamen

Bleiakkus zum Einsatz, um eine bessere galvanische Trennung zu erzielen. Die Ansteuerung (FET-Betriebsspannungen im Arbeitspunkt, Multiplexer, Triggerung für Messung) und Datenerfassung erfolgte vom Messrechner aus. Um einen möglichst großen Arbeitsabstand zwischen Messkammer und Objektiv zu erzielen wurde ein Stereomikroskop (Leica MS5, Wetzlar) verwendet, welches zur besseren Optik schräg an einem Schwenkarm montiert war.

Es waren zusätzlich 2 motorbetriebene, mit dem Computer ansteuerbare Mikromanipulatoren (Eppendorf Micromanipulator 5171, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) montiert, mit welchen die Mikroelektroden für Stimulation und Mikropipettenrecording bewegt wurden. Über ein Computerprogramm konnten stets relative Positionen sowohl ausgelesen, als auch angesteuert werden; nach einer räumlichen Kalibrierung war so ein automatischer Messbetrieb möglich. Der Manipulator konnte somit jeden Transistor auf dem Chip beliebig oft gezielt anfahren. Um etwaige Drift auszuschließen, wurden diese Koordinaten jeweils vor und nach einem Experiment zusätzlich fotografisch kontrolliert.

An der Kammer wurden zusätzliche Halterungen für Lampen, Thermofühler, Badelektrode sowie Zu- und Abfluss eines Perfusionssystems angebracht. Für dieses wurden Silikonschläuche mit möglichst geringem Innendurchmesser verwendet um zusammen mit einer peristaltische Pumpe (Gilson Minipuls 3) einen möglichst schnellen Wechsel des zu begasenden Messmediums (ACSF) vom Reservoir zur Messkammer zu garantieren. Mit einem PID-gesteuerten Heizelement (Eigenbau) konnte Medium angeheizt werden, so dass in Verbindung mit dem Thermoelement (PT100) in der Messkammer eine physiologisch sinnvolle Badtemperatur von ca. 32°C erreicht werden konnte.

Micropipettenrecording

Um Feldpotentiale auszulösen, wurden zur Stimulation monopolare Wolframelektroden (AMS 5753; Science Products, Hofheim) sowie bipolare Stahlelektroden (Matrix Electrode MX21ABS(RM1), FHC, USA) verwendet und negative (kathodische) Strompulse ($I_s = 25$ bis $100 \mu\text{A}$ für $200 \mu\text{A}$) mit einem Stimulus Isolator (A360D; WPI, Berlin) appliziert. Für das recording mit Mikropipetten wurden Glaselektroden aus Borosilikatglassrohlingen (1403547; Hilgenberg, Malsfeld) mit einem Puller gezogen, mit NaCl-Lösung gefüllt (3 mol, Widerstand $15 \text{ M}\Omega$) und über einen chlorierten Silberdraht kontaktiert. Die Mikropipette wurde an einem Vorverstärker montiert, die Signale anschließend mit einem Verstärker (Axoclamp 2B; Axon Instruments, Foster City, USA, am CMOS-Setup BA-1S, NPI electronic, Tamm) 10-fach verstärkt, tiefpassgefiltert (3 kHz) und mit einer Messkarte am Computer digitalisiert (40000 samples/sec). Damit beim Einstechen der Elektroden in den Schnitt keine vertikale Verschiebung des Schnittes kommt, wurden die Elektroden geknickt bzw. über dem Bunsenbrenner gebogen, um ihre Spitzen senkrecht zur Schnittoberfläche zu orientieren. Die schräge Aufhängung des Mikroskops garantierte eine bessere Abschätzung der Entfernung von den Elektroden-

spitzen zum Substrat.

Transistorrecording

Der Arbeitspunkt der Transistoren wurde für alle Chips gleich gewählt ($V_{Bulk} = 0.2$ V und $V_{Source} = 0.2$ V relativ zum Metallischen Kontakt der Badelektrode (Masse) sowie $V_{SourceDrain} = 0.5$ V zwischen Source und Drain). Für jedes der 2 chipseitigen FET-Arrays wurden jeweils 8 benachbarte Transistoren über Multiplexer angesteuert, simultan ausgelesen, wahlweise verstärkt ($1\times$, $100\times$, oder $1000\times$) und optional gefiltert (10 kHz Tiefpass, Butterworth Charakteristik). Die Digitalisierung erfolgte mit 40 ksamples/sec. Die Kalibrierung der Transistoren erfolgte durch Anlegen einer Spannung ΔV_{FET} an die Badelektrode mittels Funktionsgenerators (meist eine Stufe von 2 mV) und gleichzeitigem Recording der Änderung ΔI_D des Source-Drain Stromes. Die dadurch ermittelte Steilheit betrug meist $g_m = 12.5 \mu\text{A/V}$ bei einem Source-Drain Strom von etwa $3.3 \mu\text{A}$. Bei Messungen neuronaler Aktivität wurde folglich über die Gatefläche gemittelt eine hierzu äquivalente Änderung von $\langle \Delta \phi \rangle = \delta V_{FET}$ gemessen mit $\Delta V_{FET} = \Delta I_D / g_m$.

Das Gesamttrauschen des Transistorrecordings lag für die Chips mit den 2 hochauflösenden Arrays (Kap. 4.3.1, [Voe 05]) bei ca. 20 bis 50 μV RMS, für die selbst prozessierten Loopchips bei ca. 40 bis 100 μV RMS.

4.4.2. Setup für CMOS-Chips

Die wesentliche Elektronik zur Ansteuerung des Chips war auf einem Mainboard, durch ein Metallgehäuse geschirmt, untergebracht. Die Kontaktierung erfolgte über einen Sockel. Die Spannungsversorgungen für den Chip sowie die einzelnen Komponenten der Platinen erfolgte zur besseren galvanischen Trennung über Bleiakkus. Die oben erwähnten 16 Messkanäle wurden nach Ausgangstreibern im Mainboard Strom-Spannungsgewandelt und in den Messkarten (Max. 50 MSamples/sec; CS 1250, GaGe, Lockport IL, USA) eines Industrie-PCs digitalisiert. Ein digitales Pattern für Chipansteuerung und Setzen der Spannungen (DACs auf Mainboard) wurde ebenfalls über diesen PC generiert (50 MHz Digital Out; CG 3250, GaGe). Die Software für die Ansteuerung wurde in den Programmiersprachen C++ und LabView (National Instruments) geschrieben; sie stammt teilweise von [Lam 04] bzw. [Zei 09], teilweise wurde zusätzliche Ansteuer- und Auswertesoftware selbst, ebenfalls in LabView verfasst.

Durch eine Speichererweiterung der A/D-Wandlerkarten wurde eine wesentlich längere Messzeit als in früheren Experimenten mit organotypischen Hirnschnitten [Hut 06a] ermöglicht. Die Messzeiten betragen immer 300 ms (bei ca. 6 kHz, für evozierte Feldpotentiale) bis maximal mögliche 10 s (bei ca. 4 kHz, für Messungen von Oszillationen); bei letzteren waren die Speichergrenzen erreicht worden. Ein limitierender Faktor war die Zeitdauer, die der Messrechner benötigt, um die Daten auszulesen und abzuspei-

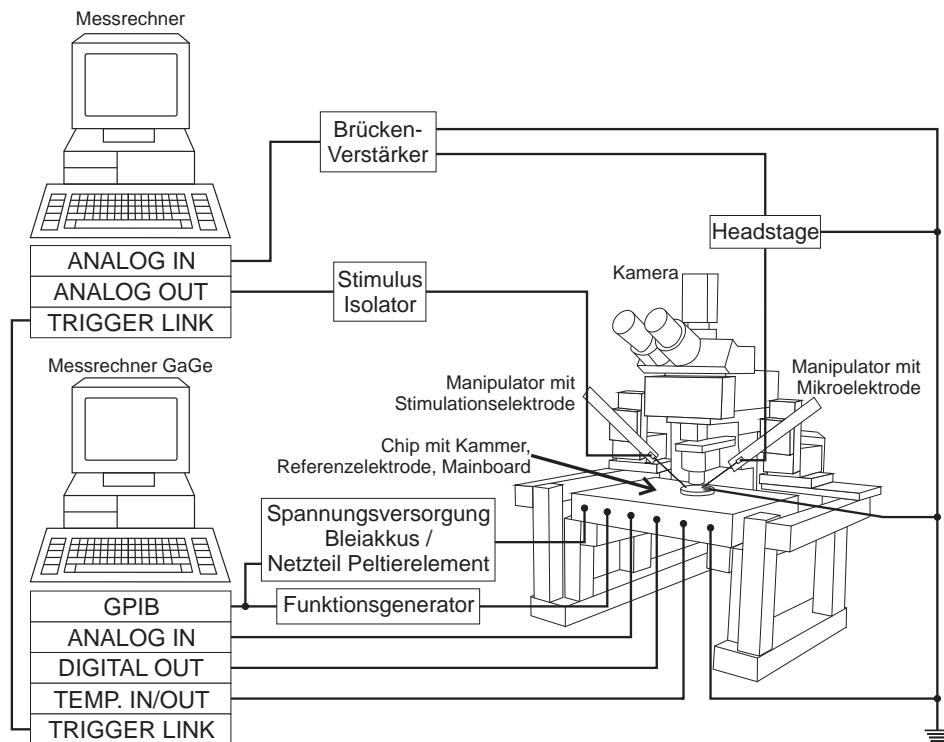


Abbildung 4.9. Vereinfachter schematischer Aufbau der Messapparatur für die CMOS-MTA Chips.

chern (für maximale Speicherauslastung ca. 2 min bei 1.3 GByte Speicherplatz auf der Festplatte). Eine kontinuierliche Messung war also nicht möglich.

Die Kalibrierung des Chips erfolgte, wie in Kap. 4.2 erläutert. An die Badelektrode wurde mittels Funktionsgenerator ein bekanntes Signal angelegt und so das Badpotential moduliert (Sinusfunktion mit 70 Hz bei 3 mV pp). Durch die kapazitive Kopplung des Bades an die Gateelektroden konnten aus den proportionalen Modulationen der Source-Drain-Ströme die Steilheiten g_m ermittelt werden. Mit diesen wurden bei Messungen neuronaler Feldpotentiale die gemessenen Daten entsprechend rückgerechnet.

Das intrinsische Gesamttrauschen lag bei ca. 100 bis 150 μV RMS. Die Signale wurden je nach Experiment bei der Datenauswertung tiefpassgefiltert (300 bis 1000 Hz); falls notwendig, erfolgte zusätzlich eine räumliche Gauß-Filterung. Durch oben genannte Autokalibrierung bedingte Offsets in den Signalen, sowie evtl. Drift wurden softwaretechnisch korrigiert; dazu wurde an die Signalanteile, die kein neuronales Feldpotential zeigten, ein Polynom dritter Ordnung gefittet und als Baselinereferenz subtrahiert. Für evozierte Signale (Kap. 6 und 7) stellte diese Methode kein Problem dar, da die Feldpotentiale durch den Stimulus getriggert wurden. Bei der Messung persistenter Oszillationen (Kap. 8) wurde dagegen ein floating Average Fit mit ausreichend großem Messfenster als Referenz subtrahiert (Subtraktion des Mittelwerts um Messpunkt mit

Fensterbreite von 150 ms, entsprechend Hochpassfilterung bei 6.7 Hz).

Die Triggerung der Messungen wurde über einen zusätzlichen Messrechner über das Netzwerk vorgenommen (Programmierung in Labview). Von dort aus erfolgte auch die die Ansteuerung der Stimulation sowie zusätzliche Messungen mit Mikropipetten-Elektroden (Geräte im Detail siehe Anhang). Sowohl Reiz- als auch Recordingelektroden wurden mit Manipulatoren betrieben, die am Setup fest montiert waren (MPC-200, Sutter Instrument Company).

Da der Chip eine starke Abwärme produzierte, war eine Kühlung durch ein Peltierelement erforderlich. Über den im Chip integrierten polykristallinen Siliziumwiderstand⁵ konnte über einen linearen Zusammenhang die Temperaturänderung ermittelt werden und so die Stromzufuhr an das Peltier PID-geregelt erfolgen. Jeder Chip wurde kalibriert, indem die temperaturabhängige Kennlinie durch sukzessives Heizen in definierter Umgebung (Brutschrank) ermittelt wurde. Damit konnte gewährleistet werden, dass der Chip, also das gesamte Substrat, auf der physiologisch sinnvollen Temperatur von 32 °C gehalten wurde. Die Temperatur des Bades wurde über ein Heizelement auf dieselbe Temperatur geregelt. Die Messmedien wurden zusätzlich im Wasserbad angewärmt, so dass sich im Bad feste 32 ± 1 °C eingestellt werden konnten (Temperaturmessung durch Thermofühler im Bad). Die Perfusion erfolgte durch eine peristaltische Pumpe über Schläuche aus Silikon. Diese wurden im Durchmesser sehr klein gewählt, damit das zu begasende Medium möglichst schnell in die Messkammer des Chips transferiert wurde. Abb. 4.10 A zeigt die Messkammer des am Board montierten Chips mit Zu- und Abfluss des Perfusionssystems. Zum Schutz der darunter liegenden Elektronik vor dem Medium wurde die Chipkammer mit einer Latex-Matte abgedichtet.

Anmerkung zur Kopplung akuter Schnitte an die CMOS-gefertigten MTAs Ein grundsätzliches Problem war die relativ kleine Gesamtfläche des Chips, die für die Positionierung der Hirnschnitte zur Verfügung stand. Um diese zu maximieren, wurden, wie oben erwähnt, die Bonddrähte mit möglichst kleinen Klebefäden eines Silikonklebers abgedeckt. Zusätzlich wurden Hippocampuschnitte der Maus verwendet, bei denen der Entorhinale Cortex entfernt wurde. So blieb genug Platz für die Positionierung der Schnitte. Die Rattenhirnschnitte in Kap. 8 waren aufgrund des juvenilen Alters der Tiere vergleichbar groß. Für die Etablierung stabiler, intrinsischer Netzwerkaktivität wäre es freilich günstiger, die Hirnschnitte weniger knapp zu beschneiden.

Bei der Verwendung der CMOS-basierten MTAs wurde im Vergleich zu selbst gefertigten Chips (Abschnitt 5) eine enorme Verschlechterung der kapazitiven Kopplung zum Slice festgestellt. Dies liegt an der Strukturierung des CMOS-Chips sowie an den notwendigen kleinen Ausmaßen der Hirnschnitte. Zu diesem Zweck wurden die Chips zusätzlich mindestens 2 h lang mit PLL beschichtet (Poly-L-lysin P1399, Sigma-Aldrich, nicht eintrocknend), was zum guten Kontakt verhalf. Zu einer weiteren, wesentlichen Verbesse-

⁵In den verwendeten Temperaturbereichen (20 bis 50 °C) herrschte lineare Abhängigkeit mit einer Steigung von 29.7 Ω/K [Eve 05].

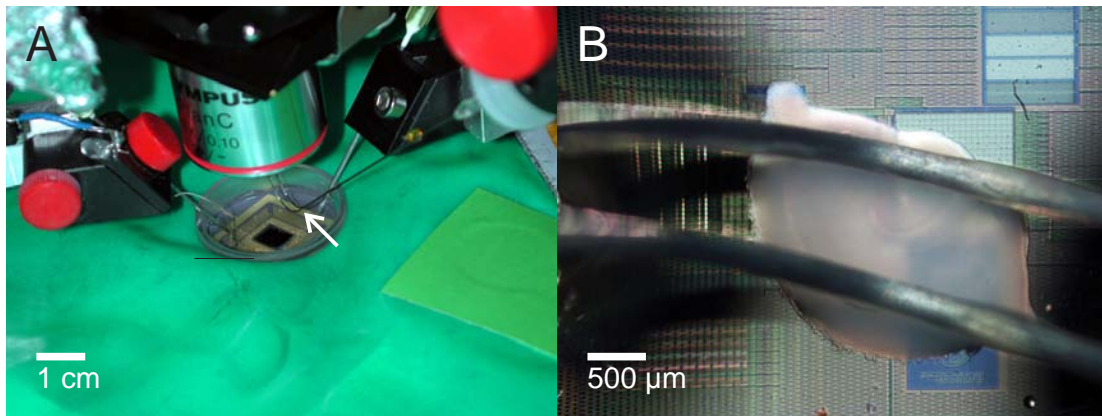


Abbildung 4.10. Chip im Messverstärker mit Perfusionssystem und Klammer **(A)** Chip mit Recordingkammer am Setup mit Zu- und Abfluss des Perfusionssystems. Mittels Manipulator wird eine Klammer (siehe Pfeil) an das Substrat gefahren, um den Chip zu fixieren. Zum Schutz der Elektronik dient als Abdeckung ein Silikontuch. **(B)** Die Aufnahme der Chipoberfläche zeigt, wie die untere Rundung dieser Klammer den Hirnschnitt fixiert.

zung trug ein neueres Vibratom bei (VT 1200S, Leica Mikrosysteme), mit dem glattere Schnittflächen bei geringerer Verletzung der Zellschichten möglich waren [Gei 02]. Insgesamt wurden somit genauso gute bis z.T. bessere Kopplungsbedingungen geschaffen, im Vergleich zu den voruntersuchenden Experimenten in Kap. 5⁶.

Die Hirnschnitte wurden nicht fixiert im Sinne eines Festklebens. Bei Experimenten mit zusätzlichen Elektroden erwiesen sich andrückende Halterungen für die Hirnschnitte als hinderlich. Bei niedrigen Perfuionsraten⁷ zeigte sich eine ausreichend gute Kopplung zum Chip, wenn der Schnitt ohne zusätzlichem Andrücken auf dem vorbehandelten Substrat auflag.

Die Schnitte konnten dadurch während des Experiments verschoben werden, z.B. mit der bipolaren Stahl-Reizelektrode über einen Manipulator oder mit einem selbst gefertigten Teflonstift. Auf diese Weise konnten sequentiell verschiedene Bereiche des Hirnschnitts über die Fläche des Sensor Arrays ($1 \times 1 \text{ mm}^2$) hinaus abgerastert werden.

Für die Etablierung persistenter Netzwerkoszillationen erwies sich die Sauerstoffversorgung als unzureichend (siehe Ausführungen in Kap. 8.1). Abhilfe schufen hohe Perfuionsraten für die Proliferation Sauerstoff-begaster ACSF. Damit die Hirnschnitte nicht weggeschwemmt wurden, mussten bei diesen Experimenten die Schnitte zusätzlich mit einer Klammer aus 2 Wolframdrähten fixiert werden, die am unteren Ende gebogen waren und zueinander einen Abstand von ca. 1.25 cm hatten. Um Einstreuungen elektrischer Felder zu vermeiden, wurden sie mit Epoxy-Harz isoliert, wobei eine leichte Einstreuung bei 50 Hz nicht vollständig vermieden werden konnte. Zur besseren Posi-

⁶Daten nicht explizit aufgeführt.

⁷Geringe Strömung in der Kammer bei ca. 2 mL/min, bei einem Kammervolumen von ca. 3 mL.

tionierung wurde die Haltevorrichtung mit einem Mikromanipulator bewegt. Abb. 4.10 A zeigt zur Illustration ein Foto mit der Klammer über dem Chip; zusätzlich zu sehen sind die 2 Kanülen für Zu- und Ablauf des Perfusionssystems. Gut erkennbar ist die untere Krümmung der 2 Wolframdrähte, deren Radius gering genug war, um genügend breite Auflagefläche zu bieten. Teilabb. B zeigt den Blick durch das Objektiv auf die Chipoberfläche mit einem Schnitt, der von den 2 Drähten festgehalten wird.

Die durch die Krümmung der Drähte gebildete Auflagefläche wird durch den Lichtreflex gut erkennbar. Berührte diese den Hirnschnitt, wurde die Vorrichtung zusätzliche 10 μm Richtung Chipoberfläche gefahren. Die Fixierung erwies sich als stabil genug; die Daten in Kap. 8 zeigten, dass die Klammer weder den Schnitt noch das Interfacing mit dem Chip beeinflusste. Auch mit der Klammer war ein Verschieben des Schnittes möglich. Um raschen Lösungsaustausch zu ermöglichen, wurde zusätzlich der Wasserspiegel in der Kammer während des Experiments erniedrigt und mit Carbogen (5% CO_2 , 95% O_2) begast. Zusätzlich wurden die Schläuche für Zu- und Ablauf auf ein Minimum gekürzt.

5. Kopplung akuter Hirnschnitte an Silizium-Chips

Die in Kapitel 3 theoretisch modellierte Verteilung neuronaler Feldpotentiale wird durch Kopplung an isolierendes Substrat und Bad bedingt. Senkrechte Profile ließen eine Abschätzung zu, wie stark die Feldpotentiale im akuten Hirnschnitt durch Schichten inaktiver Zellen abgeschwächt werden, welche von der Schneideprozedur herrühren. Die zentrale Frage dabei ist, ob die Feldpotentiale an der Substratoberfläche noch groß genug sind, um für planare Transistoren messbar zu sein.

Das Ergebnis – eine Abschwächung von ca. 50% – lässt Amplituden erwarten, die deutlich über Erfahrungen liegen, die in der Literatur mit planaren Metallelektroden Arrays (MEA) gemacht wurden, welche ebenfalls an der Unterseite des Hirnschnitts messen: in [Oka 99] oder auch [Gho 06] werden Signalamplituden von lediglich max. 0.25 mV gezeigt, während mittig im Schnitt 1 bis 3 mV typisch sind [Sta 04]. Mit dem Signal/Rausch-Verhältnis der in dieser Arbeit verwendeten Transistorchips muss also neuronale Aktivität in höheren Amplitudenbereichen detektierbar sein.

Im folgenden Kapitel wird (i) die Kopplung eines akuten Hippocampusschnittes an einfache Transistorchips in ihrer experimentellen Durchführung vorgestellt. Simultane Messungen von Transistoren und einer zusätzlichen Mikropipette verifizieren zudem (ii) anhand eines gemessenen Profils die passive Ausbreitung der Feldpotentiale im akuten Hirnschnitt. Es können (iii) beide Messmethoden anhand Signalformen und -Amplituden verglichen werden. Abschließend (iv) wird die Stimulierbarkeit akuter Schnitte mithilfe der theoretischen Ergebnisse aus Kap. 3.3.3 behandelt.

5.1. Profil von Feldpotentialen entlang eines Transistorarrays

Im folgenden wird das Transistorrecording am akuten Hippocampusschnitt vorgestellt. Es wurde ein „x-Profil“ entlang der Längsachse der Pyramidenzellen, senkrecht zum CA1, gemessen, um die passive Ausbreitung entlang dieser Richtung zu verifizieren. Dies soll auch zeigen, dass die in Kapitel 3.3 angenommene horizontale Verteilung der CSD j_{csd} im akuten Hirnschnitt gültig ist und dieselbe Form annimmt, wie sie in [Bes 02] sowie [Hut 06a] bereits an kultivierten Hirnschnitten gemessen wurde.

Messung mit Chip Für alle in Kapitel 5 vorgestellten Experimente wurden 350 μm dicke akute Hirnschnitte einer Maus (C57BL/6, postnatal 40 bis 60) präpariert, wie es

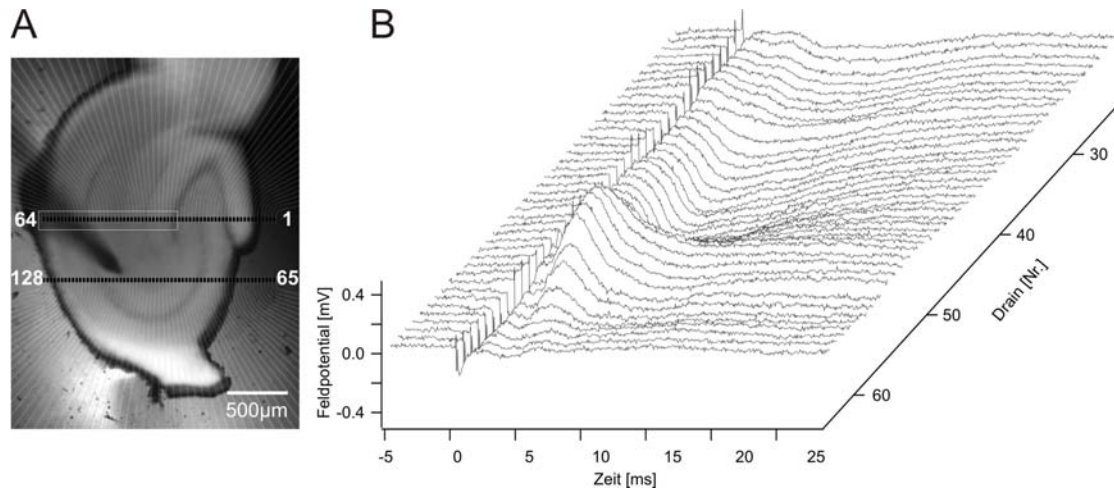


Abbildung 5.1. Messung neuronaler Antworten entlang der Längsachse von CA1 Neuronen mit Transistoren. **(A)** Foto des Hirnschnitts auf dem Chip. Die verwendeten Transistoren sind mit einem weißen Rechteck gekennzeichnet. **(B)** Von den gewählten Transistoren gemessene EPSP-Antwort nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen.

in Abschnitt 4.1 beschrieben wurde. Für Präparation sowie Messung wurde stets das selbe Medium (ACSF, siehe A.4) verwendet.

Ein Hirnschnitt wurde aus der Aufbewahrungskammer auf die unbeschichtete Oberfläche des 128-FET Chips (siehe 4.3.1) aufgebracht und so orientiert, dass die CA1-Region senkrecht zu beiden Arrays ausgerichtet war (siehe Abb. 5.1 A). Die Kammer des Chips wurde mit begaster ACSF gefüllt (ca. 2.5 mL) und perfundiert (2 mL/min bei 32°C). Innerhalb einer Regenerationsphase von 30min nach Transfer in die Messkammer adhärierte der Schnitt ausreichend am Substrat. Eine zusätzliche Fixierung des Hirnschnitts war nicht notwendig.

Nach der Regenerationsphase wurde eine Wolframelektrode im CA1 nahe der Schaffer-Kollateralen positioniert (siehe Abb. 5.1 A). Zur Stimulation wurden kathodische Rechteckpulse eingesetzt und gleichzeitig mit den Transistoren aufgezeichnet. Bei allen Experimenten wurde nach einem Stimulationsprotokoll mit steigenden Reizstromstärken jener Wert ermittelt, bei dem genügend große exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs), jedoch noch keine postsynaptische Aktivität in Form von Aktionspotentialen (APs) ausgelöst wurde ($I_s = -35 \mu\text{A}$, Stimulusdauer: 200 μs). Dies ist notwendig, um die Extrema der EPSPs ermitteln zu können, die einen Vergleich mit den Ergebnissen der quasistatischen theoretischen Beschreibung in Kap. 3 erlauben. Bei erhöhter, überschwelliger Stimulationsstromstärke würden die EPSPs immer von postsynaptischen population Spikes (pSpikes) überlagert.

Der Schnitt wurde 20 min lang mit 0.1 Hz stimuliert, um Effekte neuronaler Plastizität zu vermeiden und so ein konstantes Antwortsignal evozierter Feldpotentiale zu erreichen. Diese Stimulationsfrequenz wurde bis zum Ende des Experimentes beibehal-

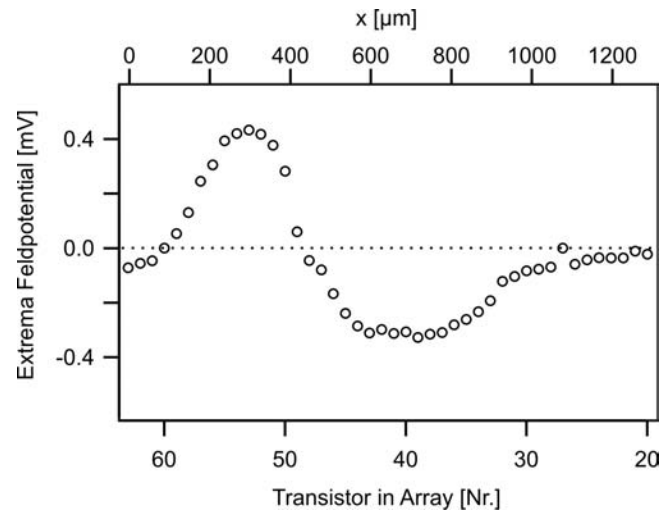


Abbildung 5.2. Mit Transistorarray gemessenes x-Profil entlang der Pyramidalneurone, senkrecht zum CA1. Bei $x = 1080 \mu\text{m}$ handelt es sich um einen defekten Transistor (Nr. 27).

ten. Die ausgelösten Feldpotentiale wurden stets gleichzeitig mit je 8 Transistoren beider Arrays aufgezeichnet. Um ein Profil entlang des gesamten Arrays zu messen, wurde mittels Multiplexer in 8 Einzelschritten sequentiell gemessen. Da gemäß obigem Stimulationsprotokoll die evozierten Feldpotentiale in Form und Amplituden relativ konstant blieben, ist ein Vergleich von sequentiell gemessenen Signalen gültig.

Ergebnisse Abb. 5.1 B zeigt gemäß der Position im Array die gemessenen Transistorsignale (das Stimulationsartefakt wurde herausgeschnitten). Am Ort der Dendriten, dem Stratum radiatum (Str.rad., ca. Transistoren 30 – 50 in Abb. 5.2) findet transmembraner Ioneneinstrom in die Synapsen statt und verursacht ein negatives Feldpotential, das Summen-EPSP. Zeitgleich findet im Stratum pyramidale, der Pyramidenzellschicht (Str.pyr., ca. Transistoren 50 – 55 in Abb. 5.2), ein Ausgleichstrom mit umgekehrten Vorzeichen statt. Für eine detaillierte Diskussion der für den Hippocampus typischen Signalformen evozierter Feldpotentiale sei auf Kap. 6 und A.1 verwiesen.

Ermittelt man für jede einzelne Transiente das Extremum des gemessenen EPSPs, erhält man das Profil entlang des Arrays, wie in Abb. 5.2 gezeigt. Es ähnelt der Form der x-Profile, wie sie in Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 vorgestellt wurden. Nimmt man an, dass dem Profil eine ausgeglichene Strombilanz zugrunde liegt, lässt dieses Experiment auf eine gleichmäßige Kopplung vom Schnitt an den Chip schließen. Bei einigen Messungen anderer Experimente war oftmals das positive Ausgleichs-EPSP im Stratum pyramidale etwas schwächer ausgeprägt, als das Korrelat im Stratum radiatum, was auf einen schwächer werdenden Kontakt zum Rand des Slices hin schließen lässt (Daten hier nicht explizit gezeigt). Da dieser Effekt auch hier nicht ausgeschlossen werden kann, wurde

auf eine weitere, quantitative Analyse (Vergleich mit Theoriekurven) verzichtet.

5.2. Vertikales Profil von Feldpotentialen im Hirnschnitt auf einem Substrat

Eine weitere Profilmessung, diesmal mit Mikroelektroden in z -Richtung, senkrecht zum Substrat, soll im Folgenden (i) Aufschluss geben, wie gut typischerweise ein akuter Hippocampusschnitt an einen Transistorchip koppelt: dazu sind die Signale, die im Gewebe direkt über dem Substrat gemessen werden, und das Signal des darunter liegenden FETs miteinander zu vergleichen. Das Amplitudenprofil quer zum Hirnschnitt erlaubt weiterhin (ii) eine Abschätzung, wie sich die Feldpotentiale im Hirnschnitt als Volumenleiter senkrecht zum Substrat ausbreiten (passiv, im quasistatischen Sinn), ob es Schichten inaktiver Zellen gibt und wie dick diese ausfallen.

Die z -Profile wurden mit herkömmlichen Mikroelektroden aus Glas gemessen. Abb. 5.3 zeigt eine schematische Übersicht des Experiments. Die Schwierigkeit bestand darin, die Mikroelektroden exakt über die Gateflächen der FETs zu positionieren, da Hirnschnitte dieser Dicke undurchsichtig sind. Zugleich galt es zu verhindern, dass während des schrittweisen Eindringens der Mikropipette der Hirnschnitt nicht verschoben wurde, um Transistor- und Elektrodensignale direkt miteinander vergleichen zu können. Durch die Messanordnung sind die Hirnschnittoberflächen verschiedenen Randbedingungen ausgesetzt: die Badelektrode (Ag/AgCl) nahe der Schnittoberfläche (dort: ohmsche Kopplung) ist auf Masse geklemmt. Auf der Substratseite sorgt das isolierende Gate- bzw. Feldoxid (schwarz im Bild) für eine kapazitive Kopplung. Ein eventuell existierender Film Elektrolyt zwischen Schnitt und Substrat ist zu berücksichtigen (weiß im Bild).

Alignment von Slice und Chip Der 128-FET Chip wurde im Messverstärker montiert und so ausgerichtet, dass die Arrays des Chips parallel zur Längsachse der Mikromanipulatoren zeigten (siehe Abb. 5.4, A). An diesen waren jeweils die Wolframelektrode sowie die Mikropipette aus Glas für Stimulation und Recording montiert. Mittels räumlicher Kalibrierung konnten die Gateflächen der 128 Transistoren computergestützt durch die Spitze der Mikropipette beliebig angesteuert werden (Programm wurde selbst in Labview geschrieben, National Instruments, München). Dazu wurde vor dem Experiment bei noch leerer Messkammer die Pipettenspitze direkt an einen festen Ort an der Oberfläche des Chips gefahren (Entfernung zum Substrat: unter $5\ \mu\text{m}$), als Ausgangspunkt definiert und eingespeichert (z.B. FET Nr. 1).

Da ein Hirnschnitt später im Messbetrieb die Chipstruktur überdeckt, konnte durch die räumliche Kalibrierungen der Manipulatoren garantiert werden, dass eine räumlich und zeitlich simultane Messung mit Mikropipette und Transistor direkt an dessen Gate

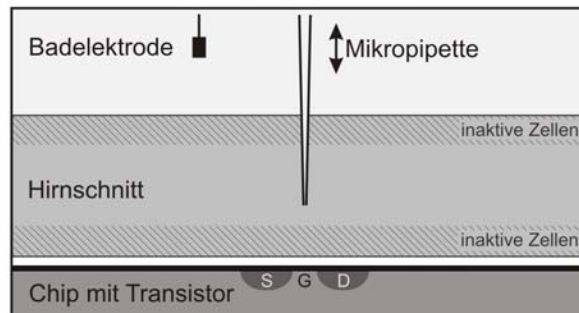


Abbildung 5.3. Schematische Seitenansicht eines akuten Hirnschnitts auf einem Transistorchip mit zusätzlicher Mikroelektrode. Durch den Schneideprozess entstehen Schichten inaktiver Zellen an den Oberflächen des Schnittes. Die im Substrat integrierten Feldeffekttransistoren (G: Gate; S: Source; D: Drain) messen an der Unterseite des Schnitts evozierte Feldpotentiale, die von aktiven Zellschichten in der Mitte des Schnitts generiert werden. Ein zusätzlicher Film von Elektrolyt zwischen dem Schnitt und dem Substrat (weiß) kann die Detektion erschweren. Durch die Messanordnung sind die Oberflächen verschiedenen Randbedingungen ausgesetzt (siehe Text). Die dadurch bedingte Verteilung neuronaler Signale wird mit einer Mikropipette im vertikalen Profil gemessen und mit den Transistorsignalen verglichen.

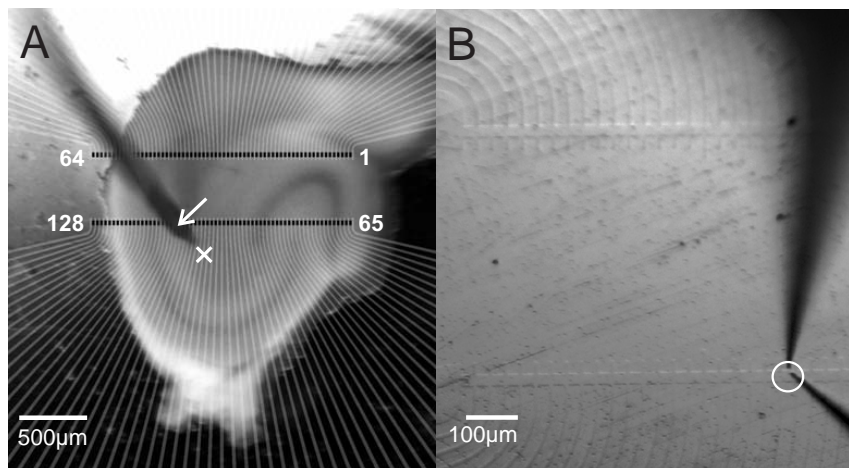


Abbildung 5.4. Fotografien von Hirnschnitt und Chipoberfläche. **(A)** Hippocampuschnitt einer Maus auf einem Chip mit 2 linearen Arrays von je 64 FETs. Zusätzlich sind die Zuleitungen (grau) sowie die Gateflächen (schwarz) gekennzeichnet. Letztere haben eine Größe von $22 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$; der Transistor-Transistor Abstand beträgt $30 \mu\text{m}$, der Abstand der Arrays $500 \mu\text{m}$. Die Spitze einer Wolframelektrode befindet sich im Schnitt und stimuliert die Schaffer-Kollaterale im CA1 (Lage der Spitze: weißes Kreuz), während die FETs das Antwortsignal (EPSP) detektieren. Über Transistor Nr. 107 (weißer Pfeil) misst anschließend eine zusätzliche Glaselektrode (nicht auf dem Bild) senkrecht zur Chipoberfläche ein vertikales Profil von Feldpotentialen. **(B)** Nach der Messung: die Pipettenspitze wird erneut mit dem gleichen computergestützten Protokoll zu Transistor Nr. 107 gefahren (weißer Kreis). Sie zeigt sehr gute Übereinstimmung mit der Position des zuvor gewählten Transistors.

stattfindet. Nach jedem Experiment wurde durch nochmaliges Anfahren die Position der Mikropipette relativ zum entsprechenden Transistor optisch kontrolliert. Die Pipette erreichte dabei jedesmal erneut ihre Sollposition.

Simultane Messung mit Mikropipette und Chip Um Signale von Glaselektroden und FETs vergleichen zu können, erwies es sich als zweckmäßig, simultane Messungen an der Stelle mit geringstem Feldpotential-Gradienten entlang des Transistorarrays durchzuführen (Gategröße von $22 \times 24 \mu\text{m}$ im Vergleich zum Durchmesser der Mikropipettenspitze von ca. $1.5 \mu\text{m}$). Dazu musste der Transistor ermittelt werden, dessen gemessene EPSPs die geringste räumliche Änderung relativ zu seinen Nachbarn aufwies. Dies entspricht jener Stelle, wo das Amplitudenprofil senkrecht zum CA1 ein Minimum aufweist (siehe auch Kap. 3.3.1, Abb. 3.9).

Wie in Kap. 5.1 vorgestellt, wurde zunächst entlang beider Arrays FET-Messungen der evozierten Feldpotentiale durchgeführt. Die stimulierende Wolframelektrode wurde wieder im CA1 nahe der Schaffer-Kollateralen positioniert (siehe Abb. 5.4, A weißes Kreuz). Das Stimulationsprotokoll erfolgte, wie in Abschnitt 5.1 vorgestellt ($I_s = -35 \mu\text{A}$ bei Stimulusdauer von $200 \mu\text{s}$); durch eine unterschwellige Reizstromstärke wurden reine EPSPs im nachgeschalteten CA1 ausgelöst, die simultan zur Stimulation mit den Transistoren als Summenpotentiale gemessen wurden. Es ist wieder anzumerken, dass nach jeder Stimulation (Stimulationsfrequenz stets 0.1 Hz) die evozierten Feldpotentiale in Form und Amplituden relativ konstant blieben und sich nur über größere Zeiträume hinweg veränderten, so dass eine quantitative Analyse der sequentiell gemessenen Signalamplituden gerechtfertigt ist. Im Hirnschnitt konnten über die hier vorgestellten Experimente hinaus z.T. 8 h lang evozierte neuronale Signale gemessen werden (Daten hier nicht gezeigt).

Obigen Kriterien zufolge wurde daraufhin FET Nr. 107, wie in Abb. 5.5 A gezeigt, für simultanes Transistor- und Mikroelektroden-Recording ausgewählt. Oberhalb diesem wurde die Messung des z-Profiles durchgeführt. Abbildung 5.5, B illustriert die Gültigkeit der Annahme eines quasistationären Falles, was für den späteren Vergleich mit numerischen Simulationen relevant wird. Insgesamt wurde somit eine Region im Hirnschnitt (Stratum radiatum, CA1) ermittelt, die bzgl. konstanter Signalamplituden deutlich größer war als die Gatefläche ($22 \times 24 \mu\text{m}^2$), sowie die Genauigkeit der Positionierung der Mikropipette (ca. $5 \mu\text{m}$).

Messung eines z-Profiles mit Mikropipette Mithilfe der computergesteuerten Mikromanipulatoren wurde anschließend die Spitze der Mikropipette zur (lateralen) Position des gewählten Transistors gefahren und langsam durch den Schnitt zur zuvor abgespeicherten Position direkt über der Gateoberfläche abgesenkt ($z \approx 0 \mu\text{m}$). Durch die senkrechte Montage der Elektroden kam es zu keiner nennenswerten Verschiebung des Hirnschnitts. Mit 0.1 Hz Stimulationsfrequenz wurden nun simultan mit Transistoren

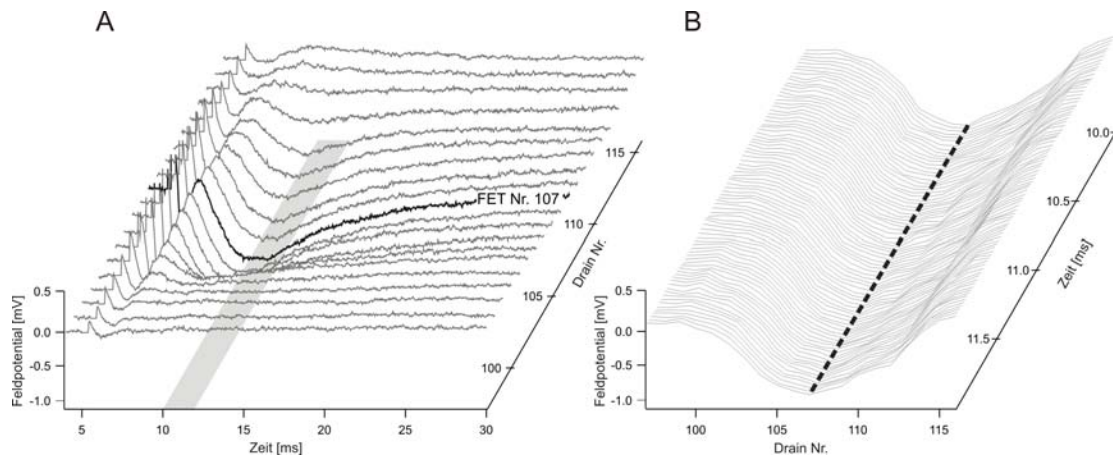


Abbildung 5.5. Transistorsignale des Feld-EPSP im Stratum radiatum. **(A)** Der ausgewählte FET Nr. 107 (schwarz) misst im lokalen Minimum des EPSPs. Graue Fläche: Zeitlicher Ausschnitt, vergrößert in **(B)**: Profile in x-Richtung (parallel zum Array) um FET Nr. 107 für verschiedene Zeitpunkte um Minimum bei ca. $t = 11$ ms. Die Annahme eines quasistationären Falles für die spätere, qualitative Betrachtung ist gerechtfertigt.

und Mikropipette die EPSP-Antworten aufgezeichnet. Nach je drei Messungen pro Messposition wurde die Spitze der Mikropipette in 10 μm -Schritten nach oben bewegt, bis die Höhe $z = 600$ μm erreicht wurde. Die Recordingelektrode befand sich dann wieder im Bad, die totale Messzeit betrug 30 min.

Am Ende des Experiments wurden Hirnschnitt und Elektrolyt entfernt und die Pipettenspitze erneut nach demselben Protokoll zum ausgewählten Transistor gefahren. Abbildung 5.4 (B) zeigt, dass beide Positionen bei der hier vorgestellten Messung sehr gut übereinstimmten.

Ergebnisse: z-Profil Abbildung 5.6 zeigt die Transienten der drei Transistoren um den gewählten FET Nr. 103 sowie der Mikropipette über Gate Nr. 107 vor der Messung des z-Profiles. Die Signale zeigen eine kurze kapazitive Transiente aufgrund der Stimulation der Schaffer-Kollateralen, gefolgt von ausgelösten EPSPs mit einem Maximum nach ca. 6 ms. Der Transistor Nr. 107 misst nahezu dasselbe Signal wie die Glaselektrode, die sich mit ihrer Spitze direkt über dessen Gate befand. Zusätzlich ist in den Transistorsignalen das fiber-volley zusehen, das von der Summe der APs in den Schaffer Kollateralen verursacht wird. Im Mikropipetten-Signal fehlt dies, da es vom starken Reizartefakt überdeckt wurde. Ursache dafür ist eine kapazitive Kopplung zur Reizelektrode über das Bad aufgrund der kurzen Distanz der Elektroden.

Für die Auswertung des z-Profiles wurden die Signalamplituden der EPSPs (Minima in EPSPs in Abb. 5.6) für die drei Transistoren (schwarz) und die Elektrode (rot, über Transistor 107, Mitte) ermittelt und den Messpositionen entsprechend gegen die Höhe über dem Substrat aufgetragen (siehe Abb. 5.7). Es wurden dabei immer die letzten

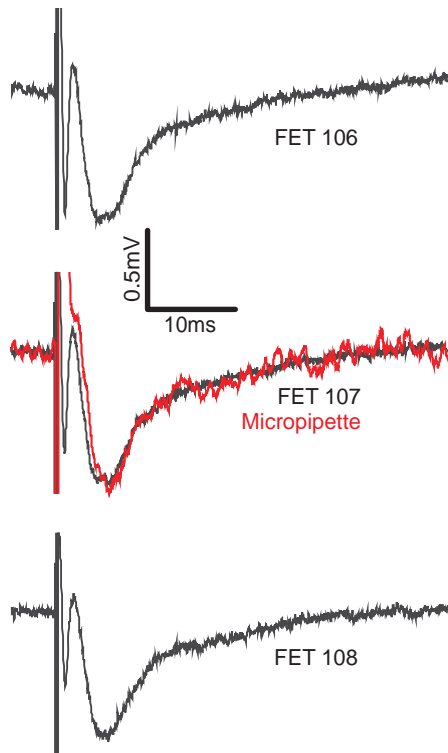


Abbildung 5.6 Evozierte Feldpotentiale im Stratum radiatum des CA1, simultan gemessen mit Feldeffekttransistoren und Mikroelektrode (Messort der Elektrode: unterhalb des Hirnschnitts ($z = 0 \mu\text{m}$) über Gate des FET Nr. 107). Gezeigt sind Signale dreier Transistoren um um FET Nr. 107 (schwarz). Die gemessenen EPSPs stimmen gut mit dem Signal der Mikroelektrode (rot) in Form und Amplitude überein. Die Transistoren messen zusätzlich ein Fiber Volley (das AP der Schaffer-Kollateralen), was bei der Mikropipette durch das starke Reizartefakt der Stimulation nicht sichtbar ist. (siehe [Sta 08]).

der je drei Messungen pro Position verwendet. Nach nahezu perfekter Übereinstimmung mit dem Transistorsignal steigt die Amplitude zum Zentrum des Schnittes hin an und fällt nahe der oberen Kante des Schnittes ab.

Der Knick bei $z = 490 \mu\text{m}$ ergibt sich durch Verlassen des Schnittes und Erreichen des Bades aufgrund der diskontinuierlichen Änderung des spezifischen Widerstandes von Hirnschnitt und Medium. Ähnliches deutet sich auch ab $z = 10 \mu\text{m}$ an: es ist denkbar, dass der Schnitt eine raue Oberfläche hat und sich deshalb ein mit Elektrolyt gefüllter Spalt zwischen Gewebe und Substrat bildet. Die Elektrode wirkte sich vermutlich für $z = 0 \mu\text{m}$ andrückend aus, wobei der Effekt für $z > 10 \mu\text{m}$ nicht beobachtbar ist. Da ab diesen Messpositionen die Transistor-Signalamplituden näherungsweise stabil blieben, kann von einer geringen Schicht Elektrolyt von $d_f < 10 \mu\text{m}$ ausgegangen werden. Ob die Elektrode den Transistor evtl. beeinflusst, wird unten diskutiert (5.3).

Die Signalamplitude erreicht im Bad einen konstanten Wert von $V_F = 0.2 \text{ mV}$, der sich durch den Spannungsabfall über den Elektrolyt (spezifischer Widerstand von $\rho = 64 \Omega\text{cm}$) zur Referenzelektrode erklärt. Diese Form des Profils wurde an insgesamt 15 Schnitten nachgewiesen, davon 4 mit einer gleichzeitigen und (für $z = 0 \mu\text{m}$) gleichartigen Messung mit Transistoren.

Mithilfe des Volumenleitermodells des Hirnschnitts (siehe Kap. 3) lässt sich das Profil qualitativ interpretieren: (i) in der Mitte des Schnitts verursachen die aktiven Stromsen-

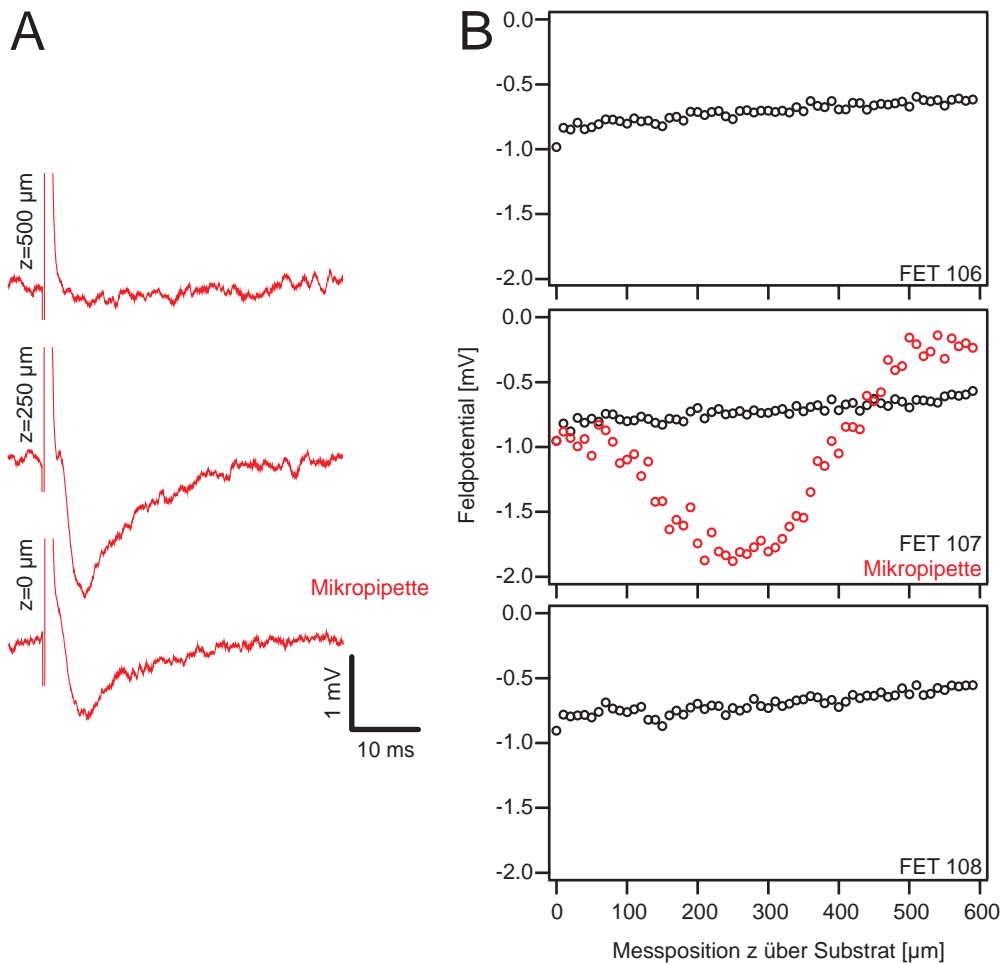


Abbildung 5.7. z-Profil evozierter Feldpotentiale im Stratum radiatum des CA1, gemessen mit Mikroelektrode bei simultaner Transistormessung. Das Profil bezieht sich auf den Ort direkt über der Gatefläche von FET Nr. 107. **(A)** Mikropipetten-Signale der Messpositionen $z = 0 \mu\text{m}$, $250 \mu\text{m}$ und $500 \mu\text{m}$. In der Mitte des Slices wird zusätzlich das fiber volley (das AP in den Schaffer Kollateralen) sichtbar **(B)** Die EPSP-Signalamplituden von Elektrode (rot) und den Transistoren um FET Nr. 107 (schwarz) sind jeweils aufgetragen gegen den Messort z der Elektrode über dem Substrat. Bei Position $z = 0 \mu\text{m}$ stimmen die Amplituden überein. Die Mikroelektrode misst das typische Profil, wie es für einen akuten Schnitt auf einem isolierenden Substrat erwartet wird. Das Absinken der Transistor-Signalamplituden bis über die Messung des z-Profiles hinaus dokumentiert eine leichte Abnahme neuronaler Aktivität; der Schnitt ist – bedingt durch das Medium – auf $490 \mu\text{m}$ aufgequollen (siehe auch [Sta 08]).

ken (current source density $j_{csd} < 0$) aufgrund ausgelöster EPSPs im Stratum radiatum eine positive Krümmung des Feldpotentials; (ii) der monotone Abfall in Richtung Bad zeigt die ohmsche Kopplung an das Bad, das auf ground-Potential (Randbedingung $\varphi = 0$) geklemmt ist; der lineare Verlauf reflektiert zudem die Abwesenheit von aktiven neuronalen Elementen (CSD $j = 0$); dasselbe ist auch (iii) an der unteren Seite des Schnitts zu sehen, bedingt durch die Schichten inaktiver Zellen an der Ober- und Unterseite. Dass die Steigung des Feldpotentials jedoch konstant ist, lässt die kapazitive Kopplung des Schnitts an das Substrat und die daraus folgende kapazitive Randbedingung ($\partial\varphi/\partial z = 0$) einsichtig werden.

Aufquellen des Hirnschnitts Da die Schnitte auf eine Dicke von 350 μm hin präpariert wurden, ist das Hirngewebe offensichtlich etwas aufgequollen (siehe Abb. 5.7,B), was bei allen Experimenten dieser Versuchsreihe beobachtet wurde (Aufquellen stets im Bereich von 40%). Ursache hierfür ist die hohe Glucosekonzentration im Medium (siehe auch [Lip 84], [Ye 06]), die besonders Gliazellen beeinflusst. Die verwendete ACSF (aus [Edw 89]) erwies sich zum damaligen Zeitpunkt jedoch als sehr gut geeignet, um gute Präparationen hinsichtlich stabiler Feldpotentiale zu erreichen.

z-Profil: Messung im Vergleich mit Theorie Zur quantitativen Interpretation wurde das Volumenleitermodell für das Feldpotential $\varphi(x, z)$, wie in Abschnitt 3.3 vorgestellt, in $x - z$ Richtung gelöst, um es den experimentellen Ergebnissen gegenüberzustellen: die Signalamplituden der Transistoren in Abbildung 5.7 (B) zeigen allerdings einen leichten Abfall aufgrund Nachlassen der neuronalen Aktivität. Zur leichteren Interpretation wurden deshalb zuerst (i) der o.g. Offset von -0.2 mV (der Mikropipette, nach Erreichen des Bades) von den Amplituden abgezogen, sowie (ii) der erwähnte monotone Abfall anhand der Transistorsignale korrigiert. Abbildung 5.8 (A) zeigt die reskalierten Signalamplituden (rot), wobei nun die Höhe z gegen die vorgefundenen Messwerte aufgetragen sind.

Zur numerischen Behandlung des Profils wurde folgendermaßen vorgegangen: die erwähnte unterschiedliche Kopplung der Schnittoberflächen schlägt sich in den Randbedingungen nieder. Die obere Kante des Schnitts liege im Modell fest bei $z = 500$ μm . Die lateralen Grenzen des Schnittes werden vernachlässigt ($\varphi = 0$ für $x \rightarrow \pm\infty$). Aus dem Foto 5.4 (A) werden die anatomischen Geometrien für Stratum pyramidale bzw. -radiatum abgeschätzt (50 μm , bzw. 250 μm). Um das gemessene Profil zu reproduzieren, wurde eine CSD für die dendritische Region von $j_{rad} = -0.075$ pA/ μm^3 angenommen; die Strombilanz berücksichtigend folgte damit für die Region der Somata $j_{pyr} = 0.375$ pA. Den oben diskutierten unterschiedlichen Krümmungen sowie linearem Abfall an Unter- bzw. Oberseite in Abb. 5.8 (A) wird durch eine Schicht aktiver Zellen von 265 μm bzw. einer Schicht inaktiver Zellen von $d_{l_{oben}} = 100$ μm an der Oberseite Rechnung getragen.

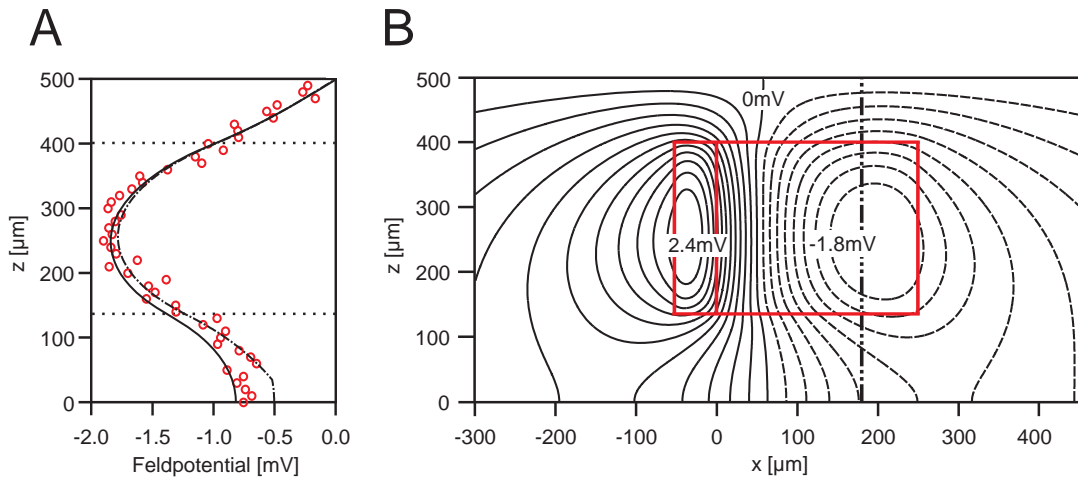


Abbildung 5.8. EPSP-Feldpotentiale im akuten Hirnschnitt auf einem Substrat: Theorie vs. Experiment. **(A)** Gemessenes z -Profil senkrecht zum Substrat (rote Markierungen) nach Abzug des Offsets (Spannungsabfall im Bad) sowie Korrektur sinkender Signalamplituden (schwächer werdende neuronale Aktivität während des Experiments). Zusätzlich errechnete Profile (schwarz) für 2 Modelle: (i) Fall mit $100 \mu\text{m}$ inaktiver Zellen an Ober-, bzw. $135 \mu\text{m}$ an Unterseite (schwarze Kurve, durchgezogen), sowie (ii) ein Fall mit beiderseits $100 \mu\text{m}$ inaktiver Zellen und zusätzlich einem $35 \mu\text{m}$ dicken Film aus Elektrolyt zwischen Schnitt und Substrat (schwarze gestrichelte Kurve). Die Schicht aktiver Zellen ist in beiden Fällen gleich (von $z = 135$ bis $400 \mu\text{m}$, begrenzt durch waagrechte, gepunktete Linien; Dicke des Hirnschnitts folglich (i) $500 \mu\text{m}$, bzw. (ii) $465 \mu\text{m}$). **(B)** Simulierte, zweidimensionale Feldpotentialverteilung für Modell (i) ohne Elektrolyt mit Markierung aktiver Zellen (rot mit $j_{csd} \neq 0$). Vertikale Linie: Ort des z -Profils bei $x = 180 \mu\text{m}$; durchgezogene Isopotentiallinien ($\Delta V = 200 \mu\text{V}$): $V > 0$, gestrichelt: $V < 0$ (vgl. [Sta 08]).

An der unteren Seite zum Substrat kann zusätzlich zur unterseitigen Schicht inaktiver Zellen ein dazwischen liegender Film aus niederohmigem Elektrolyt (ACSF, $\rho_{Bad} = 64 \Omega\text{cm}$, gemessen) nicht ausgeschlossen werden; der Elektrolyt im Spalt an der Unterseite steht also im indirekten Kontakt mit der Referenzelektrode; das Hirngewebe ($\rho = 300 \Omega\text{cm}$, [Hol 87]) ist an dieser Stelle ohmsch kontaktiert. Deshalb werden an dieser Stelle 2 Extremfälle betrachtet:

1. Die gesamten restlichen unteren $135 \mu\text{m}$ ($= d_{l_{unten,A}}$) zum Substrat bilden ein Hirngewebe aus inaktiven Zellen.
2. Die Schicht inaktiver Zellen besteht – wie an der Oberseite – aus $d_{l_{unten,B}} = 100 \mu\text{m}$ dickem Hirngewebe aus inaktiven Zellen und einem zusätzlichen $d_f = 35 \mu\text{m}$ dicken Film ACSF zwischen Schnitt und Substrat.

Zusammen mit den genannten spezifischen Widerständen (ρ_{Bad} , ρ_{slice}) sind die Parametersätze jeweils komplett, so dass die bereits in Kap. 3.2.1 besprochene Differential-

gleichung

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \varphi(x, z) = -\rho \cdot j_{csd}(x, z) \quad (5.1)$$

mit den oben diskutierten Randbedingungen für beide Fälle gelöst werden kann. Für den Fall mit Spalt müssen entsprechend 2 Domänen betrachtet werden, mit entsprechenden Randbedingung und spezifischen Widerständen ρ_{Bad} und ρ_{slice} (Kap. 3.2.1).

Das Ergebnis für den ersten Fall (ohne Elektrolyt) ist in Abbildung 5.8 (B) zu sehen. Es sind zusätzlich die Regionen aktiven Gewebes eingezeichnet (rot). Das errechnete Feldpotential $\varphi(x, z)$ nimmt erwartungsgemäß in der Mitte des Schnitts bei $j \neq 0$ Extremwerte an. Durch Ioneneinstrom im Stratum radiatum (rote Box, rechte Seite) bzw. Ausgleichsstrom im Stratum pyramidale (linke Seite) zeigt das EPSP ein negatives bzw. positives Vorzeichen. Das Feldpotential breitet sich auch in die Regionen inaktiven Gewebes aus. An der Oberseite des Schnitts klingt es durch die ohmsche Kopplung an das (ideal) geerdete Bad gegen $\varphi = 0$ ab. An der Unterseite nimmt es durch die kapazitive Kopplung an das isolierende Substrat dennoch relativ hohe, mit $z \rightarrow 0$ konstante Werte ein.

Die Position der Mikropipette (Richtung x) im Experiment wurde anhand des Fotos (Abb. 5.4, A) relativ zum Stratum radiatum abgeschätzt (gestrichelte Linie: Pfad der Messung). Für die entsprechende Position ist in Abbildung 5.8 A zu den experimentellen Signalamplituden zusätzlich das errechnete Profil $\varphi(x = 180 \mu\text{m}, z)$ zu sehen (schwarze, durchgezogene Linie). Nahe der Oberfläche sowie mittig entspricht es sehr genau den Messwerten. An der Seite zum Substrat wären dem Modell zufolge höhere Amplituden zu erwarten.

Für das zweite Modell wurde ebenso verfahren (Abb. 5.8 A, gestrichelte Linie). Es gibt das gemessene Profil der Unterseite besser wieder, zeigt aber, bedingt durch die diskontinuierliche Änderung von φ einen Knick beim Eintritt in den unteren Film aus Elektrolyt. Die zu erwartende Chip-seitige Signalamplitude ist geringer als die gemessene.

Das Experiment bestätigt die Annahme für die Randbedingungen an Ober- und Unterseite des Schnitts. Der geringfügige Abfall der Signalamplitude von FET Nr. 107 ist bedingt durch eine Kombination aus einer dickeren Schicht inaktiver Zellen an der Unterseite, sowie durch einen Spalt aus Elektrolyt (mit nicht exakt bestimmbarer Dicke), der zwischen Schnitt und Substrat liegt. Denkbar ist auch, dass die Substrat-seitigen Zellen etwas schlechter versorgt werden.

5.3. Recording neuronaler Feldpotentiale: Transistor im Vergleich mit Mikropipette

Im gemessenen z -Profil von Kap. 5.2 befindet sich die erste Messposition der Mikropipette direkt am Substrat an der selben Stelle wie das Gate des gewählten Transistors

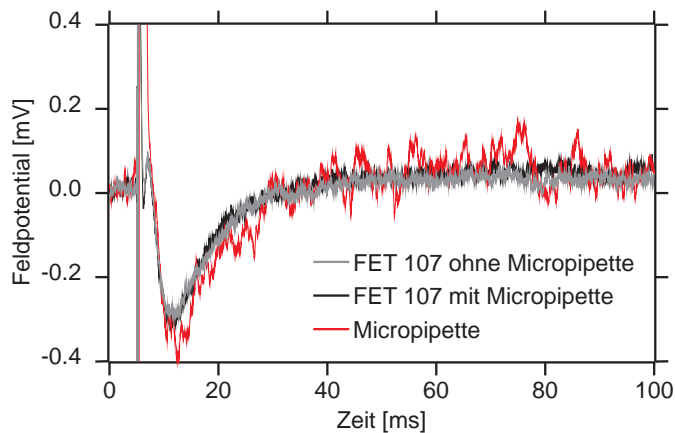


Abbildung 5.9 Übereinstimmung von Transistor- und Mikropipetten-Signal. Die Transistormessung erfolgte zunächst ohne (grau), dann mit (schwarz) zusätzlicher Mikropipette direkt über der Gatefläche des ausgewählten Transistors. Das Mikropipetten-Signal (rot) wurde simultan aufgenommen. Die Transistorsignale werden durch die Existenz der Elektrode nicht beeinträchtigt, die Transienten beider Messmethoden sind im Rahmen des Signal-Rausch – Verhältnissen nahezu identisch.

Nr. 107. Die an dieser Stelle simultan gemessenen Antworten waren zusammen mit den 2 benachbarten Transistoren desselben Arrays in Abbildung 5.6 abgebildet. Die Signale beider Messprinzipien stimmen sehr gut miteinander überein. Das erhöhte Reizartefakt wird durch die kapazitive Kopplung zur Reizelektrode über das Bad bedingt, aufgrund der kurzen Distanz beider Elektroden.

In Bezug auf die Frage, ob die gleichzeitige Existenz der Elektrode über dem Transistor diesen beeinflusst, wurde nach der Messung in Kap. 5.2 das Transistorsignal erneut, einmal ohne, und einmal mit zusätzlicher Elektrode aufgenommen (Ort der Elektrode wieder direkt über FET 107). Das Ergebnis zeigt Abb. 5.9. Die Transistorsignale sind praktisch deckungsgleich; in Anbetracht des Rauschens stimmt mit ihnen ebenfalls das Signal der zusätzlichen Mikroelektrode perfekt in Form und Amplitude überein.

Die gute Übereinstimmung der Signale beider Messmethoden bei gleichem Messort zeigt, dass planare EOSFETs wohlgeeignet sind, um neuronale Feldpotentiale von Hirnschnitten zu messen. Dies liegt v.a. in der guten Kalibrierbarkeit der Sensoren ([Fro 93]; siehe auch Kap. 4.2).

Anmerkung: Vergleich mit MEA-Messungen in der Literatur Eine in der Literatur dokumentierte Technik, mit der sich diese Ergebnisse vergleichen lassen, sind Messungen mit Multi-Elektroden Arrays (MEA): hier werden mittels planarer Metallelektroden von der Unterseite akuter Schnitte Feldpotentiale gemessen ([Nov 88] [Oka 99], [Shi 00], [Ege 02], [Gho 06], [Hua 06], [Fre 09]; Elektrodenabstand: 18 - 200 μm).

Die in diesem Abschnitt vorgestellte Gegenüberstellung von Transistor- und Elektrodensignal wirft jedoch die Frage auf, warum mit planaren Metallelektroden oft sehr geringe Signalamplituden genannt werden (ca. 100 – 350 μV in oben genannten Publikationen). In Arbeiten dagegen, in denen klassische extrazelluläre Mikropipettenmessungen an akuten Hippocampuslices durchgeführt wurden, wie sie auch in hier vorliegender

Arbeit vollzogen wurden, fallen Feldpotentiale dieser Signalform um Faktor 5–10 erhöht aus (z.B. [Fon 04], [Rot 06]). Dies ist auch der Bereich, in dem sich viele Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit befanden.

Als Argument wurde in [Heu 02] (i) eine schwache Kopplung aufgrund geringer Abdichtung der Elektroden durch das Hirngewebe aufgeführt. Als weitere Beeinträchtigung wurde (ii) weiterhin genannt, dass die Schnitte durch die untergetauchte Messanordnung schwächere Amplituden erzielten, im Vergleich zu üblichen Mikroelektrodenmessungen in der Interfacedmethode.

Da MEAs – genauso wie die in dieser Arbeit verwendeten FET-Chips – untergetauchte Messungen voraussetzen, wurden zur Verbesserung des Arguments (i) in [Heu 02] pyramidale Elektroden eingeführt, um aktiven Zellschichten in akuten Schnitten näher zu kommen. Es ist jedoch unklar, wie weit diese ins Gewebe eindringen, zumal der größte Teil der Elektrodenoberfläche an der Pyramidenbasis, nahe der Substratoberfläche liegt. Eine kritische Analyse der Signale, die in oben genannter und ähnlichen Arbeiten aufgeführt werden ([Heu 02], [Kop 06], [Ste 06]), zeigt, dass vergleichbare, erzielte Feldpotentialamplituden noch immer relativ gering waren (ca. 20–50% der in dieser Arbeit erzielten Werte).

Die kapazitive Messmethode mit Feldeffekt-Transistoren, wie sie in dieser, hier vorliegenden Arbeit diskutiert wird, liefert jedoch trotz losem Aufliegen der Schnitte sowie untergetauchter Messanordnung Signale, die mit Literaturangaben vergleichbar sind.

5.4. Experimente zur Stimulation akuter Hirnschnitte

In [Hut 04] wurden ab ca. $V_{thr} = 2 \text{ V}$ am Kondensator angelegter Rampenamplitude erfolgreich Feldpotentiale im Schnitt ausgelöst. Eine Übertragung auf akute Hirnschnitte bringt jedoch zwei prinzipielle Schwierigkeiten mit sich: (i) die Schichten aktivierbarer Neurone sitzen nicht mehr direkt über der Chipoberfläche, wie das bei kultivierten Schnitten teilweise der Fall ist. Präparationsbedingt gilt es bei akuten Hirnschnitten vielmehr, in die Schichten ab $50 \mu\text{m}$ oberhalb der unteren Schnittfläche vorzudringen.

(ii) Weiterhin ist nicht davon auszugehen, dass die Abdichtung durch einen akuten Schnitt auf dem Chipsubstrat ähnlich günstig ausfällt wie bei den Kulturen, die direkt auf dem Substrat festwachsen. Es ist denkbar, dass die untere Schnittfläche eines akuten Hirnschnitts faserig ausfällt, so dass sich eine mit Elektrolyt ausgefüllte Schicht zwischen Substrat und eigentlichem Hirngewebe ausbildet. Die Messungen in Kapitel bestätigten diese Vermutung.

Die theoretische Abschätzung in Kapitel 3.3.3 brachte zum Ergebnis, dass der reizauslösende kapazitive Strom *mindestens* um Faktor 2 bis 3 – je nach Beschaffenheit einer zusätzlichen Schicht Elektrolyt – erhöht werden muss, falls ähnliche Stimulationsbedingungen im akuten Schnitt an den Orten mit stimulierbarem Gewebe erzielt werden sollen.

In dieser Arbeit wurde dennoch versucht, die Stimulationsmethode aus [Hut 04] mit den in Kapitel 4.3 vorgestellten (baugleichen) Chips auf akute Hirnschnitte umzusetzen. Es wurde dazu wieder im Hippocampusschnitt eine Wolfram-Reizelektrode im CA1 bei den Schaffer Kollateralen derart platziert, dass neuronale Aktivität ausgelöst werden konnte. Anschließend wurde der Schnitt auf dem Chip so positioniert, dass sich der stimulierende Kondensator direkt unter der Wolframelektrode befand. Als Stimulationspulse wurden an den jeweiligen Kondensatoren Rampen als Stimulationspulse angelegt, deren schnell fallenden Flanken einen kathodischen kapazitiven Stimulationsstrom verursachten (gleiches Protokoll wie in [Hut 04]). Die Antwortsignale wurden entweder mit Transistoren oder einer Glaselektrode gemessen.

In keinem Experiment konnte nach erfolgreicher Stimulation mittels Elektrode (Kontrollexperiment) mit einem oder gar mehrfach aufgeschalteten Kondensatoren bis Erreichen maximal möglicher Spannungen neuronale Aktivität ausgelöst werden¹. Es muss betont werden, dass Chip-seitig keine höheren Spannungen als 4.5 V angelegt werden konnten, da ab dann die Durchbruchspannung überschritten wurde, was die TiO₂- Beschichtung schädigen konnte.

5.5. Diskussion

Die Experimente dieses Kapitels beweisen, dass planare Sensoren aus EOSFETs geeignet sind, Feldpotentiale akuter Schnitte an deren Unterseite zu messen. Zusammenfassend werden vier Aspekte betont.

(i) Es wurde die perfekte Übereinstimmung in Form und Amplitude der Signale eines EOSFETs sowie einer am gleichen Ort unterhalb des Schnitts befindlichen Mikroelektrode nachgewiesen.

(ii) Trotz eines, wenn auch dünnen Films von Elektrolyt ($< 10 \mu\text{m}$), gekoppelt mit inaktiven Zellen an der Unterseite, wird das in der Mitte des Schnittes verursachte und sich (passiv) ausbreitende Feldpotential zum Substrat hin nicht völlig abgeschwächt. Es beträgt am Ort der Transistoren immer noch ca. 40% seiner Maximalamplitude. Mit Sensoren guten Signal-Rausch-Verhältnisses ist somit immer noch sehr gutes Recording möglich. Warum einzig vergleichbare Experimente in der Literatur, die Messungen mit MEAs, deutlich geringere Amplituden aufweisen, ist unklar. Es fehlen dort auch vergleichende Messungen mit Mikroelektroden.

(iii) Das Experiment des Profils in z -Richtung erlaubt eine Abschätzung der Dicke inaktiver Zellen von ca. $100 \mu\text{m}$ inklusive Quellen des Schnittes, bzw. $70 \mu\text{m}$, korrigiert. Dies ist ein vernünftiger Wert verglichen mit der Literatur: in [Heu 02] werden $50 \mu\text{m}$ geschätzt, in [Tey 80] dagegen bis zu $70 \mu\text{m}$. Trotz der vermutlich leicht erhöhten Dicke an der Unterseite des Schnitts gibt das Experiment Aufschluss über den relativ gesunden

¹Daten hier nicht gezeigt; auch viele weitere Versuche einer Chip-seitigen Stimulation ohne einer zusätzlichen Wolframelektrode brachten kein Ergebnis.

Zustand des Schnittes, wenn er längere Zeit auf einem Transistorchip liegt. In diesem Experiment wurden die Schnitte noch mit einem Vibratom älterer Bauart geschnitten. Für die CMOS-Messungen (Kap. 6, sowie Kap. 7) wurde das zurzeit modernste Gerät eingesetzt, mit dem bei Patchmessungen intakte Zellen noch innerhalb der ersten 10 μm gefunden wurden [Gei 02]. Die damit vollzogenen Chipmessungen (ab Kap. 6) lassen bezüglich erzielter Signalamplituden tatsächlich auf eine Verbesserung der Schnittqualität schließen.

(iv) Eine Stimulation erwies sich mit der in der Arbeit verwendeten Technik als nicht durchführbar, im Gegensatz zur Stimulation von Hirnschnittkulturen [Hut 04]. Numerische Abschätzungen lassen jedoch vermuten, dass mit einer Verbesserung der Chipkapazitäten u.U. ein erneuter Versuch lohnenswert wäre.

6. Kartierung hippocampaler Strukturen mit CMOS-Chips

Im letzten Kapitel wurde die Kopplung akuter Hirnschnitte an einfache Siliziumchips vorgestellt. Es bestätigte sich, dass planare Sensoren in der Lage sind, am Substrat Feldpotentiale zu messen. Signaleinbußen, bedingt durch die Schicht inaktiver Zellen, bewegten sich mit ca. 40–50% in einem Rahmen, innerhalb dessen mit vorliegenden Transistor Chips gute Signal-Rausch Verhältnisse zu erwarten sind. Es zeigte sich, dass die Transistoren neuronale Feldpotentiale in gleicher Signalform und Amplitude messen, wie herkömmliche Mikropipetten.

Im folgenden Kapitel wird diese Methode auf zweidimensionale, $1 \times 1 \text{ mm}^2$ große Sensor Arrays hoher räumlicher Auflösung übertragen (Transistor–Transistor Abstand: $7.8 \mu\text{m}$). Das Ziel ist, mit diesen die zweidimensionale Signalausbreitung im akuten Hirnschnitt mit sehr hoher raum-zeitlicher Auflösung zu studieren. Dass dies möglich ist, wird anhand von Kartierungen wichtiger Stufen des Trisynaptischen Erregungsweges im Hippocampus gezeigt. Besonderes Hauptaugenmerk gilt dabei der charakteristischen Umschaltstelle CA3 \rightarrow CA1. Unter den Messbedingungen, wie sie bei den folgenden vorgestellten Experimenten vorherrschten, war keine zusätzliche Fixierung der Hirnschnitte notwendig. Deshalb konnten die Schnitte während des Experiments leicht verschoben werden, was es erlaubte, verschiedene Messungen zu einem Abbild neuronaler Aktivität im Hirnschnitt zusammenzufassen.

6.1. Messanordnung und Messdurchführung

Sowohl die Präparation als auch experimentelle Durchführung verlief ähnlich den Methoden, wie sie bereits in den Abschnitten 4 und 5 vorgestellt wurden. Für die Messungen in diesem Kapitel wurden juvenile Mäuse (C57BL/6, ca. p30–p40) präpariert, da deren Hippocampusschnitte klein genug ausfielen, damit sie auf die begrenzte Chipfläche passten. Dadurch war genug Platz, sie zu verschieben, so dass sie auf dem Sensorarray geeignet positioniert werden konnten. Für Präparation, Aufbewahrung und Messung wurde wieder dieselbe ACSF verwendet (ACSF I in A.4). Die Hirnschnitte wurden nach der Präparation (s. Kap. 4.1.1) bei Raumtemperatur gelagert.

Die für Messungen verwendeten CMOS Chips wurden mindestens 2 h vor Messbeginn mit PLL beschichtet, damit ein guter Kontakt zur sonst sehr hydrophoben Chipoberfläche möglich war. Ein MTA Chip wurde im Verstärker am Messaufbau montiert, wobei

sich am Rand der Kammer jeweils gegenüberliegend Zu- und Abfluss der Perfusion sowie die Referenzelektroden befanden. Mit Medium befüllt, wurden die Betriebsspannungen des Chips hochgefahren und eine Badmodulation gemessen. Diese wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt, um den Chip kalibrieren zu können. Zur Vermeidung hoher Betriebstemperaturen wurde mit einem Peltierelement, das sich unterhalb des Packages befand, gekühlt. Per PID-Steuerung konnte das Bad auf einer festen physiologischen Zieltemperatur gehalten werden (32°C). Mit einer peristaltischen Pumpe wurde die Kammer ständig mit entsprechend angewärmter, im Reservoir frisch begaster ACSF durchspült (2 mL/min, Chipinhalt ca. 2.5 mL; Zieltemperatur am Bad: ca. 32°C). Zusammen mit dem PID-gesteuerten Peltier konnte das Bad auf der Zieltemperatur gehalten werden ($32 \pm 1^{\circ}\text{C}$, gemessen mit einem im Bad befindlichen Thermofühler).

Nach ausreichendem Spülen mit frischem Medium wurde ein Hirnschnitt in die Kammer pipettiert, auf der Chipoberfläche positioniert und eine Akklimatisierungszeit von ca. 30 min eingeplant. Danach wurde mit einem Mikromanipulator die Reizelektrode im Schnitt positioniert¹. Dem jeweiligen Stimulationsprotokoll entsprechend wurden simultan die neuronalen Antworten mit den Transistoren des CMOS Chips ausgelesen und abgespeichert (effektive Samplingrate bei allen Experimenten dieses Kapitels: 5744 Hz).

6.2. Stimulation des CA3

Als erstes wird anhand eines Experiments untersucht, wie sich prinzipiell die Stimulation des CA3 auswirkt und ob auch die nächste Stufe im trisynaptischen Erregungsweg abgebildet werden kann: Eine monopolare Wolframelektrode wurde dazu schräg in den Schnitt gefahren, so dass sich die Position der entisolierten, stimulierenden Spitze nahe des Stratum pyramidale (Str.pyr.) des CA3 befand (siehe Fotografie links oben in Abb. 6.1²). Der Reizstrom wurde auf $70\ \mu\text{A}$ bei $300\ \mu\text{s}$ eingestellt.

Die mit dem CMOS-Chip gemessene Antwort nach Stimulation zeigt Figur 6.1: Die Signale jedes Frames (Messzeit nach Stimulation weiß eingetragen) sind ihrer Position im Array entsprechend farbkodiert aufgetragen und mit der Fotografie des Hirnschnitts hinterlegt (Bildfolge spaltenweise von links oben nach rechts unten). Die ersten 3 ms nach Stimulation sind vom Reiz dominiert und folglich weggelassen worden.

Ab $t = 3\ \text{ms}$ sind Antwortsignale im CA3 erkennbar (siehe Pfeil), die sich aus zwei neuronalen Ereignissen zusammensetzen: (i) das eng begrenzte negative Signal – es handelt sich um APs im Str.pyr. – hält ca. 1.5 bis 2 ms an; es wird anschließend (ii) von einem langanhaltenden, positiven Signal bis $t = 7.8\ \text{ms}$ (schwach erkennbar) überlagert. Letzteres lässt aufgrund der Lage und Länge auf EPSPs schließen, dem zweiten Anteil des Feldpotentials. Dieses langsamere EPSP findet vornehmlich im Stratum radiatum

¹Anfangs eine monopolare, bei späteren Experimenten eine bipolare Reizelektrode, um ein Übersprechen auf den CMOS Chip zu minimieren.

²Dieser Stimulationsort konnte durch das Reizartefakt verifiziert werden.

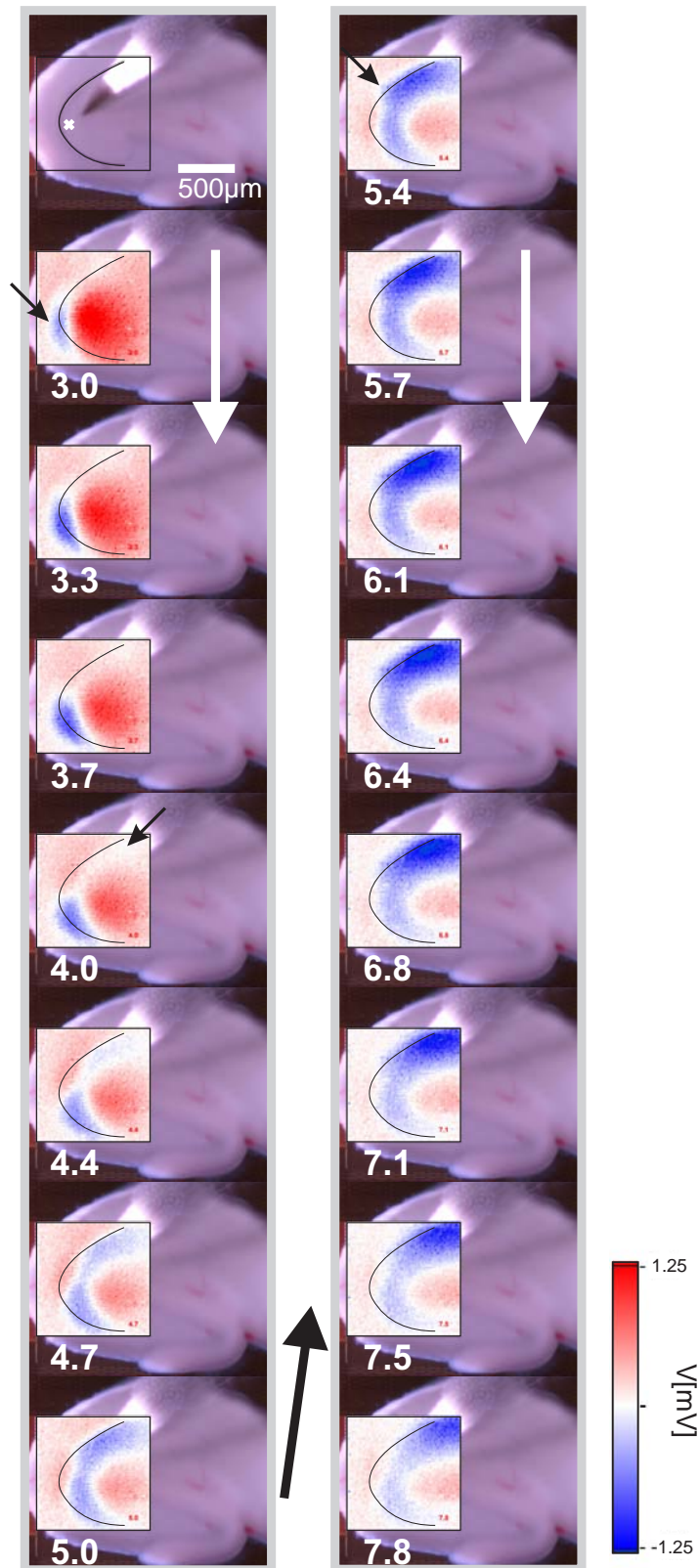


Abbildung 6.1 Stimulation des CA3: Zeitaufgelöste Signalamplituden, hinterlegt mit Foto vom Slice, zeigen eine schrittweise Signalausbreitung. Nach APs im CA3 (Pfeil bei 3 ms) durchqueren APs dessen Zellschicht entlang der Schaffer Kollateralen; nach ca. 4 ms erreichen sie das Stratum radiatum des CA1 (Pfeil bei 4 ms) und lösen dort, an den Synapsen entlang der Pyramidalschicht, EPSPs aus. Diese überschreiten die Reizschwellen der Pyramidenzellen, so dass ab ca. 5.4 ms nach Stimulation postsynaptische APs folgen. Währenddessen werden entlang des CA3 retrograd Richtung Gyrus dentatus EPSPs ausgelöst (Wolframelektrode schräg im Schnitt; Stimulationsort: weißes Kreuz; erste 3 ms nicht gezeigt, da vom starken Reizartefakt überdeckt).

(Str.rad.) des CA3 statt und zeigt dort, den einwärts gerichteten Strömen entsprechend, ein negatives Vorzeichen. APs breiten sich auch entlang der Moosfasern, hervorgerufen durch retrograde Stimulation deren Axonen, Richtung Gyrus Dentatus (GD) aus.

Die Stimulation des CA3 löst auch ein Summen-AP aus, das entlang der Schaffer Kollateralen propagiert, die den CA3 kreuzen. Dieses AP, auch „fiber volley“ genannt, erreicht bei $t = 4$ ms nach Stimulation das Str. rad. des CA1 (siehe Pfeil im Bild). Anschließend werden dort schrittweise EPSPs ausgelöst; aufgrund ihrer hohen Stärke werden folglich im Str. pyr. des CA1 postsynaptische APs (sog. population Spikes, pSpikes) ausgelöst, die als negatives Signal schrittweise entlang des CA1 in Erscheinung treten, mit einer typischen Dauer von ca. 1.5 ms. Der Pfeil bei 5.4 ms deutet die ersten APs an, die zugleich die funktionelle Grenze des CA1 zum CA3 markieren, welche hier sichtbar wird.

Eine Stimulation des CA3 führt bei akuten Hippocampusschnitten nicht immer zu einer Fortpflanzung neuronaler Aktivität bis in den CA1. Die Wahrscheinlichkeit, im 350 μm dicken Hirnschnitt einen Teil oder gar den kompletten Trisynaptischen Erregungsweg erhalten zu können, ist nicht immer sehr hoch, da ein derart exaktes Schneiden schwierig ist.

Festzuhalten ist, dass durch diese zweidimensionale Kartierung die Propagation von Feldpotentialen aufgelöst werden kann. Durch deren räumliche Ausprägung werden die ihnen zugrundeliegenden, funktionellen Strukturen in Hippocampusschnitten erkennbar.

6.3. Stimulation der Schaffer Kollateralen

Im nächsten Schritt wird die Dynamik der aktiven Reizweiterleitung in den Schaffer Kollateralen und die anschließende Aktivierung des CA1 studiert. Unterschiedlich starke Stimulationsströme sollen für bessere Unterscheidbarkeit der sich überlagernden Feldpotentiale sorgen. Dazu wurden deren Axonen mit einer Wolframelektrode stimuliert und die Antworten mit dem Chip aufgezeichnet. Mit der Stimulationsfrequenz von 0.1 Hz wurde der Stimulationsstrom von $I_s = -50 \mu\text{A} \dots -225 \mu\text{A}$ (Stimulusdauer 200 μs) eingestellt, um die Schwelle zu ermitteln, ab wann postsynaptisch Aktionspotentiale ausgelöst werden. Deren Summen-APs überlagern als population-Spike (pSpike) die zeitlich längeren (Summen-)EPSPs³.

Um die Feldpotentiale der auch zeitlich verschieden einsetzenden neuronalen Ereignisse (präsyn. AP, EPSP, postsyn. AP) besser sichtbar zu machen, sind die gemessenen Signalamplituden entlang ihrer Ausbreitung farbkodiert gegen die Zeit aufgetragen. Dazu werden die in Abb. 6.2 eingezeichneten Pfade 1 bis 4 entlang der Pyramidenzellen des CA-Bogens betrachtet. Abb. 6.3 enthält die entsprechenden Querschnitte durch die mit dem Sensorarray gemessenen Signale, farbkodiert aufgetragen gegen Position und

³Siehe typische Signalformen im Anhang, Kap. A.1.

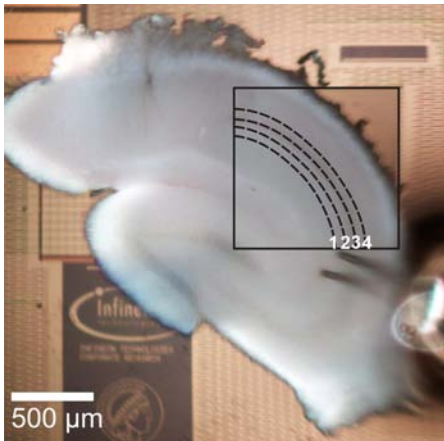


Abbildung 6.2 Hirnschnitt auf dem Sensorarray mit eingezeichneten Pfaden entlang des CA1. Entlang dieser Pfade 1 bis 4 (Stratum radiatum (2 mal), Str. pyramidale und Str. oriens) sind die gemessenen Signalamplituden in Abb. 6.3 farbkodiert gegen die Zeit aufgetragen.

Zeit entlang der Pfade: gezeigt sind jeweils die Fälle knapp unter- und überschwelliger Stimulationsstromstärken $I_s = -75 \mu\text{A}$ und $-100 \mu\text{A}$, sowie ein Fall weit in Sättigung ($I_s = -225 \mu\text{A}$; Pfadorientierung von CA3 nach CA1)⁴.

Die Stimulation erfolgt bei $t = 0 \text{ ms}$; am unteren Rand der Pfade (jeweils nahe Sensor Nr. 0) sind die Signale entsprechend vom Stimulus dominiert. Direkt nach Stimulation läuft ein AP entlang der Schaffer Kollateralen parallel zum CA1. Dies entspricht der sich weiß abzeichnenden Linie in den Messungen bzgl. „Pfad 1“ in Abb. 6.3 (links): an diesen Ort/Zeit-Paaren reflektiert diese durch $\partial V/\partial t < 0$ massiven Ioneneinstrom aufgrund der APs entlang der Axone. Zusammen mit den folgenden EPSPs zeigen die Feldpotentiale in den Querschnitten eine entsprechend klare, konstante Propagation. Die Fortpflanzungsgeschwindigkeit lässt sich auf $v_{\text{fibervolley}} \approx 300 \mu\text{m/ms}$ abschätzen⁵. Dabei wurden die jeweiligen Zeitpunkte für die Orte entlang des Pfades „1“ für die Abschätzung ausgewertet, für die erstmals nach dem Stimulationsartefakt $\partial V/\partial t$ minimal wird. Der mit dieser Methode ermittelte Wert stimmt in etwa mit Werten aus der Literatur überein, die jedoch etwas variieren (ca. $380 \mu\text{m/ms}$ in [Mee 07]; es wird betont, dass die Reizweiterleitung temperaturabhängig ist [All 09]; weiterhin werden $400 \mu\text{m/ms}$, [Alg 84] und $510 \pm 40 \mu\text{m/ms}$ [Fin 93] genannt).

In den oben gezeigten unterschwelligen Antworten (Pfade im Str. rad., $I_s = -75 \mu\text{A}$) sind anschließend lang anhaltende negative (Feld-)EPSPs sichtbar. Sie werden in Richtung Stratum oriens schwächer und kehren dann ihre Polarität um, was auf Ausgleichsströme (am Ort der Pyramidenzellen) schließen lässt. Die relativ schwache Ausprägung im Str. or. liegt vermutlich an einer schwächer werdenden Abdichtung am dortigen Rand des Slices.

Bei zunehmender Reizstromstärke (ab $I_s = -100 \mu\text{A}$) werden postsynaptisch in den

⁴Diese Messungen sind Teil des im nächsten Abschnitt (6.4) vorgestellten Experiments.

⁵Bei 4 Slices mit gleicher Methode: $v_{\text{fibervolley}} = 295 \pm 29 \mu\text{m/ms}$; Die Aufteilung der Punkte entlang des Pfades ist derart, dass der Punkt-Punkt Abstand dem Transistor-Transistor Abstand des Sensorarrays entspricht ($7.8 \mu\text{m}$).

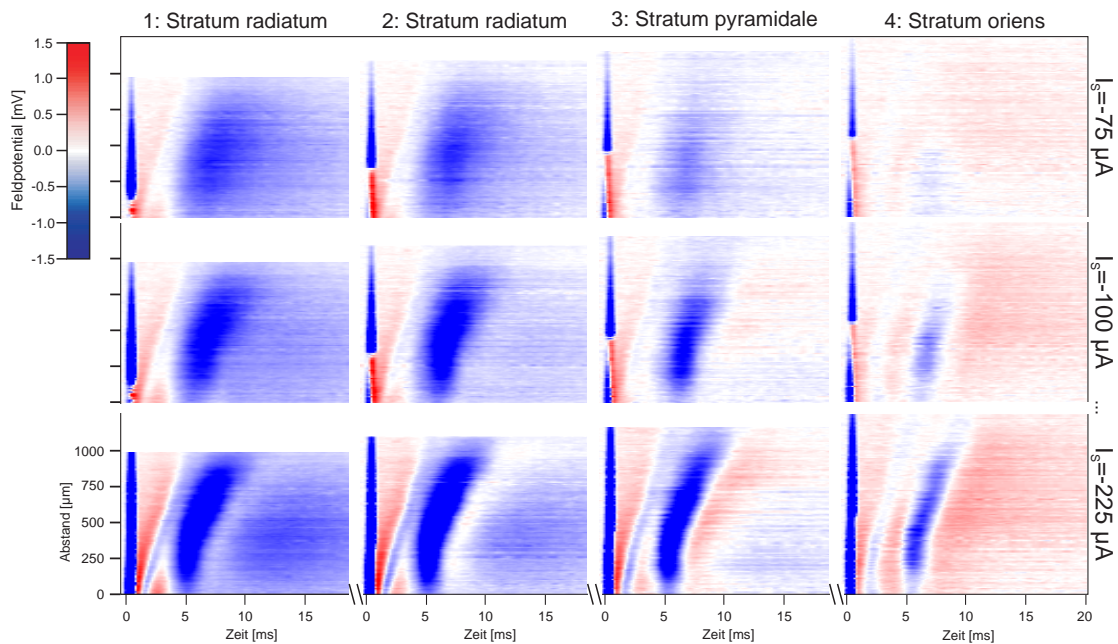


Abbildung 6.3. Querschnitte entlang der in Abb. 6.2 eingezeichneten Pfade 1 bis 4. Für die 4 Strata sind 3 Fälle verschiedener Stimulationsstromstärken gezeigt: knapp unterschwellig, knapp überschwellig sowie weit überschwellig ($I_s = -75 \mu\text{A}$, $-100 \mu\text{A}$ und $-225 \mu\text{A}$). Deutlich zu sehen ist die Ausbreitung des fiber volleys nach Stimulation (ca. erste 4 ms sowie das folgende EPSP (bis $t = 20$ ms; negativ im Str. rad., positiv im Str. oriens). Erst ab $I_s = 100 \mu\text{A}$ wird ein pSpike ausgelöst, der sich im Stratum oriens für $I_s = 225 \mu\text{A}$ klar vom positiven Ausgleichssignal des EPSPs abhebt.

Somata des CA1 APs ausgelöst, deren Ionen-Einwärtsströme im Stratum pyramidale / -oriens die Ausgleichsströme der EPSPs dominieren. Im Str. rad. sind sie wiederum mit umgekehrter Polarität zu sehen, was besonders gut am kurzzeitigen starken An- und Absteigen des Feldpotentials für $I_s = -225 \mu\text{A}$ erkennbar ist.

6.4. Die Schaffer-Kollateralen und die Projektion von CA3-CA1

Da keine zusätzliche Fixierung des Hirnschnitts auf dem Chip (wie z.B. Festkleben) notwendig war, wurde dies ausgenutzt, um nach Verschieben des Slices sequentielle Messungen verschiedener hippocampaler Regionen zu einer Karte zusammenzufügen. Eine regelmäßige Stimulation (sog. Baselinestimulation mit 0.1 Hz) sorgt dabei für die Vermeidung neuronaler Plastizität und triggert die gemessenen Antworten, so dass die 2D-aufgetragenen Feldpotentiale der Einzelmessungen räumlich korrelieren.

Das hier vorgestellte Experiment wurde derart im Zuge voriger Messung (Abb. 6.3) am gleichen Hirnschnitt durchgeführt. Die Stimulation erfolgte wie oben direkt in den

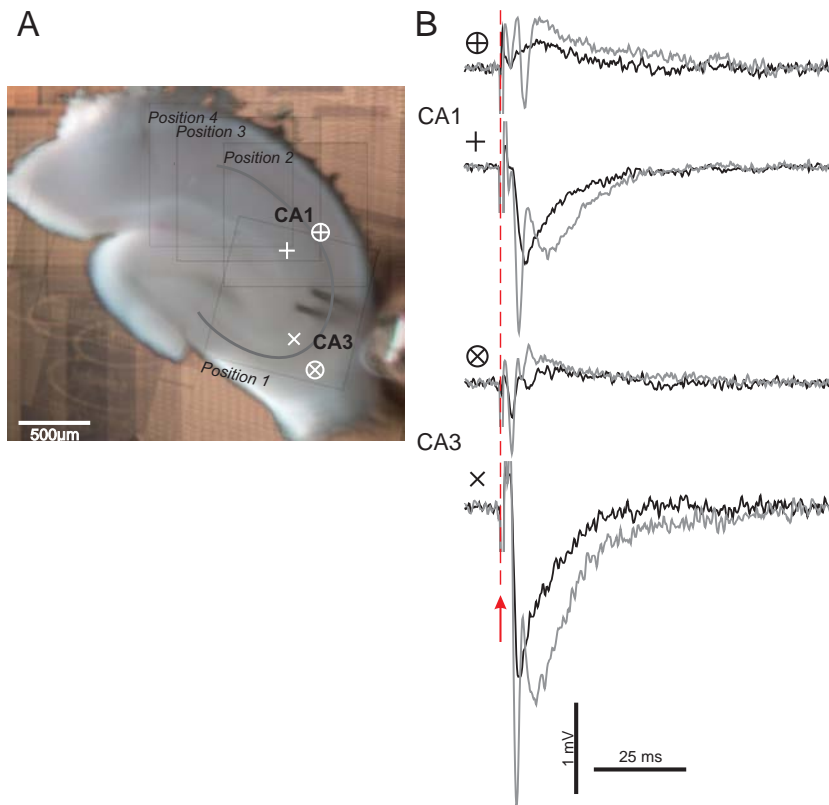


Abbildung 6.4. Mit CMOS-Chip gemessene Feldpotentiale bei unter- sowie überschwelliger Stimulation. **(A)** Das Foto des Hirnschnitts auf dem Chip mit markiertem CA zeigt 4 relative Positionen des CMOS-Arrays nach Verschieben des Schnittes bzgl. Abb. 6.6. Die ausgewählten Transistoren mit ihren Signalen in **(B)** befinden sich im CA3 sowie CA1, jeweils im stratum radiatum bzw. stratum pyramidale (siehe Markierungen). Der Stimulationszeitpunkt (roter Pfeil) ist gleich, angedeutet durch die rote Linie; die Reizstromstärken sind jeweils knapp unterschwellig ($I_s = -75 \mu\text{A}$, grau), bzw. weit überschwellig ($I_s = -225 \mu\text{A}$, in Sättigung, schwarz). (Transienten tiefpassgefiltert bis 1 kHz; Skalenbalken: Feldpotential [mV], Zeit[ms]; Reizartefakt abgeschnitten; Signale in CA1 bzw. CA3 sind aus je einer Chipmessung)

Schaffer Kollateralen nahe dem CA3 (siehe bipolare Elektrode in Abb. 6.4 A bzw. rote Linie und Pfeil in B). Für jede Teilmessung wurde der Stimulationsstrom schrittweise um $25 \mu\text{A}$ bis max. $225 \mu\text{A}$ erhöht⁶. Der Schnitt wurde zwischen den Messungen mit den beiden stabilen Stahlelektroden für die Stimulation verschoben, so dass es (bis auf eine Messposition) zu keiner nennenswerten Verdrehung des Hirnschnitts kam. Zur Rekonstruktion wurden die Fotografien jeder einzelnen Messposition deckungsgleich übereinandergelegt und die relativen Orte des Sensorarrays markiert. Vier dieser Positionen sind in der Fotografie in Fig. 6.4 A abgebildet und überdecken dabei nahezu den gesamten CA-Bogen (durch Markierung hervorgehoben). Die gesamte Messdauer betrug ca.

⁶Für Stahlelektroden sind für eine vergleichbare Stimulation höhere Stromstärken erforderlich als bei Wolframelektroden.

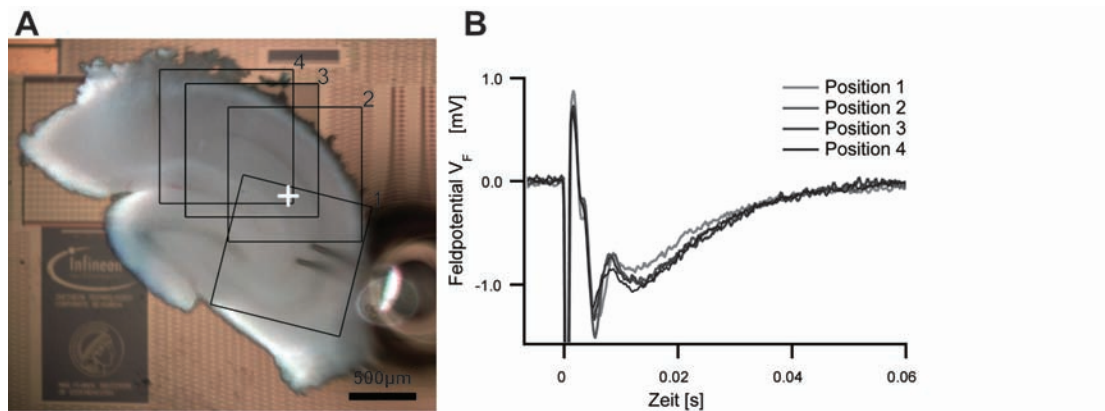


Abbildung 6.5. Näherungsweise Übereinstimmung der Transienten aus den 4 Teilerperimenten von Abb. 6.6. **(A)** Rekonstruktion der 4 Positionen des Sensorarrays mit Markierung eines Messortes (weißes Kreuz). **(B)** Trotz tlw. langer Zeitdifferenzen zwischen den Teilmessungen zeigen die bei der Markierung gemessenen Signale relativ gute Übereinstimmung.

60 min.

Abb. 6.4 B zeigt die Transienten für die Strata pyramidale und -radiatum des CA1 bzw. CA3 aus je einer Chipmessung. Pro Messort (siehe Markierungen) sind die Stimulationsstromstärken je knapp unterschwellig (schwarz, bei $I_s = -75 \mu\text{A}$) bzw. weit über der Schwelle des Auslösens postsynaptischer pSpikes im CA1 (grau, bei $I_s = -225 \mu\text{A}$, Sättigung erreicht). Dieses, hauptsächlich durch synchronen Na-Ionen Einstrom generierte Summenpotential tritt im Str. pyr. des CA1 1.9 ms nach Auslösen des Summen-EPSPs ein, und überlagert als negativer Spike das positive Ausgleichssignal des Summen-EPSPs. Dieses hat eine umgekehrte, positive Polarität im Vergleich zum Str. rad. des CA1, wo es durch dendritischen Ioneneinstrom (wieder v.a. Na-Ionen) ein negatives Vorzeichen aufweist; dort ist es mit dem nun positiven AusgleichspSpikes überlagert. Bei unterschwelliger Stimulation fehlt dieser aufgrund geringerer EPSP-Amplitude.

Zweidimensionale Kartierung Im nächsten Schritt wurden die zweidimensional aufgetragenen, farbkodierten Amplituden pro Zeitpunkt (Einzelframes) der 4 Teilmessungen zu einer Karte neuronaler Aktivitäten zusammengefasst. Dass das Kombinieren der sequentiell durchgeführten Teilmessungen näherungsweise stimmig ist, zeigt Figur 6.5: Für den mit weißem Kreuz in A markierten Messort wurden entsprechend „Position 1–4“ des Slices auf dem Array anhand der Fotos die relativ zum Schnitt befindlichen 4 Transistoren ermittelt. Deren Signale sind in B übereinandergelegt und zeigen in Anbetracht der fotografisch bedingten Ungenauigkeit eine gute Übereinstimmung. Es muss an dieser Stelle betont werden, dass das neuronale Antwortsignal tatsächlich nicht immer gleich geblieben ist. Dies lag an der stets schrittweisen Erhöhung des Stimulationsstroms pro

Messposition und an der langen Zeitdauer des gesamten Experiments; trotzdem fällt die Änderung (z.B. in 6.5 B) nicht sehr groß aus.

Da näherungsweise gleiche Antwortsignale erfolgen, wurden die Signale der Frames jedes Zeitpunktes gemäß der relativen Positionen des Arrays zum Schnitt (siehe Abb. 6.4) farbkodiert und gleich skaliert übereinander aufgetragen. Für das zeitliche Alignment wurde der Stimuluszeitpunkt verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.6 zu sehen: es wurde jeder 5. Frame ausgewertet (bei effektiver Samplingrate von 5744 Hz etwa alle 0.87 ms nach Stimulation), jeweils für obige knapp unter- sowie weit überschwellige Stimulationsstromstärken ($I_s = -75 \mu\text{A}$, blau umrandet, bzw. $I_s = -225 \mu\text{A}$, rot umrandet). Die Lage der Pyramidalschicht des CA-Bogens ist jeweils grau markiert. In dieser Darstellung ist für $I_s = -225 \mu\text{A}$ sehr schön die Ausbreitung des negativen APs in den Schaffer Kollateralen (fiber volley) nahe des Str. pyr. des CA1 Richtung Subiculum zu erkennen; an denselben Stellen wird es unmittelbar von sequentiell ausgelösten EPSPs gefolgt. Für $I_s = -75 \mu\text{A}$ hält dies, typisch für EPSPs, bis zum Schluss an. Die Signale (siehe Abb. 6.4) gleichen sich dabei näherungsweise entlang des CA1, was dessen kolumnenartige Organisation wiedergibt. Dass die Schaffer Kollateralen nicht mittig im Str. rad. verlaufen, ist übrigens nicht ungewöhnlich. In [Ama 07] wird betont, dass sie meist nahe an der Zellschicht des CA1 entlang propagieren und z.T. auch das Stratum oriens kreuzen können.

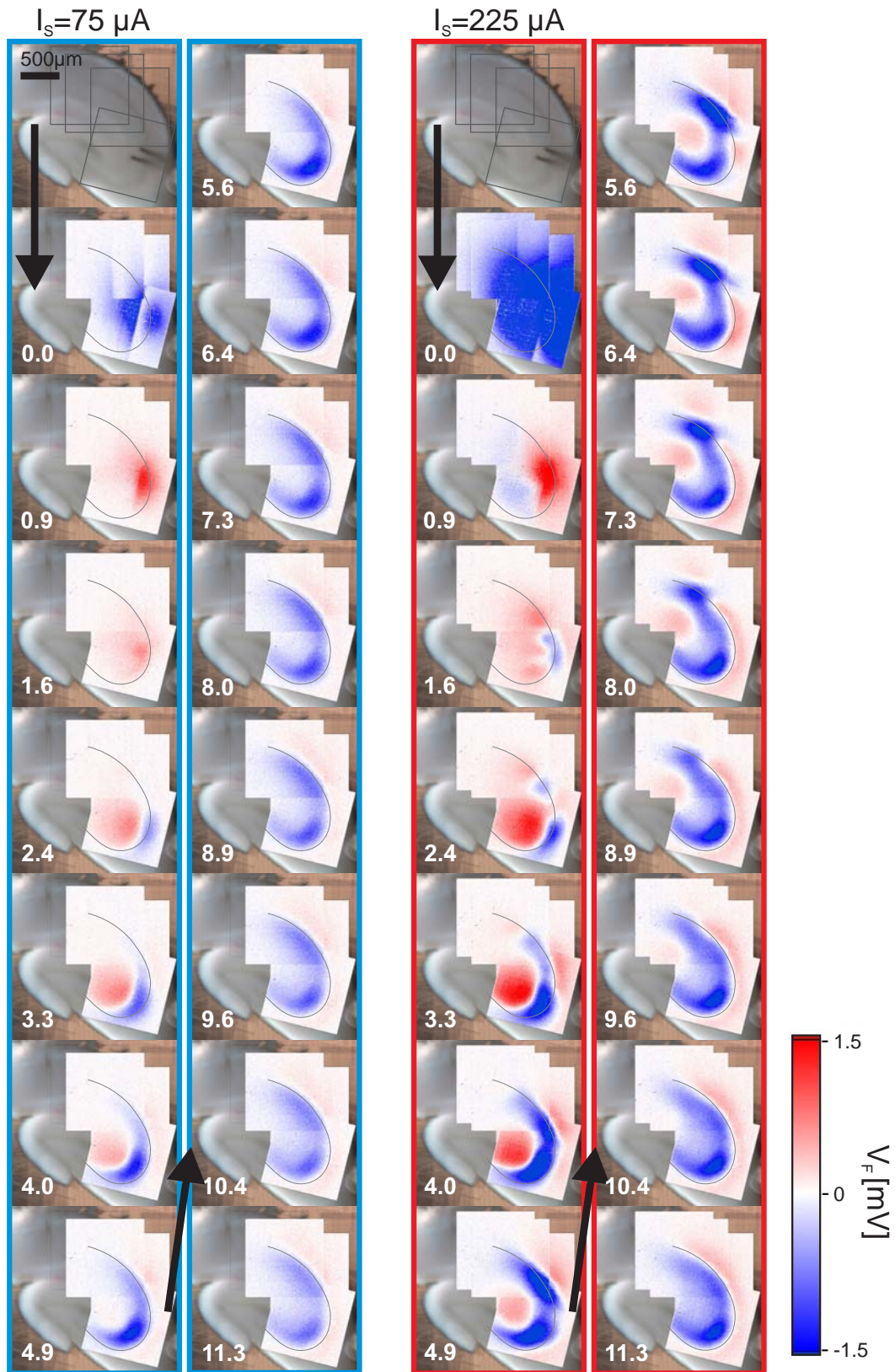
Die je rechten Spalten ($I_s = -225 \mu\text{A}$) zeigen im Unterschied zur linken das postsynaptische Auslösen der pSpikes: anhand der Deformation der CA1-Aktivität erkennbar, propagieren APs im Str. pyr. kolumnenartig ebenso in Richtung Ende-CA1/Subiculum, wie die innerhalb der Kolumne vorgeschalteten fiber volleys und EPSPs. Anhand der räumlich begrenzten postsynaptischen Aktivität ist auch deutlich die funktionelle Grenze des CA1 zum CA3 zu sehen.

Im CA3 sind die Signale komplexer. Es ist zu erwarten, dass die APs in den Schaffer Kollateralen retrograd zum CA3 propagieren. Das lang anhaltende negative Signal in dessen Str. rad. deutet auf Summen-EPSPs hin. Anhand der Transienten in Abb. 6.4 ist zu erkennen, dass es bereits bei $75 \mu\text{A}$ zu pSpikes kommt, die eindeutig nach dem EPSP ausgelöst werden. Es handelt sich also nicht um (massive) retrograde Stimulation.

Die gemessenen Feldpotentialamplituden sind vergleichbar zu den Messungen in Kap. 5. Es ist jedoch auffällig, dass die Signale nahe der Schnittträger kleiner werden, was

Abbildung 6.6. (nächste Seite) Zusammengesetzte Einzelframeansichten von Messungen nach 2 verschieden starken Stimulationspulsen ($I_s = -75 \mu\text{A}$, blau umrandet, sowie $I_s = -225 \mu\text{A}$, rot umrandet). Die jeweils linke Spalte (blau) zeigt eine unterschwellige Stimulation, bei der noch keine postsynaptischen APs ausgelöst wurden. Rechts hingegen der weit überschwellige Fall (Stimulationsstromstärke in Sättigung). Der CA Bogen ist jeweils durch eine graue Linie markiert. Weiß eingezeichnet: Zeit nach Stimulationspuls in ms. Bildfolge ist von links oben nach rechts unten.

6. Kartierung hippocampaler Strukturen mit CMOS-Chips



wohl auf eine schwächer werdende Abdichtung durch den Schnitt schließen lässt.

6.5. Diskussion

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente zeigen, dass eine neuronale Signalausbreitung in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung sichtbar gemacht werden kann. Die farbkodierte Auftragung der Signale entlang der Transistorpositionen im Array ermöglicht eine Art Imaging der neuronalen Antworten: durch systematische Stimulation einzelner Bereiche des Hippocampuschnitts können nachfolgende Verschaltungen sichtbar gemacht werden. Die Messdaten sind dabei im Einklang mit den anatomischen und bisher elektrophysiologisch gewonnenen Daten aus der Literatur. Die Messung neuronaler Feldpotentiale mit dem CMOS-Chip erweist sich also als ideales Instrument, ein Mapping neuronaler Aktivität durchzuführen. Die Messungen zeigen weiterhin im Detail:

- Die Kopplung ist auch auf größerer Längenskala (über 1×1 mm) möglich. Anfängliche Schwierigkeiten bei der Durchführung der CMOS-Experimente durch eine schwache Kopplung waren hauptsächlich in der ungünstigeren Chipoberfläche begründet, in Kombination mit der gleichzeitigen Erfordernis kleiner Hirnschnitte, da der MTA-Chip und die Kammer sehr viel kleiner waren als bei den Eigenbauchips. Dies konnte durch die Weiterentwicklung der Präparationsbedingungen bei zusätzlicher Oberflächenbehandlung des Chips behoben werden.
- Die mit CMOS-Chips gemessenen Signalamplituden besitzen dieselbe Größenordnung wie bei den vergleichenden Experimenten mit Eigenbauchips und Mikropipetten (Kap. 5). Besonders das Experiment in Abschnitt 6.4 zeigt, dass die Schicht inaktiver Zellen bzgl. ihrer Dicke sehr günstig ausfällt: Die Amplituden sind über weite Bereiche sehr hoch, obwohl die Stimulationsströme vergleichbar gering sind.
- Bis jetzt wurde ohne ein Andrücken des Hirnschnitts gearbeitet⁷; die Schnitte liegen wieder lose auf dem Chip auf, was großflächig für eine erfolgreiche Kopplung ausreichend erscheint. Nahe an Hirnschnittträndern (ca. 100 bis 150 μm) befindliche Transistormessungen lassen jedoch vermuten, dass ab dort die Abdichtung schwächer wird. Wie bereits in Kap. 3.3 abgeschätzt, nehmen folglich die Signalamplituden durch den Kontakt mit dem umgebenden Bad ab.
- Da keine aufwändige Fixierung im Sinne eines Aufklebens o. ä. notwendig zu sein scheint, ist ein Verschieben des Schnittes während des Experiments möglich; so konnten z.B. weitere Bereiche des Schnittes abgerastert werden. Die Qualität der gemessenen Signale wurde dadurch nicht durch eine Verschlechterung der Kopplung beeinflusst.

⁷In Kap. 8 muss dies jedoch aufgrund der Strömung hoher Perfusionsraten explizit erfolgen.

7. Raumzeitliche Abbildung Epileptiformer Aktivität

Bisher wurde die Methodik der Kopplung akuter Schnitte an Halbleiterchips theoretisch und experimentell vorgestellt und im letzten Kapitel um die Abbildung neuronaler Strukturen mittels hochauflösenden MTAs erweitert. Nach der Kartierung wichtiger Verschaltungen in Hippocampusschnitten werden nun, in den letzten beiden Kapiteln dieser Arbeit, die Methoden auf komplexere Netzwerkaktivitäten und neuronale Oszillationen angewendet.

Als erstes Modell werden im Folgenden epileptiforme Aktivitäten im Hippocampuschnitt provoziert und untersucht. Dies geschieht entweder durch (i) Stärkung exzitatorischer Synapsen (hier durch Verwendung Mg-freien Mediums) oder (ii) durch Schwächung hemmender Synapsen mittels Bicucullin, mit welchen GABA_A-erge Interneurone auf die Pyramidalzellen projizieren.

Mit Hilfe der großflächigen, zweidimensionalen Messungen mit den CMOS-MTAs gilt es, diese Systeme hinsichtlich einiger Fragen zu untersuchen: Wie stark fallen die Signale im Vergleich zu den bisher gemessenen aus? Gibt es Unterschiede zwischen beiden Methoden (Mg-frei / BIC)? Wie weit breiten sich die epileptiformen Signale aus? Und wie synchron ist dabei die Netzwerkaktivität? Lassen sich Oszillationen lokalisieren?

Die Experimente, die diese Fragen klären sollen, wurden, wie bereits in Abschnitt 6.1 beschrieben, durchgeführt. Im Unterschied dazu wurden zusätzlich epileptiforme Signale ausgelöst, indem die ACSF während des Experiments durch eine ACSF ohne Mg, oder durch eine ACSF mit bestimmten Konzentrationen Bicucullin (BIC) ausgetauscht wurde.

7.1. Messung mit Mg-freiem Medium: Raumzeitliche Kartierung

Experiment Als erstes werden die Messungen mit Mg-freier ACSF gezeigt. Ein Hippocampus-Hirnschnitt einer Maus (p38) wurde nach Kalibrierung des Chips, wie oben beschrieben, in der Kammer auf dem Substrat positioniert. Die Fotografie in Abb. 7.1 A zeigt die relative Position des Sensorarrays sowie die darin eingezeichneten Str. pyr. und -rad. des CA3. Nachdem unter Verwendung normaler ACSF neuronale Aktivität detektiert werden konnte, wurde das Messmedium mit Mg-freier ACSF ersetzt (Perfusionsrate ca. 2 mL/min bei 32 °C; Zusammensetzung der Lösungen: siehe A.4). Die

Stimulationselektrode befand sich weiterhin an der selben Position, wie im Foto zu sehen ist. Nach jeder Stimulation (Stimulationsstrom $I_s = 40 \mu\text{A}$) wurden gleichzeitig die evozierten Potentiale mit dem Chip aufgezeichnet. Die Stimulation erfolgte im Abstand von 10 s. Spätestens nach 10 min änderte sich die neuronale Aktivität: statt der Signale, wie sie in Kap. 6 gezeigt wurden, wurden die Feldpotentiale deutlich länger bei höheren Amplituden, charakteristisch für epileptiforme Feldpotentiale¹.

Ergebnisse Abbildung 7.1 B zeigt gemessene Transistorsignale bzgl. der im Foto (A) eingezeichneten Positionen (Tiefpassfilter bei 1 kHz, zusätzliche räumliche Gaussfilterung). Anhand der Transiente 2 (Str.rad.) ist die typische Signalform epileptiformer Aktivität gut erkennbar: die langanhaltende Signale (sog. *sharp waves*, später mit *Ripples* überlagert, s.u.) sind auf massive EPSP-Aktivität zurückzuführen, wobei die Zeitcharakteristik ca. 5 mal länger ist als bei „normalen“ EPSPs². Die Ursache liegt in der vermehrten Aktivität NMDA-vermittelter Ionenkanäle aufgrund des Mg-Mangels (siehe Kap. 4.1.3). In der Anfangsphase können Interneuronen, die indirekt vermehrt aktiviert werden, noch für ein Gleichgewicht gegenüber den starken EPSPs sorgen; ab ca. $t = 25 \text{ ms}$ nach Stimulation kippt dieses jedoch zugunsten der extrem starken exzitatorischen Aktivität um, was die Krampfphase (schnelles Feuern der CA3 Pyramidenzellen) einleitet.

Die zeitaufgelösten, 2D farbkodiert aufgetragenen Signalamplituden in Abb. 7.1 C (Zeitangaben in ms nach Stimulation) korrespondieren mit den ausgewählten, markierten Zeitpunkten in den Transistorsignalen von Teilabb. B³. Es werden jeweils Signalamplituden aus der Anfangsphase (gelb) und der beginnenden Ripplephase (grün) gezeigt. Die Entwicklung bis zur Ausbildung der schnellen Oszillationen wird anhand der Amplitudenkarten dieser 7 Zeitpunkte qualitativ deutlich:

Nach der Stimulation in den CA3 ($t=0$) werden die Moosfasern sichtbar, entlang derer sich APs retrograd Richtung GD ausbreiten und das Str.mol. des Hilus aktivieren (3.1 ms). Anschließend propagieren, nach Exzitation der CA3 Pyramidenzellen, entlang der Schaffer Kollateralen APs Richtung CA1 (bis 12.2 ms). Zusätzlich werden massiv Interneuronen aktiviert, erkennbar an der dominierenden Hyperpolarisation (positive Signalanteile). In einem kleinen Bereich des CA3 werden die IPSPs jedoch immer mehr von langanhaltenden EPSPs überlagert, was an der lokalen Abschwächung der Hyperpolarisation im Str.rad., bei $t = 12.2 \text{ ms}$ deutlich wird.

An den räumlich 2D-dargestellten Daten ist wieder die funktionale Grenze des CA3 zum CA1 sichtbar: Bei $t = 3.1 \text{ ms}$ können die APs sich nur in den Moosfasern ausbreiten, nicht jedoch in den CA1. Dies erfordert eine zusätzliche Synapsenstufe und geschieht

¹Die Epileptiformen Signale wurden mit Stimulation getriggert, wobei auch spontane Ereignisse gemessen wurden.

²Siehe Signale im Anhang, A.1.

³Ausführliche Darstellung im Anhang A.2.

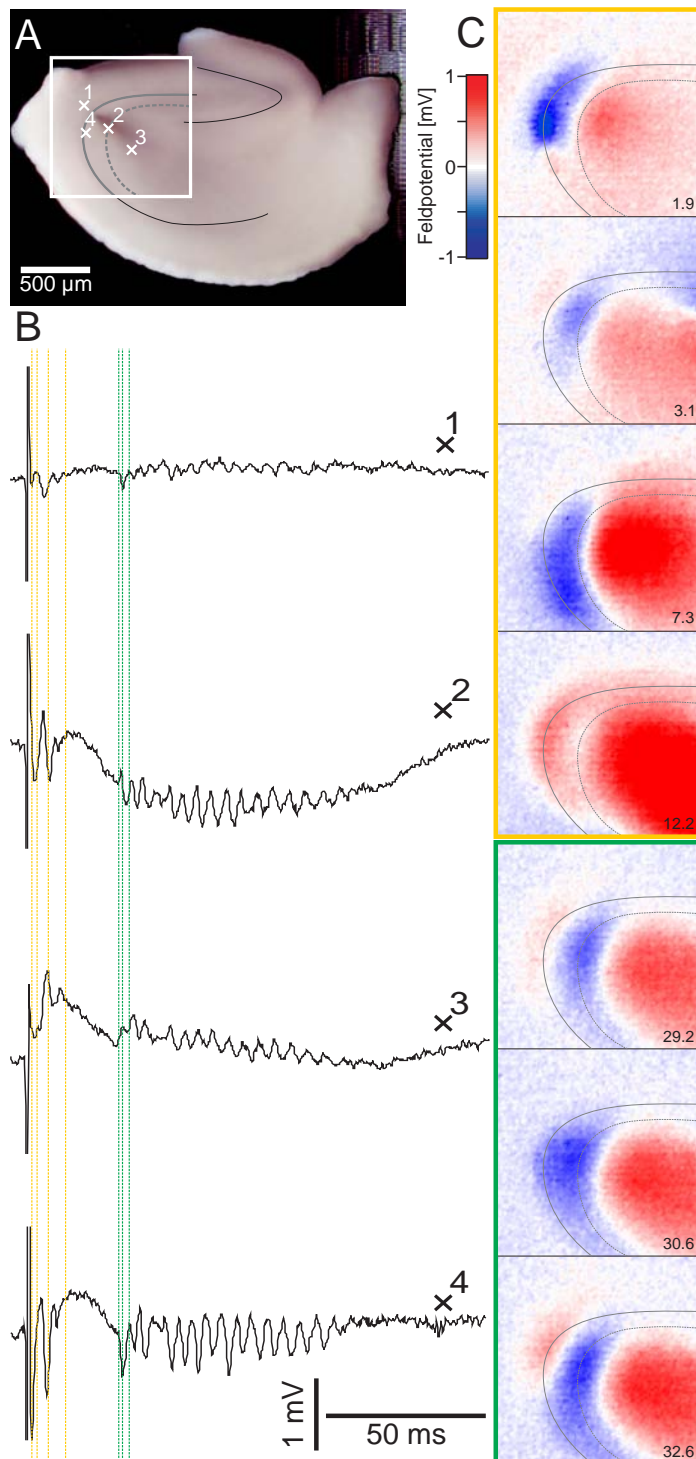


Abbildung 7.1 Epileptiforme Aktivität des CA3 nach Stimulation unter Mg-freier ACSF. **(A)** Bild des Hippocampusslice mit Markierung des Sensorarrays sowie des Stratum pyramidale (grauer, durchgezogen) und -radiatum (grauer, gestrichelt). **(B)** Transistorsignale bzgl. der im Foto eingezeichneten Positionen (1,2,3,4). **(C)** Zeitaufgelöste, farbkodiert dargestellte Signalamplituden des gesamten Arrays für 7 ausgewählte Zeitpunkte (Zeitangaben je in ms nach Stimulation). Die zeitliche Auswahl korrespondiert mit den Markierungen in B (gelb: Anfangsphase; grün: Beginn der Ripple-Oszillationen). Es werden EPSPs im CA3 ausgelöst, die sich erst in Richtung Hilus, dann entlang der Schaffer Kollaterale in Richtung CA1 ausbreiten. In einem kleinen Bereich des Stratum radiatum (CA3) dominieren anschließend EPSPs die starken IPSPs.

erst einige ms später. Der Bereich, in dem sich die EPSPs eng begrenzt gegen die IPSPs durchsetzen (siehe $t = 12.2$ ms), ist folglich dem CA3 zuzuordnen.

Ripple-Oszillationen Bei ca. 30 ms nach Stimulation – unter Normalbedingungen ist ein EPSP längst am abklingen – werden postsynaptisch im Str. pyr. des CA3 nahezu synchron APs ausgelöst werden, die anschließend Richtung CA1 propagieren (siehe frame $t = 32.6$ ms). Dies folgt in ähnlicher Weise mehrmals mit rascher Abfolge. Als direkte Folge der starken EPSPs durch vermehrte NMDA-Aktivität beginnt eine Phase schneller, synchroner Oszillationen, die „Ripples“ genannt werden (z.T. auch interictal spikes), welche die langsamen sharp waves überlagern und „sharp wave-ripple Komplexe“ bilden. Diese Oszillation ist bedingt durch die starke autoassoziative Verschaltung des CA3, gekoppelt mit der hohen Triebkraft der exzitatorischen Synapsen.

Im Str.rad. ist diese Aktivität im Übrigen durch passive Ausgleichsströme anhand der schnellen (hier positiv orientierten) pSpikes besser zu sehen, als im Str.pyr. (siehe Signal x^2 , Fig. 7.1 B). Die Signale bilden in diesem Stadium durch Überlagerung vieler verschiedener Elemente sehr komplexe Feldpotentiale: (i) die extrem ausgeprägten EPSPs der Pyramidenzellen-Dendritenbäume aufgrund der vermehrten NMDA-Kanalaktivität; (ii) die Reihen postsynaptischer APs (die Ripples), welche wiederum (iii) APs entlang der Schaffer Kollateralen quer durch das Str.rad. des CA3 nach sich ziehen bzw. rekurrente Projektionen zurück in Teile des CA3 bilden; weiterhin (iv) werden durch die Aktivität der CA3 Pyramidenzellen Interneurone aktiviert; diese Teilsignale superponieren im extrazellulären Raum zu den gemessenen Feldpotentialen.

Abb. 7.2 A zeigt ein bandpassgefiltertes Teilstück aus der Region des Str.Rad mit Ripples der Frequenz 200 Hz ($f = 201$ Hz bei $df = 6.9$ Hz; Messort bezieht sich auf Markierung x^2 in Abb. 7.1, Filterung 100 bis 1000 Hz). Über alle Messungen wurde entlang 140 ms langer bandpassgefilterter Teilstücke die spektrale Leistungsdichte (PSD, power spectral density) ermittelt und in Teilabb. B dargestellt. Man sieht sehr deutlich, dass - wie oben bereits erwähnt - nach ca. 8 min die sog. Krampfschwelle überschritten ist und sich infolge des Stimulus spontan Ripples um 200 Hz auslösen lassen. Die neuronale Oszillation ist in ihrer Frequenz konstant, lässt aber bzgl. ihrer Amplitude aus ungeklärten Ursachen nach einigen Minuten wieder nach. In Teilabb. C ist das gemittelte Spektrum aller Teilmessungen ab Eintreten der Rippleaktivität abgebildet.

7.2. Synchronität und Lokalisierung der Ripples

Neuronale Dynamik in Signalquerschnitten Die schnellen Oszillationen, die als Ripples bekannt sind und im letzten Abschnitt besprochen wurden, bilden sich sehr charakteristisch entlang des CA3 aus. Um die Oszillationen raum-zeitlich besser in ihrer Dynamik zu studieren, sind in Abb. 7.3 die Signalamplituden der Transistoren in A entlang eines nahezu lotrecht zur Zellschicht verlaufenden Schnitts farbkodiert gegen die

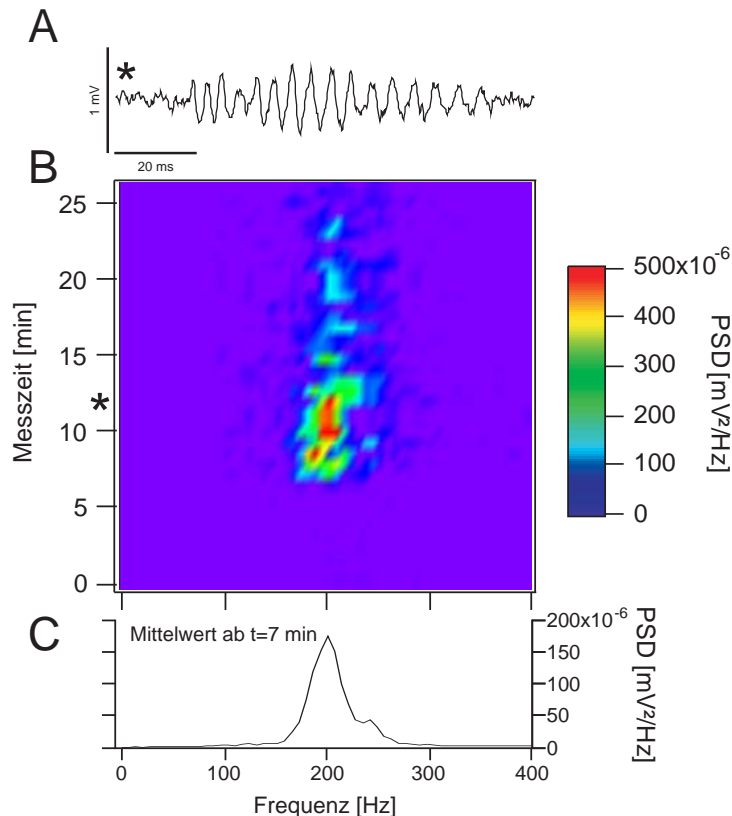


Abbildung 7.2 Ripple Oszillationen im Powerspektrum über alle Teilmessungen.
(A) Bandpassgefiltertes Teilstück mit Ripples (aus Pos x^2 nach Abb. 7.1, 100 Hz bis 1 kHz).
(B) Zeitliche Entwicklung des Spektrums ab Einleiten Mg-freier ACSF (Spektrum über 140 ms lange Teilstücke; Zeit zwischen jeder Messung: 40 s; Samplingrate 5744 Hz; Stern: Messung in A).
(C) Mittelwert über alle Messungen ab Auftreten der Ripples (ab $t = 7$ min).

Zeit aufgetragen⁴. Zugleich ist ein zeitaufgelöstes Transistorsignal an der im Bild markierten Stelle zur besseren Orientierung hinzugefügt. In B werden, der gleichen Methode folgend, Querschnitte entlang zweier Pfade parallel zum CA3 gezeigt (Orientierung vom GD Richtung CA1). Diese 2 Pfade entsprechen den markierten Linien in der Fotografie in Abb. 7.1 A.

Entlang des Querschnitts in A werden ab ca. $t = 30$ ms das Str.pyr. und Str.rad. des CA3 gleichmäßig von den Ripples beherrscht, die sich von den Pyramidenzellen aus wellenförmig ins Innere des CA-Bogens ausbreiten. Dies ist auch in Abb. 7.1 ersichtlich⁵. Das wellenförmige Muster lässt sich erklären durch die verschiedenen, sich im Feldpotential überlagernden Signalkomponenten (s.o.). Bereits im einfachen Fall „normaler“ ACSF (Abschnitt 6) wird eine solche wellenförmige Ausbreitung senkrecht zum CA-Bogen ersichtlich, wenngleich es sich um nur einen Zyklus handelt.

Im Signal-Querschnitt entlang des Str.pyr. (Teilabb. 7.3 B) wird die hohe räumliche Korrelation an den Orten der Somata des CA3 deutlich. Während die APs, die die Ripples bilden, anfangs noch Laufzeitunterschiede innerhalb des CA3 aufweisen (ab ca.

⁴Die zugrundeliegenden Daten beziehen sich wieder auf die Messungen in Abb. 7.1.

⁵Im Übrigen gleichen sich hierin alle Querschnitte senkrecht zum CA3 und zeigen eine gewisse Symmetrie.

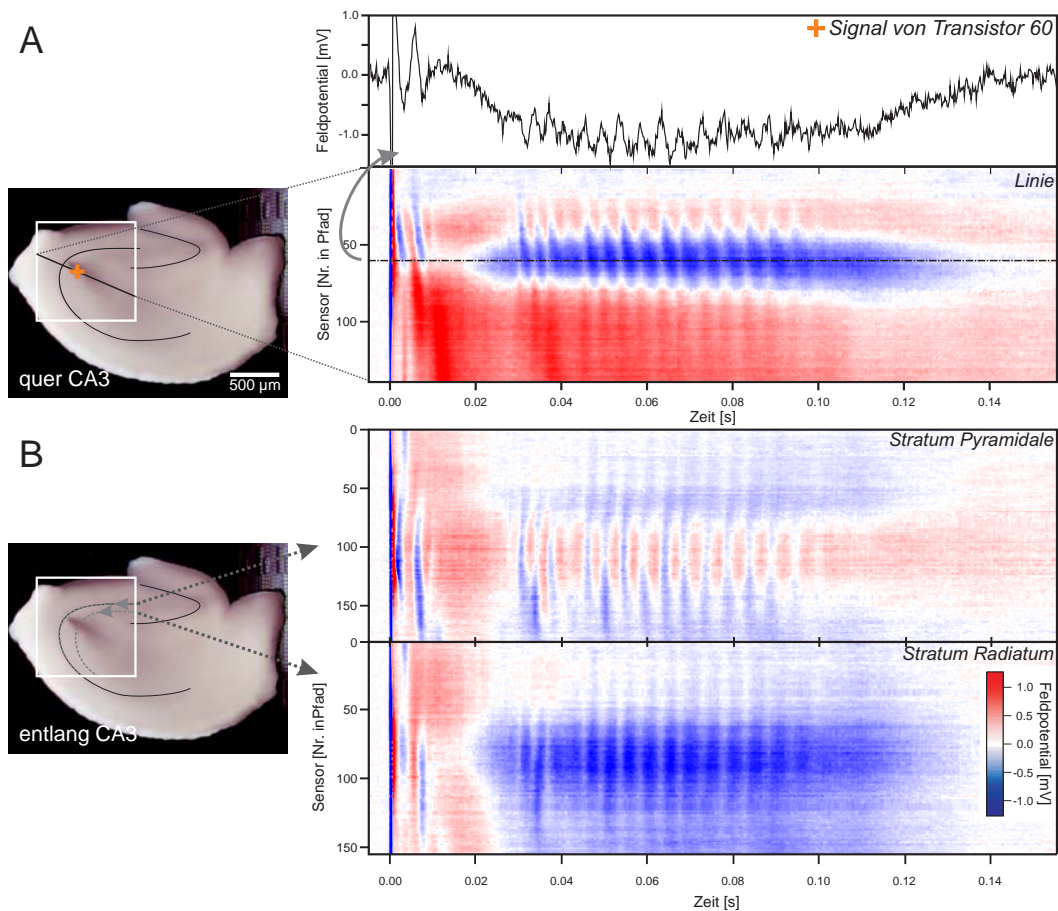


Abbildung 7.3. Synchroner Ripples in der epileptiformen Antwort unter Verwendung Mg-freien Mediums. Ca. 30 ms nach Stimulation beginnende Ripples zeigen Synchronität entlang des CA3-Bogens, bilden jedoch Wellen senkrecht zur Pyramiden-Zellschicht des CA3. **(A)** Schnitt senkrecht zum CA3 Bogen bzgl. Markierung im Foto mit exemplarisches Transistor-signal der markierten Stelle. **(B)** Schnitte parallel des CA3 entlang Str.pyr. sowie Str.rad. Die Daten korrespondieren mit Abb. 7.1.

30 ms nach Stimulation), synchronisieren sie sich in Folge zunehmend, so dass sie ab ca. $t = 45$ ms für einige Zyklen eine stabile Netzwerkoszillation bilden. In einer Vergrößerung lässt sich dabei ein Laufzeitunterschied bzgl. der Ausbreitung der APs von ca. 1.0 ms feststellen. Im Pfad entlang des Str.rad. (Grafik darunter) wird die Oszillation ebenfalls deutlich, da sich hier die (aktiven) extrazellulären Ströme der massiven EPSPs mit (passiven) Ausgleichsströmen der somatischen APs überlagern. Die einzelnen APs der Ripples sind dabei nicht an den Zeitpunkten der Extrema zu suchen, sondern an den Minima im Str.pyr. (aktiver Ioneneinstrom durch pSpikes) bzw. Max. im Str.rad. (passive Ausgleichsströme). Das Str.lac.mol. (ca. Sensor Nr. 75 – 150 im senkrechten Schnitt in A), das von interneuronaler Aktivität beherrscht wird (starke Hyperpolarisation), zeigt ebenfalls hohe Synchronität.

In den Signal-Querschnitten wird auffällig, wo die Ripples in den Feldpotentialen vorherrschen: der Teil des CA3, der dem GD zugewandt ist, erscheint weniger aktiv, ganz anders jedoch der daran anschließende Teil (Transistor Nr. 80 – 140), in dem die Oszillationen am ausgeprägtesten sind. Im unteren Teil des Pfades im Str.pyr. verlieren die Ripples wieder an Amplitude. Dieser Bereich gehört bereits zum CA1: er zeigt eine leicht wellenartige Aktivität weg vom CA3, Richtung entorhinaler Cortex, aufgrund Aktivierung durch den oszillierenden CA3 über die Schaffer Kollateralen. Insgesamt lässt sich anhand der Datenlage die Rippleaktivität in Näherung als eine räumlich kohärente Oszillation beschreiben, die auf die ursprünglich mit „CA2“ und „CA3“ bezeichneten Bereiche des CA lokalisiert werden kann, in denen autoassoziative Projektionen ausgebildet werden. Der CA1 und das ursprünglich mit CA4 bezeichnete Areal nahe dem GD bleiben außen vor.

Kartierung der spektralen Leistungsdichten Um die neuronalen Oszillationen noch genauer zu lokalisieren, bietet es sich aufgrund der hohen zweidimensionalen Auflösung der MTAs an, die Amplitudenverteilung der spektralen Leistungsdichte (PSD) aller Transistoren frequenz aufgelöst zu betrachten⁶.

Erneut bezugnehmend auf die bisher besprochenen Daten wurde für jeden Transistor das Signal Fourier-transformiert (Methode: FFT) und die spektrale Leistungsdichte ermittelt. Dazu wurden nur die Rippleoszillationen anhand 140 ms langer, bandpassgefilterter Teilstücke ausgewertet (0.1 – 1 kHz). Für den Transistor mit dem absoluten Maximum im gesamten Array bei $f_0 = 201$ Hz ist in Abb. 7.4 A dessen Signal, und in B die zugehörige spektrale Leistungsdichte zu sehen. Die Position dieses Transistors ist in C durch die weißen Linien markiert: Dort wurden für alle Transistoren die zugehörigen Amplituden, ihrer Position im Array entsprechend, farbkodiert aufgetragen und mit dem Foto des Hirnschnitts hinterlegt (C; Farbkodierung auf absolutes Maximum normiert). Zusätzlich sind die Zellschichten der Gyrus dentatus und des CA-Bogen hervorgehoben. Analog dazu sind in D die Phasen der Fouriertransformationen entsprechend den Messorten aufgetragen ($\Phi = 0$ entsprechend Markierung des Transistors maximaler Amplitude).

Für die bereits oben beobachtete Extremalstelle im Leistungsspektrum lassen sich die Rippleoszillationen auf einen begrenzten Bereich des CA3 lokalisieren. Die Amplitudenverteilung wird im Str.pyr räumlich maximal und zeigt ein Nebenmaximum im Str.rad., aufgrund von Ausgleichströmen der Pyramidenzellen. Das entspricht auch jener Stelle, in der die EPSPs maximale Aktivität zeigten, wie aus Abb. 7.1 ersichtlich wurde.

Die zugehörigen Phasen lassen auf hohe Synchronität entlang der Pyramidenzellschicht des CA3 schließen. An dessen zum GD-zugewandten Teil – in älterer Literatur als CA4 beschrieben – kommt es zu einer kontinuierlichen Phasenverschiebung. Ein denkbarer Mechanismus wäre eine retrograde Propagation entlang der eng am Str.pyr. verlaufenden Moosfasern. In der Übergangsregion CA3 – CA1 kommt es hingegen zu einem diskontinuierlichen Phasensprung von ca. 110° . Diese Stelle wurde bereits anhand Abb. 7.1 C und 7.3 B als direkte Grenze zum CA1 identifiziert. Eine Erklärung für den Phasensprung ist die Zeitverzögerung durch die Synapsen der Schaltstelle CA3→CA1.

Abschließend sei noch erwähnt, dass für die Synchronisierung der schnellen Oszillationen um 200 Hz dichte, intrinsische Netzwerke unter den Interneuronen verantwortlich gemacht werden. Diese durchziehen zum einen die Bereiche des Stratum oriens, Str.pyr., Str.rad und -lac.mol.; zum andern bilden besonders Basketcells (Korbzellen) in Form von gap junctions und schnellen Parvalbumin-exprimierenden inhibitorischen Synapsen im Str.or. und -pyr. schnelle Verbindungen entlang des CA-Bogens. Gerade über letztere GABA_A-erge Synapsen bildet sich zusammen mit dem rekurrenten CA3-Netzwerk ein System gekoppelter Oszillatoren, welches Synchronität auszubilden vermag. Für ein

⁶Die PSD bietet frequenz aufgelöst im zweidimensionalen Bild mehr Schärfe als die Beträge der Fouriertransformationen.

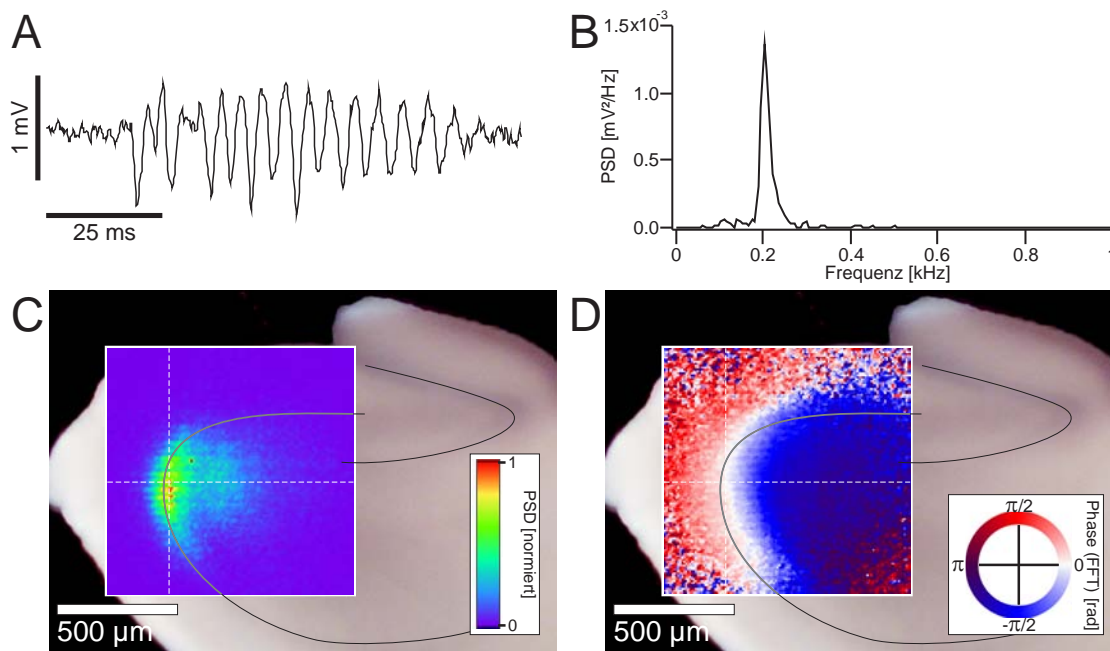


Abbildung 7.4. Kartierung der Rippleschwingungen anhand Spektralanalysen. **(A)** Bandpassgefiltertes Transistorsignal (0.1 bis 1 kHz) einer Rippleschwingung mit **(B)** zugehöriger spektraler Leistungsdichte (gemessenes Signal bzgl. Ort der weißen Markierung in C). **(C)** Die spektralen Leistungsdichten wurden für die maximale Frequenz ($f = 201$ Hz bei $df = 6.9$ Hz) allen Messorten im MTA entsprechend aufgetragen. **(D)** Die zugehörige Phasen aus der Fouriertransformation bei $f = 201$ Hz zeigen Synchronität im CA3 und einen Phasensprung zum CA1 ($\Phi = 0$ für Markierung in C).

tiefergehendes Studium dieser Mechanismen sei auf die Literatur verwiesen⁷, da deren explizites Studium nicht Gegenstand dieser Arbeit sein soll.

7.3. Messung mit Bicucullin

Die zweite Methode, epileptiforme Feldpotentiale auszulösen, stärkt die exzitatorische Triebkraft, indem es durch Blockade $GABA_A$ -erge inhibitorische Synapsen schwächt. Im Experiment wurde dies durch Einleitung von ACSF, welche mit Bicucullin-Methiodid (BIC) versetzt war, erreicht. Die übrigen Rahmenbedingungen blieben gleich.

Abb. 7.5 zeigt analog obiger Diskussion Signalquerschnitte entlang der im Foto eingezeichneten Pfade (Str.pyr., Str.rad., senkrecht CA3), sowie zur Orientierung einzelne ausgewählte Transienten. An diesen fällt die völlig andersartige Signalform im Vergleich zum Mg-freien Fall auf, die jedoch für alle BIC-Experimente typisch war: das Feld-EPSP steigt bereits nach 5 bis 10 ms sehr steil auf hohe Amplituden an, da es nicht durch hohe Hyperpolarisationen überdeckt wird. Es breitet sich entlang des CA3 vom Reizort in beide Richtungen aus (Richtung CA1 sowie GD) und löst gleichermaßen pSpikes im Str.pyr. aus. Aufgrund geringer Hemmung (vermittelt durch das BIC) fällt das EPSP mit ca. 300 ms um eine Größenordnung von 10 mal länger aus als im Fall ohne BIC. Während dieser Phase zeigen die farbkodierten, gegen die Zeit aufgetragenen Signalamplituden in C (v.a. im Str.pyr) einzelne Fluktuationen, die auf postsynaptische Aktivität hindeuten; anders als im Mg-freien Modell vermag sie sich jedoch nicht zu einer Oszillation zu synchronisieren. Das lang anhaltende EPSP wird am Ende von Signalen kürzerer Zeitcharakteristik durchbrochen und klingt dann langsam ab. Anhand der Signalprofile ist ersichtlich, dass diese 2 Ereignisse mit gleicher Geschwindigkeit entlang des CA propagieren, mit $173 \mu\text{m/ms}$ jedoch deutlich langsamer als in den Schaffer Kollateralen. Diese sehr späten Signale wurden mit ein- bis tlw. dreimaliger Wiederholung bei fast allen Messungen beobachtet. Die Laufrichtung ist dabei nicht festgelegt (hier: Grenze CA1 Richtung GD).

Die Gemeinsamkeit mit den Messungen mit Mg-freiem Medium besteht freilich in den extrem langen, stark ausgeprägten EPSPs, die als „sharp waves“ identifiziert wurden; Ursache ist immer das Missgleichgewicht aus starker Exzitation bei mangelnder Inhibition durch Interneurone. Im hier vorliegenden Fall – Blockade der $GABA_A$ -Rezeptoren durch Bicucullin – scheint sich zusätzlich ein Mangel an Synchronität zu zeigen: Dies bezieht sich auf den Unterschied beider studierter Modellsysteme, nämlich das Auftreten der Ripples (bei Mg-freiem Medium), bzw. deren Fehlen bei Anwesenheit von Bicucullin.

⁷Siehe [Man 07], [Bar 07], [McC 01], [Iso 08].

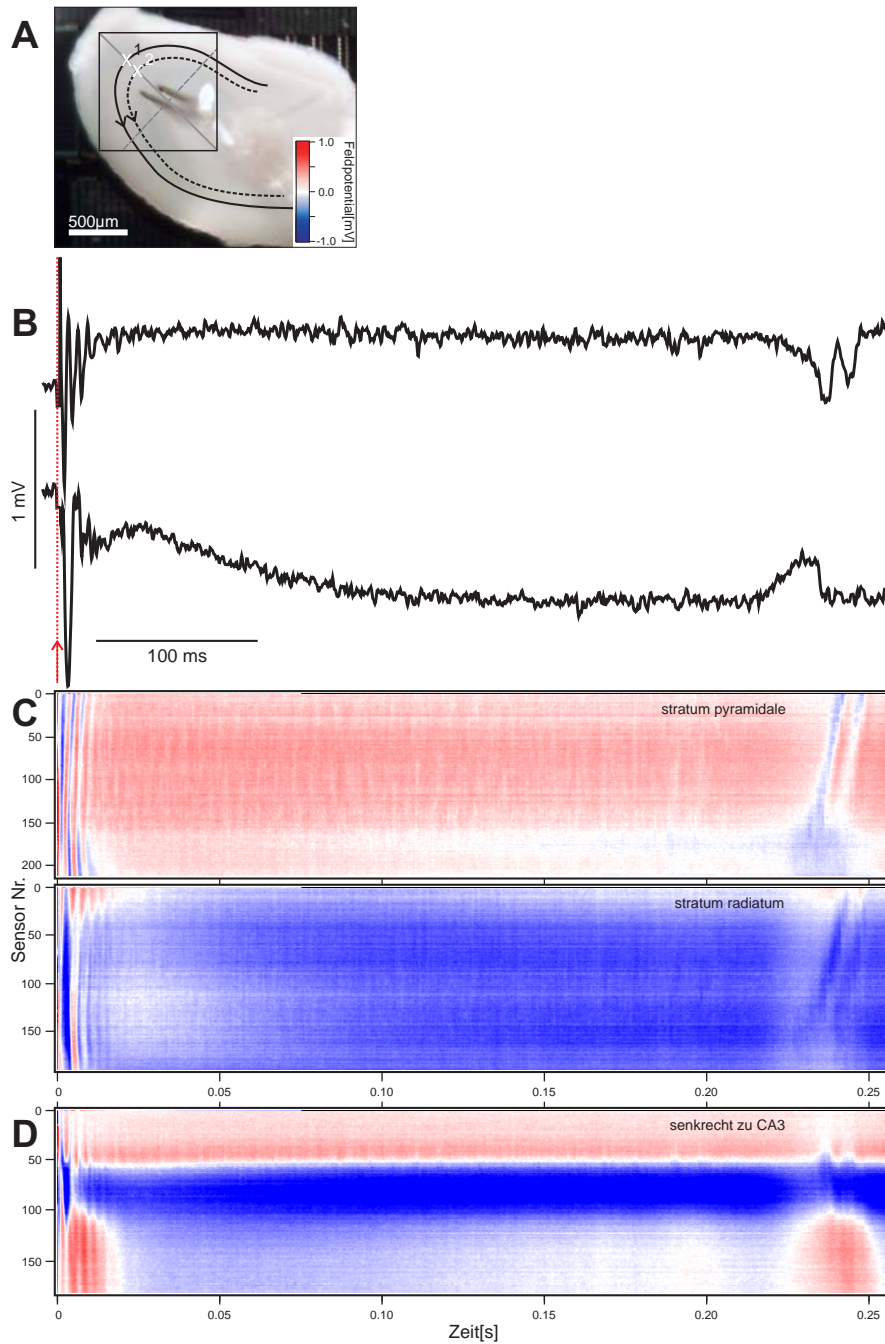


Abbildung 7.5. Signale entlang verschiedener Pfade innerhalb des Sensorarrays. **(A)** Foto des Hirnschnitts mit markierter Fläche des MTA. Die gekennzeichneten Pfade verlaufen parallel zum CA-Bogen (entlang der Zellschicht als schwarze Linie, parallel dazu im Stratum oriens und Stratum radiatum als gestrichelte Linien), sowie senkrecht zu CA1 (graue Gerade, gestrichelt) und CA3 (graue Gerade, durchgezogen). Auf letzterem Pfad sind zusätzlich 4 Messorte farblich gekennzeichnet. **(B)** Transienten hierzu. **(C)** und **(D)** Querschnitte entlang obiger Pfade durch die recordings im Sensorarray. Die Feldpotentiale der einzelnen Messorte sind dabei farblich gegen die Zeit aufgetragen (zeitlich und räumlich gefiltert), entlang Pfaden parallel zur Zellschicht (C), sowie senkrecht dazu (D).

7.4. Diskussion

Die raum-zeitliche Auflösung bei der Messung neuronaler Feldpotentiale wurde in diesem Kapitel auf epileptiforme Signale in Hippocampusschnitten angewendet. Es zeigt sich, dass sich die Methodik besonders für die Abbildung komplexer Netzwerkaktivitäten eignet. Aufgrund evtl. Symmetrien zu benachbarten Messorten (i.e. Pixeln) gewinnen einige Schwankungen innerhalb der Transienten z.T. eine räumliche Bedeutung, die sonst nur mühsam sichtbar gemacht werden könnte. So werden besonders rhythmische Aktivitäten evident, aber auch langsame, singuläre Signale: die Hyperpolarisationen in weiten Teilen des CA3, die oben diskutiert wurden, kommen besonders aufgrund ihrer räumlichen Korrelationen zur Bedeutung.

In der zeitlichen Auflösung der 2D-angeordneten, farbkodierten Signalamplituden ist die neuronale Dynamik im Druck schlecht darstellbar. Deshalb wurden die Signale im Querschnitt entlang ausgewählter Pfade durch das Sensorarray in ihrer raum-zeitlichen Dynamik betrachtet, wodurch komplexe Strukturen der gemessenen Feldpotentiale klarer dargestellt werden können. Besonders die Synchronisation der Ripple-Aktivität im gesamten CA3 bei Mg-freiem Medium ist anhand der Messdaten eindeutig einsichtig. Hinsichtlich ihrer Erklärung ergibt sich mit den Erfahrungen aus der Literatur ein insgesamt schlüssiges Bild.

8. Raumzeitliche Abbildung neuronaler Oszillationen im beta- und gamma-Bereich

In diesem Kapitel werden Netzwerk-Oszillationen im Hippocampuschnitt untersucht, die sich nach chemischer Stimulation anhaltend (persistent) ausbilden. Im Unterschied zu den Messungen der letzten Kapiteln werden diese Signale nicht mehr durch elektrische Stimulation getriggert, sondern alleinig durch Anwendung von Carbachol (CCH) verursacht, das im Hippocampuschnitt für Ausbildung von theta-, beta- und gamma-Rhythmen bekannt ist (Kap. 2.2.2).

Die mit dem CMOS-MTA gemessenen Oszillationen werden hinsichtlich folgender Fragestellungen untersucht: Wie werden die Signale aussehen und welche Dynamik werden die zeitaufgelösten, 2D-kartierten Signalamplituden zeigen? Werden Muster beobachtet, wie sie im „gesunden“ Zustand von Hippocampuschnitten beobachtet wurden, oder ähneln sie jenen, die im epileptiformen Zustand evident wurden? Wie stabil sind die Oszillationen? Sind sie einem charakteristischen Frequenzband zuzuordnen und ist dies evtl. beeinflussbar?

8.1. Messanordnung und Messdurchführung

Die Präparation der 350 µm dicken Schnitte wurde durchgeführt, wie in Kap. 4 beschrieben. Da die Ausbildung spontaner Netzwerkaktivitäten jedoch im Vergleich zu den Experimenten voriger Kapitel besonders schwer zu realisieren war, werden im Folgenden einige Aspekte betont, die zur Verbesserung beitrugen.

Bei der Präparation wurde besonders auf zügiges Arbeiten Wert gelegt. Dauerte die Entnahme des Gehirns (siehe Kap. 4.1.1, incl. kurzem Bad in eisgekühltem Präparationspuffer) länger als 40 s, wurde es verworfen und ein neuer Versuch unternommen. Für die Hirnschnittpräparation mit dem Vibratom wurden nur gerade Teilstücke aus dem ventralen Bereich des Hippocampus verwendet, da diese eher Oszillationen ausbilden sollen als die übrigen [Pap 07]. Die Aufbewahrungskammer, in der die Schnitte gelagert wurden, befand sich stets in einem Brutschrank mit der Temperatur von 32 °C.

Notwendigkeit der Sauerstoffversorgung Für die Etablierung spontaner Netzwerkaktivität ist die Versorgung mit Sauerstoff unabdingbar. In [Huc 08] wurde gezeigt, dass

nach Absenken des Sauerstoffpartialdrucks in der ACSF (Begasung mit Gasgemischen, $O_2 < 70\%$) die evozierten Feldpotentiale, wie sie auch hier in Kap. 6 gemessen wurden, zwar gleich blieben; die Ausbildung robuster Netzwerkoszillationen war jedoch extrem sensitiv auf die Versorgung mit Sauerstoff.

In der Regel werden deshalb Hirnschnittexperimente in der „interfaced-Technik“ durchgeführt, wenn Netzwerkaktivität studiert werden soll (z.B. in [Fis 98]): dabei werden die Schnitte an der Oberfläche der ACSF (incl. Begasung mit Carbogen, 95% O_2 , 5% CO_2) gehalten und zusätzlich von oben mit angefeuchtetem Carbogen begast. Dies sorgt für eine ausreichende Sauerstoffversorgung, um spontane Netzwerkaktivitäten auszubilden.

Aus diesem Grund wurde die Aufbewahrungskammer im Brutschrank auf die *interfaced-Methode* umgerüstet (siehe Kap. 4.1.2). Die größte Schwierigkeit lag jedoch bei der Messanordnung selbst. Die Chipmessungen erfolgten – aufgrund der Mindestmenge des erforderlichen Elektrolyts – stets mit untergetauchte Schnitten und konnten deshalb nicht auf die interfaced-Methode umgerüstet werden (sog. submerged-Messanordnung, die weit verbreitet ist und auch als „Oslo-Kammer“ bekannt ist [Lan 81]). Eine Absenkung des Wasserspiegels, um die Oberfläche des Schnitts mit Luft zu begasen, führte nicht zum Erfolg, da deshalb die Versorgung mit ACSF verschlechtert wird.

Die Lösung brachte eine Kombination aus niedrigem Pegel zusammen mit extrem hoher Durchflussrate der ACSF (3-fach erhöht auf 5 bis 6 mL/min). Da ab 3 mL/min die Schnitte angehoben und z.T. weggeschwemmt wurden, wurde zur Fixierung eine Klammer aus Wolframdrähten gefertigt. Diese wurde zur Isolation mit Epoxy-Harz beschichtet, welches auch zur Isolation der Stimulationselektroden verwendet wird (siehe Abb. 4.10, S. 57, in Kap. 4.4.2). Durch eine Biegung am Ende der Drähte mit großem Radius wurde für ein gleichmäßiges Andrücken gesorgt. Die im Experiment verwendeten Medien wurden in einem Wasserbad auf 40 °C vorgewärmt, die Temperatur in der Chipkammer betrug stets 32 °C. Wegen des nun hohen Verbrauchs wurde das Medium im Kreis gepumpt und wiederverwendet.

Messung Im Experiment wurde ein Schnitt nach Kalibrierung des Chips in dessen Kammer gegeben. Nach Zugabe des Mediums über das Perfusionssystem wurde der Pegel des Elektrolyts in der Kammer mit einem Absaugsystem, das an einem Manipulator befestigt war, möglichst niedrig eingestellt. Vor Erhöhung der Perfusionsrate wurde die Klammer positioniert, die den Schnitt fixierte. Diese wurde ebenso mit einem Manipulator bewegt, so dass der Schnitt möglichst schonend, um max. 10 μm festgedrückt werden konnte. Anschließend wurde die Perfusion auf ca. 5 bis 6 mL/min eingestellt. Bei diesen Raten kam es z.T. bereits zu einem Flattern der Schnittträger, was durch geeignete Positionierung von Zulauf- und Absaugschlauch vermieden werden konnte. Über der Kammer wurde zusätzlich ein Schlauch montiert, aus dem Carbogen auf das Medium strömte. Danach wurde eine Regenerationszeit von mindestens 20 min für den Hirnschnitt eingeplant, bevor mit einem Experiment begonnen wurde.

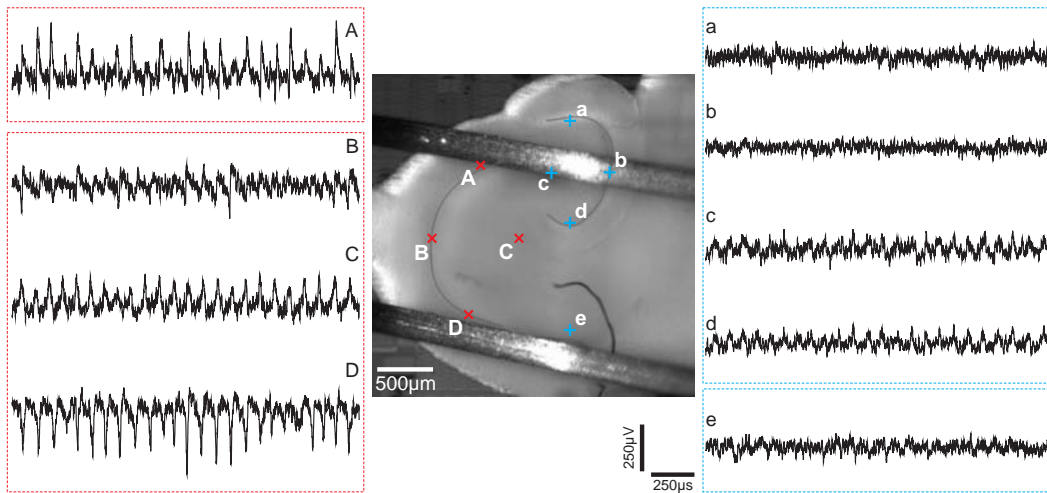


Abbildung 8.1. Oszillationen in Feldpotentialen nach Zugabe von 25 μm Carbachol. Der Schnitt wurde für verschiedene Messpositionen mit der Halteklammer (siehe Teilstücke der Drähte) verschoben, so dass eine Abrasterung größerer Hirnschnittbereiche durch das Sensorarray des MTA möglich war. Zeitgleiche Messungen sind: (B,C,D) und (a,b,c,d); Einzelmessungen: (A), (e) (Messzeit je 2 s).

Zunächst wurden Messungen mit normalem Medium durchgeführt, die nie eine auffällige spontane Aktivität zeigten¹. Die Messzeiten betragen immer 2 s bis maximal mögliche 10 s bei einer Abtastfrequenz von – je nach Messdauer und entsprechender Speicherbelastung – 4069 oder 5744 Hz². Für die Applikation von Carbachol (CCH) wurden für 500 mL Einheiten ACSF mit den gewünschten Konzentrationen versetzt und anstatt der reinen ACSF in das Perfusionssystem eingeleitet. Da mit äußerst schwachen oszillatorischen Signalen – laut Literatur im Bereich von 10 bis 70 Hz – gerechnet wurde, sind alle hier vorgestellten Ergebnisse im Zuge der Auswertung neben räumlichem Gaußfilter zusätzlich mit 300 Hz tiefpassgefiltert. Da der Hirnschnitt mit der Manipulator-betriebenen Klammer nur leicht angedrückt wurde, konnte er damit wie beim Experiment in Kap. 6.4 bewegt werden. Auf diese Weise war es möglich, mit der 1x1 mm²-großen Sensorfläche weite Teile des Hippocampuschnitts abzurastern.

8.2. Synchrone Oszillationen im CA3 und CA1

Im hier vorgestellten Experiment wurden bereits ca. 5 min nach Applikation von CCH (25 μm) neuronale Oszillationen beobachtet. Bereits oben vorgestellten Kartierungsmethoden entsprechend, werden im Folgenden diese Netzwerkaktivitäten bezüglich ihrer raum-zeitlichen Ausprägung charakterisiert.

¹Daten hier nicht explizit aufgeführt.

²Lange Messdauern gingen systembedingt auf Kosten sehr viel längerer Wartezeiten zwischen den einzelnen Messungen (für 10 s: ca. 3 min).

Abb. 8.1 zeigt gemessene Transistor-Signale an ausgewählten Orten (Samplingrate: 5744 Hz). Diesen liegen verschiedene Messpositionen des Sensorarrays relativ zum Schnitt zugrunde, so dass nur die Signale der Orte (B,C,D) simultan gemessen sind, ebenso wie (a, b, c, d). Die Feldpotentiale zeigen Oszillationen, deren Form mit CCH-evozierten, oszillierenden Feldpotentialen aus der Literatur übereinstimmen (siehe Abb. 2.4, Kap. 2.2). Auch die gemessenen maximalen Signalamplituden betragen mindestens 50% derer in Abb. 2.4; sie erfüllen damit erneut größenordnungsgemäß die Erwartungen aus den Abschätzungen von Kap. 3.3.

Es ist auffällig, dass die Signale in verschiedenen Arealen unterschiedlich groß ausgeprägt sind: in den Bereichen des CA, die dem GD zugewandt sind (Position A in Abb. 8.1), sowie denen, die an den CA1 angrenzen (Pos. D), sind sie am größten, während es dazwischen einen leichten Einbruch gibt. Im CA1 selbst (e) sind sie nur noch schwach ausgeprägt, ebenso wie in Teilen des GD, die nahe an den Moosfasern liegen (c, d). In übrigen Teilen des GD (a, b) sind die Oszillationen praktisch abgeklungen. In Abschnitt 8.3 wird die ortsabhängige Ausprägung durch geeignete Methoden näher untersucht.

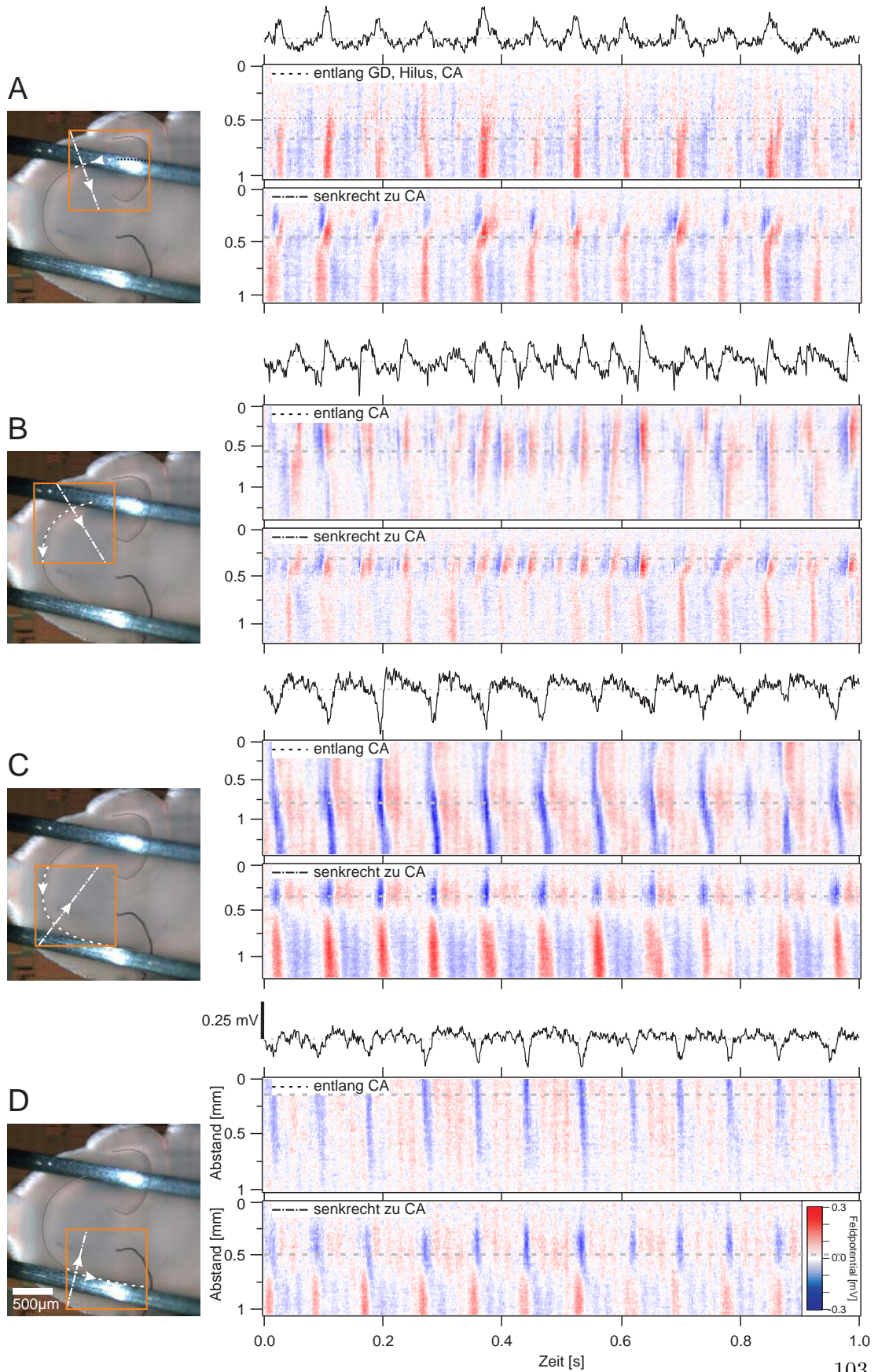
Signalprofile Entlang der Kolumnen senkrecht zur CA-Zellschicht³ kommt es wieder zu wechselseitigen Ausgleichsströmen, wie sie bereits in Kap. 6 offenkundig wurden. Dies ist bereits an der unterschiedlichen Polarität der Signale bzgl. Pos. C und D von Abb. 8.1 erkennbar. Die Erfahrung aus Kap 7 zeigt, dass Feldpotentiale bei Netzwerkaktivitäten ein entsprechend komplexes Muster zeigen, da sie sich aus vielen Teilkomponenten zusammensetzen. Diese stammen oft von unterschiedlichen neuronalen Ereignissen, die zeitgleich stattfinden. Entsprechend werden im Folgenden zeitaufgelöste Signalprofile entlang bestimmter Pfade betrachtet, um die Signale besser verstehen zu können.

In Abb. 8.2 A–D sind für 4 verschiedene Positionen des Sensorarrays gemessene Signalprofile farbkodiert gegen die Zeit aufgetragen. Die jeweils angefügten Fotos enthalten Markierungen der Position des Sensorarrays und der Pfade, die entlang des CA sowie

³Entlang Stratum pyramidale bzw. Str. radiatum und Str. lacunosum moleculare.

Abbildung 8.2. (nächste Seite) Querschnitte entlang je zweier Pfade bei 4 verschiedenen Positionen des Arrays nach Zugabe von 25 μm Carbachol. **(A – D), links:** Der Hirnschnitt wurde für jede Messposition entlang des CA Bogens verschoben. Die Fotografien zeigen die markierten Positionen des Sensorarrays relativ zum Schnitt. Es sind jeweils 2 Pfade eingezeichnet: entlang des CA, sowie senkrecht dazu vom Stratum oriens über Str. pyramidale zum Str. radiatum. Die Orientierung entlang des CA ist stets von GD über CA3, hin zu CA1. **(A – D), rechts:** Querschnitte gemessener Feldpotentiale entlang gekennzeichneter Pfade, aufgetragen gegen die Zeit (Farbkodierung der Signale jeweils ± 0.3 mV). Die grau gestrichelten Linien markieren jeweils die Kreuzungspunkte beider Pfade, deren Signalausschnitte zusätzlich gezeigt sind (dort Nullpunktmarkierungen durch gestrichelte Linien; Skalierungen: siehe Maßstab in D, 0.25 mV).

8.2. Synchrone Oszillationen im CA3 und CA1



senkrecht dazu verlaufen. Die 2 zugehörigen Signalprofile in A, B, C und D sind stets einem gemeinsamen Datensatz entnommen und korrespondieren einander zeitlich. Die gezeigten Signale beziehen sich auf den Kreuzungspunkt beider Pfade, der in den Signalprofilen jeweils durch die grau gestrichelte Linie markiert ist. Pro Position wurden mindestens 2 bis 4 s lange Messungen vorgenommen; die Gesamtzeit des Experiments betrug ca. 30 min.

In Teilabb. **A** wird ersichtlich, dass im ersten Teil der Strecke – von den Körnerzellen des GD bis zum Hilus – die Signale extrem schwach ausgeprägt sind; das anschließende, dem GD zugewandte äußerste Ende des CA⁴, weist dagegen Signale mit hoher Synchronität auf. Die einzelnen Zyklen entlang dieses Streckenabschnitts sind jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Der senkrechte Schnitt zeigt ein komplexes Muster, das zwei wesentliche Merkmale aufweist: (i) ein im Str.or. bzw. Str.pyr. liegender Signalanteil korrespondiert mit dem des darunter liegenden Str.rad. im Sinne synchroner Quellstromsenken und -quellen (sink-source pairs); (ii) im Bereich der Übergangsregion der Polarität (Region mit $V_F = 0$, ca. bei Transistor Nummer 50) findet eine Überlagerung mit einem positiven, von außen nach innen laufenden Signalanteil statt. Dieser kann wiederum identifiziert werden mit den schnellen, positiven Signalen, die, wie eben erwähnt, synchron entlang der CA3-Zellschicht auftreten. Beide Signalanteile müssen an unterschiedlichen Stellen der Kolumne entstehen.

In **B** zeigt sich eine ähnliche Situation, wenngleich die Oszillationsfrequenz erhöht ist⁵. Zusätzlich kann eine interessante Beobachtung gemacht werden: einige Zyklen verlaufen synchron über den gesamten CA-Bogen, während einige sich auf den Bereich des CA beschränken, der bereits in A abgebildet war; dieser entspricht in etwa der ersten Hälfte des Pfades in B. Im Schnitt senkrecht dazu finden sich nur z.T. von außen nach innen laufende Signale, obwohl die Pfade ähnlich sind; insgesamt scheinen sich 2 verschiedene Oszillationen zu überlagern.

In **C** zeigen sich die Signale synchron in der ersten Hälfte des Pfades entlang des CA. Ab dann folgt eine Ausbreitung Richtung CA1. Es ist anzumerken, dass ab dieser Stelle, an der sich auch der Schnitt senkrecht zum CA befindet, sich in etwa auch Grenze zum CA1 lokalisieren lässt. Die Phasenverschiebung wird von der Projektion des CA3 zum CA1 verursacht, der diesen in der Oszillation mit antreibt (siehe unten, Diskussion).

Die Bereiche des abgebildeten Str.pyr. in **D** liegen nun im CA1. Dort zeigt sich wieder synchrone Aktivität, die Richtung Subiculum schwächer wird. Da sich über dieser Stelle die fixierende Klammer befand, kann das Abklingen nicht an einer schwächer werdenden Kopplung liegen. Weiter außerhalb liegende Bereiche zeigten keine nennenswerten Aktivitäten mehr (hier nicht gezeigt).

⁴Im Foto weiß markiert, im Profil ab ca. 0.5 mm.

⁵Zeitliche Differenz zwischen A und B: 6 min.

8.3. Kartierung der Oszillation durch räumliche Verteilung spektraler Leistungsdichten

Amplituden und Phasen Die eben diskutierten Messergebnisse zeigen, dass sich bei den CCH-evozierten Oszillationen verschiedene Signalanteile unterschiedlicher Frequenz überlagern und damit wellenförmige Muster verursachen scheinen. Die Frequenz bleibt nicht stabil.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Transistorsignale mittels DFT (Methode: FFT) Fourier-transformiert. Daraus wurden (i) Spektren der Leistungsdichte (PSD, power spectral density) für jeden Pixel gebildet. Die hohe Ortsauflösung der MTAs erlaubt, anschließend die Amplituden der Leistungsdichten entsprechend dem Pixelort im Array frequenz aufgelöst aufzutragen; analog zu Kap. 7.2 bietet dies eine Kartierung der gemessenen Oszillationen in ihren zweidimensionalen Ausprägungen. Ebenso wurde (ii) mit den Phasen aus der diskreten Fouriertransformation für die jeweils betrachteten Frequenzen verfahren.

In Abbildung 8.3 wurde dies für 2 Array-Positionen des vorigen Experiments⁶ durchgeführt: einmal für den dem GD-zugewandten Teil des CA3 (Teilabb. A–C) sowie für den Übergangsregion CA3/CA1 (D–F). In den Fotos (A, D) sind neben den Positionen des Sensorarrays die Orte dreier Transistoren markiert, deren Spektren in B und E gezeigt sind. Neben den Hauptmaxima und deren höheren harmonischen Ordnungen finden sich zusätzliche eng benachbarte Maxima.

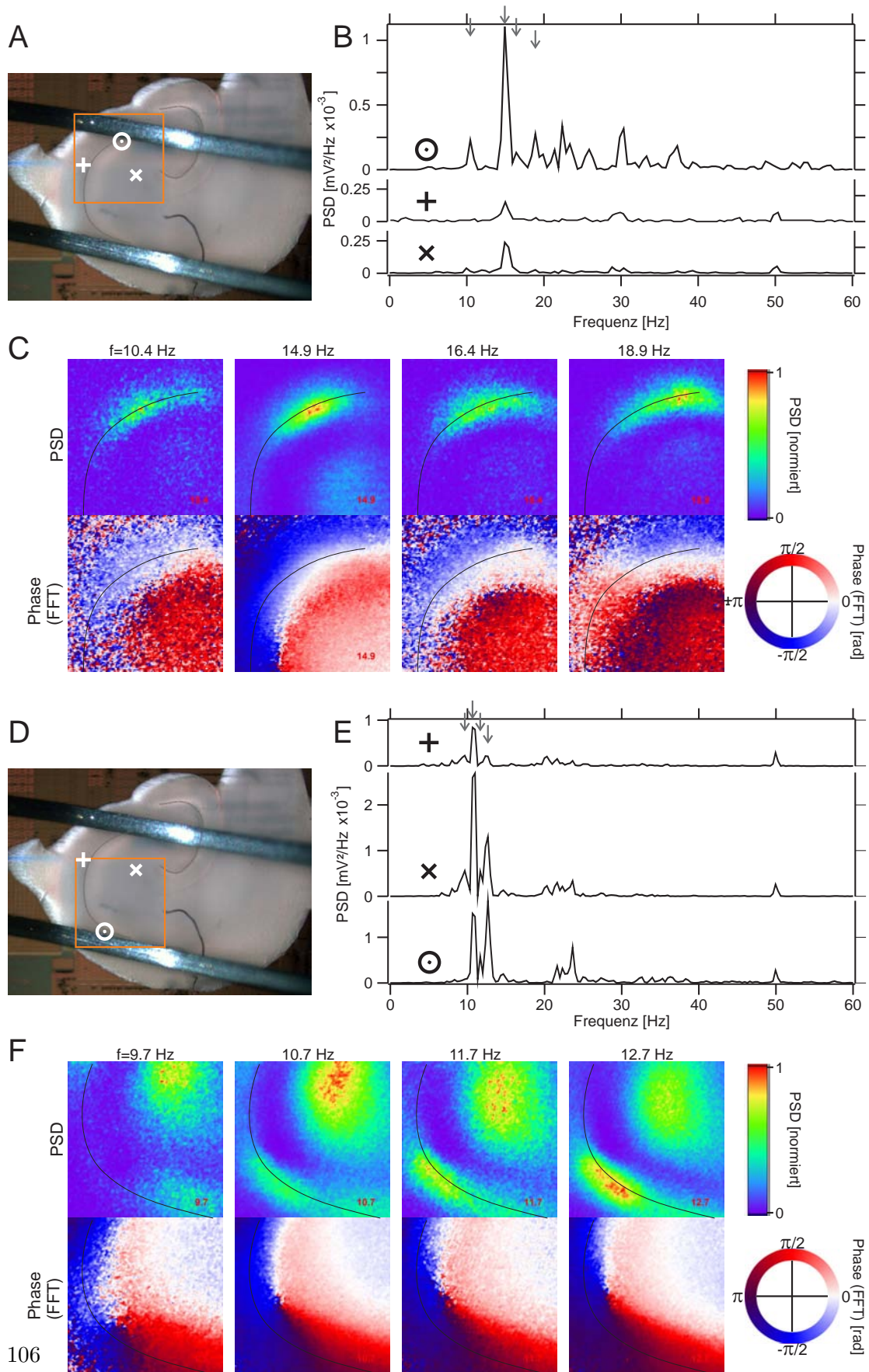
Für je 4 dieser Maximalstellen (keine höhere harmonische Ordnung) sind in den Teilabb. C bzw. F frequenz aufgelöst die 2D-aufgetragenen spektralen Leistungsdichten und die zugehörigen Phasenwinkel zu sehen⁷. Die Kartierungen der spektralen Leistungsdichten sind für jeden Pixel in Spektralfarben kodiert und bzgl. der Skalierungen stets auf die jeweiligen Amplitudenmaxima normiert (max. Amplitudenwerte nicht explizit aufgeführt). Darunter befinden sich die Phasen aus den Fouriertransformationen. Die Winkel wurden im Phasenraum derart gedreht, dass die Transistoren mit maximaler

⁶Es handelt sich um dieselben Datensätze, denen auch Abb. 8.2 B und C zugrunde liegen.

⁷Mit höheren harmonischen Ordnungen ($n=2, 3$) ausführlicher im Anhang, Kap. A.2.4, Abb. A.7 und A.8 auf S. 126,f.

Abbildung 8.3. (nächste Seite) Kartierung der spektralen Leistungsdichten (PSD) und zugehörigen relativen Phasen für benachbarte Extremstellen im Spektrum. Messung I: **(A)** Foto mit markierter Position des Sensorarrays. Entsprechend der 3 Markierungen (weiß) zeigt **(B)** die zugehörigen spektralen Leistungsdichten. **(C)** Kartierung der spektralen Leistungsdichte-Amplituden und deren Phasen entlang des gesamten Sensorarrays, aufgelöst nach 4 eng benachbarte Frequenzen mit lokalen Maxima. Analog dazu Ergebnisse für Messung II nach Verschieben des Schnitts **(D,E,F)**. Die in A und B mit X gekennzeichneten Transistoren entsprechen derselben Messposition relativ zum Hirnschnitt.

8. Neuronale Oszillationen im beta- und gamma-Bereich



spektraler Leistung den Wert $\Phi = 0$ aufweisen (A–C: für Transistor bzgl. Markierung mit Kreis; D–F: für Transistor bzgl. Markierung mit Kreuz). Für schwächer ausgeprägte Maximalstellen im Spektrum ist dies nicht immer eindeutig, da sich durch das schwächere Signal-Rausch Verhältnis eine entsprechend schlechte Phasenauflösung ergibt. In allen Karten wurde die Lage des CA-Bogens markiert (schwarz gestrichelte Linien). Im übrigen ist anhand der Amplitudenverteilungen erkennbar, dass die Klammer, die den Schnitt fixiert, offensichtlich keinen Einfluss hinsichtlich des Andrückens ausübt.

Übergangsbereich CA4/CA3 Bzgl. der Messung **A–C** zeigt sich für das Hauptmaximum bei $f = 14.9$ Hz eine scharfe Verteilung entlang des äußersten Endes des CA3 (in früherer Literatur: „CA4“): die maximale Ausprägung liegt im Bereich der Pyramidenzellkörper (Str.pyr.). An den weiteren, sich im Spektrum abzeichnenden Maximalstellen finden sich ähnliche, jedoch räumlich leicht verschobene Ausprägungen mit deutlich geringeren spektralen Leistungsdichten (Farbkodierung je auf Maximum pro Bild skaliert), wie z.B. für $f = 18.9$ Hz (4. Spalte).

In der Nähe der Dendritenregion, dem Str.rad., befindet sich im Stratum lacunosum moleculare (Str.lac.mol., Innenseite des CA3), eine weitere räumlich ausgeprägte Oszillation, deren Phase um 30° verschoben ist. Es handelt sich somit nicht um „source-sink pairs“, wie sie z.B. typischerweise bei EPSPs zwischen Str.rad. und -pyr. des CA1 vorherrschen. Das Str.lac.mol. ist stark durchdrungen von dicht vernetzten Interneuronen. Da darüber hinaus auch an einer benachbarten MTA-Messposition sowohl das (näherungsweise) gleiche Muster als auch derselbe Phasenversatz gefunden wurde⁸, deutet dies darauf hin, dass die Region vom darüber liegenden Str.pyr. angetrieben wird.

Anhand der Phasen Kartierung lassen sich die Orte synchroner Oszillationen ablesen. Für das Hauptmaximum ($f = 14.9$ Hz) liegen diese eindeutig entlang der pyramidalen Zellkörper. Auch für die anderen (spektralen) Maximalstellen zeigen sich an diesen Orten maximaler Ausprägung stationäre Oszillationen. Die Literatur beschreibt die CCH-induzierte Aktivität als eine Feldoszillation durch gekoppelte Oszillatoren, die durch Pyramidenzellen und Korbzellen gebildet werden (siehe Kap. 2.2.2). Da diese auf das Str.pyr. zu beschränkt sind, liefern die vorliegenden Daten ein dazu stimmiges Bild.

Die synchrone Oszillation ist jedoch beschränkt auf den Teil des CA3, der dem GD zugewandt ist („CA4“). Zum unteren Ende des Sensorarrays hin, entlang des CA, verschieben sich die Phasen relativ zum Amplitudenmaximum kontinuierlich, bis ein diskontinuierlicher Phasensprung sichtbar wird: Dort, nahe dem CA1, findet sich diesmal zwischen Str.pyr. und Str.rad. ein Phasenversatz von 180° , der auf source-sink pairs hinweist. Da parallel zu diesem Teil des CA die Axone der Mossfasern verlaufen, ist denkbar, dass die kontinuierliche Phasenverschiebung durch Propagation entlang dieser Axonbündel (mit anschließender Anregung der dort Synapsen bildenden Pyramidenzellen des CA3) verursacht wird.

⁸Bei $f = 14.7$ Hz; Daten hier nicht explizit gezeigt.

Übergangsbereich CA3/CA1 Die Messungen bzgl. Abb. 8.3 **D–F** bilden den Übergangsbereich CA3/CA1 ab. Wie bei voriger Messposition finden sich wieder eng benachbarte Maximalstellen im Spektrum, deren Amplituden jedoch deutlich ausgeprägter sind. Das Maximum liegt bei 10.7 Hz (zweite Spalte). Es zeigt deutlich ausgeprägte Oszillationen im unteren Bereich des CA3 (nahe CA1) sowie in der Region Str.rad./Str.lac.mol. des CA3 (Innenbereich des CA3). Die folgenden 2 Maximalstellen (11.7 bzw. 12.7 Hz) gleichen sich darin, wohingegen im ersten Maximum ($f = 9.7$ Hz) die charakteristische Ausprägung im unteren Teil des CA fehlt.

Die Oszillation im Str.rad./Str.lac.mol. deckt sich in ihrer räumlichen Ausprägung mit jener in Teilabb. C, $f = 14.9$ Hz (Markierung jeweils weißes X). Für $f = 10.7$ Hz ist sie in F noch stärker, für $f = 12.7$ Hz schwächer ausgeprägt, als im Str.pyr. Für höhere harmonische Ordnungen findet sich das absolute Maximum ebenfalls im Str.pyr⁹. Aus der Kartierung der relativen Winkelbeziehungen geht ein Phasenverschiebung von ca. 180° hervor. Dass es sich bei den 2 genannten Regionen um keine „source-sink pairs“ handelt, ist aus den Kartierungen der relativen Phasen abzulesen: die Phasen ändern sich kontinuierlich zwischen beiden oben genannten Positionen. Beim genannten Innenbereich des CA (Str.rad./Str.lac.mol.) handelt es sich - im Gegensatz zum unterhalb liegenden Str.pyr. - um eine synchrone Oszillation. Dies lässt darauf schließen, dass diese Region ebenfalls aus neuronalen Ensembles besteht, die (i) in diesem Stadium oszillatorische Fähigkeit besitzen und (ii) eine Kopplung zueinander besitzen. Der antreibende Input kann dabei natürlich auch von außen kommen. Diese Region ist im übrigen tatsächlich von dichten, interneuronalen Netzen durchdrungen, die z.T. direkt mit der pyramidalen Zellschicht verknüpft sind¹⁰.

Auch bei dieser MTA-Messposition ist aus den Kartierungen der relativen Phasen ein kontinuierlicher Phasenversatz abzulesen, der auf Wellenmuster schließen lässt. Zum Einen an den bereits oben diskutierten Stellen entlang des CA3, wo die Moosfasern verlaufen (s.o.). Zum andern sehr ausgeprägt im unteren Teil des CA, wo sich der Übergang zum CA1 befindet. Dies könnte wiederum durch die Projektion CA3→CA1 entlang der Schaffer Kollateralen verursacht werden. Entlang des Str.pyr. findet sich somit keine synchrone Feld-Oszillation, wie sie bei voriger Messposition (A-C) beobachtet wurde. Da die Leistungsdichte ein lokales Maximum hat, lässt sich folgern, dass diese Bereiche von außen angetrieben werden.

Dass oben erwähnten höhere harmonischen Ordnungen tatsächlich Obertonschwingungen und keine unabhängige Oszillationen sind, liegt dadurch nahe, dass (i) das Signal sägezahnförmig ist, (ii) die räumlichen Ausprägungen fast identisch sind (im Gegensatz zu oben erwähnten „Nebenmaxima“) und (iii) dieser Effekt bei allen jeweiligen Messungen auch nach größeren Zeitabständen stets auftrat.

⁹Siehe Anhang, Abb. A.8.

¹⁰Deren massive, nahezu synchrone Aktivität war bereits in Kap. 7 zu sehen.

Zusammengesetzte Karte nach Verschieben des Hirnschnitts Durch Verschieben des Hirnschnitts zwischen den einzelnen Messungen konnte, wie eben bereits gezeigt wurde, ein größerer Teil der Hippocampus abgerastert werden. Bzgl. der verschiedenen MTA-Messpositionen zeigten sich in den Spektren oft mehrere, eng benachbarte Hauptmaxima. Diese „Nebenmaxima“ (mit denen nicht die höheren harmonischen Ordnungen gemeint sind) lassen sich entsprechend ihrer räumlichen Verteilung kategorisieren. Durch die Variierung des Schnittes während des Experiments konnte dies für mehrere Messpositionen am Hippocampus bestätigt werden. Dabei wurden 2 Gruppen wesentlich verschiedener Ausprägungen gefunden.

Um dies darzustellen wurden für jede dieser 2 Gruppen die Amplitudenverteilungen der spektralen Leistungsdichten frequenz aufgelöst aufgetragen (Farbkodierung stets gleich); anschließend wurden sie übereinandergelegt, entsprechend versetzt gemäß den Positionen des Sensorarrays. Aus Abbildung 8.4 ist anhand dieser Kartierungen ersichtlich, dass die Muster dieser 2 Gruppen einander entsprechen (je links im Bild, zugleich unterlegt mit dem Foto des Hirnschnitts; CA-Bogen leicht nachgezeichnet). Teilabb. A zeigt dabei die langsamere Ausprägung, B die schnellere (mittlere Frequenz ca. 11.5 Hz, bzw. 14.7 Hz). Rechts finden sich Leistungsspektren, die an den den markierten Messpositionen den entsprechenden Teilmessungen entnommen wurden (schwarzes Kreuz in A, B). Der zeitliche Zusammenhang der zugrundeliegenden Teilmessungen entspricht den Nummerierungen 1–5 in den Fotos.

Die Fälle A und B zeigen zwei unterschiedliche Muster. Obwohl für die (3 in A, bzw. 2 in B) Messpositionen innerhalb einer dieser Gruppen die Frequenzen leicht versetzt sind¹¹, decken sich ihre Amplituden in der Mitte. Rechts wurden die Spektren der je 2 Transistormessungen so skaliert, dass sich die betrachteten Maximalstellen decken. Diese ergibt sich auch für die zweiten harmonischen Ordnungen. Der Peak bei 50 Hz ist bedingt durch Einstreuung des Hausnetzes aufgrund der zusätzlichen metallenen Haltevorrichtung.

Abschließend sind nochmals 2 Dinge hervorzuheben. (i) Die Oszillation kann anhand ihrer Eigenfrequenz räumlich abgebildet werden. Es zeigt sich, dass diese nicht fest ist. In der Kartierung zeigt sich jedoch, dass diese, einer Variierung unterworfenen Eigenfrequenzen, einander ähnliche räumliche Ausprägungen besitzen. Anhand deren räumlichen Maxima lassen sich die Herde der Oszillation sichtbar machen. (ii) Die Spektren zeigen zusätzliche Maximalstellen, deren Eigenfrequenzen wieder leicht verschoben sind. Allerdings zeigen sich für diese in der spektralen Kartierung völlig unterschiedliche räumliche Verteilungen. Es scheinen sich 2 Oszillationen unterschiedlicher räumlicher Ausprägung wechselseitig im zeitlichen Abstand zu überlagern. Bereits bei den oben gezeigten Signalen waren z.T. Schwebungen zu sehen. Es ist an dieser Stelle nochmals anzumerken, dass diese Messungen im Anfangsstadium der Oszillationen stattfanden.

¹¹11.0, 11.4 und 12.2 Hz in A bzw. 14.4 und 14.9 Hz in B.

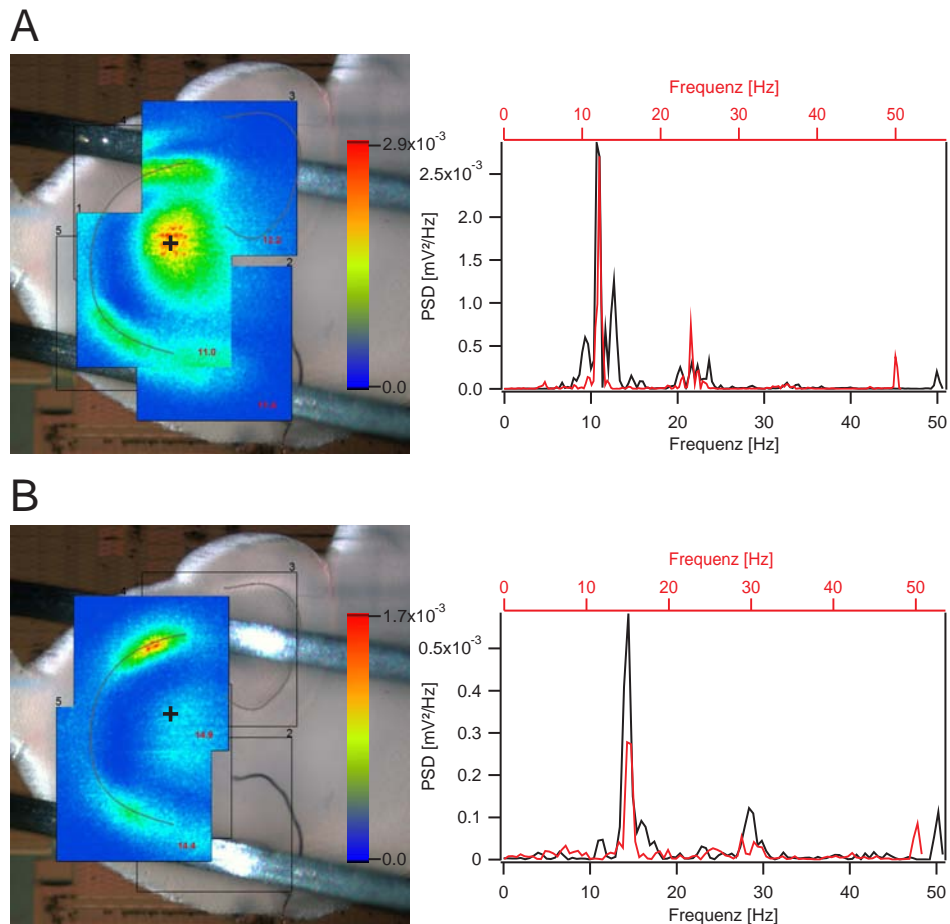


Abbildung 8.4. Räumliche Verteilung spektraler Leistungsdichten für 2 eng beieinander liegender Extremitäten, zusammengesetzt nach verschiedenen Messpositionen. **(A)** und **(B)** zeigen dabei 2 verschiedene Muster. **Links:** Karten der spektralen Leistungsdichten, die sich entsprechend ihrer relativen Positionen decken (rot in Karten: Angabe der Frequenz in Hz; Skalierung für jedes Muster stets gleich). **Rechts:** Spektren für 1 Messort bzgl. Markierung in den Bildern links (schwarzes Kreuz). Die Abszisse des jeweils zweiten Spektrums (rot, an Oberseite) ist relativ zur schwarzen so skaliert, dass sich die betrachteten Maximalstellen links decken. Der dadurch verschobene Peak bei 50 Hz ist bedingt durch leichte elektrische Einstrahlung des Hausnetzes aufgrund der metallenen Haltevorrichtung.

8.4. Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit

Die Frequenzen der gemessenen CCH-induzierten Oszillationen liegen im Bereich von 10 bis 20 Hz und befinden sich damit (nach Klassifikation gemäß Abb. 2.3, Kap. 2.2) im sog. beta-Band. Bereits Ende der 1980er Jahre wurden erstmals in Experimenten nach CCH-Induktion (Konzentration: 40 μmol) im Hippocampus vergleichbare Oszillationen durch intra- sowie extrazelluläre Mikropipettenmessungen nachgewiesen, die sich allerdings im Bereich von 4 – 10 Hz bewegten [Mac 89].

In [Fis 98] hingegen wurden erstmals nach CCH-Applikation (Konzentration: 40 μmol) Oszillationen um 40 Hz gefunden, was deshalb Aufmerksamkeit hervorrief, weil sich die Oszillation damit bzgl. ihrer Frequenz im selben Bereich, dem gamma-Band, befindet, wie bei in vivo Experimenten während kognitiver Prozesse [Bra 99]. Die Frage nach unterschiedlichen Messbedingungen im Vergleich zu Experimenten, bei denen geringere Frequenzen beobachtet werden, wurden offen gelassen. In [Fel 00] wurden, abhängig von der CCH-Konzentration, Oszillationen verschiedener Frequenzen gefunden, die sich z.T. überlagern oder abwechselnd in Erscheinung treten.

Deshalb wird im folgenden ein Experiment vorgestellt, bei dem nach längeren Wartezeiten schrittweise die Carbachol-Konzentration geändert wurde. Damit kann eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der gefundenen Oszillationsfrequenz sowie die Langzeitstabilität der Oszillationen diskutiert werden.

8.4.1. Variation der CCH-Konzentration

Die Präparation sowie die Messungen selbst wurden, wie bereits im vorigen Abschnitt 8.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 3 Messmedien ACSF verschiedener Konzentrationen CCH vorbereitet und nacheinander eingeleitet ($t = 0$: 25 μmol , ab $t = 20$ min: 50 μmol , ab $t = 80$ min: 75 μmol .). Während dieser Zeit wurden (in unregelmäßigen Abständen) die neuronalen Antworten stets 3 s lang, z.T. 10 s lang aufgezeichnet (Sampling-rate: 4069 Hz).

Abb. 8.5 A zeigt ein Foto mit dem Hirnschnitt, wieder mit der Klammer fixiert. Der Schnitt wurde während des Experiments nicht bewegt. Für den markierten Transistor (weißes Kreuz), um den synchrone Oszillationen hoher Amplituden beobachtet werden konnte, wurden alle Messungen in gleichgroße, 1.5 s lange Teilstücke unterteilt, von denen die spektrale Leistungsdichten berechnet, und in Teilabb. B farbkodiert gegen die Frequenz aufgetragen wurden. Die Abfolge der Spektren von unten nach oben entspricht demnach nicht einer linearen zeitlichen Ordnung (Anfangszeiten mit jeweiligen CCH-Konzentrationen markiert).

Ab $t = 5$ min treten erste Oszillationen mit ca. 20 Hz auf (Teilmessung Nr. 1, in Grafik schwach erkennbar). Die Oszillationen bleiben in der Folgezeit zwar bestehen, zeigen aber vorerst keine eindeutige Frequenz. 20 min nach Erhöhen auf 50 μmol CCH (ab $t = 50$ min, Nr. 52) steigt die Signalamplitude an und die Oszillationsfrequenz er-

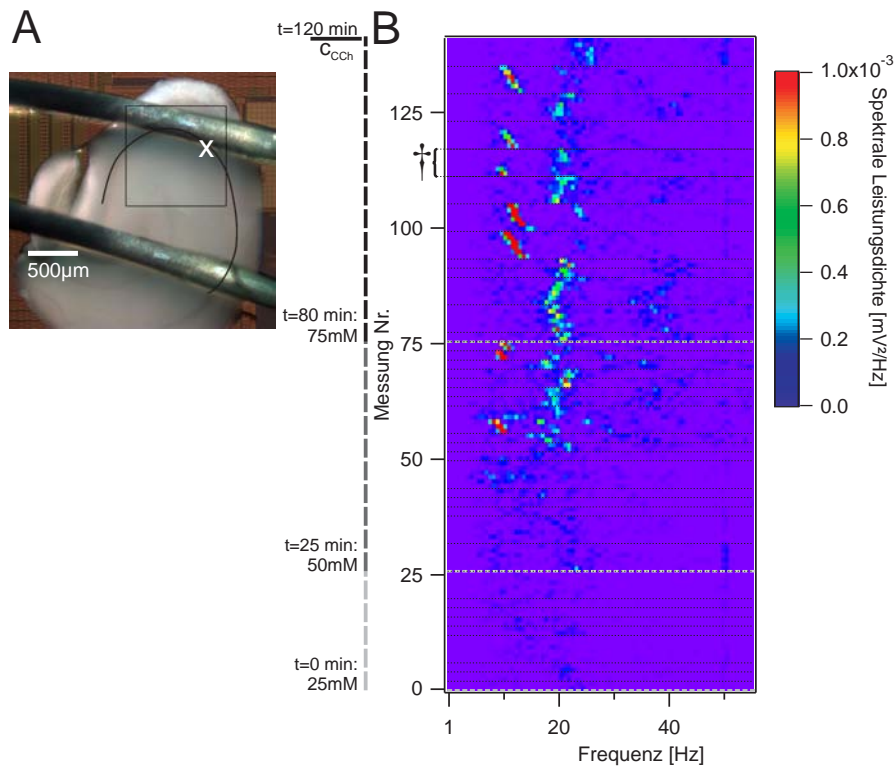


Abbildung 8.5. Spektrale Leistungsdichten eines Transistors während eines 120 min dauernden Zeitraumes bei schrittweiser Erhöhung der CCH-Konzentration. **(A)** Foto des Hirnschnitts mit Markierung des MTA Arrays sowie des betrachteten Transistors. **(B)** Spektrale Leistungsdichten einzelner Teilmessungen für beobachteten Zeitraum. Alle Messungen wurden in 1.5 s lange Teilstücke unterteilt und daraus spektrale Leistungsdichten berechnet. Links dazu die Angabe der CCH-Konzentrationen mit Zeitpunkten der Einleitung. Der mit † markierte Ausschnitt ist in Abb. 8.6 detailliert wiedergegeben (zusammenhängende Zeilen mit gestrichelten Linien begrenzt; Zeitachse ist nicht linear; die Farbkodierung der spektralen Amplituden wurde zur besseren Darstellung nur bis $0.001 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ gewählt).

reicht einen festen Wert um 20 Hz, der sich jedoch stets leicht ändert. Die 10 s langen Messungen ab $t = 55 \text{ min}$ (Nr. 56) zeigen z.T. Sprünge im Spektrogramm zwischen 10 und 20 Hz. Beispielfhaft wird dazu später der mit † markierte Bereich diskutiert werden (Abb. 8.6). An manchen Stellen ändert sich die Frequenz kontinuierlich von 15 zu 10 Hz.

Auffällig ist, dass die Oszillation durch die Erhöhung der CCH-Konzentration in ihrer Amplitude verstärkt, in ihrer Grundfrequenz jedoch näherungsweise nicht weiter beeinflusst wird¹². Für $50 \mu\text{mol}$ ist zwar bei einigen Teilmessungen ein Maximum bei 40 Hz verstärkt ausgeprägt, jedoch erweist sich dies als 2. harmonische Ordnung zur Grundfrequenz von 20 Hz.

¹²Dies wurde durch eine zusätzliche, 100 min lange Messung bestätigt, deren Frequenz sich ebenfalls bei 20 Hz einpendelte (CCH-Konzentrationen waren 50 und $75 \mu\text{mol}$).

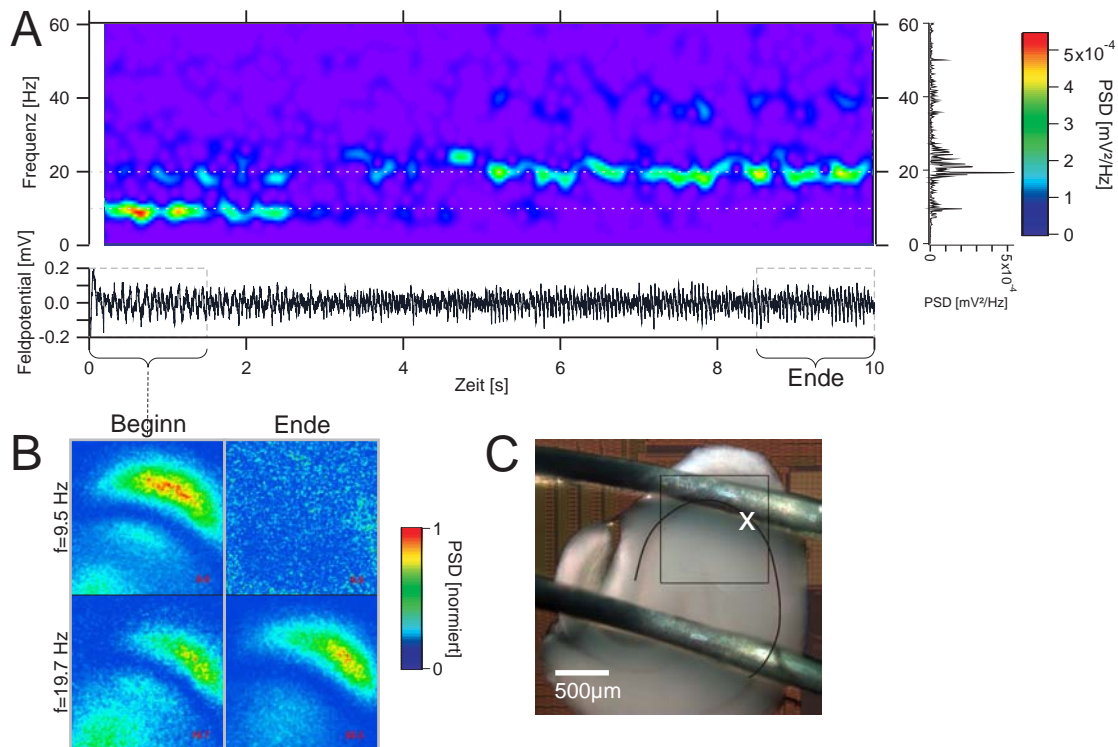


Abbildung 8.6. Änderung der Oszillationsfrequenz innerhalb einer 10 s langen Messung. **(A)** Leistungsdichte-Spektrogramm und Transiente (unten) einer 10 s langen Messung des CA3 nach Zugabe von 75 μM Carbachol. Rechts: Leistungsdichtespektrum über die gesamte Messung. **(B)** Kartierung der Leistungsdichte für die Maximalstellen $f = 9.5$ Hz und $f = 19.7$ Hz gemäß Transistorpositionen im Array. **(C)** Foto des Hirnschnitts mit Position des Messorts von A.

8.4.2. Kurzzeitige Änderung der Grundfrequenz

Die bzgl. der Markierung † in Abb. 8.5 erwähnte, innerhalb von 10 s beobachtete Änderung der Grundfrequenz wird in Abb. 8.6 A in einem Spektrogramm höher aufgelöst dargestellt¹³. Rechts ist ein Leistungsspektrum über die gesamte Messung zu sehen, unten die Transiente. Das Bild in C zeigt nochmals den ausgewählten Messtransistor.

Die Änderung der Grundfrequenz erfolgt, wie bei einem Modensprung, sprunghaft von 10 auf 20 Hz. Für beide Zeitbereiche findet sich die 2. harmonische Ordnung im Spektrum wieder. In B wurden, oben vorgestellten Methoden folgend (Kap. 8.3), die spektralen Leistungsdichten für betreffende 2 Frequenzen kartiert, wobei je die ersten, sowie letzten 1.5 s ausgewertet wurden ($f = 9.5$ Hz, sowie $f = 2 \times 9.5 \approx 19.7$ Hz; Amplituden zur besseren Darstellung jeweils auf Maximalwert normiert). Die Ausprägung der Oszillation ist für 19.7 Hz jeweils gleich, wenn auch leicht relativ zu 9.5 Hz verschoben.

¹³Bei Samplingrate von 4069 Hz über FFT bei $df = 3.5$ Hz für alle 100 Punkte (Gauß-Fensterung; Gabor Methode).

8.5. Diskussion

Die Messungen mit MTAs entwerfen ein klares Bild neuronaler CCH-Oszillationen in Hippocampusschnitten. Obwohl viele Aspekte nur angerissen wurden und die Beantwortung einiger Fragen noch offen bleibt, lassen sich bereits jetzt einige Aussagen treffen.

(i) Durch Verschieben des Hirnschnitts konnten erneut größere Bereiche mit dem MTA gemessen werden. Es zeigte sich, dass die räumliche Ausprägung andersartig ist als im Vergleich zu den Messungen von Kap. 6 und 7. Es wurde deutlich, dass Oszillationen (a) entlang der Pyramidenzellen sowohl des Gyrus Dentatus-seitigen Teils des CA3 auftreten, als auch im Übergangsbereich CA3/CA1. Weiterhin weist (b) das Stratum lacunosum moleculare (Str.lac.mol.) des CA3 eine eigene, ausgeprägte Oszillation auf.

(ii) Die Analyse der relativen Phasenbeziehungen zeigte, dass die Oszillationen sowohl im Str.lac.mol. als auch im Str.pyr. des CA3 synchron sind, zueinander jedoch einen Phasenversatz (ca. 30°) aufweisen. Die Oszillation im Str.pyr. nahe CA1 zeigt hingegen ein wellenartiges Muster. Denkbar ist, dass diese Region über die Projektion CA3→CA1 angetrieben wird. Dieser Befund deckt sich sehr gut mit Erfahrungen in [Bra 95]. Dort wurde nach in-vivo Messungen von gamma-Oszillationen von einer Synchronität nahe des Hilus des GD berichtet¹⁴, die jedoch entlang des CA3 Richtung CA1 rapide abnahm.

(iii) Die Spektralanalysen zeigen keine feste Frequenz. Es finden sich z.T. mehrere, eng beieinander liegende Maximalstellen im Leistungsspektrum mit höheren harmonischen Ordnungen. Die zweidimensionalen Kartierungen der spektralen Amplituden, aufgelöst für diese Frequenzen, offenbaren leichte Verschiebungen ihrer räumlichen Ausprägungen entlang des CA-Bogens. Die ortsaufgelösten Transienten weisen entsprechende Schwebungen auf.

(iv) Es wurden im anfängliche Zeitraum der Feldoszillation 2 Muster gefunden, die gänzlich verschiedenartige räumliche Ausprägungen aufweisen. Den zugrundeliegenden Messpositionen entsprechend konnten die zweidimensionalen Amplitudenverteilungen näherungsweise deckungsgleich zu je einer spektralen Kartierung zusammengefasst werden. Ein Vergleich mit einer Kartierung zu einem späteren Zeit stünde noch aus.

(v) In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der CCH-Konzentration auf die Frequenz untersucht, da in der Literatur kein eindeutiger Zusammenhang gefunden werden konnte. Weiterhin galt es aufzuklären, warum in anderen Arbeiten nach CCH-Anwendung oft von gamma-Oszillationen (30 bis 80 Hz) berichtet werden. Es zeigte sich (a) nach einer Anfangsphase stets die typische Oszillationsfrequenz von ca. 20.5 Hz, die leicht schwankte (± 2.5 Hz). Zusätzlich konnten (b) in langen Messungen Sprünge in der Grundfrequenz zwischen 10 und 20 Hz beobachtet werden (für 50 μ mol CCH). Dieser Mechanismus sowie die Frage nach den gamma-Oszillationen bleibt vorerst unklar.

¹⁴Diese Stelle ist mit der oben beschriebenen Region (CA3/GD) vergleichbar.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung der Ergebnisse

- Anhand numerisch berechneter Modelle wurde die räumliche Verteilung von Feldpotentialen durch Hirngewebe auf isolierenden Chips studiert. Dies erlaubte eine Charakterisierung des Interfacings akuter Hirnschnitte mit Siliziumchips, wobei Effekte durch die Existenz toter Zellen an den Schnittträndern sowie durch eine zusätzliche Schicht von Elektrolyt eingehend diskutiert wurden. Im Rahmen der theoretischen Modelle wurde auch die Möglichkeit einer Stimulation akuter Hirnschnitte mittels planarer Kondensatoren erörtert. Es zeigte sich dabei, dass dies aufgrund der inaktiven Zellschichten beim gegenwärtigen Stand der Technik kaum realisierbar ist.
- In ersten Experimenten wurde die Kopplung eines akuten Hirnschnitts mit Feld-Effekt Transistor Chips erstmals erfolgreich realisiert. Anhand der Messung eines Tiefenprofils mit konventionellen Mikropipetten wurde die theoretisch berechnete Verteilung der Feldpotentiale im Hirnschnitt experimentell bestätigt, so dass die Schichtdicke inaktiver Zellen abgeschätzt werden konnte. Es zeigte sich keine nennenswerte Beeinträchtigung durch eine Schicht Elektrolyt zwischen Schnitt und Chipsubstrat. Das simultane Transistor- und Mikropipettenrecording zeigte zudem eine sehr gute Übereinstimmung in den Signalformen sowie -Amplituden, was die Äquivalenz der neuartigen Messmethodik mittels Feld-Effekt Transistoren im Vergleich zur konventionellen Technik unterstreicht.
- Die Messmethodik wurde auf CMOS-gefertigte Chips mit hochauflösenden Transistorarrays (Multi-Transistor Array, $1 \times 1 \text{ mm}^2$) übertragen. Die sehr kleine Rasterweite von $7.8 \text{ }\mu\text{m}$ und Samplingraten von bis zu ca. 6 kHz ermöglichten es, die aktive neuronale Signalausbreitung in Hippocampusschnitten mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu messen. Durch systematische Experimente konnten dadurch elementare Strukturen und Verschaltungen im Hippocampus raumzeitlich abgebildet werden.
- Als Anwendungsmöglichkeiten wurden Messungen komplexer Netzwerkaktivitäten demonstriert. Dazu wurden Hirnschnittpräparation und Messanordnung dahingehend verbessert, dass physiologisch relevante Zustände im Hirnschnitt etabliert werden konnten. Zum einen (i) wurden dadurch sog. epileptiforme Aktivitäten in

ihrer Ausbreitung und Dynamik studiert, die u.a. als „sharp wave-ripple Komplexe“ auch bei Gedächtnisprozessen vorkommen. Schnelle, krampfartige Oszillationen konnten bezüglich ihres Ursprungsherd ebenso kartiert werden wie (ii) die in einem weiteren Schritt durch Carbachol (CCH) induzierten Oszillationen in Hippocampusschnitten. Diese gelten als ein Modellsystem, das sehr nahe an Signalen von in-vivo Messungen herankommt. Die MTAs erwiesen sich als besonders geeignet, synchronisierte sowie von außen angetriebene, neuronal oszillierende Areale im Hippocampusschnitt zu identifizieren.

Ausblick

- Eigene experimentelle Versuche, akute Hirnschnitte mittels planarer, chipseitiger Kondensatoren kapazitiv zu stimulieren, brachten kein Ergebnis, was theoretisch gewonnene Erfahrungen bereits nahelegten. Die verbesserten Präparationsbedingungen bzgl. akuter Schnitte, welche im Laufe dieser Arbeit geschaffen wurde, machen jedoch eine Wiederaufnahme von Stimulationsexperimenten interessant.
- Die hier vorgestellten Methoden in Kombination mit den hochauflösenden Multi-Transistor Arrays bieten Anwendungsmöglichkeiten für viele neurobiologische Fragestellungen, bei denen breite, großflächige Feldpotentialmessungen von Vorteil sind (z.B. neuronale Plastizität bei Gedächtnisprozessen; Studium pathologischer Prozesse wie z.B. bei Demenzen oder bei der Parkinsonschen Krankheit).
- Die Messmethodik kann auch direkt auf andere Hirnareale übertragen werden, von denen Hirnschnittpräparate etabliert sind (z.B. Cerebellum, Neokortex).
- Die Verwendung räumlich größerer Arrays könnten in Zukunft Signalpropagationen auch in größeren Hirnschnitten evtl. komplett abbilden. Auch die Verwendung von Hirnschnitten höherer Wirbeltiere wäre denkbar.
- Die Messung neuronaler Signale in akuten Hirnschnitten mit hochauflösenden Chips wäre in der Pharmaforschung eine denkbare Verbesserung im Screening nach pharmakologischen Substanzen, so dass die Suche nach neuen Wirkstoffen beschleunigt werden könnte.

A. Anhang

A.1. Zur Signalform extrazellulärer Feldpotentiale im CA1

In Abbildung A.1 sind Signale aufgeführt, wie sie typisch mit Mikroelektroden im Stratum pyramidale (jeweils oben), sowie im Stratum radiatum (unten) gemessen werden (mittig im Schnitt; Position: siehe Schema in A.2 A). Es wurden die Schaffer Kollaterale stimuliert ($125 \mu\text{A}$ für $100 \mu\text{s}$), gemessen wurde am Hippocampuschnitt einer Maus. Links in der Abbildung sind jeweils selbst gemessene Antworten [Sta 04], rechts Messungen aus einem klassischen Lehrbuch [She 03].

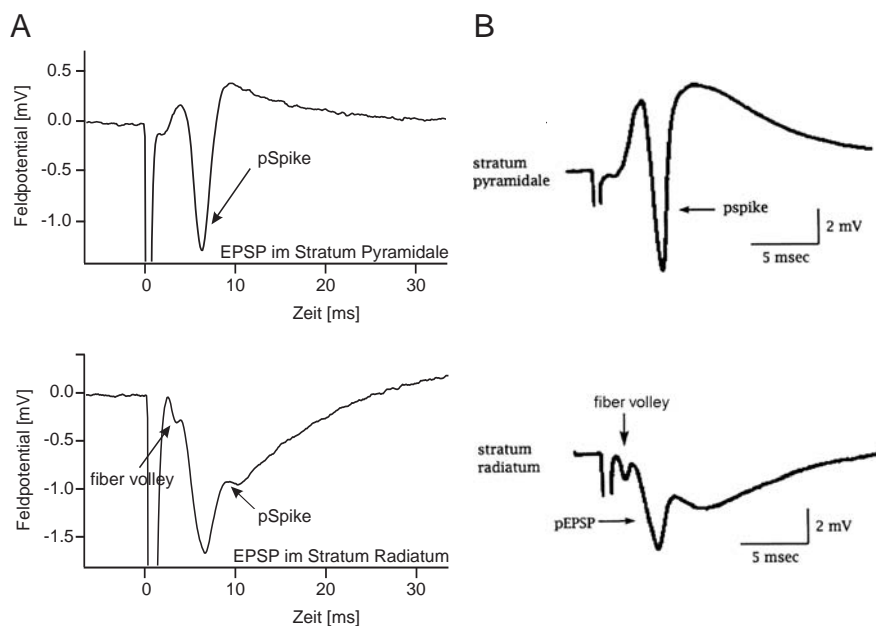


Abbildung A.1. Gegenüberstellung von Signalen aus dem CA1. **(A)** Eigene Messungen aus Stratum radiatum (oben) und Stratum pyramidale (unten). **(B)** Entsprechende Signale aus einem Lehrbuch (nach [She 03])

Direkt nach dem Stimulus folgt im Str.rad. ein kleiner, negativer Peak, der von vorbeilaufenden Summen-APs im Axonbündel durch Ioneneinstrom generiert wird (sog. fiber volley). Es folgt ein (Summen-) EPSP. Die wohlstrukturierten Dendritenbäume im Str.rad. des CA1 bilden mit den Somata im Str.pyr. Dipole (wechselseitige Vorzeichen für APs bzw. EPSPs), die in den Messungen als „source-sink pairs“ beobachtet werden

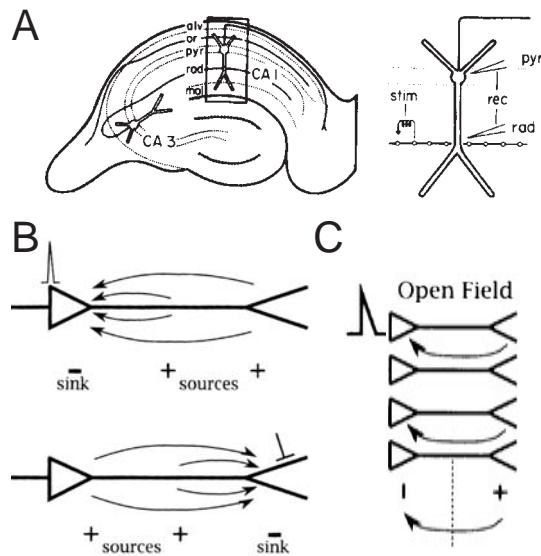


Abbildung A.2 Open-field Struktur im Hippocampuslice. **(A)** Sliceschema mit Stimulations- und Ableitort bzgl. Messdaten in Abb. A.1. **(B)** Entsprechende aktive Stromsenken und passive Stromquellen (kapazitiv und ohmsch) dazu. **(C)** Schema einer open-field Struktur, wie sie durch lamellaren Aufbau auch der CA1 aufweist. (Je nach [Joh 99]).

(Abb. A.2 B): im Str. rad. ist das (Feld-)EPSP negativ durch Ioneneinstrom (Stromsenke), im Str.pyr. positiv durch entsprechende Ausgleichströme (passive kapazitive und ohmsche Ionenströme, Stromquelle). Überlagert ist es von postsynaptischen Summen-APs (pSpike) durch Ioneneinstrom im Str.pyr, bzw. deren passiven Ausgleichsströmen im Str.Rad. (siehe Abb. A.2).

Obwohl die synaptischen Ströme sehr klein sind und die Aktionspotentiale sehr kurz, sind diese Ereignisse im Extrazellulärraum als Feldpotentiale messbar. Dies liegt am lamellaren Aufbau des Hippocampus: durch die folgende, wohlgeordnete Struktur der kolumnenartig organisierten Prinzipalzellen und ihrer sehr großen Anzahl synchron aktivierter Synapsen bzw. Somata bilden sie eine klassische sog. „open-field“ Struktur (siehe Abb. A.2 C). Damit werden wohlgeordnete Neuronen incl. ihren Dendritenbäumen beschrieben, die synchron aktiv sind (bzgl. EPSPs, prä- und postsynaptische APs) und deren extrazelluläre Signale sich aufgrund ihrer Anordnung positiv überlagern und dadurch verstärken.

A.2. Ergänzungen zu Experimenten mit MTA-Chips

A.2.1. Orte der postsynaptischen population Spikes

Ergänzung zu Kap. 6.4: Anhand Abb. 6.4 wurde bereits die Superponierung von EPSPs und postsynaptischen APs (pSpikes) erläutert. Durch die Umkehrung der Signale entlang der apikal-basalen Achse der Pyramidenzellen ergibt sich zusätzlich ein sehr komplexes Feldpotential. Die Orte maximaler Feldpotential-Amplituden müssen demnach nicht unbedingt die neuroanatomischen Orte der maximalen Generierung von EPSPs

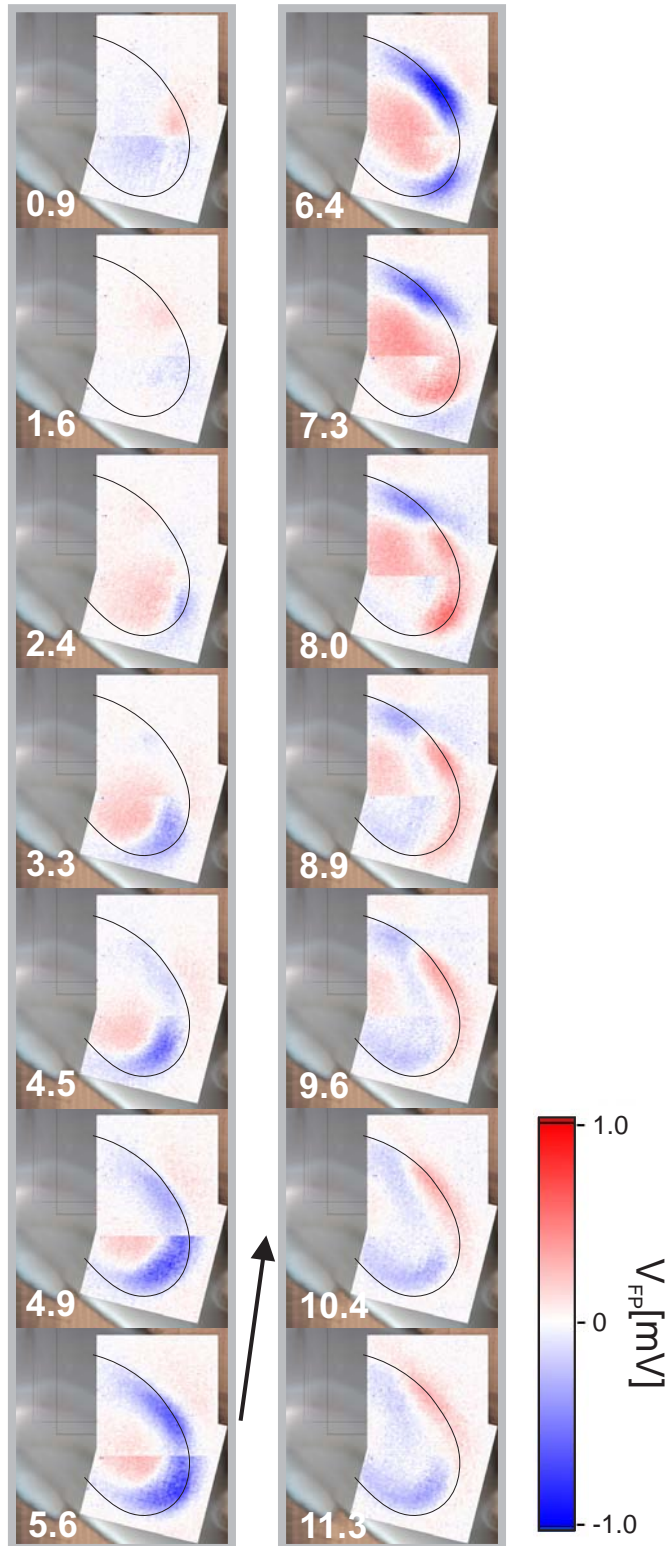


Abbildung A.3 Die Differenz zweier Messungen mit knapp unter- und überschweiliger Stimulation zeigt die Orte, an denen APs (pSpikes) ausgelöst werden.

bzw. APs wiedergeben.

Um dies zu umgehen, wurden von den knapp überschwelligen Daten des Experiments bzgl. Abb. 6.6 die korrespondierenden unterschwelligen Messungen subtrahiert ($V_{postsynaptisch} = V_{unterschwellig} - V_{überschwellig}$). Da zwischen diesen die EPSP-Amplituden entgegen den pSpikes-Amplituden nur geringfügig ansteigen, wird so die zusätzliche postsynaptische Aktivität näherungsweise freigelegt.

Das Ergebnis zeigt Abb. A.3 für unter- bzw. überschwellige Stimulation bei $I_{s1} = 75 \mu\text{A}$ bzw. $I_{s2} = 100 \mu\text{A}$. Nach kurzer Latenz werden retrograd im CA3 und anterograd im Str. pyr. des CA1 pSpikes ausgelöst. In der Übergangsregion dazwischen ist ein leichter Signaleinbruch erkennbar, der die Grenze des CA1 markiert. Besonders gut zu sehen ist, dass offensichtlich direkt nach den postsynaptischen APs im Str. pyr. des CA1 langsame Feldpotentiale positiven Vorzeichens vorherrschen. Diese stammen aufgrund der Subtraktion der EPSPs nicht von deren passiven Ausgleichsströmen, die an diesen Stellen typischerweise gemessen werden können¹. Vielmehr wird hier die Aktivität von Interneuronen sichtbar gemacht, die sofort nach Feuern der Prinzipalzellen aktiviert werden, so dass mittels IPSPs im Str. pyr. eine Phase der Hyperpolarisation folgt.

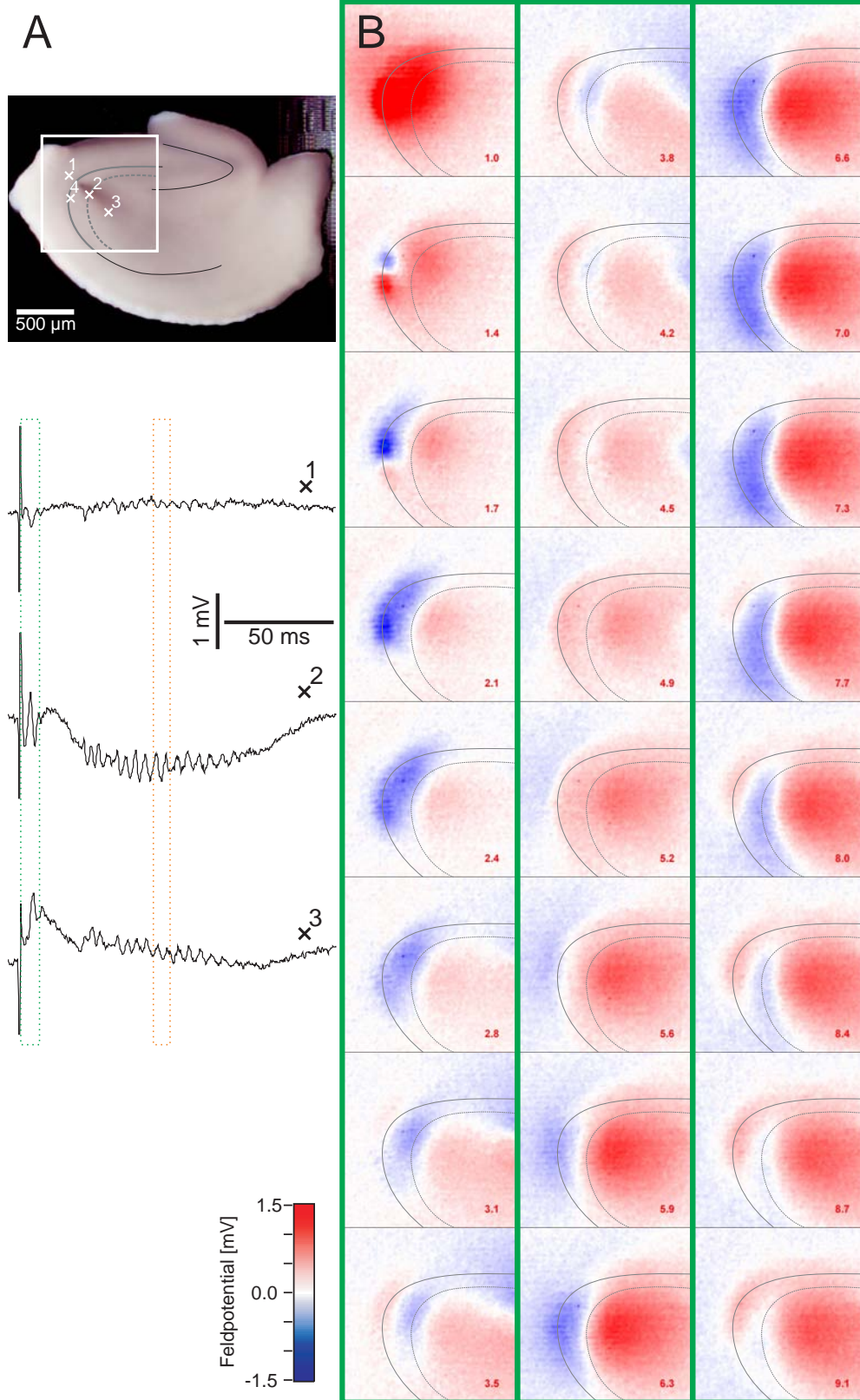
Dieser Wechsel von langsamen EPSPs, kurzen postsynaptischen APs und noch langsameren IPSPs führt je nach unterschiedlicher Gewichtung oft zu einer Verschiebung der Feldpotential-Extrema. In den nächsten Kapiteln (7 und 8) wird dies oft in Form von Wellen innerhalb einer Kolumne – also senkrecht zur Prinzipalschicht und parallel zur somato-dendritischen Achse – sichtbar werden.

A.2.2. Ergänzung zur Messung epileptiformer Aktivität

Ergänzung zur zeitlich aufgelösten Kartierung gemessener Signale unter Mg-freier ACSF in Abschnitt 7.1: Abbildung A.4 zeigt die Anfangsphase der epileptiformen Aktivität, Abb. A.5 die Phase mit Rippleaktivität. Die in den Signalen (Abb. A.4 B) angebrachten, grün und orange gestrichelten Kästen markieren die Bildausschnitte bzgl. Teilabb. B sowie Abb. A.5, die zeitaufgelöst die farbkodierten Signalamplituden des gesamten Arrays zeigen.

¹Siehe A.1

Abbildung A.4. (nächste Seite) Anfangsphase nach Stimulation unter Mg-freier ACSF. **(A)** Bild des Hippocampuslice mit Markierung des Sensorarrays sowie des Stratum pyramidale und -radiatum. Zugleich sind **(B)** zeitaufgelöste Transistorsignale bzgl. der im Foto eingezeichneten Positionen gezeigt. Es werden EPSPs im CA3 ausgelöst, die sich entlang der Schaffer Kollaterale in Richtung CA1 ausbreiten. Die zeitliche Auswahl der farbkodiert dargestellten Signalamplituden korrespondiert mit der Markierung in Abb. 7.3 (jeweils grüner Rahmen).



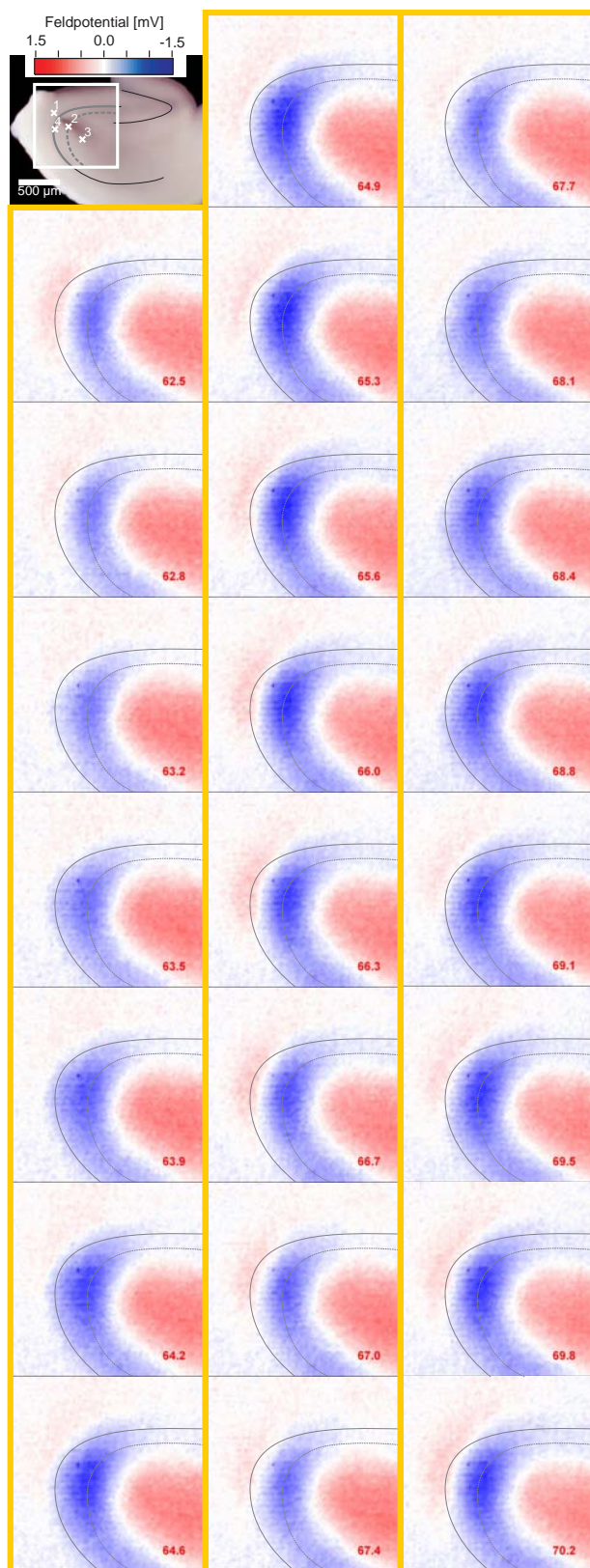


Abbildung A.5 Schnelle Oszillationen (Ripples) im CA3 unter Mg-freier ACSF. Die zeitliche Auswahl der farb-kodiert dargestellten Signalamplituden korrespondiert mit der Markierung in Abb. 7.3 (jeweils gelber Rahmen).

A.2.3. Aktivität im Gyrus Dentatus unter Mg-freier ACSF

Es soll noch ein Experiment gezeigt werden, bei dem der Gyrus dentatus (GD) direkt stimuliert wurde, wiederum bei Verwendung Mg-freier ACSF (Hippocampuslice einer Maus, p40). Als Stimulationsort wurde das Stratum molekulare gewählt, in etwa an der Stelle, wo auch der Tractus perforans die Körnerzellschicht des GD innerviert (Stimulationsstrom: $I_s = 40 \mu\text{A}$ für $200 \mu\text{s}$).

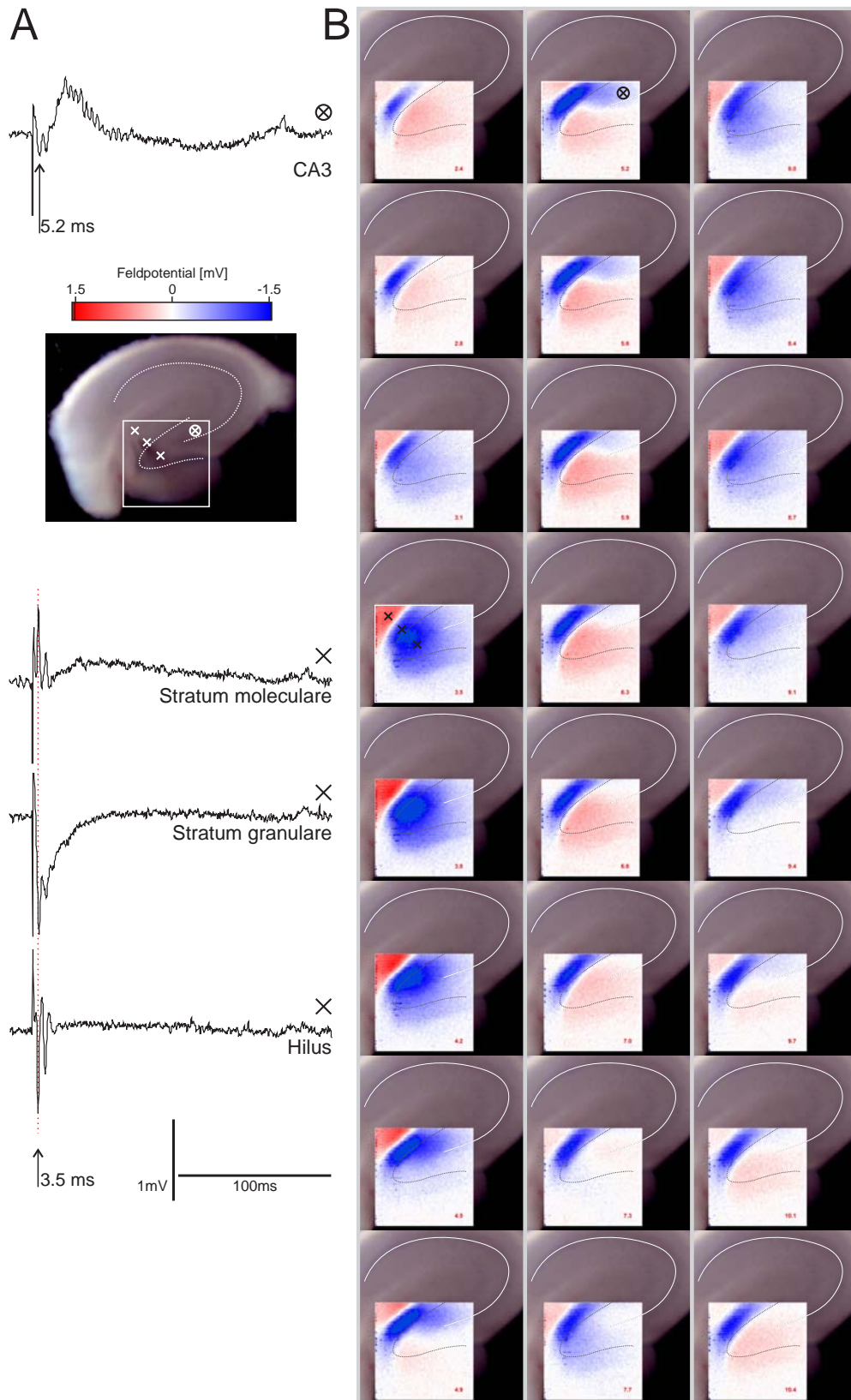
In Abb. A.6 A ist eine Fotografie mit der schematischen Position des CMOS-Arrays zu sehen. Zugleich sind 4 Orte markiert, deren Transistorsignale zeitaufgelöst gezeigt sind: unten 3 Orte im GD (Stratum molekulare, -granulare und Hilus bzgl. der 3 Kreuze) sowie einer im CA3 (Kreuz mit Kreis). Die Teilabbildung B zeigt die Signale ortsaufgelöst entsprechend ihrer Position im Sensorarray für verschiedene Zeiten (zeitliche Abfolge $\Delta t = 0.35 \text{ ms}$; effektive Samplingrate: 5744 Hz). Die zeitlichen Markierungen bei den Transienten in A korrespondieren mit den jeweiligen Frames ($t = 3.5 \text{ ms}$ und $t = 5.2 \text{ ms}$), in denen die entsprechenden Orte markiert sind, an denen die 4 Signale gemessen wurden.

Anhand der 2D- Kartierung (Teilabb. B) ist die räumliche Ausbreitung der neuronalen Aktivität zu sehen: direkt nach der Stimulation ist ein stark ausgeprägtes, langanhaltendes negatives Signal am Stratum granulare sichtbar, das auf stetes Feuern der Prinzipalzellen aufgrund des Mg-Mangels deutet. Ab $t = 3.5 \text{ ms}$ lösen die dicht vernetzten Zellen (Körnerzellen und Interneurone) im Hilus 3 mal hintereinander im Abstand von ca. 5 ms nahezu synchron APs aus (erstes AP angedeutet durch gestrichelte Linie in A, bei $t = 3.5 \text{ ms}$; siehe auch Position der 3 Signale in B); die Feuerrate ist mit 209 Hz vergleichbar mit der Frequenz der Ripples im CA3. Danach propagieren jeweils APs entlang der oberen Innenseite des GD in Richtung CA3; die Propagationsgeschwindigkeit lässt sich auf $248 \mu\text{m}/\text{ms}$ abschätzen²; dies ist ein typischer Wert für die Axongeschwindigkeit in den Moosfasern, die um ca. 30% geringer ist als in den Schaffer Kollateralen ([Kre 08];

²Daten hier nicht gezeigt; es wurde analog zu Kap. 6 ein Signalquerschnitt entlang der Innenseite des GD betrachtet, wo auch in etwa die Moosfasern verlaufen.

Abbildung A.6. (nächste Seite) Aktivität im Gyrus dentatus bei Mg-freier ACSF.

(A) Vier Signale mit Fotografie des Slices; die Orte der gemessenen Signale sind zusammen mit der relativen Position des CMOS Arrays im Foto eingezeichnet: 3 Positionen im Stratum molekulare, -granulare und im Hilus (Kreuze) sowie eine im CA3 (Kreis mit Kreuz; Bipolare Stimulationselektrode schwach erkennbar; Position in direkter Nähe der ersten Markierung oben links) **(B)** Zeitaufgelöste zweidimensionale Kartierung neuronaler Feldpotentiale im GD; nach Stimulation im Stratum molekulare werden die Körnerzellen massiv aktiviert. Anschließend werden (nahezu) zeitgleich im gesamten Hilus Aktionspotentiale ausgelöst, die entlang der Moosfasern zum CA3 progagieren (insgesamt 3 mal, 2 dieser Ereignisse gezeigt); effektive Samplingrate: 5744 Hz ; es ist nur jeder zweite Frame mit zeitlicher Abfolge von $\Delta t = 0.35 \text{ ms}$ gezeigt.

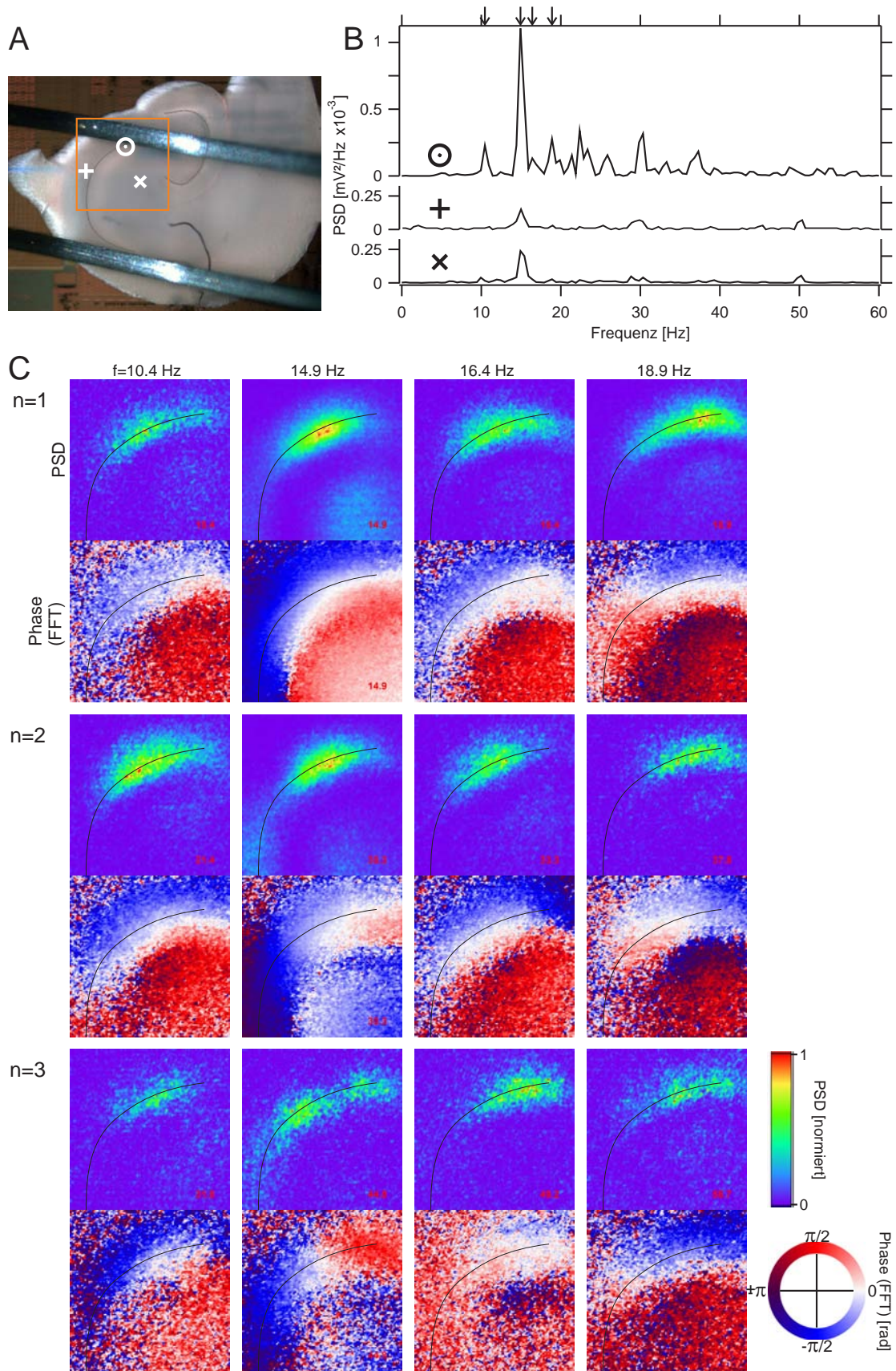


dort $270 \mu\text{m/ms}$; in [Sch 08]: $240 \mu\text{m/ms}$; es wird betont, dass die Geschwindigkeit Temperaturabhängig ist: in [All 09] wurden bei ca. 37°C $470 \pm 40 \mu\text{m/ms}$ gemessen). Im ersten Fall erreichen sie diesen bei $t = 5.2 \text{ ms}$ (siehe Pfeil bei Transiente des CA3 in A). Während im GD die Aktivität langsam abklingt (ca. 50 ms nach Stimulation), sind im CA3 wieder Ripple-Oszillationen beobachtbar (siehe Transiente in A), deren Frequenz 280 Hz betragen.

A.2.4. Ergänzung zu Messungen persistenter Oszillationen

Ergänzung zu Kapitel 8.3: Wie bereits in Abb. 8.3 gezeigt wurde, zeigten die spektralen Leistungsdichten sehr scharfe, eng beieinander liegende lokale Extremstellen, die sich in höheren Ordnungen wiederholten. Abb. A.7 sowie A.8 zeigen für die gefundenen Maxima die Kartierungen der spektralen Leistungsdichten, auch für höhere harmonische Ordnungen bis zur Ordnung $n = 3$, jeweils für die 2 in Kap. 8.3 diskutierten Messpositionen des MTAs. Zugleich sind die zugehörigen Phaseninformationen aus den FFTs gezeigt. Deren Winkel wurden wieder so gedreht, dass am Ort maximaler spektraler Leistungsdichte $\Phi = 0$ ist. Für schwächer ausgeprägte Nebenmaxima ist dies nicht immer eindeutig, da sich durch das erhöhte Rauschen eine entsprechend schlechte Phasenauflösung ergibt. Zwischen den Frequenzmaxima fanden sich keine scharfen Verteilungen (nicht gezeigt).

Abbildung A.7. (nächste Seite) Kartierung der spektralen Leistungsdichten und Phasen für Frequenzen mit lokalen Maxima und deren höhere Ordnungen. **(A)** Foto mit markierter Position des Sensorarrays. Die mit $+$ und \times markierten Positionen entsprechen denen in der folgenden Figur A.8. Entsprechend der 3 weißen Markierungen zeigt **(B)** die zugehörigen spektralen Leistungsdichten. Für die 4 mit einem grauen Pfeil markierten Extremstellen zeigt **(C)** die Kartierung der spektralen Leistungsdichte-Amplituden und deren Phasen entlang des gesamten Sensorarrays; zusätzlich auch für höhere Ordnungen bis $n = 3$ (siehe auch Abb. A.8).



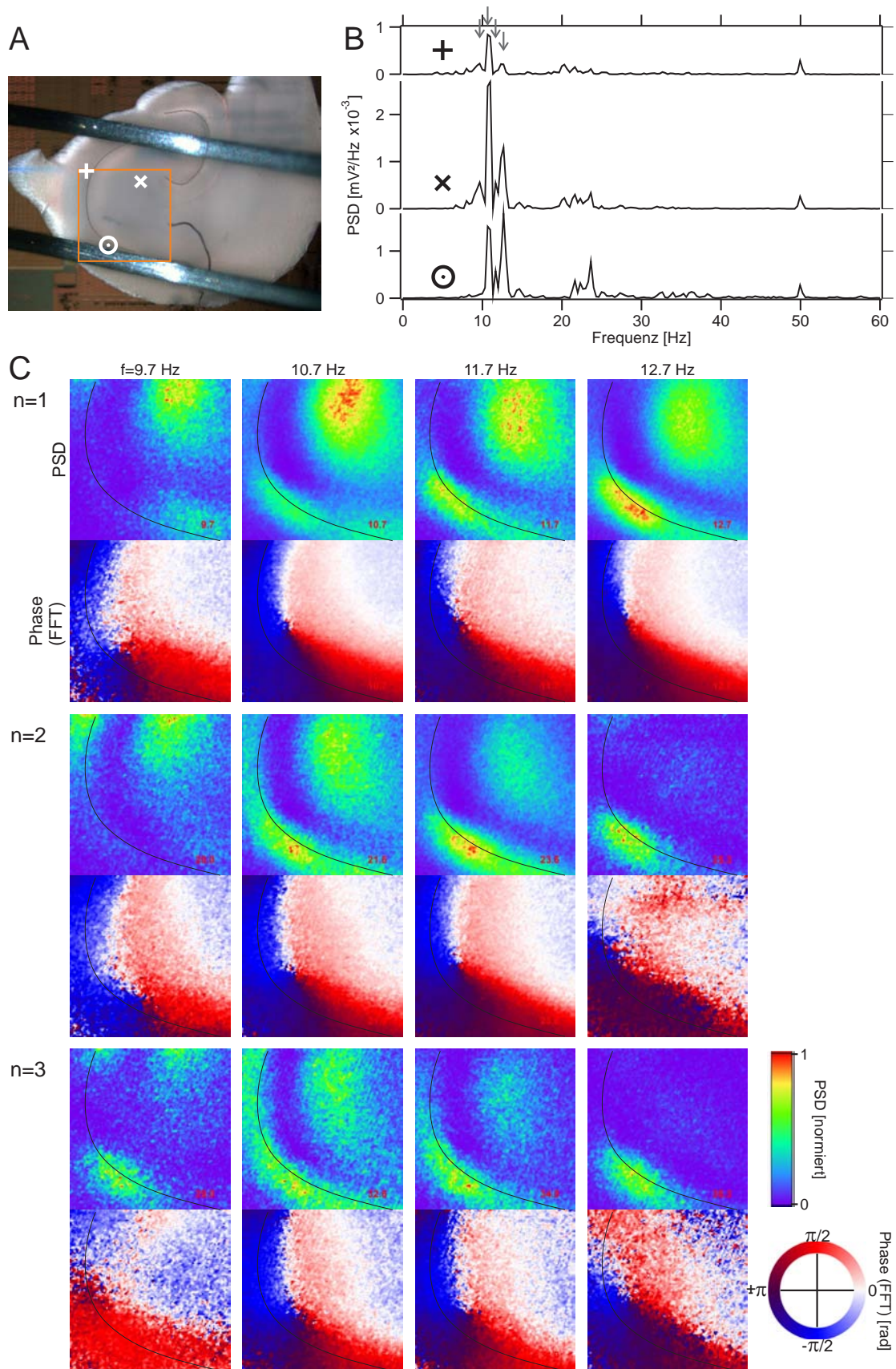


Abbildung A.8. Kartierung spektraler Leistungsdichten mit Phaseninformation II (Erläute- 127
rungen: siehe vorige Abbildung)

A.3. Geräte und Materialien

Hirnschnittpräparation

Aufbewahrungskammer	Plexiglas	Eigenbau
Brutschrank	Hera Cell	Haereus, Hanau
Cell Culture Plate Insert als Hirnschnitthalterung	Filter Millicell-CM, 0.4 µm	Millipore, Cork, Irland
Vibratom	VT 1000S VT 1200S	Leica, Nussloch, Deutschland Leica, Nussloch, Deutschland
Osmometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH, Berlin
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Messgeräte GmbH, Berlin
Leitfähigkeitsmessgerät	InoLab Cond Level 1	WTW, Weilheim

Chips

Bondwachs	Aquabond 55	Aquabond Technologies, USA
Package	Kyocera KD-P88639	Mosis, USA
Silikonkleber	Elastosil E 41	Wacker Chemie, München

Setup Eigenbauchips

Stereomikroskop	MS 5	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Zubehör dazu	Okularstutzen 445546 Schwenkarm	Wild / Leica Mikrosysteme, Wetzlar Eigenbau
Digitalkamera	Coolpix 950	Nikon GmbH, Düsseldorf
Funktionsgenerator	33120A	Hewlett Packard / Agilent, Böblingen
Heizelement	PID gesteuert	Eigenbau
Messkarte	NI PCI-6071E	National Instruments, München
Digital I/O	OPTO PCI	Kolter Electronic, Erftstadt
GPIB Karte	PCI-GPIB	National Instruments, München
Peristaltische Pumpe	Minipuls 3	Gilson, Middleton, USA
Mikromanipulator	PatchMan	Eppendorf, Hamburg
Referenzelektrode (Ag/AgCl Pellet)	E-206	Science Products, Hofheim
Verstärker für Elektrophysiologie	Axoclamp 2B	Axon Instruments, Foster City, USA
Mikropipettenrohlinge (Borosilikat)	1403547	Hilgenberg, Malsfeld
Mikropipetten Puller	DMZ-Universal-Puller	Zeitz Instruments, Augsburg
Pipettenbeschichtung	Sylgard 184	Dow Corning, MI, USA
Wolframelektroden	AMS 5753	Science Products, Hofheim
Stimulus Isolator	A360D	WPI, Berlin

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Geräte und Verbrauchsmaterialien

Setup CMOS-Chip (MTA)

Reizelektroden		
Matrix Electrode	MX21ABS(RM1)	FHC, St Bowdoin, USA
Auffichtmikroskop	BX50WI	Olympus, Hamburg
Objektive		Olympus, Hamburg Zeiss, Oberkochen
Kamera	PL-A776	PixeLINK, Ottawa, ON, Canada
Aufsatz für Kamera	180570	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Mikromanipulatoren	MPC-200	Sutter Instrument Company, Novato CA, USA
Brückenverstärker	BA-1S	NPI electronic GmbH, Tamm
Funktionsgenerator	33220A	Agilent Technologies, Böblingen
Peltier-Element	UEPT-41024	uwe electronic, Unterhaching
A/D Wandlung	CompuScope 1250	GaGe, Lockport IL, USA
Digital Out	CompuGen 3250	GaGe, Lockport IL, USA
DAQ Steuerrechner	PCIe-6259	National Instrument
zus. DAQ	USB-6008	National Instrument
Breakout Box	BNC-2110	National Instrument
Stabilisiertes Netzteil	E3631A	Agilent, Palo Alto, CA, USA
Peristaltische Pumpe	Perimax 12	Spetec, Erding
IR-Thermometer	561 HVACPro	Fluke, Kassel
PID-Heizelement		Eigenbau

A.4. Lösungen**ACSF I**

für Maus-Hirnschnitte verwendet

Angaben in mM

NaCl 125, KCl 2.5, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 26.0, NaH₂PO₄ 1.25, Glucose 25, CaCl₂ 2.5

pH = 7.4

Am Messtag frisch angesetzt. Aus: [Edw 89]

ACSF II

v.a. für Ratten-Hirnschnitte verwendet

Angaben in mM

NaCl 124, KCl 3, MgSO₂ 2.0, NaHCO₃ 26.0, KH₂PO₄ 1.25, Glucose 10, CaCl_{2,5} 2

pH = 7.4

Am Messtag frisch angesetzt. Aus: [Kor 96]

ACSF III

v.a. für Ratten-Hirnschnitte in Verbindung mit CCH verwendet

Angaben in mM

NaCl 126, KCl 3, MgSO₄ 2.0, NaHCO₃ 26.0, NaH₂PO₄ 1.25, Glucose 10, CaCl₂ 2

pH = 7.4

Am Messtag frisch angesetzt. Aus: [Man 05]

A.5. Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad	B. Braun AG, Melsungen
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bicucullin Methiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbachol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbogen O ₂ (95%)	Westfalen AG Münster
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylether	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haen
Epoxy-Harz	Epon EIR6001M, EpoxyLite International, Bradford, UK
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoba (Isoflouran)	Essex Tierarznei, München
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin P1399	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spülmittel FOR	Schnell-Chemie, München

A.6. Software

Dev-C++	Bloodshed Software (Freeware)
Comsol/Femlab	COMSOL Multiphysics GmbH, Göttingen
Igor Pro	WaveMetrics
LabView	National Instruments, München
Matlab	The MathWorks, München

B. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen teilweise standardisiert durch englischen Bezeichnungen

AC	kommissural/assoziativen Afferenz
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
ALD	Atomic Layer Deposition
AP	Aktionspotential
BIC	Bicucullin
BMI	Bicucullin-Methiodid
CA	Cornu ammonis
CCH	Carbachol (Carbamoylcholin)
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
CSD	current source density
DAC	Digital Analog Converter
DFT	Diskrete Fourier-Transform
EC	Entorhinaler Cortex
EEG	Elektroenzephalogramm
EOSFET	Electrolyte-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
FET	Field Effect Transistor
FFT	Fast Fourier Transformation
GD	Gyrus dentatus
h	Hilus
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
mAChR	muscarine Acetylcholin-Rezeptoren
MEA	Multi-Electrode Array, oft auch (planares) Metal-Electrode Array
MF	Moosfasern
mGluR	metabotrope Glutamat-Rezeptoren
MOSFET	Metal-Oxide-Silicon Field-Effect Transistor
MTA	Multi-Transistor Array

Fortsetzung nächste Seite

B. Abkürzungsverzeichnis

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

p*, z.B. p40	postnatal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMMA	Polymethylmethacrylat (Acrylglas)
pp	Tractus perforans, perforant pathway
PSD	Power Spectral Density
SC	Schaffer Kollateralen
pSpike	population Spike
Str.lac.mol., slm	Stratum lacunosum moleculare
Str.or., so	Stratum oriens
Str.pyr., sp	Stratum pyramidale
Str.rad., sr	Stratum radiatum
S	Subiculum
SWR	Sharp Wave Ripple

C. Abbildungsverzeichnis

1.1. Motivation: Akuter Hirnschnitt auf Transistorchip	2
2.1. Der Hippocampus im Gehirn der Ratte und als akut präparierter Hirnschnitt	6
2.2. Neuronale Projektionen im hippocampalen Hirnschnitt	8
2.3. Klassen neuronaler Oszillationen im Cortex von Ratten	9
2.4. Generation von Gamma Oszillationen im Hippocampus	12
3.1. Entstehung von Feldpotentialen im Hirnschnitt als Volumenleiter	16
3.2. Das gewählte Koordinatensystem im CA1 des Hippocampus	18
3.3. Geometrie des Hirnschnittmodells auf isolierendem Substrat	21
3.4. Geometrie des Hirnschnittmodells mit zusätzlichem Film Elektrolyt zwischen Schnitt und isolierendem Substrat	22
3.5. Geometrie des Hirnschnittmodells auf isolierendem Substrat mit Stimulationsspot	24
3.6. Auswirkung verschiedener Schichtdicken inaktiver Zellen auf die Verteilung des Feldpotentials im akuten Hirnschnitt auf isolierendem Substrat	28
3.7. Profile von Feldpotentialen maximaler Amplitude entlang eines Querschnitts senkrecht zum Substrat für verschiedene Dicken inaktiver Zellen	29
3.8. Abnahme maximal am Substrat messbarer Amplitude bei verschiedenen Schichtdicken inaktiver Zellen	30
3.9. Profile von Feldpotentialen entlang der x-Achse unterhalb, sowie mittig des Schnittes für Modell ohne Elektrolyt	31
3.10. Theoretische Verteilung der Feldpotentiale im Hirnschnitt auf isolierendem Substrat mit umgebendem Elektrolyt	32
3.11. Einfluss des Wasserfilms unterhalb des Slices auf Feldpotentiale: Profile entlang der z-Achse	33
3.12. Maximal erreichbare EPSP-Amplitude, abhängig von Wasserfilm sowie Schicht inaktiver Zellen	34
3.13. Profile von Feldpotentialen entlang der x-Achse am Substrat, sowie durch Mitte des Schnitts, mit und ohne Film aus Elektrolyt	35
3.14. Lösungen des Stimulationsmodells für kultivierten Schnitt und akuten Hirnschnitt, mit und ohne zusätzlicher Zwischenschicht Elektrolyt	37

3.15. Stimulationsprofile entlang der radialen Achse für einen kultivierten Hirnschnitt im Vergleich mit akuten Schnitten	38
4.1. Akute Hirnschnittpräparate aus dem Hippocampus einer Maus und einer Ratte	42
4.2. Schema des 128-FET Chips	46
4.3. Kennlinien eines p-Kanal Transistors der burid-channel Konfiguration	47
4.4. Ungeklebter bzw. fertig geklebter Chip mit Kammer	48
4.5. Layout und Aufbau des Loopchips	49
4.6. Layout des MTA Chips	50
4.7. Schematische Zeichnung eines CMOS Pixels mit Hirngewebe	51
4.8. Vereinfachter schematischer Aufbau der Messapparatur für die in der Abteilung gefertigten Chips	52
4.9. Vereinfachter schematischer Aufbau der Messapparatur für die CMOS-MTA Chips	55
4.10. Chip im Messverstärker mit Perfusionssystem und Klammer	57
5.1. Messung neuronaler Antworten entlang der Längsachse von CA1 Neuronen mit Transistoren	60
5.2. Mit Transistorarray gemessenes x-Profil senkrecht zum CA1	61
5.3. Schematische Seitenansicht eines akuten Hirnschnitts auf einem Transistorchip mit zusätzlicher Mikroelektrode	63
5.4. Fotografien von Hirnschnitt und Chipoberfläche	63
5.5. Transistorsignale des EPSP im Stratum radiatum um ausgewählten FET 107	65
5.6. Signale evozierter Feldpotentiale im Stratum radiatum des CA1, simultan gemessen mit Feldeffekttransistoren und Mikroelektrode	66
5.7. z-Profil evozierter Feldpotentiale im Stratum radiatum des CA1, gemessen mit Mikroelektrode bei simultaner Transistormessung	67
5.8. EPSP-Feldpotentiale im akuten Hirnschnitt auf einem Substrat: Theorie vs. Experiment	69
5.9. Übereinstimmung von Transistor- und Mikropipetten-Signal	71
6.1. Stimulation des CA3: Zeitaufgelöste Signalamplituden hinterlegt mit Foto des Slices	77
6.2. Hirnschnitt auf dem Sensorarray mit eingezeichneten Pfaden entlang des CA1	79
6.3. Querschnitte entlang der in Abb. 6.2 eingezeichneten Pfade	80
6.4. Transienten verschiedener Positionen bei unter- sowie überschwelliger Stimulation	81

6.5. Näherungsweise Übereinstimmung der Transienten aus den 4 Telexperimenten von Abb. 6.6	82
6.6. Zusammengesetzte Einzelframeansichten von Messungen nach 2 verschiedenen starken Stimulationspulsen	83
7.1. Epileptiforme Aktivität des CA3 unter Mg-freier ACSF	89
7.2. Ripple Oszillationen im Powerspektrum über alle Teilmessungen	91
7.3. Synchrone Ripples in der epileptiformen Antwort unter Verwendung Mg-freien Mediums	92
7.4. Kartierung der Ripplesoszillationen anhand Spektralanalysen	95
7.5. Signale entlang verschiedener Pfade innerhalb des Sensorarrays	97
8.1. Oszillationen in Feldpotentialen nach Zugabe von Carbachol	101
8.2. Querschnitte entlang je zweier Pfade bei 4 verschiedenen Positionen des Arrays nach Zugabe von 15 μm Carbachol	102
8.3. Kartierung der spektralen Leistungsdichten und zugehörigen relativen Phasen für benachbarte Extremstellen im Spektrum	105
8.4. Räumliche Verteilung spektraler Leistungsdichten für 2 eng beieinander liegender Extremstellen, zusammengesetzt nach verschiedenen Messpositionen	110
8.5. Spektrale Leistungsdichten eines Transistors während eines 120 min dauernden Zeitraumes bei schrittweiser Erhöhung der CCH-Konzentration	112
8.6. Änderung der Oszillationsfrequenz innerhalb einer 10 s langen Messung	113
A.1. Gegenüberstellung von Signalen aus dem CA1	117
A.2. Open-field Struktur im Hippocampuslice	118
A.3. Differenz zweier Messungen mit knapp unter- und überschwelliger Stimulation	119
A.4. Anfangsphase nach Stimulation unter Mg-freier ACSF	120
A.5. Schnelle Oszillationen (Ripples) im CA3 unter Mg-freier ACSF	122
A.6. Aktivität im Gyrus dentatus bei Mg-freier ACSF	123
A.7. Kartierung der spektralen Leistungsdichten und Phasen für Frequenzen mit lokalen Maxima und deren höhere Ordnungen I	125
A.8. Kartierung der spektralen Leistungsdichten und Phasen für Frequenzen mit lokalen Maxima und deren höhere Ordnungen II	127

D. Literaturverzeichnis

- [Alg 84] B. Alger und andere. 1984. „Brain Slice Methods“. In: R. Dingledine (Hrsg.), *Brain Slices*, S. 381–437, Plenum Press, New York.
- [All 09] H. Alle, A. Roth und J. R. P. Geiger. 2009. „Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers“. *Science*, **325**, S. 1405–1408.
- [Ama 04] D. Amaral und M. Witter. 2004. „Hippocampal formation“. In: *The Rat Nervous System*, S. 635–704, Academic Press.
- [Ama 07] D. Amaral und P. Lavenex. 2007. „Hippocampal Neuroanatomy“. In: P. Andersen (Hrsg.), *The Hippocampus Book*, S. 37–114, Oxford University Press.
- [And 07] P. Andersen (Hrsg.). 2007. *The Hippocampus book*. Oxford University Press.
- [And 71] P. Andersen, T. V. Bliss und K. K. Skrede. 1971. „Lamellar organization of hippocampal pathways“. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, **13**, S. 222–238.
- [Bar 07] M. Bartos, I. Vida und P. Jonas. 2007. „Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks“. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, S. 45–56.
- [Ber 29] H. Berger. 1929. „Electroencephalogram in humans“. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, **87**, S. 527–570.
- [Bes 02] B. Besl und P. Fromherz. 2002. „Transistor array with an organotypic brain slice: field potential records and synaptic currents“. *The European journal of neuroscience*, **15**, S. 999–1005.
- [Bra 95] A. Bragin, G. Jandó, Z. Nádasdy, J. Hetke, K. Wise und G. Buzsáki. 1995. „Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat“. *The Journal of neuroscience*, **15**, S. 47–60.
- [Bra 99] A. Bragin, J. Engel, C. L. Wilson, I. Fried und G. W. Mathern. 1999. „Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures“. *Epilepsia*, **40**, S. 127–137.
- [Buz 04] G. Buzsáki und A. Draguhn. 2004. „Neuronal oscillations in cortical networks“. *Science*, **304**, S. 1926–1929.

- [Buz 92] G. Buzsáki, Z. Horváth, R. Urioste, J. Hetke und K. Wise. 1992. „High-frequency network oscillation in the hippocampus“. *Science*, **256**, S. 1025–1027.
- [Chr 96] J. J. Chrobak und G. Buzsáki. 1996. „High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat“. *The Journal of neuroscience*, **16**, S. 3056–3066.
- [Chr 98] J. J. Chrobak und G. Buzsáki. 1998. „Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat“. *The Journal of neuroscience*, **18**, S. 388–398.
- [Csi 00] J. Csicsvari, H. Hirase, A. Mamiya und G. Buzsáki. 2000. „Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events“. *Neuron*, **28**, S. 585–594.
- [Din 84] R. Dingledine (Hrsg.). 1984. *Brain slices*. Plenum Press, New York.
- [Edw 89] F. A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann und T. Takahashi. 1989. „A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system“. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **414**, S. 600–612.
- [Ege 02] U. Egert, D. Heck und A. Aertsen. 2002. „Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices“. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, **142**, S. 268–274.
- [Eve 03] B. Eversmann, M. Jenkner, F. Hofmann, C. Paulus, R. Brederlow, B. Holzapfl, P. Fromherz, M. Merz, M. Brenner, M. Schreiter, R. Gabl, K. Plehnert, M. Steinhauser, G. Eckstein, D. Schmitt-Landsiedel und R. Thewes. 2003. „A 128 x 128 CMOS biosensor array for extracellular recording of neural activity“. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, **38**, S. 2306–2317.
- [Eve 05] B. Eversmann. 2005. *CMOS-basierte Sensorarrays zur Detektion extrazellulärer neuronaler Signale*. Dissertation, Technische Universität München.
- [Fel 00] J. M. Fellous und T. J. Sejnowski. 2000. „Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 Hz), theta (5-12 Hz), and gamma (35-70 Hz) bands“. *Hippocampus*, **10**, S. 187–197.
- [Fin 93] G. T. Finnerty und J. G. Jefferys. 1993. „Functional connectivity from CA3 to the ipsilateral and contralateral CA1 in the rat dorsal hippocampus“. *Neuroscience*, **56**, S. 101–108.
- [Fis 04] A. Fisahn, A. Contractor, R. D. Traub, E. H. Buhl, S. F. Heinemann und C. J. McBain. 2004. „Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations“. *The Journal of neuroscience*, **24**, S. 9658–9668.

- [Fis 98] A. Fisahn, F. G. Pike, E. H. Buhl und O. Paulsen. 1998. „Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro“. *Nature*, **394**, S. 186–189.
- [Fon 04] R. Fonseca, U. V. Nägerl, R. G. M. Morris und T. Bonhoeffer. 2004. „Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis“. *Neuron*, **44**, S. 1011–1020.
- [Fre 09] U. Frey, U. Egert, F. Heer, S. Hafizovic und A. Hierlemann. 2009. „Micro-electronic system for high-resolution mapping of extracellular electric fields applied to brain slices“. *Biosensors & bioelectronics*, **24**, S. 2191–2198.
- [Fro 02] P. Fromherz. 2002. „Sheet conductor model of brain slices for stimulation and recording with planar electronic contacts“. *European biophysics journal*, **31**, S. 228–231.
- [Fro 05] P. Fromherz. 2005. „The Neuron-Semiconductor Interface“. In: I. Willner und E. Katz (Hrsg.), *Bioelectronics: from theory to applications*, S. 339–394, WILEY-VCH, Weinheim.
- [Fro 91] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter und J. Weis. 1991. „A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor“. *Science*, **252**, S. 1290–1293.
- [Fro 93] P. Fromherz, C. Müller und R. Weis. 1993. „Neuron transistor: Electrical transfer function measured by the patch-clamp technique“. *Physical review letters*, **71**, S. 4079–4082.
- [Frs 06] E. Förster, S. Zhao und M. Frotscher. 2006. „Laminating the hippocampus“. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, S. 259–267.
- [Gei 02] J. R. P. Geiger, J. Bischofberger, I. Vida, U. Fröbe, S. Pfitzinger, H. J. Weber, K. Haverkamp und P. Jonas. 2002. „Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology“. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, **443**, S. 491–501.
- [Gho 06] G. Gholmieh, W. Soussou, M. Han, A. Ahuja, M.-C. Hsiao, D. Song, A. R. Tanguay und T. W. Berger. 2006. „Custom-designed high-density conformal planar multielectrode arrays for brain slice electrophysiology“. *Journal of neuroscience methods*, **152**, S. 116–129.
- [Gra 89] C. M. Gray und W. Singer. 1989. „Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, S. 1698–1702.
- [Han 01] H. Hanser (Hrsg.). 2001. *Lexikon der Neurowissenschaft*. Spektrum Akademischer Verlag.

- [Heu 02] M. O. Heuschkel, M. Fejtl, M. Raggenbass, D. Bertrand und P. Renaud. 2002. „A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices“. *Journal of neuroscience methods*, **114**, S. 135–148.
- [Hol 87] J. Holsheimer. 1987. „Electrical conductivity of the hippocampal CA1 layers and application to current-source-density analysis“. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, **67**, S. 402–410.
- [Hua 06] C.-W. Huang, Y.-J. Hsieh, J.-J. Tsai und C.-C. Huang. 2006. „Effects of lamotrigine on field potentials, propagation, and long-term potentiation in rat prefrontal cortex in multi-electrode recording“. *Journal of neuroscience research*, **83**, S. 1141–1150.
- [Huc 08] C. Huchzermeyer, K. Albus, H.-J. Gabriel, J. Otáhal, N. Taubenberger, U. Heinemann, R. Kovács und O. Kann. 2008. „Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state“. *The Journal of neuroscience*, **28**, S. 1153–1162.
- [Hut 04] M. Hutzler und P. Fromherz. 2004. „Silicon chip with capacitors and transistors for interfacing organotypic brain slice of rat hippocampus“. *The European journal of neuroscience*, **19**, S. 2231–2238.
- [Hut 06a] M. Hutzler, A. Lambacher, B. Eversmann, M. Jenkner, R. Thewes und P. Fromherz. 2006. „High-resolution multitransistor array recording of electrical field potentials in cultured brain slices“. *Journal of neurophysiology*, **96**, S. 1638–1645.
- [Hut 06b] M. Hutzler. 2006. *Kopplung von Halbleiterchips an organotypische Hirnschnitte: Stimulation, Detektion und Modulation neuronaler Aktivität*. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Physik.
- [Iso 08] Y. Isomura, Y. Fujiwara-Tsukamoto und M. Takada. 2008. „A network mechanism underlying hippocampal seizure-like synchronous oscillations“. *Neuroscience research*, **61**, S. 227–233.
- [Joh 99] D. Johnston und S. M.-S. Wu. 1999. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. MIT Press, 4.. Aufl.
- [Kop 06] M. V. Kopanitsa, N. O. Afinowi und S. G. N. Grant. 2006. „Recording long-term potentiation of synaptic transmission by three-dimensional multi-electrode arrays“. *BMC neuroscience*, **7**, p. 61.
- [Kor 96] M. Korte, O. Griesbeck, C. Gravel, P. Carroll, V. Staiger, H. Thoenen und T. Bonhoeffer. 1996. „Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1

- region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, S. 12547–12552.
- [Kre 08] G. J. Kress, M. J. Dowling, J. P. Meeks und S. Mennerick. 2008. „High threshold, proximal initiation, and slow conduction velocity of action potentials in dentate granule neuron mossy fibers“. *Journal of neurophysiology*, **100**, S. 281–291.
- [Lam 04] A. Lambacher, M. Jenkner, M. Merz, B. Eversmann, R. Kaul, F. Hofmann, R. Thewes und P. Fromherz. 2004. „Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μm resolution“. *Applied physics. A, Materials science & processing*, **79**, S. 1607–1611.
- [Lan 81] T. Langmoen und P. Andersen. 1981. „The hippocampal slice in vitro. A description of the technique and some examples of the opportunities it offers“. In: G. Kerkut und H. Wheal (Hrsg.), *Electrophysiology of Isolated Mammalian CNS Preparations*, p. 51–105, Academic Press, London.
- [LeB 02] F. E. N. LeBeau, S. K. Towers, R. D. Traub, M. A. Whittington und E. H. Buhl. 2002. „Fast network oscillations induced by potassium transients in the rat hippocampus in vitro“. *The Journal of physiology*, **542**, S. 167–179.
- [Lip 84] P. Lipton und T. Whittingham. 1984. „Energy metabolism and brain slice function“. In: R. Dingledine (Hrsg.), *Brain Slices*, p. 113–153, Plenum Press, New York.
- [Mac 89] B. A. MacVicar und F. W. Tse. 1989. „Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices“. *The Journal of physiology*, **417**, S. 197–212.
- [Man 05] E. O. Mann, J. M. Suckling, N. Hajos, S. A. Greenfield und O. Paulsen. 2005. „Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus in vitro“. *Neuron*, **45**, S. 105–117.
- [Man 07] E. O. Mann und O. Paulsen. 2007. „Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations“. *Trends in neurosciences*, **30**, S. 343–349.
- [McC 01] D. A. McCormick und D. Contreras. 2001. „On the cellular and network bases of epileptic seizures“. *Annual review of physiology*, **63**, S. 815–846.
- [Mee 07] J. P. Meeks und S. Mennerick. 2007. „Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons“. *Journal of neurophysiology*, **97**, S. 3460–3472.
- [Mit 85] U. Mitzdorf. 1985. „Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena“. *Physiological reviews*, **65**, S. 37–100.

- [Nov 88] J. L. Novak und B. C. Wheeler. 1988. „Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array“. *Journal of neuroscience methods*, **23**, S. 149–159.
- [Now 84] L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet und A. Prochiantz. 1984. „Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones“. *Nature*, **307**, S. 462–465.
- [Oka 99] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara und M. Taketani. 1999. „A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice“. *Journal of neuroscience methods*, **93**, S. 61–67.
- [Pap 07] C. Papatheodoropoulos. 2007. „NMDA receptor-dependent high-frequency network oscillations (100-300 Hz) in rat hippocampal slices“. *Neuroscience letters*, **414**, S. 197–202.
- [Pie 96] R. Pierret. 1996. *Semiconductor device fundamentals*. Addison-Wesley.
- [Pit 52] W. Pitts. 1952. „Investigation on synaptic transmission“. In: *Cybernetics*, Trans. 9th Conf. Josiah Macy Found, New York.
- [Plo 69] R. Plonsey. 1969. *Bioelectric Phenomena*. McGraw-Hill, New York.
- [Pre 97] W. H. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling und B. Flannery. 1997. *Numerical recipes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Rot 06] C. Roth-Alpermann, R. G. M. Morris, M. Korte und T. Bonhoeffer. 2006. „Homeostatic shutdown of long-term potentiation in the adult hippocampus“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, S. 11039–11044.
- [Sch 08] C. Schmidt-Hieber, P. Jonas und J. Bischofberger. 2008. „Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons“. *The Journal of physiology*, **586**, S. 1849–1857.
- [Sch 98] R. Schätzthauer und P. Fromherz. 1998. „Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents“. *The European journal of neuroscience*, **10**, S. 1956–1962.
- [She 03] G. M. Shepherd (Hrsg.). 2003. *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, USA, 5.. Aufl.
- [Shi 00] K. Shimono, F. Brucher, R. Granger, G. Lynch und M. Taketani. 2000. „Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices“. *The Journal of neuroscience*, **20**, S. 8462–8473.

- [Sin 93] W. Singer. 1993. „Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning.“. *Annual review of physiology*, **55**, S. 349–374.
- [Sta 04] C. Stangl. 2004. „Elektrische Kopplung akuter Hirnschnitte an Feldeffekttransistoren“. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Physik.
- [Sta 08] C. Stangl und P. Fromherz. 2008. „Neuronal field potential in acute hippocampus slice recorded with transistor and micropipette electrode“. *The European journal of neuroscience*, **27**, S. 958–964.
- [Ste 06] E.-M. Steidl, E. Neveu, D. Bertrand und B. Buisson. 2006. „The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays“. *Brain research*, **1096**, S. 70–84.
- [Syn 03] U. o. B. MRC Centre for Synaptic Plasticity. 2003. „Hippocampal pathways“. <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/info/pathway/hippocampal.htm>.
- [Sze 06] S. M. Sze und K. K. Ng. 2006. *Physics of Semiconductor Devices*. Wiley & Sons, 3. Aufl.
- [Tey 80] T. J. Teyler. 1980. „Brain slice preparation: hippocampus“. *Brain research bulletin*, **5**, S. 391–403.
- [Tra 01] R. D. Traub, N. Kopell, A. Bibbig, E. H. Buhl, F. E. LeBeau und M. A. Whittington. 2001. „Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks“. *The Journal of neuroscience*, **21**, S. 9478–9486.
- [Voe 05] M. Voelker und P. Fromherz. 2005. „Signal transmission from individual mammalian nerve cell to field-effect transistor“. *Small*, **1**, S. 206–210.
- [Voe 06] M. Voelker. 2006. *Detektion von Aktionspotentialen einzelner Säugetierneurone mit rauscharmen Feldeffekttransistoren nahe der thermodynamischen Messgrenze*. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Physik.
- [Wal 06] F. Wallrapp und P. Fromherz. 2006. „TiO₂ and HfO₂ in electrolyte-oxide-silicon configuration for applications in bioelectronics“. *Journal of applied physics*, **99**.
- [Whi 95] M. A. Whittington, R. D. Traub und J. G. Jefferys. 1995. „Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation“. *Nature*, **373**, S. 612–615.

- [Wie 09] M. Wiemhöfer. 2009. *Kapazitive Stimulation von Epithel- und Hirngewebe mit oxidierten Siliziumchips*. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Physik.
- [Ye 06] J. H. Ye, J. Zhang, C. Xiao und J.-Q. Kong. 2006. „Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons“. *Journal of neuroscience methods*, **158**, S. 251–259.
- [Zei 09] R. Zeitler. 2009. *Detektion von Spannungsfluktuationen in der Adhäsionsregion von Zellen mit Feldeffekttransistoren*. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Physik.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. Dr. P. Fromherz für die interessante Themenstellung, seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft

Herrn R. Pabst und Herrn Wagner für viele Arbeiten an den Setups

Martin Wiemhöfer für gemeinsame Chipprozessierung und Helge Vogl für Hilfestellungen im Reinraum

Ralf Zeitler, Martin Wiemhöfer, Max Eickenscheidt, Michael Hutzler und Christoph Hermann für viele wertvolle Tips und stete Diskussionsbereitschaft

Martin Wiemhöfer, Barbara Jacob, Ralf Zeitler, Max Eickenscheidt und Raimund Gleixner für Korrekturen in Teilen des Manuskripts

allen Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, die mich während dieser Zeit begleitet hat.