

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

**Konzeption eines  
*Patch-on-Chip*-Systems für  
Wirkstofftests und Grundlagenforschung  
an vernetzten adhärennten Zellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)  
der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Carsten Tautorat, geb. am 22.05.1979 in Rostock  
aus Rostock

Rostock, 31.10.2012

Datum der Verteidigung: 17.04.2013

## Gutachter

Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch

Universität Rostock, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa

Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Lehrstuhl Biophysik

Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter Hauptmann

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, Institut für Mikro- und Sensorsysteme

Mit größter Freude widme ich diese Arbeit dem  
*„dynamischen Duo“* Kalle und Kniffo.





## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Helmut Beikirch für die langjährige vertrauensvolle Unterstützung und für die Möglichkeit meine Dissertation an der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa danke ich für die stets hilfreiche Wissensvermittlung und die konstruktiven Kritiken, die meine Arbeit in den Jahren am Lehrstuhl für Biophysik positiv und zielführend beeinflusst haben.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Werner Baumann bedanke ich mich für die interessanten Projekte und Herausforderungen, für die aufbauende Unterstützung, und für alle tiefgehenden Diskussionen im Bereich der Elektrophysiologie, Elektronik und Chipstechnologie.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Philipp J. Köster bedanke ich mich für die freundschaftliche und gute Zusammenarbeit in den beiden Projekten MIBA und PoreGenic.

Abschließend möchte ich mich bei Denise Franz, Jessica Schröder, Uwe Scheffler, Thomas Kröger und Dr. rer. nat. Oliver Klink des PoreGenic-Projekts sowie den weiteren Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Biophysik bedanken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, dem Europäischen Sozialfond (ESF) sowie beim Land Mecklenburg Vorpommern danke ich für die Förderung des MIBA-Projektes, der folgenden Zwischenfinanzierung sowie des PoreGenic-Projektes.



# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Konzeption eines neuartigen *Patch-Clamp*-Systems, mit dem das Verhalten von adhärent wachsenden Zellnetzwerken automatisiert untersucht werden kann. Um Ganzzelleableitungen zu ermöglichen, wurde zunächst die Technik der lokalen Elektroporation mit mikrostrukturierten Nadelelektroden entwickelt. Die Membranöffnung wurde bspw. Fluoreszenzfärbungen, Rasterelektronenmikroskopie sowie *Focused-Ion-Beam*-Präparationen bestätigt.

Die Zellnetzwerke wurden auf Sensorchips mit 8×8 Nadelelektroden kultiviert und untersucht. Vier Elektrodentypen mit Höhen kleiner 10 µm, die sich in Material und Form unterscheiden, wurden charakterisiert und für Zelltests verwendet. Für die Experimente wurde ein chipbasiertes Messsystem mit softwaregesteuerter Elektronik für die Signalerfassung und Elektroporation realisiert. Modellbildung und Simulationen halfen geeignete Elektroporationsparameter für die Dimensionierung der Elektronik festzulegen. Die Arbeit stellt Ergebnisse von Untersuchungen an zellfreien und kultivierten Sensorchips vor. Durchgeführte extrazelluläre Signalableitungen an elektrisch aktiven Zellen zeigten hohe Signalamplituden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Beschreibung des aktuellen Standes der *Patch-Clamp*-Technik als Grundlage für das Systemkonzept. Der neuartige Ansatz der entwickelten Methode wird dadurch unterstrichen, dass alle existierenden, automatisierten Systeme ausschließlich für suspendierte Einzelzellen entwickelt worden sind. Bisher erlaubt nur die klassische (manuelle) *Patch-Clamp*-Technik die Signalableitung an vernetzten Zellen. Für den Stand der Technik wurden Systemstudien an automatisierten *Patch-Clamp*-Systemen durchgeführt, deren konzeptionelle Vor- und Nachteile in einer vergleichenden Zusammenfassung deutlich werden. Die wesentlichen Systemparameter wurden in Vergleichstabellen und detaillierten Systembeschreibungen im Anhang der Dissertation zusammengefasst.

Im Ausblick wird der aktuelle Entwicklungsstand des neuen *Patch-Clamp*-Systems mit 4×4 *Patch-Sites* beschrieben, mit dem bei ersten *Patch-Clamp*-Ableitungen an suspendierten Einzelzellen *Seal*-Widerstände über 0,5 GΩ erreicht wurden. Derzeit werden Experimente für die Optimierung der *Seal*-Widerstände an vernetzten adhären Zellkulturen durchgeführt.



## Abstract

This thesis reviews the current state of the automated patch-clamp techniques. Up to now, only the conventional (manual) patch-clamp technique allows for signal recordings from adherent cell networks. The thesis presents the concept of a novel system for the automatic patch-clamp analysis of adherent cell networks. To enable whole-cell patch-clamp recordings, the system exploits the new technique of local electroporation with microstructured needle electrodes. The local opening of the membrane was confirmed by fluorescence staining, scanning electron microscopy and focused ion-beam preparations, respectively.

Cell networks were cultured and investigated on sensor chips with 8×8 needle electrode arrays with a pitch of 100  $\mu\text{m}$ . Four types of needle electrodes of different shapes and materials were tested with heights of less than 10  $\mu\text{m}$ . For electroporation and signal recording, a chip-based setup with software controlled electronics has been developed. Modeling and simulation were used to determine electroporation parameters. Results are presented of investigations with cell-free and cell carrying sensor chips. Extracellular recordings showed high signal amplitudes. The innovative character of the new patch-clamp system is demonstrated by the fact that all existing automated systems were developed for suspended single cells only.

The outlook describes the current state of the development, a patch-clamp system with 4×4 patch sites. First patch-clamp recordings from suspended single cells were successful, with seal resistances above 0.5 G $\Omega$ .



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Physikalische Konstanten .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Motivation.....</b>	<b>4</b>
<b>3 Elektrophysiologie .....</b>	<b>7</b>
3.1 Einführung.....	7
3.2 Biologischer Hintergrund .....	7
3.2.1 Vereinfachter Aufbau einer biologischen Zelle.....	8
3.2.2 Zellmembran .....	9
3.2.3 Ionenkanäle.....	11
3.2.4 Transmembranpotential .....	13
3.3 Extrazelluläre Ableitungen .....	14
3.4 Intrazelluläre Ableitungen.....	16
<b>4 Patch-Clamp-Technik .....</b>	<b>18</b>
4.1 Klassisches <i>Patch-Clamp</i> .....	18
4.1.1 Allgemeiner Systemaufbau .....	19
4.1.2 <i>Patch</i> -Pipette .....	21
4.1.3 <i>Giga-Seal</i> -Abdichtung .....	22
4.1.4 Ganzzelleableitung.....	24
4.1.4.1 Durchführung einer klassischen Ganzzelleableitung .....	26
4.1.4.2 <i>Voltage-Clamp</i> -Modus .....	29
4.1.4.3 <i>Current-Clamp</i> -Modus.....	32

4.1.5	Kompensationsmethoden .....	34
4.1.5.1	Kapazitäten .....	34
4.1.5.2	Serienwiderstand.....	36
4.1.5.3	<i>Offset</i> -Spannungen.....	38
4.2	Automatisiertes <i>Patch-Clamp</i> (APC).....	39
4.2.1	Planare <i>Patch-Clamp</i> -Automatisierung.....	41
4.2.2	Nicht-planare <i>Patch-Clamp</i> -Automatisierung.....	42
4.3	Komparative Zusammenfassung .....	43
4.3.1	Stand der Technik: APC-Systeme .....	43
4.3.2	Vergleich: <i>Patch-Sites</i> .....	44
4.3.3	Vergleich: Automatisierte Systemkonzepte.....	46
4.3.4	Vergleich: APC-Signableitung .....	48
4.3.5	Vergleich: Grad der Automatisierung .....	49
4.3.6	Vergleich: Automatisiertes <i>Liquid-Handling</i> .....	50
4.4	Schlussfolgerung.....	50
<b>5</b>	<b>Elektroporation .....</b>	<b>51</b>
5.1	Elektroporation in der Konzeptidee .....	51
5.2	Elektroporation im homogenen Feld .....	53
5.3	Elektroporation im inhomogenen Feld .....	54
5.3.1	Elektroporation in der <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	54
5.3.2	Lokale Mikroinvasive Nadelspitzen-Elektroporation (LOMINE).....	55
5.3.3	Weitere Einflussgrößen auf die Elektroporation.....	57
5.4	Optimierung der LOMINE-Parameter.....	59
<b>6</b>	<b>Messsystem.....</b>	<b>61</b>
6.1	System-Konzept .....	61
6.2	Hardware .....	63
6.2.1	Sensorchip .....	65
6.2.1.1	Typisierung der Messelektroden.....	67



6.2.1.2	Dielektrophorese (DEP) Elektroden .....	70
6.2.1.3	Materialauswahl - Substrat .....	72
6.2.1.4	Chip-Träger .....	73
6.2.2	Signalerfassung .....	76
6.2.2.1	Spannungsmessung an der Nadelelektrode.....	77
6.2.2.2	<i>Voltage-Clamp</i> -Verstärker .....	79
6.2.2.3	Chip-Sockel .....	82
6.2.3	Zellmanipulation .....	84
6.2.4	Signalaufbereitung .....	86
6.2.4.1	Endverstärkung - Messsignale.....	87
6.2.4.2	Filter .....	88
6.2.4.3	Zeitmultiplexbetrieb.....	90
6.2.4.4	<i>Clipping</i> -Detektion .....	91
6.2.4.5	Signalanpassung – Analoge Steuersignale .....	92
6.2.5	Digitalisierung der Messsignale .....	92
6.2.6	Systemsteuerung .....	93
6.3	Systemsoftware.....	95
6.3.1	Auswertung der Sensorsignale .....	95
6.3.2	Graphische Benutzeroberfläche .....	98
6.3.3	Hilfswerkzeug für die Software-Erstellung.....	98
6.4	Peripherie .....	99
6.4.1	Badelektrode.....	99
6.4.2	Temperierung.....	99
6.4.3	Stromversorgung.....	102
6.4.4	Testchip .....	102
6.4.5	Chip-Positionserkennung .....	103
6.4.6	Chip-Identifizierung.....	104
<b>7</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>107</b>
7.1	Zellfreie Untersuchungen.....	107
7.1.1	Defekte Nadelelektroden.....	107

7.1.2	Elektrodenwiderstand .....	108
7.1.3	Spannungsänderung nach dem Elektroporationspuls .....	109
7.2	Versuche mit Zellkulturen .....	110
7.2.1	Biokompatibilität .....	110
7.2.2	Variabilität im Zellwachstum .....	111
7.2.3	Selektivität der Zellmanipulation .....	111
7.2.4	Nachweis der Porenbildung .....	112
7.2.5	<i>Focused Ion Beam</i> (FIB)-Präparation .....	115
7.2.6	Überlebensrate der Zellen .....	116
7.2.7	Ableitung des Transmembranpotentials .....	116
7.2.8	Extrazelluläre Messungen .....	117
7.2.9	Zellpositionierung .....	118
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>123</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>138</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>179</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Chipbasiertes Labormuster .....	2
Abbildung 3-1: Vernetzte Zellkultur und Aufbau einer tierischen Zelle.....	8
Abbildung 3-2: Aufbau und elektrische Eigenschaften der Zellmembran.....	10
Abbildung 3-3: Querschnitt einer Zelle.....	11
Abbildung 3-4: Öffnen und Schließen eines Ionenkanals .....	13
Abbildung 3-5: Extrazelluläre Signalableitung .....	15
Abbildung 3-6: Methoden für intrazelluläre Ableitungen - Eine Auswahl .....	16
Abbildung 4-1: Klassische <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	19
Abbildung 4-2: Klassischer <i>Patch-Clamp</i> -Aufbau .....	20
Abbildung 4-3: Ausbildung eines <i>Giga-Seals</i> .....	24
Abbildung 4-4: Ganzzelleableitung im <i>Voltage-Clamp</i> -Modus.....	26
Abbildung 4-5: Durchführung einer Ganzzelleableitung.....	28
Abbildung 4-6: <i>Voltage-Clamp</i> -Modus .....	31
Abbildung 4-7: <i>Current-Clamp</i> -Messung .....	33
Abbildung 4-8: Prinzip-Darstellung Kapazitätskompensation .....	35
Abbildung 5-1: Porenbildung durch Elektroporation.....	52
Abbildung 5-2: Prinzipdarstellung Elektroporation .....	53
Abbildung 5-3: LOMINE.....	56
Abbildung 6-1: Konzeptidee der <i>Patch-Site</i> .....	62
Abbildung 6-2: Grundaufbau des Messsystems.....	63
Abbildung 6-3: Grundaufbau der Hardware.....	63
Abbildung 6-4: Hardwarekomponenten des Labormusters .....	64
Abbildung 6-5: Grundaufbau einer Nadelelektrode .....	66
Abbildung 6-6: Grundaufbau des Sensorchips .....	67
Abbildung 6-7: Aufbau einer Platin-Nadelelektrode (Typ A).....	68
Abbildung 6-8: Aufbau einer Galvanik-Silber-Nadelelektrode (Typ B) .....	69
Abbildung 6-9: Aufbau einer Platin-Hohlnadelelektrode (Typ C).....	69
Abbildung 6-10: Aufbau einer Massiv-Silber-Nadelelektrode (Typ D) .....	70
Abbildung 6-11: DEP-Elektroden .....	72
Abbildung 6-12: Zusammenbau Sensorchip (68-CLCC) .....	73

<b>Abbildung 6-13: Zusammenbau Sensorchip (<i>Flip-Chip-Bonding</i>)</b> .....	74
<b>Abbildung 6-14: Ersatzschaltbild Chip-Träger: 68-CLCC vs. Flip-Chip</b> .....	75
<b>Abbildung 6-15: Kanal-zu-Kanal-Isolation: 68-CLCC vs. Flip-Chip</b> .....	75
<b>Abbildung 6-16: Spannungsmessung an den Nadelelektroden</b> .....	77
<b>Abbildung 6-17: <i>Voltage-Clamp</i>-Messkanal</b> .....	80
<b>Abbildung 6-18: Messbereich <i>Voltage-Clamp</i>-Verstärker</b> .....	81
<b>Abbildung 6-19: Elektrisches Ersatzschaltbild Chip-Sockel (Yamaichi)</b> .....	83
<b>Abbildung 6-20: Elektrische Zellmanipulation</b> .....	85
<b>Abbildung 6-21: Grundaufbau der Signalaufbereitung (Konzeptidee)</b> .....	87
<b>Abbildung 6-22: Datenkonvertierung in Textdatei</b> .....	96
<b>Abbildung 6-23: Datenanalyse und -auswertung</b> .....	97
<b>Abbildung 6-24: Graphische Benutzeroberfläche</b> .....	98
<b>Abbildung 6-25: Temperierung des Messsystems</b> .....	101
<b>Abbildung 6-26: Langzeittemperierung</b> .....	102
<b>Abbildung 6-27: Testchip</b> .....	103
<b>Abbildung 6-28: Chip-Identifizierung</b> .....	106
<b>Abbildung 7-1: Defekte Nadelelektroden</b> .....	107
<b>Abbildung 7-2: Elektrodenwiderstände</b> .....	108
<b>Abbildung 7-3: Variabilität im Zellwachstum</b> .....	111
<b>Abbildung 7-4: Totfärbung mit Trypanblau</b> .....	112
<b>Abbildung 7-5: Nachweis der Porenbildung mittels Fluoreszenzfärbung</b> .....	113
<b>Abbildung 7-6: Blasenbildung bei hoher Feldstärke</b> .....	114
<b>Abbildung 7-7: FIB-Präparation an zellbesetzten Sensorchips</b> .....	115
<b>Abbildung 7-8: Extrazelluläre Signalableitung von HMZ (Maus)</b> .....	117
<b>Abbildung 7-9: Extrazelluläre Signalableitung von HMZ (Ratte)</b> .....	118
<b>Abbildung 9-1: PoreGenic® <i>Hand-Setup 1.0</i></b> .....	124

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Überblick <i>APC</i> -Systeme.....	40
Tabelle 4-2: Vor- und Nachteile des klassischen <i>Patch-Clamps</i> .....	41
Tabelle 4-3: Vor- und Nachteile des automatisierten <i>Patch-Clamps</i> .....	41
Tabelle 5-1: Elektroporation in der <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	55
Tabelle 6-1: Borosilikatglas- vs. Silizium-Substrat.....	72
Tabelle 6-2: Eigenschaften Operationsverstärker OPA129UB.....	79
Tabelle 6-3: Digitalisierung von <i>Patch-Clamp</i> -Daten .....	93

# Abkürzungsverzeichnis

## Kleine Buchstaben (Latein)

an	Index für Anionen (Goldman-Gleichung)
c	Konzentration
cSEVC	Kontinuierliches Einzel-Elektroden- <i>Voltage-Clamp</i> (englisch: <i>continuous single-electrode voltage-clamp</i> )
d	Kreisdurchmesser in m
d <sub>A</sub>	Außendurchmesser in m
dSEVC	Diskontinuierliches Einzel-Elektroden- <i>Voltage-Clamp</i> (englisch: <i>discontinuous single-electrode voltage-clamp</i> )
d <sub>I</sub>	Innendurchmesser in m
d <sub>Z</sub>	Zelldurchmesser in m
f <sub>-3dB</sub>	Grenzfrequenz (-3 dB) in Hz
hERG-Kanal	Spannungsaktivierter Kaliumkanal in Herzmuskelzellen (englisch: <i>human Ether-a-go-go Related Gene channel</i> )
ka	Index für Kationen (Goldman-Gleichung)
k.a.	Keine Angaben
t	Zeit in s
thinXXS	thinXXS Microtechnology AG (Zweibrücken, Deutschland)
z	Wertigkeit von Ionen

## Große Buchstaben (Latein)

AB	schwedische Form der Aktiengesellschaft
AFM	Rasterkraftmikroskopie (englisch: <i>Atomic Force Microscopy</i> )
A <sub>perm</sub>	Fläche des permeablen Bereiches (Elektroporation)
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
Alu-Block	Aluminium-Block
A <sub>M</sub>	Membranoberfläche in m <sup>2</sup>
APC-System	Automatisiertes <i>Patch-Clamp</i> -System
A/S	dänische Form der Aktiengesellschaft
AVIVA	AVIVA Biosciences Corp.

	jetzt: Aviva Systems Biology, Corp. (San Diego, Kalifornien, USA)
B	Breite in m
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BV	niederländische Kapitalgesellschaft mit beschränkter Haftung
C	Kapazität in F
$C_1$	Kopplungskapazität in F
CCS AG	Cytocentrics AG jetzt: Cytocentrics Bioscience GmbH (Rostock, Deutschland)
CCS BV	Cytocentrics BV (Eindhoven, Niederlande)
$C_e$	Summe aller wirksamen Eingangskapazitäten in F
Cellectricon	Cellectricon AB (Mölnal, Schweden)
$C_{EL}$	Frequenzabhängige Kapazität einer Elektrode (Ersatzschaltbild) in F (in der Literatur wird $C_{EL}$ häufig für $f = 1$ kHz angegeben)
CHO-Zellen	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (englisch: <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> )
$C_{INJ}$	Kapazität in F (Komponente der Kapazitätskompensation)
$C_K$	Kapazität in F (Komponente der Kapazitätskompensation)
$C_M$	Membrankapazität in F
$C_M^*$	Flächenspezifische Membrankapazität in $F \cdot m^{-2}$
CLCC	Chip-Träger (englisch: <i>Ceramic Leadless Chip Carrier</i> )
CMOS	Komplementärer Metall-Oxid-Halbleiter (englisch: <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i> )
Dagan	Dagan Corp. (Minneapolis, Minnesota, USA)
DEP	Dielektrophorese (Zellpositionierung)
DIV	Tage <i>in vitro</i> (englisch: <i>days in vitro</i> )
DOE	Statistische Versuchsplanung (englisch: <i>Design of Experiments</i> )
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRIE	Reaktives Ionentiefenätzen (englisch: <i>deep reactive ion etching</i> )
$E$	Elektrisches Feld
E19	Tag der embryonalen Entwicklung (in dem Fall 19. Tag nach der Befruchtung)
EEPROM	<i>Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory</i>
ESB	Ersatzschaltbild

FBA	Rückkopplungsverstärker (englisch: <i>feedback-amplifier</i> )
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (englisch: <i>Food and Drug Administration</i> )
FIB	Fokussierter Ionenstrahl (englisch: <i>Focused Ion Beam</i> )
Fluxion	Fluxion Biosciences Inc. (South San Francisco, Kalifornien, USA)
Flyion	Flyion GmbH (Tübingen, Deutschland)
FR-4	Standard Basismaterial für Leiterplatten aus Epoxidharz mit Glasfasergewebe (englisch: <i>Flame Retardant</i> )
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
$G_M$	Membranleitwert in S
H	Höhe in m
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEK-Zelle	Menschliche embryonale Nierenzelle (englisch: <i>Human Embryonic Kidney cell</i> )
HEKA	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH (Lambrecht i. d. Pfalz, Deutschland)
HMZ	Herzmuskelzelle
HSF	Menschlicher Hautfibroblast (englisch: <i>Human Skin Fibroblast</i> )
HTS	Hochdurchsatzuntersuchung (englisch: <i>High Throughput Screening</i> )
$I_{64}$	Gesamtstrom von 64 abgeleiteten Zellen in A (IonWorks™ Quattro)
IEF	Fakultät für Informatik und Elektrotechnik der Universität Rostock
IGS	Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik (Universität Rostock)
$I_i$	Ionenstrom in A
IMTEK	Institut für Mikrosystemtechnik
$I_K$	Kompensationsstrom in A (Komponente der Kapazitätskompensation)
$I_{\text{Offset}}$	Stromantwort auf einen Testpuls im <i>Voltage-Clamp</i> -Modus in A
$I_{\text{PIP}}$	Strom über die Pipette gemessen in A
$I_{R,\text{eff}}$	Effektiver Rauschstrom in A
IWM	Institut für Werkstoffmechanik
KCl	Kaliumchlorid
L	Länge in m
$L_1$	Induktivität in H (Ersatzschaltbild)
L929	Mausfibroblasten-Zelllinie
LCC	Chip-Träger (englisch: <i>Leadless Chip Carrier</i> )



LIMS	Labor-Informations- und Managment-System
LLC	US-amerikanische Kapitalgesellschaft
LOMINE	LOkale MikroInvasive NadelElektroporation
MEA	Multielektrodenanordnung (englisch: <i>Multi Electrode Array</i> )
MCS	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
MD	Molecular Devices LLC (Sunnyvale, Kalifornien, USA)
MIBA	Mikrostrukturen und Methoden für die Intrazelluläre Bioanalytik
MPSA	Multi- <i>Patch</i> -Stellen-Array (englisch: <i>Multi Patch Site Array</i> )
NaCl	Natriumchlorid
Nanion	Nanion Technologies GmbH (München, Deutschland)
NaOH	Natriumhydroxid
NPI	npi electronic GmbH (Tamm, Deutschland)
$P$	Permeabilitätskoeffizient der Goldman-Gleichung in $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
PCB	Leiterplatte (englisch: <i>printed circuit board</i> )
PES	Polyethersulfon
PGA	Programmierbarer Verstärker (englisch: <i>Programmable Gain Amplifier</i> )
PID	Reglertyp (Proportional-Integral-Differenzierer)
PMMA	Polymethylmethacrylat
POM	Polyoxymethylen
PPC	<i>Population-Patch-Clamp</i>
Pt100	Platin-Temperatursensor mit $R_0 = 100 \Omega$
Pt1000	Platin-Temperatursensor mit $R_0 = 1 \text{ k}\Omega$
$R$	Ohmscher Widerstand in $\Omega$ , Gaskonstante ( $R = N_A \cdot k_B$ )
$R_0$	Nennwiderstand von Platin-Temperatursensoren in $\Omega$ bei $T = 0 \text{ }^\circ\text{C}$
$R_1$	Kurzschlusswiderstand in $\Omega$
$R_2$	Isolationswiderstand in $\Omega$
$R_{\text{Access}}$	<i>Access</i> -Widerstand in $\Omega$ (durch Verunreinigung der Pipettenöffnung mit Zellmaterial)
$R_e$	Wirksamer Eingangswiderstand in $\Omega$ (setzt sich aus verschiedenen Teilen, wie Oberflächenpassivierung des Sensorchips, Verstärkereigenschaften, Platinenmaterial etc. zusammen)
$R_{\text{EL}}$	Frequenzabhängiger Widerstand einer Elektrode (Ersatzschaltbild) in $\Omega$

	(in der Literatur wird $R_{EL}$ häufig für $f = 1$ kHz angegeben)
$R_F$	Rückkopplungswiderstand in $\Omega$
$R_K$	Widerstand in $\Omega$ (Komponente der Kapazitätskompensation)
$R_L$	Lastwiderstand in $\Omega$
$R_M$	Membranwiderstand in $\Omega$
$R_M^*$	Flächenspezifischer Membranwiderstand in $\Omega \cdot m^2$
$R_{Patch}$	Widerstand des Membranflecks in $\Omega$
$R_{PIP}$	Pipettenwiderstand in $\Omega$
$R_S$	Serienwiderstand in $\Omega$
$R_{Seal}$	Abdichtwiderstand in $\Omega$
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFID	<i>Radio-Frequency IDentification</i>
RNS	Ribonukleinsäure
SBS	<i>Society for Biomolecular Screening</i>
$Si_3N_4$	Siliziumnitrid
$SiO_2$	Siliziumoxid
Sophion	Sophion Bioscience A/S (Ballerup, Dänemark)
$T$	Absolute Temperatur in K ( $T = 298,15$ K = 25 °C, Raumtemperatur)
Tecella	Tecella LCC (Foothill Ranch, Kalifornien, USA)
$T_{EP}$	Pulsdauer eines einzelnen Impulses in s
TEVC	Zwei-Elektroden- <i>Voltage-Clamp</i> (englisch: <i>Two-electrode voltage-clamp</i> )
TiW	Titan-Wolfram (Haftschicht bei der Chip-Prozessierung)
$U'$	Transmembranpotential in V
$U_A$	Ausgangsspannung in V
$U_B$	Betriebs- bzw. Versorgungsspannung in V
$U_{EL}$	An der Nadelelektrode gemessene Spannung in V
$U_{EP}$	Spannungsamplitude des Elektroporationssignals in V
$U_e$	Eingangsspannung in V
$U_{eff}$	Effektivwert in V
$U_{Feld}$	Von einem elektrischen Feld hervorgerufene Potentialdifferenz in der Zellmembran, die das Ruhemembranpotential überlagert in V ( $U_M = U_{Feld} + U_{MRuhe}$ )
$U_{LSB}$	kleinste Quantisierungsstufe bei der Digitalisierung

$U_M$	Aktuelles Transmembranpotential in V ( $U_M = \varphi_i - \varphi_a$ )
$U_{MRuhe}$	Ruhemembranpotential in V (beschreibt den Fließgleichgewichtszustand; entspricht der Goldman-Gleichung)
$U_{PIP}$	Pipettenspannung in V
$U_{Steuer}$	Steuerspannung in V
USB	Seriellles Bussystem zur Verbindung eines Rechners mit einem externen Gerät (englisch: <i>Universal Serial Bus</i> )
$V$	Verstärkungsfaktor
$Z_e$	Eingangsimpedanz in $\Omega$ ( $Z_e = C_e \parallel R_e$ )
$Z_{EL}$	Elektrodenimpedanz in $\Omega$ ( $Z_{EL} = C_{EL} \parallel R_{EL}$ )
$Z_s'$	Realteil der Impedanz in $\Omega$
$Z_s''$	Imaginärteil der Impedanz in $\Omega$

### Griechische Buchstaben

$\alpha$	größter Winkel, bei dem das Transmembranpotential die Durchbruchspannung erreicht (Elektroporation)
$\Delta f$	Bandbreite (-3 dB) in Hz
$\epsilon_r$	Relative Permittivität in $A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$
$\tau$	Ladezeitkonstante eines $RC$ -Gliedes ( $\tau = R \cdot C$ ) in s
$\varphi_i$	elektrisches Potential im Zellinneren in V
$\varphi_a$	elektrisches Potential des Außenmediums in V

## Physikalische Konstanten

$\varepsilon_0 = 8,854188 \cdot 10^{-12} \cdot \text{F} \cdot \text{m}^{-1}$	Permittivität des Vakuums
$F = 9,64853 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$	Faraday-Konstante
$h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ W} \cdot \text{s}^2$	Plancksches Wirkungsquantum
$k_B \approx 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ W} \cdot \text{s} \cdot \text{K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	Avogadro-Konstante
$R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	allgemeine Gaskonstante ( $R = N_A \cdot k_B$ )

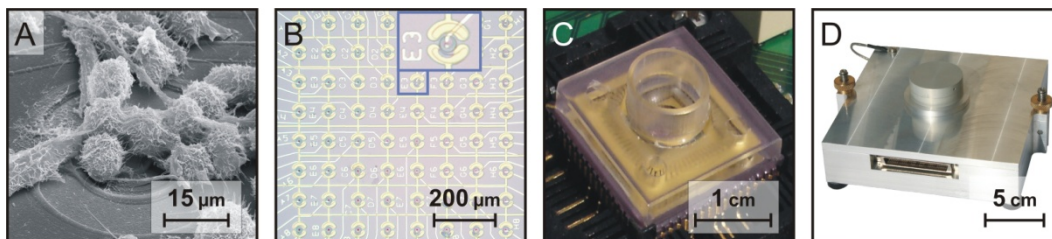
„Was immer der Mensch denkt, fühlt oder tut, Ionenkanäle in Zellmembranen sind an den zugrundeliegenden Prozessen beteiligt.“ [1]

## 1 Einleitung

Die bislang offenen Fragestellungen für das Verständnis lebender Organismen und ökologischer Systeme werden zunehmend durch die fachübergreifende Verknüpfung von Ingenieurs- und Biowissenschaften im *Life Science Engineering* bearbeitet. Die daraus resultierenden Biotechnologien liefern Werkzeuge für Anwendungen und Methoden in den Bereichen der biomedizinischen sowie der Grundlagen-Forschung. Sie bieten damit wesentliche Ansatzpunkte zur Aufklärung biologischer Mechanismen und der zielgerichteten Bekämpfung von Krankheiten. Große Herausforderungen bestehen hier vor allem in der Umsetzung geeigneter Methoden zur nicht-invasiven Untersuchung der biologischen Systeme.

Am Lehrstuhl für Biophysik (Leitung: Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Gimsa, Universität Rostock) werden Biotechnologien für verschiedenste Anwendungen entwickelt. Chipbasierte Zell-Manipulations- und *Monitoring*-Systeme dienen hierbei der elektrophysiologischen Untersuchung von lebenden biologischen Zellen [2]. An diesen Forschungsarbeiten sind in enger Kooperation weitere Forschungseinrichtungen wie der Lehrstuhl Elektronische Bauelemente und Schaltungstechnik (Leitung: Prof. Dr.-Ing. habil. H. Beikirch, Universität Rostock) sowie Firmen wie die Micronas GmbH (Freiburg im Breisgau, Deutschland) und die Gesellschaft fuer Silizium-Mikrosysteme mbH (Grosserkmannsdorf, Deutschland) beteiligt. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag bislang in der Konzeption, Umsetzung und Anwendung von chipbasierten Sensorsystemen für die extrazelluläre Ableitung von Aktionspotentialen elektrisch aktiver Zellen in Kombination mit der multiparametrischen Analyse von Zellaktivitäten (Ansäuerung, Adhäsion, Temperatur etc.). Die aktuellen Themen behandeln jedoch auch zunehmend die intrazelluläre Analytik, deren Fortschritte in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden. **Abbildung 1-1** gibt eine Vorschau auf das realisierte chipbasierte Labormuster, das vor allem für grundlegende Versuche zur lokalen Öffnung von Zellmembranen lebender biologischer Zellen konzipiert wurde. Das Labormuster war ein erster Schritt zur Schaffung des **PoreGenic**<sup>®</sup>-Messsystems für elektrophysiologische Untersuchungen an vernetzten adhärennten Zellen.

Im Anwendungsfeld der intrazellulären Analytik gilt die *Patch-Clamp*-Technik weltweit als „Goldstandard“ für die Untersuchung von Ionenkanälen. Ionenkanäle, die sich als porenbildende Proteine in der Zellmembran fast aller Zelltypen befinden, spielen bei der Zell-Zell-Kommunikation eine entscheidende Rolle [3]. Als elektrische „Torhüter“ sind sie in den Zellmembranen von elektrisch aktiven Zellen zuständig für die Generierung und Ausbreitung von Nervenimpulsen, für die Muskelkontraktion sowie für viele weitere biologische Prozesse [4]. Von großem Interesse sind Ionenkanäle auch in der Pharmaforschung und Medizin, da sie im Kampf gegen viele Krankheiten den Wirkort für Medikamente darstellen. Eine aktuelle Abschätzung zur Marktsituation dieser Medikamente ist [5] zu entnehmen. Ionenkanäle stehen demnach an dritter bzw. vierter Stelle der wichtigsten Wirkorte für Medikamente [6]. Die primäre Wirkungsweise bei zwei der insgesamt achtzehn im Jahr 2006 von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) neu zugelassenen molekularen Wirkstoffe beruhte auf der Beeinflussung von Ionenkanälen [7]. Dies liegt darin begründet, dass viele Krankheiten auf fehlerhafte Funktionen einzelner Ionenkanäle zurückzuführen sind. Einige dieser als *Channelopathien* bezeichneten Krankheiten sind in [8, 9] aufgelistet. Beispielsweise kommt es bei der genetisch vererbaren Mukoviszidose zu Fehlfunktionen der Chloridionenkanäle und in der Folge zu dem typischen zähen, klebrigen Schleim in der Lunge, Geschlechtsorganen etc.



**Abbildung 1-1: Chipbasiertes Labormuster**

**A:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme einer Zellkultur (L929 Mausfibroblasten, 3 DIV) auf einem Sensorchip. Nadelelektrode (Mitte) verdeckt von Zellen. Vordergrund: Nierenförmige Elektrode zur dielektrophoretischen (DEP) Zellpositionierung. Chiptyp A. Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle.  
**B:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines zellfreien 8x8-*Multi-Patch-Site-Arrays* (MPSA). Elektrodenabstand 100 µm. Jeweils zwei nierenförmige DEP-Elektroden liegen um eine Nadelelektrode. Definierte Zuordnung der Elektroden durch integrierte Beschriftung. Chiptyp A. Vergrößerte Darstellung (blauer Kasten) von Elektrode E3. Umgezeichnete eigene Abbildung [10]. **C:** Sensorchip eingesetzt in den Chip-Sockel des Labormusters. **D:** Labormuster für parallele Signalleitungen und lokale Elektroporationsversuche an 15 Nadelelektroden. Temperiertes Gehäuse aus Aluminium.

Wirkstoffe von pharmakologischem Interesse werden mit der *Patch-Clamp*-Technik untersucht, indem ihre Fähigkeit getestet wird Ionenkanäle bestimmter Zelltypen gezielt zu blockieren oder zu aktivieren. Dadurch hat die *Patch-Clamp*-Technik in der gesamten

*Life Sciences* und speziell im Pharmaentwicklungsbereich eine besondere Bedeutung. Sie bietet damit die Möglichkeit das Verhalten einzelner Ionenkanäle zu analysieren, um deren Eignung als Zielmolekül (englisch: *target molecule*) für die Wirkstoffentwicklung zu untersuchen. Allerdings verhinderten bis noch vor wenigen Jahren der hohe Arbeitsaufwand und der geringe Durchsatz ihre breite Anwendung in der Medikamentenentwicklung. Heutzutage gibt es jedoch eine, wenn auch überschaubare, Zahl an kommerziellen, automatisierten *Patch-Clamp*-Systemen (*APC*-Systeme), mit denen eine wesentlich höhere Durchsatzrate erreicht werden kann (**4.2**). Darüber hinaus sind diese Systeme weniger arbeitsintensiv als das klassische (manuelle) *Patch-Clamp*. Der Einsatzbereich der *APC*-Systeme ist jedoch auf abgelöste, vereinzelte Zellen in Suspension beschränkt, obwohl ca. 95 % der ca. 220 menschlichen Zelltypen in adhären Zellnetzwerken leben [11]. Für eine direkte Untersuchung von adhären wachsenden Zellen bzw. Zellverbänden auf einer Kulturfläche wurden in zwei Patentfamilien bereits verschiedene Verfahren und Methoden skizziert, die als Ausgangspunkt für die durchgeführte Systemkonzeption in **Kapitel 6** dienten [12, 13].

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Mikrostrukturen und Methoden für die Intrazelluläre Bioanalytik - MIBA“ (Förderkennzeichen: 16SV2339) wurde am Lehrstuhl für Biophysik das Labormuster eines chipbasierten Messsystems für die Erprobung der lokalen Elektroporation konzipiert, umgesetzt und getestet. Diese Arbeiten erfolgten für ein neuartiges *Patch-Clamp*-System namens PoreGenic® mit dem Ziel ein Öffnungswerkzeug für Zellmembranen zu erproben und so Ganzzelleitungen an adhären wachsenden Zellen durchführen zu können.

Ein Großteil der Arbeiten am Sensorchip (Maskendesign, Prozessierung, Fertigung etc.) wurde von Dr.-Ing. J. Held und Kollegen unter der Leitung von Prof. Dr. O. Paul am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt. Der Bereich der Zellbiologie (Zellkultur, dielektrophoretische Zellpositionierung etc.) aber auch technische Tätigkeiten wurden von Dr. rer. nat. P. J. Köster am Lehrstuhl für Biophysik an der Universität Rostock übernommen. Die Konzeption, Realisierung, Testung sowie die Inbetriebnahme des Messsystems für Signalleitungen an Zellnetzwerken, Versuche zur elektrischen Zellmanipulation, Datenauswertung etc. wurden vom Autor durchgeführt [10, 14-16]. Die verschiedenen Arbeitsschwerpunkte wurden in zahlreichen, teils gemeinsamen Beiträgen veröffentlicht [10, 11, 14-29].

„The most accurate and reliable procedure for measuring inhibition of hERG currents is voltage clamp using the whole-cell configuration of the patch clamp technique, ...“ [30]

## 2 Motivation

Ziel der Arbeit war es, ein *Patch-Clamp*-System für Ganzzelleableitungen an adhären wachsenden Zellen zu konzipieren und erste Funktionen in einem chipbasierten Labormuster umzusetzen. Dafür sollte ein Sensorchip mit mehreren Mikrostrukturen versehen werden, sodass gleichzeitig Zellmanipulationen als auch Signalleitungen an verschiedenen Stellen in einem Zellverband erfolgen konnten. Die Mikrostrukturen wurden in Form eines gleichmäßig verteilten *Multi-Patch-Site-Arrays* (MPSA) ausgerichtet (**Abbildung 1-1 B**). Mit der Bezeichnung MPSA wird eine eindeutige Abgrenzung zu den planaren Multielektrodenanordnungen (MEAs) für extrazelluläre Ableitungen an elektrisch aktiven Zellen vorgenommen. Um in die Konfiguration der Ganzzelleableitung zu gelangen, sollte die Methodik der lokalen Elektroporation angewendet und auf ihre Eignung hin überprüft werden. Elektroporation wird in der Biologie als Standardmethode bspw. für die Gentransfektion, Zellfusion und zum Einbringen von Molekülen (Fluoreszenzmarker etc.) verwendet [31]. Es war zu klären, inwieweit von Zellen überwachsene Mikroelektroden durch lokale Elektroporation die Zellmembran so penetrieren können, dass die Qualität des klassischen *Patch-Clamp* erreicht werden kann. Anhand des in dieser Arbeit dargelegten Labormusters und ersten Testmessungen werden wesentliche Funktionen des entwickelten Systems beschrieben und validiert.

Von der Entwicklung sollen mehrere Anwendungsgebiete der biomedizinischen und der Grundlagen-Forschung profitieren. Hierzu zählen u. a. die intrazelluläre Analytik, die Genmanipulation an Zellen und zukünftige Mensch-Maschine-Schnittstellen. Aufgrund von Zeit- und Kosteneinsparung werden vor allem bei Anwendungen im Bereich der Pharmaentwicklung automatisierte Hochdurchsatz-*Screening* (HTS) Verfahren nachgefragt. Diese zellbasierten Analysesysteme bieten den Vorteil, dass sie der steigenden Nachfrage (Politik, Gesellschaft etc.) nach Ersatzmethoden für Tierversuche nachkommen können.

Das große Interesse an der Untersuchung des Aufbaus und der Funktion von Proteinen (Ionenkanäle etc.) liegt in hohem Maße im sog. *Human-Genom-Projekt* (1990 bis 2003) begründet. Dieses Projekt hatte sich die vollständige Entschlüsselung des



menschlichen Genoms zum Ziel gesetzt, um bspw. die molekularen Mechanismen von Krankheiten besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln. Zudem führten in der Vergangenheit die Wirkstoffe einzelner Medikamente als Nebenwirkungen zur ungewollten Beeinflussung der sog. hERG-Ionenkanalaktivität, die gefährliche Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod beim Patienten auslösten [32]. In der Folge wurde durch europäische, amerikanische und japanische Zulassungsbehörden eine Richtlinie zur Untersuchung aller neuen pharmakologischen Wirkstoffe auf ihre hERG-Kanalaktivität herausgegeben. Laut dieser Richtlinie sollen ungewollte Nebeneffekte bereits in frühen Phasen der Medikamentenentwicklung ausgeschlossen werden [33]. Seitdem besteht ein immenser Bedarf am Einsatz der *Patch-Clamp*-Technik in der präklinischen Phase. Hierfür werden jedoch automatisierte Methoden benötigt, die im Hochdurchsatz<sup>1</sup> biochemische, genetische oder pharmakologische Tests durchführen können [35]. Viele Pharmafirmen lassen in solchen primären Untersuchungen an Ionenkanälen 500.000 bis 1.000.000 Substanzen pro Medikamentenentwicklung testen.

Der aktuelle Stand der Technik beruht auf z. T. kommerziell erhältlichen *APC*-Systemen für teil- bis vollautomatisierte, elektrophysiologische Untersuchungen an Zellen in Suspension (**4.2**). Hingegen können adhärent wachsende Zellen, die den überwiegenden Anteil im menschlichen Körper ausmachen, bislang nur im klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau untersucht werden. Für Hochdurchsatz-Anwendungen, bei denen sehr viele Substanzen mit statistischer Sicherheit in kürzester Zeit auf ihre Wirkung hin untersucht werden müssen, ist dies unzweckmäßig. Der durchschnittliche Durchsatz des manuellen Verfahrens liegt zwischen 10 und 20 Tests pro Tag und bei ca. 100 Datenpunkten<sup>2</sup> pro Woche [36, 37]. Höchste Durchsatzraten werden an adhärennten Zellen bspw. mit spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiver Markierung durch indirekte Messungen der Ionenkanalaktivität erreicht [38]. Allerdings generieren indirekte Verfahren oftmals Daten, die nicht mit den elektrophysiologischen Messungen korrelieren [5]. Demzufolge ist die resultierende Klassifikationsrate für falsch beurteilte Substanzwirkungen (falsch-positiv oder falsch-negativ) vergleichsweise hoch, weshalb ihre Akzeptanz und das Vertrauen in sie gering

---

<sup>1</sup> Der Begriff Hochdurchsatz ist nicht eindeutig definiert. Einige Literaturquellen sprechen bei 100.000 Substanzen pro Tag von einem Hochdurchsatz [34]. Andere Quellen definieren bereits 10.000 Datenpunkte pro Tag als Hochdurchsatz [35].

<sup>2</sup> Der Begriff Datenpunkt wird durch das Experiment definiert, dies kann je nach Fragestellung bspw. die maximale Stromantwort (Endpunktmessung) eines Ionenkanals oder auch seine komplette Kinetik im Signalverlauf sein.

sind. Einige Literaturquellen schließen indirekte Verfahren für die Untersuchung von Ionenkanälen sogar ausdrücklich aus, da es mit ihnen u. a. nicht möglich ist die Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle in geeigneter Weise zu untersuchen [39, 40]. Ein vergleichendes Beispiel über die Aussagekraft indirekter Verfahren gaben Wood *et al.* [34]. Demnach scheinen einige Substanzen eine bis zu 1000-fach geringere Wirksamkeit zu besitzen, als bei Vergleichsmessungen mit der *Patch-Clamp*-Technik [36]. Denyer *et al.* [41], Xu *et al.* [42], Bennett und Guthrie [43] sowie Numann und Negulescu [44] geben einen Überblick über indirekte Techniken.

Die Motivation zur Schaffung eines APC-Systems für adhärenzte Zellnetzwerke liegt demnach im Fehlen eines schnellen, genauen Systems für die intrazelluläre Analytik. Mit diesem Werkzeug soll es durch direkte Messung von Ionenströmen sowie durch definierte Beeinflussung der elektrischen und chemischen Umgebung der Ionenkanäle möglich werden das Verhalten von vernetzten adhärenzten Zellen unter Berücksichtigung von Effekten auf die Zell-Zell-Kommunikation zu analysieren. Abgesehen von der gewünschten Automatisierung und einem erhöhten Durchsatz soll die Informationsgewinnung bei der Charakterisierung von Wirkstoffen und Ionenkanälen schneller, kostengünstiger und damit gegenüber dem klassischen *Patch-Clamp* effektiver werden, insbesondere durch Parallelisieren, vereinfachte Handhabung und standardisierte Techniken.

## **3 Elektrophysiologie**

### **3.1 Einführung**

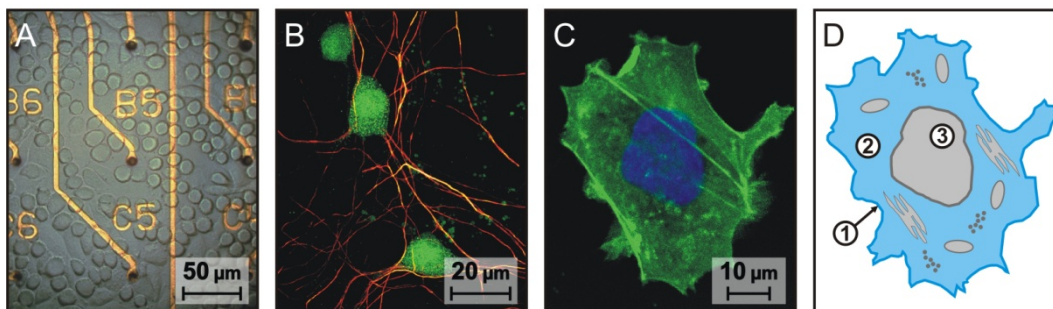
Erste elektrophysiologische Untersuchungen wurden bereits zum Ende des 18. Jahrhunderts von Luigi Galvani (1737 - 1798) durchgeführt, der physiologische Effekte des elektrischen Stroms an präparierten Froschschenkeln untersuchte. Die von ihm durch elektrische Nervenreizung hervorgerufenen pulsartigen Muskelkontraktionen stellten die erste Demonstration eines Aktionspotentials dar. Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Systemen um bioelektrische Signale intra- oder extrazellulär zu untersuchen. Eine große Herausforderung bei der Konzeption dieser Messinstrumente stellt die Minimierung des Rauschens bei gleichzeitig maximaler Signalbandbreite dar. Problematisch ist hierbei, dass die Signalableitung von sehr hochohmigen Signalquellen erfolgt, sodass die Bandbreite durch hohe Serienwiderstände (elektrolytische Prozesse, Ausbildung einer Doppelschicht etc.) und das Vorhandensein von Streukapazitäten begrenzt wird. Durch schaltungstechnische Maßnahmen und spezielle Kompensationsmechanismen wird jedoch einer zu starken Beeinflussung des sehr empfindlichen biologischen Systems entgegengewirkt.

### **3.2 Biologischer Hintergrund**

Biologische Zellen sind die elementaren lebenden Einheiten aller Organismen und werden in vielerlei Hinsicht unterschieden. So gibt es prokaryote und eukaryote Zellen. Zu den eukaryoten Zellen gehören die tierischen und pflanzlichen Zellen, die im Gegensatz zu den prokaryoten Zellen (Bakterien etc.) einen Zellkern besitzen. Eine weitere Unterteilung kann erfolgen, indem zwischen adhärent wachsenden Zellen und frei im Nährmedium suspendiert wachsenden Zellen unterschieden wird. Adhärent wachsende Zellen leben in verzweigten Zellverbänden und sind über die extrazelluläre Matrix sowie über *Gap-Junctions* und *Tight-Junctions* miteinander verbunden. Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit sind vor allem tierische, adhärent wachsende Zellen wie bspw. die L929 Tumorzelllinie (immortalisierte Mausfibroblasten).

### 3.2.1 Vereinfachter Aufbau einer biologischen Zelle

In dieser Arbeit wird vereinfachend von kugelförmigen Zellen mit einem maximalen Durchmesser kleiner 100  $\mu\text{m}$  ausgegangen. Diese Annahme gilt für eine Vielzahl tierischer Zellen [45]. Darüber hinaus werden für die Modellbildung und Berechnung in der Literatur zu *Patch-Clamp* überwiegend vereinzelt Zellen angenommen. Allerdings gilt diese Vereinfachung bei verzweigten Netzwerken, wie sie bspw. neuronale Zellen bilden, zumeist nicht hinreichend. **Abbildung 3-1** zeigt Beispiele für adhären wachsende, vernetzte Zellkulturen und stellt den Grundaufbau einer tierischen Zelle vor.



**Abbildung 3-1: Vernetzte Zellkultur und Aufbau einer tierischen Zelle**

**A:** Auflichtmikroskopie einer adhären wachsenden Zellkultur auf einem Sensorchip. Zelltyp L929. Chiptyp C.  
**B:** Fluoreszenzmikroskopie einer neuronalen Zellkultur (28 DIV). Umgezeichnete Abbildung aus [46].  
**C:** Fluoreszenzmikroskopie einer einzelnen tierischen Zelle. Anfärbung der Aktinfilamente (grün) im Zytoskelett. Anfärbung des Zellkerns (blau). Originalaufnahme: Dr. rer. nat. B. Bader (Universität Rostock).  
**D:** Vereinfachtes schematisches Modell einer tierischen Zelle. Die Zellmembran (1) umgibt das Zellplasma (2). Im Zellplasma liegen Zellkern (3) und weitere subzelluläre Strukturen (nicht beschriftet) wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Ribosomen etc.

Jede lebende Zelle wird durch eine dünne Zellmembran von der äußeren Umgebung abgegrenzt, in der der entscheidende Teil der Lebensprozesse abläuft [47]. Im Inneren der Zelle werden der Zellkern und verschiedene Zellorganellen, wie die Mitochondrien etc., durch weitere Membransysteme begrenzt. Das Zellplasma füllt das Innere der Zelle aus, in das der Zellkern und alle weiteren subzellulären Kompartimente (Zellorganellen) eingebettet sind. Das Zellplasma setzt sich aus dem flüssigen Zytosol und dem festeren Zytoskelett zusammen. Es enthält vor allem Wasser, gelöste Proteine sowie lösliche Kohlenhydrate (Glukose etc.) und ist im Vergleich zu den schlecht leitenden Membranen vergleichsweise gut elektrisch leitfähig. Ebenso gut leitend ist das Zellplasma im Zellkern sowie in den meisten Zellorganellen. Stark vereinfacht, kann die Zelle daher als ein elektrischer Leiter umgeben von einer isolierenden Hülle betrachtet werden, der innere Kompartimente mit analogen Eigenschaften enthält. In den nachfolgenden Betrachtungen wird vereinfachend von einer kugelförmigen Zelle mit äußerer Zellmembran ausgegangen.

### 3.2.2 Zellmembran

Die elektrischen Eigenschaften des biologischen Zellmodells werden hauptsächlich von den Eigenschaften seiner dünnen Zytoplasmamembran oder auch Zellmembran kleiner 10 nm bestimmt, die sich im Wesentlichen aus Proteinen und Lipiden zusammensetzt [48]. Detaillierte Beschreibungen zu den elektrischen Eigenschaften der Zellmembran und der Zelloberfläche gibt u. a. Glaser [49].

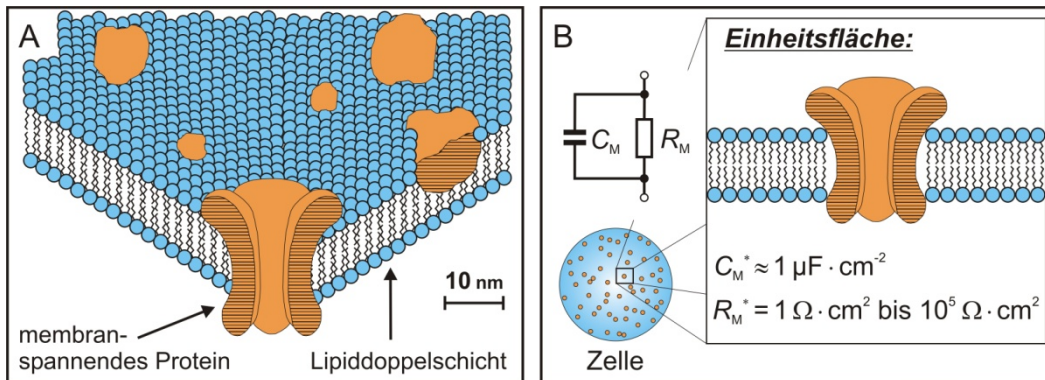
Als äußere Begrenzung der Zelle besteht die eigentliche Funktion der Zellmembran darin, den unkontrollierten Austausch von wasserlöslichen Stoffen (Ionen, kleine Metabolite etc.) zwischen dem Zellinneren und dem extrazellulären Raum zu verhindern bzw. zu steuern. Durch verschiedene Transportprinzipien steuert die Membran selektiv ihre Durchlässigkeit für bestimmte Moleküle [47]. Die Transportmechanismen beruhen auf der erleichterten bzw. freien Diffusion, dem sog. *Carrier*-Transport, auf porenartigen Kanälen (z. B. Ionenkanäle) und dem aktiven Transport durch Pumpen.

Die Lipide der Zellmembran bilden eine Lipiddoppelschicht, in die die Proteine der Zellmembran eingelagert sind. Viele durchspannen die Membran auch ganz. Andere Proteine sind nur an der Oberfläche der Membran gebunden. Singer und Nicolson [50] stellten ein vereinfachtes Modell der Zellmembran vor, in dem die Membran aus den Proteinen und Lipiden mosaikartig zusammengesetzt wurde. **Abbildung 3-2 A** zeigt dieses Modell der Zellmembran. Ihre elektrischen Eigenschaften sind in **Abbildung 3-2 B** in Form eines Ersatzschaltbildes (ESBs) dargestellt. Die Lipiddoppelschicht verhält sich ähnlich einem Plattenkondensator mit der Kapazität  $C_M$ . Der Membranwiderstand  $R_M$  wird u. a. durch die Ionenkanäle bestimmt, die die Zellmembran ganz durchdringen. Zu beachten ist, dass in der Elektrophysiologie überwiegend der Kehrwert des Membranwiderstandes angegeben wird, d. h. der Leitwert  $G_M$  der Membran oder eines einzelnen Ionenkanals (Einzelkanalableitung). Widerstand und Kapazität werden üblicherweise als flächenspezifische Werte angegeben<sup>3</sup>. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden in dieser Arbeit die flächenspezifischen Werte eindeutig mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. So liegt der flächenspezifische Membranwiderstand  $R_M^*$  für verschiedene Zellen zwischen  $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und  $100 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  [47, 51]. In Hinblick auf ihre geringe Dicke verhält sich die Membran wie ein elektrischer Isolator. Der Wert für die flächenspezifische Membrankapazität ist für verschiedene Zelltypen mit proteinhaltigen

---

<sup>3</sup> In der Literatur wird hinsichtlich des Formelzeichens häufig nicht eindeutig zwischen dem spezifischen Wert und dem Wert für die gesamte Zelle unterschieden. Aufschluss bietet in diesen Fällen ausschließlich die zugeordnete Einheit.

Lipidmembranen nahezu konstant und beträgt näherungsweise  $C_M^* \approx 1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  [48, 52, 53]. Allerdings ist zu beachten, dass die wirksame Membrankapazität von der Messmethode, von der Frequenz, von den Membransystemen im Zytoplasma, vom Proteingehalt und den Mikrovilli<sup>4</sup> abhängig ist [54].



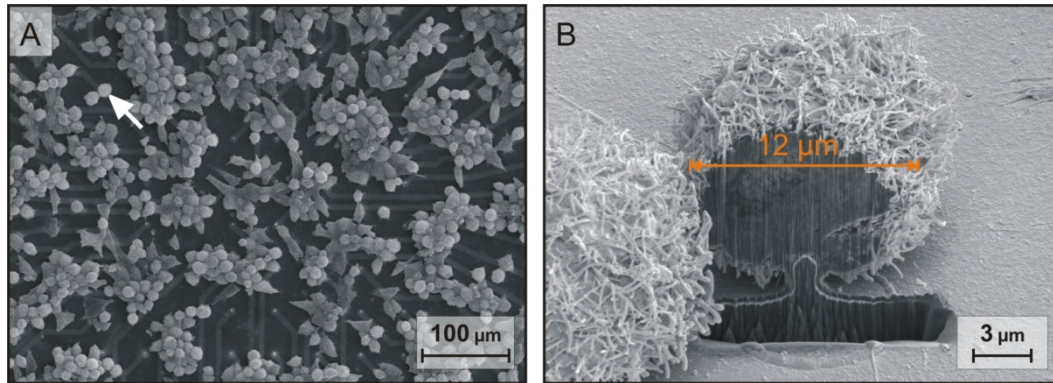
**Abbildung 3-2: Aufbau und elektrische Eigenschaften der Zellmembran**

**A:** Vereinfachtes Modell der Zellmembran umgezeichnet nach Singer und Nicolson [50] mit mosaikartiger Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen. Dreidimensionale schematische Darstellung teilweise im Querschnitt. Proteine sind orange eingefärbt (Rezeptoren, Ionenkanäle etc.). Die Membranlipide sind blau dargestellt mit ihren Fettsäureketten (schwarz). Das Innere der Lipiddoppelschicht ist nicht eingefärbt.  
**B:** Vereinfachtes Ersatzschaltbild (ESB) für die elektrische Eigenschaft der Zellmembran. Die Lipiddoppelschicht verhält sich wie ein Plattenkondensator mit der flächenspezifischen Membrankapazität  $C_M^*$ . Die Ionenkanäle (orange) bestimmen den flächenspezifischen Widerstand  $R_M^*$  der Zellmembran. Ausgehend von den Werten für eine Einheitsfläche kann die Membrankapazität und der -widerstand einer Zelle mit bekannter Oberfläche berechnet werden. Einheitsfläche im Querschnitt dargestellt.

Als Beispiel wurde für die L929 Zelle (Mausfibroblast) in **Abbildung 3-3** die Membrankapazität näherungsweise berechnet. Stark vereinfachend wurde von einer kugelförmigen Zelle ausgegangen und anhand einer mikroskopischen Aufnahme der Zelldurchmesser  $d_z$  ermittelt, der zur näherungsweisen Berechnung der Membranoberfläche  $A_M$  verwendet wird. Der Wert für  $C_M$  liegt für die L929 Zelle aus **Abbildung 3-3 B** bei ca. 5 pF (Modell: Kugel). Neben der Berechnung über den Zelldurchmesser können die Werte für  $R_M$  und  $C_M$  auch mittels *Patch-Clamp* bestimmt werden (**Abbildung 4-4 B**). Abgesehen von der Möglichkeit zur Typisierung der Zellen, können damit Rückschlüsse auf die Dichte und Leitfähigkeit der Ionenkanäle gezogen werden. Ferner dient es der Kontrolle von Änderungen der Zellgröße während eines Versuches. Die dielektrischen Eigenschaften ( $C_M$ ,  $R_M$ ,  $\epsilon_r$  etc.) von suspendierten Zellen wurden u. a. von Gimsa und Wachner [55] sowie Maswiwat *et al.* [56] anhand ihres frequenzabhängigen Verhaltens untersucht. Zu diesen Methoden aus dem Bereich der AC-Elektrokinetik zählen die

<sup>4</sup> Mikrovilli sind fadenförmige Zellfortsätze, die zur Oberflächenvergrößerung von Zellen dienen und dadurch den Stoffaustausch verbessern.

Dielektrophorese (DEP) sowie die Elektrorotation [55]. Lindau und Neher [57] sowie Fidler und Fernandez [58] wendeten für Kapazitätsmessungen an einzelnen Zellen die *Lock-in*-Technik an, die sich weit verbreitet durchgesetzt hat [59].



**Abbildung 3-3: Querschnitt einer Zelle**

REM-Aufnahmen von L929 Mausfibroblasten (3 DIV) auf Sensorchip. Chiptyp A. Originalaufnahmen: Fraunhofer IWM Halle. **A:** Übersichtsbild über den gesamten Sensorbereich. L929 Zellen liegen kugelförmig oder flach auf der Oberfläche. Die kugelförmigen Zellen besitzen ähnliche Zelldurchmesser, wie die ausgewählte Zelle (weißer Pfeil). **B:** *Focused-Ion-Beam*-Schnitt (FIB-Schnitt) zur Ansicht des Zell-Elektrodenkontakts bei der ausgewählten Zelle auf einer Nadelelektrode. Umgezeichnete eigene Abbildung zur näherungsweise Bestimmung des Oberflächeninhalts der Zellmembran [10]. Annahme: kugelförmiger Zellkörper mit  $A_M = \pi \cdot d_z^2$ . Berechnete Membrankapazität:  $C_M \approx 5$  pF (Kugel). FIB-Präparation: Fraunhofer IWM Halle.

### 3.2.3 Ionenkanäle

Ionenkanäle dienen in der Zellmembran als schaltbare Ventile. Sie modulieren durch ihr Öffnen und Schließen einen molekularen oder ionalen Transportweg, welcher nach beiden Seiten (intra- und extrazellulärer Raum) offen ist. Im offenen Zustand fließen durch einen einzelnen Kanal mehr als 10 Mio. Ionen pro Sekunde [38]. Der in **Abbildung 3-2 B** dargestellte Ionenkanal veranschaulicht, dass diese eingelagerten Proteine die Membran vollständig durchdringen.

Es wird zwischen passiven und gesteuerten Ionenkanälen unterschieden. Zusätzlich werden die Kanäle anhand der Ionen, für die sie leitend sind, und nach dem Steuerungsmechanismus, der ihr Öffnen und Schließen bewirkt, eingeteilt. Jeder Kanaltyp zeigt seine eigene Leitfähigkeits- und Schaltcharakteristik [3]. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass im menschlichen Genom bereits mehr als 400 verschiedene Ionenkanal-Gene identifiziert wurden [60, 61]. Bei Ionenkanälen (mechanosensitiv, liganden- oder spannungsgesteuert) wird das Öffnen und Schließen des Kanals als Reaktion auf einen entsprechenden Reiz hervorgerufen. Hierzu zählt u. a. die Beeinflussung durch elektrische Felder (Änderung des Transmembranpotentials) oder



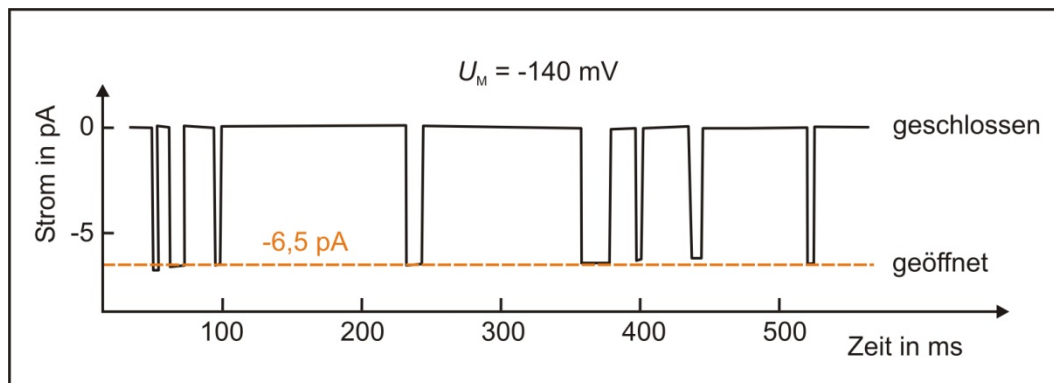
durch physikalische und chemische Reize. Diese Eigenschaft der Kanäle bildet bspw. bei Neuronen die Grundlage für ihre elektrische Erregbarkeit. Hodgkin und Huxley [62] hatten diesbezüglich ein theoretisches Modell über die Erregungsleitung in Nervenfasern aufgestellt und dabei die Existenz spannungsgesteuerter Ionenkanäle in der Zellmembran zunächst nur postuliert. Sie erhielten dafür im Jahr 1963 den Nobelpreis für Medizin. So kann bei Nervenzellen eine Spannungsänderung an der Zellmembran oder der Einfluss von chemischen Signalstoffen wie Neurotransmitter bzw. intra- oder extrazelluläre Botenstoffe an den Ionenkanälen zur Auslösung von einem Aktionspotential führen. Die Spannungsänderungen an der Zellmembran können auch durch das Aktionspotential einer benachbarten Zelle hervorgerufen werden. Eine exemplarische Beschreibung zur Ausbildung des Transmembranpotentials bei Glia- und Nervenzellen geben Kandel *et al.* ([63] S. 139ff.). Auch Arzneimittel oder Giftstoffe können die Ionenkanäle blockieren oder aktivieren, weshalb sie in der Medikamentenentwicklung als äußerst attraktive *Targets* gelten [5, 63]. Laut Comley [64] handelt es sich beim hERG-Kanal um den meist untersuchten Ionenkanal, gefolgt von den Kalium-, Calcium- und Natriumkanälen. Zheng *et al.* [38] fassen eine Auswahl an weiteren liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen zusammen und stellen verschiedene Technologien zur Untersuchung der Kanäle gegenüber.

Der Durchtritt spezifischer Ionen beruht auf der Selektivität der meisten Ionenkanäle, die teilweise nur eine bestimmte Ionensorte passieren lassen. Hierfür ist im Eingangsbereich der Pore eine Art Filter vorgesehen, der aufgrund seiner Größe und elektrischen Eigenschaft für die Selektivität des Ionenkanals verantwortlich ist [65-67]. Die Zuordnung von Kanälen erfolgt oft anhand ihrer Selektivität (bspw. Kalium- oder Natriumkanal). Die Gesamtselektivität der Zellmembran wird letztendlich durch die relativen Anteile der verschiedenen Ionenkanalarten bestimmt. Da die Verteilung und das Vorhandensein der einzelnen Ionenkanalarten bei jedem Zelltyp verschieden sind, fallen auch die Reaktionen der Ionenkanäle, bspw. die Auswirkung von Testsubstanzen, zellspezifisch aus. So ist die Membran einer Gliazelle im Nervengewebe überwiegend kaliumselektiv [63]. Hille [66] befasst sich sehr detailliert mit der Theorie der Ionen-selektivität von Kanälen und gibt Anleitungen zur experimentellen Bestimmung ihrer Selektivität.

In **Abbildung 3-4** ist exemplarisch der Signalverlauf beim Öffnen und Schließen eines Ionenkanals dargestellt. Die übliche Methode zur Bestimmung der Ionen-



selektivität eines einzelnen Kanals liefert die Einzelkanalableitung mit der *Patch-Clamp*-Technik (**Kapitel 4**). Sofern sich der Kanal öffnet und für die entsprechenden Ionen leitend wird, springt der Strom von seiner Grundlinie ( $I \approx 0$  pA) auf einen bestimmten Wert. Nach kurzer Zeit schließt er sich wieder und der Strom geht auf die Nulllinie zurück. Die Ströme durch einen Ionenkanal zeigen sich nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ pulsartig als elektrische Signale stets gleicher Amplitude, treten aber mit verschiedener Zeitdauer auf [3, 68].



**Abbildung 3-4: Öffnen und Schließen eines Ionenkanals**

Beispiel für eine Einzelkanalableitung an der Muskelfaser einer Ratte. Zugabe des Neurotransmitters Acetylcholin im extrazellulären Raum führt zu Öffnungsreaktionen des Ionenkanals. Im Bild öffnet sich der Kanal acht Mal kurzzeitig mit einer Stromamplitude von ca. -6,5 pA. Die angelegte Steuerspannung beträgt -140 mV. Umgezeichnete Abbildung aus [69, 70].

### 3.2.4 Transmembranpotential

Das elektrische Transmembranpotential<sup>5</sup>  $U_M$  ist die Differenz des Potentials  $\varphi_i$  im Zellinneren und dem Potential  $\varphi_a$  des Außenmediums [71]. Die Abhängigkeit des Transmembranpotentials von den jeweiligen Ionenkonzentrationen wurde experimentell von Hodgkin und Katz [72] am Riesenaxon vom Tintenfisch untersucht. Die Goldman-Gleichung entspricht der verallgemeinerten Nernst-Gleichung, deren Herleitung z. B. von Adam *et al.* [47] beschrieben wurde. Für einwertige Ionen gilt:

$$U_M = \varphi_i - \varphi_a = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left( \frac{\sum P_{ka} \cdot c_{ka}^a + \sum P_{an} \cdot c_{an}^i}{\sum P_{ka} \cdot c_{ka}^i + \sum P_{an} \cdot c_{an}^a} \right) \quad (3-1)$$

<sup>5</sup> Der Begriff Transmembranpotential beschreibt die Potentialdifferenz (Spannung) des Potentials  $\varphi_i$  im Zellinneren und dem Potential  $\varphi_a$  des Außenmediums. Die Bezeichnung Transmembranpotential ist eine feste Begrifflichkeit in der Elektrophysiologie, die aus elektrotechnischer Sicht nicht korrekt gewählt ist.

Nach **Gleichung 3-1** wird das Transmembranpotential aus der intra- und extrazellulären Konzentration  $c$  der Ionen, für die die Membran durchlässig ist, und deren Membranpermeabilität bestimmt. Die Permeabilität  $P$  der Membran verhält sich proportional zur Anzahl der offenen Ionenkanäle, die das jeweilige Ion leiten können. Wird berücksichtigt, dass die Konzentration von Natrium-, Kalium- und Chloridionen deutlich alle anderen Ionensorten dominieren, so ergibt sich **Gleichung 3-1** zu:

$$U_M = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left( \frac{P_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na}}^a + P_{\text{K}} \cdot c_{\text{K}}^a + P_{\text{Cl}} \cdot c_{\text{Cl}}^i}{P_{\text{Na}} \cdot c_{\text{Na}}^i + P_{\text{K}} \cdot c_{\text{K}}^i + P_{\text{Cl}} \cdot c_{\text{Cl}}^a} \right). \quad (3-2)$$

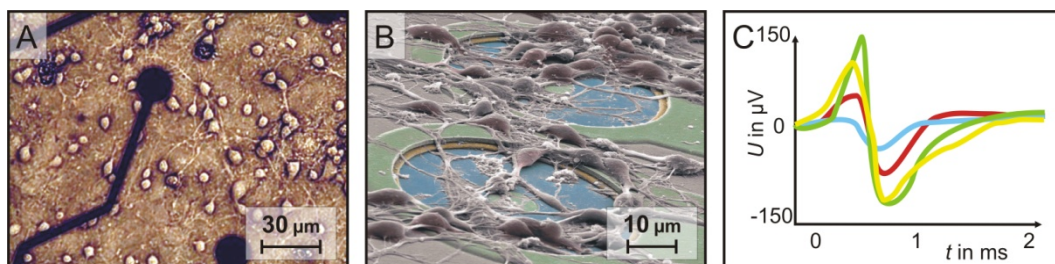
Unter Gleichgewichtsbedingungen kann mit der Goldman-Gleichung (**Gleichung 3-1**) der Wert von  $U_M$  für beliebig viele einwertige Ionensorten näherungsweise berechnet werden [73]. Es wird hierbei dann vom Ruhemembranpotential  $U_{\text{MRuhe}}$  gesprochen. Sofern eine Ionensorte dominiert, vereinfacht sich **Gleichung 3-2** zusätzlich. In diesem Fall ist das Transmembranpotential nahezu gleich dem Nernst-Potential der dominierenden Ionensorte. Für Gliazellen (überwiegend kaliumpermeabel) ergibt sich bspw. ein Ruhemembranpotential von  $U_{\text{MRuhe}} \approx -75$  mV. Das Ruhemembranpotential der meisten tierischen Zellen liegt typischerweise zwischen -30 mV und -90 mV. Bei pflanzlichen Zellen kann  $U_{\text{MRuhe}}$  bis zu -200 mV betragen [48]. Unter der Annahme eines homogenen Feldverlaufes (Plattenkondensator) über der Zellmembran, ergibt sich bspw. für eine 10 nm dünne Membran mit einem Transmembranpotential von -50 mV ein hohes elektrisches Feld von immerhin  $5 \text{ MV} \cdot \text{m}^{-1}$ . Das Öffnen und Schließen von spannungssensitiven Ionenkanälen wird durch Änderungen in diesen Feldern ausgelöst [48].

Aus **Gleichung 3-2** lassen sich bereits zwei Randbedingungen für die Konzeption eines Messsystems ableiten, um definierte Untersuchungen durchführen zu können. So darf die Ionenkonzentration innerhalb und außerhalb der Zelle bspw. durch das Eindringen der Messelektrode nicht verfälscht werden. Des Weiteren ist die Temperatur in der Messkammer konstant zu halten (**6.4.2**).

### 3.3 Extrazelluläre Ableitungen

Bei der extrazellulären Ableitung werden Signale elektrisch aktiver Zellen mit Hilfe von Wechselspannungsverstärkern außerhalb der Zelle abgeleitet. Die zu detektierenden

Signalamplituden sind vergleichsweise klein mit typischerweise  $10\ \mu\text{V}$  bis  $1\ \text{mV}$ . Die erforderliche, hohe Signalverstärkung von  $V \geq 1.000$  setzt die Verwendung von sehr rauscharmen Verstärkern voraus, um ein hinreichend gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Es wird zwischen zwei Arten der extrazellulären Ableitung unterschieden. Bei der Untersuchung von einzelnen Zellen wird eine Mikroelektrode in die Nähe der Zellmembran geführt. Die dafür verwendeten Mikroelektroden sind Pipetten aus Metall (bspw. glasisoliertes Platin) oder mit Salzlösung gefüllte Glas-Mikropipetten. Für Ableitungen an mehreren Zellen oder Zellverbänden wird zumeist eine planare MEA verwendet, bei der jede Elektrode an eine eigene Signalverarbeitung (Verstärker, Filter etc.) angeschlossen wird. Mit einem MEA kann u. a. die koordinierte Aktivität von mehreren Neuronen in einem Netzwerk untersucht werden. In Koester *et al.* [74, 75] wurde ein multiparametrischer Sensorchip mit 52 MEA-Elektroden sowie das dazugehörige Messsystem für extrazelluläre Ableitungen gezeigt. Schrott [76] gibt einen detaillierten Überblick über bestehende chipbasierte Messsysteme mit integrierten MEA-Elektroden. In Tautorat [77] und Schrott *et al.* [78-80] wurde die Konzeption und Realisierung eines solchen Systems für Untersuchungen an neuronalen Zellverbänden beschrieben. Koester [81] erläuterte die Anwendung dieser Systeme an verschiedenen Chipsystemen bzw. Chipgenerationen. Stett *et al.* [82] haben bereits die Anwendung und Funktionsweise solcher Systeme im Bereich der Grundlagen- und Pharmaforschung beschrieben. Die **Abbildung 3-5** zeigt exemplarisch die extrazelluläre Ableitung an Nervenzellkulturen auf zwei verschiedenen Sensorchiptypen des Lehrstuhls für Biophysik.

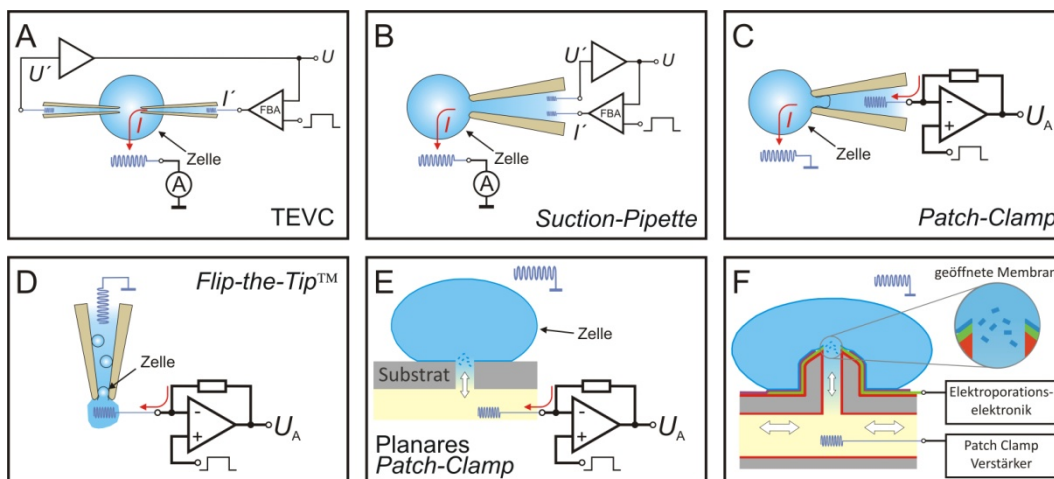


**Abbildung 3-5: Extrazelluläre Signalableitung**

**A:** Netzwerk von Neuronen des frontalen Kortex (28 DIV) auf der Oberfläche eines Glas-Neurochips. Die schwarzen Strukturen sind die planaren Platin-Ableitelektroden. Umgezeichnete Abbildung aus [75].  
**B:** Nervenzellkultur auf zwei planaren Elektroden (blau eingefärbt) eines Silizium-Neurochips. Umgezeichnete Abbildung aus [83].  
**C:** Überlagerte Signalverläufe (gemittelt) von vier verschiedenen farbkodierten neuronalen Signalquellen auf einer Sensorelektrode. Die elektrische Aktivität wurde mit einem Silizium-Neurochip aufgezeichnet. Umgezeichnete Abbildung aus [75].

### 3.4 Intrazelluläre Ableitungen

Bei intrazellulären Ableitungen wird der Strom durch die bzw. die Spannung über der gesamten Zellmembran untersucht. Je nach Messmethode werden dafür eine oder mehrere Mikropipetten durch die Zellmembran hindurch in die Zelle eingeführt. Da das Zytosol selbst ein Elektrolyt ist, sind die Mikropipetten elektrisch leitend mit dem Zellinneren verbunden. In **Abbildung 3-6** ist eine Auswahl intrazellulärer Messmethoden aufgeführt. Die Reihenfolge der einzelnen Methoden entspricht in etwa der zeitlichen Abfolge ihrer Entwicklung. Als aktueller Stand der Technik ist die klassische *Patch-Clamp*-Technik sowie die auf ihr basierenden *APC*-Weiterentwicklungen für Untersuchungen an suspendierten Zellen hervorzuheben (**Abbildung 3-6 C-E**).



**Abbildung 3-6: Methoden für intrazelluläre Ableitungen - Eine Auswahl**

Die dargestellten Funktionsweisen basieren auf dem *Voltage-Clamp*-Modus (4.1.4.2). Stark vereinfachte schematische Darstellungen. **A, B:** Bei großen Zellen werden zwei intrazelluläre Elektroden verwendet. Eine Elektrode misst das Transmembranpotential (Spannung  $U'$ ). Über die zweite Elektrode wird der Strom  $I'$  injiziert. Stromfluss (roter Pfeil) über Membran bis zur Referenzelektrode. **A-C:** Rückkopplungsverstärker (FBA). Umgezeichnete Abbildung aus [70]. **A:** Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC). Zwei scharfe Einstechelektroden werden in die Zelle eingeführt (4.1.4.2). **B:** *Suction-Pipette* für *Voltage-Clamp* und interne Perfusion<sup>6</sup>. Ausführliche Beschreibung in [84]. **C:** Klassische *Patch-Clamp*-Technik (4.1). Das Beispiel zeigt die Untersuchung an einem Membranstück in der *Cell-Attached*-Konfiguration (4.1.3). **D:** *Flip-the-Tip*<sup>®</sup>-Technik, bei der die Zellen in eine Mikropipette eingesaugt werden (4.2.2). Die Pipette ist mit extrazellulärer Lösung gefüllt. Durch Ansaugen wird eine Zelle an der Spitze positioniert und die *Giga-Seal*-Bildung induziert. **E:** Planares *Patch-Clamp* (4.2.1). Die suspendierte Zelle wird über eine Öffnung im Substrat angesaugt, positioniert und untersucht. Umgezeichnete Abbildung aus [85]. **F:** Die Zellmembran (blau) einer adhären Zelle wird durch lokale Elektroporation oberhalb einer *Patch-Site* geöffnet. Die Elektroporation erfolgt über die an der Spitze geöffnete Elektroporationselektrode (grün). Anschließend erfolgt die Ganzzelleableitung über den *Patch-Clamp*-Verstärker durch mikrofluidischen Kontakt zum Zellinneren.

<sup>6</sup> Der aus dem Lateinischen stammende Begriff *Perfusion* (*perfusio* = das Benetzen) beschreibt im Allgemeinen einen Lösungswechsel. Bei zellphysiologischen Untersuchungen ist im Speziellen der Lösungswechsel von extra- oder intrazellulären Puffern, entweder zur Versorgung der Zellen oder zur Applikation von Testsubstanzen, gemeint.

In **Abbildung 3-6 F** ist ein Teil des konzipierten Messsystems *PoreGenic*<sup>®</sup> dargestellt. Um den technischen Aufwand im Chipsystem zu minimieren, mussten die in **Abbildung 3-6 A, B** dargestellten Methoden mit zwei intrazellulären Elektroden vermieden werden. Nachfolgend werden die Messmethoden aus **Abbildung 3-6 C-E** vorgestellt. Einen Schwerpunkt wird hierbei die klassische *Patch-Clamp*-Technik bilden, insbesondere um den *Voltage-Clamp*-Modus sowie den *Current-Clamp*-Modus vorzustellen, die aufgrund ihrer verschiedenen Funktionsweisen unterschiedliche Aussagen bei der Ganzzellableitung liefern. Die planaren *Patch-Clamp*-Systeme in **Abbildung 3-6 E** stehen repräsentativ für eine Vielzahl von teil- bzw. vollautomatisierten *Patch-Clamp*-Systemen, auf die in **4.2** detailliert eingegangen wird.

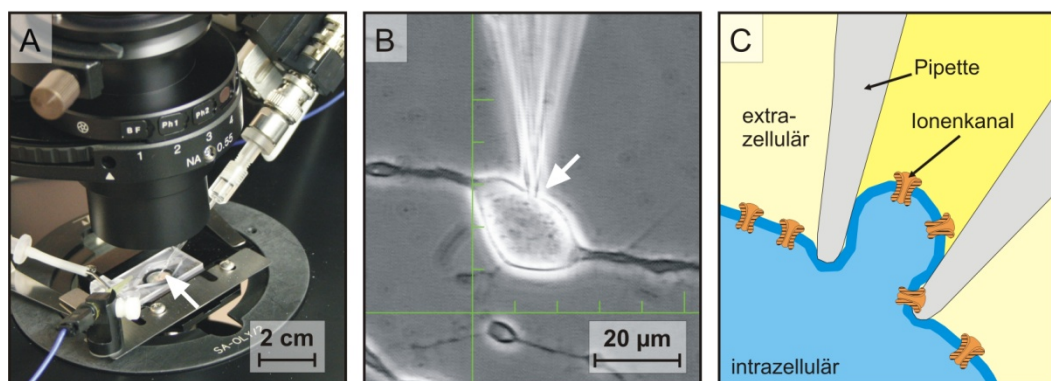
„It [die *Patch-Clamp*-Technik; Anmerkung des Verfassers] should facilitate discrimination between factors influencing the properties of single channels and agents creating or modifying different populations of channels.“ [86]

## 4 *Patch-Clamp*-Technik

### 4.1 Klassisches *Patch-Clamp*

Einen großen Anteil an der Entwicklung der *Patch-Clamp*-Technik hat die Arbeitsgruppe um Erwin Neher und Bert Sakmann, welche für ihre Arbeiten im Jahr 1991 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Neher und Sakmann [86] demonstrierten ihre optimierte Technik zunächst an Muskelfasern von Fröschen. Die Namensgebung der *Patch-Clamp*-Technik ist aus ihrer Funktionsweise abgeleitet. Den Grundaufbau zeigt **Abbildung 4-1**. Die Messelektrode, auch *Patch*-Pipette bezeichnet, wird auf die Zellmembran aufgesetzt und überdeckt nur einen kleinen Membranausschnitt (Fleck, Stelle oder Flicker; englisch: *patch*). Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der Pipette wird das Pipetteninnere durch den angesaugten Membranausschnitt relativ zum Außenmedium elektrisch isoliert [3]. In dieser sog. *Cell-Attached*-Konfiguration soll sich eine sehr hohe elektrische Abdichtung zwischen der Badlösung und dem Pipetteninneren mit Abdichtwiderständen über 1 G $\Omega$  ausbilden. Dieser Zustand, der durch eine besondere Wechselwirkung zwischen dem Glas der Pipette und den Lipiden der Zellmembran entsteht, wird als *Giga-Seal* bezeichnet. Das Erreichen des *Giga-Seals* gilt als ein Schlüsselement zum Gelingen der meisten *Patch-Clamp*-Ableitungen (**4.1.3**). Die *Cell-Attached*-Konfiguration ist Ausgangspunkt für die verschiedenen *Patch-Clamp*-Konfigurationen, die bereits von Hamill *et al.* [87] ausführlich beschrieben wurden. In Abhängigkeit vom Durchmesser der Austrittsöffnung (1  $\mu\text{m}$  bis 2  $\mu\text{m}$ ) an der *Patch*-Pipette sind in der *Cell-Attached*-Konfiguration zeitlich hochaufgelöste Ableitungen von wenigen oder sogar einzelnen Ionenkanälen möglich. Die messbaren Ströme liegen dann in der Größenordnung von nur wenigen Picoampere (**Abbildung 3-4**). Für diese Einzelkanaluntersuchungen enthält der Membranfleck im Idealfall zwar nur einen einzigen Ionenkanal, aber auch bei wenigen Kanälen können die Einzelkanalströme untersucht werden [1]. Neher und Sakmann [86] gaben für die Ableitung an einer Muskelfaser einen Wert von nur 2,2 pA für einen Ionenkanal an. In dieser Hinsicht hat die *Patch-Clamp*-Technik die Zellphysiologie revolutioniert, da es mit ihr möglich wurde in molekulare Dimensionen vorzu-

stoßen. In der Folge konnten viele zuvor nur postulierte Theorien, bspw. über die Existenz von Ionenkanälen nach Hodgkin und Huxley [62], verifiziert. Weitere *Patch-Clamp*-Konfigurationen sind, ausgehend von der *Cell-Attached*-Konfiguration, u. a. die Ganzzelleableitung (englisch: *whole-cell configuration*), die *Inside-Out*- und die *Outside-Out*-Konfiguration [87]. Der intrazelluläre Raum (Ruhemembranpotential, Ionenkonzentration etc.) bleibt ausschließlich in der *Cell-Attached*-Konfiguration unbeeinflusst. Bei den Konfigurationen *Inside-Out* und *Outside-Out* wird unter Aufrechterhaltung des *Giga-Seals* ein Membranstück aus der Zellmembran herausgerissen und getrennt von der Zelle untersucht. Durch Öffnung des Membranausschnitts erhält man bei der Ganzzelleableitung Zugriff auf die gesamte Zelle, deren Durchführung in 4.1.4 detailliert dargestellt ist. Bei vielen Anwendungen wird die Ganzzelleableitung bevorzugt angewendet, da das Verhalten der Kanal-Proteine in dieser Konfiguration eher ihren natürlichen, physiologischen Eigenschaften entspricht [40]. Auch sind hier die zu detektierenden Messströme vergleichsweise groß gegenüber den anderen Konfigurationen. Das Anwendungsgebiet des *Patch-Clamp*-Systems PoreGenic® beschränkt sich in der Anfangsphase auf Ganzzelleableitungen (**Kapitel 6**).



**Abbildung 4-1: Klassische *Patch-Clamp*-Technik**

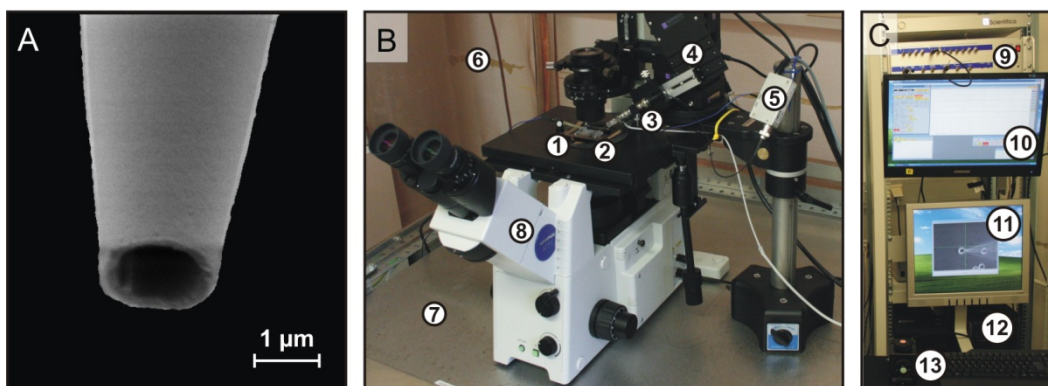
**A:** Detailaufnahme vom *Patch-Clamp*-Aufbau des Lehrstuhls für Biophysik. Eine Pipette ist im Pipettenhalter (rechts oben) befestigt. Die Pipette taucht mit der Spitze (weißer Pfeil) in die Messkammer auf dem Mikroskoptisch ein. **B:** Mikroskopische Aufnahme einer Nervenzelle mit aufgesetzter *Patch*-Pipette. Die Kontaktstelle Pipette-Zelle liegt in der Mitte des Bildes (weißer Pfeil). **C:** Schematische Querschnittsdarstellung der Kontaktstelle Pipette-Zelle in *Cell-Attached*-Konfiguration. Der gläserne Rand der Pipette (grau) isoliert die durch Unterdruck eingesaugte Membranfläche (blau) elektrisch von der umgebenen Lösung. Im Idealfall enthält der eingeschlossene Membranfleck für Einzelkanaluntersuchungen nur einen einzigen Ionenkanal (orange eingefärbt). Es sind sechs Ionenkanäle im dargestellt.

#### 4.1.1 Allgemeiner Systemaufbau

**Abbildung 4-2** zeigt einen klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau, wie er für Referenzmessungen verwendet wurde, mit den Hauptbestandteilen Messkammer, Pipetten-



halter inkl. *Patch*-Pipette, Mikromanipulator, *Patch-Clamp*-Verstärker, Arbeitsrechner, Mikroskop sowie schwingungsgedämpfter Tisch und optional ein mehrkanaliges Oszilloskop. Umgeben ist der Aufbau von einem Faraday-Käfig. In der Literatur zu *Patch-Clamp* werden überwiegend inverse Durchlichtmikroskope mit starker Vergrößerung (größer 100-fach) und hoher Kontrastverstärkung verwendet. Der Mikromanipulator dient der räumlichen Feinpositionierung der *Patch*-Pipette auf der Zelle mit einer typischen Schrittweite von ca. 0,1  $\mu\text{m}$ . Die technischen Anforderungen an den Mikromanipulator sind demnach sehr hoch. Der Pipettenhalter besitzt mindestens einen Fluidik-Anschluss sowie die Schnittstelle zur elektrischen Kontaktierung an den *Patch-Clamp*-Verstärker. Der Verstärker besteht in der Regel aus zwei Komponenten. Der Vorverstärker, allgemein auch als *Headstage* bezeichnet, enthält den empfindlichen Teil der Sensorelektronik und ist mit der *Patch*-Pipette verbunden. Ihm nachgeschaltet ist ein Endverstärker (Filterung, Verstärkung, Digitalisierung etc.), in dem die analogen Signale der *Headstage* schaltungstechnisch weiterverarbeitet werden. Obwohl die Datenauswertung und Systemsteuerung zunehmend rechnergestützt erfolgen, werden auch weiterhin Oszilloskope parallel verwendet, da sie eine sehr hohe zeitliche Auflösung der Signale ermöglichen.



**Abbildung 4-2: Klassischer *Patch-Clamp*-Aufbau**

**A:** REM-Aufnahme der feuerpolierten Spitze einer *Patch*-Pipette (Borosilikatglas). Originalaufnahme: Frau R. Lange (IEF, IGS, Universität Rostock). **B:** Grundaufbau eines klassischen *Patch-Clamp*-Systems am Lehrstuhl für Biophysik bestehend aus: Messkammer (1), *Patch*-Pipette (2), Pipettenhalter (3), Mikromanipulator (4), *Patch-Clamp*-Vorverstärker (5), Faraday-Käfig (6), Schwingungsgedämpfter Tisch (7) und Mikroskop (8). **C:** Teilansicht eines *Patch-Clamp*-Aufbaus: *Patch-Clamp*-Endverstärker (9) Steuerungs- und Analyse-Monitor (10), Video-Monitor (11), Messrechner (12) mit Datenerfassungs- und Analysesoftware etc. sowie Fernbedienung (13) des Mikromanipulators.

Damit Relativbewegungen zwischen der Zelle und der Pipette vermieden werden, wird der Messplatz (Messkammer, Mikromanipulator, Vorverstärker, Mikroskop etc.) auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut. Auf diese Weise werden die Einflüsse mechanischer Schwingungen und Erschütterungen aus der Umgebung reduziert.



Beispiele für detaillierte Beschreibungen des klassischen *Patch-Clamp*-Aufbaus sind in Penner [88] sowie Numberger und Draguhn [59] zu finden.

#### 4.1.2 *Patch-Pipette*

Die *Patch-Pipette* ist das zentrale Element der *Patch-Clamp*-Technik. Das Ausgangsmaterial der Pipette sind röhrenförmige Kapillaren zumeist aus mittelhartem Borosilikatglas. Die *Patch-Pipette* wird unter Hitzeeinwirkung aus einer Glaskapillare geschmolzen und dünn ausgezogen. Hierfür werden automatisierte Ziehgeräte (englisch: *puller*) verwendet. Die Eigenschaften (Form, Öffnungsdurchmesser etc.) der Pipette werden u. a. anhand der Schmelztemperatur sowie der Ziehkraft variiert. Die Pipette ist mit einer leitfähigen Elektrolytlösung (idealerweise KCl) aufgefüllt. In die Lösung ist ein chlorierter Silberdraht eingetaucht, der mit der *Headstage* verbunden ist. Das konstante Löslichkeitsprodukt der Kalium- und Chloridionenkonzentration sorgt für ein nahezu stabiles Pipettenpotential während der Signalleitung [89].

Um die Eigenschaften der Pipette für die Signalleitung zu verbessern, werden unterschiedliche Maßnahmen getroffen. So verbessert die Beschichtung mit hydrophoben Substanzen (Wachs, Sylgard<sup>®7</sup> etc.) deutlich das Signal-Rausch-Verhältnis bei hohen Frequenzen, da die Ausbildung von Streukapazitäten verringert wird. Aufgrund von Oberflächenspannungen würde es sonst oberhalb der Pipettenspitze zum Hochkriechen des Lösungsfilms an der Pipettenaußenseite kommen [90]. Zusätzlich wird während des Experiments die Eintauchtiefe in die Messkammer auf ein Minimum beschränkt und die Lösung in ihrem Inneren nur so weit aufgefüllt bis ein ausreichend guter elektrischer Kontakt zum Ag/AgCl-Draht entsteht. Eine weitere konstruktive Maßnahme sieht vor, dass die Entfernung der Pipette zu allen geerdeten Oberflächen maximal ist. Diese Streukapazitäten, die sich als Parallelkapazitäten (unterer Picofarad-Bereich) zum Eingang der Elektronik auswirken, führen im höheren Frequenzbereich zu einem dominierenden Spannungsrauschen [48]. Hamill *et al.* [87] nennen bspw. für ihre Gesamtkapazität aus Pipette und Pipettenhalter einen Wert von 4 pF bis 7 pF. Die Pipette wird zusätzlich hitzepoliert, damit die Ränder an ihrer Spitze glatt sind. Auf diese Weise wird die Ausbildung eines *Giga-Seals* stark begünstigt [87]. Die Herstellung und

---

<sup>7</sup> Der Markenname Sylgard<sup>®</sup> (Dow Corning Corp., USA) steht für ein hydrophobes Silikon-Elastomer.

Spezifikation von *Patch*-Pipetten wurden von Hamill *et al.* [87], Levis und Rae [91] sowie Penner [88] ausführlich beschrieben.

Die Größe der Pipettenöffnung legt nicht nur die Fläche des eingeschlossenen Membranausschnitts bei der *Patch-Clamp*-Ableitung fest (**Abbildung 4-1 C** und **Abbildung 4-2 A**), sondern definiert auch unmittelbar den sog. Pipettenwiderstand in der freien Lösung. Bei einem Standard-Öffnungsdurchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$  bis 2  $\mu\text{m}$  liegen die typischen Pipettenwiderstände zwischen 2  $\text{M}\Omega$  und 10  $\text{M}\Omega$  [92]. Die Pipetten der *APC*-Systeme besitzen ähnliche Werte (**4.3.2**). Neben ihrem Widerstand werden Pipetten auch durch ihre Wandstärke charakterisiert. So weisen dünnwandige Pipetten (ca. 0,15 mm) bei gleichem Öffnungsdurchmesser einen niedrigeren Pipettenwiderstand auf als dickwandige Pipetten (0,3 mm bis 0,5 mm), weshalb dünnwandige Pipetten vor allem für Ganzzellaufleitungen bevorzugt verwendet werden. Auch ist die kapazitive Kopplung dickwandiger Pipetten erheblich geringer als die dünnwandiger Pipetten, weshalb sie vor allem bei Einzelkanalaufleitungen ihre Anwendung finden. Von Sakmann und Neher [93] wurde die Abhängigkeit der elektrischen Pipetteneigenschaften von den geometrischen Parametern ausführlich beschrieben. In diesem Zusammenhang werden in **4.1.5.2** die Notwendigkeit für einen möglichst geringen Pipetten- bzw. Serienwiderstand sowie Methoden zu dessen Kompensation beschrieben. Der Pipettenwiderstand wird messtechnisch ermittelt, wenn die Pipette in die Badlösung der Messkammer eintaucht und ein definierter Testpuls angelegt wird (**Abbildung 4-4 B**). Numberger und Draguhn [59] beschreiben hierfür einen unipolaren Puls von  $U_{\text{Steuer}} = -10 \text{ mV}$  mit einer Zeitdauer von 20 ms, der mit einer Frequenz von 2 Hz bis 5 Hz wiederholt wird. Ein Testpuls von  $U_{\text{Steuer}} = +5 \text{ mV}$  mit einer Länge von 5 ms wurde von Lepple-Wienhues *et al.* [40] beschrieben. Anhand der Stromantwort kann im *Voltage-Clamp*-Modus der Pipettenwiderstand vereinfacht nach dem Ohmschen Gesetz berechnet werden (**4.1.4**).

### 4.1.3 *Giga-Seal*-Abdichtung

Für erfolgreiche Signalaufleitungen bei *Patch-Clamp*-Experimenten wird eine gute Abdichtung (*Giga-Seal*) zwischen der Pipette und der Zellmembran benötigt. Ein hoher *Seal*-Widerstand größer 1  $\text{G}\Omega$  ist die Voraussetzung für eine weitgehend komplette elektrische Isolation des Membranausschnitts und führt zu einem vertretbaren Stromrauschen. Die Namensgebung „*Giga-Seal*“ ist auf Hamill *et al.* [87] zurückzuführen. Für ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis sollte laut Numberger und Draguhn [59]

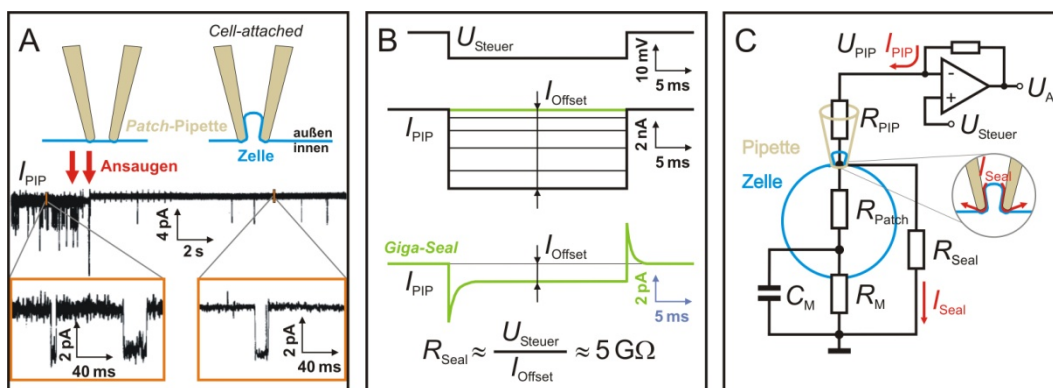
der untere Grenzwert der Abdichtung  $5 \text{ G}\Omega$  betragen. Allerdings berichteten Kiss *et al.* [94] von zufriedenstellenden Ganzzelleableitungen mit Abdichtwiderständen zwischen  $50 \text{ M}\Omega$  und  $600 \text{ M}\Omega$  unter Nutzung eines planaren APC-Systems. Sordel *et al.* [95] nennen für erfolgreiche Ganzzelleableitungen einen minimal notwendigen *Seal*-Widerstand von nur  $200 \text{ M}\Omega$ .

Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks in der *Patch*-Pipette wird der Membranausschnitt angesaugt (**Abbildung 4-3 A**). Im Querschnitt betrachtet, bildet sich durch die Einstülpung der Membran innerhalb der Pipette eine  $\Omega$ -Form, so wie es in **Abbildung 4-1 C** und **Abbildung 4-3 A** zu erkennen ist. Der Abstand zwischen Glaspipette und Zellmembran beträgt laut Ogden und Stanfield [96] weniger als  $1 \text{ nm}$ . Sherman-Goldman [48] berichtet, dass es lange Zeit keine ausreichende, molekulare Beschreibung für die Ausbildung des *Giga-Seals* gab. Corey und Stevens [97] zogen verschiedene Möglichkeiten als Erklärung für den *Giga-Seal* in Betracht. Einer ihrer Ansätze beruhte auf den elektrostatischen Wechselwirkungen der Ionenbindungen, die zwischen der Membran und der Glasoberfläche vorliegen. Ein weiterer Ansatz bezieht die van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Membran und Glas aufgrund des dichten Abstands mit ein. Suchyna *et al.* [98] geben weitere Erklärungsansätze. Auch ohne genaue Ursachenklärung sind zwei wesentliche Grundvoraussetzungen zum Erlangen des *Giga-Seals* bekannt, die Verwendung von frisch hergestellten, sauberen *Patch*-Pipetten sowie von gefilterter Elektrolytlösung. Zusätzlich können der Rand der Pipettenspitze durch Hitzepolieren geglättet und die Oberfläche der zu untersuchenden Zelle durch enzymatische Behandlung ihrer Zellmembran von störenden Molekülen gesäubert werden [3].

Die elektrischen Eigenschaften des *Seal*-Widerstands sind in **Abbildung 4-3 B, C** anhand eines Beispiels beschrieben. Demnach stellt ein zu kleiner *Seal*-Widerstand eine niederohmige Verbindung des Zellinneren oder des Membranflecks zum extrazellulären Raum dar. In Hinblick auf das resultierende Stromrauschen des *Giga-Seals* ist zu beachten, dass thermische Bewegungen der freien Ladungen die Hauptquelle des Rauschens bei der *Patch-Clamp*-Ableitung ausmachen [48]. Die Varianz des Stromrauschens wird analog zum thermischen Widerstandsrauschen berechnet. Der effektive Rauschstrom  $I_{R,eff}$  berechnet sich damit nach **Gleichung 4-1**.

$$I_{R,eff} = \sqrt{S_I^2} = \sqrt{\frac{4k_B T \Delta f}{R}} \quad (4-1)$$

Wird ein *Giga-Seal* mit einem Abdichtwiderstand von bis zu 100 G $\Omega$  während eines Experiments erreicht, führt dies zu einer deutlich sichtbaren Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (**Abbildung 4-3 A**). Gemäß Hamill *et al.* [87] und Neher [92] dominieren ab dann andere Rauschquellen, die in der Pipette, der Elektronik usw. lokalisiert sind. Bei einem sehr guten *Giga-Seal* mit 100 G $\Omega$  ( $\Delta f = 10$  kHz;  $T = 37$  °C) beträgt nach **Gleichung 4-1** der zusätzliche effektive Rauschstrom im *Voltage-Clamp*-Modus nur  $I_{R,eff} = 41$  fA. Hingegen würde ein *Seal*-Widerstand von bspw. nur 100 M $\Omega$  zu einem  $I_{R,eff} = 1,3$  pA führen. Für Einzelkanalableitungen, wie sie in **Abbildung 3-4** und **Abbildung 4-3 A, B** dargestellt sind, spielt demnach die Höhe des *Seal*-Widerstands eine übergeordnete Rolle.



**Abbildung 4-3: Ausbildung eines Giga-Seals**

**A:** Beispielmessung an Membran (blau) eines Froschmuskels sowie schematische Darstellung nach Aufsetzen der *Patch-Pipette* auf die Membran (oben-links) bzw. nach Ausbildung des *Giga-Seals* (oben-rechts). Nach Aufsetzen  $R_{Seal}$  ca. 150 M $\Omega$ . Verringerung des Rauschens nach Ausbildung *Giga-Seal* ( $R_{Seal} \approx 60$  G $\Omega$ ). Die obere Messung zeigt den Stromverlauf während und nach dem Anlegen eines Unterdrucks (rote Pfeile) an die Pipette. Die unteren Stromverläufe zeigen Ausschnitte von Einzelkanalströmen vor (links) und nach (rechts) dem Erreichen des *Giga-Seals*. Umgezeichnete Abbildung aus [87]. **B:** Ausbildung eines *Giga-Seals* beobachtet anhand der Stromantwort auf einen Testpuls (obere Kurve). Prinzipielle Darstellung. Unipolarer Testpuls:  $U_{Steuer} = -10$  mV und  $t_{Puls} = 20$  ms mit Wiederholfrequenz von 2 Hz bis 5 Hz. Der mittlere Signalverlauf zeigt eine Abnahme des Stromes  $I_{Offset}$  mit Zunahme des Abdichtwiderstandes  $R_{Seal}$ . Die untere Stromantwort (grün) veranschaulicht das Erreichen eines *Giga-Seals* von ca. 5 G $\Omega$ . Eigene Abbildung nach [59]. **C:** Elektrisches ESB zur Auswirkung des  $R_{Seal}$  in der *Cell-Attached*-Konfiguration. Der Abdichtwiderstand beschreibt den Leckstrom  $I_{Seal}$  zum extrazellulären Raum. Eigene Abbildung nach [14, 96, 99].

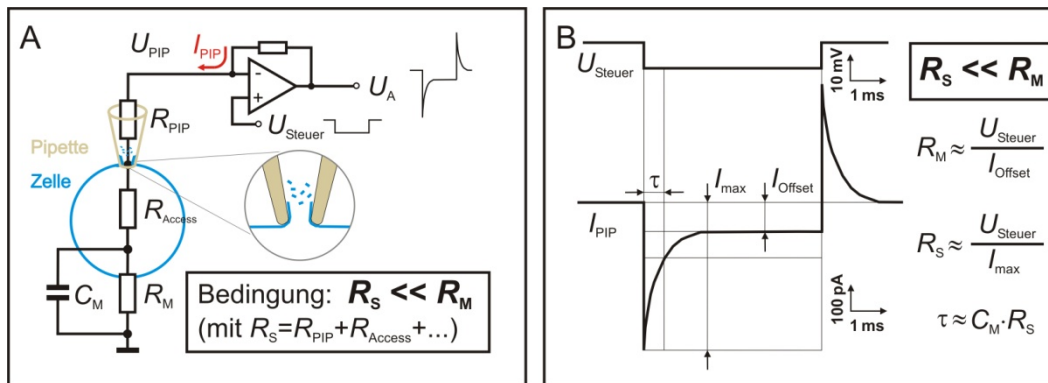
#### 4.1.4 Ganzzelleableitung

Das Ziel bei der Ganzzelleableitung ist, das Verhalten der Summe der Einzelströme aller aktiven Ionenkanäle zu registrieren. Der typischerweise gemessene Gesamtstrom wurde von Mathes [100] mit größer 50 pA angegeben. Für die Messung ist die Zellmembran zu

durchbrechen, um einen direkten elektrischen Kontakt mit dem Zellinneren zu erhalten. Abgesehen vom elektrischen Kontakt wird das Öffnen der Membran zumindest teilweise zum Vermischen der Pipettenlösung mit dem Zytoplasma führen. Dadurch ändert sich in einem gewissen Maße der Ionenzustand der Zelle, sodass Messergebnisse unter Umständen falsch interpretiert werden können. Die Geschwindigkeit dieses Stoffaustausches ist vor allem abhängig von der Zellgröße und den Eigenschaften der verwendeten Pipette. Je nach Anwendung ist die Pipettenlösung daher in ihrer Ionen- und Substanzkonzentration anzupassen, wie bspw. durch Nachahmung des physiologischen Ionen-Milieus des Zytoplasmas. Über die Pipette ist es aber auch möglich bestimmte Testsubstanzen (Farbstoffe für Fluoreszenzversuche, Kanalblocker etc.) ins Zellinnere einzuschleusen und dort ihre Wirkung auf die Aktivität der verschiedenen Ionenkanäle zu untersuchen. Marty und Neher [45] sowie Pusch und Neher [101] beschreiben den Vorgang des Stoffaustausches zwischen Pipette und Zelle.

Wie in **3.2** dargestellt, werden die hier betrachteten elektrischen Eigenschaften der Zellmembran durch die Ionenkanäle und die Lipiddoppelschicht bestimmt. Bei der Ganzzelleableitung wird unter Verwendung des *Voltage-Clamp*-Modus (**4.1.4.2**) das Transmembranpotential der gesamten Zelle über die *Patch*-Pipette vorgegeben. Die resultierende Stromantwort gibt Aufschluss über die Eigenschaften und Reaktionen der gesamten Zellmembran (**Abbildung 4-4 B**). Gegenüber der *Cell-Attached*-Konfiguration (Einzelkanalableitung) nimmt der gemessene Strom ( $I_{PIP}$ ) bei einer sprunghaften Änderung des Transmembranpotentials um mehrere Größenordnungen zu, da die gesamte Membran zunächst umgeladen werden muss. Zudem wirkt sich in dieser Konfiguration der Membranleitwert der gesamten Membran aus und ist nicht mehr auf nur einen kleinen Membranausschnitt beschränkt. Aufgrund des wesentlich größeren Stromflusses gegenüber der *Cell-Attached*-Konfiguration, darf der Spannungsabfall über dem Serienwiderstand  $R_S$  nicht vernachlässigt werden. Um dem entgegenzuwirken, werden verschiedene Kompensationsmethoden eingesetzt (**4.1.5**).

Das elektrische ESB einer Ganzzelleableitung ist in **Abbildung 4-4 A** dargestellt. Im Vergleich zu **Abbildung 4-3 C** verschwindet der Widerstand des Membranflecks  $R_{Patch}$  nach dem Durchbrechen der Membran und geht bei der Ganzzelleableitung in den sog. *Access*-Widerstand  $R_{Access}$  über. Der *Access*-Widerstand beschreibt vor allem die Verunreinigung der Pipettenöffnung mit Membranfragmenten und anderem Zellmaterial [59].



**Abbildung 4-4: Ganzzelleableitung im Voltage-Clamp-Modus**

Für  $R_S \ll R_M$  sowie eine intakte *Giga-Seal-Formation* ( $R_M \ll R_{Seal}$ ). **A:** ESB der Ganzzelleableitung. Die Zelle wurde vereinfacht als Kreis dargestellt, die Zellmembran blau gefärbt. Der Serienwiderstand  $R_S$  setzt sich u. a. aus dem Pipettenwiderstand  $R_{PIP}$  und dem Widerstand  $R_{Access}$  zusammen. **Kreisförmige Einblendung:** vergrößerte Darstellung der durchbrochenen Membran. **B:** Dargestellt sind die mathematischen Beziehungen zur näherungsweisen Bestimmung von  $R_S$ ,  $R_M$  und  $C_M$  im *Voltage-Clamp-Modus*. Testpuls:  $U_{Steuer} = -10$  mV;  $t_{Puls} = 10$  ms und Wiederholfrequenz von 2 Hz bis 5 Hz. Herleitung in [59, 96, 99, 102].

Die allgemeinen Beziehungen von Strom und Spannung am Kondensator gelten nach **Abbildung 4-4** auch für die Membrankapazität einer biologischen Zelle. So kommt es bei einer Änderung der Membranspannung zu transienten Strömen, da die Membrankapazität zunächst umgeladen werden muss. Die resultierende Zeitkonstante  $\tau$  in **Abbildung 4-4 B** ist von den Zelleigenschaften, aber auch von den Elektroden- und Medieneigenschaften abhängig und wird im *Voltage-Clamp-Modus* (**4.1.4.2**) aus der Stromantwort ermittelt.

#### 4.1.4.1 Durchführung einer klassischen Ganzzelleableitung

Der Ausgangspunkt ist, wie bei jeder klassischen *Patch-Clamp*-Untersuchung, das manuelle Aufsetzen einer unbenutzten, sauberen *Patch-Pipette* auf die Zellmembran. Die Zelle befindet sich adhärent wachsend auf dem Boden einer mit extrazellulärem Medium gefüllten Messkammer. Zuvor wird die Oberfläche der Zelle in der Zellpräparation enzymatisch gereinigt, um sie von ihrer extrazellulären Matrix sowie dem Bindegewebe zu befreien [3, 96]. Wie in **Abbildung 4-6 A** und **Abbildung 4-7 A** schematisch dargestellt, ist die Messlösung über eine Badelektrode geerdet. Für das Aufsetzen der *Patch-Pipette* wird ein Mikromanipulator unter visueller Kontrolle verwendet. Nach dem Eintauchen der Pipette (Überdruck wurde zuvor angelegt) in die Badlösung erfolgt ein *Offset-Abgleich*, wie er in **4.1.5.3** beschrieben wird. Bis kurz vor dem Aufsetzen auf die Zellmembran bleibt der leichte Überdruck in der *Patch-Pipette* bestehen, damit ständig Flüssigkeit aus ihrer Öffnung strömt und diese nicht verunreinigt wird. Es erfolgt ein erneuter *Offset-Abgleich* der Steuerspannung unmittelbar vor

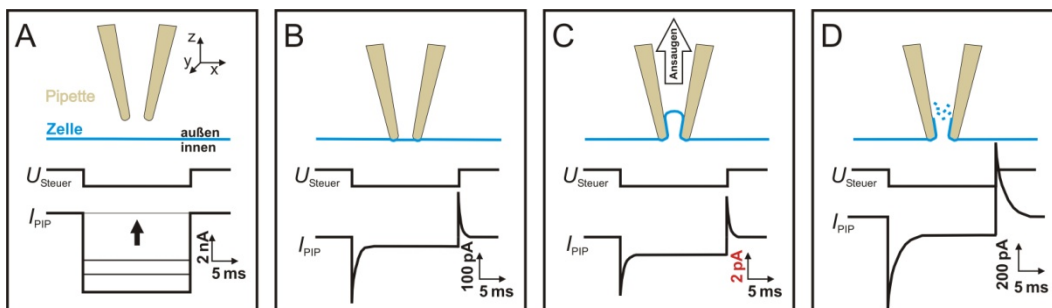
dem Aufsetzen. Durch ständiges Anlegen eines elektrischen Testpulses wird noch vor dem Aufsetzen der *Patch*-Pipette ihr Pipettenwiderstand ermittelt (**Abbildung 4-3 B**, **Abbildung 4-5 A**). In der Nähe der Zelloberfläche erhöht sich der Widerstand dann leicht [59]. Durch Anlegen eines „leichten“ Unterdrucks in der *Patch*-Pipette wird der Membranausschnitt angesaugt (**Abbildung 4-5 B, C**). Bei zu hohem Unterdruck wird die Membran ggf. zerstört oder es kann zur mechanischen Aktivierung von Ionenkanälen kommen. Gelingt das Ansaugen des Membranausschnitts, isoliert der gläserne Rand der Pipette die umschlossene Membranfläche elektrisch und physisch von der umgebenen Lösung. In dieser *Cell-Attached*-Konfiguration müssen Relativbewegungen zwischen Zelle und Pipette vermieden werden, da sich sonst die feste Verbindung verschlechtert oder sogar abreißt (**Abbildung 4-3** und **Abbildung 4-5 C**).

Bevor ausgehend von der *Cell-Attached*-Konfiguration in die Ganzzelleableitung übergegangen wird, erfolgt eine Kompensation der transienten, kapazitiven Ströme, die vor allem durch die Pipette und den Pipettenhalter hervorgerufen werden. Diese sog. Pipettenkompensation wird in **4.1.5** vorgestellt. Mit ihr wird verhindert, dass bei sprunghaften Änderungen der Membranspannung die Stromantwort zu hoch ausfällt oder der Verstärker evtl. übersteuert und in die Sättigung geht. Im *Voltage-Clamp*-Modus (**4.1.4.2**) wird anschließend die Steuerspannung auf das zu erwartende Ruhemembranpotential des jeweiligen Zelltyps gelegt. Dieser Wert der Steuerspannung wird auch als Haltepotential bezeichnet und dient als Gleichspannungsanteil für die weiteren Untersuchungen. Das Haltepotential kann jedoch auf jeden beliebigen Wert gesetzt werden. Geht der gemessene Strom dabei gegen Null, entspricht die eingestellte Steuerspannung dann nahezu dem Ruhemembranpotential der Zelle [87]. Durch das anschließende Durchbrechen der Zellmembran sowie das Umladen (Depolarisation) wird die Zelle dann weder belastet noch geschädigt [59]. Durch eine kurzzeitige Erhöhung des Unterdrucks in der *Patch*-Pipette oder durch Anlegen eines elektrischen Feldes (**Kapitel 5**) wird anschließend die Membran im Bereich der Pipette zerstört, sodass ein direkter elektrischer Kontakt zum Zellinneren entsteht.

In der Fachsprache des *Patch-Clamps* wird das Durchbrechen der Zellmembran mit Hilfe eines elektrischen Feldes als *Tickling*, *Buzzing* oder *Zapping* bezeichnet. Numberger und Draguhn [59] sowie Sherman-Gold [48] berichteten jedoch, dass das kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes, also die Elektroporation der Membran, den *Giga-Seal* eher zerstört. In **5.3.1** wird die Anwendung der Elektroporation im *Patch-*



*Clamp*-Versuch näher erläutert. Sofern das Öffnen der Zellmembran erfolgreich war und der *Giga-Seal* intakt bleibt, besteht die Möglichkeit zur intrazellulären Ganzzelleableitung. Die Dauer einer Ganzzelleableitung mit stabilem *Seal* kann mehr als eine Stunde betragen [45]. In dieser Konfiguration können die elektrischen Eigenschaften der gesamten Zellmembran bestimmt werden (**Abbildung 4-4 B**). Danach erfolgt eine zweite Kompensation der kapazitiven Ströme (Zellmembran  $C_M$ ) sowie die Kompensation des Serienwiderstandes (**4.1.5**). Die elektronische Kontrolle der Annäherung der *Patch*-Pipette, die Ausbildung des *Giga-Seals* sowie die näherungsweise Bestimmung der Membraneigenschaften in der Ganzzelleableitung sind anhand der Stromantwort auf den Testpuls in **Abbildung 4-5** dargestellt.



**Abbildung 4-5: Durchführung einer Ganzzelleableitung**

Schematische Schritte vom Eintauchen der Pipette in die Messkammer bis hin zur Ganzzelleableitung. Verfahrensweise im *Voltage-Clamp*-Modus. Der obere Teil der Skizzen dokumentiert jeweils Position und Zustand von Pipette (gelb) und Zellmembran (blau) in Anlehnung an [59, 103, 104]. Stromantwort (unterer Signalverlauf) auf Testpuls (obere Kurve). Testpuls:  $U_{\text{Steuer}} = -10 \text{ mV}$  und  $t_{\text{Puls}} = 20 \text{ ms}$  mit Wiederholffrequenz von 2 Hz bis 5 Hz. **A:** Bestimmung des Pipettenwiderstandes  $R_{\text{PIP}}$  aus Stromantwort nach dem Eintauchen. Annäherung der *Patch*-Pipette an die Zelle (in x-, y- und z-Richtung) mit dem Mikromanipulator. Der Strom  $I_{\text{PIP}}$  sinkt in der Nähe der Zelle (schwarzer Pfeil verdeutlicht Abnahme des Stroms). **B:** Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran. **C:** *Cell-Attached*-Konfiguration mit Ausbildung des *Giga-Seals*. Zumeist ist ein Ansaugen über den Fluid-Kanal notwendig. Anschließend erfolgt die Kompensation der Pipettenkapazität. **D:** Ganzzelleableitung nach dem Durchbrechen der Zellmembran. Gegenüber der *Cell-Attached*-Konfiguration muss jetzt die gesamte Membranfläche umgeladen werden. Die Stromstärke steigt, da der gesamte Membranleitwert sowie die Membrankapazität wirksam werden. Die näherungsweise Bestimmung des Membranleitwertes sowie der Membrankapazität ist aus der Stromantwort möglich. Anschließend erfolgt eine Kompensation der Zellmembrankapazität (nicht dargestellt).

Abgesehen von der in **Abbildung 4-5** dargestellten Verwendung des *Voltage-Clamp*-Modus wird bei *Patch-Clamp*-Versuchen gelegentlich in den *Current-Clamp*-Modus umgeschaltet. Durch gezielte Depolarisation der Zellmembran ermöglicht der *Current-Clamp*-Modus das Auslösen von Aktionspotentialen bei erregbaren Zellen. Beide Modi werden in den folgenden Teilabschnitten vorgestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise und experimentellen Prozedur von *Patch-Clamp*-Ableitungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration wird bspw. in Jackson [104], Sontheimer und Olsen [103] sowie Numberger und Darguhn [59] vorgenommen.



#### 4.1.4.2 *Voltage-Clamp*-Modus

*Patch-Clamp*-Untersuchungen werden überwiegend im *Voltage-Clamp*-Modus durchgeführt. Mit dieser Messmethode wird bei der Ganzzelleableitung unter Vorgabe der Steuerspannung  $U_{\text{Steuer}}$  der resultierende Stromfluss  $I_{\text{PIP}}$  durch die gesamte Zellmembran gemessen. Daraus kann der Membranleitwert berechnet werden, der sich bei konstantem Transmembranpotential vereinfacht proportional zur Summe der Ionenkanal-Leitfähigkeiten verhält. Auf diese Weise ist es möglich eine Aussage über die Abhängigkeit der transportierten Ionenmenge vom Transmembranpotential zu erhalten. Obwohl *Voltage-Clamp* damit keinen natürlichen Prozess nachahmt, ist es hauptsächlich für die Untersuchung von spannungsgesteuerten Ionenkanälen von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass bspw. bei Neuronen der überwiegende Teil der Ionenkanäle spannungsgesteuert ist [48]. Cole und Curtis [105, 106] konnten daher mit dieser Messmethode erstmalig nachweisen, dass sich der Membranleitwert einer Nervenzelle bei elektrischer Erregung erhöht. Ebenfalls unter Verwendung von *Voltage-Clamp* hatten die Arbeiten von Huxley und Hodgkin [62, 107-110] gezeigt, dass für Natrium- und Kaliumionen verschiedene Schleusen in der Zellmembran existieren. Sie hatten hierfür die Entstehung von Aktionspotentialen an erregten Axonen vom Tintenfisch mit Einstech-Mikropipetten untersucht, den Vorläufern der *Patch-Clamp*-Technik (**Abbildung 3-6 A**).

Intrazelluläre Untersuchungen basierend auf der *Voltage-Clamp*-Technik können mit einer oder zwei Mikropipetten erfolgen. Bei der Verwendung von nur einer Pipette wird zwischen dem kontinuierlichen und diskontinuierlichen *Voltage-Clamp* unterschieden, wobei das kontinuierliche *Einzel-Elektroden-Voltage-Clamp* (*cSEVC*) der Standardfunktionsweise für Ableitungen bei der *Patch-Clamp*-Technik entspricht. Mit beiden *Einzel-Elektroden*-Varianten ist es möglich Experimente an kleinen Zellen durchzuführen. Hingegen ist das sog. *Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp* (*TEVC*) auf Zellen mit Zelldurchmessern von größer 20  $\mu\text{m}$  beschränkt [103, 111]. Neher und Sakmann [3] berichten jedoch, dass typische Säugetierzellen mit einem Zelldurchmesser von 10  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  bereits das Einstechen von nur einer Elektrode kaum überstehen. Als Schlussfolgerung wurde für die Systemkonzeption des chipbasierten Messsystems in **Kapitel 6** der Einsatz des *TEVC* ausgeschlossen, da eine zweite Mikropipette den Aufwand drastisch erhöht hätte. Weiterführende Darstellungen zum *TEVC* sind Finkel und Gage [112] sowie Sherman-Gold [48] zu entnehmen.

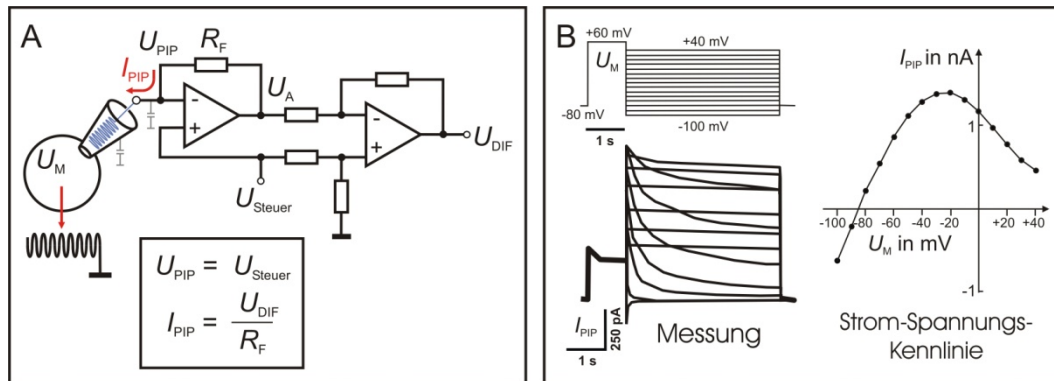
Beim diskontinuierlichen *Einzel-Elektroden-Voltage-Clamp* (*dSEVC*) wird eine Art Zeitmultiplexbetrieb für die Stromeinspeisung und Spannungsmessung verwendet, damit eine gegenseitige Beeinflussung vermieden wird. Aufgrund des höheren Rauschens ist es für Messströme kleiner 5 nA schlechter geeignet als das *cSEVC* [48]. Allerdings entsteht beim *dSEVC* kein Fehler durch den Serienwiderstand, so wie er in **4.1.5.2** beschrieben wird. Das *dSEVC* wurde von Finkel und Redman [113] beschrieben.

Im Vergleich zum *TEVC* und *dSEVC* erfolgt beim *cSEVC*, also dem auf *Voltage-Clamp* basierendem *Patch-Clamp*, die Vorgabe des Transmembranpotentials gleichzeitig zur Messung des Stroms über nur eine Elektrode. Die schaltungstechnische Grundstruktur des *cSEVC* zeigt **Abbildung 4-6 A**, die aus einem Strom-Spannungs-Wandler mit hochohmigem Rückkopplungswiderstand aufgebaut wird. Aufgrund der hohen Verstärkung sind Kapazitätskompensationen (**4.1.5.1**) durchzuführen, da über den hohen Rückkopplungswiderstand auch die parasitären Eingangskapazitäten umgeladen werden müssen. Durch die Kompensation wird verhindert, dass bei einer sprunghaften Änderung der Steuerspannung der Verstärker übersteuert. Auf eine Beschreibung der Funktionsweise des Strom-Spannungs-Wandlers wird verzichtet und auf **6.2.2.2** sowie weiterführende Literatur wie Ogden [102] oder Halliwell *et al.* [89] verwiesen.

Sofern alle beteiligten *Offset*- und Leckstromgrößen in **Abbildung 4-6 A** vernachlässigt werden, entspricht das Pipettenpotential (invertierender Eingang) aufgrund der Rückkopplung der vorgegebenen Steuerspannung (nicht-invertierender Eingang). Der gemessene Strom  $I_{PIP}$  ist dann betragsmäßig so groß wie der Strom, der durch die Membran fließt. Der Strom  $I_{PIP}$  lässt bei der Ganzzelleableitung unmittelbar Rückschlüsse auf den Leitwert der Zellmembran zu (**Abbildung 4-4 B**). Hierfür wird das Transmembranpotential ausgehend vom Haltepotential kurzzeitig durch einen Testpuls auf verschiedene Spannungswerte gesetzt und die Stromantwort registriert. In **Abbildung 4-6 B** ist beispielhaft eine Strom-Spannungs-Beziehung dargestellt [114].

Sofern für die Zellmembran, wie in **Abbildung 4-4 A** dargestellt, ein vereinfachtes ESB angenommen wird, setzt sich die resultierende Stromantwort ( $I_{PIP}$ ) auf einen Testpuls aus der Summe zweier Terme zusammen. Zum einen aus dem interessierenden Anteil des Stromes, der von den die Membran durchquerenden Ionen getragen wird. Der zweite Term wird von den Ionen getragen, die sich bis zur Membran bewegen, um die Membrankapazität zu laden bzw. zu entladen [70]. Letzterer, kapazitiver Anteil am Gesamtstrom führt zu den in **Abbildung 4-4 B** ermittelten Umladungszeiten, die über die

Zeitkonstante ( $\tau$ ) beschrieben werden. Anhand der Zeitkonstante wird die Membrankapazität näherungsweise bestimmt. Sofern die Änderung des Transmembranpotentials abgeschlossen ist, fließt kein kapazitiver Strom mehr, sodass nur noch der interessierende Anteil vom Ionenfluss durch die Membran hindurch übrig ist und gemessen wird. Über das ohmsche Gesetz kann dann der Membranwiderstand bzw. der Membranleitwert ermittelt werden (**Abbildung 4-4 B**).



**Abbildung 4-6: Voltage-Clamp-Modus**

**A:** Schaltungstechnischer Grundaufbau und Berechnungen zum Voltage-Clamp-Modus bei der Ganzzellableitung. Die Bestimmung des Pipettenstroms  $I_{PIP}$  erfolgt mit einem Strom-Spannungswandler. Durch Vorgabe der Steuerspannung wird das Pipettenpotential verändert und die resultierende Stromantwort aufgezeichnet. Der Differenzverstärker bildet die Potentialdifferenz aus der Ausgangsspannung  $U_A$  und der Steuerspannung  $U_{Steuer}$ . Die Badelektrode (links unten) dient zum Referenzieren des Außenmediums. Die Zelle wird vereinfacht als kugelförmig angenommen. Der Einfluss von Streukapazitäten (grau eingezeichnet) ist aufgrund von Kompensations- und Konstruktionsmaßnahmen vernachlässigt. **B:** Strom-Spannungs-Beziehung von hERG transfizierten HEK 293 Zellen. Umgezeichnete Abbildung aus [114]. Links: Voltage-Clamp-Protokoll (oben) und Stromantwort (unten) einer Zelle. Um die hERG-Kanäle zu aktivieren bzw. teilweise zu inaktivieren, wurde die Zelle mit +60 mV für  $t = 1$  s depolarisiert. Anschließend wurde die Zelle mit verschiedenen Spannungswerten repolarisiert. Die maximale Stromantwort erhielt man bei  $U_M = -20$  mV. Rechts: Resultierende Strom-Spannungs-Kennlinie von mehreren Zellen ( $n = 4$ ) für  $T = 35$  °C.

Die übliche Methode zur Bestimmung der Ionenselektivität eines einzelnen Kanals ist die Einzelkanalableitung. Hierbei werden im Voltage-Clamp-Modus die resultierenden Amplituden der Einzelkanalströme bei unterschiedlichen Steuerspannungen ermittelt und in einer Strom-Spannungs-Kurve dargestellt (**Abbildung 4-6 B**) [103]. Aus der Kurve wird ersichtlich, dass der Leitwert einiger Kanäle von der Stromrichtung abhängig ist. Kanäle, bei denen der Anstieg der Strom-Spannungs-Kurve konstant ist, werden häufig als ohmscher Kanal bezeichnet. Allerdings zeigen viele offene Kanäle einen nichtlinearen Zusammenhang von Spannung und Strom (**Abbildung 4-6 B**). Der Schnittpunkt der Stromkurve ( $I \approx 0$  pA) mit der Achse der Steuerspannung wird als Umkehrpotential (englisch: *reversal potential*) bezeichnet. Das Umkehrpotential gibt den Wert des Membranpotentials an, bei dem Ein- und Ausstrom der Ionen durch die Membran im

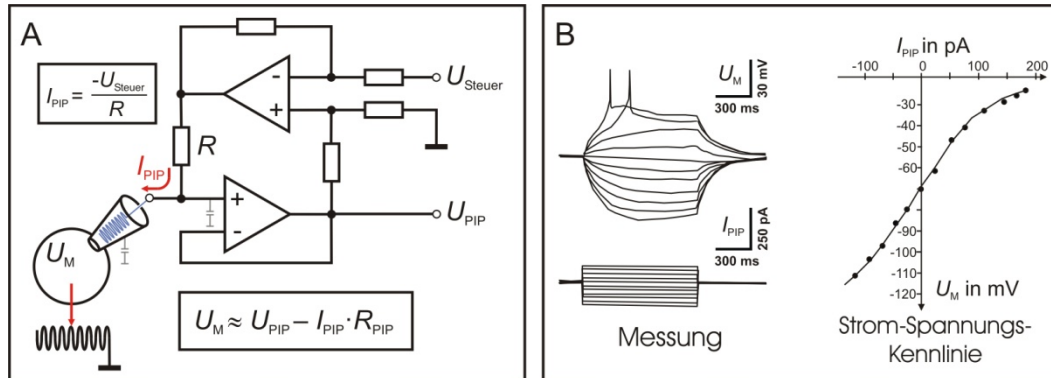
Gleichgewicht sind. Das Umkehrpotential ist daher ein bedeutender Parameter zur Bestimmung der Ionenselektivität.

Ein Beispiel für das zufällige Öffnen und Schließen der Ionenkanäle mit bestimmten Zeitkonstanten zeigt **Abbildung 3-4**. Die Ergebnisse eines Experiments liegen daher erst nach statistischer Auswertung von zahlreichen, unabhängigen Einzelereignissen vor. So hatten Neher und Sakmann [86] zur Analyse ihrer Messwerte eine Mittelwertbildung von 40 bis 50 detektierten Ereignissen der Stromamplitude vorgenommen. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Einzelwerte in Größenklassen mit anschließender Häufigkeitsbestimmung der Ereignisse, die in Histogrammen (Amplituden-, Offenzeit- und Geschlossenzeithistogrammen) dargestellt werden [59]. Die Histogramme geben auch Aufschluss darüber, inwieweit die aufgezeichneten Ereignisse den Eigenschaften von Ionenkanälen entsprechen, da mit ihnen mögliche Artefakte in den Messergebnissen erkannt werden. Anhand der ermittelten Stromamplituden wird zudem die Zahl der transportierten Ionen pro Zeiteinheit berechnet, um damit die Transporteffizienz eines Kanals zu charakterisieren. Detaillierte Beschreibungen zur Auswertung dieser Daten sind bspw. Sontheimer und Olsen [103], Numberger und Draguhn ([59] S. 126ff.) oder Hille [70] zu entnehmen.

#### 4.1.4.3 *Current-Clamp*-Modus

*Patch-Clamp*-Experimente im *Current-Clamp*-Modus ahmen den durch ein Aktionspotential hervorgerufenen Strom nach. Daraus ergeben sich Informationen und Rückschlüsse über das physiologische Erregungsmuster von Neuronen, bei ihrer Reaktion auf Neurotransmitter. Vereinfacht gesagt, werden bei erregbaren Zellen Aktionspotentiale durch gezielte Depolarisation ihrer Zellmembran ausgelöst [59]. Hierfür wird die Zelle mit einem definierten Strom belastet und dabei die Änderungen ihres Transmembranpotentials analysiert. Um das Ruhemembranpotential zu bestimmen, wird bei der Ganzzelleableitung der Strom gegen null geregelt. Darüber hinaus ist es im *Current-Clamp*-Modus möglich den Widerstand sowie die Kapazität der Membran zu bestimmen ([59] S. 96ff.). Um eine Zelle mit einem definierten Strom stimulieren zu können und zugleich das resultierende Transmembranpotential zu ermitteln, wird eine Kombination aus Spannungsmessung und Stromquelle benötigt. **Abbildung 4-7 A** zeigt die vereinfachte, schematische Darstellung einer solchen Schaltung, deren grundlegende Funktionsweise bereits in Tautorat [77] für die Ansteuerung von ionenselektiven

Feldeffekttransistoren zur Bestimmung des  $pH$ -Wertes beschrieben wurde. Das Versuchsergebnis einer Messung im *Current-Clamp*-Modus ist in **Abbildung 4-7 B** beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 4-7: Current-Clamp-Messung**

**A:** Die Messung der Pipettenspannung  $U_{PIP}$  erfolgt sehr hochohmig mit einem Spannungsfollower. Der Einfluss von Streukapazitäten (grau eingezeichnet) ist aufgrund von Kompensations- und Konstruktionsmaßnahmen vernachlässigt. Auch bei sprunghaften Änderungen der Steuerspannung bzw. bei hochfrequenten Strömen fließt der gesamte Strom der Stromquelle durch die Pipette in die Zelle und durch die Zellmembran in die Badelektrode. Die Badelektrode (links unten) dient zum Referenzieren des Außenmediums. Die Zelle wird vereinfacht als kugelförmig angenommen. Umgezeichnete Abbildung aus [48, 77]. **B:** *Current-Clamp*-Messung an embryonaler Pyramidenzelle (Neuron, 22 DIV) einer Schildkröte. Umgezeichnete Abbildung aus [115]. Links: Reaktion des Transmembranpotentials auf verschiedene Strompulse (Dauer:  $t = 1$  s). Bei starker Depolarisation werden Aktionspotentiale ausgelöst (Spannungsspitzen in der  $U_M$ -Kurve). Die Umladevorgänge der Membrankapazität und aller nicht kompensierter Streukapazitäten zu Beginn und am Ende des Strompulses in der  $U_M$ -Kennlinie sind deutlich zu erkennen. Rechts: Resultierende Kennlinie der Strom-Spannungsbeziehungen. Das Ruhemembranpotential liegt ca. bei  $-70$  mV ( $I_{PIP} \approx 0$  pA).

Zur Bestimmung des Transmembranpotentials ist von der gemessenen Pipettenspannung der Spannungsabfall über dem Pipettenwiderstand abzuziehen. Diese sog. *Bridge-Balance*-Technik ist nicht trivial, da sie voraussetzt, dass der Wert vom Pipettenwiderstand bekannt und konstant ist. Allerdings ändert sich sein Wert während des Experiments und muss für eine korrekte Kompensation innerhalb der Zelle analysiert werden [116]. Des Weiteren ist zu beachten, dass *Offset*-Spannungen (**4.1.5.3**) einen weiteren Anteil am gemessenen Pipettenpotential darstellen. Sie entstehen bspw. an der Grenzfläche Draht/Elektrolyt in der *Patch*-Pipette aufgrund der nicht idealen Eigenschaften der Bad- und Messelektroden (keine perfekten Elektroden 2. Art). Der Einfluss dieser Potentiale wird durch einen *Offset*-Abgleich weitgehend eliminiert [48]. In der Praxis wird die Schaltung in **Abbildung 4-7 A** um einen Strom-Monitor erweitert, der den tatsächlich fließenden Strom überwacht. Dies ist notwendig, da bspw. bei einem hohen Pipettenwiderstand die Gefahr des Übersteuerns der Schaltung besteht. In **Abbildung 4-7 A** wird dafür der Spannungsabfall über dem stromeinstellenden Widerstand  $R$  kontrolliert, der schaltungstechnisch in Reihe zur Pipette liegt. Den kompletten

schaltungstechnischen Aufbau eines *Current-Clamp*-Verstärkers mit integrierter Kompensation des Reihenwiderstands beschreibt Strickholm [116].

#### 4.1.5 Kompensationsmethoden

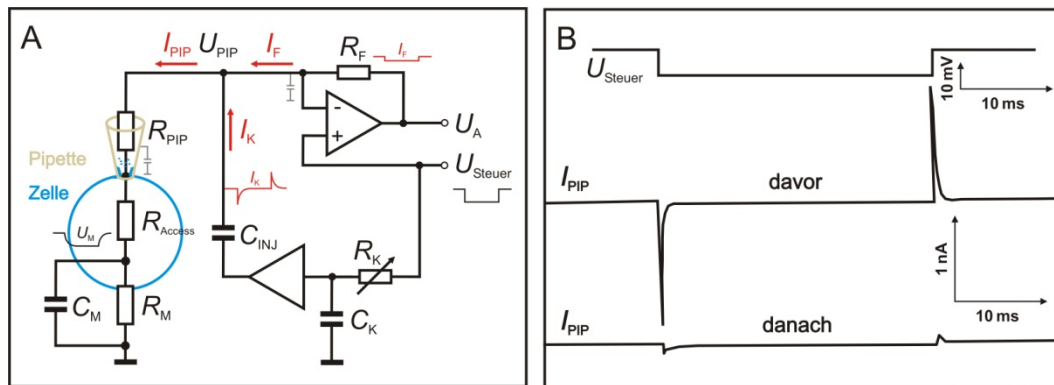
##### 4.1.5.1 Kapazitäten

Die Kompensation der wirksamen Kapazitäten am Eingang des *Patch-Clamp*-Verstärkers (*Headstage*) soll bei sprunghaften Änderungen des Transmembranpotentials ein Übersteuern vermeiden. Zudem wird dadurch das Rauschen leicht gemindert. Jedoch führt diese Kompensation weder zur Erhöhung der Genauigkeit noch zur Vergrößerung der Bandbreite bei der Signableitung [59]. Die Kapazitäten, zu denen verschiedenste Streukapazitäten sowie die Eingangskapazität des Verstärkers zählen, bestimmen maßgeblich das schaltungstechnische Verhalten (Bandbreite, Rauschen etc.) bei hohen Frequenzen. Konstruktive Maßnahmen zur Minimierung der Streukapazitäten der *Patch*-Pipette wurden in **4.1.2** beschrieben.

Die Kompensation dieser Kapazitäten setzt eine schaltungstechnische Erweiterung in der Elektronik voraus. In **Abbildung 4-8 A** ist für den *Voltage-Clamp*-Modus die erweiterte Schaltung dargestellt. Demnach wird mittels kapazitiver Kopplung ein transienter Kompensationsstrom in die Verbindung zwischen Pipette und Verstärker eingespeist. Damit an dieser Stelle kein zusätzliches Rauschen eingekoppelt wird, werden rauscharme Operationsverstärker und Koppelkondensatoren mit sehr geringer Kapazität im unteren Picofarad-Bereich verwendet. Anhand der Stromantwort auf einen Testpuls wird die Schaltung über das variable *RC*-Glied abgeglichen, sodass der Lade-strom weitgehend kompensiert wird. In den aktuellen klassischen und automatisierten *Patch-Clamp*-Systemen erfolgt diese Kompensation automatisch. Numberger und Draguhn [59] schlagen vor, dass mindestens zwei dieser in **Abbildung 4-8 A** dargestellten Kompensationsschaltungen pro *Patch-Clamp*-Verstärker verwendet werden, die sich ungestört überlagern. Von denen ist eine Schaltung mit einer schnellen Zeitkonstante für die Kompensation der Pipettenkapazität (typ.  $C \leq 10$  pF) auszustatten, damit sich das Potential an ihrer Spitze bei einer Änderung der Steuerspannung schneller einstellt. Die Pipettenkapazität wird auf diese Weise nach erfolgreicher Ausbildung des *Giga-Seals* kompensiert. Die Zeitkonstante des dazugehörigen Stromes liegt laut Marty und Neher [45] im Bereich von  $0,5 \mu\text{s}$  bis  $5 \mu\text{s}$ . Diese Kompensation der Pipettenkapazität ist essentiell, da eine nicht-kompensierte Pipettenkapazität zu einer falschen Serienwider-

standskompensation führt und dadurch der Widerstand falsch abgeschätzt werden würde.

Zum Umladen der gesamten Zellmembrankapazität (typ.  $C \leq 500$  pF) muss die zweite Schaltung für deutlich größere transiente Ströme ausgelegt werden. Sie wird bei der Ganzzelleableitung während der Serienwiderstandskompensation abgeglichen. Für kompliziert aufgebaute Zellen bzw. Zellkulturen (Neuronen etc.) sind prinzipiell wesentlich mehr Schaltungen notwendig. Der *Patch-Clamp*-Verstärker Triton+ (Tecella LLC, Foothill Ranch, Kalifornien, USA) enthält bspw. vier Kompensationsstufen je Messkanal [117]. Für detaillierte Beschreibungen zur schaltungstechnischen Kompensation der Kapazitäten wird an dieser Stelle auf weiterführende Literatur wie Sigworth [118], Sherman-Gold [48] oder auch Numberger und Draguhn [59] verwiesen. **Abbildung 4-8** veranschaulicht die Funktion und Wirkungsweise der Kapazitätskompensation.



**Abbildung 4-8: Prinzip-Darstellung Kapazitätskompensation**

Prinzip-Darstellung zur Erweiterung eines *Patch-Clamp*-Verstärkers mit Kapazitätskompensation in Anlehnung an [59]. **A:** Das RC-Glied  $R_K$  und  $C_K$  dient dem Abgleich der Kompensationsschaltung. Über den Kondensator  $C_{INJ}$  wird der Kompensationsstrom  $I_K$  zwischen der Elektronik und der *Patch*-Pipette eingespeist. **B:** Beispiel für die Auswirkung der Kapazitätskompensation bei einer Ganzzelleableitung nach der Kompensation der Pipetten- sowie Membrankapazität. Der mittlere Signalverlauf zeigt die Stromantwort vor und der untere Verlauf nach der Kompensation. Umgezeichnete Abbildung aus [59].

Zusätzliche schaltungstechnische Maßnahmen zur Minimierung der Streukapazitäten sind bspw. der Gebrauch von dynamischen Spannungsquellen sowie die Verwendung von aktiven Schirmungen. Der Einsatz dynamischer Spannungsquellen, ist vorrangig auf den *Current-Clamp*-Modus beschränkt [48]. Bei der aktiven Schirmung wird die Steuerspannung als Schirmung für die Pipette verwendet, indem alle in der Nähe der Pipette sowie des Pipettenhalters befindlichen Metalloberflächen mit ihr elektrisch verbunden werden. Abgesehen von der Badelektrode, werden das Mikroskop, der Objektisch sowie das Gehäuse der *Headstage* an die Steuerspannung angeschlossen. Mit dieser Vorgehensweise in Kombination mit dem Beschichten einer möglichst dickwandigen



*Patch*-Pipette mit Sylgard®, der Beschränkung auf geringe Pipettenfüllstände und einer geringen Eintauchtiefe der Pipette in das Außenmedium kann die wirksame Pipettenkapazität auf ca. 2 pF reduziert werden. Die aktive Schirmung kann jedoch zum Anstieg des Rauschens führen, da Rauschanteile des treibenden Verstärkers über die Kapazität der Schirmung eingekoppelt werden. Axon Instruments Inc. (heute: **Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**) verwendet daher keine aktive Schirmung in diesem Bereich der Elektronik [48].

#### 4.1.5.2 Serienwiderstand

Das in **Abbildung 3-2 B** vorgestellte, vereinfachte Modell beschreibt die Eigenschaften der Zellmembran anhand der Parallelschaltung ihrer Kapazität  $C_M$  mit dem Widerstand  $R_M$ . In **Abbildung 4-4 A** ist dieses Modell an den Zustand einer Ganzzelleableitung angepasst. Demnach liegt zwischen der Messelektronik und dem Zellinneren der Serienwiderstand  $R_S$ , der sich aus mehreren Anteilen ( $R_{PIP}$ ,  $R_{ACCESS}$  etc.) zusammensetzt und so klein wie möglich sein sollte. Der Serienwiderstand begrenzt in Kombination mit der Membrankapazität die Geschwindigkeit dynamischer Umladeprozesse und bildet mit der Parallelschaltung aus Membranwiderstand und -kapazität einen unerwünschten Spannungsteiler (**Abbildung 4-4 A**). Eine Faustformel besagt, dass der Serienwiderstand maximal doppelt bis dreimal so groß sein sollte wie der Pipettenwiderstand [59]. Der Anteil des Pipettenwiderstandes besitzt typische Werte im Bereich von 2 M $\Omega$  bis 6 M $\Omega$  [59]. Darüber hinaus muss der Serienwiderstand zwingend sehr viel kleiner sein als der Membranwiderstand ( $R_S \ll R_M$ ), damit die in **Abbildung 4-4 B** getroffenen Vereinfachungen zur Berechnung der Membraneigenschaften gelten. Dafür sollte der Serienwiderstand idealerweise mindestens zwei Größenordnungen kleiner sein als der Membranwiderstand [103]. Um einen geringen Serienwiderstand zu gewährleisten, beschreibt Celectricon [119] einen automatisierten Serienwiderstandstest vor jeder Messung. Alle Messkanäle, die die Spezifikation nicht erfüllen, werden damit automatisch aussortiert.

Im *Voltage-Clamp*-Modus wird bei sprunghaften Änderungen des vorgegebenen Transmembranpotentials oder des Membranleitwertes (postsynaptischer Strom etc.) die Geschwindigkeit des Umladevorganges der Membrankapazität  $C_M$  durch den Serienwiderstand  $R_S$  begrenzt. Es bildet sich ein einfaches *RC*-Tiefpassfilter. Bei den sprunghaften Leitwertsänderungen der Zellmembran führen die hervorgerufenen Verzögerungen zur kurzzeitigen Depolarisation der Zellmembran. Als Folge können sich



spannungsaktivierbare Ionenkanäle öffnen, die einen zusätzlichen Strom verursachen [59]. Der gemessene Strom liefert in diesem Fall keine Information über die eigentliche Leitwertänderung zu Beginn des Umladevorgangs. Der Spannungsteiler aus Serienwiderstand und Membranwiderstand führt hierbei zu einem Spannungsabfall über  $R_s$ , sodass das Membranpotential von der vorgegebenen Steuerspannung abweicht. Je größer der Serienwiderstand, desto größer ist diese Abweichung.

Zur Minimierung des Serienwiderstandes werden verschiedene, konstruktive Maßnahmen (große, niederohmige Pipette etc.) getroffen, die durch elektronische Kompensationsverfahren ergänzt werden können. Die Kompensation des Serienwiderstandes erfolgt zeitlich nach der Kompensation der Kapazitäten (Pipette, Zellmembran etc.). Die angewandten Verfahren basieren auf der Korrektur der Steuerspannung. Sherman-Gold [48] stellt verschiedene Verfahren vor. Ein Verfahren basiert auf positiver Rückkopplung, die den Spannungsabfall über der Pipette kompensiert. Diese Methode neigt allerdings zu Stabilitätsproblemen und geht schnell in die Sättigung [45]. Darüber hinaus muss der Wert des Serienwiderstandes bekannt sein, der sich jedoch während eines Experiments verändern kann. Der Serienwiderstand wird daher mehrfach ermittelt und neu kompensiert. Eine weitere Methode ist das von Armstrong und Chow [120] entwickelte *Supercharging*-Verfahren, bei dem ein zusätzlicher Puls hoher Amplitude und kurzer Zeitdauer (ca. 5  $\mu$ s) dem eigentlichen Steuersignal überlagert wird. Sigworth [118] zeigte am Beispiel des kommerziell erhältlichen *Patch-Clamp*-Verstärkers EPC 9 (**HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht i. d. Pfalz, Deutschland**) die Funktionsweise dieser Widerstandskompensation. Strickholm [116] sowie Sherman *et al.* [121] stellen weitere Methoden für die Serienwiderstandskompensation vor. Die von Sherman *et al.* [121] beschriebene Methode liefert eine vollständige Widerstandskompensation. Sie wird durch eine exklusive Nutzungslizenz ausschließlich im APC-System QPatch® (**Sophion Bioscience A/S, Ballerup, Dänemark**) verwendet [100]. Andere Kompensationen zeigen laut Mathes [100] Schwingneigungen.

Bei der Medikamentenentwicklung können unkompensierte Serienwiderstände zu falsch-positiv oder falsch-negativ Ergebnissen führen. So führt bspw. ein steigender Serienwiderstand während der Messung zu einer Reduktion der Stromamplitude, obwohl es sich dabei nur um ein Artefakt handelte. Irrtümlicherweise kann dieses Verhalten dann als ein Treffer interpretiert werden, sodass ein falsch-positiv-Ergebnis diagnostiziert werden könnte. Für die Pharmaindustrie führt dies zu erhöhten Kosten, da

z. B. eine unwirksame Substanz in die nächste Phase der Medikamentenentwicklung übergeht. Im schlimmeren Fall wird jedoch eine wirksame Substanz als unwirksam diagnostiziert.

#### 4.1.5.3 *Offset-Spannungen*

*Offset-Spannungen* führen bei *Voltage-Clamp*-Ableitungen zu Abweichungen zwischen dem vorgegebenen Pipettenpotential und dem tatsächlichen Wert am Membranfleck (*Cell-Attached*) bzw. dem aufgezwungenen Transmembranpotential (Ganzzelleableitung). *Offset-Spannungen* müssen daher kompensiert werden. Hierbei haben Elektrodenpotentiale und Diffusionsspannungen (*Liquid-Junction*<sup>8</sup>) den wesentlichen Anteil. In einem sehr einfachen Kompensationsverfahren wird im *Voltage-Clamp*-Modus ein Nullpunktgleich vorgenommen, indem die *Patch*-Pipette in die Badlösung eintaucht und der gemessene Strom gegen 0 pA durch Verändern der Steuerspannung geregelt wird [59]. Der resultierende Wert der Steuerspannung bei  $I_{PIP} \approx 0$  pA wird gewöhnlich als Haltespannung bezeichnet. Es kann jedoch nach dem Abgleich zu Verschiebungen der *Offset-Spannung* kommen, sofern bspw. ein Wechsel zwischen den einzelnen *Patch-Clamp*-Konfigurationen vorgenommen wird und sich dadurch die *Liquid-Junction-Spannung* ändert. Von Neher [122] wurde der Umgang mit den *Offset-Spannungen* ausführlich beschrieben.

Die Verwendung von Ag/AgCl-Drähten für die *Patch*-Pipette sowie für die Badelektrode erlaubt einen reversiblen Ionenfluss in der Umgebung von gelösten Chloridionen (**6.4.1**). Damit der Beitrag der Badelektrode zur *Offset-Spannung* vernachlässigbar wird, wird die Badelektrode so groß wie möglich dimensioniert. Sollte sich jedoch die Chloridionenkonzentration oder die Temperatur signifikant ändern, verschiebt sich nicht nur das Transmembranpotential entsprechend der Nernst-Gleichung (**3.2.4**), sondern auch das Elektrodenpotential selbst. Bei Experimenten mit Lösungswechsel wird daher eine Agarbrücke verwendet, die verhindert dass Metall-Ionen von der Badelektrode in die Badlösung übertreten. Agarbrücken mit 3 Mol KCl besitzen einen Widerstand von

---

<sup>8</sup> *Liquid-Junction-Spannungen* stellen sich durch Diffusion an der Grenzfläche zwischen verschiedenen Flüssigkeiten aufgrund von unterschiedlichen Ionenbeweglichkeiten und Ionenkonzentrationen ein. Der Übergang an der Pipettenöffnung von der Lösung aus dem Pipetteninneren in die Lösung des Außenmediums bzw. der intrazellulären Lösung bewirkt ebenfalls eine *Liquid-Junction-Spannung*.

1 k $\Omega$  bis 2 k $\Omega$  [48]. Auf die elektrochemischen Zusammenhänge bei der Ausbildung von Elektrodenpotentialen soll in dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Sie wurden bspw. von Neher [123] detailliert beschrieben.

## 4.2 Automatisiertes *Patch-Clamp* (APC)

Das klassische *Patch-Clamp* ist technisch anspruchsvoll, arbeitsaufwändig und setzt die Bedienung durch qualifiziertes Personal voraus. Der erreichbare Durchsatz von ca. 10 bis 20 Messungen pro Tag ist für pharmakologische Anwendungen in der Medikamentenentwicklung zu gering. Um diese technologische Lücke zu schließen, wurden in den letzten Jahren verschiedene APC-Systeme entwickelt, bei denen die gesamte Versuchsdurchführung inkl. Wirkstoffzugabe teil- bis vollautomatisiert erfolgt. Einige dieser Geräte sind bereits als verkaufsfähiges Produkt auf dem Markt erhältlich. Der Durchsatz der APC-Systeme reicht im Vergleich zum manuellen *Patch-Clamp* von einer geringen Durchsatzsteigerung bis hin zum Hochdurchsatz mit mehr als 10.000 Datenpunkten pro Tag. Je nach System können Ableitungen über einen oder sogar mehrere *Patch-Clamp*-Kanäle parallel erfolgen. Eine Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile des klassischen *Patch-Clamps* und der APC-Systeme erfolgt in **Tabelle 4-2** und **Tabelle 4-3**.

Beschleunigt wurde die rasante Entwicklung der APC-Systeme durch eine Richtlinie zur Untersuchung aller neuen Wirkstoffe auf ihre hERG-Kanalaktivität [33]. Für die Pharmaindustrie besteht seitdem ein hoher Bedarf an Methoden zur effizienten Ionenkanaluntersuchung, um geeignete Kandidaten für neue Medikamente testen zu können. Der Einsatzort der *Patch-Clamp*-Technik liegt hauptsächlich in der Sicherheitspharmakologie (hERG-Kanal), im sekundären *Screening* sowie in der *Lead*-Optimierung [124]. Ein Großteil der dafür verwendeten Geräte basiert auf einem planaren APC-Prozess. Neben dem erhöhten Durchsatz zeigen alle APC-Systeme jedoch auch eine Reihe von Einschränkungen, zu denen in erster Linie die Beschränkung auf Zellen in Suspension zählt (**Tabelle 4-3**). Damit Zellen untersucht werden können, müssen sie zunächst vereinzelt werden. Hierfür werden die Zellen aus ihrem natürlichen Zellverband mechanisch (Absaugen bzw. Abschaben) oder enzymatisch, bspw. mit dem Verdauungsenzym Trypsin, herausgelöst. Die Behandlung mit Trypsin führt jedoch dazu, dass alle für die Zelladhäsion wichtigen Strukturen (extrazelluläre Proteine etc.) von der Zellmembran entfernt werden. Dies ist notwendig, da unzureichend vereinzelt Zellen zu einer schlechten elektrischen *Seal*-Abdichtung führen. Darüber hinaus müssen Verunreinigungen in der

Zell-Suspension durch Zentrifugieren der suspendierten Zellen sowie durch Verwendung steril gefilterter Lösungen verringert werden. Auf diese Weise wird eine Verschmutzung der *Patch-Site* vermieden, die ebenfalls zu einem schlechten *Seal*-Widerstand führen würde. Laut Knott *et al.* [125] minimiert das sog. *Cytocentering*-Verfahren das Problem verunreinigter *Patch-Sites* (**Anhang A14**). Um an suspendierten Zellen in die Konfiguration der Ganzzelleableitung zu gelangen, wird wie beim klassischen *Patch-Clamp* die Membran geöffnet. Die Öffnung der Zellmembran erfolgt bevorzugt durch zusätzlichen Unterdruck, durch chemische Stoffe oder durch Elektroporation. Auch hier ist zu beachten, dass der Abdichtwiderstand nicht durch das Öffnen der Membran zerstört wird.

In **4.2.1** und **4.2.2** werden APC-Systeme entsprechend ihrem Aufbau in planare und nicht-planare Systeme unterteilt. **Tabelle 4-1** enthält den Großteil aktueller APC-Systeme, deren Aufbau und Funktionsweisen in **Anhang A7-A17** detailliert beschrieben werden. In **Anhang A1-A5** sind die wesentlichen Eigenschaften der APC-Systeme als Stand der Technik in Tabellenform zusammengefasst, die in **4.3** als Ausgangspunkt für das Systemkonzept in **Kapitel 6** miteinander verglichen werden.

**Tabelle 4-1: Überblick APC-Systeme**

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
IonWorks™ HT	<b>Anhang A7</b>	Molecular Devices LLC (Sunnyvale, Kalifornien, USA)
IonWorks™ Quattro	<b>Anhang A8</b>	
IonWorks™ Barracuda	<b>Anhang A9</b>	
PatchXpress®	<b>Anhang A10</b>	
QPatch®	<b>Anhang A11</b>	Sophion Bioscience A/S (Ballerup, Dänemark)
Port-a-Patch®	<b>Anhang A12</b>	Nanion Technologies GmbH (München, Deutschland)
Patchliner®	<b>Anhang A13</b>	
SynchroPatch® 96		
CytoPatch™	<b>Anhang A14</b>	Cytocentrics Bioscience GmbH (Rostock, Deutschland)
Dynaflow® HT	<b>Anhang A15</b>	Cellectricon AB (Mölnädal, Schweden)
IonFlux™	<b>Anhang A16</b>	Fluxion Biosciences Inc. (South San Francisco, Kalifornien, USA)
Flyscreen®	<b>Anhang A17</b>	Flyion GmbH (Tübingen, Deutschland)

Tabelle 4-2: Vor- und Nachteile des klassischen *Patch-Clamps*

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>hochwertige Daten (zeitliche Auflösung, kontrollierte Bedingungen etc.)</li> <li>hoher Informationsgehalt</li> <li>Einzelkanalableitungen</li> <li>hohe Auflösung im pA-Bereich</li> <li>alle Kanaltypen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>erfahrenen Anwendern vorbehalten</li> <li>aufwändig und zeitintensiv</li> <li>geringer Durchsatz</li> <li>intrazelluläre Perfusion ist auf langsame Diffusion begrenzt</li> <li>Vibrationsisolation notwendig (schwingungsgedämpfter Tisch)</li> <li>Vollautomatisierung ist schwierig</li> <li>Verschlechterung des <i>Seal</i>-Widerstandes beim Übergang in die Ganzzelleableitung [126]</li> <li>Parallelisierung der Ableitung ist <b>nicht</b> möglich</li> </ul>

Tabelle 4-3: Vor- und Nachteile des automatisierten *Patch-Clamps*

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li><b>kein</b> Expertenwissen nötig</li> <li>Benutzer muss nur Sensorchips, Substanzen und Zellsuspension nachfüllen</li> <li>Massenproduktion der Sensorchips</li> <li>automatisierte Zellpositionierung: <ul style="list-style-type: none"> <li>ohne optische Kontrolle</li> <li>kein Mikromanipulator notwendig</li> </ul> </li> <li>Miniaturisierung des Messaufbaus</li> <li>automatisierte Wirkstoffzugabe durch mikrofluidische Kanäle</li> <li>teilweise automatisierte Perfusion auf der intrazellulären Seite</li> <li>„keine“ Relativbewegungen zw. Zelle und Pipette (schwingungsgedämpfter Tisch ist nicht notwendig)</li> <li>Verbesserung des <i>Seal</i>-Widerstandes beim Übergang in die Ganzzelleableitung [126]</li> <li>Parallelisierung der Ableitung ist möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>aktuell:</b> nur Zellen in Suspension</li> <li><b>aktuell:</b> nicht alle Kanaltypen</li> <li>hohe Zellqualität und Viabilität notwendig: <ul style="list-style-type: none"> <li>keine visuelle Auswahl der zu untersuchenden Zellen möglich</li> <li>Zellen müssen homogen sein, da sie nicht nach Größe oder anderen Kriterien ausgewählt werden</li> </ul> </li> <li>Verlust an Flexibilität und Kontrolle während der Messung</li> <li>reduzierte Qualität der Daten</li> </ul>

#### 4.2.1 Planare *Patch-Clamp*-Automatisierung

Die aktuellen Systementwicklungen beruhen zunehmend auf planare *Patch-Sites*, die in herkömmliche Mikrotiter-Zellkulturplatten (englisch: *well plate*) oder in chipbasierte Systeme integriert werden. Unter Anwendung der Mikrosystemtechnik können mehrere *Patch-Sites* auf kleinster Fläche bspw. in einem MPSA angeordnet werden. Daraus resultieren nicht nur vielfältige Gestaltungsmöglichkeiten für parallele, simultane Aufzeichnungen mit vollautomatisierter Zell- und Testsubstanzzugabe, sondern es können auch die Verbrauchskosten seitens der Anwender durch preiswerte Massenproduktion der APC-Systeme minimiert werden. Einen geschichtlichen Abriss über die Entwicklung der planaren *Patch-Clamp*-Technik geben Behrends und Fertig [126].

Der grundlegende Gedanke dieser Systeme besteht im Ersetzen der *Patch*-Pipette durch eine geeignete *Patch-Site* auf einer planaren Oberfläche, bei der im Gegensatz

zum klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau die Zelle zur *Patch*-Pipette hin bewegt wird (**Abbildung 3-6 E**). Die suspendierte Zelle wird hierbei durch Ansaugen über einer im Substrat (Glas, Silizium, Kunststoff etc.) eingelassenen mikrostrukturierten Öffnung (typ.  $d < 10 \mu\text{m}$ ) platziert. Typische Öffnungen haben, wie beim klassischen *Patch-Clamp*, einen Durchmesser von  $1 \mu\text{m}$  bis  $2 \mu\text{m}$ . Die Nachbildung der *Patch*-Pipette im Substrat verhindert Relativbewegungen zwischen Zelle und Pipette. Auf der Ober- und Unterseite befinden sich Elektrolytlösungen, die ausschließlich über die Öffnung im Substrat elektrisch miteinander verbunden sind. Je nach Anwendung oder Zelltyp können die Elektrolytlösungen in ihrer Zusammensetzung angepasst werden. Ein automatisiertes Druckprotokoll zieht die Zelle an, positioniert sie und hält sie fest.

Im Gegensatz zum klassischen *Patch-Clamp* ist für die Positionierung der Zelle keine optische Kontrolle notwendig. Knott *et al.* [125] berichteten, dass große Öffnungsdurchmesser ( $8 \mu\text{m}$  bis  $12 \mu\text{m}$ ), die für das Ansaugen optimal wären, eher schlechte Ergebnisse bei der Ausbildung des Abdichtwiderstandes zeigten. Sie führten dies auf eine ungenaue Positionierung sowie auf eine Verunreinigung der Öffnung infolge des angelegten Unterdruckes zurück. Eine der ersten planaren Systemaufbauten mit einer konischen Öffnung ( $d \approx 40 \mu\text{m}$  an engster Stelle) wurde von Kostyuk *et al.* [127] beschrieben. Als Substrat diente eine Polyethylen-Schicht (Kunststoff). Der große Öffnungsdurchmesser eignete sich jedoch ausschließlich für sehr große Zellen.

Grundlegende Berechnungen (*Seal*-Abschätzung etc.) und Versuchsmessungen zu planaren *Patch-Clamp*-Systemen wurden von Sordel *et al.* [95] sowie Stett *et al.* [128] vorgenommen.

#### 4.2.2 Nicht-planare *Patch-Clamp*-Automatisierung

Bei den nicht-planaren APC-Systemen handelt es sich überwiegend um laterale Fluidstrukturen, in denen die Zellen an kleinen Öffnungen positioniert werden. Ihre Funktionsweise entspricht von der Ausbildung des *Giga-Seals* bis hin zur Ganzzellableitung der von planaren APC-Systemen. Das Dynaflo<sup>®</sup> HT System sowie das IonFlux<sup>™</sup> 16 bzw. IonFlux<sup>™</sup> HT gehören zur Gruppe der lateralen Systeme (**Anhang A15, A16**). Eine weitere Form der nicht-planaren Systeme basiert auf der Nutzung von *Patch*-Pipetten, wie bspw. das Flyscreen<sup>®</sup>. Die Qualität des mit dem Flyscreen<sup>®</sup> (**Anhang A17**) erreichbaren *Giga-Seals*, die Stabilität der Aufzeichnung und der geringe Access-Widerstand (**Abbildung 4-4**) sind vergleichbar mit dem klassischen *Patch-Clamp* [5].

Es gibt nur wenige automatisierte Ansätze mit *Patch*-Pipetten. Zu diesen *APC*-Systemen zählen das AutoPatch®-System (**CeNeS Pharmaceuticals Plc, Histon, Cambridge, England**), der Apatchi-1™ (vorherige Bezeichnung: Neuropatch™) von Sophion, der RoboPatch (**Wyeth Research, Tochtergesellschaft der Pfizer Inc., New York, USA**) sowie die *Flip-the-Tip*™-Technologie (**Abbildung 3-6 D**) von Flyion. Die durchgeführten Systemstudien lassen vermuten, dass ausschließlich Flyion eine Vermarktung in dieser Sparte vornahm. Aktuell befindet sich die **Flyion GmbH (Tübingen, Deutschland)** im Insolvenzverfahren (Stand: September 2012).

Mathes [129] berichtete, dass bspw. die **Xention Ltd. (Pampisford, Cambridge, England)** das AutoPatch®-System nur intern für die Wirkstoffentwicklung an Ionenkanälen verwendet. Der RoboPatch wurde von Vasilyev *et al.* [130, 131] beschrieben. Das AutoPatch®-System und der Apatchi-1™ wurden in verschiedenen Literaturquellen vorgestellt [37, 39, 129, 132]. Asmild *et al.* [133] befassten sich ausführlich mit dem Apatchi-1™. Exemplarisch wird die *Flip-the-Tip*™-Technologie im *APC*-System Flyscreen® (Flyion) im **Anhang A17** vorgestellt.

## 4.3 Komparative Zusammenfassung

### 4.3.1 Stand der Technik: *APC*-Systeme

Die Ausführungen in **4.1** und **4.2** sowie die Systembeschreibungen in **Anhang A1-A17** zeigen, dass die *APC*-Techniken bei der Ionenkanalanalyse die technische Lücke zwischen den indirekten Methoden (Hochdurchsatz mit geringem Informationsgehalt) und dem klassischen *Patch-Clamp* (hoher Informationsgehalt mit niedrigem Durchsatz) zu füllen beginnen. Allerdings sind bei den *APC*-Systemen die Kosten pro Datenpunkt mit 0,75 US\$ bis 10 US\$ (**Anhang A2**) hoch [39]. Im Vergleich dazu liegen die Kosten bei der indirekten Ionenkanalanalyse unter 0,2 US\$ [100, 134]. In Hinblick auf die Durchsatzrate liegen die *APC*-Systeme durchschnittlich zwischen 20 und 10.000 Datenpunkten pro Tag, wobei der Übergang in den Hochdurchsatz ab 10.000 Datenpunkten knapp erreicht wird (**Anhang A2**). Es ist allerdings zu beachten, dass höhere Durchsatzraten die Flexibilität der Versuchsdurchführung (Untersuchung der Spannungsabhängigkeit etc.) sowie die Möglichkeit der Mehrfachsubstanzzugabe für Dosis-Wirkungs-Kurven minimiert und damit auch den Informationsgehalt der *Patch-Clamp*-Ableitung reduziert. Eine weitere Einschränkung betrifft die Erfolgsrate von verwendbaren Daten mit gleichbleibend

hoher Qualität. So liegt die Erfolgsquote der meisten APC-Systeme laut Herstellerangabe bei derzeit 40 % bis 95 % (**Anhang A2**). Farre *et al.* [124] berichteten jedoch, dass die tatsächliche Erfolgsrate in der Praxis geringer ausfällt. Ursachen für die geringe Erfolgsrate liegen vor allem in systembedingten Faktoren (Zellpositionierung, Abdichtwiderstand etc.). Eine Ausnahme bildet der IonWorks™ Quattro mit einer realen Erfolgsquote von mehr als 95 % aufgrund der PPC-Technik. Für den Vergleich der APC-Ansätze mit dem klassischen *Patch-Clamp* ist ferner zu beachten, dass der überwiegende Anteil an Versuchsdaten vom klassischen *Patch-Clamp* unter Strömungsbedingungen aufgezeichnet wird, d. h. dass die Testsubstanzen kontinuierlich über die Zelle strömen [34]. Hingegen bieten die APC-Systeme zumeist keine Möglichkeit zum Erzeugen kontinuierlicher Strömungen. Des Weiteren sind die optimale Zellkultur und Präparation der interessierenden Zelllinien unter Umständen verschieden, sodass es auch hier im Vergleich zum klassischen *Patch-Clamp* zu unterschiedlichen Substanzwirkungen kommen kann. Gegebenenfalls ist dann eine bestimmte Zelllinie nicht geeignet für APC-Systeme. Darüber hinaus sind aufgrund der automatisierten Zellpositionierung und dem Wegfall der optischen Beobachtung die Anforderungen an die Zellkultur und Präparation gegenüber dem klassischen *Patch-Clamp* drastisch gestiegen (**Tabelle 4-2** und **Tabelle 4-3**).

Die Zusammenfassung in **Anhang A1** zeigt, dass die Vielzahl der APC-Plattformen auf planaren *Patch-Sites* aus Glas-, Silizium- oder Polymer-Substraten basieren. Fast alle Systeme wie der Patchliner®, der PatchXpress® und das QPatch® erreichen damit stabile *Giga-Seal*-Abdichtungen. Interessanterweise unterscheiden sich die APC-Systeme in ihrem Aufbau und gewissermaßen auch in ihrer Funktionsweise mehr oder weniger stark von einander, wobei ihre generelle Herangehensweise, nämlich das Positionieren und die *Patch-Clamp*-Untersuchung von Zellen mit Hilfe einer Öffnung im Substrat, bei allen Systemen gleich ist. Aus dem nachfolgenden Systemvergleich ergeben sich wesentliche Merkmale und Besonderheiten für die Konzeption des APC-Systems PoreGenic®. In **Anhang A1-A17** werden konzeptionelle Vor- und Nachteile deutlich.

### 4.3.2 Vergleich: *Patch-Sites*

**Anhang A1** gibt eine Übersicht zu den Spezifikationen der *Patch-Sites* kommerziell erhältlicher APC-Systeme. Es handelt sich hierbei zumeist um planare MPSA. Die Anzahl der *Patch-Sites* pro Chip liegt derzeit zwischen 1 beim Port-a-Patch® sowie dem CytoPatch™ und steigt auf bis zu 384×64 beim IonWorks™ Barracuda mit seiner PPC-



Technologie. Die Anzahl separater Messkammern liegt dabei zwischen 1 und 384 pro Chip. Ihre elektrische Kontaktierung erfolgt dabei fast ausschließlich durch Eintauchen der Mess- und Badelektroden in die dafür vorgesehenen Reservoirs bzw. direkt in die Messkammer. Im Gegensatz dazu besitzt laut Asmild *et al.* [133] nur die QPlate® des QPatch® integrierte Mess- und Badelektroden, die über Federstifte mit der Messelektronik verbunden werden.

In der Literatur wird bei wenigen Systemen auf die Einmalnutzung der Sensorchips eingegangen. Für die restlichen Systeme liegen zur maximalen Nutzungsdauer keine Informationen vor, sodass auch für diese Systeme eine Mehrfachnutzung unwahrscheinlich erscheint.

Hinsichtlich der *Seal*-Qualität zeigten Sordel *et al.* [95], dass bei den planaren *Patch-Sites* die dispersiven Wechselwirkungen und die Wahl eines geeigneten Öffnungsdurchmessers die ausschlaggebenden physikochemischen Parameter sind und nachteilige Oberflächenrauigkeiten von ihnen überdeckt werden.

**Substrat-Material:** Die typischen *Seal*-Widerstände in **Anhang A3** zeigen, dass ein *Giga-Seal* ausschließlich mit Borosilikatglas- oder Silizium-Substraten erreicht wird (**Anhang A1**), wobei zu beachten ist, dass die *Seal*-Qualität (Abdichtwiderstand, Erfolgsrate etc.) bei Silizium-Substraten deutlich schlechter ist [95, 135]. Borosilikatglas zeichnet sich insbesondere durch seine guten dielektrischen Eigenschaften und der daraus resultierenden geringen Streukapazitäten aus [136]. Darüber hinaus zeigt es nur eine geringe Affinität zu Testsubstanzen und besitzt eine lange Lagerbeständigkeit. Die Vorteile von Silizium-Substraten, wie beim QPatch®, liegen in der einfachen und vielseitigen Mikrostrukturierung, Modifizierung und Funktionalisierung von Oberflächen. Allerdings bewirkt die hohe Dichte an freien Ladungsträgern vergleichsweise große parasitäre Streukapazitäten [126]. Zusätzlich weisen Silizium-Substrate einen photoelektrischen Effekt auf, wodurch optische Beobachtungen während der Messung ausgeschlossen sind. Im Gegensatz zu den Substraten aus Glas oder Silizium sind mit den Polymer-Substraten des Dynaflo HT sowie der IonWorks™-Systeme nur Abdichtwiderstände von typ. 20 M $\Omega$  bzw. kleiner 600 M $\Omega$  erreichbar.

**Serien- und Pipettenwiderstand:** Bei den Systemen, für die Informationen zum Widerstand zur Verfügung stehen, liegen die Serienwiderstände unterhalb 10 M $\Omega$  mit Pipettenwiderständen zwischen 1 M $\Omega$  und 3 M $\Omega$ . Das pipettenbasierte Flyscreen® 8500

erreicht Serienwiderstände von nur 2 M $\Omega$  bis 5 M $\Omega$  mit einem Pipettenwiderstand von ca. 1 M $\Omega$ .

**Gehäuseformat:** Beim überwiegenden Teil der Systeme sind die MPSA in preiswerte Mikrotiterplatten aus Kunststoff eingebettet, wobei zu beachten ist, dass nur die neueren Systeme wie der IonWorks™ Barracuda sowie die beiden IonFlux™-Systeme nachweislich an den SBS-Standard<sup>9</sup> [137-140] für Mikrotiterplatten angepasst wurden. Systeme wie der PatchXpress® und das CytoPatch™ besitzen chipbasierte Gehäuseformate. Die Verwendung von Mikrotiterplatten hat u. a. den Vorteil, dass sie mit Standard-Pipettierrobotern bedient werden können. Ziel der Hersteller ist es die Anzahl an Messkammern weiter zu erhöhen, jedoch gleichzeitig ihr Messvolumen zu verringern, um u. a. den Verbrauch an Zellen und Wirkstoffen zu reduzieren. Andererseits verstärkt die Verringerung des Kammervolumens den Einfluss der nicht-spezifischen Adsorption von Substanzen an die Oberfläche der Messkammern [141, 142]. Viele Kunststoffmaterialien zeigen diese unerwünschte Adsorption unmittelbar und/oder über Stunden, speziell von lipophilen Wirkstoffen. Ly *et al.* [143] stellten bei ihren Vergleichsmessungen mit glasbeschichteten und Kunststoff-Substanzplatten fest, dass einige Substanzen durch den Kunststoff adsorbiert wurden. Dadurch wurde die effektive Konzentration der Substanzen reduziert, weshalb die Korrelation zum klassischen *Patch-Clamp* stark verschlechtert wurde. Aus diesem Grund werden z. B. im QPatch® zur Verringerung der Substanz-Adsorption glasbeschichtete Mikrofluidikkanäle verwendet [100].

#### 4.3.3 Vergleich: Automatisierte Systemkonzepte

Mit Hilfe von **Anhang A2** wurde der Aufbau der verschiedenen Systeme verglichen. Es zeigt sich, dass der überwiegende Teil der APC-Systeme auf Ganzzelleableitungen beschränkt ist. Um einen hohen Durchsatz zu erreichen, wird an mehreren Messkammern gleichzeitig gemessen. Die Anzahl der Messkanäle reicht dabei von nur einem Kanal bis zu 384 Kanälen. Interessanterweise erreicht bspw. das IonFlux™ HT mit nur 64 Messkanälen einen ähnlich hohen Durchsatz von 10.000 Datenpunkten pro Tag wie das IonWorks™ Barracuda mit 384 Kanälen. Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich bei den

---

<sup>9</sup> Der SBS-Standard (Society for Biomolecular Sciences-Standard) für Mikrotiterplatten ist in [137-140] definiert.

IonFlux™-Systemen um reine Plattenleser handelt, die für den APC-Betrieb mit beliebigen Pipettierrobotern erweitert werden können (**Abbildung A16-1 B**).

**Zellpositionierung und Ganzzelleleitung:** Die Positionierung der Zellen erfolgt bei allen Systemen durch Anlegen von Unterdruck durch automatisierte Druckregelung. Abgesehen von den IonWorks™ Systemen, die ausschließlich membranperforierende Stoffe verwenden, wird durch Anlegen eines pulsartigen Unterdrucks in die Konfiguration der Ganzzelleleitung gewechselt. Der PatchXpress® 7000A besitzt für jede Messkammer eine eigene Druckregelung, sodass der *Seal*-Widerstand individuell optimiert werden kann. Bei Nutzung membranperforierender Stoffe fällt die technische Umsetzung von Fluidik und Druckregelung deutlich einfacher aus [39]. Zudem bewirkt die Permeabilisierung der Zellmembran mit membranperforierenden Stoffen, dass die Diffusion intrazellulärer Bestandteile, die für die Funktion der Kanäle wichtig sind, begrenzt ist. Allerdings ist der *Access*-Widerstand deutlich größer als bei einer durch Unterdruck aufgerissenen Membran. Dadurch und durch Diffusionspotentiale zeigt sich bei Verwendung membranperforierender Stoffe im *Voltage-Clamp*-Modus möglicherweise ein verfälschtes pharmakologisches Verhalten der untersuchten Ionenkanäle und Substanzwirkungen [124].

**Patch-Clamp-Verstärker:** Die verwendeten *Patch-Clamp*-Verstärker sind entweder durch Eigenentwicklung in das Messsystem integriert oder können nach Schnittstellendefinition als externe Geräte angeschlossen werden. Für den Port-a-Patch® sowie den Patchliner® wird standardmäßig der EPC 10 (HEKA) verwendet. Die Abtastrate der APC-Systeme liegt zwischen 5 kHz und 50 kHz (durchschnittlich 20 kHz). Hinsichtlich des Rauschverhaltens der integrierten Verstärker liegen nur Informationen für das QPatch® und das IonWorks™ HT vor, deren Effektivwert des Rauschstroms unterhalb 12 pA liegt [144, 145]. Laut Tanaka [146] beinhalten die Systeme SynchroPatch® 96, IonFlux™ 16 sowie IonFlux™ HT den 16 Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker Triton+ (Tecella).

Mit Ausnahme des IonWorks™ HT sowie des IonWorks™ Quattro besitzen alle Systeme sowohl Serienwiderstands- als auch Kapazitätskompensationen. Das QPatch® wendet eine spezielle Kompensationstechnik an, die zu einer vollständigen Kompensation des Serienwiderstandes führt [100]. Für die beiden IonWorks™ Systeme HT und Quattro ist vor allem die Leckstrom-Subtraktion aufgrund des fehlenden *Giga-Seals* notwendig. Auch die IonFlux™-Systeme, das Port-a-Patch® sowie der Patchliner®

besitzen eine Leckstrom-Subtraktion. Zu den im IonWorks™ Barracuda verwendeten Kompensationsmethoden liegen keine Informationen vor.

**Software:** Eine besondere Bedeutung hat bei allen APC-Systemen die Betriebssoftware. Sie ist für die Datenerfassung, -analyse, -auswertung und -speicherung sowie für die Koordinierung des Versuchsablaufs und der Systemsteuerung (Verstärker, Roboter etc.) zuständig. Die Automatisierung und das Parallelisieren von *Patch-Clamp* führen zu einer großen Datenmenge, die ebenfalls automatisiert und effizient ausgewertet werden müssen. So entscheidet die Betriebssoftware bspw. anhand des *Seal*-Widerstandes ob sich die Weiterführung eines Experimentes lohnt oder ob es abubrechen ist. Auf diese Weise werden Testsubstanzen effektiver eingesetzt und Versuchszeit eingespart.

**Mikroskopierbarkeit:** Für keines der untersuchten Systeme wurden Aussagen zur Mikroskopierbarkeit gefunden. In den meisten Fällen scheint der Aufbau für eine optische Beobachtung während der Messung ungeeignet zu sein. Ausschließlich für den Port-a-Patch® ist eine optionale Erweiterung, nämlich das sog. Port-a-Patch® Microscope Slide, für Fluoreszenzaufnahmen erhältlich [147].

**Temperierung:** Für Säugerzellen physiologisch relevante Temperaturen werden in weniger als der Hälfte der Gerätesysteme intern bereitgestellt.

#### 4.3.4 Vergleich: APC-Signalleitung

Die wesentlichen Erkenntnisse aus **Anhang A3** lassen sich wie folgt zusammenfassen: APC-Systeme erreichen derzeit mit einer Erfolgsrate von durchschnittlich 60 % einen *Seal*-Widerstand von 1 GΩ bis 10 GΩ bei der Ganzzelleableitung. Stabile Ganzzelleableitungen über eine Zeitdauer von 20 bis 30 Minuten sind typisch. Voraussetzung für Einzelkanalableitungen ist, dass die Signalleitung an einzelnen Zellen durchgeführt werden kann. Mit Ausnahme des IonFlux™ (ausschließlich PPC) können dies zwar alle Systeme, jedoch sind Einzelkanalableitungen nachweislich nur mit dem Port-a-Patch® sowie dem Patchliner® möglich. Mit dem IonWorks™ Quattro, dem IonWorks™ Barracuda sowie mit den QPatch®-Systemen kann durch Wahl des entsprechenden Sensorchips optional die PPC-Technologie angewendet werden.

Die Möglichkeit zur Anwendung der *Voltage-Clamp*-Technik wird in der Literatur und den Produktbeschreibungen zu allen Systemen mehrfach erwähnt. Im Gegensatz dazu wird *Current-Clamp* nur im Zusammenhang mit dem Port-a-Patch®, dem

Patchliner® und dem Flyscreen® 8500 beschrieben. Inwieweit die pharmakologische Bedeutung von *Current-Clamp* bei der Wirkstoffsuche geringer ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die pharmakologische Korrelation der Messergebnisse zum klassischen *Patch-Clamp*, die vor allem mit den planaren Systemen erzielt werden, wird als gut bewertet [5]. Allerdings zeigt sich, dass es bei den aktuellen Systemen aufgrund fehlender intrazellulärer Perfusion, durch den Überschuss an Zellen pro Messkammer sowie durch ein ungünstiges Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zu einer deutlich veränderten Wirksamkeit bei Stoffgemischen mit hydrophoben Testsubstanzen kommen kann [5]. Die Untersuchung von spannungs- oder ligandengesteuerten Ionenkanälen ist mit allen Systemen möglich. Teilweise gibt es Einschränkungen für ligandengesteuerte Kanäle aufgrund der Auslegung des Perfusions-Systems.

**Zelllinien:** Die betrachteten Systeme sind auf Zelllinien für die Expression bestimmter Ionenkanäle beschränkt, bei denen die Qualität der Zellsuspension die Erfolgsrate der Messung in erheblichem Maße beeinflusst. Da die Zellen zufällig aus der Zellsuspension ausgewählt werden, sollten ihre Expressionseigenschaften und Physiologie stabil und reproduzierbar sein. Entsprechend ist die Untersuchung von Primärzellen in *APC*-Systemen problematisch, da ihre Zellpräparationen oft verschiedene Zelltypen enthalten und die Zellsuspension durch Gewebereste etc. verunreinigt sein kann. Die meisten Experimente wurden daher bislang an CHO- und HEK-Zellen durchgeführt, die relativ einfach kultiviert und transfiziert werden können [126].

#### 4.3.5 Vergleich: Grad der Automatisierung

**Anhang A4** enthält Spezifikationen zu einzelnen Hauptkomponenten der *APC*-Systeme, die Aufschluss über ihren Automatisierungsgrad geben. Der Grad der Automatisierung ist von System zu System unterschiedlich. Hierzu zählt u. a. die Handhabung der Zellen, die Substanzzugabe, die *Seal*-Ausbildung und ggf. der Übergang zur Ganzzelleableitung mittels geeigneter Verfahren (Fluidik, Robotik etc.). Im Folgenden werden daher die Begriffe voll- und teilautomatisiert, unabhängig von der Einschätzung der Hersteller verwendet. Als teilautomatisiert wurden alle Systeme bezeichnet, die zumindest die *Patch-Clamp*-Ableitung (Verstärker, Software, Pumpen etc.) automatisiert durchführen. Als vollautomatisiert sollen *APC*-Systeme gelten, die autonom über längere Zeit ohne Beaufsichtigung und menschlichen Eingriff arbeiten. Hierfür ist u. a. Robotik für den automatischen Chipwechsel notwendig. Zu letzteren *APC*-Geräten zählen das

IonWorks™ Barracuda, die QPatch®-Systeme sowie das Dynaflo® HT. Eine Besonderheit stellt das Dynaflo® HT dar, das ein integriertes System zur Aufbereitung von Zellsuspensionen aus adhären Zellen enthält.

#### 4.3.6 Vergleich: Automatisiertes *Liquid-Handling*

In **Anhang A5** werden die Eigenschaften der Substanzzugabe und der Perfusion der APC-Systeme gegenübergestellt. Demnach ist es nur bei wenigen Systemen möglich einen Lösungswechsel auf der intra- und extrazellulären Seite durchzuführen. Die übrigen Systeme sind auf die extrazelluläre Seite beschränkt, deren Austauschzeit für den Lösungswechsel mit durchschnittlich 50 ms angegeben wird. Abgesehen vom IonWorks™ HT und IonWorks™ Quattro können bei allen Systemen während der Messung Substanzen zugegeben werden.

### 4.4 Schlussfolgerung

Adhären wachsende Zellen können mit den in **4.2** vorgestellten APC-Systemen nicht analysiert werden. Die Zellen müssen aus ihrem Zellverband gelöst, in Suspension vorliegen. Inwieweit die Zellen unter diesen Umständen ihr „natürliches Verhalten“ zeigen, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Allerdings sind Phänomene wie das Auslösen des programmierten Zelltods bekannt (Anoikis<sup>10</sup>).

Aus dem Vergleich der Systeme in **4.3** lassen sich wesentliche Merkmale für ein geeignetes Systemkonzept ableiten. Demzufolge sollte sowohl für die *Patch-Site* als auch für das Substrat der Messkammern Glas bevorzugt verwendet werden [150]. Im Vergleich zu Ganzzelleableitungen im *Voltage-Clamp*-Modus spielen bisher sowohl Einzelkanalableitungen als auch der *Current-Clamp*-Modus nur eine untergeordnete Rolle. Hinsichtlich der *Seal*-Erfolgsrate ist zu beachten, dass der Erfolg stabiler Ganzzelleableitungen nicht nur durch die Technologie der *Patch-Site*, sondern auch von der biologischen Qualität der Zellkultur bzw. des Zelltyps bestimmt wird [95].

Dass spannungsgesteuerte Ionenkanäle für die meisten Pharmaunternehmen von größerer Bedeutung als ligandengesteuerte Kanäle sind [35], stellt in Hinblick auf das anzustellende Gerätekonzept eine Vereinfachung dar. Für die Desensibilisierung von ligandengesteuerten Ionenkanälen wäre ein sehr schneller Lösungsaustausch innerhalb weniger Millisekunden notwendig.

---

<sup>10</sup> Anoikis ist eine Sonderform der Apoptose (programmierter Zelltod), die durch das Herauslösen adhären Zellen aus ihrer extrazellulären Matrix eintritt [148, 149].

## 5 Elektroporation

### 5.1 Elektroporation in der Konzeptidee

Für die Automatisierung des konzipierten *Patch-Clamp*-Systems (vgl. 4.2) wurde als Öffnungswerkzeug für Zellmembranen die Methode der lokalen Elektroporation erprobt, siehe **Kapitel 6**. Diese für adhärente Zellen patentierte Verfahrensweise soll durch Permeabilisierung der Zellmembran den Übergang von einer *cell-Attached*-ähnlichen Konfiguration in die Ganzzelleableitung an unbehandelten *in-vitro*-Zellnetzwerken ermöglichen [12, 13]. **Abbildung 5-1 A** zeigt den schematischen Aufbau der Konzeptidee, der prinzipiell der Funktionsweise einer *Patch*-Pipette entspricht. Über den mikrofluidischen Kanal wird ein Membranbereich zunächst angesaugt, um dann anschließend mittels Elektroporation die Membran zu öffnen. Für die Permeabilisierung wurde an der Spitze der *Patch-Site* eine Elektroporationselektrode integriert. Als Gegenelektrode dient die Badelektrode.

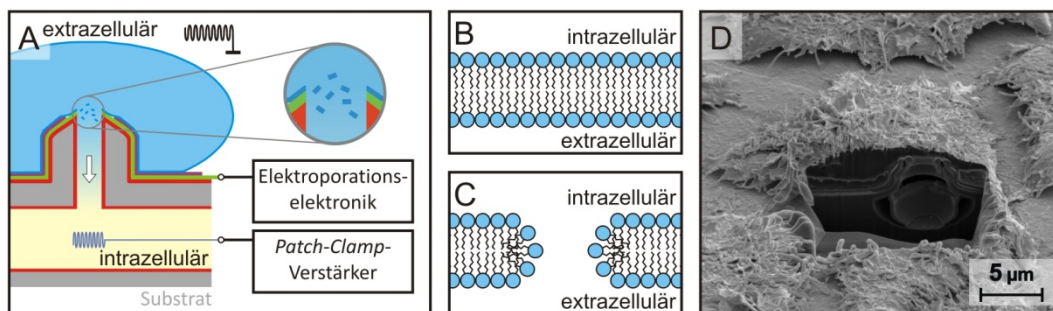
Theorie und Anwendung der Elektroporation wurden in der Literatur bereits detailliert beschrieben [53, 151-159]. Pucihar *et al.* [160] fassen unter Angabe zahlreicher Literaturstellen zusammen, wie Moleküle unterschiedlicher Größe durch Elektroporation in Zellen eingebracht werden können. Erste chipbasierte Anwendungen an einzelnen suspendierten Zellen beschreiben Huang und Rubinsky [161, 162] sowie Lin *et al.* [163]. Die Elektroporation von adhärennten Zellen wurde bspw. bereits von Ghosh *et al.* [164] mit planaren Elektroden untersucht. Einen Überblick über den Stand der Technik von mikrofluidischen Chipsystemen mit integrierten Elektroporationskammern geben Fox *et al.* [165].

Für praktische Zwecke wird bei der Permeabilisierung der Zellmembran von einem kritischen Wert ausgegangen, ab dem die Anzahl der Poren rapide ansteigt. Dieser Wert wird als kritische Membrandurchbruchspannung<sup>11</sup> bezeichnet und liegt für viele eukaryote Zellen bei Raumtemperatur im Bereich von 1 V ( $\pm 0,5$  V) [53, 154, 166]. Zur vereinzelt Porenbildung kommt es bereits unterhalb der kritischen Membrandurchbruchspannung [56, 167, 168]. Die Entstehung der Poren unter Einwirkung eines elektrischen Feldes wird durch verschiedene Modelle erklärt, die ausgehend von kleinen Defekten in

---

<sup>11</sup> Die kritische Membrandurchbruchspannung ist von verschiedenen Parametern wie der Temperatur, dem Zelltyp etc. abhängig.

der Lipiddoppelschicht in hydrophile Poren übergehen [155, 158, 169-172]. Simulationen zum Ablauf der Porenbildung wurden u. a. von Tieleman [152] vorgestellt. In **Abbildung 5-1 B, C** ist das Resultat, eine metastabile, hydrophile Pore in der Lipiddoppelschicht, dargestellt [155, 158]. Während die Porenbildung innerhalb von Mikrosekunden abläuft, kann das Wiederverschließen mehrere Minuten andauern [158, 173, 174]. **Abbildung 5-1 D** zeigt das Elektroporationsergebnis am Beispiel einer L929 Zelle auf einer Platin-Hohlnadelektrode (Typ C). Trotz fehlender fluidischer Anbindung ähneln Platin-Hohlnadelektroden (**6.2.1.1**) dem Aufbau der Konzeptidee sehr.



**Abbildung 5-1: Porenbildung durch Elektroporation**

**A:** Schematische Darstellung der Membranöffnung mittels Elektroporation und Ansaugen entsprechend der Konzeptidee des *Patch-Clamp*-Systems. Die Isolierung der Elektroporationselektrode (grün) ist nur an der Spitze der *Patch-Site* geöffnet. **B:** Ausschnitt der Lipiddoppelschicht einer intakten Zellmembran vor der Elektroporation. **C:** Theoretische Darstellung einer metastabilen, hydrophilen Pore nach der Elektroporation [158, 159, 169, 170, 175]. **D:** Ergebnis der Membranöffnung mittels Elektroporation (ohne Ansaugen). FIB-Schnitt und REM-Aufnahmen einer Platin-Hohlnadelektrode (Typ C) mit einer aufsitzenden elektro-porierten Zelle (L929). FIB-Präparation und Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle.

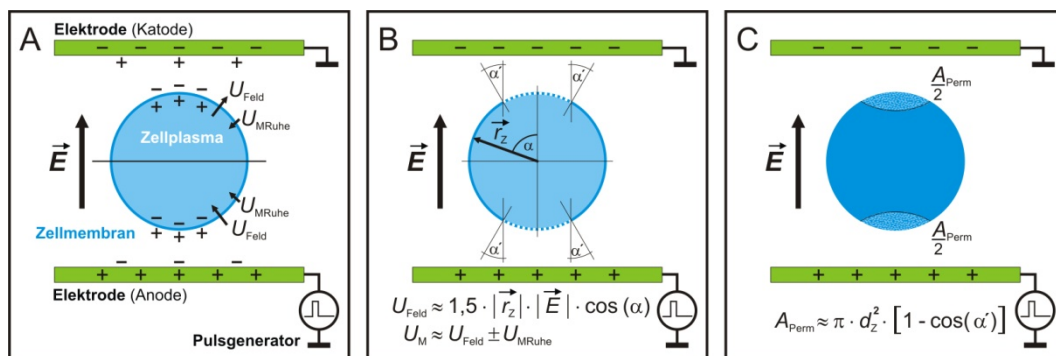
An suspendierten Zellen wird die Permeabilisierung von Zellmembranen durch Elektroporation für die zeitgleiche Gentransfektion, Zellfusion etc. genutzt, die sich zwischen zwei großen Elektrodenplatten in sog. Elektroporationskammern befinden. Die Erzeugung eines elektrischen Feldes zwischen diesen Elektroden bewirkt die Bildung von reversiblen oder irreversiblen Poren, die für Ionen und Makromoleküle permeabel sind. Diese Ionen und Makromoleküle können normalerweise die Zellmembran nicht passieren [53, 158, 159]. Elektroporation wird daher häufig auch zum Einbringen von Farbstoffen, pharmakologischen Substanzen etc. verwendet. Die einfache Wirkungsweise der konventionellen Elektroporationskammern ist allerdings nur ansatzweise auf die chipintegrierten *Patch-Sites* bzw. auf die klassische *Patch-Pipette* übertragbar. Im Gegensatz zu dem homogenen Feldverlauf zwischen den großen Elektrodenplatten führt der für die *Patch-Clamp*-Ableitung optimierte Systemaufbau zu einer starken Inhomogenität des elektrischen Feldes. Nachfolgend werden die Grundlagen der Elektroporation unter Einfluss homogener Felder beschrieben. Daraus abgeleitet ergeben sich



Ansätze und Hinweise für die Elektroporation unter inhomogenen Bedingungen im *Patch-Clamp*-Aufbau.

## 5.2 Elektroporation im homogenen Feld

Die Vorgänge bei der Elektroporation werden in **Abbildung 5-2** am stark vereinfachten Versuchsaufbau beschrieben. Zwischen zwei planparallelen Elektrodenplatten befindet sich eine suspendierte Zelle in einem elektrolytisch leitenden Milieu. In diesem Modell wird die Zelle als kugelförmiger Körper, bestehend aus einer hochisolierenden Hülle und einem elektrisch leitenden Zellinneren, betrachtet (**3.2.1**). Zwischen den beiden vergleichsweise großen Elektrodenplatten herrscht ein nahezu homogener Feld- und Potentialverlauf, der in der Umgebung der Zelle durch deren Anwesenheit gestört wird.



**Abbildung 5-2: Prinzipdarstellung Elektroporation**

Schematische Darstellung einer Zelle im homogenen elektrischen Feld  $E$  zwischen zwei Elektrodenplatten (grün). Zur besseren Anschauung, ist die Zelle überproportional groß dargestellt. **A:** Darstellung der Ladungsverteilung nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Pfeile illustrieren die Orientierung des physiologischen ( $U_{\text{MRuhe}}$ ) und induzierten Transmembranpotentials im spiegelsymmetrischen Zell-Elektroden-System.  $U_{\text{MRuhe}}$  ist negativ gegenüber dem Außenmedium (asymmetrischer Durchbruch). **B:** Darstellung der Winkelbeziehungen einer Membranstelle mit  $U_M$  und dem Feldvektor von  $E$  [53, 154, 176]. Der Anteil von  $U_{\text{Feld}}$  in  $U_M$  ist vom Winkel  $\alpha$  abhängig. Die Gültigkeit der Gleichung für  $U_M$  ist simplifiziert und steht in der Literatur in Diskussion. **Annahme:** Die Zellmembran wirkt hochisolierend wie das Dielektrikum eines Kondensators und ist bereits vollständig umgeladen. **A, B:** Zelle im Querschnitt. **C:** Darstellung und näherungsweise Berechnung des permeablen Bereiches  $A_{\text{Perm}}$ . Der einzusetzende Winkel  $\alpha'$  ist der Winkel  $\alpha$ , bei dem das Transmembranpotential gleich der Durchbruchspannung ist. Zur Vereinfachung wurde ein symmetrischer Durchbruch angenommen.

Das Anlegen eines elektrischen Feldes  $E$  führt zu einer Grenzflächen-Polarisation an der Zellmembran (**Abbildung 5-2 A**). Diese Polarisation bewirkt eine zusätzliche Potentialdifferenz  $U_{\text{Feld}}$  über der Membran, die sich dem Ruhemembranpotential  $U_{\text{MRuhe}}$  überlagert [53, 154, 176, 177]. Der Anteil von  $U_{\text{Feld}}$  ist winkelabhängig<sup>12</sup> (**Abbildung 5-2 B**). Erreicht das Transmembranpotential an einer Stelle der Zellmembran den kritischen

<sup>12</sup> Der Winkel  $\alpha$  definiert den Winkel zwischen der Richtung des elektrischen Feldes  $E$  und einem Punkt auf der kugelförmigen Zellmembran.

Wert der Durchbruchspannung kommt es zur Bildung wässriger Poren. Die Höhe des elektrischen Feldes bestimmt dabei die Größe der permeabilisierten Fläche in **Abbildung 5-2 C** [178]. Eine irreversible Porenbildung wird in Abhängigkeit von der Zellgröße bei einer Feldstärke im Bereich von  $1 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$  bis  $100 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$  erreicht [179]. Die Berücksichtigung von  $U_{\text{MRuhe}}$  in **Abbildung 5-2 B** führt zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Transmembranspannung auf den beiden Halbkugeln der Zelle. Die Halbkugel gegenüber der Anode (+) erreicht an ihrem Pol ( $\alpha = 0^\circ$ ) die kritische Potentialdifferenz zuerst, was zu einer unterschiedlichen Qualität der Poren in beiden Hemisphären führt und als asymmetrischer Membrandurchbruch bezeichnet wird [154]. Als Folge ist der permeabilisierte Membranbereich um den Pol der anodenseitigen Halbkugel größer, aber der Effekt (Porengröße) der Permeabilisierung ist um den Pol der katodenseitigen Halbkugel stärker [180]. Das Anlegen von bipolaren Spannungspulsen führt zur symmetrischen Membranöffnung [181].

### 5.3 Elektroporation im inhomogenen Feld

Bei der Elektroporation im klassischen oder automatisierten *Patch-Clamp*-Aufbau bildet der kleine Öffnungsdurchmesser ( $d \leq 2 \mu\text{m}$ ) der *Patch*-Pipette bzw. der *Patch-Site* die Elektroporationselektrode. Die um mehrere Größenordnungen größere Badelektrode stellt die Gegenelektrode dar. Der Aufbau ähnelt damit vereinfacht dem Modell einer Punktladung gegenüber einer weit entfernten Elektrodenplatte, sodass sich ein inhomogener Feldverlauf für die Elektroporation ergibt. Die Feld- und Potentialverteilungen dieser Elektrodenkonfiguration wurden in Simulationen überprüft. Ähnliche Konfigurationen von kugelförmigen oder zylindrischen Elektroden wurden von Nowak *et al.* [182] simuliert und bestätigen den inhomogenen Feldverlauf. Ausgehend von der *Cell-Attached*-Konfiguration steht dem aktiven Elektrodenbereich in diesem Aufbau nur ein sehr kleiner Membranbereich der Zelle gegenüber. Diese unmittelbare Nähe der Zelle zur Elektroporationselektrode bewirkt ein sehr starkes, lokal wirkendes, elektrisches Feld an der anliegenden Zellmembran.

#### 5.3.1 Elektroporation in der *Patch-Clamp*-Technik

Die Anwendung der Elektroporation erfolgt in der *Patch-Clamp*-Technik nach Ausbildung des *Seals* in der *Cell-Attached*-Konfiguration [45, 95, 126, 144, 183]. Elektroporation wird hier u. a. für den Übergang in die Ganzzelleableitung, zum Einbringen von Substanzen

oder zur elektrischen Zellstimulation genutzt. Damit bspw. die Membran stabilerer Zellen (ab 3 DIV) geöffnet werden kann, wird zusätzlich zum Ansaugen der Zellmembran ein Elektroporationspuls angelegt [126]. In Hinblick auf den Erhalt des *Seal*-Widerstands funktioniert diese Form der Membranöffnung in der planaren *Patch-Clamp*-Technik zuverlässiger als beim klassischen *Patch-Clamp* [126].

In **Tabelle 5-1** sind Literaturangaben zum Einsatz der Elektroporation aufgeführt, mit denen ausgehend von der *Cell-Attached*-Konfiguration die Zellmembran erfolgreich geöffnet wurde. Angaben zu den übrigen Parametern (Temperatur, Zellgröße etc.) sind den Literaturquellen direkt zu entnehmen.

**Tabelle 5-1: Elektroporation in der *Patch-Clamp*-Technik**

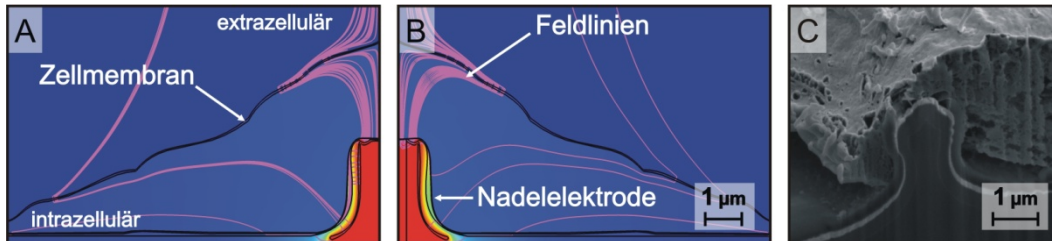
Literatur	<i>Patch-Clamp</i>	$U_{EP}$ in V	Pulsdauer in ms	Ansaugen (in Kombination)
Sherman-Gold [48]	klassisch	1,5	0,1 bis 50	-
Marty und Neher [45]	klassisch	-	$10^{-2}$ bis 0,5	-
Schroeder <i>et al.</i> [144]	klassisch	-	-	ja
Tovar und Tung [184]	klassisch	0,5	1 bis 10	ja
Kutchinsky <i>et al.</i> [183]	planar	-	-	wahlweise
Sordel <i>et al.</i> [95]	planar	1	0,1	wahlweise
Ionescu-Zanetti <i>et al.</i> [185]	lateral	0,5 bis 2	5 bis 30	ja

### 5.3.2 Lokale Mikroinvasive Nadelspitzen-Elektroporation (LOMINE)

In Tautorat *et al.* [14] sowie Koester *et al.* [29] wurde für die Elektroporation mit Nadel-  
elektroden die Bezeichnung Lokale Mikroinvasive Nadelspitzen-Elektroporation (LOMINE) eingeführt. Anhand von schematischen Darstellungen wurde die Wirkungs-  
weise der LOMINE bereits von Koester *et al.* [11, 28] sowie Held *et al.* [186] ansatzweise  
beschrieben. Aufgrund der fehlenden mikrofluidischen Anbindung ist mit den Nadel-  
elektroden eine Kombination aus Ansaugen und LOMINE nicht möglich. Im Gegensatz  
zur *Cell-Attached*-Konfiguration wird bei den Nadelelektroden daher ein Abstand zur  
Zellmembran von ca. 100 nm angenommen.

Simulationen zu den Feld- und Potentialverteilungen in **Abbildung 5-3 A, B** an  
Platin-Nadelelektroden (Typ A) sowie an Platin-Hohlnadelelektroden (Typ C) mit über-  
deckter Zelle wurden durchgeführt [25]. Die Simulationsergebnisse zeigen ein sehr stark  
gebündeltes Feld oberhalb der Elektroporationselektrode, das direkt durch die Zelle in  
Richtung Badelektrode (weit entfernte große Gegenelektrode) verläuft. Dieser Feldver-  
lauf kommt dem angenommenen Modell einer Punktladung gegenüber einer weit ent-  
fernten Elektrodenplatte sehr nahe. Das Größenverhältnis bspw. einer Nadelelektrode

vom Typ A ( $A \approx 1,1 \mu\text{m}^2$ ) zur Badelektrode ( $A \approx 0,27 \text{cm}^2$ ) beträgt immerhin ca. 1:25 Millionen. Für diese Arbeiten wurde die Simulationssoftware COMSOL Multiphysics® (COMSOL Multiphysics GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 5-3: LOMINE**

Die Nadelelektroden besitzen keinen mikrofluidischen Anschluss. **A, B:** Feldlinienverlauf (Pink) und elektrisches Potential am zweidimensionalen Querschnitt einer vertikal halbierten Nadelelektrode (links unten) mit überdeckter Zelle.  $T_{EP} = 5 \mu\text{s}$ . Die Simulationen wurden von Kiran K. Sriperumbudur (Universität Rostock) durchgeführt. **A:** Platin-Nadelelektrode (Typ A). **B:** Platin-Hohlnadelelektrode (Typ C). Umgezeichnete Abbildung aus [25]. **C:** Ergebnis der Membranöffnung mittels Elektroporation (ohne Ansaugen). FIB-Schnitt und REM-Aufnahmen einer Platin-Nadelelektrode (Typ A) mit einer elektroporierten L929 Zelle. FIB-Präparation und Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle.

Die Simulationsergebnisse in **Abbildung 5-3 A, B** bestätigen, dass aufgrund der direkten Feldeinkopplung eine erfolgreiche Membranöffnung bereits bei geringen Pulsamplituden erreicht wird. Es wurde daher abgeschätzt, dass für die Zellmanipulation ein notwendiger Aussteuerbereich im unteren Volt-Bereich (maximal  $\pm 5 \text{V}$ ) ausreicht (**6.2.3**). Hinsichtlich des notwendigen Aussteuerbereiches der Elektronik ist zu beachten, dass laut Zimmermann [154] bei  $37 \text{°C}$  mit einer Halbierung der Durchbruchspannung auf ca.  $0,5 \text{V}$  zu rechnen ist. Aufgrund des temperierten Systemaufbaus konnten alle Versuche unter physiologischen Bedingungen im Bereich von  $35 \text{°C}$  bis  $37 \text{°C}$  durchgeführt werden (**6.4.2**).

Eine weitere Anwendung der LOMINE ist das Einschleusen von nicht-membrangängigen Makromolekülen (Proteine, Wirkstoffe, DNS etc.) in einzelne Zellen des Zellverbandes auch noch nach der lokalen Elektroporation. Die Eigenschaften einer ausgewählten Zelle im Netzwerk gezielt durch Elektroporation zu beeinflussen, indem ihre genetische, metabolische oder stoffliche Zusammensetzung manipuliert wird, wurde in der Literatur bereits beschrieben [187, 188]. Darüber hinaus kann die Zellmanipulation mit schwächeren Feldern für die intra- und extrazelluläre Stimulation ausgewählter Zellen verwendet werden.

### 5.3.3 Weitere Einflussgrößen auf die Elektroporation

Abgesehen vom homogenen oder inhomogenen Feldverlauf ist der Effekt der Elektroporation von vielen verschiedenen Parametern abhängig, wie bspw. den Zelleigenschaften, der Temperatur sowie den Pulsparametern [173, 174, 189-191]. Gimsa und Wachner [55] sowie Maswivat *et al.* [56] betrachten u. a. die Frequenzabhängigkeit der resultierenden Transmembranspannung bei der Elektroporation.

**Zellspezifische Parameter:** Selbst in dem vereinfachten Modell in **Abbildung 5-2** ist die Permeabilisierung einer kugelförmigen Zellmembran von der Zellgröße abhängig. Die Gleichung für  $U_{\text{Feld}}$  in **Abbildung 5-2 B** zeigt, dass sich die Elektroporationsfeldstärke  $E$  umgekehrt proportional zur Zellgröße im homogenen Feld verhält [173]. Die näherungsweise Modellannahme einer kugelförmigen Zelle gilt bspw. nicht für flache Zellen, weshalb deren Form und Ausdehnung im Feld berücksichtigt werden muss [192]. Für gleichbleibende Elektroporationseffekte müssen Zellgröße und die Orientierung nicht sphärischer Zellen im homogenen Feld stets berücksichtigt werden [56, 192].

**Temperatur:** Der Wert der kritischen Membrandurchbruchspannung bei Raumtemperatur wird für viele eukaryote Zellen mit ca. 1 V angegeben. Die Durchbruchspannung sowie die Zeit für das Wiederverschließen der permeabilisierten Zellmembran sind jedoch stark temperaturabhängig [193]. Bei geringen Temperaturen verdoppelt sich die Durchbruchspannung auf ca. 2 V ( $T = 4\text{ °C}$ ) und halbiert sich auf ca. 0,5 V ( $T = 37\text{ °C}$ ) unter physiologischen Bedingungen [154]. Die Geschwindigkeit des Verschließens ist langsamer bei niedrigen Temperaturen und nimmt oberhalb von 30 °C stark zu [154, 193]. In diesem Zusammenhang haben bspw. Pucihar *et al.* [160] in ihren Versuchen die Temperatur auf 37 °C gehalten, um die Erholung der Zellen nach der Elektroporation zu begünstigen.

Thermische Effekte können bei einer kurzen Pulsdauer im Bereich von 5  $\mu\text{s}$  bis 50  $\mu\text{s}$  ausgeschlossen werden, da sich die Temperatur durch die Elektroporation nicht signifikant erhöht [154, 159].

**Pulsdauer:** Pulsdauer und -anzahl bestimmen das Maß der Permeabilisierung in einem bestimmten Teilbereich der Zellmembran. So führt bspw. eine längere Pulsdauer zu größeren Poren [173, 178, 194]. Sofern jedoch bei der Variation das Produkt der beiden Parameter aus elektrischer Feldstärke und Pulsdauer konstant gehalten wird, werden ähnliche Elektroporationsergebnisse erzielt [151]. Diesen Zusammenhang nennen auch

andere Literaturquellen, die mit längeren Pulsen bzw. mit einer erhöhten Anzahl an Pulsen eine geringere Feldstärke benötigten [160].

Schoenbach *et al.* [151] beschreiben die Verwendung von sehr kurzen Pulslängen im unteren Nanosekundenbereich, die insbesondere Elektroporationseffekte an den inneren Membranen von Zellkern, Mitochondrien etc. hervorrufen. Durch Kombination von langen Pulsen ( $T_{EP} = 4$  ms) gefolgt von sehr kurzen Pulsen ( $T_{EP} = 10$  ns) gelang es ihnen nicht-membrangängige Substanzen vom Äußeren der Zelle schrittweise in den Zellkern zu transportieren. Tieleman *et al.* [195] zeigten in ihren Simulationen den Verlauf der Permeabilisierung einer Membran unter Einfluss eines zeitlich sehr kurzen, aber sehr starken  $5 \text{ MV}\cdot\text{cm}^{-1}$  Feldes ( $T_{EP} = 4$  ns). Kotnik und Miklavcic [196] geben einen vertieften theoretischen Einblick in die Elektroporation an den inneren Membranen der Zelle.

**Pulsfolgen:** Schoenbach *et al.* [151] zeigten in ihren Versuchen, dass Pulsfolgen keinen additiven Effekt im Vergleich zu einzelnen Impulsen besitzen. Allerdings kann es bei Pulsfolgen zu irreversiblen Porenbildungen kommen, wenn Einzelpulse trotz geringer Feldstärke (reversible Wirkung) in einem zu schnellen Wiederholungsintervall angelegt werden [154]. Die Membran schafft es in diesen Fällen nicht, sich vor einem neuen Puls wieder zu verschließen. Tovar und Tung [184] sowie Zimmermann [154] geben für reversible Pulsfolgen ein minimales Wiederholungsintervall von einer Minute an, wobei die starke Temperaturabhängigkeit des Verschließens eventuell längere Pausen erfordert.

**Pulsformen:** Vergleichende Untersuchungen zu geeigneten rechteckförmigen Signalformen von Tekle *et al.* [180, 181] zeigten, dass bipolare Pulsfolgen eine doppelte bzw. 5-fache Transfektions-Effizienz gegenüber unipolaren Pulsfolgen bzw. Einzelpulsen besitzen. Gegenüber der geringen Überlebensrate von Zellen bei Einzelpulsen war die Überlebensrate bei uni- und bipolaren Pulsfolgen ähnlich hoch. Während der Ladezeit der Zellmembran, entstehen auch kurzzeitig Potentialdifferenzen über den subzellulären Membranen. Dieser Effekt, der umso stärker wirkt, je kürzer die Anstiegszeit des Pulses ist, wird für intrazelluläre Elektroporationsversuche verwendet [151].

**Ionenkonzentration:** Die Abhängigkeit der induzierten Transmembranspannung von den Leitfähigkeiten des Zytoplasmas, der Membran sowie des Außenmediums wurde bereits in der Literatur beschrieben [56, 173, 192, 197].

## 5.4 Optimierung der LOMINE-Parameter

Die elektrischen Elektroporationsparameter (Pulsdauer, Pulsamplitude etc.) wurden auf ein erfolgreiches Einbringen der Nadelelektroden bei maximaler Zellviabilität<sup>13</sup> optimiert. Der Effekt der LOMINE wurde anfänglich mit Fluoreszenzfärbung untersucht (7.2.4). Um das Überwachsen der Zelle und das Eindringen der Elektroporations-elektrode betrachten zu können, wurden Querschnitte mit Hilfe von FIB-Präparationen angefertigt. Durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die resultierende Verbindungsstelle von Zelle und Elektrode bewertet (7.2.5). Parallel zu den Elektroporationsversuchen wurde die Spannung  $U_{EL}$  an den Nadelelektroden gemessen und auf Auffälligkeiten hin untersucht (Abbildung 6-20 B). Inwieweit eine reversible oder irreversible Elektroporation zu einer stabilen Ganzzelleableitung mit den Elektroporations-elektroden des Konzeptentwurfs bzw. mit den Nadelelektroden vom Typ A-D führen kann, musste ebenfalls durch Experimente herausgefunden werden.

---

<sup>13</sup> Zellviabilität (englisch: *cell viability*) beschreibt den Anteil an lebenden Zellen in einer Zellpopulation. Laut Zimmermann [154] ist die Zellviabilität das aussagekräftigste Merkmal zur Beschreibung eines Elektroporationseffektes.





## 6 Messsystem

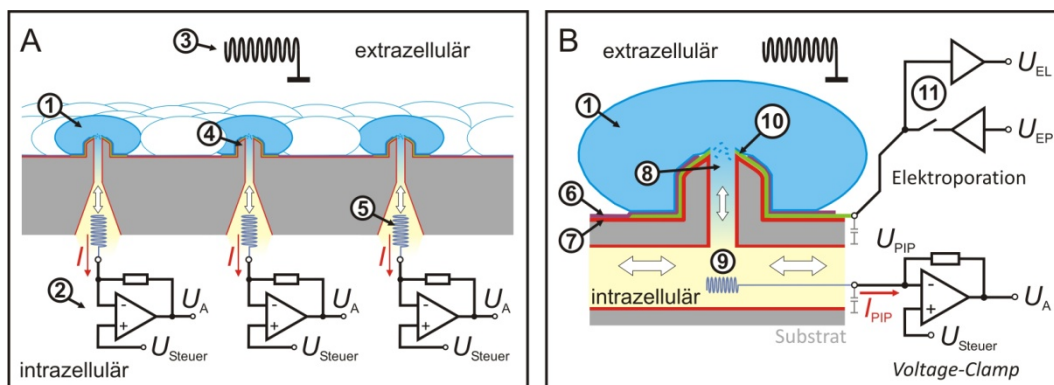
### 6.1 System-Konzept

Die Ausführungen und Schlussfolgerungen zu den manuellen und automatisierten *Patch-Clamp*-Systemen in **Kapitel 4** dienen als Grundlage für das erstellte System-Konzept. Demnach war ein Sensorchip mit einem integrierten MPSA zu gestalten, das sensitive Signableitungen mit *Giga-Seal*-Ausbildung an Zellnetzwerken ermöglicht. Als Vorlage für seine Konzeption waren die Vorteile des klassischen *Patch-Clamp* sowie der APC-Systeme miteinander zu kombinieren. Darüber hinaus sollte der Sensorchip optimale Bedingungen (Biokompatibilität, Adhäsion etc.) für die Zellkultur bieten. Nach Aussaat auf dem Sensorchip sollen die Zellen ihre natürlichen Netzwerke ausbilden und dabei die *Patch*-Pipetten überwachen. Damit würde die Beschränkung der in **4.2** vorgestellten APC-Systeme auf vereinzelte, suspendierte Zellen wegfallen, da die Zellen nicht mehr durch Ansaugen auf den *Patch-Sites* positioniert werden müssen, sondern sich selbst auf den integrierten Pipetten festsetzen. Im Vergleich zum klassischen *Patch-Clamp* ist dadurch keine Positionierung der Pipette auf der Zelle mehr notwendig. Um anschließend Ganzzelleableitungen an den Zellen vornehmen zu können, kann die LOMINE-Methode angewandt werden. Prinzipiell ergibt sich damit ein APC-System für Zellnetzwerke. Als Messmethode für die *Patch-Clamp*-Ableitungen sollte das kontinuierliche Einzel-Elektroden-Voltage-Clamp (*cSEVC*) Anwendung finden (**4.1.4.2**).

In **Abbildung 6-1 A** ist die Konzeptidee anhand mehrerer chipintegrierter MPSA-Elemente mit mikrofluidischem Zugriff auf das Zellinnere skizziert. Im Gegensatz zu den planaren Systemen in **4.2** mit einer einfachen Öffnung im Substrat sind diese *Patch-Sites* gegenüber der Chipoberfläche erhöht und bilden eine kurze pipettenähnliche Nadelform [12, 13]. Der vertikale Kanal in **Abbildung 6-1 A, B** bildet das Innere der *Patch*-Pipette. Über den Zu- und Ablauf in **Abbildung 6-1 B** soll die Kontaktierung des *Patch-Clamp*-Verstärkers sowie die intrazelluläre Perfusion erfolgen.

Von Held *et al.* [24, 26] wurden erste erfolgreiche Fertigungsergebnisse sowie die einzelnen Prozessierungsschritte von Mikrostrukturen beschrieben, die Vorarbeiten zur *Patch-Site* in **Abbildung 6-1** darstellen. Allerdings war eine Erprobung und Weiterentwicklung dieser Strukturen aus personellen und zeitlichen Gründen nicht möglich, so dass sich die nachfolgenden Ausführungen auf den Entwicklungsstand des Messsystems

ohne fluidische Kontaktierung des Zellinneren beschränken. In dieser Entwicklungsphase wurden mit mikrostrukturierten Nadelelektroden wichtige Vorarbeiten zur Herstellung der konzipierten *Patch-Sites* durchgeführt, die lokale Elektroporation als Öffnungswerkzeug für Zellmembranen erprobt und Experimente zur intra- sowie extrazellulären Signalableitungen an Zellnetzwerken vorgenommen. Die Nadelelektroden (Typ A-D) werden in 6.2.1 vorgestellt. In **Abbildung 6-2** ist der vereinfachte Grundaufbau des Labormusters beginnend mit der Zellkultur bis hin zum extrahierbaren Informationsgewinn skizziert. Die Konzeption, Umsetzung und Testung der beiden Bereiche Hard- und Software standen im Vordergrund dieser Arbeit. Sie werden in den nachfolgenden Teilabschnitten ausführlich beschrieben. Richtungsweisend waren hierfür die Vergleichstabellen in **Anhang A1-A5**, die wesentliche Merkmale der APC-Systeme seitens der Hard- und Software zusammenfassen.



**Abbildung 6-1: Konzeptidee der Patch-Site**

Schematische Querschnittsdarstellung der *Patch-Clamp*-Ableitung mit chipintegrierten *Patch*-Pipetten. Die Ableitelektronik ist vereinfacht durch Strom-Spannungswandler (*Voltage-Clamp*) dargestellt. **A:** Zellen (1) im Zellnetzwerk überwachen die Chipoberfläche. Parallele intrazelluläre Signalableitungen (2) erfolgen von mehreren Zellen (drei Zellen dargestellt; blaue Füllfarbe) im Netzwerk. Eine gemeinsame Ag/AgCl-Badelektrode (3) referenziert den extrazellulären Raum der Zellkultur. Die chipintegrierte *Patch-Site* (4) ist von einer Zelle überwacht. Die Messung erfolgt von der intrazellulären Seite mit jeweils einer Ag/AgCl-Messelektrode (5, blau-grau). **B:** Die Abbildung zeigt eine Zelle in der Ganzzellableitung mit geöffneter Membran. Die Grundform der *Patch-Site* ist in Borosilikatglas oder Silizium gestaltet. Chemische Haftsichten zum Erreichen des *Giga-Seals* sind nicht dargestellt. Lagenaufbau:  $Si_3N_4$ -Passivierung (6, lila) der gesamten Chipoberfläche mit Ausnahme des aktiven Elektrodenbereiches der Elektroporationselektroden (10) an der Elektrodenspitze sowie den Kontakt-Pads (nicht dargestellt).  $SiO_2$ -Schicht (7, rot) zur elektrischen Isolierung von Silizium-Substraten (grau). Der vertikale Kanal (8) bildet das Innere der *Patch*-Pipette mit einem Öffnungsdurchmesser von 1  $\mu m$  bis 2  $\mu m$ . Zu- und Ablauf als horizontaler Kanal (9) gefüllt mit intrazellulärem Puffer. Metallisierung der Elektroporationselektrode (10; grün) als Elektrodenmaterial sowie zur elektrischen Kontaktierung nach außen. Elektronik (11) für die Zellmanipulation (Elektroporation und Stimulation) sowie zur Messung der Spannung  $U_{EL}$  an der Elektrode. Der Schaltungsteil für die Zellmanipulation ist zuschaltbar. Ein wesentlicher Teil der beteiligten, parasitären Kapazitäten ist grau dargestellt.

Zur schrittweisen Überprüfung und Verifikation aller Funktionen wurde im angefertigten Labormuster eine vereinfachte Konzeptidee umgesetzt. Die Vereinfachungen betreffen

die Beschränkung auf eine reduzierte Anzahl an Messkanälen sowie die Verwendung von Multifunktions-Datenerfassungskarten. Die Datenerfassungskarte dient als Schnittstelle zwischen Hard- und Software, die über die Programmierumgebung LabView® eingebunden wurde (6.2.6 und 6.3). Auf diese Weise konnte der Entwicklungsaufwand von Hard- und Software reduziert werden.

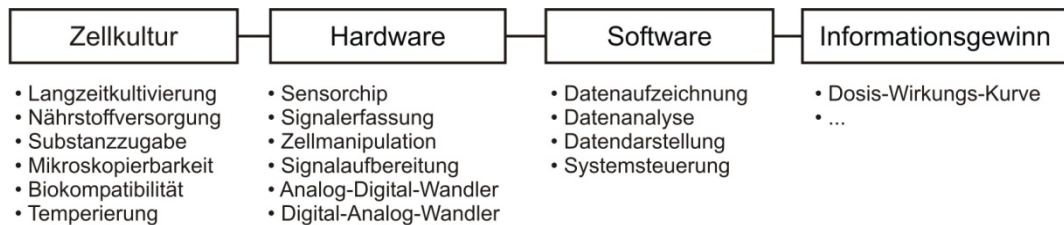


Abbildung 6-2: Grundaufbau des Messsystems

## 6.2 Hardware

Der Bereich der Hardware umfasst alle schaltungstechnischen und konstruktiven Maßnahmen, einschließlich des Sensorchips, die für die Signallerfassung an der Zellkultur notwendig sind. In **Abbildung 6-3** ist der vereinfachte Aufbau beginnend mit dem Sensorchip bis hin zur Schaffung einer digitalen Schnittstelle für den Übergang in den Software-Bereich dargestellt. **Abbildung 6-3** zeigt außerdem die Peripherie als Grundbaustein der Hardware, da ihr alle notwendigen und optionalen Baugruppen zugeordnet werden. Die peripheren Komponenten bestehen größtenteils als eigenes Gerätekonzept. Hierzu zählen u. a. die Stromversorgung, die Temperierung und mindestens ein Messrechner, auf dem die Systemsoftware ausgeführt wird.

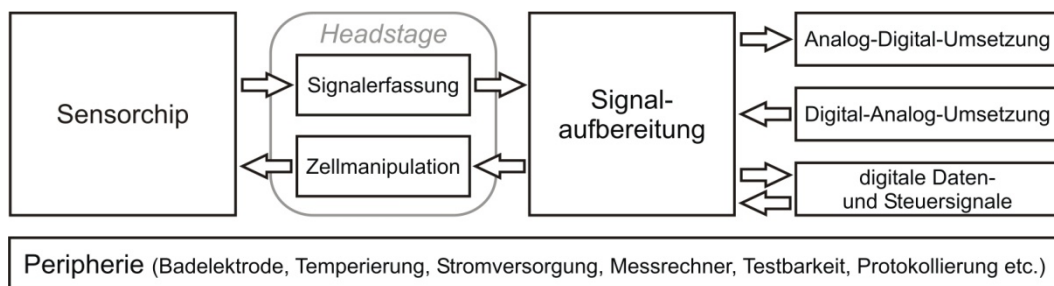
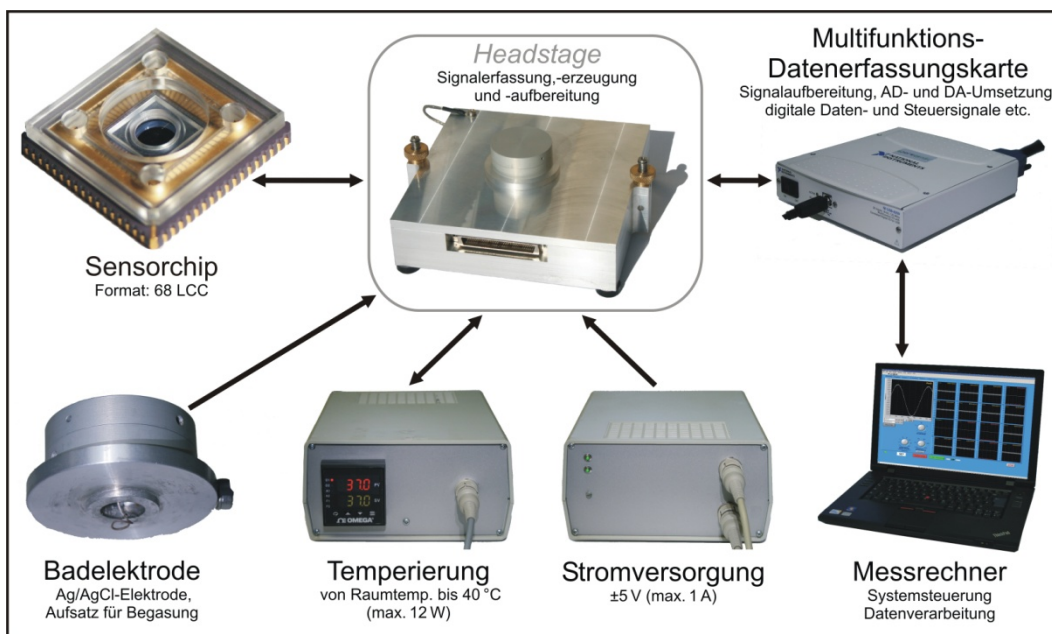


Abbildung 6-3: Grundaufbau der Hardware

Der Sensorchip mit seinen Nadelelektroden wird in der *Headstage* direkt mit der sensiblen Elektronik für die Signallerfassung und Zellmanipulation verbunden. Die Bezeichnung *Headstage* wird hier in Analogie zur *Patch-Clamp*-Technik verwendet (4.1.1). In diesem Systemkonzept umschließt jedoch das Gehäuse der *Headstage* den Sensor-

chip vollständig und dient damit als miniaturisierter Faraday-Käfig sowie zur Temperierung der Zellkultur [15]. Für die Halterung und elektrische Kontaktierung des Chips wurde in der *Headstage* ein Chip-Sockel vorgesehen (6.2.2.3). In der Signalaufbereitung erfolgt die Anpassung (Filterung, Endverstärkung etc.) der vorverstärkten Sensorsignale sowie der generierten Signale für die Zellmanipulation.

Analoge Schaltungstechnik dominiert in den Bereichen Zellmanipulation, Signalerfassung und -aufbereitung stark. Ihre Einbindung in die Systemsteuerung durch Verwendung von elektronischen Schaltern, Relais-Treibern etc. erfolgt durch digitale Daten- und Steuersignale. Abgesehen von der Analog-Digital-Umsetzung sowie Digital-Analog-Umsetzung räumlich hinter bzw. vor der Signalaufbereitung in **Abbildung 6-3** sind Analog- und Digitalbereich über die gesamte Hardware vermischt. **Abbildung 6-4** zeigt das aktuelle Labormuster, dessen interner Systemaufbau im Vergleich zu den Ausführungen in [15] überarbeitet wurde. Die wesentlichen Hardwarekomponenten sind mit ihren Verbindungen dargestellt. Die *Headstage* geht in dieser Ansicht deutlich als zentraler Bestandteil hervor. Zeitlich parallele Signalableitungen und Versuche zur elektrischen Zellmanipulation sind mit dieser vereinfachten Testapplikation auf 15 Messkanäle beschränkt. Durch 90°-Chipdrehung des Sensorchips in der *Headstage* können jedoch 4×15 Elektroden des Sensorchips nacheinander kontaktiert werden.



**Abbildung 6-4: Hardwarekomponenten des Labormusters**

### 6.2.1 Sensorchip

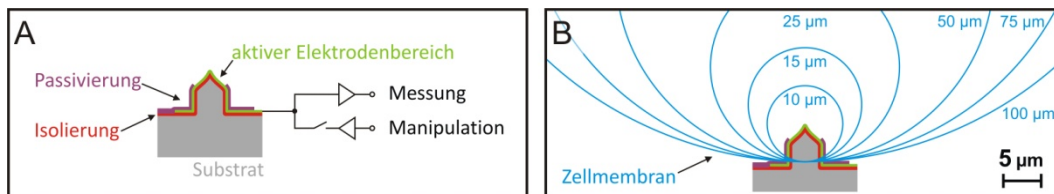
Es wurden vier verschiedene Typen von mikrostrukturierten Elektroden in Form von Nadelelektroden für den Sensorchip entworfen und durch das IMTEK prozessiert. Mit ihnen sollte vorrangig die technische Machbarkeit ihrer Herstellung gezeigt und die lokale Elektroporation als Öffnungswerkzeug für Zellmembranen erprobt und weiterentwickelt werden. Ein mikrofluidischer Zugriff auf das Zellinnere sowie *Patch-Clamp*-Ableitungen sind mit den Nadelelektroden noch nicht möglich.

Eine vergleichende Übersicht der vier verschiedenen Nadelelektroden (Chiptyp A-D) ist in **Anhang A7** dargestellt und wurde bereits in Tautorat *et al.* [16] zusammengefasst. Im Vergleich zu den *APC*-Systemen entspricht der Aufbau dieser Nadelelektroden weder den *Patch-Sites* in **4.2** noch der daraus abgeleiteten Konzeptidee in **Abbildung 6-1**. Als aktives Material wurde je nach Elektrodentyp Platin oder Silber verwendet. Die Festlegung und Charakterisierung der einzelnen Herstellungsschritte wurde von Held [198] beschrieben. Die messtechnische Überprüfung des Verhaltens der Nadelelektroden erfolgte anhand von zellfreien Tests sowie bei Zellversuchen (**Kapitel 7**).

Der Grundaufbau einer Nadelelektrode ist in **Abbildung 6-5 A** am Beispiel einer Platin-Elektrode (Typ A) beschrieben. Demnach benötigt jede Elektrode einen eigenen Anschluss an die Sensorelektronik (Zellmanipulation und Messwerterfassung). Um die Zellmembran lokal durch Elektroporation zu öffnen, wird kurzzeitig ein hohes elektrisches Feld an der Elektrode erzeugt. Als Gegenelektrode dient die Badelektrode. Die Größe der resultierenden Poren ist von verschiedenen Parametern abhängig (**Kapitel 5**). Der elektrisch aktive Elektrodenbereich, über den das Zellinnere nach erfolgreicher Öffnung der Zellmembran elektrisch kontaktiert werden soll, wird durch die Passivierung auf den Spitzenbereich der Nadel begrenzt.

Die bevorzugte Verwendung von Silizium als Substrat wurde seitens IMTEK aufgrund der hohen Gestaltungsflexibilität gewählt. Darüber hinaus wurde das Ziel verfolgt eine CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) kompatible Prozessierung zu erhalten. Auf diese Weise sollte eine nachträgliche Integration von Elektronik auf dem Sensorchip vereinfacht werden [198]. Die Grenzfläche von Sensorchip und Zellkultur wird durch eine Passivierungsschicht gebildet, die dem Schutz der Chipoberfläche sowie der elektrischen Isolierung dient (**Abbildung 6-5 A**). Bei der Passivierung handelt es sich standardmäßig um Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), das im aktiven Bereich der Nadelelektrode geöffnet ist [198].

In Hinblick auf die zu untersuchenden Zellen begrenzt der Zelldurchmesser, der in 3.2 mit kleiner 100  $\mu\text{m}$  angenommen wurde, die Abmessungen der Nadeln notwendigerweise auf eine Höhe kleiner 5  $\mu\text{m}$  mit einem Außendurchmesser kleiner 5  $\mu\text{m}$ . **Abbildung 6-5 B** veranschaulicht das resultierende Größenverhältnis für diverse Zelldurchmesser ( $10 \mu\text{m} \geq d_z \geq 100 \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 6-5: Grundaufbau einer Nadelelektrode**

Schematische Querschnittsdarstellung einer Nadelelektrode (Höhe = 5  $\mu\text{m}$ ;  $d_A = 5 \mu\text{m}$ ). **A:** Nadelelektrode mit angeschlossener Elektronik (schematisch als Verstärkerstufen). In Anlehnung an Taurat *et al.* [14]. **B:** Größenvergleich für verschiedene Zelldurchmesser ( $10 \mu\text{m} \geq d_z \geq 100 \mu\text{m}$ ). Annahme: kugelförmige Zelle (Zellmembran blau). Die Auflagefläche der Zelle liegt zentriert am Ansatz der Nadelelektrode.

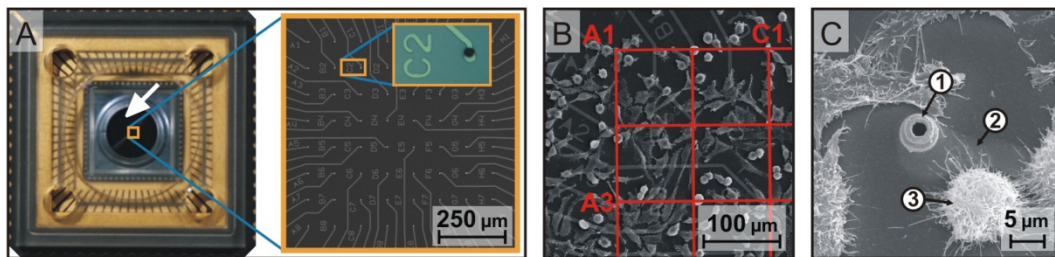
Die Integration der Nadelelektroden erfolgt auf dem Sensorchip in Form eines gleichmäßig verteilten  $8 \times 8$  MPSA mit einem Nadelabstand von 100  $\mu\text{m}$ . Frühere Versionen des Sensorchips besaßen jedoch auch Elektrodenabstände von nur 50  $\mu\text{m}$  und 75  $\mu\text{m}$ .

**Abbildung 6-6** zeigt den Grundaufbau eines Sensorchips, der aus dem eigentlichen Chip (typ.  $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ), einem Chipträger und einem aufgeklebten Trog zusammengesetzt wird. Chip und Chipträger werden über Bonddrähte elektrisch verbunden. Die Leiterbahnen auf Chipebene besitzen eine Breite von ca. 5  $\mu\text{m}$  und verbinden die Nadelelektroden mit jeweils einem Kontakt-Pad (**Abbildung 6-12 B**). Der Trog bildet im inneren Bereich die Messkammer für die Zellkultur, die direkt auf der Oberfläche des Chips kultiviert und untersucht wird. Laut Koester *et al.* [11, 28] bietet dieser Aufbau die Möglichkeit zur Langzeitkultivierung.

Von Held *et al.* [24, 27, 199, 200] wurden die verschiedenen Chip-Layouts anhand ihrer Prozessierungsmasken vorgestellt, in denen teilweise DEP-Elektroden, Elektrodenbeschriftungen und eine oder drei Referenzelektroden integriert wurden. **Anhang A7** ordnet die Variationen in den Layouts den einzelnen Elektrodentypen (A-D) zu. Die Beschriftung der Elektroden ist in die Metallisierungsebene der Elektrodenzuleitung eingebettet und dient der schnellen Elektrodenidentifizierung bei mikroskopischen Beobachtungen [199]. In **Abbildung 6-6 A, B** ist die Beschriftung auf der Chipoberfläche zu erkennen, deren Zählweise von der algebraischen Notation eines Schachbrettes abgeleitet wurde. **Anhang A20** zeigt die Zuordnung dieser Beschriftung



anhand der schematischen Darstellung eines Sensorchips. Die integrierten Referenzelektroden wurden bisher nicht verwendet.



**Abbildung 6-6: Grundaufbau des Sensorchips**

**A:** Draufsicht auf einen kompletten Sensorchip aus Chip, Chip-Träger und aufgeklebtem Trog. Der offene Bereich (weißer Pfeil) bildet die Kultivierungsfläche für Zellen und wird durch den Trog begrenzt. In der Mitte der Auflagefläche (oranges Quadrat) befindet sich das 8x8 MPSA. In der REM-Aufnahme (rechts) sind das MPSA, die Leiterbahnen und die Elektrodenbeschriftung zu erkennen. Die Elektrode C2 wurde zusätzlich lichtmikroskopisch vergrößert. REM-Originalaufnahme: IMTEK Universität Freiburg. **B:** REM-Aufnahme einer Zellkultur (L929) auf einem Sensorchip. Der Ausschnitt des MPSA wurde nachträglich mit einem Hilfsgitter (rot) zum Auffinden der Nadelelektroden (Typ C) überlagert. Elektroden A1, A3 und C1 sind beschriftet. Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **C:** REM-Aufnahme einer Platin-Hohl-nadelelektrode (1, Typ C) frei von Zellen in Detailsicht. In der Metallisierungsebene liegt die elektrische Zuleitung (2) der Nadelelektrode mit ca. 5 µm Leiterbahnbreite. Zelltyp L929 (3). Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle.

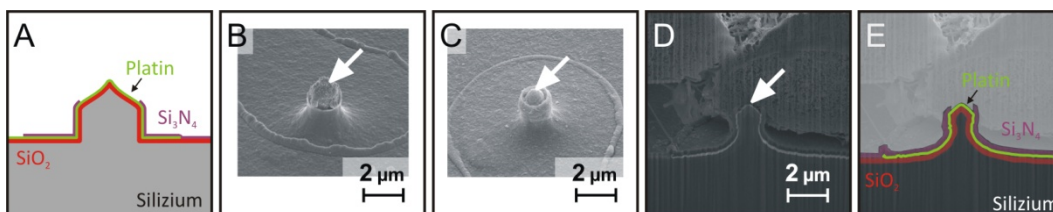
**Abbildung 6-6 C** zeigt, dass die Nadelelektroden ungewollt auch frei von Zellen sein können. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass eine Zelle optimal auf einer Nadelelektrode sitzt, wird die dielektrophoretische Zellpositionierung angewandt. Hierfür wurden jeweils zwei planare, nierenförmige Elektroden um eine Nadelelektrode herum angeordnet (**6.2.1.2**).

Für *Patch-Clamp*-Ableitungen und intrazelluläre Wirkstoffzugaben sind neben der Prozessierung von Hohl-nadeln auch vertikale sowie horizontale Fluidikkanäle versuchsweise in die Sensorchips integriert worden. Ihre Herstellung wurde von Held *et al.* [24, 26] beschrieben. Sensorchips mit diesen Fluidikkanälen standen jedoch nicht für Tests zur Verfügung. Diverse Ideen zur Verbesserung der Zelladhäsion im Bereich der Nadelelektrode sowie zur Erhöhung des Abdichtwiderstandes sind in zwei Patentfamilien [12, 13] enthalten.

### 6.2.1.1 Typisierung der Messelektroden

**Platin-Nadelelektrode (Typ A):** Hierbei handelt sich um massive Nadeln, deren Grundformen durch Trockenätzen (DRIE) von Silizium hergestellt werden. Auf diese Weise sind besonders kleine Abmessungen möglich, sodass laut Held *et al.* [186, 201] sehr spitze Elektroden mit einem Außendurchmesser kleiner 1 µm produziert werden konnten. Es gibt zwei Grundtypen der Nadelform, deren Form durch einen einzelnen

Trockenätzschritt oder durch einen stufenweisen Ätzprozess festgelegt wurde. Aufgrund der Vielzahl an Prozessparametern wurden mittels statistischer Versuchsplanung (englisch: *Design of Experiments, DoE*) die Wirkzusammenhänge zwischen den Einflussgrößen (Prozessparameter: Ätztechnik, Ätzdauer etc.) und den Zielgrößen (Nadelform, Breite etc.) ermittelt. Diese Arbeiten erfolgten mit dem Ziel eine hohe Prozessstabilität und reproduzierbare Nadelelektroden zu erhalten. Die resultierenden Geometrien wurden mit REM und FIB anhand von Querschnittsbildern der Nadeln untersucht und von Held *et al.* [27, 201, 202] vorgestellt. Held *et al.* [200] beschreiben die Erweiterung der Sensorchips um DEP-Elektroden (6.2.1.2). In **Abbildung 6-7** ist der Grundaufbau der Platin-Nadelelektroden dargestellt.

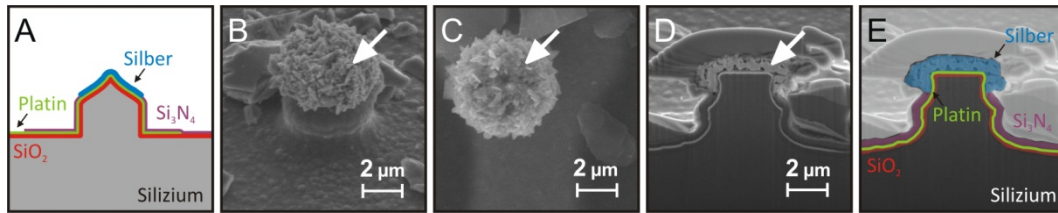


**Abbildung 6-7: Aufbau einer Platin-Nadelelektrode (Typ A)**

**A:** Schematische Querschnittsdarstellung einer Platin-Nadelelektrode, deren Grundform in Silizium gestaltet wird. Lagenaufbau: 400 nm  $\text{SiO}_2$ -Schicht (rot) zur elektrischen Isolierung des Silizium-Substrats (grau). 15 nm TiW (nicht dargestellt) als Haftschrift. 150 nm Platin-Schicht (grün) als Elektrodenmaterial und zur elektrischen Kontaktierung nach außen. 400 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Passivierung der gesamten Chipoberfläche mit Ausnahme des aktiven Elektrodenbereiches an der Elektrodenspitze sowie des Kontakt-Pads (links). Informationen aus [198]. **B, C:** Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **B, C:** REM-Aufnahmen der Nadelelektrode. Die Passivierung ist im aktiven Elektrodenbereich (weißer Pfeil) geöffnet. Die leichte Erhebung um die Elektrode herum markiert die Breite der Platin-Metallisierung, die als Leiterbahn ( $B = 5 \mu\text{m}$ ) bis zu den Kontakt-Pads verläuft. **C:** Umgezeichnete eigene Abbildung aus [10]. Originalaufnahme: IMTEK Universität Freiburg. **D, E:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahme mit einer elektroporierten L929 Zelle über der Nadelelektrode. Vergleichende Darstellungen zur Ansicht des Lagenaufbaus. (FIB-Präparation und Originalaufnahmen: Fraunhofer IWM Halle.)

**Galvanik-Silber-Nadelelektrode (Typ B):** Der Grundaufbau dieses Elektrodentyps entspricht einer Platin-Nadelelektrode (Typ A). Allerdings erhält er abschließend eine dünne Silber-Schicht (ca. 300 nm), die elektrochemisch auf dem Platin abgeschieden wird. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Tests und Messungen mit diesen Elektroden waren Ausgangspunkt für die Konzipierung der Massiv-Silber-Nadelelektroden (Typ D). Die Versuche in 7.2.8 zeigten ihre Eignung vor allem für die Ableitung von Signalen an Herzmuskelzellen (HMZ). **Abbildung 6-8** zeigt den Grundaufbau einer Galvanik-Silber-Nadelelektrode.

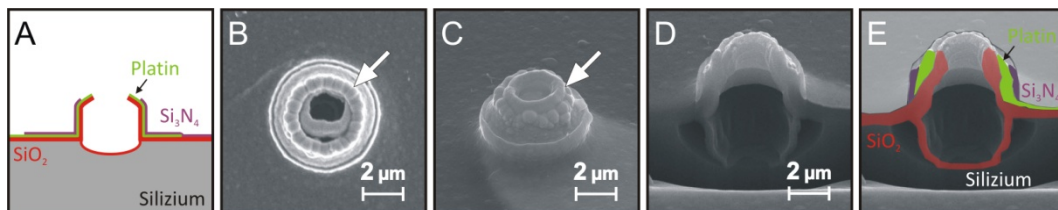




**Abbildung 6-8: Aufbau einer Galvanik-Silber-Nadelelektrode (Typ B)**

**A:** Schematische Querschnittsdarstellung einer Platin-Nadelelektrode mit Silberschicht. Grundform in Silizium gestaltet. Lagenaufbau: 400 nm  $\text{SiO}_2$ -Schicht (rot) zur elektrischen Isolierung des Silizium-Substrats (grau). 150 nm Platin-Schicht (grün) als Elektrodenmaterial und zur elektrischen Kontaktierung nach außen. 400 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Passivierung der gesamten Chipoberfläche mit Ausnahme des aktiven Elektrodenbereiches an der Elektrodenspitze sowie des Kontakt-Pads (links). 300 nm Silberschicht (blau) elektrochemisch im Spitzenbereich aufgetragen. Informationen aus [198]. **B-D:** REM-Aufnahmen der Nadelelektrode. Aktiver Elektrodenbereich (weißer Pfeil) mit grobkörniger Silberschicht. FIB-Präparation und Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **D, E:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahmen einer Nadelelektrode. Vergleichende Darstellungen zur Ansicht des Lagenaufbaus. Die dunkle Platin-Schicht über dem Silber wird für die FIB-Präparation benötigt.

**Platin-Hohladelektrode (Typ C):** Die Integration von Platin-Hohladeln gilt als Vorarbeit für die konzipierte *Patch-Site* in **Abbildung 6-1**. Ziel war es, dass die Öffnung der Hohladel bereits der typischen *Patch*-Pipettenspitze weitestgehend entspricht. In **Abbildung 6-9** wird der Grundaufbau einer Platin-Hohladelektrode vorgestellt.

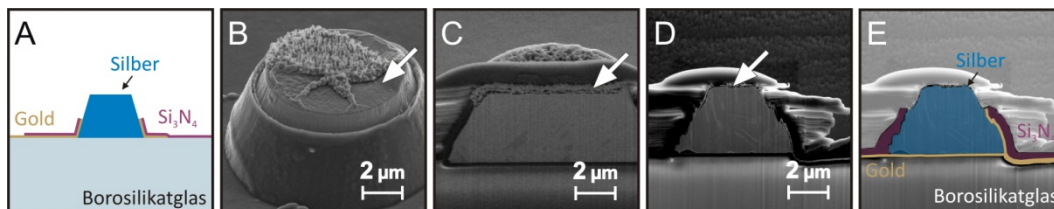


**Abbildung 6-9: Aufbau einer Platin-Hohladelektrode (Typ C)**

FIB-Präparation und Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **A:** Schematische Querschnittsdarstellung einer Platin-Hohladelektrode. Lagenaufbau: 400 nm  $\text{SiO}_2$ -Schicht (rot) zur elektrischen Isolierung des Silizium-Substrats (grau). 150 nm Platin-Schicht (grün) als Elektrodenmaterial und zur elektrischen Kontaktierung nach außen. 400 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Passivierung der gesamten Chipoberfläche mit Ausnahme des aktiven Elektrodenbereiches an der Elektrodenspitze sowie des Kontakt-Pads (links). Informationen aus [24, 26]. **B, C:** REM-Aufnahmen der Nadelektrode ( $d_1 = 2 \mu\text{m}$ ). Der aktive Elektrodenbereich (weißer Pfeil) verläuft ringförmig um die Elektrode. **D, E:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahmen einer Nadelelektrode. Vergleichende Darstellungen zur Ansicht des Lagenaufbaus.

Aufgrund ihrer Nadelform ( $d_1 \leq 2 \mu\text{m}$ ) besitzen die Hohladeln eine stark vergrößerte Elektrodenoberfläche gegenüber den einfachen Platin-Nadelelektroden (Typ A). Ihre Herstellung erfolgt ebenfalls durch Trockenätzen von Silizium. Neben der Nadel-Prozessierung beschreiben Held *et al.* [24, 26] auch die Integration und Herstellung von vertikalen und horizontalen Fluidikkanälen für die intrazelluläre Wirkstoffzugabe und das Anlegen von Unterdruck wie beim *Patch-Clamp*.

**Massiv-Silber-Nadelelektrode (Typ D):** Im Gegensatz zu der dünnen Silberschicht auf den Platin-Nadelelektroden (Typ B) sollte durch eine massive Ag-Strukturdicke die elektrochemische Langzeitstabilität bei der Signalableitung verbessert werden. Da die von Held *et al.* [199] beschriebene Prozessierung auf Ionen-Strahl-Ätzen basiert, konnten nur Mikrosäulen oder Kegelstümpfe hergestellt werden. Bei diesen Sensorchips wird ein Borosilikatglas-Substrat verwendet. Der Wechsel von Silizium auf Borosilikatglas kam dem Wunsch nach die elektrischen Eigenschaften des Substrats zu verbessern wobei gleichzeitig die Möglichkeit der Durchlichtmikroskopie zu etabliert wurde. In **Abbildung 6-10** sind der Grundaufbau einer Massiv-Silber-Nadelelektrode sowie zwei verschiedene Nadelbreiten dargestellt.



**Abbildung 6-10: Aufbau einer Massiv-Silber-Nadelelektrode (Typ D)**

**A:** Schematische Querschnittsdarstellung einer Massiv-Silber-Nadelelektrode. Lagenaufbau: Substrat aus Borosilikatglas (Pyrex). 20 nm Chrom (nicht dargestellt) als Haftschiicht. 200 nm Gold (goldgelb) als Keimschicht (englisch: *seed layer*) für die elektrochemische Silberbeschichtung (5 µm Silberschicht, blau). 400 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Passivierung der gesamten Chipoberfläche mit Ausnahme des aktiven Elektrodenbereiches an der Elektrodenspitze sowie des Kontakt-Pads (links). Informationen aus [199]. **B:** REM-Aufnahme der Nadelelektrode. Aktiver Elektrodenbereich (weißer Pfeil). Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **C-E:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahmen von Nadelelektroden. Die dunkle Platin-Schicht über dem Silber wird für die FIB-Präparation benötigt. Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle. **D, E:** Vergleichende Darstellungen zur Ansicht des Lagenaufbaus. FIB-Präparation: Fraunhofer IWM Halle.

### 6.2.1.2 Dielektrophorese (DEP) Elektroden

Die skizzierte Konzeptidee in **Abbildung 6-1** und **Abbildung 6-5 B** geht von einer optimalen Lage der Zelle auf der *Patch-Site* bzw. Nadelelektrode aus. Es wurden verschiedene Methoden auf ihre Eignung hin untersucht, die die Positionierung der Zellen günstig beeinflussen sollten. Eine einfache Möglichkeit liegt in der Erhöhung der Zelldichte auf den Sensorchips. Der entscheidende Nachteil dieser Herangehensweise besteht jedoch in der Gefahr, dass die gewünschte Monolage der Zellen durch ein Übereinanderwachsen verlorengeht. Zwei weitere Methoden, die die Wahrscheinlichkeit einer optimal sitzenden Zelle erhöhen können, sind die DEP-Zellpositionierung sowie das Aufbringen von chemischen Gruppen auf der Chipoberfläche. Konzeptionell sollen beide Methoden kombiniert werden, damit durch das zielgerichtete Anwachsen definierte Zellnetzwerke geschaffen werden und dabei die benötigte Menge an Zellen

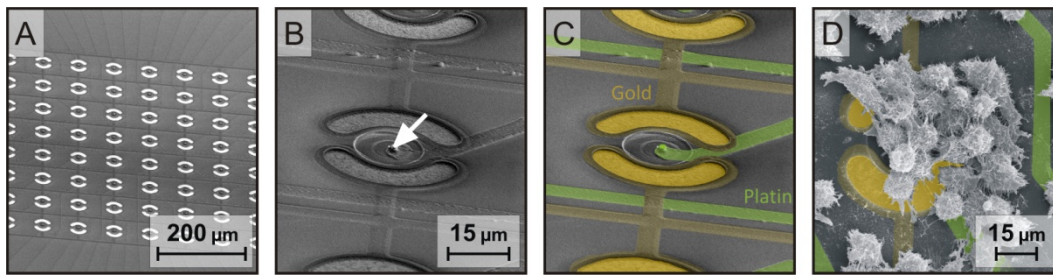
pro Zellkultur verringert wird. Die definierten Zellnetzwerke werden für eine reproduzierbare Signalinterpretation des Informationsaustausches zwischen den Zellen benötigt.

Bei der DEP [203-206] verursacht ein elektrisches Feld ein elektrisches Dipolmoment (räumliche Ladungstrennung) in der Zelle, das laut Gimsa *et al.* [52] zu einer orientierten Bewegung der Zelle in einem inhomogenen Feld führt. Je nachdem ob es sich um eine anziehende oder abstoßende Wirkung handelt, wird zwischen positiver und negativer DEP unterschieden. Für die Positionierung von Zellen im Bereich der Nadelelektrode sollte die positive DEP Anwendung finden, da eine sammelnde Wirkung benötigt wird. Die positive DEP, bei der sich die Zellen in Richtung höherer Feldstärke bewegen, wurde u. a. von Fuhr *et al.* [207] und Jones [206] beschrieben. Der DEP-Effekt ist laut Gimsa *et al.* [208] von einer Vielzahl an Parametern (Elektrodenform, Zelltyp, elektrisches Feld, Leitfähigkeit etc.) abhängig. Koester *et al.* [11, 19] beschreiben DEP-Experimente auf den Sensorchips.

Für die DEP wurden jeweils zwei planare, nierenförmige Elektroden um jede Nadelelektrode herum integriert (**Abbildung 6-11 A**). Diese Elektroden werden nachfolgend als DEP-Elektroden bezeichnet. Die konzeptionelle Idee besteht in einer groben Zellpositionierung zwischen beiden DEP-Elektroden, gefolgt von einer Feinpositionierung zwischen den DEP-Elektroden und der Nadelelektrode. Als Vorarbeiten zur Integration der DEP-Elektroden sind die von Koester *et al.* [209, 210] veröffentlichten Untersuchungen an Neurosensor-Chips mit planaren Elektroden für die extrazelluläre Ableitungen an Nervenzellkulturen zu nennen. **Abbildung 6-11 B** zeigt die Anordnung der zwei nierenförmigen DEP-Elektroden mit einem mittleren Abstand von jeweils ca. 15 µm zur Nadelelektrode. Die Elektroden ähneln einem an zwei Stellen geöffneten Kreis. Es gibt jedoch auch einige wenige DEP-Versionen mit zwei voneinander abgewandten Elektroden [74].

Für die Prozessierung der insgesamt 128 DEP-Elektroden wurden eine zusätzliche Metallisierungs- sowie eine Isolationsschicht benötigt. **Abbildung 6-11 C, D** veranschaulicht die Lage der beiden Metallisierungsschichten für den Anschluss der Nadelelektroden (Platin) sowie der DEP-Elektroden (Gold). Die Prozessierung und das resultierende Chip-Layout wurden von Held [198] sowie Held *et al.* [200] beschrieben. DEP-Elektroden wurden ausschließlich auf Sensorchips mit Nadelelektroden vom Typ A

integriert (**Anhang A7**). **Anhang A23** zeigt die elektrische Anschlussbelegung der DEP-Elektroden. In **7.2.9** werden die durchgeführten DEP-Versuche vorgestellt.



**Abbildung 6-11: DEP-Elektroden**

REM-Aufnahmen von Sensorchips (Typ A) mit DEP-Elektroden ohne Elektrodenbeschriftung. **A:** 8×8 MPSA mit 128 DEP-Elektroden (weiß schimmernd). Elektrodenabstand 100 µm. Jeweils zwei nierenförmige DEP-Elektroden umgeben eine Nadelelektrode. **B:** Nahaufnahme einer Nadelelektrode (weißer Pfeil) mit ihren beiden DEP-Elektroden. Elektrode G5. **C:** Bearbeitete Darstellung der Elektrode G5 mit Beschriftung der Metallisierungsschichten. Metallisierungsschicht der DEP-Elektroden: 150 nm Goldschicht auf 15 nm Chrom. Informationen aus [198]. **A-C:** Zellfreier Sensorchip. Bearbeitete Darstellungen. Originalaufnahmen: IMTEK Universität Freiburg. **C, D:** DEP-Elektroden sind gelb eingefärbt. Leiterbahnen der DEP-Elektroden sind gelb-transparent. Leiterbahnen der Platin-Nadelelektroden sind grün-transparent. **D:** Mit DEP angezogene Zellen auf Nadelelektrode. Zellkultur: Mausfibroblasten L929, 3 DIV. Bearbeitete Darstellung. Originalaufnahme: Fraunhofer IWM Halle.

### 6.2.1.3 Materialauswahl - Substrat

Die *Patch*-Pipetten im klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau bestehen weitestgehend aus Borosilikatglas (**4.1.2**). Der Vergleich der *APC*-Systeme in **4.3.2** zeigte jedoch, dass je nach Anforderung sowohl Glas als auch Silizium-Substrate für den Sensorchip in Frage kommen. In **Tabelle 6-1** sind wesentliche Vor- und Nachteile der beiden Materialien zusammengefasst.

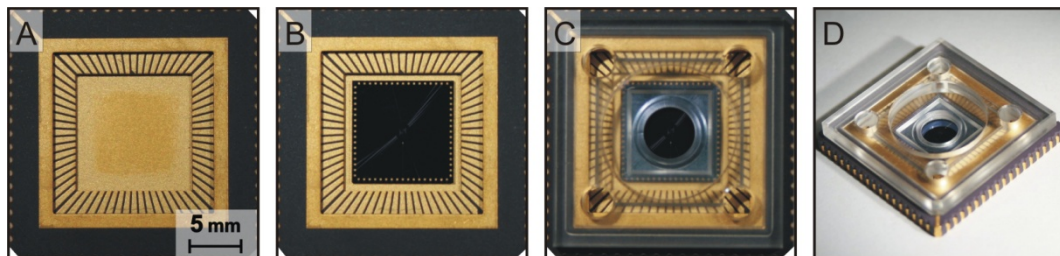
**Tabelle 6-1: Borosilikatglas- vs. Silizium-Substrat**

	<b>Borosilikatglas (Pyrex)</b>	<b>Silizium</b>
<b>Vorteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• gute dielektrische Eigenschaften</li> <li>• geringe Streukapazität</li> <li>• geringe Anbindung von Testsubstanzen</li> <li>• Mikroskopierbarkeit</li> <li>• lange Lagerbeständigkeit</li> <li>• chemikalienbeständig</li> <li>• temperaturbeständig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vielseitige Mikrostrukturierung</li> <li>• hohe Gestaltungsflexibilität</li> <li>• Verwendung von Standardtechnologien</li> <li>• kostengünstige Massenproduktion</li> <li>• CMOS-kompatible Prozessierung                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Integration von Elektronik</li> <li>- Miniaturisierung durch Integration</li> </ul> </li> <li>• einfache Funktionalisierung von Oberflächen</li> </ul>
<b>Nachteile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prozessierung ist schwieriger</li> <li>• keine Integration von Elektronik möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Seal</i>-Qualität (Abdichtwiderstand, Erfolgsrate etc.) ist schlechter</li> <li>• Isolierung zum Substrat ist notwendig</li> <li>• hohe Dichte an freien Ladungsträgern                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- schlechte dielektrische Eigenschaften</li> <li>- vergleichsweise große parasitäre Kapazitäten</li> <li>- verstärktes Rauschen</li> <li>- verlangsamte Spannungstransienten</li> </ul> </li> </ul>

Für eine flexible Prozessierung unterschiedlichster Nadelformen wurde seitens IMTEK bevorzugt Silizium verwendet. Ausschließlich die Massiv-Silber-Nadelelektroden (Typ D) sind auf einem Borosilikatglas-Substrat hergestellt. **Anhang A7** enthält die Zuordnung des Substratmaterials zu den Elektrodentypen.

#### 6.2.1.4 Chip-Träger

Die Sensorchips wurden standardmäßig in einen 68-poligen Chip-Träger (68-CLCC, Hersteller: **Kyocera Corp., Kyoto, Japan**) montiert. Die Elektroden sowie das Substrat der Sensorchips sind mittels *Ball-Wedge*-Bonden über Golddrähte ( $d_A = 25 \mu\text{m}$ ) nach außen kontaktiert [198]. Mit dem verwendeten Chip-Träger wurden bereits in Vorgängerprojekten (extrazelluläre Ableitung an Neuronen) gute Erfahrungen hinsichtlich seiner Handhabbarkeit und elektrischen Eigenschaften gesammelt. Zudem sind speziell auf ihn abgestimmte Verkapselungsteile vorrätig bzw. kurzfristig produzierbar, die den Sensorchip komplettieren. Die Verkapselungsteile aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas®) schützen die Bonddrähte und versehen den Chip mit einem Trog als Zellkulturkammer. Das maximale Kammerfluidvolumen beträgt ca. 250  $\mu\text{l}$ . Der Trog gestattet die Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven für mikroskopische Betrachtungen der Zellkultur. Die innere Gestaltung des Troges ist an das Immersionsobjektiv LUMPLFL100XW (**Olympus Corp., Tokyo, Japan**) mit 100-facher Vergrößerung und einem 1 mm Arbeitsabstand angepasst. Die Chipoberfläche bleibt in einem kreisrunden Bereich ( $d = 5 \text{ mm}$ ) mit dem MPSA in der Mitte geöffnet. Im Vergleich zu Trögen aus PMMA stellte Koester [81] ein Absinken der Wachstumsrate bei neuronalen Zellkulturen fest, sofern stattdessen Polyoxymethylen (POM) verwendet wurde. In **Abbildung 6-12** ist der Aufbau eines Sensorchips schrittweise dargestellt.

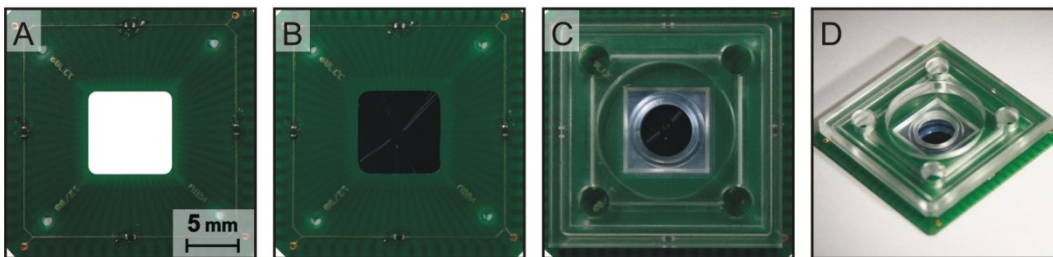


**Abbildung 6-12: Zusammenbau Sensorchip (68-CLCC)**

**A:** Keramischer Chip-Träger 68-CLCC (**Kyocera Corp., Kyoto, Japan**) in Draufsicht. Oben in der Mitte liegt Pad 1 (nicht sichtbar). Die Zählrichtung der Pads erfolgt gegen den Uhrzeigersinn. Das Pad 1 (Pin 1) ist mit dem *Die-Attach-Pad* verbunden. Informationen und technische Skizze in [211]. **B:** Eingeklebter Chip (Typ A). Kantenlänge 10 mm. Golddrähte verbinden Kontakte (Pads) des Sensorchips mit dem Chip-Träger. Das Substrat wird über Pad 1 (Pin 1) kontaktiert. Verwendetes Verfahren: *Ball-Wedge-Bonden* [198]. **C:** Aufgeklebtes Verkapselungsteil. **D:** Komplettierter Sensorchip (Typ A). Pinning in **Anhang A21 D**.



Die Verwendung des 68-CLCC beschränkte die Möglichkeiten zur optischen Beobachtung der lebenden Zellkultur auf die Nutzung der Auflichtmikroskopie. In biologischen Laboren ist jedoch die Durchlichtmikroskopie stärker verbreitet, die einen transparenten Chip-Träger voraussetzt. Die Nutzung von Glassubstraten wurde bereits in **6.2.1.3** aufgrund der elektrischen Eigenschaften in Betracht gezogen, sodass ein Ersatz für den 68-CLCC mit einer Ausrichtung auf die Durchlichtmikroskopie vorteilhaft war. In **Abbildung 6-13** ist das Konzept eines Chip-Trägers vorgestellt, der mit dem Sensorchip durch Anwendung der *Flip-Chip*-Technologie verbunden wurde. Dieser Chip-Träger wurde in einem ersten Versuch aus einfachem Platinenmaterial (FR-4) hergestellt. Auf dem Sensorchip wurden laut Held [198] die Pads modifiziert und eine 3 µm dicke Goldschicht aufgetragen.

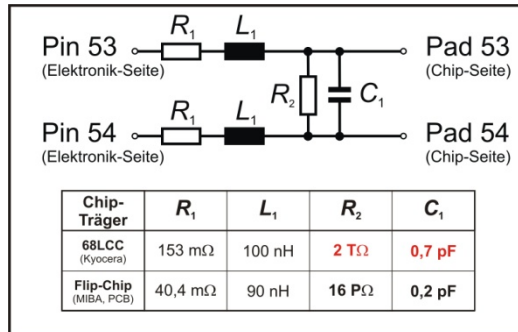


**Abbildung 6-13: Zusammenbau Sensorchip (*Flip-Chip*-Bonding)**

**A:** Chip-Träger aus Platinenmaterial (FR-4) für *Flip-Chip*-Montage in Draufsicht. In der Mitte der Platine befindet sich eine quadratische Aussparung. Oben in der Mitte liegen Pad 1 und Pin 1 (nicht sichtbar). Die Zählrichtung der Pads erfolgt gegen den Uhrzeigersinn in Anlehnung an [211]. **B:** Kontaktierter Sensorchip (Typ A). Die Pads von Sensorchip und Chip-Träger wurden durch *Flip-Chip*-Montage verbunden [198]. Das Substrat wird über Pad 1 (Pin 1) kontaktiert. **C:** Aufgeklebtes Verkapselungsteil. **D:** Komplettierter Sensorchip (Typ A). Pinning in **Anhang A21 D**.

Um den Einfluss des Chip-Trägers auf das Messsystem zu bestimmen, wurde das Ersatzschaltbild (ESB) der Kanal-zu-Kanal-Isolation durch verschiedene Testmessungen bestimmt. Die Durchführung der Messungen ist in **Anhang A25, A26** beschrieben. Die hohe Luftfeuchtigkeit im Brutschrank während der Zellkultivierung, welche die Kanal-zu-Kanal-Isolation durch Feuchtaufnahme der Materialien negativ beeinflussen kann, wurde dabei nicht berücksichtigt. Für die Untersuchungen wurde ein Alpha-ANB Impedance / Gain Phase Messsystem mit einem ZG2 Test Interface (beide **Novocontrol Technologies GmbH & Co. KG, Hundsangen, Deutschland**) verwendet, das sich für diese Anwendung durch die Kombination eines großen Frequenz- und Impedanzbereiches in Verbindung mit einer hohen Messgenauigkeit auszeichnet. Dies ermöglicht eine elektrische Charakterisierung von sowohl hochisolierenden als auch leitfähigen Komponenten. Der Bereich des ohmschen Isolationswiderstandes wurde durch ein Hochohm-Multimeter 6517B (**Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio, USA**) abge-

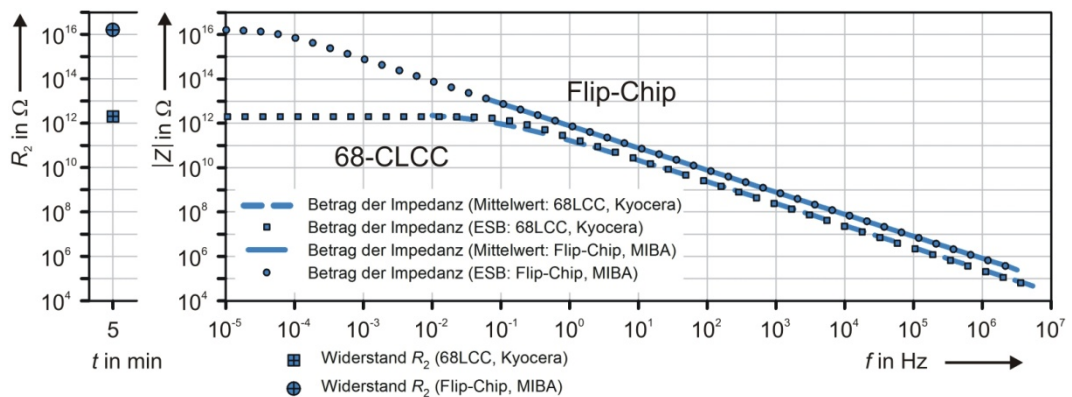
deckt. In **Abbildung 6-14** sind für den 68-CLCC (Kyocera) sowie für den Chip-Träger aus Platinenmaterial (*Flip-Chip*) das ESB dargestellt und die ermittelten Werte zum Vergleich aufgelistet. Die Kanal-zu-Kanal-Isolation wird durch den Isolationswiderstand  $R_2$  sowie die Koppelkapazität  $C_1$  definiert.



**Abbildung 6-14: Ersatzschaltbild Chip-Träger: 68-CLCC vs. Flip-Chip**

ESB für die Kanal-zu-Kanal-Isolation zwischen zwei Kontakten eines Chip-Trägers. Die Bezeichnungen Elektronik-Seite und Chip-Seite beschreiben die räumliche Ausrichtung des Modells. Der Kontakt (Pin) auf der Elektronik-Seite wird über den Chip-Sockel mit der Messelektronik verbunden. Der Kontakt (Pad) auf der Chip-Seite wird über einen Bonddraht (68-CLCC) oder durch die Flip-Chip-Technologie mit dem eigentlichen Chip (10 x 10 mm<sup>2</sup>) verbunden. Parasitäre Anteile gegen Masse sind im Modell nicht berücksichtigt.

Der Einfluss des geringeren Isolationswiderstandes  $R_2$  sowie der höheren Koppelkapazität  $C_1$  beim 68-CLCC gegenüber der *Flip-Chip*-Variante veranschaulicht **Abbildung 6-15** am resultierenden Verlauf der Impedanz. In **Abbildung 6-15** wurden dafür die Messwerte gemittelt und mit dem Verhalten der in **Abbildung 6-14** vorgestellten ESBs überlagert.



**Abbildung 6-15: Kanal-zu-Kanal-Isolation: 68-CLCC vs. Flip-Chip**

Überlagerung der gemittelten Messwerte mit dem ESB. Probenumfang jeweils (n = 3). Messbedingungen: Konstante Temperatur bei ca. 22 °C. Temperaturmessung: Fluke 971 (**Fluke Corp., Everett, Washington, USA**) und PicoSens (**Opsens Inc., Quebec, Canada**). Relative Luftfeuchte ca. 31 % (Fluke 971). **Links:** Isolationswiderstand  $R_2$  (t = 5 min) gemessen mit einem 6517B (**Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio, USA**). Messspannung:  $U = 400$  V. **Rechts:** Betrag der Impedanz der ESBs (einzelne Punkte bzw. Quadrate) sowie der Messwerte (Kurve) abgetragen über die Frequenz. Messgerät: Alpha-ANB mit ZG-2 (**Novocontrol Technologies GmbH & Co. KG, Hundsangen, Deutschland**). Messspannung:  $U_{\text{eff}} = 1$  V.

Der Vergleich der Kanal-zu-Kanal-Isolation als Maß für das Übersprechen und die gegenseitige Beeinflussung der Messkanäle zeigt, dass der Chip-Träger aus Platinenmaterial

bei Gleichstrom bis in den Frequenzbereich unterhalb 0,1 Hz einen bis zu 10.000-fach höheren Isolationswiderstand besitzt als der 68-CLCC. Dieses Verhalten ist auf die Unterschiede zwischen den Koppelkapazitäten und dem ohmschen Anteil von  $R_2$  zurückzuführen (**Abbildung 6-14**). Im Frequenzbereich oberhalb 0,1 Hz zeigte sich ein konstanter Unterschied im Isolationswiderstand mit einem Faktor von ungefähr 10. Unter den gewählten Laborbedingungen (**Anhang A25, A26**) bei Raumtemperatur mit einer relativen Luftfeuchte kleiner 35 % wäre der Chip-Träger aus Platinenmaterial dem bisher verwendeten 68-CLCC vorzuziehen.

### 6.2.2 Signalerfassung

In **4.1.4** wurden der *Voltage-Clamp*-Modus sowie der *Current-Clamp*-Modus vorgestellt, deren grundlegende Schaltungsstrukturen in **Abbildung 4-6 A** und **Abbildung 4-7 A** dargestellt sind. Bei *Patch-Clamp*-Ableitungen kann je nach Bedarf zwischen beiden Betriebsmodi umgeschaltet werden. Erfahrungsgemäß wird im klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau vorrangig der *Voltage-Clamp*-Modus verwendet. Die Recherche zu den APC-Systemen in **4.3** ergab zudem, dass nur wenige Geräte den *Current-Clamp*-Modus anbieten. Es wird daher auf eine geringe pharmakologische Bedeutung des *Current-Clamp* bei der Wirkstoffsuche geschlossen, die seine Anwendung eher uninteressant macht. Aufgrund der fehlenden Prozessierung von vollständigen *Patch-Sites* nach dem Konzept in **Abbildung 6-1 B** konzentriert sich die Signalerfassung der vereinfachten Testapplikation vorrangig auf die Verwendung der Nadelelektroden (Typ A-D), um die Methode der lokalen Elektroporation hinreichend zu erproben (**Abbildung 6-4**). Mit ihren hohen Elektrodenwiderständen ( $R_{PIP} > 50 \text{ M}\Omega$ ) sind sie für *Voltage-Clamp*-Ableitungen ungeeignet, da der daraus resultierende sehr hohe Serienwiderstand  $R_S$  die in **4.1.5.2** getroffene Festlegung ( $R_S \ll R_M$ ) für die näherungsweise Bestimmung der Membraneigenschaften nicht mehr erfüllt. In **7.1.2** wird der *Voltage-Clamp*-Modus verwendet, um den Elektrodenwiderstand der Nadelelektroden zu bestimmen.

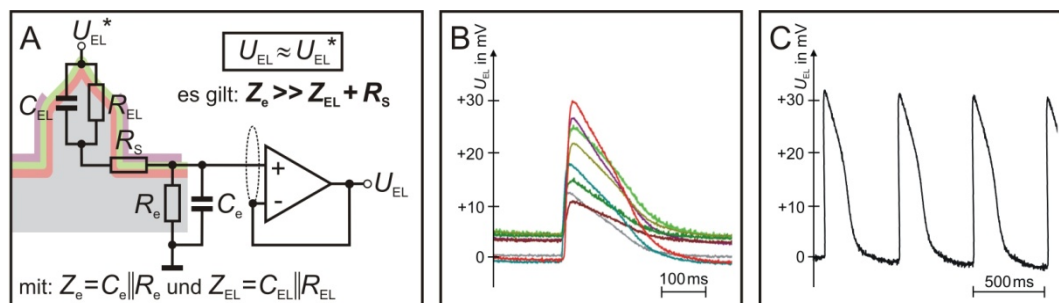
Die Signalerfassung wurde für den Großteil der Nadelelektroden auf die in **Abbildung 6-1 B** skizzierte hochohmige Spannungsmessung von  $U_{EL}$  beschränkt. Der Messaufbau entspricht damit dem in **4.1.4.3** beschriebenen Verfahren zur Bestimmung des Ruhemembranpotentials bei der Ganzzellaufleitung im *Current-Clamp*-Modus. Abgesehen von der Steuerung der Elektroporation sind damit auch Anwendungen wie bspw. die Untersuchung von Änderungen des Transmembranpotentials  $U_M$  nach erfolgreicher Elektroporation sowie die extrazelluläre Ableitung an elektrisch aktiven Zellen möglich



(7.2.7 und 7.2.8). Grundlage für den Schaltungsentwurf und zur Klärung von Dimensionierungsfragen waren die Erstellung von ESBs, die alle wesentlichen elektrischen Wechselbeziehungen zwischen Zelle, Nadelelektrode und Elektronik vereinfacht darstellen. Das in Tautorat *et al.* [14] vorgestellte ESB für eine Ganzzelleableitung mit Nadelelektroden wurde dafür sukzessiv angepasst. Die ESBs für den Chip-Träger sowie für den Chip-Sockel in **Abbildung 6-14** und **Abbildung 6-19** beschreiben wesentliche Komponenten für die Kanal-zu-Kanal-Isolation.

### 6.2.2.1 Spannungsmessung an der Nadelelektrode

Die *Current-Clamp*-Technik wurde von Sherman-Gold [48] für die Aufzeichnung von Transmembranpotentialen als „traditionelle“ Methode bezeichnet. Ihre Funktionsweise ist in 4.1.4 ausführlich beschrieben. Sofern die in **Abbildung 4-7** skizzierte Stromquelle weggelassen wird, vereinfacht sich die *Current-Clamp*-Schaltung zu einem einfachen Spannungsfollower, mit dem die Pipettenspannung  $U_{PIP}$  einer *Patch*-Pipette bzw. die Spannung  $U_{EL}$  einer Nadelelektrode bestimmt werden kann. **Abbildung 6-16 A** veranschaulicht wesentliche Randbedingungen für die Signalleitung an den Nadelelektroden. Für eine weitgehend präzise Spannungsmessung von  $U_{EL}$  wurde die Signalerfassung in Form eines sehr hochohmigen Impedanzwandlers konzipiert.



**Abbildung 6-16: Spannungsmessung an den Nadelelektroden**

**A:** Schematische Darstellung zur Spannungsmessung von  $U_{EL}$  an einer Nadelelektrode. Die Nadelelektrode ist direkt mit der Verstärkerelektronik der Signalerfassung verbunden. Für eine präzise Spannungsmessung von  $U_{EL}$  ist der sich aus Elektrode und Elektronik gebildete Spannungsteiler zu beachten. Die Elektrode ist in Form eines vereinfachten Ersatzschaltbildes aus der Parallelschaltung der Kapazität  $C_{EL}$  und dem Widerstand  $R_{EL}$  dargestellt.  $C_{EL}$  und  $R_{EL}$  sind frequenzabhängig. Im Hintergrund ist beispielhaft der schematische Querschnitt einer Platin-Nadelelektrode (Typ A) dargestellt. Der Serienwiderstand  $R_S$  beschreibt vor allem die Zuleitung zwischen Nadelelektrode und Elektronik. Die Parallelschaltung von  $C_e$  und  $R_e$  beschreibt eingangsseitig die Eigenschaften des Messsystems und setzt sich aus verschiedenen wirksamen Anteilen (Passivierung der Chipoberfläche, Verstärkereigenschaften, Platinmaterial etc.) zusammen. **B:** Extrazelluläre Ableitung an Herzmuskelzellen (Ratte; 5 DIV E19 bis E20) auf mehreren Elektroden eines Sensorchips. Die Signalleitungen von acht Elektrodenkanälen (verschiedene Farben) sind dargestellt. Die Zeitdauer eines Aktionspotentials beträgt ca. 330 ms. Chiptyp D. **C:** Extrazelluläre Ableitung an Herzmuskelzelle (Ratte; 5 DIV E19 bis E20). Kontraktionsfrequenz ca. 2 Hz. Chiptyp D. Umgezeichnete Abbildung aus Tautorat *et al.* [16].

In **Abbildung 6-20 A** ist die Beschaltung zur Spannungsmessung zusammen mit der Zellmanipulation dargestellt. **Abbildung 6-16 B, C** zeigt zwei Beispiele für Signalableitungen an den Nadelelektroden. Die vereinfachte Testapplikation in **Abbildung 6-4** enthält insgesamt 14 Messkanäle für hochohmige Spannungsmessungen [16]. Im Gegensatz zu dem in Tautorat *et al.* [10, 14, 15] sowie Koester *et al.* [11, 19, 28, 29, 212] beschriebenen Entwicklungsstand erfolgte damit eine Erweiterung um zwei weitere Messkanäle für die Ableitung der Spannung an den Nadelelektroden. Die Bestimmung des Absolutwertes des Transmembranpotentials  $U_M$  ist jedoch mit den in **6.2.1** vorgestellten Nadelelektroden nicht möglich, da mehrere überlagerte Effekte die Spannungsmessung von  $U_{EL}$  beeinflussen. So stellen sich bspw. durch Bad- und Nadelelektrode *Offset*-Spannungen ein, die sich als zusätzlicher Gleichanteil im Messsignal zeigen (**4.1.5.3**). Für eine Minimierung dieses Gleichanteils werden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Silber-Nadelelektroden Typ B und Typ D in Kombination mit der standardmäßig verwendeten Ag/AgCl-Badelektrode zeigen sehr stabile Spannungswerte von  $U_{EL}$  mit geringem *Offset* (**Kapitel 7**). Um elektrochemische Elektrodenprozesse seitens der Elektronik zu reduzieren, wurden spezielle Operationsverstärker eingesetzt, die sich durch sehr geringe Leckströme auszeichnen. Ihre sehr hohen Eingangswiderstände waren zudem erforderlich, damit der in **Abbildung 6-16 A** skizzierte Spannungsteiler eine nahezu dämpfungsfreie Signalableitung an den Nadelelektroden mit Elektrodenwiderständen über 50 M $\Omega$  erlaubte. Die Bestimmung des Elektrodenwiderstands  $R_{EL}$  wird in **7.1.2** vorgestellt. Für die Auswahl eines geeigneten Operationsverstärkers wurden die Maximalwerte der Eingangsruhestrome, die Eingangsimpedanzen sowie die Rauschgrößen der auf dem Markt erhältlichen Schaltkreise untersucht. Neben diesen kritischen Parametern wurde die maximal zulässige Eingangsoffsetspannung auf  $\pm 5$  mV festgelegt. Zudem wurden für ein geringes Übersprechen 1-Kanal-Verstärker bevorzugt. Anhand der Ausführungen von Tietze und Schenk ([213] S. 541ff.) zu nichtinvertierenden Verstärkern erfolgten unter Verwendung der Herstellerangaben Überschlagsrechnungen ( $V = 1, 10$  und  $100$ ) zu resultierenden Eingangswiderständen verschiedener Operationsverstärker. Für den ausgewählten Verstärker OPA129UB (**Texas Instruments Inc., Dallas, Texas, USA**) ergibt sich für eine Beschaltung als Spannungsfolger ( $V = 1$ ) ein Eingangswiderstand von ca. 1 P $\Omega$  ( $10^{15}$   $\Omega$ ). Der OPA129UB wird daher vorzugsweise als Elektrometer-Verstärker eingesetzt [214]. Bei der physiologischen Temperatur von 37 °C liegt der maximale Eingangsruhestrom des OPA129UB

unterhalb  $\pm 250$  fA [214]. **Tabelle 6-2** fasst wesentliche Eigenschaften des ausgewählten Operationsverstärkers OPA129UB zusammen.

**Tabelle 6-2: Eigenschaften Operationsverstärker OPA129UB**

Spezifikationen für  $T = 25$  °C und  $U_B = \pm 15$  V, sofern nicht anders angegeben. Informationen aus [214].

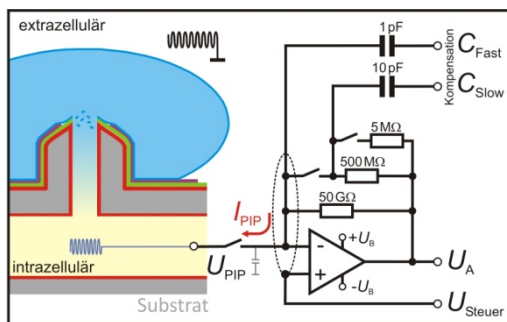
Parameter	Bedingungen	Spezifikation
Eingangsruhestrom	$T = 37$ °C	max. $\pm 250$ fA
Gleichtakt-Eingangsimpedanz		typ. $1$ p $\Omega$ // $2$ pF
Differenz-Eingangsimpedanz		typ. $10$ T $\Omega$ // $1$ pF
Eingangsspannungsbereich		typ. $\pm 12$ V
Ausgangsspannungsbereich	$R_L = 2$ k $\Omega$	min. $\pm 12$ V
Frequenzgang	$V = 1$ , Kleinsignalverhalten	$f_{3dB} = 1$ MHz
Eingangs-Offset-Spannung	$U_e \approx 0$	max. $\pm 2$ mV
Spannungsrauschen	$0,1$ Hz bis $10$ Hz	typ. $4$ $\mu$ V (Spitze-Spitze)
Stromrauschen	$f = 10$ kHz	typ. $0,1$ fA/ $\sqrt{\text{Hz}}$
Stabilitätsgrenze bei kapazitiver Last	$V = 1$	typ. $1$ nF
weitere Informationen:	kein Standard-Pinning, sehr lange Lieferzeiten	

Aufgrund der gewählten Betriebsspannung von  $\pm 5$  V ist der maximale Aussteuerbereich des OPA129UB auf  $\pm 2$  V begrenzt [214]. Die erwarteten Sensormesssignale liegen innerhalb dieser Grenzen. In Hinblick auf die überlagerten *Offset*-Spannungen durch Elektrodenpotentiale etc. wurde im Bereich der Signalerfassung jedoch weder eine feste noch eine programmierbare Signalverstärkung vorgesehen.

### 6.2.2.2 Voltage-Clamp-Verstärker

In Tautorat *et al.* [14, 15] wurde die Integration von vier Strom-Spannungswandlern in die vereinfachte Testapplikation beschrieben, deren Aufbau der Grundstruktur eines *Voltage-Clamp*-Verstärkers in **Abbildung 4-6 A** entspricht. Das in Tautorat *et al.* [16] vorgestellte Labormuster wurde auf nur eine Grundstruktur für *Voltage-Clamp*-Ableitungen reduziert und bietet optional die Möglichkeit an einen EPC 9 *Patch-Clamp*-Endverstärker (HEKA) zu Vergleichszwecken angeschlossen zu werden. Als Operationsverstärker wurde ebenfalls der für die Spannungsmessung von  $U_{EL}$  ausgewählte OPA129UB verwendet. Im Vergleich zu den Kennwerten der von Sigworth [118] sowie Hamill *et al.* [87] beschriebenen Eingangsstufen besitzt der OPA129UB hinsichtlich seiner Rauscheigenschaften sowie des Ruhestroms vergleichbare und bezüglich der Bandbreite und Eingangsimpedanz bessere typische Kennwerte (**Tabelle 6-2**). Auf dem in **Abbildung 4-6 A** dargestellten Differenzverstärker sowie auf Schaltungsstrukturen für die in **4.1.5**

vorgestellten Kompensationsmethoden wurde vorerst verzichtet, da sie zumindest in den EPC 9 Endverstärker (HEKA) integriert sind. Der überarbeitete Messkanal wurde an die Funktionsweise einer EPC 9 *Headstage* (HEKA) angepasst [118]. Dieser Kanal wird vollständig über die Software Patchmaster (HEKA) gesteuert und ausgewertet. In dieser Konfiguration zeichnet die Systemsoftware des Labormusters die Ausgangs- sowie Steuerspannung des Strom-Spannungswandlers zusätzlich auf. Notwendigerweise überwacht die Systemsoftware den mit der Software Patchmaster angeforderten Verstärkungsfaktor und schaltet den jeweiligen Rückkopplungswiderstand zu. Die Verbindung zwischen dem EPC 9 Endverstärker und dem Labormuster erfolgt über eine speziell angefertigte Kabelkonfektion. In **Abbildung 6-17** ist der Anschluss des *Voltage-Clamp*-Kanals in der Konzeptidee dargestellt. Im Labormuster ist der Eingang des Messkanals jedoch mit einer Nadelelektrode verbunden.

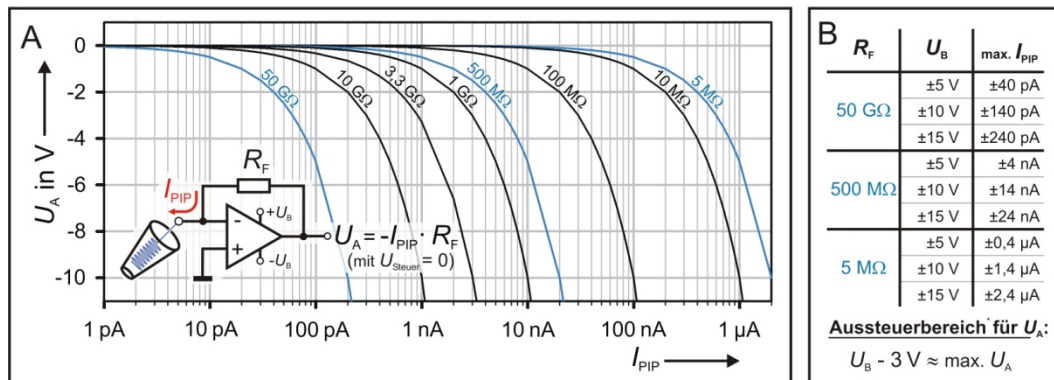


**Abbildung 6-17: Voltage-Clamp-Messkanal**

Vereinfachte schematische Darstellung eines *Voltage-Clamp*-Kanals mit drei Verstärkungsstufen. Die Ausgangsspannung  $U_A$  sowie die Steuerspannung  $U_{Steuer}$  werden von der Systemsoftware aufgezeichnet. Die Pipette kann von der Elektronik weggeschaltet werden. Alle dargestellten Schalter sind elektromechanische Reed-Relais. Über die beiden Kondensatoren 1 pF bzw. 10 pF werden die Signale der Kapazitätskompensation von  $C_{Fast}$  und  $C_{Slow}$  seitens des EPC 9 Endverstärkers (HEKA) direkt eingespeist. Ohne angeschlossenen EPC 9 Endverstärker ist die Kompensation der parasitären Kapazitäten nicht möglich.

Aufgrund der verschiedenen Betriebsspannungen von  $\pm 5$  V beim Labormuster und  $\pm 15$  V beim EPC 9 (HEKA) wurde die Betriebsspannung  $U_B$  des *Patch-Clamp*-Verstärkers umschaltbar konzipiert. Eine integrierte Anschlussdetektion erkennt hierfür die Verbindung des EPC 9 mit dem Labormuster. Mit Hilfe von festverdrahteter Logik erfolgt das automatische Umschalten zwischen den beiden Betriebsspannungen. Die Versorgung des *Voltage-Clamp*-Messkanals mit der  $\pm 15$  V Betriebsspannung erfolgt seitens des EPC 9 Endverstärkers. Im Fall einer Verwendung ohne EPC 9 Endverstärker führt die verringerte Betriebsspannung automatisch zu einer Verringerung des maximalen Strommessbereiches, da sich auch der Aussteuerbereich des *Patch-Clamp*-Verstärkers reduziert. Für die Konzeption dieses Schaltungsbereiches wurde **Abbildung 6-18 A** verwendet. Die Kurvenverläufe geben für verschiedene Verstärkungsfaktoren

Aufschluss über die resultierende Ausgangsspannung  $U_A$  in Abhängigkeit vom Messstrom. Der angegebene Messbereich liegt innerhalb der physiologisch interessanten Grenzen, die für Einzelkanalströme bereits bei ca. 10 fA beginnen [59]. Mathes [100] berichtete von Ganzzelleableitungen im Bereich von 50 pA. Die Messströme im Riesenaxon können andererseits bis in den Milliampere-Bereich hineinreichen. **Abbildung 6-18** zeigt auch, dass durch Erhöhung der Betriebsspannung der Messbereich erhöht werden kann. Bei einem Überschreiten der einzelnen Messbereiche übersteuert der Operationsverstärker. Durch Verringerung des Verstärkungsfaktors kann dem Übersteuern jedoch entgegengewirkt werden. Für einen automatisierten Betrieb des Messsystems wird diese Gefahr durch Verwendung einer sogenannten *Clipping*-Detektion erkannt (6.2.4.4). **Abbildung 6-18 B** zeigt den maximalen Strommessbereich in Abhängigkeit von der Betriebsspannung am Beispiel für die drei in der *Headstage* des EPC 9 (HEKA) integrierten Rückkopplungswiderstände  $R_F = 5 \text{ M}\Omega$ ,  $500 \text{ M}\Omega$  und  $50 \text{ G}\Omega$  [118].



**Abbildung 6-18: Messbereich Voltage-Clamp-Verstärker**

Ermittlung des resultierenden Aussteuerbereiches bei einem *Voltage-Clamp*-Verstärker für verschiedene Verstärkungsfaktoren und Strommessbereiche. Es gilt:  $U_{Steuer} \approx 0 \text{ V}$ . **A:** Aussteuerbereich der Spannung  $U_A$  am Ausgang des abgebildeten Strom-Spannungswandlers in Abhängigkeit vom Messstrom  $I_{PIP}$  für eine Auswahl häufig verwendeter Rückkopplungswiderstände. Blau hervorgehoben sind die Kurvenverläufe von  $R_F = 5 \text{ M}\Omega$ ,  $500 \text{ M}\Omega$  und  $50 \text{ G}\Omega$ , die im Labormuster sowie in der *Headstage* des EPC 9 (HEKA) integriert sind. Vereinfachte Darstellung für den Fall  $I_{PIP} > 0 \text{ A}$ . Für  $I_{PIP} < 0 \text{ A}$  ändert sich ausschließlich das Vorzeichen von  $U_A$ . **B:** Tabellarische Zusammenfassung der Abhängigkeit des maximalen Strommessbereiches von der Betriebsspannung für die drei Rückkopplungswiderstände  $R_F = 5 \text{ M}\Omega$ ,  $500 \text{ M}\Omega$  und  $50 \text{ G}\Omega$ . Das Verhältnis von Aussteuerbereich  $U_A$  und Betriebsspannung  $U_B$  gilt für den Operationsverstärker OPA129UB [214].

Für eine zufriedenstellende Bandbreite wurde bei der Beschaffung und Integration der Rückkopplungswiderstände der Grenzwert ihrer parasitären Parallelkapazität auf jeweils 0,1 pF festgelegt. Hamill *et al.* [87] gaben diesen Wert für ihren 10 GΩ Rückkopplungswiderstand an. Im Gegensatz zu den 14 Messkanälen für die Spannungsmessung von  $U_{EL}$  an den Nadelelektroden, kann bei der Signalerfassung mit dem *Voltage-Clamp*-

Verstärker nicht auf eine Signalverstärkung verzichtet werden. Die Wahl einer programmierbaren Verstärkung ermöglicht das Umschalten zwischen den verschiedenen Messbereichen (**Abbildung 6-18 A**). Für das IonFlux™-System (**Fluxion Biosciences Inc., South San Francisco, Kalifornien, USA**) wird bspw. eine zweistufige Verstärkung beschrieben [215].

Von Asmild *et al.* [133] wurde der Messbereich des QPatch® mit 10 pA bis 20 nA angegeben, mit dem Einzelkanal- und Ganzzelleitungen möglich sind. Sigworth und Neher [90] verwendeten einen Rückkopplungswiderstand von  $R_F = 10 \text{ G}\Omega$  für ihre Einzelkanalableitungen. Die konzeptionelle Entscheidung für die schaltungstechnische Dimensionierung des Labormusters ähnlich dem EPC 9 (HEKA) deckt sich mit den Ausführungen von Sherman-Gold [48]. Demnach werden für Einzelkanalableitungen ein  $50 \text{ G}\Omega$  Widerstand und für Ganzzelleitungen ein  $500 \text{ M}\Omega$  Widerstand verwendet. Die drei Werte für den Rückkopplungswiderstand sind auch im aktuellen *Patch-Clamp*-Verstärker EPC 10 (HEKA) noch Stand der Technik.

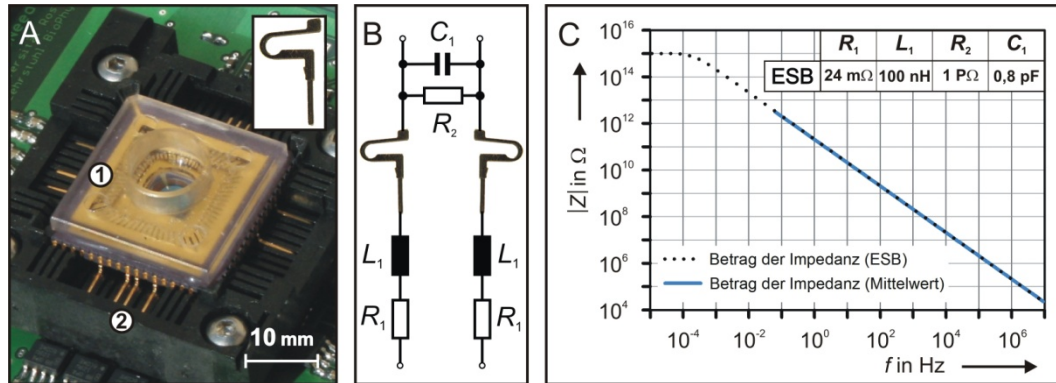
Die Bandbreite des Strom-Spannungswandlers in **Abbildung 6-17** wird über die parasitäre Streu- und Parallelkapazität des Rückkopplungswiderstandes begrenzt. Dies garantiert zwar Stabilität und minimiert das Rauschen, allerdings führt eine geringe Bandbreite zu einer schlechten zeitlichen Auflösung, die für die Messung von Ionenströmen sowie die Ableitung von Aktionspotentialen zumeist unakzeptabel ist [48]. Um die Kinetik der biologischen Signale trotzdem zu erhalten, werden die hochfrequenten Signalanteile durch Frequenzgangkompensation nachträglich in der Signalaufbereitung verstärkt [48]. Sigworth [118] stellte eine im EPC 9 (HEKA) verwendete Schaltung zur Frequenzgangkompensation vor. Im Labormuster wurde auf diese Form der Signalaufbereitung vorerst verzichtet.

### 6.2.2.3 Chip-Sockel

Der Chip-Sockel dient der mechanischen Aufnahme sowie der elektrischen Kontaktierung des Sensorchips im Messsystem. Wie bereits in Vorgängerprojekten (extrazelluläre Ableitung an Neuronen) wird ein 68-poliger CLCC als Chip-Träger für den Sensorchip verwendet (**6.2.1**). Ein für dieses Trägerformat passender Chip-Sockel ist der IC51-0684-390-1 (**Yamaichi Electronics Co. Ltd., Tokio, Japan**) in **Abbildung 6-19 A**. Seine Eignung für die Verwendung im Messsystem wurde anhand seiner elektrischen Eigenschaften untersucht. Hierfür wurde das ESB in **Abbildung 6-19 B** von zwei benach-



barten Kontakten ermittelt, mit dem das Übersprechverhalten von Kanal-zu-Kanal bewertet wurde. Der Betrag der wirksamen Impedanz als Maß für die elektrische Verbindung zwischen beiden Kontakten ist in **Abbildung 6-19 C** für die gemessenen Werte sowie für das ermittelte ESB dargestellt. Die Versuchsdurchführung und Messergebnisse sind in **Anhang A27** dokumentiert.



**Abbildung 6-19: Elektrisches Ersatzschaltbild Chip-Sockel (Yamaichi)**

Ersatzschaltbild des Chip-Sockels IC51-0684-390-1 (Yamaichi Electronics Co., Ltd., Tokio, Japan). Alle Kontaktflächen sind vergoldet [216]. **A:** Eingesetzter Sensorchip (1) im Chip-Sockel (2). Die nicht verwendeten Kontakte wurden aus dem Chip-Sockel entfernt. Rechts oben: einzelner Kontakt. **B:** Modell des ESB. Parasitäre Anteile gegen Masse sind nicht berücksichtigt. **C:** Betrag der Impedanz des ESBs (gestrichelter Kurvenverlauf) sowie der Messwerte (blaue Kurve) über Frequenz. Rechts oben: Tabellarische Zusammenfassung der Einzelkomponenten. Parasitäre Anteile gegen Masse sind nicht berücksichtigt. Probenumfang:  $n=3$ . Konstante Temperatur bei 22 °C. Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 32 % (Fluke 971).

Das in **Abbildung 6-19 B, C** vorgestellte ESB liefert Anhaltspunkte zum Übersprechverhalten von benachbarten Kanälen. Eine Überschlagsrechnung zur Koppelkapazität  $C_1$  bestätigt den ermittelten Wert von 0,8 pF. Wird zur Berechnung das Modell eines Plattenkondensators mit einer Plattenfläche von ca. 10 mm<sup>2</sup>, ein  $\epsilon_r = 3,7$  für das Sockelmaterial (PES) und einen Kontaktabstand von ca. 0,9 mm angenommen, berechnet sich der Wert für  $C_1$  zu ca. 0,4 pF [216]. Die Plattenfläche ergibt sich aus der effektiven Überlagerungsfläche der benachbarten Kontakte. Gegenüber dem sehr hohen ohmschen Anteil durch  $R_2$  wird der Einfluss von  $C_1$  bereits ab 0,1 mHz sichtbar, sodass der Betrag der Impedanz bei  $f = 1$  kHz bereits auf ca. 200 G $\Omega$  abgefallen ist (**Abbildung 6-19 C**). Damit in der praktischen Anwendung der Isolationswiderstand  $R_2$  vergleichbar hohe Werte annimmt, müssen die Kontakte stets sauber und trocken gehalten werden. Für die Reinigung wurde das Messsystem an dieser Stelle leicht demontierbar konstruiert. Um das Übersprechen von Kanal-zu-Kanal nachträglich zu verringern, wurden größtmögliche elektrische Abstände zwischen den Messkanälen geschaffen, indem alle ungenutzten Kontakte aus dem Chip-Sockel entfernt wurden (**Abbildung 6-19 A**). Die

Reduzierung auf 15 parallele Messkanäle sowie die Drehung des Chips innerhalb des Sockels machte dies möglich.

### 6.2.3 Zellmanipulation

Für die in **6.2.1** vorgestellten Sensorchips mit Nadelelektroden ist das Öffnen der Zellmembranen auf die elektrische Zellmanipulation (LOMINE) beschränkt, da es keine mikrofluidische Verbindung zum Ansaugen der Zellmembran gibt. Angelegte Spannungspulse an der Spitze der Elektroporations- bzw. Nadelelektrode erzeugen lokal im Bereich der Zellmembran ein sehr starkes elektrisches Feld, das zur Permeabilisierung der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und damit zur Bildung von Poren in der Zellmembran führt. Wie in **Kapitel 5** beschrieben, ist der resultierende Effekt der LOMINE an der Zellmembran von verschiedenen Parametern abhängig. Der Schaltungsbereich der Signalgenerierung für LOMINE und Zell-Stimulation wurde entsprechend der Ausarbeitungen in **Kapitel 5** auf einen maximalen Aussteuerbereich von  $\pm 4$  V zum Erzeugen des elektrischen Feldes ausgelegt. Die Manipulation mit der Multifunktions-Datenerfassungskarte NI USB-6259 (**National Instruments Corp., Austin, Texas, USA**) in **Abbildung 6-4** ist hardwareseitig auf die Generierung von Impulsen bzw. Pulsfolgen mit einer minimalen Impulslänge von ca.  $3,3 \mu\text{s}$  beschränkt [217]. Mit einem optionalen Funktionsgenerator können jedoch auch beliebige Signalformen extern eingespeist werden. Zimmermann ([154] S. 31ff.) beschrieb neben Rechteckpulsen für die Elektroporation bspw. auch die Verwendung von exponentiell abfallenden Pulsformen oder auch sinusförmige Signale.

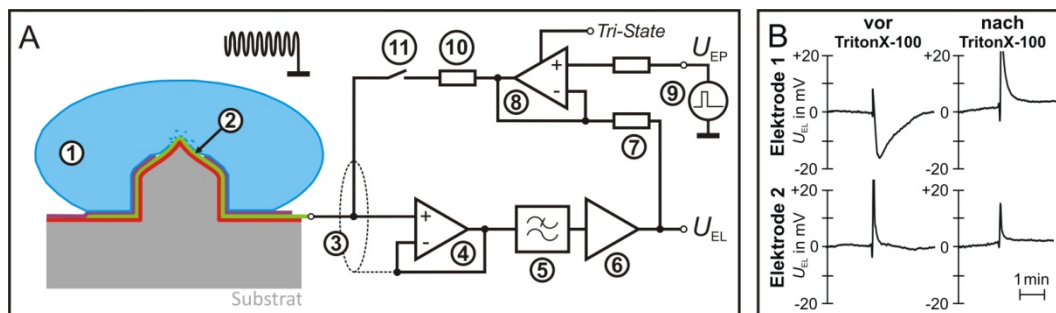
Für eine vollständige Bedienung über die Systemsoftware wird der Funktionsgenerator mit dem Messrechner verbunden. Die Ausgabe des Manipulationssignals erfolgt wahlweise bezüglich 0 V, bezüglich einer beliebigen Haltespannung oder bezüglich der kurz zuvor mit der Nadelelektrode gemessenen Spannung  $U_{\text{EL}}$ . Sofern  $U_{\text{EL}}$  als Bezug verwendet wird, wird es als Gleichspannungsanteil aufaddiert. Es wird vorausgesetzt, dass sich vor der Zellmanipulation ein stabiler Spannungswert von  $U_{\text{EL}}$  mit geringer Driftgeschwindigkeit eingestellt hat. Die Haltespannung wird vom Anwender über Bedienelemente der Systemsoftware vorgegeben.

Die zeitliche Steuerung der Zellmanipulation übernimmt die Systemsoftware. Je nach Betriebssystem können jedoch undefiniert schwankende Verzögerungszeiten (kein Echtzeitsystem) im Ablauf der Prozessschritte auftreten. Vorversuche mit dem



Microsoft-Betriebssystem Windows Vista™ (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) zum zeitlich versetzten Setzen zweier digitaler Datensignale am Ausgang der Datenerfassungskarte NI USB-6259 zeigten willkürliche Schwankungen von 1 ms bis 500 ms. Damit waren die Voraussetzungen für eine zeitlich definierte Manipulation der Zellen nur unzureichend erfüllt. Alle zeitlich kritischen Steuersignale wurden daher durch takt- und triggergesteuerte Logik miteinander synchronisiert. Auf diese Weise war es möglich, dass der Startpunkt für die Ausgabe des analogen Manipulationssignals direkt in den Prozessablauf des Zu- und Abschaltens der Elektronik integriert werden konnte. In Tautorat *et al.* [15] wurde diese Erweiterung als überarbeitete LOMINE-Sequenz beschrieben, bei der Vor- und Nachlaufzeit verkürzt wurden. Ziel war es dabei die Beeinflussung der Zelle zeitlich definiert zu gestalten.

In Tautorat *et al.* [14, 15] wurde bereits die Elektronik der elektrischen Zellmanipulation stark vereinfacht beschrieben. In **Abbildung 6-20 A** ist die Beschaltung am Beispiel eines Elektrodenkanals zur Spannungsmessung dargestellt, die auch für den *Voltage-Clamp*-Kanal gilt.



**Abbildung 6-20: Elektrische Zellmanipulation**

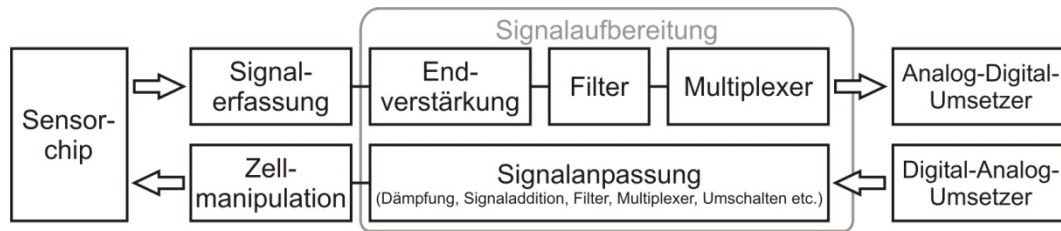
**A:** Beschaltung eines Elektrodenkanals für Spannungsmessungen (schematische Darstellung). Eine Zelle (1) sitzt auf einer Nadelelektrode (2). Querschnittsdarstellung von Zelle und Nadelelektrode. Ein hochempfindlicher Operationsverstärker (4) mit aktiver Schirmung (3) misst ständig die Spannung  $U_{EL}$  an der Nadelelektrode (2). Die obere Bandbreite wird durch ein aktives Filter (5) begrenzt. Ein Treiber (6) dient der Vermeidung von Stabilitätsproblemen durch kapazitive Lasten. Die Erzeugung eines Elektroporationspulses (9) erfolgt über eine Multifunktions-Datenerfassungskarte oder über einen externen Funktionsgenerator. Der Verstärker (8) besitzt eine *Tri-State*-Funktion und wird nur während der Elektroporationssequenz zugeschaltet. Vor dem Einschalten des Verstärkers (8) wird  $U_{EP} = U_{EL}$  gesetzt. Der Widerstand (7) hält den *Tri-State*-Ausgang auf einem definierten Pegel und verhindert kapazitiv eingekoppelte Einschaltpulse an der Nadelelektrode. Der Widerstand (10) dient der Strombegrenzung. Die Elektronik der Zellmanipulation wird durch ein Reed-Relais (11) auf die Nadelelektrode geschaltet. **B:** Potentialverlauf zweier Elektroden eines Sensorchips (Typ C) jeweils nach Elektroporation (LOMINE). Beide Elektrodenkanäle sind für Spannungsmessungen ausgelegt. Zelltyp L929. Die aufgezeichnete Kurvenform an Elektrode 1 ( $\Delta U \approx -20$  mV) vor Zugabe von Triton®X-100 entspricht der erwarteten Potentialänderung bei einer intrazellulären Ableitung. Die Zugabe von Triton®X-100 führt zur Zelllyse. Nach Zugabe von Triton®X-100 verhält sich Elektrode 1 wie eine zellfreie Elektrode. Elektrode 2 verhält sich vor und nach der Zugabe von Triton®X-100 wie eine zellfreie Nadelelektrode. Umgezeichnete Abbildung aus [16].

Die Auswahl einer beliebigen Elektrode im MPSA sowie die Vorgabe der elektrischen Elektroporationsparameter erfolgen über Bedienelemente der Systemsoftware (**Abbildung 6-24**). Diese individuelle Auswahl einer Elektrode oder eines Elektrodenbereiches im MPSA erlaubt es u. a. den Effekt der Elektroporation lichtmikroskopisch mit starker Vergrößerung und in Echtzeit zu beobachten.

Damit die hochsensible Signalerfassung weitestgehend unbeeinflusst bleibt, wird bei Nichtbenutzung der Zellmanipulation ihre Ausgangsstufe inaktiviert und zusätzlich durch Öffnen eines elektromechanischen Schalters in Form eines Reed-Relais von der Elektroporationselektrode getrennt. Die Inaktivierung der Endverstärkung schaltet den Ausgang des Elektroporationsverstärkers in einen hochohmigen Zustand (Tri-State-Funktion). Die Verwendung von Reed-Relais erhöht zwar den schaltungstechnischen Aufwand, aber im Vergleich zu elektronischen Schaltern besitzen sie einen höheren Isolationswiderstand und geringere Streu- und Koppelkapazitäten. Die verwendeten Miniatur-Reed-Relais vom Typ CRF05 (**MEDER electronic AG, Singen, Deutschland**) zeichnen sich durch einen typischen Isolationswiderstand von  $1\text{ T}\Omega$ , eine maximale Prellzeit von  $100\ \mu\text{s}$  und ihre kleine Bauform aus [218].

#### 6.2.4 Signalaufbereitung

Die Signalkonditionierung umfasst hauptsächlich die Filterung und Verstärkung der bereits vorverstärkten Sensormesssignale. Darüber hinaus müssen die Signale der Zellmanipulation sowie die Steuerspannung für das *Voltage-Clamp* aufbereitet werden. Damit der gesamte Dynamikbereich der Analog-Digital- aber auch der Digital-Analog-Umsetzung genutzt wird, werden die analogen Signale verstärkt bzw. gedämpft (**Abbildung 6-21**). Auf diese Weise werden eine hohe Genauigkeit und ein vermindertes Quantisierungsrauschen vor allem bei kleinen Signalamplituden erreicht. Rauschen und Signale außerhalb der interessierenden Bandbreite werden durch Filterung unterdrückt. Die in **4.1.5** vorgestellten Kompensationsmethoden sind ebenfalls der Signalaufbereitung zuzuordnen. Allerdings wurde im Labormuster vorerst nur die Kapazitätskompensation durch den optionalen Anschluss des EPC 9 (HEKA) integriert und erprobt (**Abbildung 6-17**). In **Abbildung 6-21** ist der Grundaufbau der Signalaufbereitung für die Signalerfassung und Zellmanipulation schematisch dargestellt.



**Abbildung 6-21: Grundaufbau der Signalaufbereitung (Konzeptidee)**

#### 6.2.4.1 Endverstärkung - Messsignale

Damit das Quantisierungsrauschen bei der Digitalisierung kleiner Signalamplituden nur einen geringen Einfluss auf die Messgenauigkeit hat, werden die bereits vorverstärkten Sensorsignale an den Eingangsspannungsbereich des Analog-Digital-Umsetzers angepasst. Da Filterung und Verstärkung zusätzliches Rauschen sowie weitere Offsetgrößen verursachen, wird die Verstärkung prinzipiell vor der Filterung angeordnet (**Abbildung 6-21**). Die verwendete Datenerfassungskarte NI USB-6259 besitzt eine analoge Filterstufe mit zu hoher Grenzfrequenz. Daher musste in der praktischen Umsetzung vor der Endverstärkung die Bandbegrenzung zur Einhaltung des Abtasttheorems erfolgen (**Abbildung 6-20 A**). Die Dimensionierung der Endverstärkung erfolgt in Hinblick auf das größte interessierende Sensorsignal, um damit den zulässigen Dynamikbereich voll auszunutzen. Eine große Gefahr des Übersteuerns besteht bei zu hoher Verstärkung der Spannungsmesskanäle sofern je nach Elektrodentyp die gemessene Spannung  $U_{EL}$  einen zu hohen Wert annimmt. Eine rein wechsellspannungsmäßige Verstärkung würde zwar neben diesem *Offset*-Problem auch die Drift- und Rauschprobleme der Gleichspannungsverstärkung beheben, allerdings wäre es dann nicht möglich das Transmembranpotential zu bestimmen. Für den *Voltage-Clamp*-Kanal besteht ebenfalls die Gefahr des Übersteuerns, die vor allem im nicht-überwachten, automatisierten Betrieb durch Kontroll- und Steuermechanismen minimiert werden muss. In **Abbildung 6-18** wurde der resultierende Aussteuerbereich des *Voltage-Clamp*-Verstärkers in Abhängigkeit der Stromverstärkung dargestellt. Der Einsatz einer *Clipping*-Detektion an ausgewählten Stellen innerhalb des Signalweges zeigt Überschreitungen des zulässigen Aussteuerbereiches an, sodass bei programmierbaren Verstärkungen der Verstärkungsfaktor automatisch minimiert werden kann. Solche frei wählbaren Verstärkungen können diskret mit elektronischen oder mit elektromechanischen Schaltern oder auch durch Verwendung von programmierbaren Verstärkern (englisch: *Programmable Gain Amplifier*, PGA) geschaffen werden. Der *Voltage-Clamp*-Messkanal in **Abbildung 6-17**

enthält eine dreistufige Signalverstärkung mit mechanischen Schaltern (Reed-Relais). Innerhalb der verwendeten Datenerfassungskarte NI USB-6259 ist ebenfalls eine programmierbare Verstärkung integriert, die als Endverstärkung für die 14 Spannungsmesskanäle und den *Voltage-Clamp*-Messkanal dient [219]. Diese Verstärkung wird allerdings indirekt über die softwareseitige Festlegung des Eingangsspannungsbereiches bedient, der zwischen  $\pm 100$  mV und  $\pm 10$  V in sieben Stufen vorgegeben werden kann [219]. Als Standard für die 15 Messkanäle der *Headstage* wurde ein Eingangsspannungsbereich von  $\pm 2$  V gewählt. Der Wert der kleinsten Quantisierungsstufe beträgt damit  $U_{\text{LSB}} \approx 61$   $\mu\text{V}$  (16 bit). Bei Verwendung des EPC 9 *Patch-Clamp*-Verstärkers (HEKA) wird der Eingangsspannungsbereich automatisch auf  $\pm 10$  V ( $U_{\text{LSB}} \approx 305$   $\mu\text{V}$ ) erhöht. Inwieweit die Signalbandbreite ( $f_{-3\text{dB}} = 1,7$  MHz) der Datenerfassungskarte von dem resultierenden Verstärkungsfaktor beeinflusst wird, geht aus ihrem Datenblatt nicht hervor [217].

Zur Vermeidung von Stabilitätsproblemen bei kapazitiven Lasten wurden alle Messkanalausgänge der Signalerfassung mit einem zusätzlichen Treiberverstärker ( $V = 1$ ) versehen (**Abbildung 6-20 A**). Der für diese Aufgabe ausgewählte Operationsverstärker LT1351 (**Linear Technology Corp., Milpitas, Kalifornien, USA**) besitzt günstige *Offset*-, Bandbreite- sowie Rauschparameter und zeigt keine Instabilitäten bei beliebiger kapazitiver Last [220].

#### 6.2.4.2 Filter

Bei elektrophysiologischen Messungen führen große Bandbreiten zu einem starken Hintergrundrauschen und damit zu einem schlechten Signal-Rauschabstand, sodass das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen nur schwer erkannt wird. Sofern jedoch Ereignisse mit sehr kurzer Zeitdauer aufgezeichnet werden sollen, ist ein Kompromiss zwischen dem Rauschen und der benötigten oberen Bandbreite zu finden. Es besteht hierbei die Gefahr, dass schnelle Signale durch Filterung verfälscht werden. Numberger und Draguhn [59] berichteten, dass bei der Ganzzelleableitung die Tiefpassfilterung keinesfalls unter 10 kHz eingestellt werden sollte, da zur Bestimmung der Membrankapazität die schnellen kapazitiven Transienten benötigt werden (**Abbildung 4-4 B**). Die Notwendigkeit einer hohen oberen Bandbegrenzung betrifft bei *Patch-Clamp*-Ableitungen die Untersuchung von Einzelkanalströmen, von synaptischen Strömen sowie die schnell aktivierenden Ganzzellströme von Natriumkanälen und einigen Kaliumkanälen [59]. In **Tabelle 6-3** sind einige Literaturwerte zur benötigten Bandbreite bei

*Patch-Clamp*-Ableitungen zusammengefasst. Ausführliche Informationen zur Filterung bei *Patch-Clamp*-Anwendungen gaben bereits Sontheimer und Olsen [103], Colqhoun [221], Ogden [102] sowie Sherman-Gold [48].

Für die Filterung stehen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Zunächst soll daher zwischen analogen und digitalen Filtern unterschieden werden. Die analoge Filterung unterteilt sich in passive und aktive Filter. Bei der passiven Filterung werden Widerstände, Kondensatoren und Spulen wahlweise kombiniert. Aktive Filter sind stattdessen aus einem oder mehreren Operationsverstärkern aufgebaut und stellen daher keine besondere Last für die Signalquelle dar. Ihre Filtercharakteristik wird durch Kombination von Widerständen und Kondensatoren festgelegt. Zu den gebräuchlichsten Charakteristiken zählen: Chebyshev-, Bessel- und Butterworth-Filter. Im Vergleich zu Chebyshev- und Butterworth-Filtern weisen Bessel-Filter ein geringeres Überschwingen, geringe Signalverzerrungen und nur kleine Phasenverschiebungen auf. Diese Eigenschaften machen sie für Untersuchungen im Zeitbereich besonders interessant, weswegen sie in der *Patch-Clamp*-Technik bevorzugt zur Bandbegrenzung als Tiefpassfilter eingesetzt werden [48, 59]. Bessel-Filter vierter Ordnung sind gewöhnlich ausreichend, solange nicht hochfrequentes Rauschen die Verwendung von sechster oder achter Ordnung notwendig macht [48]. Im Gegensatz zu den analogen Filtern werden digitale Filter in die Software implementiert und beruhen auf mathematischen Berechnungen. Die digitale Signalaufbereitung kann bereits hardwareseitig in digitalen Signalprozessoren oder erst in der Systemsoftware auf dem Messrechner erfolgen. Mit Hilfe von digitalen Filtern können neben den passiven und aktiven Filtercharakteristiken viele weitere Filtertypen wie bspw. Gauß-Filter geschaffen werden. Gauß-Filter sind leicht zu implementieren und ähneln den Grundeigenschaften von Bessel-Filtern höherer Ordnung [48].

Die konzeptionelle Idee für das Messsystem besteht darin, dass unter Einhaltung des Abtasttheorems die Messsignale mit großer Bandbreite durch analoge Filterung aufgezeichnet werden, um sie anschließend digital aufzubereiten. Mit einer maximalen Abtastrate von ca. 30 kHz pro Messkanal seitens der zur Verfügung stehenden Datenerfassungskarte, wurde die obere Bandbegrenzung durch ein analoges Bessel-Filter 4. Ordnung auf 6 kHz gesetzt. Erfahrungsgemäß wird selbst bei der Verwendung von Filtern höherer Ordnung die Abtastrate in einem Abstand vom 5-fachen zur oberen Filtergrenzfrequenz gesetzt. Eine maximal nutzbare Bandbreite bis zur Hälfte der Abtast-

rate wäre nur bei einer idealen Filterwirkung mit sofortigem Übergang vom Durchlass- in den Sperrbereich möglich, die jedoch praktisch nicht zu realisieren ist. Die untere Bandbreite wurde nicht durch Hochpassfilterung begrenzt, da sonst alle Informationen (Transmembranpotential etc.) aus dem Gleichanteil der Messsignale verlorengehen würden.

Um den schaltungstechnischen Aufwand zu verringern, wurde von einem diskreten Filteraufbau abgesehen und der rauscharme Tiefpassfilter LTC1563-3 (Linear Technology) integriert. Seine variable Grenzfrequenz wird im Bereich von 256 Hz bis 256 kHz über mehrere Widerstände eingestellt [222]. Allerdings ist zu beachten, dass der aktuelle Ansatz im Labormuster nicht vorsieht, dass der Wert der Abtastrate flexibel durch den Benutzer verringert werden kann, da dann eine dynamische, programmgesteuerte Anpassung der Filtergrenzfrequenz seitens der analogen Elektronik vor der Digitalisierung erfolgen müsste. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass bei der Auswahl der Filterstufe die einfacher zu implementierenden Filter mit geschalteten Kondensatoren (englisch: *switched capacitor filter*) aufgrund ihres höheren Rauschens nicht berücksichtigt wurden.

Die Datenerfassungskarte NI USB-6259 besitzt eine zusätzliche analoge Filterstufe mit einer Grenzfrequenz von 1,7 MHz [217, 219]. Bei dem *Voltage-Clamp*-Kanal wird die resultierende Bandbreite zusätzlich durch die hohe Stromverstärkung und den Anteil der parasitären Parallelkapazitäten begrenzt (**Abbildung 6-17**).

Bei der Aufzeichnung biologischer Signale werden zusätzlich zur Tiefpassfilterung auch Notch-Filter verwendet, um die Netzfrequenz (50 Hz bzw. 60 Hz) aus dem Messsignal zu eliminieren. Allerdings verzerren diese Filter die Signalanteile in diesem Frequenzbereich stark. Das Labormuster besitzt daher keine Notch-Filter, sondern verwendet u. a. eine Stromversorgung mit sehr geringer Restwelligkeit (**6.4.3**) und ein abschirmendes Gehäuse (Faraday-Käfig).

#### 6.2.4.3 Zeitmultiplexbetrieb

Aufgrund der hohen Anzahl an Messkanälen kann durch Verwendung eines Zeitmultiplexbetriebes der schaltungstechnische Aufwand der Analog-Digital-Umsetzung auf ein Minimum reduziert werden. Nachteilig ist bei dieser Vorgehensweise, dass die notwendige Abtastrate des Analog-Digital-Umsetzers direkt proportional zur Anzahl der gemultiplexten Kanäle steigt. Des Weiteren führen die sequentielle Abtastung der

Kanäle sowie die benötigte Einschwingzeit des Multiplexers zu einem zeitlichen Versatz von Kanal zu Kanal, der je nach Abtastrate bei der Datenanalyse berücksichtigt werden muss. **Abbildung 6-21** zeigt den Einsatz eines Multiplexers direkt vor der Analog-Digital-Umsetzung und entspricht damit dem Funktionsprinzip des Labormusters unter Verwendung der Datenerfassungskarte NI USB-6259. Bei Mehrkanalmessungen beträgt die maximale Abtastrate des Analog-Digital-Umsetzers der NI USB-6259 1 MHz [217]. Die maximale Abtastrate pro Messkanal beträgt jedoch nur ca. 30 kHz und ist unabhängig von der Anzahl der tatsächlich genutzten Messkanäle. Die Steuerelektronik der Datenerfassungskarte NI USB-6259 schaltet ihren internen Multiplexer sequentiell durch alle 32 Messkanäle durch [219].

#### 6.2.4.4 *Clipping*-Detektion

Die *Clipping*-Detektion wird in der *Patch-Clamp*-Technik verwendet, um das Übersteuern der Verstärkerelektronik bei Messsignalen zu erkennen. Dies kann an ausgewählten Stellen im Signalpfad bis hin zum Analog-Digital-Umsetzer durch einfache Schwellwerterkennung (Schmitt-Trigger) erfolgen. Sofern bei der Analog-Digital-Umsetzung ein zulässiger Eingangsspannungsbereich definiert wurde, kann der Analog-Digital-Umsetzer auch zur Detektion verwendet werden. Im Falle eines Überschreitens der zulässigen Spannungspegel wird die Signalverstärkung ggf. reduziert. Je nach gewählter Zeitkonstante können transiente Überschreitungen bspw. nach einem Elektroporationspuls durch analoge oder digitale Filterung ausgeblendet und ignoriert werden. Im aktuellen Labormuster bedarf der *Voltage-Clamp*-Kanal aufgrund seiner hohen Stromverstärkung einer Kontrolle seiner Spannungspegel. Ohne Anschluss des EPC 9 Endverstärkers (HEKA) beschränkt sich die *Clipping*-Detektion auf die Kontrolle des Eingangsspannungsbereiches des Analog-Digital-Umsetzers. Aufgrund der gewählten Betriebsspannung von  $\pm 5\text{ V}$  ist der maximale Aussteuerbereich des OPA129UB in diesem Betriebsmodus auf  $\pm 2\text{ V}$  begrenzt (6.2.2). Mit Anschluss des EPC 9 (HEKA) an das Labormuster vergrößert sich durch Erhöhung der Betriebsspannung auch der Aussteuerbereich des *Voltage-Clamp*-Kanals und es steht zusätzlich die integrierte *Clipping*-Detektion des EPC 9 zur Verfügung. Die 14 Kanäle zur Spannungsmessung von  $U_{EL}$  werden jeweils über ihre Analog-Digital-Umsetzer überwacht.

#### 6.2.4.5 Signalanpassung – Analoge Steuersignale

Die Signalanpassung der analogen Steuersignale enthält die Aufbereitung der Steuerspannung für das *Voltage-Clamp* sowie die Signale für die Zellmanipulation nach ihrer Digital-Analog-Umsetzung. Erfahrungsgemäß beträgt die Amplitude eines typischen Testpulses bei *Voltage-Clamp*-Ableitungen maximal 10 mV (**Abbildung 4-3 B** und **Abbildung 4-5**). Konzeptionell wird der Dynamikbereich der Steuerspannung auf  $\pm 500$  mV eingeschränkt, damit noch eine ausreichend hohe Haltespannung des Pipettenpotentials zur Verfügung stehen kann. Die Steuerspannung des *Voltage-Clamp*-Kanals wird entweder über den optionalen EPC 9 *Patch-Clamp*-Verstärker (HEKA) oder von der Datenerfassungskarte bereitgestellt. Für die automatische Umschaltung dient ein analoger Multiplexer. Die Steuerspannung wird über einen zusätzlichen analogen Messkanal der Datenerfassungskarte überwacht. Die Signale für die Zellmanipulation können optional über einen externen Funktionsgenerator oder über die Datenerfassungskarte generiert werden. Im Gegensatz zur Steuerspannung erfolgt für die Zellmanipulation kein Umschalten der Signalquelle sondern eine schaltungstechnische Addition der beiden Signale. Dadurch ist es u. a. möglich das Signal des Funktionsgenerators dem Wert der aktuell gemessenen Spannung  $U_{EL}$  zu überlagern. Der Spannungsbereich der Datenerfassungskarte ist zwischen  $\pm 5$  V und  $\pm 10$  V wählbar [217]. Aufgrund der Betriebsspannung von  $\pm 5$  V wurde der Ausgangsspannungsbereich für Steuerspannung und Zellmanipulation auf  $\pm 5$  V ( $U_{LSB} \approx 153 \mu\text{V}$ ) festgelegt. Damit Rauscheffekte und Offsetgrößen minimal bleiben, wird der komplette Ausgangsspannungsbereich der Digital-Analog-Umsetzung verwendet. Eine anschließende Dämpfungschaltung kann verwendet werden, um die Signale an den maximal zulässigen Arbeitsbereich anzupassen [48]. Innerhalb der Headstage werden die Signale jedoch nur verteilt (Verstärkung = 1).

#### 6.2.5 Digitalisierung der Messsignale

Biologische Signale werden überwiegend im Zeitbereich untersucht, da zumeist ihre Zeitabhängigkeit überprüft werden soll. Als Beispiel ist hier die Charakterisierung von Membranreaktionen mittels *Voltage-Clamp* zu nennen. Für die Datenspeicherung im Zeitbereich müssen allerdings ausreichend viele Datenpunkte aufgezeichnet werden. Dazu ist zunächst die interessierende Bandbreite u. a. durch Untersuchung der spektralen Leistungsdichte der Signale festzulegen, damit keine Informationen verloren



gehen. In **6.2.4.2** wurde die Verwendung von Filtern höherer Ordnung zur Bandbegrenzung beschrieben. Zur Einhaltung des Abtasttheorems wird die Abtastrate erfahrungsgemäß auf das 5-fache der oberen Filtergrenzfrequenz gesetzt. Die Abtastrate der APC-Systeme liegt zwischen 5 kHz und 50 kHz mit einer durchschnittlichen Abtastrate von ca. 20 kHz (**Anhang A2**). Die Forderung von Numberger und Draguhn [34] nach einer Bandbreite von mindestens 10 kHz führt zu einer notwendigen Abtastrate von 50 kHz. In **Tabelle 6-3** sind einige Literatur- und Produktangaben zu verschiedenen *Patch-Clamp*-Systemen aufgeführt, die als zusätzlicher Anhaltspunkt für das Systemkonzept dienen. Wie in Tautorat *et al.* [16] beschrieben, wurde die Abtastrate anfänglich auf nur 15 kHz festgelegt. Durch den Wechsel auf eine leistungsfähigere Datenerfassungskarte konnte die Abtastrate auf 30 kHz erhöht werden. Die maximale Abtastrate beträgt derzeit 31,25 kHz pro Messkanal [217]. Aufgrund der erhöhten Abtastrate wurde die obere Bandbreite von 3 kHz auf 6 kHz erhöht. Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass der aktuelle technische Stand des Labormusters vorrangig für die Überwachung von Spannungsänderungen an den Nadelelektroden konzipiert wurde, um die Zellöffnung mittels Elektroporation zu erproben. Selbst für die Untersuchung von elektrisch aktiven Zellen ist die Bandbreite von 3 kHz bzw. 6 kHz noch ausreichend.

**Tabelle 6-3: Digitalisierung von *Patch-Clamp*-Daten**

Referenz	Abtastrate in kHz	Auflösung	obere Grenzfrequenz in kHz	Filtertyp
Tecella [117]	20/40	16 bit	wählbar	analog und digital
Sigworth und Neher [90]	-	-	7	-
Kreir <i>et al.</i> [223]	50	-	3/10	Bessel
Sordel <i>et al.</i> [95]	20	-	2	-
Sophion [224]	500	16 bit	20	-
Ionescu-Zanetti <i>et al.</i> [225]	5	-	2	Bessel

### 6.2.6 Systemsteuerung

Die Verwendung einer multifunktionalen Datenerfassungskarte in Kombination mit einer Systemdesignsoftware wie LabVIEW bietet einfache und flexible Möglichkeiten ein Sensorsystem mit reduziertem Zeit- und Entwicklungsaufwand umzusetzen. Dieser konzeptionelle Ansatz reduziert den hard- und softwareseitigen Arbeitsaufwand, da fertige Funktionen und Werkzeuge bereits zur Verfügung stehen. Es gibt eine große Auswahl an Multifunktions-Datenerfassungskarten für verschiedenste Anwendungen. Bei der Auswahl müssen daher notwendige und zulässige Parameter (Abtastrate,

Auflösung, Anzahl der Kanäle etc.) bezüglich der analogen Mess- und Ausgabekanäle sowie für die digitalen Steuersignale berücksichtigt werden. Aufgrund der sequentiellen Kontaktierung aller Nadelelektroden in vier Arbeitsschritten durch 90°-Chipdrehung erfolgte eine Beschränkung auf nur 15 Messkanäle. Die anfänglich verwendete Datenerfassungskarte NI PCI-6221 (National Instruments) mit 16 Messkanälen wurde später durch die leistungsstärkere, pinkompatible NI USB-6259 ersetzt [15]. Detaillierte Informationen zur NI USB-6259 stehen anhand ihrer Datenblätter zur Verfügung [217, 219]. Neben der erhöhten Anzahl an Messkanälen (32 statt 16) bietet die NI USB-6259 u. a. eine gesteigerte Abtastrate, eine erhöhte Anzahl an digitalen Ein- und Ausgängen und unterstützt durch den Anschluss über USB (*Universal Serial Bus*) das Konzept eines einfachen, modularen Systemaufbaus.

Die Systemsteuerung erfüllt folgende Grundfunktionen (Auswahl):

- Digitalisierung analoger Messsignale:
  - 14× Spannungsmessung ( $U_{EL}$ ) an der Nadelelektrode
  - 1× Ausgang des Strom-Spannungswandlers (*Voltage-Clamp*-Kanal)
  - 1× Steuerspannung (*Voltage-Clamp*-Kanal)
- Generierung analoger Ausgangssignale:
  - Steuerspannung des *Voltage-Clamp*-Kanals
  - Zellmanipulation (für alle Kanäle)
- digitale Steuersignale:
  - Ein- und Ausschalten der Verstärker für die Zellmanipulation (*Tri-State* Funktion)
  - Ein- und Ausschalten der Betriebsspannung
  - Kontrolle der Betriebsspannung (Warnung bei Ausfall)
  - *Trigger*-Signal für externen Funktionsgenerator (Zellmanipulation)
  - Anschlusskontrolle EPC 9 (HEKA)
  - Umschaltung Steuerspannung (EPC 9 oder intern)
- digitales Bus-System für 3×8 Relais-Treiber:
  - Stromverstärkung des *Voltage-Clamp*-Kanals
  - Substrat-Anschluss (Anwendung: 90°-Chipdrehung)
  - Zuschalten der Zellmanipulation
- Komplexe Steueralgorithmen:
  - Chip-Positionserkennung (Anwendung: 90°-Chipdrehung)
  - Sequenz der Zellmanipulation (hardwaregesteuert)
  - *Offset*-Kompensation (optional)

## 6.3 Systemsoftware

Die Systemsoftware dient der Überwachung und dem Zugriff des Benutzers in den Programmablauf des Messsystems. Mit dessen Hilfe erfolgt die komplexe Systemsteuerung, Datenaufzeichnung, Datenspeicherung bis hin zum Informationsgewinn durch Datenanalyse und -auswertung. Dafür steht dem Anwender eine graphische Benutzeroberfläche zur Verfügung (**Abbildung 6-24**). Die Anzeige der aktuellen Messwerte erfolgt je nach gewählter Zeitskala für einen bestimmten Zeitraum quasi in Echtzeit. Da aber viele elektrophysiologische Ereignisse für das menschliche Auge zu schnell ablaufen, waren geeignete Funktionalitäten (Schwellwerterkennung etc.) vorzusehen, die eine graphische Messwertdarstellung ermöglichen. Die Datenauswertung erfolgt derzeit *offline* mit zusätzlichen Programmen wie SigmaPlot (**Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA**) oder dem Offline Sorter (**Plexon Inc., Dallas, Texas, USA**). Die Programmierung von Prozesssteuerung und Datenverarbeitung basiert auf der graphischen Systemdesignsoftware LabVIEW (**National Instruments Corp., Austin, Texas, USA**).

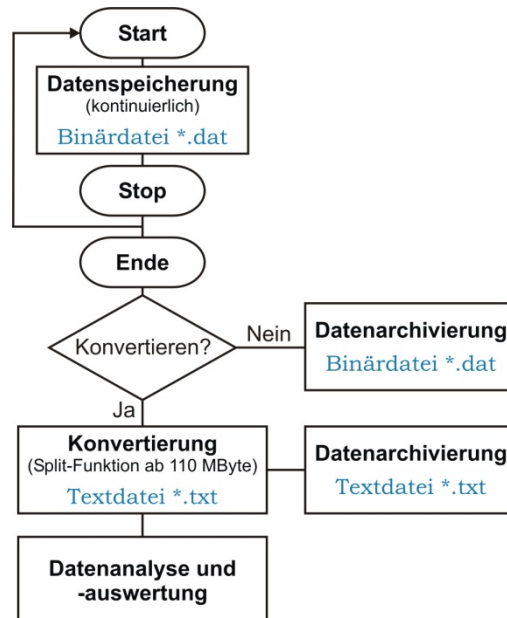
Die Systemsoftware erfüllt folgende Grundfunktionen (Auswahl):

- Systemsteuerung:
  - Start/Stop der Messung
  - Start/Stop der Datenspeicherung
  - Auswahl Nadelelektrode für Zellmanipulation
  - Auslösen der Zellmanipulation
- Anzeigeelemente:
  - Mehrkanalanzeige (jeder Messkanal besitzt eine Anzeige)
  - Oszilloskop-Funktion (automatische Skalierung, Cursor etc.)
- Parameterfestlegung:
  - Zellmanipulation (Pulsparameter)
  - Steuerspannung für *Voltage-Clamp*-Kanal
  - Zeitskala für Messwertdarstellung
- kontinuierliche Datenspeicherung (ressourcenschonend als Binärdatei \*.dat)
- Datenkonvertierung (Wandlung \*.dat in \*.txt)

### 6.3.1 Auswertung der Sensorsignale

Die Speicherung von Messdaten erfolgt mit der Systemsoftware ressourcenschonend als Binärdatei (\*.dat) mit eigener Dateistruktur. Diese Binärdateien können allerdings nicht

direkt in Analyseprogramme importiert werden, sondern müssen zunächst in lesbare Textdateien (\*.txt) mit tabellarischer Struktur konvertiert werden. Dieser Arbeitsschritt ist in **Abbildung 6-22** anhand eines vereinfachten Programmablaufplanes dargestellt.

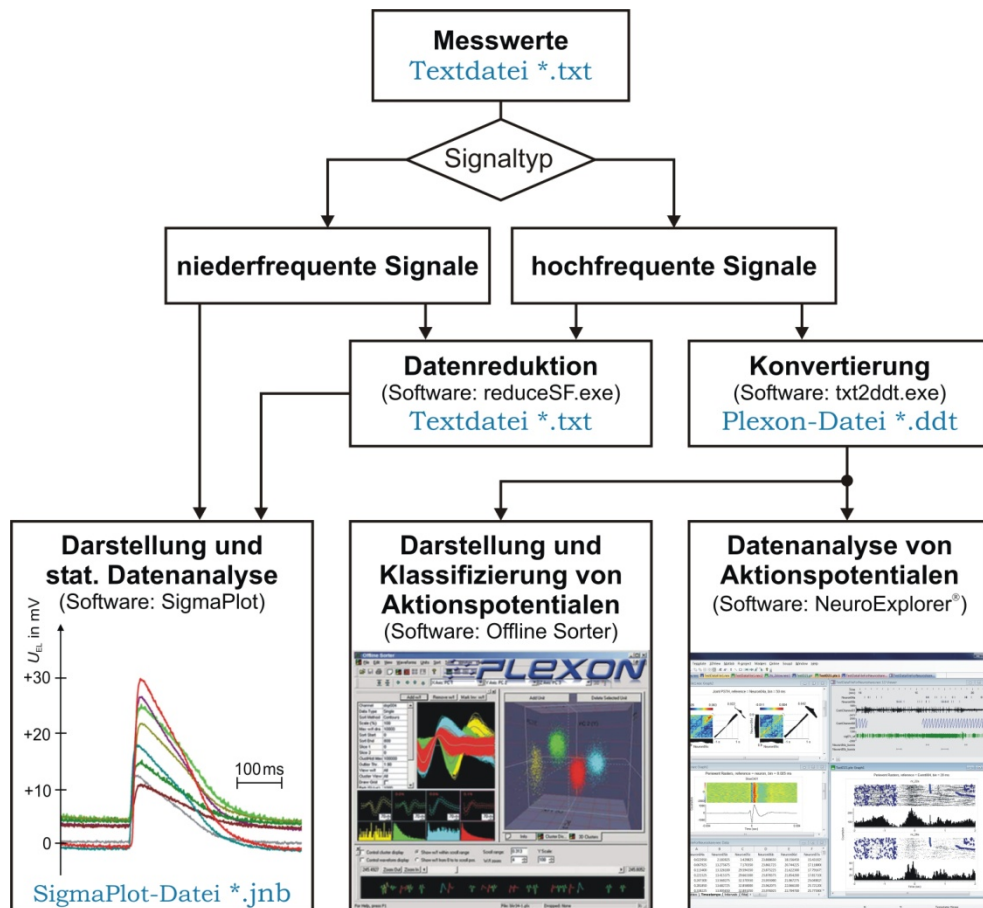


**Abbildung 6-22: Datenkonvertierung in Textdatei**

Stark vereinfachte Darstellung des Programmablaufs. Die kontinuierliche Datenspeicherung kann während des Programmablaufs beliebig gestartet und gestoppt werden. Nach Beendigung der Systemsoftware wird der Benutzer automatisch aufgefordert zu entscheiden, ob eine Konvertierung seiner aufgezeichneten Messdaten (Binärformat) in tabellarisch strukturierten Textdateien erfolgen soll. Durch Auswahl einer Datei (Beispiel: *dateiname.dat*) erfolgt die Konvertierung. Der Dateiname bleibt mit der neuen Endung \*.txt bestehen: *dateiname.txt*. Sofern die Textdatei die Größe von ca. 110 MByte überschreitet, erfolgt eine Auftrennung (Split-Funktion) der Datei in mehrere Teile. Erfahrungsgemäß können Textdateien oberhalb 110 MByte nicht mehr weiterverarbeitet werden. Für eine fehlerfreie, zeitliche Zusammensetzung der Messdaten erhalten die Dateinamen ein zusätzliches Kürzel: *dateiname\_part1.txt*, *dateiname\_part2.txt* etc. Die Nachfrage nach weiteren Konvertierungen wird so lange wiederholt bis der Benutzer den Dialog abbricht. Die konvertierten Messdaten stehen dann zur Datenanalyse und Datenauswertung bereit.

Für die Darstellung, Analyse und statistische Auswertung der Messdaten wurden bisher die in **Abbildung 6-23** gezeigten Programme verwendet. Für die effektive Verarbeitung der Messdaten (Textdatei) stehen zwei Hilfsprogramme zur Verfügung. Das Programm *reduceSF.exe* dient der nachträglichen Verringerung der Abtastrate. Es wurde von Dipl.-Ing. S. Unger (**Universität Rostock**) im Rahmen seiner Tätigkeit als studentische Hilfskraft erstellt. Mit diesem Programm ist es bspw. möglich, eine Langzeitmessung mit stark verringerter Datenmenge auszuwerten. Für die Verarbeitung von Signalen elektrisch aktiver Zellen werden die Programme Offline Sorter sowie der NeuroExplorer (**NEX Technologies, Littleton, Massachusetts, USA**) verwendet. Dafür werden die Messdaten zunächst mit dem Hilfsprogramm *txt2ddt.exe* in ein Plexon-Dateiformat (\*.ddt) für kontinuierliche Messdaten konvertiert. Dieses Programm wurde von Dr.-Ing. G. Bausch

(Universität Rostock) erstellt. Mit SigmaPlot wurden überwiegend die Effekte der Elektroporation anhand von Änderungen der Spannung  $U_{EL}$  nachträglich dargestellt und dokumentiert.



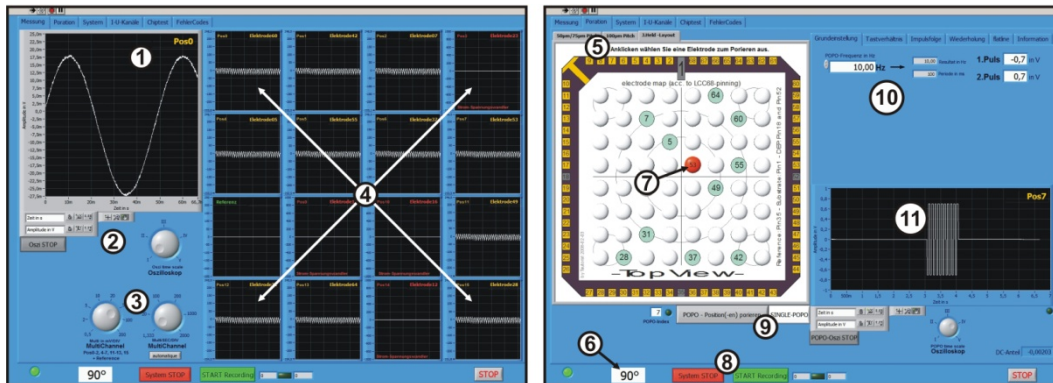
**Abbildung 6-23: Datenanalyse und -auswertung**

Vor der Datenanalyse und -auswertung erfolgt durch den Benutzer eine Sortierung der Messwerte in Hinblick auf die interessierenden Signalanteile. **Hochfrequente Signale:** Bei der extrazellulären Ableitung von elektrisch aktiven Zellen interessiert vor allem die Auswertung mit Programmen der Neurophysiologie. **Niederfrequente Signale:** Überwiegend Betrachtung der Elektroporationseffekte sowie Langzeitmessungen. **Datenreduktion:** Das Ergebnis ist eine Textdatei mit gleicher Struktur wie die Originaldatei. Der Dateiname wird mit dem Hinweis auf die Datenreduzierung geändert. **Konvertierung:** Das Konvertierungsergebnis ist eine Plexon-Datei \*.ddt mit eigener Datenstruktur. **Beispiele:** Das Beispiel der graphischen Benutzeroberfläche für die Darstellung und Klassifizierung von Aktionspotentialen mit der Software Offline Sorter (**Plexon Inc., Dallas, Texas, USA**) ist eine umgezeichnete Abbildung von [www.plexon.com](http://www.plexon.com) (Abruf 21.09.2012). Das Beispiel für die Datenanalyse von Aktionspotentialen mit der Software NeuroExplorer (**NEX Technologies, Littleton, Massachusetts, USA**) ist eine umgezeichnete Abbildung von [www.neuroexplorer.com](http://www.neuroexplorer.com) (Abruf 04.06.2013).

Sofern zusätzliche Messdaten aus *Patch-Clamp*-Ableitungen nach Umsetzung der Konzeptidee (**Abbildung 6-1**) in die Signalverarbeitung einfließen, wird es aufgrund der größeren Menge an generierten Daten notwendig sein die Rohdaten bereits *online* in elektrophysiologisch bzw. pharmakologisch relevante Werte umzuwandeln. Der bisherige manuelle Ansatz wäre dafür ungeeignet.

### 6.3.2 Graphische Benutzeroberfläche

In **Abbildung 6-24** sind zwei Benutzeroberflächen der Systemsoftware dargestellt, die es dem Benutzer erlauben das gesamte Messsystem zu überwachen und zu steuern. Alle Informationen und Eingabefelder des Programmfensters wurden thematisch aufgeteilt und mit Hilfe von Registerkarten auf mehreren, hintereinander liegenden Dialogfeldern angeordnet. Auf eine detaillierte Beschreibung der Softwarebedienung wird an dieser Stelle verzichtet.



**Abbildung 6-24: Graphische Benutzeroberfläche**

Programmfenster der graphischen Benutzeroberfläche während einer Messung. Zum Start/Beenden einer Messung wird der linke Umschalter (8) verwendet. Zum Start/Beenden der Datenspeicherung wird der rechte Umschalter (9) verwendet. Über eine Oszilloskop-Funktion (1) kann ein beliebiger Kanal durch Anklicken eines der 16 Fenster in der Mehrkanalanzeige (4) ausgewählt und untersucht werden. Typische Oszilloskop-Funktionen, wie automatische Skalierungen, Zeitachse etc. werden über die Bedienelemente des Oszilloskops (2) und die Mehrkanalanzeige (3) vorgegeben. Die Auswahl des gültigen Chip-Layouts erfolgt über Registerkarten (5). Die aktuell angeschlossenen Nadelelektroden werden durch automatische Chip-Positionserkennung (6) im 8x8 MPJA eingeblendet. Die dargestellte Chip-Position beträgt 90° ausgehend von einer definierten 0°-Position und einer Drehrichtung im Uhrzeigersinn. Für die LOMINE wird entweder nur eine Elektrode (7) durch Anklicken ausgewählt oder es wird der rechte Umschalter (9) auf Multi-Elektroporation umgeschaltet. Bei Multi-Elektroporation werden alle aktuell angeschlossenen Nadelelektroden sequentiell durchgeschaltet und mit dem Elektroporationssignal beaufschlagt. Die jeweils aktuelle Elektrode wird rot eingefärbt und im zweiten Oszilloskop-Fenster (11) dargestellt. Die Parameter der Elektroporation werden über Bedienelemente (10) vorgegeben. Die Elektroporationssequenz wird durch Betätigen der rechten Taste (9) gestartet.

### 6.3.3 Hilfswerkzeug für die Software-Erstellung

In Tautorat *et al.* [14] wurde eine sog. Programmierplatine beschrieben, die als Hilfswerkzeug für die Erstellung und Verifikation der Systemsoftware diene. Mit ihr sind alle Steuer- und Datensignale sowie alle analogen Ein- und Ausgänge über Steckkontakte mit externen Messgeräten oder Signalgeneratoren kontaktierbar. Abgesehen vom fehlenden Sensorchip und der vereinfachten, analogen Signalaufbereitung sind der Aufbau und die Funktionsweise von Programmierplatine und Messsystem nahezu identisch.

## 6.4 Peripherie

### 6.4.1 Badelektrode

Die Badelektrode in **Abbildung 6-2** steht in der Messkammer in direktem Kontakt mit der Elektrolytlösung und dient, abgesehen von der DEP-Zellpositionierung, als Gegenelektrode im Messsystem. An der Grenzfläche zwischen Elektrolyt und dem Metall der Elektrode treten jedoch Grenzflächenpotentiale auf. Durch Verwendung von chlorierten Silberdrähten (Ag/AgCl-Elektrode) als Badelektrode sowie in der *Patch*-Pipette werden diese Grenzflächenphänomene, die sich als *Offset*-Spannungen (elektrochemisch: Überspannungen; englisch: *over potentials*) zeigen, stabilisiert und nahezu konstant gehalten [89]. Die Stabilität der resultierenden *Offset*-Spannungen begünstigt ihre Kompensation während der Messung (**4.1.5.3**). Behrends und Fertig [126] beschrieben ebenfalls den Einsatz von einfachen Ag/AgCl-Drähten im Port-a-Patch® als Bad- und Messelektroden (**Anhang A12**). Das Größenverhältnis der aktiven Elektrodenbereiche, bspw. einer Nadel- elektrode vom Typ A ( $A \approx 1,1 \mu\text{m}^2$ ) zur Badelektrode ( $A \approx 0,27 \text{cm}^2$ ), beträgt ca. 1:25 Millionen.

Für die Handhabung der Badelektrode ist zu beachten, dass sie vor jeder Benutzung auf Beschädigungen der Silberchloridschicht untersucht wird. Standardmäßig wird sie einmal im Monat neu chloriert oder sogar komplett ersetzt. In verschiedenen Literaturquellen wurde dringend auf eine lichtgeschützte Lagerung hingewiesen. Silberchlorid ist photochemisch empfindlich und wird bei UV-Licht unter Abgabe von Silber zersetzt. Für die Lagerung der Badelektrode in Flüssigkeiten gibt es in der Literatur unterschiedliche Empfehlungen. Teilweise wird Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder sogar ausschließlich destilliertes Wasser empfohlen [59, 226, 227]. In **Anhang A28** ist ein optimiertes Protokoll für das elektrochemische Chlorieren von Silberdrähten zur Herstellung von Bad- und Messelektroden aufgeführt, das durch Literaturrecherche und eigene Experimente aufgestellt wurde.

### 6.4.2 Temperierung

Zur Aufrechterhaltung der physiologisch relevanten Temperaturen im Bereich von 35 °C bis 37 °C ist eine stabile Temperierung der Zellkultur auch während der Messung vorzunehmen. Nach **Gleichung 3-2** ist das Transmembranpotential direkt von der Temperatur abhängig. *Patch-Clamp*-Versuche bei Raumtemperatur im Vergleich zu 35 °C zeigten,



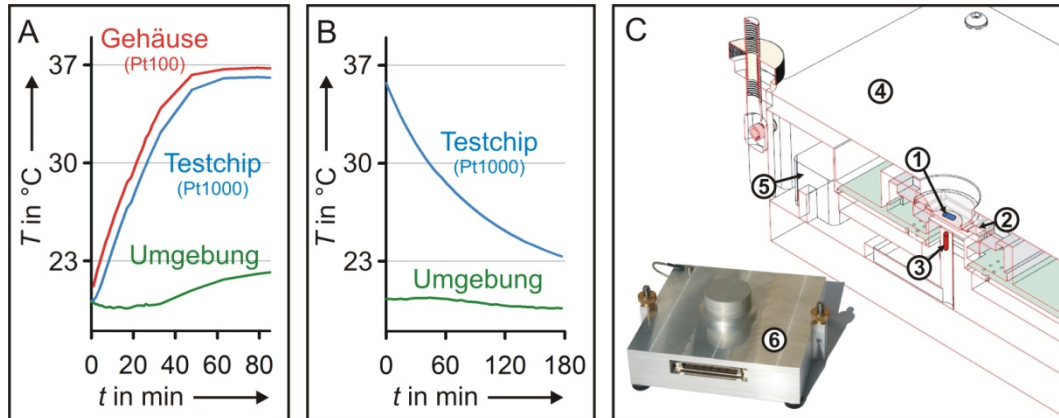
dass die Temperatur einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität der Zellen sowie auf die Wirkung von Substanzen hat [114, 228-230]. Guthrie *et al.* [231] arbeiteten bei 37 °C. Kirsch *et al.* [232] zeigten den deutlichen Einfluss der Temperatur auf die Pharmakologie von hERG-Kanälen. Versuche zur Beurteilung von Substanzwirkungen sind demnach bei physiologischen Temperaturen durchzuführen. Die Temperierung kann in einem Wärmeschrank oder durch Integration von Temperier-Elementen in das Messsystem erfolgen. Für Untersuchungen von Temperaturabhängigkeiten ist der Soll-Wert der Temperatur in der Messkammer flexibel einstellbar zu halten. Für die Beschreibung des Einsatzortes des Messsystems werden einfache Laborbedingungen mit einer Raumtemperatur von durchschnittlich 25 °C angenommen.

Neben der Zellkultur unterliegt auch die Messelektronik einer starken Temperaturabhängigkeit. So nehmen u. a. *Offset*-, Rausch- und Driftgrößen bei Operationsverstärkern sowie das thermische Rauschen von Widerständen mit steigender Temperatur zu. Der Eingangsruhestrom des Operationsverstärkers OPA129UB in der Signalerfassung verdoppelt sich bspw. alle 10 °C [214]. Für den Bereich der Elektronik sind daher erhöhte Temperaturen und vor allem Temperaturschwankungen zu vermeiden. Dies kann durch konstruktive Maßnahmen erfolgen, indem die Temperierung der Messkammer thermisch von der Elektronik getrennt ist. Die Verwendung eines Wärmeschrankes wurde für das Gerätekonzept ausgeschlossen. Für die Temperierung wurde stattdessen eine bewährte Geräteeigenentwicklung mit eingebautem Temperatur- und Prozessregler CN8200 (**Newport Electronics Inc., Santa Ana, Kalifornien, USA**) verwendet. Der CN8200 verfügt über verschiedene Regelalgorithmen, deren Parameter automatisch durch eine Selbstoptimierung eingestellt werden. Zur Überwachung des Regelkreises dient ein Pt100 als Temperatursensor (**Abbildung 6-25 C**). Als Heizelement wurden Hochlastwiderstände im Gehäuse der *Headstage* integriert. Eine Kühlung der Messkammer erfolgt somit ausschließlich passiv, weshalb die minimale Messtemperatur gleich der Raumtemperatur ist. Der zeitliche Verlauf der passiven Abkühlung des Systems ist in **Abbildung 6-25 B** dargestellt. Ein Anwendungsbeispiel für zusätzliche aktive Kühlung nennen Sigworth und Neher [90], die ihre Zellen kühl hielten, um deren Kanalaktivität zu verlangsamen.

In **Abbildung 6-25** und **Abbildung 6-26** sind der Versuchsaufbau sowie Ergebnisse von Temperierungsuntersuchungen dargestellt. **Abbildung 6-25 A** gibt Aufschluss über die Aufwärmzeit des Systems bis zum Erreichen des Sollwertes von 37 °C.



Die Wärmekapazität des Aluminiumgehäuses veranschaulicht **Abbildung 6-25 B**. Abgesehen von der langen Aufwärmzeit ( $t \approx 1$  h), ist die hohe Wärmekapazität vorteilhaft bei Schwankungen der Umgebungstemperatur oder bei kurzzeitigem Stromausfall.

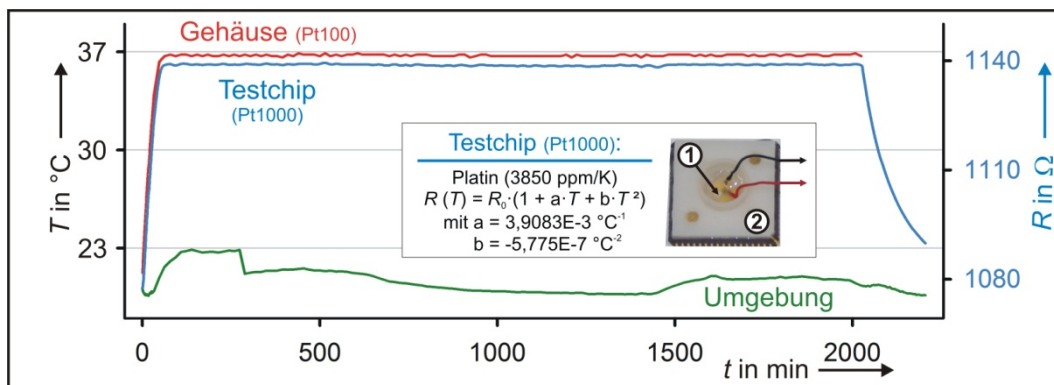


**Abbildung 6-25: Temperaturierung des Messsystems**

Funktionstest und Aufbau der integrierten Temperaturierung im Labormuster. **A, B:** Vergleichende Darstellung der Temperaturen auf der Sensoroberfläche (Pt1000), im Gehäuse (Pt100) und der Raumtemperatur (Umgebung). Ein Pt100 (roter Kurvenverlauf) ist in das Messsystem integriert und extern mit dem Temperatur- und Prozessregler CN8200 (**Newport Electronics Inc., Santa Ana, Kalifornien, USA**) über eine 3-Draht-Messung verbunden. Die Ist-Wert Anzeige ( $Offset = 0$  °C) des CN8200 zeigt den mit dem Pt100 ermittelten Temperaturwert (rote Kurve). Der Pt100 liegt in der Genauigkeitsklasse 1/3 B nach DIN 60751 [233]. Als Algorithmus wurde eine PID-Regelung verwendet, deren Parameter über eine automatische Selbstoptimierung eingestellt wurden. Temperaturbestimmung (blaue Kurve) des Pt1000 durch 4-Draht-widerstandsmessung mit einem 2001 Multimeter (**Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio, USA**). Der Pt1000 liegt in der Genauigkeitsklasse A nach DIN 60751 [234]. Überwachung der Umgebungstemperatur (grün) in ca. 10 cm Entfernung seitlich des Messsystems mit einem PicoSens (Opsens). **A:** Aufwärmphase des Systems. Die Aufwärmzeit beträgt ca. eine Stunde. Solltemperatur: 37 °C. **B:** Abkühlphase nach Ausschalten der Temperaturierung. Für eine bessere Lesbarkeit wurde die Zeit auf  $t = 0$  zurückgesetzt. Die Temperatur des Pt100 wurde nicht gemessen. **C:** Illustration eines Querschnitts durch das Labormuster des Messsystems. Isometrische Darstellung. Testchip (2) mit eingeklebtem Pt1000 (1, blau). Pt100 (3, rot) und in das Gehäuse (4) des Messsystems integrierte Hochlastwiderstände (5). Pt100 und Pt1000 sind vereinfacht als Zylinder dargestellt. Links unten: Foto der Headstage (6) des Labormusters.

Die Funktionsfähigkeit der integrierten Temperaturierung wurde mit zwei Langzeittests ( $t > 36$  h) überprüft und die Stabilität der Regelung bestätigt. **Abbildung 6-26** zeigt das Ergebnis eines dieser beiden Tests. Die Kurvenverläufe in **Abbildung 6-26** zeigen eine konstante Abweichung zwischen dem Sollwert (37 °C) und den ermittelten Werten des Pt100 ( $\Delta T \approx -0,3$  °C  $\pm 0,2$  °C) sowie des Pt1000 ( $\Delta T \approx -1,3$  °C  $\pm 0,2$  °C) nach Ablauf der Aufwärmphase. Die Differenz des Pt1000 wird vor allem durch die räumliche Temperaturverteilung im Messsystem hervorgerufen. Durch *Offset*-Kompensation am Temperatur- und Prozessregler CN8200 wurde die Temperaturierung um diesen Wert erhöht. Die Differenz des Pt100 zum Sollwert ist minimal. Allerdings kann diese Abweichung nicht mit einer Messungenauigkeit oder einer fehlenden *Offset*-Kompensation begründet werden, da der Wert des Pt100 direkt Einfluss auf den PID-Regelkreis nimmt. Inwieweit

die Selbstoptimierung des CN8200 zu einer bleibenden Regelabweichung führte, konnte nicht geklärt werden.



**Abbildung 6-26: Langzeittemperierung**

Temperaturverhalten des Messsystems im Langzeittest ( $t > 36$  h). Messaufbau wie in **Abbildung 6-25**. Solltemperatur: 37  $^{\circ}\text{C}$  ( $0 \leq t \leq 2025$  min). Skalierung der rechten y-Achse ( $R$  in  $\Omega$ ) wurde für den resultierenden Temperaturwert des Pt1000 an die linke y-Achse ( $T$  in  $^{\circ}\text{C}$ ) angepasst. Der Kurvenverlauf des Pt1000 stellt somit gleichzeitig den gemessenen Widerstandswert sowie die aus ihm ermittelte Temperatur dar. **Mitte:** Aufbau des Testchips für Temperaturüberwachungen im Labormuster. Berechnung der Ist-Temperatur des Pt1000 [234]. Bild des Testchips (2). Pt1000 (1) eingebettet in einen 68-CLCC (Kyocera) Chip-Träger mit aufgesetztem Trog und kurzem Messkabel (5 cm). Der Pt1000 ist zur Nachahmung des Sensorchips zusätzlich auf ein Deckgläschen ( $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ) geklebt.

### 6.4.3 Stromversorgung

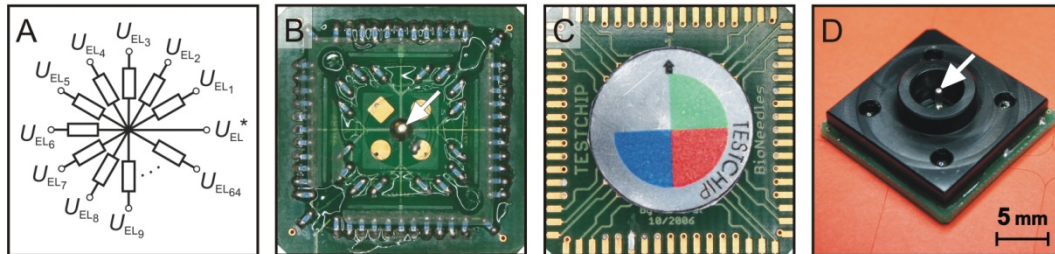
Das Netzgerät des Messsystems in **Abbildung 6-2** stellt eine  $\pm 5$  V Betriebsspannung zur Verfügung, die bis 1 A belastbar ist. Die Besonderheit des Netzgerätes besteht in der geringen Restwelligkeit, sodass auf die Verwendung von *Notch*-Filtern verzichtet werden kann (**6.2.4.2**). Die Konzeption des Netzgerätes geht auf ein Vorprojekt zur extrazellulären Ableitung von elektrisch aktiven Zellen am Lehrstuhl für Biophysik zurück.

Sofern der optionale *Patch-Clamp*-Verstärker EPC 9 (HEKA) verwendet wird, wird der *Voltage-Clamp*-Messkanal exklusiv mit der  $\pm 15$  V Betriebsspannung des EPC 9 versorgt.

### 6.4.4 Testchip

Der Testchip dient dem Test der Systemelektronik. Sein Gebrauch ermöglicht die definierte Einspeisung von Testsignalen mit einem externen Funktionsgenerator sowie dem Test der Chip-Positionserkennung in **6.4.5**. Des Weiteren wird der Testchip für eine einfache *Offset*-Kompensation der Messkanäle nach dem Systemstart verwendet. Der Testchip entspricht konstruktiv dem Sensorchip mit Verkapselungsteil (**Abbildung 6-27 B-C**). Allerdings besitzt der Testchip anstelle der  $8 \times 8$  Elektroden ein definiertes

Widerstandsnetzwerk, das jede der 64 Elektroden durch einen Widerstand ( $R = 1 \text{ M}\Omega$ , 1 %) darstellt. Die Elektrodenzuordnung und Anschlussbelegung des Testchips entspricht **Anhang A19**. **Abbildung 6-27 A** zeigt den schematischen Aufbau des Testchips.



**Abbildung 6-27: Testchip**

**A:** Sternförmiges Widerstandsnetzwerk für eine definierte hochohmige Signaleinkopplung auf jeden Elektrodenmesskanal. **B:** Bestückter Testchip im 68-CLCC-Format ohne Verkapselungsteil. **B, D:** In der Mitte befindet sich ein Anschluss zur Einspeisung von Testsignalen (weißer Pfeil). **C:** Unterseite des Testchips mit einem Etikett für die optische Chip-Positionserkennung (6.4.5). **D:** Testchip mit Verkapselungsteil.

### 6.4.5 Chip-Positionserkennung

Die sequentielle Kontaktierung der Nadelelektroden durch 90°-Chipdrehung im Chip-Sockel vereinfachte den Aufbau des Labormusters stark. Aufgrund der Chipdrehung war es jedoch notwendig, eine eindeutige Elektrodenzuordnung zu definieren (**Anhang A19**). Die aktuelle Position des Chips wurde ausgehend von einer Standard-Position (0°: Pin 1 im Chip-Sockel an Pin 1 des Sensorchips) in Uhrzeigerrichtung mit 0°, 90°, 180° und 270° bezeichnet (**Anhang A22**). Seitens der Systemsteuerung musste je nach Chip-Winkel der Anschluss für das Substrat (Chiptyp A-C) sowie der Anschluss der internen Referenzelektroden rotieren. Die dafür notwendigen systemintegrierten Schalter öffnen und schließen die Signalwege anhand der Chip-Position. Die Anschlüsse der DEP-Elektroden bleiben im Messsystem stets unbeschaltet. Anfänglich wurde die Position manuell über die Bedienoberfläche der Software eingegeben. Bei der Speicherung der Messdaten wird die Chip-Position in der Kopfzeile der Datei abgespeichert. Zusätzlich enthält der von der Systemsoftware vorgeschlagene Dateiname neben dem aktuellen Datum mit Uhrzeit auch eine Angabe zur Position. Für die nachträgliche Datenauswertung und -analyse, bspw. anhand von REM-Aufnahmen einzelner Elektroden mit überlagerten Zellen, ist diese Vorgehensweise essentiell. Allerdings zeigte sich, dass die Handhabung nicht anwenderfreundlich und seitens des Benutzers stark fehlerbehaftet war. Die Einführung einer automatisierten Erkennung löste dieses Problem und ermöglicht sogar das Ausschalten des Messsystems sofern der Chip plötzlich entnommen wird. Diese Eigen-

schaft dient dem Schutz der empfindlichen Elektronik der Signalerfassung, die eingangsseitig keine Schutzfunktionen enthält.

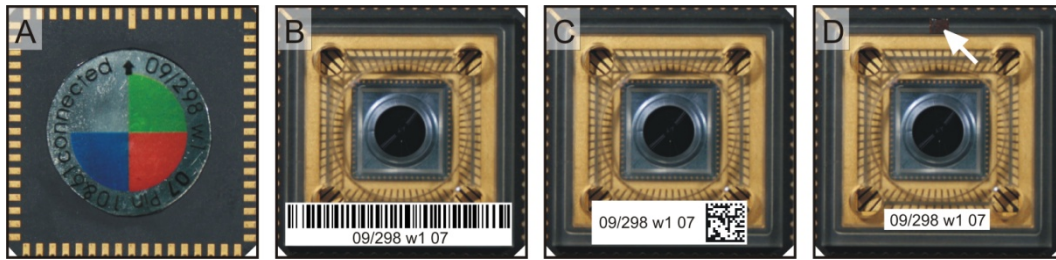
Für die Konzeption der Positionserkennung ist zu erwähnen, dass anfänglich keine Änderungen am Chip-Layout vorgenommen werden konnten. Eine platzsparende Integration der Erkennung in die Chip-Prozessierung war damit zunächst ausgeschlossen. Es wurden zeitlich versetzt zwei Methoden zur Positionserkennung in das Messsystem integriert. Für die einfache Nachrüstung vieler damals vorrätiger, kompletierter Sensorchips war die Einführung eines optischen Verfahrens basierend auf Farberkennung durch Lichtreflexion. Hierfür wurde auf der Rückseite des Chip-Trägers ein Aufkleber mit Farbbereichen zur Identifizierung der Chip-Position befestigt (**Abbildung 6-28 A**). Zusätzlich konnte auf dem feuchtebeständigen Aufkleber die Chipbezeichnung aufgedruckt werden. Die optische Anbindung von Lichtquelle und Sensor erfolgte über Glasfaserkabel. Die gebündelten Glaserfasern wurden in einer Hülse (englisch: *ferrule*) unterhalb des Sensorchips im Alu-Gehäuse installiert. Der technische und finanzielle Aufwand für diese Methode war sehr hoch und war exklusiv für 68-CLCC Chip-Träger geeignet (**Abbildung 6-12**). Die Positionserkennung wurde durch das zweite Verfahren stark vereinfacht. Dieses Verfahren basiert auf der definierten Verstimmung eines Spannungsteilers bei Veränderung der Chip-Position bzw. bei fehlendem Chip. Dafür wurden zwei Pins (Pin 10 & Pin 61) des Chip-Trägers miteinander kurzgeschlossen (**Anhang A19**). Dabei wurde auf die Kontaktierung der vier Ekelektroden im 8x8 MPSA verzichtet, die jedoch stets zu Vergleichszwecken (Überwachen der Zellen, Aussehen der Nadelelektrode etc.) verwendet werden. Die Auswertung des verstimmten Spannungsteilers erfolgt über einen 4-fachen Schmitt-Trigger. Vorteil dieses Verfahrens ist der vergleichsweise einfache Aufbau, die Möglichkeit der späteren Integration auf *Wafer*-Ebene (in CMOS) und der Wegfall des Aufklebers auf der Rückseite des Sensorchips, der bei Sensorchips mit *Flip-Chip*-Montage die Möglichkeiten für Durchlichtmikroskopie eingeschränkt hätte.

#### 6.4.6 Chip-Identifizierung

Für die Datenverarbeitung und Informationsgewinnung aus den Messwerten des Sensorsystems ist eine lückenlose Protokollierung aller Arbeitsschritte und Versuche notwendig. Für eine komplette Laborautomatisierung ist zudem die Einführung eines rechnergestützten Labor-Informations- und Management-Systems (LIMS) auf Basis von

Datenbanksystemen erforderlich. In kleinen Laboren erfolgen diese Arbeiten jedoch größtenteils ohne Automatisierung durch handschriftliches Ausfüllen von Laborbüchern etc. Grundlage für beide Herangehensweisen ist eine eindeutige Zuordnung jedes Sensorchips durch Vergabe von Chipnamen oder -nummern. In der Datenbank können dadurch alle wichtigen Informationen zum Chip wie bspw. Elektrodentyp (Material, Form usw.), Datum der Herstellung, Wafer-Kennung, Chip-Eingang etc. hinterlegt werden. Die Protokollierung der Arbeitsschritte und Versuche erfolgt dann für den gesamten Lebenszyklus des Chips von der Vorbereitung für den ersten Gebrauch bis hin zu seiner Aussortierung.

Aktuell erfolgt die Chipbezeichnung im Randbereich der optischen Chip-Positionserkennung durch Aufkleben eines Etiketts auf der Unterseite des Sensorchips (**Abbildung 6-28 A**). Allerdings ist die Anwendung auf ein nicht-automatisiertes Auslesen durch den Anwender beschränkt. Nachteilig ist hierbei, dass der Sensorchip zum Ablesen angehoben werden muss. Flyion und Sophion verwenden stattdessen *Barcodes* als Beschriftung ihrer Sensorchips [132, 224, 235]. Beispiele für die Gestaltung von *Barcodes* zeigt **Abbildung 6-28 B-D**, die als Etikett auf den Trog des Sensorchips geklebt wurden. Für ein Ablesen der Chipbezeichnung ohne *Barcode*-Lesegerät wurde die Kennung zusätzlich alphanummerisch als Klartext beschriftet. Etiketten mit Polyesterfolien sind temperaturbeständig und widerstandsfähig gegen Wasser, Alkohol und schwache Säuren. Dadurch wird die Lebensdauer der *Barcodes* zwar erhöht, allerdings können Verunreinigungen oder Beschädigungen des *Codes* zu Störungen beim Auslesen führen. Große Etiketten minimieren diese Gefahr und kommen dem begrenzten Auflösungsvermögen der Lesegeräte entgegen, allerdings steigt damit auch der Platzbedarf. Ein Verlust des Etiketts macht den Sensorchip unter Umständen unbrauchbar, sofern er nicht mehr identifiziert werden kann. Eine sichere, automatisierbare Handhabung besteht in der Integration eines vergleichsweise kleinen *RFID-Transponders*, für den jedoch stets ein Lesegerät notwendig ist. In **Abbildung 6-28 D** wurde testweise der passive *Transponder mic3®-TAG 16 kbit RW (Microsensys GmbH, Erfurt, Deutschland)* in den Randbereich des Verkapselungsteils eingeklebt. Der *Transponder* mit integrierter Antenne und einem 16 kbit EEPROM zum Auslesen und Beschreiben von Daten hat eine Grundfläche von nur 2 x 1,7 mm<sup>2</sup>. Erste Versuche mit dem Schreib- und Lesegerät *iID® UNI 13 (Microsensys)* waren erfolgreich.



**Abbildung 6-28: Chip-Identifizierung**

Verschiedene Konzeptbeispiele für eine Chip-Identifikation. Chip-Name: 09/298 w1 07. Chip-Träger: 68-CLCC. **B-D:** Die Chipbezeichnung wurde zusätzlich alphanummerisch als Klartext aufgebracht. Verschiedene Etiketten (**HellermannTyton GmbH, Tornesch, Deutschland**) für Laserbedruckung mit weißer Polyester-Folie (Material 1101) auf Verkapselungsteil aufgeklebt. Zulässiger Temperaturbereich -40 °C bis +150 °C. Kleber: Acryl. **A:** Aktueller Stand der Chipbezeichnung auf Rückseite. Chipbezeichnung in Randbereich der optischen Positionserkennung. **B:** Beispiel eines 1D-Strichcodes. Barcode Format: Code 128. Schriftzug: 09/298 w1 07. Erstellt am 01.04.2011 auf <http://www.morovia.com/free-online-barcode-generator>. **C:** Beispiel eines 2D-Barcodes. Barcode Format: DataMatrix. Schriftzug: 09/298 w1 07. Erstellt am 01.04.2011 auf <http://invx.com>. **D:** *Transponder mic3®-TAG 16 kbit RW (Microsensys GmbH, Erfurt, Deutschland)* eingebettet in den Randbereich des Verkapselungsteils (weißer Pfeil).

Da es sich bei dem Sensorchip um einen passiven Chip ohne interne Elektronik handelt, bei dem zusätzlich die Anzahl der Anschlüsse begrenzt ist, blieben chipintegrierte Lösungsansätze unberücksichtigt. An dieser Stelle wird auf eine detaillierte Gegenüberstellung der drei vorgestellten Chipbeschriftungen sowie weiterer Methoden verzichtet, da die Schaffung eines LIMS nicht Bestandteil dieser Arbeit war. Hierbei sind viele Entscheidungskriterien wie bspw. der Kostenfaktor, die Bedienerfreundlichkeit, der Nutzen sowie die Gestaltung der Netzwerkstruktur zu berücksichtigen. Vorläufig wird daher weiterhin das Etikett der optischen Chip-Positionserkennung verwendet.



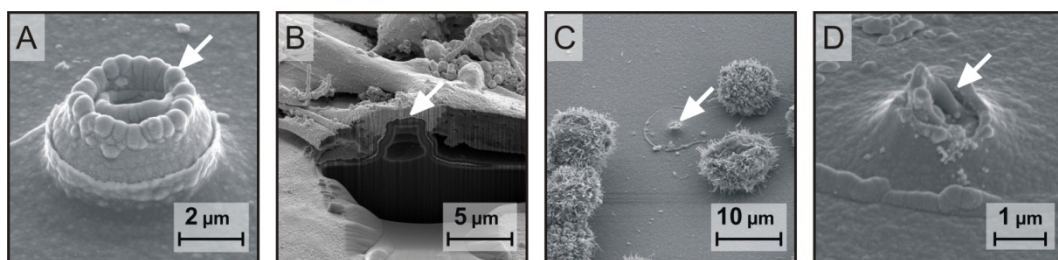
## 7 Ergebnisse

### 7.1 Zellfreie Untersuchungen

Zellfreie Tests wurden durchgeführt, um Eigenschaften der Elektronik (Bandbreite, Übersprechen, Rauschen, Aussteuerbereich, Zeitkonstanten etc.) sowie die elektrochemischen Eigenschaften des Messsystems (Elektrodenpolarisierung, Elektrodenimpedanzen etc.) zu untersuchen. Eine genaue Kenntnis des Systemverhaltens mit und ohne Zelle ist für die Datenanalyse nach Elektroporationsversuchen notwendig. Nachfolgend sind Messergebnisse mit Sensor- und Testchips vorgestellt.

#### 7.1.1 Defekte Nadelelektroden

Bei der Verwendung der Sensorchips war zu beachten, dass die Prozessierung der Nadelelektroden durch fortlaufende Entwicklungs- und Optimierungsarbeiten geprägt war [198]. Absolute Prozesssicherheit in der Serie gab es daher nicht. Des Weiteren konnten nur stichprobenartig REM-Aufnahmen von einzelnen Nadelelektroden angefertigt werden. Wegen der für die REM-Aufnahme verwendeten Beschichtung mit leitfähigem Material wurden die Sensorchips für weitere Messungen unbrauchbar. Nicht-invasive lichtmikroskopische Aufnahmen bieten nur eingeschränkte Möglichkeiten für Detailaufnahmen und die Erkennung defekter Nadelelektroden. Beispiele für defekte Nadelelektroden zeigt **Abbildung 7-1**.

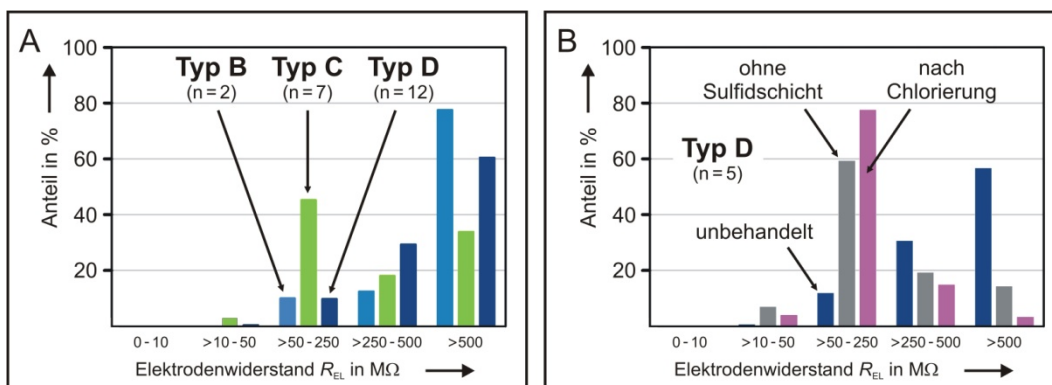


**Abbildung 7-1: Defekte Nadelelektroden**

Die REM-Aufnahmen zeigen Beispiele für defekte Nadelelektroden (weißer Pfeil). FIB-Präparation und Originalaufnahmen: Fraunhofer IWM Halle. **A:** Chiptyp C. Der Randbereich der Nadelöffnung ist nicht glatt, sondern besitzt große Unebenheiten. **B:** Chiptyp C. Nicht geöffnete Platin-Hohl-Nadelelektrode mit primären HMZ von Mausembryonen. **C:** L929 Mausfibroblasten um fehlende Nadelelektrode. Chiptyp A. **D:** Fehlende Nadelelektrode. Chiptyp A.

### 7.1.2 Elektrodenwiderstand

Die Höhe der wirksamen Elektrodenimpedanzen war für die Dimensionierung der Signalableitung und Zellmanipulation in 6.2.2 und 6.2.3 von großer Bedeutung. Es mussten daher die Elektrodenimpedanzen der Nadelelektroden ermittelt werden. In **Abbildung 6-16** bildet der Elektrodenwiderstand  $R_{EL}$  einen Spannungsteiler mit dem Eingangswiderstand der Elektronik. Der in Serie zu  $R_{EL}$  liegende Widerstand  $R_S$  (Zuleitung etc.) ist vergleichsweise klein und wurde hier vernachlässigt. Die Widerstandsbestimmung an den Sensorchips erfolgte mit einem 16 Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker Triton+ (Tecella). Durch 90°-Chipdrehung (4×15) konnten jeweils 15 Nadelelektroden der untersuchten Sensorchips nacheinander angeschlossen werden. **Abbildung 7-2 A** zeigt für die drei Nadeltypen (Typ B-D) die Gegenüberstellung ihrer Elektrodenwiderstände.



**Abbildung 7-2: Elektrodenwiderstände**

*Voltage-Clamp*-Messung an Nadelelektroden mit dem 16 Kanal *Patch-Clamp*-Verstärker Triton+ (Tecella LLC, Foothill Ranch, Kalifornien, USA). Sequentielle Untersuchung: 4×16 Elektroden pro Sensorchip. Messungen bei Raumtemperatur. Elektrolytlösung: HSF-Puffer (pH 7,18; 14,75 mS·cm<sup>-1</sup>). Testpuls:  $U_{Steuer} = +10$  mV; Pulsdauer = 10 ms; Haltespannung  $\approx 0$  V. Datenaufzeichnung: Abtastrate = 20 kHz; TecellaLab\_v0.42 (Software). Vorbehandlung der Sensorchips: 1. Conrad 15% ( $t = 15$  min bei 37 °C); 2. Waschen mit H<sub>2</sub>O; 3. Tergazym ( $t = 45$  min bei 50 °C); 4. Waschen mit H<sub>2</sub>O; 5. 0,5 M NaOH (50  $\mu$ l für  $t = 20$  min) und 6. Spülen mit HSF-Puffer. **A:** Gegenüberstellung der Elektrodenwiderstände von 21 Sensorchips (Typ B-D) mit jeweils 60 Elektroden pro Chip (insgesamt 1260 Elektroden). Zwei Sensorchips mit Nadeltyp B (hellblau, n = 2). Sieben Sensorchips mit Nadeltyp C (grün, n = 7). Zwölf Sensorchips mit Nadeltyp D (dunkelblau, n = 12). **B:** Gegenüberstellung der Elektrodenwiderstände von fünf Sensorchips (n = 5) mit Massiv-Silber-Nadelelektroden vor und nach der Behandlung. Entfernung Silbersulfidschicht: Aluminiumfolie wurde mit den elektrischen Kontakten der Elektroden verbunden und tauchte zusätzlich in den mit 1 M NaCl gefüllten Trog ein ( $t = 60$  min bei 50 °C). Chlorieren (nach Entfernung der Sulfidschicht): Beschichtungszeit:  $t = 30$  s. Stromstärke:  $I = 10$  nA. 0,1 M KCl. Jede Elektrode wurde separat beschichtet.

Aufgrund der hohen Elektrodenwiderstände der Silber-Nadelelektroden (Typ B, D) wurden einige Sensorchips (n = 5) mit Massiv-Silber-Nadelelektroden (Typ D) zusätzlich behandelt, um eine eventuell durch die Lagerung der Sensorchips an Luft gebildete, schlecht leitende Silbersulfidschicht zu entfernen. Nach der Entfernung der Sulfidschicht wurden diese Elektroden elektrochemisch chloriert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Abbildung 7-2 B** dargestellt. Es zeigte sich, dass allein die Entfernung der Silber-



sulfidschicht zu einer deutlichen Verringerung der Elektrodenwiderstände führte. Ohne Behandlung der Silber-Nadelelektroden (Typ B, D) lagen jeweils nur knapp 10 % ihrer ermittelten Widerstände unterhalb 250 M $\Omega$ . Interessanterweise besaßen fast 50 % der chemisch inerten Platin-Hohlnadeln Elektrodenwiderstände unterhalb 250 M $\Omega$ . Nach der Entfernung der Silbersulfidschicht erhöhte sich der Anteil bei den Massiv-Silber-Nadelelektroden auf ca. 67 % und stieg nach elektrochemischer Chlorierung auf immerhin 81 %. Wobei nicht auszuschließen ist, dass es während der Messung zu einer spontanen Chlorierung durch den Messstrom kommt. Insgesamt musste festgestellt werden, dass der Großteil der Elektrodenwiderstände aller Chiptypen über 50 M $\Omega$  lag, also bei Werten die selbst für einfache *Voltage-Clamp*-Versuche an der Zelle zu hoch sind.

### 7.1.3 Spannungsänderung nach dem Elektroporationspuls

Experimente mit typischen Elektroporationsparametern zeigten mit bipolaren Pulsfolgen ( $T_{EP} = 10 \mu\text{s}$ ;  $U_{EP} = \pm 1,5 \text{ V}$ ; Pulsanzahl = 1000) an zellfreien Sensorchips größtenteils eine große positive Spannungsänderung an den Nadelelektroden, gefolgt von einer zeitlich sehr langen Drift zurück in die Nähe des ursprünglichen Spannungswertes. Die Intensität dieses Effektes konnte auf die Wahl der Elektroporationsparameter, auf den verwendeten Elektroporationspuffer sowie auf die Elektrodeneigenschaften (Material, Aufbau etc.) zurückgeführt werden. Negative Änderungen der Spannung  $U_{EL}$  wurden nur sehr selten mit zellfreien Sensorchips beobachtet. Die Auswirkungen eines typischen Elektroporationspulses auf die zwei Elektrodenmaterialien Platin und Silber wurde bereits in [15] gezeigt. Dort wurden die Untersuchungen an einem teilbeschichteten Sensorchip (Typ A) vorgenommen. In diesen Tests blieb die Spannung  $U_{EL}$  an den silberbeschichteten Elektroden nahezu stabil, während die unbeschichteten Platinelektroden eine positive Aufladung und eine minutenlange Drift zeigten. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da es zeigt, dass Platin-Elektroden polarisierbar sind. Die elektrischen Eigenschaften von Platin-Elektroden wurden bspw. ausführlich von de Boer und van Oosterom [236] beschrieben. Sofern die Platin-Nadelelektroden ausschließlich als Elektroporationselektroden entsprechend der Konzeptidee (**Abbildung 6-1 B**) verwendet werden, zeichnen sie sich durch ihr weitgehend inertes Verhalten aus.

„The initial starting point for working with these systems is usually with an existing cell line that works well for manual patch clamp.“ [5]

## 7.2 Versuche mit Zellkulturen

Um belastbare Aussagen zur Verwendung der Elektroporation als Öffnungswerkzeug für Zellmembranen bei *Patch-Clamp*-Messungen machen zu können, wurden mit den verschiedenen Sensorchiptypen Untersuchungen an lebenden adhärennten Zellen durchgeführt, um jeweils optimale Elektroporationsparameter zu finden. Das Labormuster war auf die Verwendung von Nadelelektroden begrenzt und besaß nur einen Elektrodenkanal, mit dem vereinfachte *Voltage-Clamp*-Versuche vorgenommen wurden.

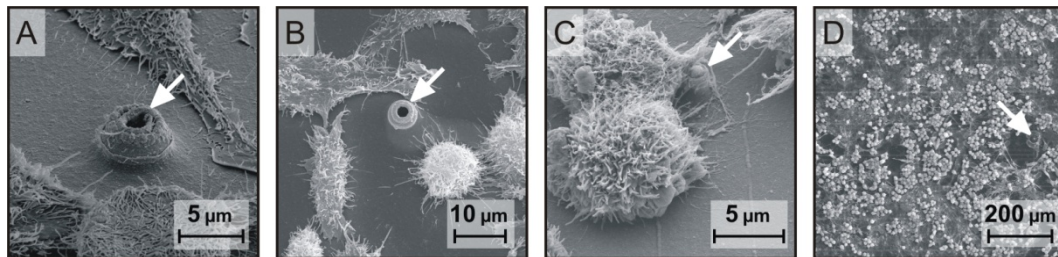
Elektroporationseffekte können mit verschiedenen Methoden (*Voltage-Clamp*, Fluoreszenzfärbung, radioaktive Marker etc.) untersucht werden, die unterschiedlich sensitiv Änderungen des Transmembranpotentials sowie der Membranpermeabilität bzw. -leitfähigkeit [164, 237]. Änderungen im Transmembranpotential wurden mit den Spannungsmesskanälen (**6.2.2.1**) anhand der Änderung von  $U_{EL}$  untersucht. Für Ghosh *et al.* [164] ist die Beobachtung der Membranleitfähigkeit in der *Cell-Attached*-Konfiguration die bevorzugte Methode, um den Mechanismus der Porenbildung und des Wiederverschließens zu untersuchen. Die untersuchten Zellen dürfen dabei keinem Fremdmaterial (Fluoreszenzfarbstoff etc.) ausgesetzt werden, welches das Ergebnis eventuell beeinflusst. Zimmermann [154] beschrieb, dass der Membrandurchbruch sowie das Verschließen der Membran bei großen Zellen ( $d_z > 40 \mu\text{m}$ ) direkt mit Mikroelektroden beobachtet werden kann. Auch für kleinere Zellen ist die *Cell-Attached*-Konfiguration nutzbar, um den Effekt der Permeabilisierung zu demonstrieren [154]. Als aussagekräftigen Test nennt Zimmermann die Kontrolle der Zellviabilität. In **7.2.3** wird anhand der Zellvitalität (Überlebensrate) der Effekt von sehr hohen Feldstärken untersucht.

### 7.2.1 Biokompatibilität

Zum Nachweis der Biokompatibilität wurden von Koester *et al.* [29] neuronale Langzeit-Primärkulturen (21 DIV) genutzt, wobei die Nadelelektroden und die Chipoberfläche unterschiedlich gut überwachsen wurden. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um die sehr empfindlichen Neuronen des frontalen Kortex der Maus.

## 7.2.2 Variabilität im Zellwachstum

Unter optimalen Versuchsbedingungen sollte die Zellkultur eine gleichmäßige Monolage auf der Chipoberfläche bilden. Bei einigen lichtmikroskopischen Aufnahmen sowie bei REM-Bildern zeigten sich allerdings ungleichmäßig ausgebildete Zellnetzwerke (**Abbildung 7-3**) mit nicht überwachsenen Nadelelektroden oder sogar abgelösten Zellverbänden (**Abbildung 7-8 C**).



**Abbildung 7-3: Variabilität im Zellwachstum**

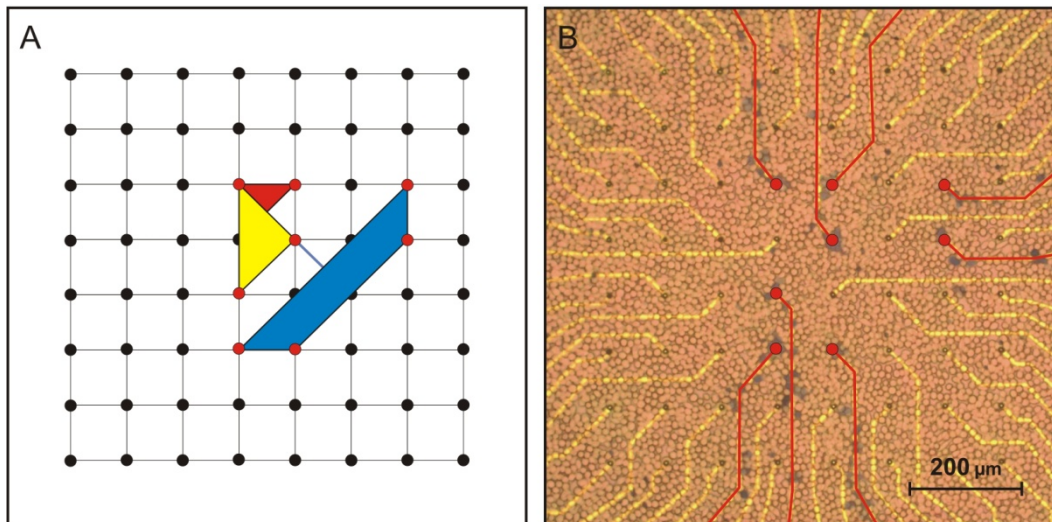
Die Abbildungen zeigen Beispiele für nicht bewachsene Nadelelektroden (weißer Pfeil) auf Sensorchips mit kultivierten L929 Zellen. Originalaufnahmen: Fraunhofer IWM Halle. **A, B:** Chiptyp C. **C:** Chiptyp A. **D:** Chiptyp A mit DEP-Elektroden.

## 7.2.3 Selektivität der Zellmanipulation

Unter der Selektivität der Zellmanipulation wird die individuelle Auswahl von einzelnen Elektroden im 8×8 MPSA während der Versuchsdurchführung verstanden. Dadurch ist es bspw. möglich die Elektroporationsparameter von Elektrode zu Elektrode zu variieren und zeitgleich mikroskopische Beobachtungen durchzuführen. Die Festlegung auf eine bestimmte Elektrode erfolgt über die Bedienoberfläche der Systemsoftware (**6.3.2**). Die Grundlage hierfür bildete die Einführung einer definierten Elektrodenzuordnung, wie sie in **Anhang A19-A21** vorgenommen wurde. Zum Nachweis der Selektivität sowie als Systemtest wurden Vitalitätsuntersuchungen mit dem Farbstoff Trypanblau durchgeführt. Die hierfür verwendeten irreversiblen Elektroporationsparameter führten in Vorversuchen überwiegend zur Zelllyse (Zelltod) der in unmittelbarer Nähe zur Elektrode liegenden Zellen.

Trypanblau ist nicht membrangängig und bindet an zytosolische Proteine. Der Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran toter Zellen in das Zytosol ein und färbt diese Zellen tiefblau [28]. Im Gegensatz dazu werden lebende Zellen nicht angefärbt. Aufgrund der Zytotoxizität von Trypanblau erfolgt die Auswertung des Vitalitätstest durch Zugabe des Farbstoffes erst direkt nach Abschluss der Elektroporationsversuche. Vitalitätstests wurden mit Sensorchips (Typ A, n = 5) durchgeführt, auf denen L929 Zellen (Mausfibroblasten) kultiviert waren. Die Vorbehandlung und Aussaat der Zellen

wurde in Koester *et al.* [29] beschrieben. Die Selektivität der Elektroporation wurde anhand eines definierten Musters nachgewiesen [29, 238]. Hierfür wurde ausschließlich an ausgewählte Elektroden im MPSA ein Elektroporationssignal angelegt. **Abbildung 7-4** illustriert das Ergebnis dieser Untersuchungen (siehe auch [14]).



**Abbildung 7-4: Totfärbung mit Trypanblau**

Gleichmäßiger Bewuchs der Zellkultur (Mausfibroblasten L929, 3 DIV). Chiptyp A. **A:** Planung der Mustergenerierung im Elektrodenarray. Rot-markiert sind alle Elektroden, an die das Elektroporationssignal angelegt werden soll. Die Punkt-zu-Punkt-Verbindung der rot-markierten Elektroden ergibt als Umriß ein Segelboot, das zur besseren Darstellung mit blauem Rumpf, gelbem Segel und roter Flagge eingefärbt ist. **B:** Lichtmikroskopische Aufnahme vom 8x8 MPSA nach der Vitalfärbung mit Trypanblau. Erfolgreich angefärbt sind die Zellen im Bereich der ausgewählten Elektroden (roter Punkt). Allerdings zeigen sich auch bei Zellen entlang der Zuleitungen (rot) deutliche Totfärbungen als Reaktion auf das bipolare Elektroporationssignal. Elektroporation jeweils mit:  $U_{EP} = \pm 2$  V; 1x Puls;  $T_{EP} = 50$  ms.

Diese Versuche zeigten eine deutliche Anfärbung der Zellen bei 7 von 8 Elektroden. Es ist zu berücksichtigen, dass u. a. die Zugabe des Farbstoffs bzw. das Absaugen von Medium gelegentlich zum Verrutschen oder Ablösen von Zellen führte. **Abbildung 7-4** offenbart, dass es auf den Leiterbahnen (rot-eingefärbt) der betreffenden Elektroden ebenfalls zur Anfärbung der Zellen durch Trypanblau kommen kann.

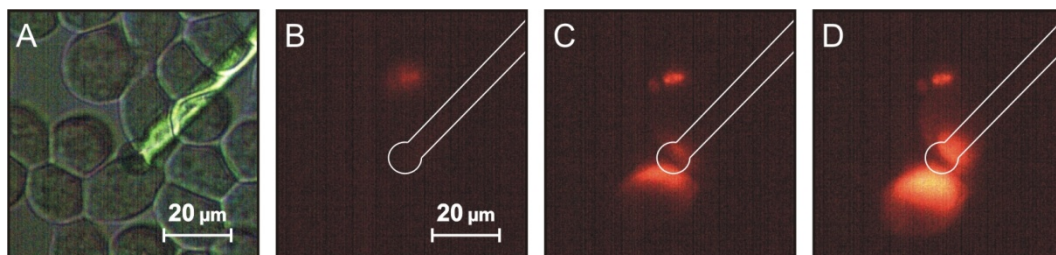
#### 7.2.4 Nachweis der Porenbildung

Im Gegensatz zu den Vitalitätstests in **7.2.3** erfolgen Fluoreszenzuntersuchungen direkt während der Zellmanipulation bei zeitgleicher mikroskopischer Beobachtung. Auch die hierfür verwendeten Farbstoffe können die intakte Zellmembran nicht durchdringen. Aufgrund der Porenbildung durch die Elektroporation kann der Fluoreszenz-Farbstoff jedoch in die Zelle eindringen und an bestimmte Moleküle, bspw. DNS, spezifisch binden und fluoreszente Komplexe bilden. Die Intensität und lokale Verteilung der

resultierenden Fluoreszenz gibt gewissen Aufschluss über die Durchlässigkeit der Zellmembran. So kann eine Beurteilung erfolgen, inwiefern ein bestimmtes Elektroporationssignal (Frequenz, Amplitude etc.) zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal geführt hat. Hierbei spielen die Eigenschaften der Elektroden, der Zelltyp, die Lage der untersuchten Zelle etc. eine besondere Rolle [28, 56]. Zu beachten ist, dass bereits tote Zellen zu Beginn des Versuches ein starkes Fluoreszenzsignal zeigen. Im Gegensatz dazu steigt die Fluoreszenz der Zellen auf der Nadelelektrode erst nach der LOMINE.

Es wurden verschiedene Versuche mit zwei Fluoreszenz-Farbstoffen an Zellkulturen von Typ Mausfibroblasten L929, humane Hautfibroblasten sowie an Neuronen (Maus) durchgeführt. Der Farbstoff Propidiumiodid färbt die DNS und RNS an. Hingegen markiert Rhodamin-Phalloidin das Strukturprotein Aktin. Es gibt noch weitere Farbstoffe, um den intrazellulären Eingriff nachzuweisen wie bspw. *Lucifer Yellow* [239] oder den Kalziumindikator Fura 2-AM [160].

Der Versuchsaufbau gestattet die Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs, sodass die Zellreaktionen an einzelnen Elektroden mit starker Vergrößerung beobachtet werden kann [19]. **Abbildung 7-5** und **Abbildung 7-6** zeigen ausgewählte Ergebnisse der Elektroporationsversuche an L929 Mausfibroblasten mit dem Farbstoff Propidiumiodid.



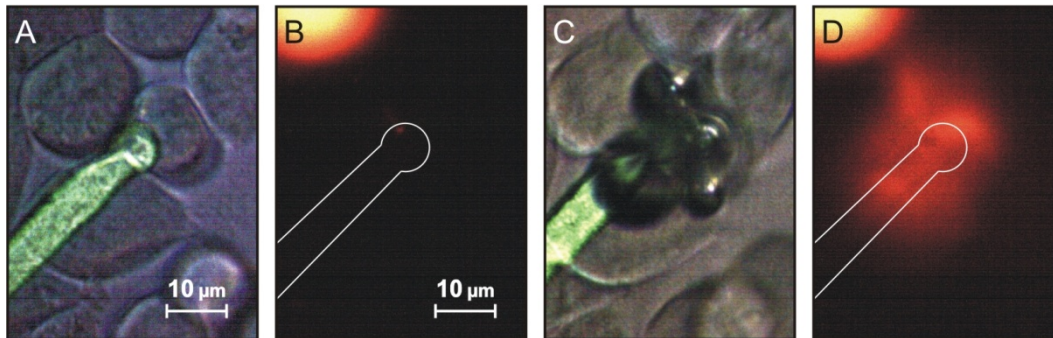
**Abbildung 7-5: Nachweis der Porenbildung mittels Fluoreszenzfärbung**

Untersuchung von Elektroporationseffekten an Mausfibroblasten L929 (2-3 DIV) durch Fluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid. Chiptyp A. Elektrodenabstand  $100\ \mu\text{m}$ . **A:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Elektrode vor der Elektroporation ohne Fluoreszenz-Anregungsfilter. Größtenteils gleichmäßiger Bewuchs des Sensorchips. **B-D:** Lichtmikroskopische Aufnahme mit Fluoreszenz-Anregungsfilter. Gleichbleibende Fluoreszenz einer toten Zelle bzw. von Zellresten in den Abbildungen auf der Elektrode. Die Lage der Elektrode ist durch eine weiße Umrandung angedeutet. **B:** Noch keine sichtbare Reaktion zum Zeitpunkt  $t = 60\ \text{s}$  nach dem ersten bipolaren Elektroporationsschuss ( $U_{EP} = \pm 1,5\ \text{V}$ ;  $T_{EP} = 25\ \text{ms}$ ; Pulsanzahl = 10; bei  $t = 0\ \text{s}$ ). **C:** Deutlich sichtbare Reaktion nach 2. Puls ( $U_{EP} = \pm 2\ \text{V}$ ;  $T_{EP} = 25\ \text{ms}$ ; Pulsanzahl = 10; bei  $t = 61\ \text{s}$ ) zum Zeitpunkt  $t = 75\ \text{s}$ . **D:** Stärkere Anfärbung beider Zellen zum Zeitpunkt  $t = 100\ \text{s}$ .

Die Versuche zeigten eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität sofern die angelegte Signalamplitude des Elektroporationsschusses erhöht wurde (**Abbildung 7-5**) [240]. Weitere Elektroporationsexperimente an humanen Hautfibroblasten sowie an Neuronen (Maus) wurden in [10, 28] beschrieben. Die durchgeführten Versuche zeigten bei langen, bipolaren Elektroporationsschüssen hoher Amplitude ( $U_{EP} \geq \pm 1,5\ \text{V}$ ;  $T_{EP} \geq 25\ \text{ms}$ ) vermehrt



sichtbare Blasenbildung an den Platin-Nadelelektroden (Typ A). **Abbildung 7-6 C** zeigt einen solchen Fall, der zur deutlichen Fluoreszenzfärbung in **Abbildung 7-6 D** führte. Inwieweit die betroffenen Zellen dadurch getötet oder lediglich kurzzeitig geöffnet wurden, ist nicht ersichtlich. Eine anschließende Anfärbung mit Trypanblau erfolgte nicht.



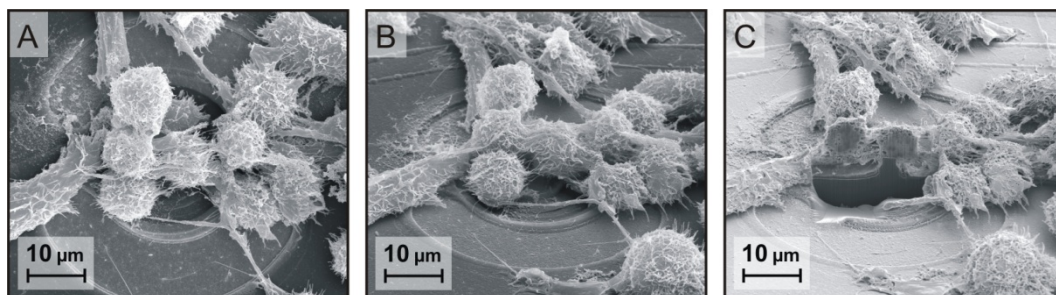
**Abbildung 7-6: Blasenbildung bei hoher Feldstärke**

Untersuchung von Elektroporationseffekten an Mausfibroblasten L929 (2-3 DIV) durch Fluoreszenzfärbung mit Propidiumiodid in Porationsbuffer (272 mOsmol/kg). Größtenteils gleichmäßiger Bewuchs der Zellkultur. Chiptyp A. Elektrodenabstand 100 µm. **A, C:** Lichtmikroskopische Aufnahme ohne Fluoreszenz-Anregungsfilter. **B, D:** Lichtmikroskopische Aufnahme mit Fluoreszenz-Anregungsfilter. Gleichbleibend starke Fluoreszenz einer bereits toten Zelle links oben. Die Lage der Elektrode ist durch weiße Umrandung angedeutet. **A:** Die Elektrode vor der Elektroporation von drei Zellen umgeben. **B:** Keine sichtbare Fluoreszenz im Bereich der Elektrode. **C:** Deutliche Blasenbildung direkt nach der bipolaren Pulsfolge ( $\pm 2$  V;  $T_{EP} = 25$  ms; Pulszahl = 10).  $t = 0$  s. **D:** Deutliche Anfärbung der drei Zellen 15 s nach dem Elektroporationspuls.

Die vorgestellte Methode der Fluoreszenzmikroskopie ist ein geeignetes Mittel die Auswirkungen der Elektroporation zu beurteilen. Allerdings gibt es gewisse Nutzungseinschränkungen, zu denen u. a. das Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffes sowie die Auswirkungen von photoelektrischen Störeffekten zählen. Das Verblässen des Farbstoffes (*Photobleaching*) resultiert aus dessen Zerstörung durch das Anregungslicht in einem photochemischen Prozess [241]. Als Folge nimmt die sichtbare Fluoreszenz mit der Zeit ab. Bei Fluoreszenz-Experimenten, in denen der Einfluss von zeitlich aufeinanderfolgenden Elektroporationssignalen an einer bestimmten Elektrode untersucht werden soll, ist dies bei der Bewertung der aktuellen Fluoreszenzintensität zu berücksichtigen. Eine Möglichkeit bietet hier das Schließen des Strahlengangs mit Hilfe des *Shutters*, sodass die Bestrahlung mit dem Anregungslicht nur dann stattfindet, wenn die aktuelle Fluoreszenzintensität überprüft werden soll. Jedoch führt das Umschalten im Strahlengang bei den Sensorchips mit Silizium-Substrat (Typ A-C) zu photoelektrischen Störeffekten und damit zu Spannungsänderungen von  $U_{EL}$ .

### 7.2.5 Focused Ion Beam (FIB)-Präparation

Die Anwendung der FIB-Präparation (englisch: *focused ion beam*) kombiniert mit REM-Aufnahmen dienten der zusätzlichen Überprüfung der Elektroporationseffekte. Mittels FIB-Präparation und REM ist es möglich Querschnitte von der Verbindungsstelle Zelle-Chip anfertigen zu lassen, um das Überwachsen und das Eindringen der Nadelelektrode in die Zellmembran zu beurteilen. Zellfreie FIB-Präparationen dienen außerdem der Optimierung der Chip-Prozessierung. Heilmann *et al.* [242] haben die Vorgehensweise der Probenaufbereitung und FIB-Präparation bereits ausführlich beschrieben. Für die Probenaufbereitung werden die Zellen mit kritischer Punkttrocknung präpariert. Die Proben werden anschließend mit einer dünnen Platinschicht versehen, um ein Aufladen der Oberfläche zu vermeiden. **Abbildung 7-7** zeigt REM-Aufnahmen vor und nach der FIB-Präparation. Weitere Querschnittsdarstellungen der Nadelelektroden mit und ohne Zelle wurden u. a. in Friedmann *et al.* [18, 243] veröffentlicht.



**Abbildung 7-7: FIB-Präparation an zellbesetzten Sensorchips**

REM-Aufnahmen an einer mit L929 Zellen überwachsenen Nadelelektrode. Chiptyp A mit DEP-Elektroden. Originalaufnahmen: Fraunhofer IWM Halle. **A:** Draufsicht der überwachsenen Nadelelektrode. Neigungswinkel: 0°. **B:** Seitenansicht unter 52° Neigungswinkel. **C:** Seitenansicht nach FIB-Schnitt. Neigungswinkel: 52°. FIB-Präparation: Fraunhofer IWM Halle.

Ein großer Nachteil der FIB-Präparation ist die Tatsache, dass es sich um ein zerstörendes Verfahren handelt, da die Sensorchips mit Platin beschichtet und anschließend geschnitten werden. Zudem war bei Bilderfolgen von mehreren aufeinanderfolgenden FIB-Schnitten zu beobachten, dass die fixierten, toten Zellen von Schnitt zu Schnitt schrumpften bzw. sich leicht bewegten. Diese und weitere Präparationsartefakte sind bei der Interpretation der REM-Aufnahmen zu beachten. In diesem Zusammenhang berichtet Zimmermann [154], dass sichtbare Membranöffnungen und -risse im REM nach Elektroporationsversuchen eher durch den Verlust der osmotischen Barriere beim Einfrieren entstanden sind. Die Bestimmung von Abständen zwischen Nadelelektrode und Zellkörper anhand von FIB-Präparationen kann durch Präparationsartefakte verfälscht werden.

### 7.2.6 Überlebensrate der Zellen

Bei den Vitalitätsuntersuchungen mit dem Farbstoff Trypanblau (**7.2.3**) wurde die individuelle Zellmanipulation im 8×8 MPSA durch selektive Elektroporation überprüft und nachgewiesen. Die hierfür ausgewählten Elektroporationsparameter sollten gezielt zur Zellyse der in unmittelbarer Nähe zur Elektrode liegenden Zellen führen. Der Anwendungsbereich der Vitalfärbung mit Trypanblau ist damit jedoch noch nicht erschöpft. Schädigende Auswirkungen der Elektroporation auf Zellen, die die LOMINE zunächst überlebt haben, wurde zeitversetzt durch Vitalfärbung getestet [28].

### 7.2.7 Ableitung des Transmembranpotentials

Die durchgeführten Versuche zur Messung des Transmembranpotentials lassen vermuten, dass es sich z. T. um echte intrazelluläre Ableitungen handelte [11]. Ein zweifelsfreier Beweis konnte bisher jedoch noch nicht erbracht werden.

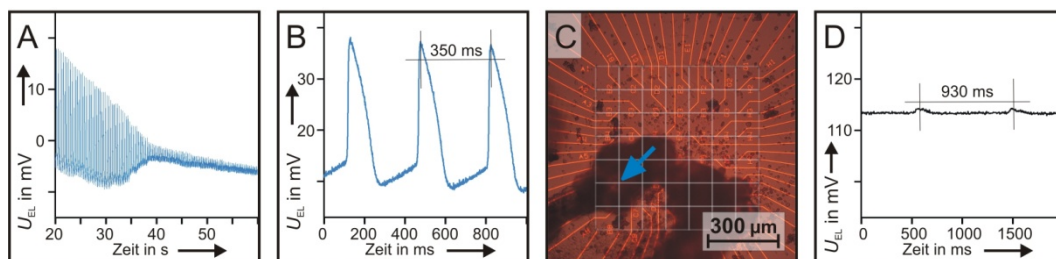
Zum Sammeln von Anhaltspunkten wurden verschiedene Methoden (Trypan-Blau, Fluoreszenzfärbung und FIB-REM) angewandt, um zunächst eine definierte Membranöffnung nachweisen zu können. Für die Messung des Transmembranpotentials wurde von einer negativen Potentialdifferenz zwischen dem Zellinneren und dem Außenmedium ausgegangen (**3.2.4**). Osipenko *et al.* [244] berichteten bei ihren Untersuchungen von einem Ruhemembranpotential von -20 mV bei L929 Zellen. Es wurde daher vermutet, dass eine erfolgreiche Öffnung der Zellmembran im Bereich der Nadel-elektrode in Kombination mit einer hohen elektrischen Abdichtung des Zellinneren durch einen negativen Sprung der Spannung  $U_{EL}$  erkannt werden müsste. Elektroporationsversuche, die zu einer negativen Änderung von  $U_{EL}$  führten, zeigten jedoch innerhalb von Sekunden bis Minuten einen Rückgang auf den ursprünglichen Wert. Dieser Vorgang wurde von Koester *et al.* [19] als ein Wiederverschließen der Zellmembran interpretiert. Sofern nach diesen Beobachtungen das Tensid Triton® X-100 zugegeben wurde, um die Zellmembranen aller Zellen aufzulösen, verhielten sich alle Elektroden wie zellfreie Elektroden. Erfahrungsgemäß reagieren zellfreie Nadel-elektroden (Typ A-D) auf einen Elektroporationspuls mit einer positiven Spannungsänderung von  $U_{EL}$  [19]. In **Abbildung 6-20 B** ist ein solcher Versuch mit einem negativen Sprung von ca. -30 mV an L929 Zellen dokumentiert.



## 7.2.8 Extrazelluläre Messungen

Extrazelluläre Signalableitungen **ohne LOMINE** wurden an HMZ sowie an neuronalen Zellen vorgenommen. Versuche mit primären neuronalen Zellen wurden auf Sensorchips mit Platin-Hohlnadeln (Typ C) beschränkt. Um die biologische Herkunft der aufgezeichneten Signale von elektrisch aktiven Zellen zu belegen, wurden alle Experimente durch Zugabe des zelltoxischen Tensids Triton® X-100 beendet. Die abschließende Auswertung erfolgte zumeist mit dem *Offline Sorter* (6.3.1).

Signale primärer HMZ von Mausembryonen sowie von postnatalen Ratten wurden mit Sensorchips vom Typ B (Galvanik-Silber-Nadeln) mit hohen Signalamplituden von bis zu 30 mV aufgezeichnet. **Abbildung 7-8 A, B** zeigt einen typischen Signalverlauf. Nach Beginn der Messung nahm die Signalamplitude innerhalb von wenigen Minuten stetig ab. Außerdem lösten sich die Zellen zumeist kurz vor oder während den Messungen teilweise oder ganz von der Oberfläche ab, sodass bei vielen Versuchen keine oder nur wenige Signale sichtbar waren (**Abbildung 7-8 C**).



**Abbildung 7-8: Extrazelluläre Signalableitung von HMZ (Maus)**

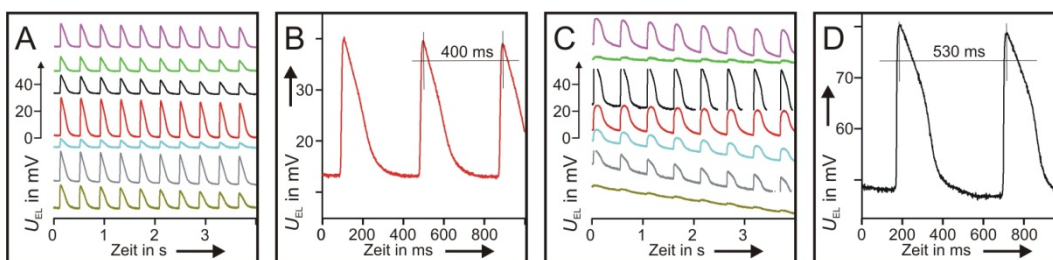
Extrazelluläre Signalableitung primärer HMZ von Mausembryonen.  $T = 37^\circ\text{C}$ . Keine  $\text{CO}_2$ -Begasung. **A-C:** Chiptyp B. Die Bilder zeigen den Signalverlauf bzw. den Ort der Nadelelektrode B6 im  $8 \times 8$  MPSA. **A:** Signalverlauf an Elektrode B6 ab 20 s nach dem Start der Messung. **B:** Bestimmung der Kontraktionsfrequenz (ca. 3 Hz) für Elektrode B6. Zeitfenster: 1 s. **C:** Auflichtmikroskopie des Sensorchips nach beendeter Messung. Der blaue Pfeil bezeichnet den Ort von Elektrode B6 unter dem Zellhaufen. Nur noch 30 % der Nadelelektroden sind nach der Messung von Zellen bedeckt (dunkler Bereich). Hilfgitter zur Lokalisierung der bedeckten Nadelelektroden im  $8 \times 8$  MPSA. **D:** Chiptyp C. Kontraktionsfrequenz  $\approx 1$  Hz. Zeitfenster: 2 s. Dieser Signalverlauf wurde von Dipl.-Biol. D. Franz (Universität Rostock) zur Verfügung gestellt [245].

Auf Sensorchips mit Platin-Hohlnadeln (Typ C) zeigten die Signalableitungen von primären Herzmuskelzellen (Maus und Ratte) sowie von primären neuronalen Zellen (Maus) nur Amplituden bis maximal 3 mV bei geringem Signal-Rausch-Abstand (**Abbildung 7-8 D**). Bei den HMZ von Mausembryonen lagen die beobachteten Kontraktionsfrequenzen zwischen 0,4 Hz und 1,2 Hz.

Primäre HMZ von postnatalen Ratten wurden auch auf Sensorchips mit Massiv-Silber-Nadeln (Typ D) getestet. Die detektierten Signalamplituden betragen bis zu 30 mV (**Abbildung 7-9 C, D**). Die Kontraktionsfrequenz lag durchschnittlich bei ca. 2 Hz [16]. Im

Vergleich zu den Messungen mit Galvanik-Silber-Nadeln (Typ B) fielen auch bei den Massiv-Silber-Nadeln die Signalamplituden stetig ab und blieben dann teilweise leicht oberhalb des Rauschens konstant [19]. Obwohl keine Elektroporationssignale an die Nadelelektroden für die extrazelluläre Ableitung angelegt wurden, ähnelt die Form der mit den Elektroden vom Typ B, D aufgezeichneten Signale dem intrazellulären Aktionspotential wie es bspw. von Brown [246] beschrieben wurde.

Zellmanipulationsversuche mit Platin-Hohladelchips (Typ C) an HMZ von Maus-embryonen zeigten nach der LOMINE deutlich sichtbare Signalamplituden, die nach kurzer Zeit wieder im Rauschen verschwanden [245].



**Abbildung 7-9: Extrazelluläre Signalableitung von HMZ (Ratte)**

Extrazelluläre Signalableitung von primären HMZ postnataler Ratten: 5 DIV (E19 bis E20).  $T = 37^\circ\text{C}$ . **A, B:** Chiptyp B. Keine  $\text{CO}_2$ -Begasung. **A:** Mehrkanalarstellung (mehrfarbig) von sieben Elektroden eines Sensorchips. Zeitfenster: 4 s. **B:** Kontraktionsfrequenz  $\approx 2,5$  Hz. Zeitfenster: 1 s. **C, D:** Chiptyp D.  $\text{CO}_2$ -Begasung: 10 %; 10 ml/min. **C:** Mehrkanalarstellung (mehrfarbig) von sieben Elektroden eines Sensorchips. Zeitfenster: 4 s. **D:** Kontraktionsfrequenz  $\approx 1,9$  Hz. Zeitfenster: 1 s.

### 7.2.9 Zellpositionierung

Erfolgreiche DEP-Zellpositionierungen mit Nadelelektroden (Typ A) wurden bereits von Koester *et al.* [29, 74] vorgestellt. Bei diesen Versuchen wurde das elektrische Feld direkt an den Nadelelektroden erzeugt (**Anhang A24**). Es zeigte sich jedoch, dass die für die Zellbewegung notwendigen, starken elektrischen Felder zu Zellstress und auch zur Zellyse führten. Dieser Effekt wurde auf die vergleichsweise sehr hohe Feldstärke an der Spitze der Elektrode zurückgeführt. Um den beobachteten Stress auf die Zellen während der DEP-Zellpositionierung zu verringern, wurden jeweils zwei planare, nierenförmige Elektroden um jede Nadelelektrode herum integriert (**Abbildung 6-11 B, C**). Die Anschlussbelegung für die DEP-Elektroden ist **Anhang A23** zu entnehmen.

## 8 Diskussion

Die für die Konzepterstellung durchgeführten Systemstudien zeigten, dass für Untersuchungen an adhärennten Zellnetzwerken der klassische *Patch-Clamp*-Aufbau noch immer den Stand der Technik darstellt. Für die vorgestellte Konzeption eines neuartigen, automatisierten *Patch-Clamp*-Systems für solche Netzwerke wurden in dieser Dissertation wesentliche Systemkomponenten realisiert und erfolgreich erprobt. Um Ganzzelleableitungen an Zellnetzwerken mit einem APC-System zu ermöglichen, wurde die Technik der lokalen Elektroporation LOMINE an Nadelelektroden entwickelt und ein Messsystem zur Erprobung realisiert. Der Ausblick (**Kapitel 9**) zeigt den aktuellen Entwicklungsstand des *Patch-Clamp*-Systems mit  $4 \times 4$  *Patch-Sites*, das in einem Folgeprojekt weiterentwickelt wird. Die *Patch-Sites* auf einem Glassubstrat bauen auf der entwickelten Konzeptidee auf. Mit ihnen wurden bei ersten *Patch-Clamp*-Ableitungen an suspendierten Einzelzellen *Seal*-Widerstände von über  $0,5 \text{ G}\Omega$  erreicht. Im Folgenden werden die einzelnen Systemkomponenten der Dissertation diskutiert.

**Sensorchips:** Die Nadelelektroden der Sensorchips stellen eine vereinfachte Form der Konzeptidee dar. Die messtechnische Überprüfung ihrer Eigenschaften erfolgte anhand von zellfreien Tests sowie in Zellversuchen (**Kapitel 7**). Mit den vier Elektrodentypen (Chiptyp A-D) wurden Untersuchungen zur lokalen Elektroporation und intra- sowie extrazelluläre Signalableitungen durchgeführt.

Die Prozessierung der Nadelelektroden war durch fortlaufende Entwicklungs- und Optimierungsarbeiten geprägt, wodurch eine hohe Prozesssicherheit in der Entwicklungsphase nicht gewährleistet werden konnte (**7.1.1**). Bei der Passivierung der Sensorchips handelt es sich standardmäßig um Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), das im aktiven Bereich der Nadelelektrode geöffnet war [198]. Eine Passivierung mit Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) in Kombination mit der Behandlung durch Sauerstoff-Plasma liefert eine höhere *Seal*-Erfolgsrate, als die reine Passivierung mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$  [95]. In der Konzeption des im Folgeprojekt entwickelten Sensorchips mit den  $4 \times 4$  *Patch-Sites* wurde dieser neue Wissensstand berücksichtigt.

Bei der Auswertung und Interpretation der LOMINE-Versuche war zu beachten, dass aufgrund der begrenzten Menge an Sensorchips eine Mehrfachbenutzung (bis zu 5 Mal) notwendig war. Dadurch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich Zellreste

oder andere Verunreinigungen auf den Nadelelektroden befanden, die die Signalableitung an der Nadelelektrode beeinflussten. Zusätzlich war zu beachten, dass sich die Eigenschaften der Nadelelektroden (Schichtdicken, Form, Material etc.) vor allem durch Elektroporationstestserien verändern können.

**Chip-Träger:** Die Kanal-zu-Kanal-Isolation als Maß für das Übersprechen und die gegenseitige Beeinflussung der Messkanäle wurde für den Chip-Sockel und für zwei verschiedene Chip-Träger bestimmt (6.2.1.4, 6.2.2.3). Dabei stellte sich heraus, dass unter den getesteten Bedingungen ein konzeptioneller Wechsel auf einen Chip-Träger aus Platinmaterial zu einer Erhöhung der Kanal-zu-Kanal-Isolation führen würde. Die Chip-träger müssen zuvor jedoch erneut unter den Bedingungen in der Zellkultur (hohe Luftfeuchtigkeit etc.) untersucht werden, damit auch die Eigenschaft ihrer Wasseraufnahme berücksichtigt werden kann.

**Labormuster:** Innerhalb der Dissertation wurde ein vollständiges Messsystem mit softwaregesteuerter Elektronik für die hochohmige Signalableitung und elektrische Zellmanipulation (LOMINE und DEP) konzipiert und verwendet. Die integrierte Temperierung und CO<sub>2</sub>-Begasung machten es möglich die Sensorchips direkt aus der Zellkultur in das System einzulegen und zu untersuchen. Der Systemaufbau ermöglichte die optische Kontrolle der Zellen auf der Chipoberfläche und im Elektrodenbereich mit einem inversen Mikroskop während des Experiments. Die LOMINE-Parameter (Pulsdauer, Pulsamplitude etc.) konnten über die grafische Benutzeroberfläche der Systemsoftware variiert werden, um die Membranöffnung an den Nadelelektroden zu optimieren. Die Auswertung der Messdaten erfolgt zurzeit *offline* nach dem Experiment (6.3).

**Zellkultur:** Zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen wurde das Labormuster mit einer integrierten Temperierung sowie einem Aufsatz zur CO<sub>2</sub>-Begasung der Zellkultur während der Messung ausgestattet (6.4.2). Bei den Experimenten war eine Variabilität (7.2.2) im Zellwachstum zu beobachten. Die Ursachen hierfür könnten in der Zellkultur (Kulturbedingungen, Alter der Zellen, Auswahl des Zelltyps etc.), in der gewählten Zellzahl bei der Aussaat oder Variationen in der Zell-Adhäsion (Beschichtung, Chipoberfläche etc.) liegen. Jedoch erwiesen sich die Sensorchips für Langzeitkultivierungen der empfindlichen primären Zellkulturen und Zelllinien als biokompatibel.

**DEP-Zellpositionierung:** Mit DEP-Elektroden wurden verschiedene Zelltypen wie menschliche Hautfibroblasten, L929 Tumorzellen und primäre Mauszellen (Glia und Neurone) erfolgreich positioniert, die danach im Bereich der Nadelelektroden anwuchsen [10, 11]. Laut Koester *et al.* [74] kann es mit der Zeit zu einer Abwanderung der Zellen von der Nadelelektrode kommen, was jedoch durch das Aufbringen von chemischen Gruppen auf der Chipoberfläche beeinflusst werden kann.

Aufgrund des Fehlens von Sensorchips, bei denen DEP- und Nadelelektroden kontaktiert waren, konnten nach der DEP-Zellpositionierung keine Signalableitungen oder LOMINE-Versuche vorgenommen werden.

Die erfolgreichen Experimente zur Positionierung von Zellen an die Nadelelektroden waren ausschlaggebend für die Integration von DEP-Elektroden in den aktuellen Sensorchip.

**LOMINE:** Simulationen bestätigten, dass die Zellmembran durch die unmittelbare Nähe zur Elektroporationselektrode einem starken, lokalen elektrischen Feld ausgesetzt ist (5.3). Die durchgeführten Experimente und Untersuchungsmethoden zeigten, dass es möglich ist die Zellmembran gezielt zu öffnen (7.2.3-7.2.7). Inwieweit bei *Patch-Clamp*-Ableitungen nach LOMINE der *Giga-Seal* erhalten bleibt und stabile Ganzzelleableitungen möglich sind, konnte mit den Nadelelektroden aufgrund ihrer hohen Elektrodenwiderstände noch nicht vollständig geklärt werden (7.1.2). Diese Untersuchungen werden erstmalig mit den *Patch-Sites* des aktuellen Messsystems vorgenommen, die Pipettenwiderstände unterhalb 10 M $\Omega$  besitzen.

**Extrazelluläre Signalableitung:** Extrazelluläre Signalableitungen an primären HMZ zeigten sehr hohe Signalamplituden (7.2.8). Die Signalform und die Kontraktionsfrequenz führten zu vergleichbaren Ergebnissen wie bei Experimenten mit dem klassischen *Patch-Clamp*-Aufbau [245]. Bei den Messungen zeigte sich eine Verringerung der Signalamplitude über die Messdauer (**Abbildung 7-8 A**). Die Ursache könnte in einer „Vergiftung“ der Elektroden durch elektrochemische Prozesse liegen [19].

**Intrazelluläre Signalableitung:** Nach Einsatz der LOMINE wurden sprunghafte Änderungen der Spannung  $U_{EL}$  an den Nadelelektroden beobachtet, die in ihrer Höhe und ihrem Vorzeichen als intrazelluläre Ableitungen des Transmembranpotentials interpretiert werden konnten (7.2.7, **Abbildung 6-20 B**). Verschiedene Nachweisverfahren

konnten zwar den Erfolg der intrazellulären Signalableitung nicht zweifelsfrei bestätigen, aber als begründeter Hinweis angesehen werden.

Die Erkenntnisse aus den Systemstudien und den durchgeführten Experimenten sowie die Vorarbeiten an Hard- und Software (LOMINE, *Voltage-Clamp*, DEP, LIMS etc.) dienen als Grundlage für das Folgeprojekt, dessen aktueller Entwicklungsstand im Ausblick (**Kapitel 9**) vorgestellt wird.

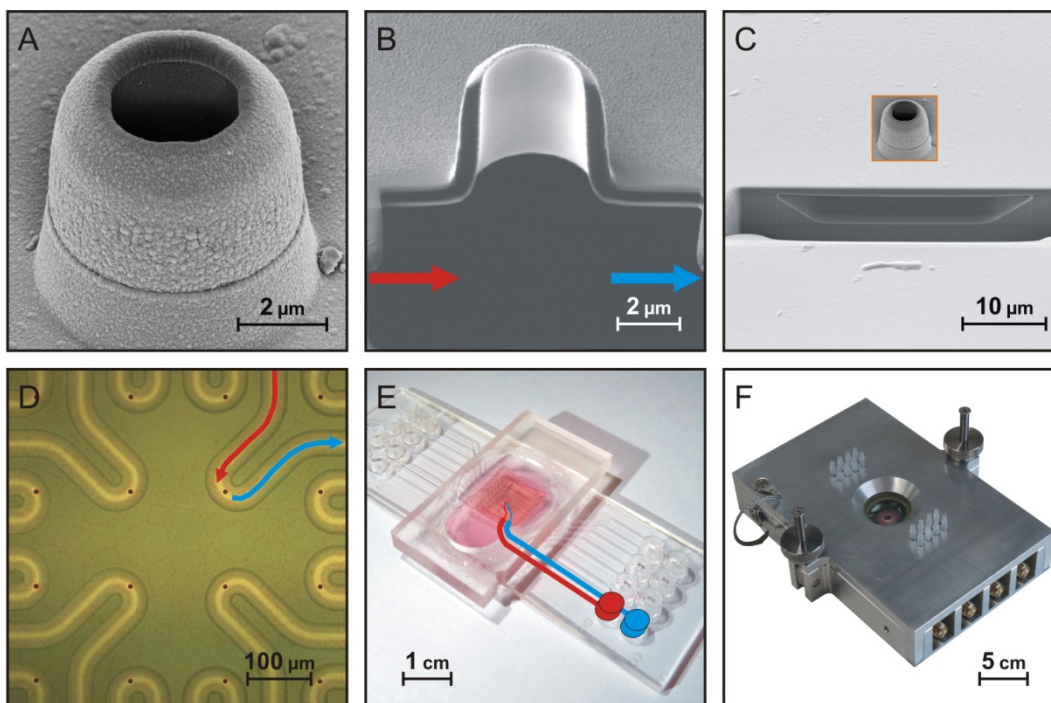
„It seems ironic that planar patch clamp was developed by academics but now the academics are waiting for this technology to become affordable.“ [100]

## 9 Ausblick

Aufgrund der Nachfrage nach preiswerten Hochdurchsatzverfahren werden sich die APC-Systeme stetig weiterentwickeln. Es ist anzunehmen, dass durch neue Fertigungs- und Bearbeitungstechnologien die Anzahl der Messkammern pro Mikrotiter-Zellkulturplatte bald standardmäßig auf 1536 steigen wird [247]. Diese Miniaturisierung hilft den Einsatz an Substanzen zu verringern und auch den Durchsatz zu erhöhen. Technische Herausforderungen ergeben sich jedoch für die Durchsatzsteigerung, bspw. in der Signableitung, Datenauswertung und dem *Liquid-Handling*. Eine Schätzung ergab, dass von suspendierten Zellen mit einem 384-Kanal-Dispenser an mindestens 1536 *Patch-Sites* parallel abgeleitet werden müsste, um im Hochdurchsatz ca. 40.000 Datenpunkte pro Tag zu erhalten [35]. Für vernetzte adhärente Zellen entspricht der klassische (manuelle) *Patch-Clamp*-Aufbau jedoch immer noch dem Stand der Technik.

Die Arbeiten am *Patch-on-Chip*-System PoreGenic® werden im BMBF-Projekt „PoreGenic® - Wirkstofftests und Grundlagenforschung an adhären vernetzten Zellen“ (Förderkennzeichen: 0315809) im Rahmen der Förderinitiative „Gründungsoffensive Biotechnologie“ (GO-Bio) am Lehrstuhl für Biophysik fortgeführt. Das PoreGenic® *Hand-Setup* in **Abbildung 9-1** ist die nächste Entwicklungsstufe, um die Elektrophysiologie von Zellnetzwerken in einem APC-System untersuchen zu können. Die Signableitung erfolgt mit einem weiterentwickelten Mehrkanal *Patch-Clamp*-Verstärker. Der Sensorchip mit einem 4×4 MPSA basiert auf einem Glassubstrat und wird durch einen Fluidik-Chipträger kontaktiert. Der Chipträger im Standard-Objektträgerformat besteht aus transparentem Kunststoff. Jedes MPSA-Element besitzt einen mikrofluidischen Zu- und Ablauf (**Abbildung 9-1 D, E**). Mit dem PoreGenic® *Hand-Setup* wurden an suspendierten Einzelzellen *Seal*-Widerstände über 0,5 GΩ erreicht. Ein nächster Entwicklungsschritt sieht vor, den Übergang in die Ganzzelleableitung durch Elektroporation oder starkes Ansaugen zu erreichen. Derzeit werden Experimente für die Optimierung der *Seal*-Widerstände an vernetzten adhären Zellkulturen durchgeführt. Dafür werden neue Technologien für eine hohe *Seal*-Qualität entwickelt, bspw. um die *Patch-Site* vor Verunreinigungen zu schützen.

Eine repräsentative Umfrage bei *Patch-Clamp*-Anwendern im Forschungs- und Pharmabereich bestätigte, dass wegen des gesteigerten Informationsgewinns ein großes Interesse an Ionenkanalanalysen von Zellnetzwerken besteht. Mit der Lösung der technischen Herausforderungen kann das PoreGenic® *Patch-on-Chip*-System stabile Ganzzelleleitungen und eine *Gigaseal*-Wahrscheinlichkeit über 80 % erreichen und somit die automatisierte Elektrophysiologie revolutionieren. Die Validierung des Systems wird anhand relevanter pharmakologischer Studien, wie der Bestimmung der hERG-Kanalaktivität, vorgenommen. Aufgrund der Menge an generierten Messdaten wird es notwendig sein, die Daten bereits *online* in pharmakologisch relevante Werte umzuwandeln.



**Abbildung 9-1: PoreGenic® Hand-Setup 1.0**

**A:** REM-Aufnahme eines MPSA-Elements mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 2 µm. Originalaufnahme: Frau R. Lange (IEF, IGS, Universität Rostock). **B:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahme eines MPSA-Elements. FIB-Präparation und Originalaufnahme: **Chiphersteller**. **B, D, E:** Überlagerte schematische Darstellung für den mikrofluidischen Zulauf (rot) und Ablauf (blau). **C:** FIB-Schnitt und REM-Aufnahme eines Fluidikkanals. Das Inlet (orange umrahmt) veranschaulicht das Größenverhältnis eines MPSA-Elements zum Fluidikkanal. FIB-Präparation und Originalaufnahme: M. Zwanzig (**Fraunhofer IZM, Berlin**). **D:** Oberfläche des Sensorchips mit 16 *Patch-Sites* (schwarze Punkte). **E:** Sensorchip mit acht fluidisch kontaktierten *Patch-Sites*. Der Chipträger im Standard-Objekträgerformat (75,5 mm x 25,5 mm x 1,5 mm) besitzt 16 Fluidanschlüsse. In die Fluidanschlüsse taucht jeweils eine Ag/AgCl-Elektrode für die Signalableitung ein. **F:** *Hand-Setup* mit acht *Patch-Clamp*-Kanälen für den Anschluss eines weiterentwickelten 16 Kanal *Patch-Clamp*-Verstärkers Triton+ (Tecella) für die Signalableitung (nicht dargestellt).



## Literaturverzeichnis

- [1] U. B. Kaupp. Nobelpreis für Medizin - Messung von Strömen an einzelnen Ionenkanälen. *Spektrum der Wissenschaft* 12, 20-24. 1991.
- [2] W. Baumann, E. Schreiber, G. Krause, S. Stüwe, A. Podssun, S. Homma, H. Anlauf, R. Rosner, I. Freund, M. Lehmann. Multiparametric neurosensor microchip. *Euroensors XVI. Proceedings Euroensors XVI* , 1169-1172. 2002.
- [3] E. Neher, B. Sakmann. Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft* , 48-56. 1992.
- [4] P. Moore, *Nature* 438, (2005) 699.
- [5] J. Dunlop, M. Bowlby, R. Peri, D. Vasilyev, R. Arias. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 358-368. 2008. Nature Publishing Group.
- [6] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat Rev Drug Discov* 5, (2006) 993-996.
- [7] J. Owens. 2006 drug approvals: finding the niche. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 99-101. 2007. Nature Publishing Group.
- [8] T. J. Jentsch, C. A. Hubner, J. C. Fuhrmann, *Nat Cell Biol* 6, (2004) 1039-1047.
- [9] F. Lehmann-Horn, K. Jurkat-Rott, *Channelopathies*, Elsevier B.V., 2000.
- [10] C. Tautorat, P. J. Koester, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Cismak, A. Heilmann, J. Gimsa, H. Beikirch, L. Jonas, W. Baumann. Intracellular potential measurements of adherently growing cells using micro-needle arrays. *μTAS 2008 Conference, Chemical and Biological Microsystems Society. The Proceedings of μTAS 2008 Conference* , 1777-1780. 2008. San Diego, California, USA, Chemical and Biological Microsystems Society.
- [11] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann, *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 55, (2010) 6-9.
- [12] W. Baumann, R. Ehret, M. Lehmann, G. Igel, H.-J. Gahle, B. Wolf, U. Sieben, I. Freund, M. Brischwein. Verfahren und Vorrichtung zur intrazellulären Manipulation einer biologischen Zelle. [DE 19841337, EP 962524A1, US 6475760]. 1998.
- [13] W. Baumann, R. Ehret, M. Lehmann, G. Igel, H.-J. Gahle, B. Wolf, U. Sieben, I. Freund, M. Brischwein. Verfahren und Vorrichtung zur Messung eines Zellpotentials. [DE 19827957, EP 960933, US 6368851, JP 11346794]. 1998.
- [14] C. Tautorat, P. J. Koester, A. Podssun, J. Gimsa, W. Baumann. Analytikchip zur Erfassung intrazellulärer Potentiale adhären wachsender Zellen nach lokaler Elektroporation: Einleitung - Elektrotechnische Aspekte. *Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2007* , 975-978. 2007. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
- [15] C. Tautorat, P. J. Koester, A. Podssun, H. Beikirch, J. Gimsa, L. Jonas, W. Baumann. Local Micro-Invasive Needle Electroporation - A Technical Challenge. *Conference Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, 340-341. 2008. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [16] C. Tautorat, D. Franz, J. Gimsa, W. Baumann, H. Beikirch, P. J. Koester. PoreGenic® - Patch-on-Chip-System für Zellnetzwerke. Gerlach, Gerald and Schütze, Andreas. 10. *Dresdner Sensor-Symposium*. 10. *Dresdner Sensor-Symposium* 43, 41-46. 2011. Dresden, Verlag der Wissenschaften GmbH.
- [17] D. Franz, C. Tautorat, O. Klink, U. Scheffler, T. Kroeger, J. Gimsa, W. Baumann, H. Beikirch, P. J. Koester. PoreGenic® - Patch-on-Chip System for Adherent Cellular Networks. *Biophysical Journal* 102[3], 583a. 2012.

- [18] A. Friedmann, A. Cismak, C. Tautorat, P. J. Koester, W. Baumann, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Heilmann, *Scanning* (2011).
- [19] P. J. Koester, C. Tautorat, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann, *Biosensors and Bioelectronics* 26, (2010) 1731-1735.
- [20] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, P. Ruther, J. Gaspar, O. Paul, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann. GO-Bio 3: PoreGenic® - 1. Whole-Cell Patch Clamp Recordings with a 3D-MEA chip. Proceedings of the 7th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays. 291-292. 2010. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [21] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, P. Ruther, J. Gaspar, O. Paul, H. Beikirch, J. Gimsa, W. Baumann. GO-Bio 3: PoreGenic® - 2. Cardiomyocyte Action Potential Recordings with a 3D-MEA chip. Proceedings of the 7th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays. 293-294. 2010. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [22] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Cismak, A. Heilmann, J. Gimsa, W. Baumann. The new LOMINE technology: 1. A novel and potent tool for intracellular whole-cell membrane potential recoding with 3D silver and platinum microelectrodes. in press . 2009.
- [23] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Cismak, A. Heilmann, J. Gimsa, W. Baumann. The LOMINE technology: 2. A potent tool for recoding of action potential of cardiomyocytes with 3D silver and platinum microelectrodes. *Biosensors and Bioelectronics* . 2009.
- [24] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, P. Ruther, O. Paul. Hollow Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications. *Micro Electro Mechanical Systems, 2009. MEMS 2009. IEEE 22nd International Conference on. Micro Electro Mechanical Systems, 2009. MEMS 2009. IEEE 22nd International Conference on* , 220-223. 2009.
- [25] K. K. Sriperumbudur, P. J. Koester, M. Stubbe, C. Tautorat, J. Held, W. Baumann, J. Gimsa. Local Electroporation of Single Adherent Cells by Micro-Structured Needle Electrodes. *COMSOL Conference 2009. Proceedings of the COMSOL Conference Bangalore 2009*. 2009.
- [26] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, P. Ruther, O. Paul. Integration of Microfluidic Features with Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications. *Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2009* , 476-479. 2009. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
- [27] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, A. Trautmann, P. Ruther, O. Paul. Microneedle Arrays for Intracellular Recording Applications. *IEEE MEMS Conference, Tucson, USA, 2008. Dig.Tech.Papers IEEE MEMS Conference, Tucson, USA, 2008* , 268-271. 2008.
- [28] P. J. Koester, C. Tautorat, A. Podssun, J. Gimsa, L. Jonas, W. Baumann. A new Principle for intracellular Potential Measurements of adherently growing Cells. *Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*. 271-274. 2008. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [29] P. J. Koester, C. Tautorat, A. Podssun, J. Gimsa, W. Baumann. Analytikchip zur Erfassung intrazellulärer Potentiale adhären wachsender Zellen nach lokaler Elektroporation: Einleitung - Biologische Aspekte. *Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2007* , 433-436. 2007. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
- [30] S. Sorota, X. S. Zhang, M. Margulis, K. Tucker, T. Priestley, *ASSAY and Drug Development Technologies* 3, (2005) 47-57.
- [31] J. A. Lundqvist, F. Sahlin, M. A. I. Aberg, A. Stroemberg, P. S. Eriksson, O. Orwar, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, (1998) 10356-10360.
- [32] B. Fermi, A. A. Fossa, *Nat Rev Drug Discov* 2, (2003) 439-447.
- [33] ICH. S7B: The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) By Human Pharmaceuticals. 2005.
- [34] C. Wood, C. Williams, G. J. Waldron, *Drug Discovery Today* 9, (2004) 434-441.

- [35] J. Comley, Drug Discovery World Fall, (2003) 47-57.
- [36] W. Tang, J. Kang, X. Wu, D. Rampe, L. Wang, H. Shen, Z. Li, D. Dunnington, T. Garyantes, J Biomol Screen 6, (2001) 325-331.
- [37] D. Owen, A. Silverthorne. CHANNELLING DRUG DISCOVERY. Current trends in ion channel drug discovery research. Drug Discovery World , 48-61. 2002.
- [38] W. Zheng, R. H. Spencer, L. Kiss, ASSAY and Drug Development Technologies 2, (2004) 543-552.
- [39] B. Fermini, in Ion Channels, (B. Fermini and B. T. Priest, Eds), Springer, Berlin Heidelberg, 2008, 1-25.
- [40] A. Lepple-Wienhues, K. Ferlinz, A. Seeger, A. Schaefer, Receptors and Channels 9, (2003) 13-17.
- [41] J. Denyer, J. Worley, B. Cox, G. Allenby, B. Martyn, Drug Discovery Today 3, (1998) 323-332.
- [42] J. Xu, X. Wang, B. Ensign, M. Li, L. Wu, A. Guia, J. Xu, Drug Discovery Today 6, (2001) 1278-1287.
- [43] P. B. Bennett, H. R. E. Guthrie, Trends in Biotechnology 21, (2003) 563-569.
- [44] R. Numann, P. A. Negulescu, Trends in Cardiovascular Medicine 11, (2001) 54-59.
- [45] A. Marty, E. Neher, in Single-Channel Recording, (B. Sakmann and E. Neher, Eds), Plenum Press, New York, 1995, 31-52.
- [46] T. Reimer, W. Baumann, P. J. Koester, J. Gimsa. Burst-induced Inhibition in Cortical Neuronal Networks in vitro. 7th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. Conference Proceedings of the 7th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays , 66-67. 2010. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [47] G. Adam, P. Läger, G. Stark, Physikalische Chemie und Biophysik, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- [48] R. Sherman-Gold, The Axon Guide, Axon Instruments Inc., 1993.
- [49] R. Glaser, in Electromanipulation of Cells, (U. Zimmermann and G. A. Neil, Eds), CRC Press, New York, 1996, 329-363.
- [50] S. J. Singer, G. L. Nicolson, Science 175, (1972) 720-731.
- [51] V. Sukhorukov, W. M. Arnold, U. Zimmermann, J. Membarin Biol. 132, (1993) 27-40.
- [52] J. Gimsa, T. Mueller, T. Schnelle, G. Fuhr. Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strength: dispersion of the cytoplasm. Biophysical Journal 71[1], 495-506. 1996.
- [53] E. Neumann, in Electroporation and Electrofusion in Cell Biology, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 61-82.
- [54] J. Gimsa, M. Simeonova, D. Wachner, J. Sudsiri, L. Haberland. On the influence of molecular properties on the subcellular absorption of electric field energy. COST 281, 3rd MCM and Workshop. Temperature Effects of RF-EMF . 2002. London, UK.
- [55] J. Gimsa, D. Wachner, Biophys J 75, (1998) 1107-1116.
- [56] K. Maswiwat, D. Wachner, J. Gimsa, Bioelectrochemistry 74, (2008) 130-141.
- [57] M. Lindau, E. Neher, Pflügers Archiv European Journal of Physiology 411, (1988) 137-146.
- [58] N. Fidler, J. M. Fernandez, Biophys J 56, (1989) 1153-1162.
- [59] M. Numberger, A. Draguhn, Patch-Clamp-Technik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin; Oxford, 1996.
- [60] P. Moore, Nature 438, (2005) 699-702.
- [61] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R.

- Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. bu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. D. Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Y. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. H. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. C. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. D. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, *Science* 291, (2001) 1304-1351.
- [62] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol* 117, (1952) 500-544.
- [63] E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, *Neurowissenschaften: Eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995.
- [64] J. Comley, *Drug Discovery World* 7, (2006) 62-79.
- [65] B. Hille, *Biophys Journal* 22, (1978) 283-294.
- [66] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1992.
- [67] G. Eisenman, R. Horn, *Journal of Membrane Biology* 76, (1983) 197-225.
- [68] C. R. Anderson, C. F. Stevens, *J. Physiol* 235, (1973) 655-691.
- [69] J. A. Sanchez, J. A. Dani, D. Siemen, B. Hille, *J. Gen. Physiol.* 87, (1986) 985-1001.
- [70] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2001.
- [71] R. Heinrich, M. Gaestel, R. Glaser, *Journal of Theoretical Biology* 96, (1982) 211-231.
- [72] A. L. Hodgkin, B. Katz, *J. Physiol* 108, (1949) 37-77.
- [73] D. E. Goldman, *J. Gen. Physiol.* 27, (1943) 37-60.
- [74] P. J. Koester, C. Tautorat, A. Podssun, J. Gimsa, L. Jonas, W. Baumann. Dielectrophoretic Positioning of Cells for the Measurement of Intracellular Potentials using Kidney-Shaped Electrodes. 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. Conference Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays , 317-318. 2008. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [75] P. J. Koester, S. M. Buehler, M. Stubbe, C. Tautorat, M. Niendorf, W. Baumann, J. Gimsa, *Lab Chip* 10, (2010) 1579-1586.
- [76] R. Schrott. Integration eines Neuro-Sensors in ein Messsystem sowie Untersuchungen zur Unit-Separation. 1-191. 2009. Rostock, University Rostock.

- [77] C. Tautorat. Entwurf und Realisierung einer Testumgebung für einen neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor. Diplomarbeit. 2005. Universität Rostock.
- [78] R. Schrott, G. Bausch, K.-P. Kirchner, C. Tautorat, W. Baumann, D. Weiss, H. Beikirch. Evaluation System for Neural Data Acquisition and Analysis. 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. Conference Proceedings of the 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays , 77-78. 2006. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [79] R. Schrott, C. Tautorat, A. Podssun, P. J. Koester, K.-P. Kirchner, G. Bausch, H. Beikirch, W. Baumann, I. Freund. CMOS Sensorsystem zur Untersuchung elektrisch aktiver Zellen. MikroSystemTechnik Kongress 2007. Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2007 , 445-447. 2007. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
- [80] R. Schrott, C. Tautorat, K.-P. Kirchner, P. J. Koester, G. Bausch, W. Baumann, I. Freund, H. Beikirch. Hardwareentwurf für ein Messsystem zur Untersuchung elektrisch aktiver Zellen. 12. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik. Proceedings 12.Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik , 93-97. 2007.
- [81] P. J. Koester. Biochips for the Detection of Biological Cell Potentials - PhD Thesis. 2010. Universität Rostock.
- [82] A. Stett, U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch, H. Haemmerle. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. Anal Bioanal Chem. 377[3], 486-495. 2003.
- [83] E. Schreiber, W. Baumann, G. Krause, A. Podssun, S. Homma, H. Anlauf, R. Rosner, I. Freund, M. Lehmann. Optimization of a Standard CMOS Process-Based MEA Chip for Recording of Neuronal Activity. SIMEA 2003. Proceedings SIMEA 2003 . 2002. Denton Texas USA.
- [84] K. S. Lee, N. Akaike, A. M. Brown, Journal of Neuroscience Methods 2, (1980) 51-78.
- [85] N. Fertig, R. H. Blick, J. C. Behrends, Biophys J 82, (2002) 3056-3062.
- [86] E. Neher, B. Sakmann, Nature 260, (1976) 799-802.
- [87] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, Pfluegers Arch. 391, (1981) 85-100.
- [88] R. Penner, in Single-Channel Recording, (B. Sakmann and E. Neher, Eds), Plenum Press, New York, 1995, 3-30.
- [89] J. Halliwell, M. Whitaker, D. Ogden, in Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, (D. Ogden, Ed), The Company of Biologists Ltd., Cambridge, 1994, 1-15.
- [90] F. J. Sigworth, E. Neher, Nature 287, (1980) 447-449.
- [91] R. A. Levis, J. L. Rae, in Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques, (W. Walz, Ed), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2007, 1-34.
- [92] E. Neher. Unit conductance studies in biological membranes. Baker, P. F. Techniques in Cellular Physiology. 1-16. 1981. Amsterdam, Elsevier.
- [93] B. Sakmann, E. Neher, in Single-Channel Recording, (B. Sakmann and E. Neher, Eds), Plenum Press, New York, London, 1995, 637-650.
- [94] L. Kiss, P. B. Bennett, V. N. Uebele, K. S. Koblan, S. A. Kane, B. Neagle, K. Schroeder, ASSAY and Drug Development Technologies 1, (2003) 127-135.
- [95] T. Sordel, F. Kermarrec, Y. Siquin, I. Fonteille, M. Labeau, F. Sauter-Starace, C. Pudda, F. de Crecy, F. Chatelain, M. De Waard, C. Arnoult, N. Picollet-D'hahan, Biomaterials 31, (2010) 7398-7410.
- [96] D. Ogden, P. Stanfield, in Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, (D. Ogden, Ed), The Company of Biologists Ltd., Cambridge, 1994, 53-78.
- [97] D. P. Corey, C. F. Stevens, in Single-Channel Recording, (B. Sakmann and E. Neher, Eds), Plenum Press, New York, 1983, 53-60.
- [98] T. M. Suchyna, V. S. Markin, F. Sachs, Biophys J 97, (2009) 738-747.

- [99] A. Molleman, Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 2002.
- [100] C. Mathes, Expert Opinion on Therapeutic Targets 10, (2006) 319-327.
- [101] M. Pusch, E. Neher, Pflügers Archiv European Journal of Physiology 411, (1988) 204-211.
- [102] D. Ogden, in Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, (D. Ogden, Ed), The Company of Biologists Ltd., Cambridge, 1994, 407-437.
- [103] H. Sontheimer, M. L. Olsen, in Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques, (W. Walz, Ed), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2007, 35-68.
- [104] M. B. Jackson, Current Protocols in Neuroscience (1997) 6.6.1-6.6.30.
- [105] K. S. Cole, H. J. Curtis, J. Gen. Physiol. 22, (1938) 37-64.
- [106] K. S. Cole, H. J. Curtis, J. Gen. Physiol. 22, (1939) 649-670.
- [107] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, B. Katz, Arch. Sci. Physiol. 3, (1949) 129-150.
- [108] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol 116, (1952) 449-472.
- [109] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol 116, (1952) 497-506.
- [110] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol 116, (1952) 473-496.
- [111] W. Schwarz, J. Rettinger, Foundations of electrophysiology, Shaker Verlag, Aachen, 2003.
- [112] A. S. Finkel, P. W. Gage, in Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes, (T. G. Jr. Smith, H. Lecar, S. J. Redman, and P. W. Gage, Eds), Williams & Wilkins, Baltimore, 1985, 47-94.
- [113] A. S. Finkel, S. J. Redman, Journal of Neuroscience Methods 11, (1984) 101-127.
- [114] Z. Zhou, Q. Gong, B. Ye, Z. Fan, J. C. Makielski, G. A. Robertson, C. T. January, Biophys J 74, (1998) 230-241.
- [115] M. G. Blanton, J. J. Lo Turco, A. R. Kriegstein, Journal of Neuroscience Methods 30, (1989) 203-210.
- [116] A. Strickholm, Journal of Neuroscience Methods 61, (1995) 53-66.
- [117] Tecella. Tecella - Product Information. 2010. USA, Tecella LLC.
- [118] F. J. Sigworth, Journal of Neuroscience Methods 56, (1995) 195-202.
- [119] Cellectricon AB. Robust and Reliable Performance: The Dynaflow®HT system - next generation integrated patch clamp technology. Dynaflow®HT Application Note. 2010.
- [120] C. M. Armstrong, R. H. Chow, Biophys Journal 52, (1987) 133-136.
- [121] A. J. Sherman, A. Shrier, E. Cooper, Biophys J 77, (1999) 2590-2601.
- [122] E. Neher, Methods in Enzymology 207, (1992) 123-131.
- [123] E. Neher, in Single-Channel Recording., (B. Sakmann and E. Neher, Eds), Plenum, New York, 1995, 147-154.
- [124] C. Farre, M. George, A. Brueggemann, N. Fertig, Drug Discovery Today: Technologies 5, (2008) e23-e28.
- [125] T. Knott, S. Single, A. Stett, Laborwelt IV/2002, (2002) 20-22.
- [126] J. C. Behrends, N. Fertig, in Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques, (W. Walz, Ed), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007, 411-433.
- [127] P. G. KOSTYUK, O. A. KRISHTAL, V. I. PIDOPLICHKO, ., Nature 257, (1975) 691-693.
- [128] A. Stett, V. Bucher, C. Burkhardt, U. Weber, W. Nisch, Medical & Biological Engineering & Computing 41, (2003) 233-240.
- [129] C. Mathes, Drug Discovery Today 8, (2003) 1022-1024.
- [130] D. V. Vasilyev, T. L. Merrill, M. R. Bowlby, J Biomol Screen (2005) 1087057105279481.

- [131] D. Vasilyev, T. Merrill, A. Iwanow, J. Dunlop, M. Bowlby, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 452, (2006) 240-247.
- [132] M. Fejtl, U. Czubayko, A. Hümmer, T. Krauter, A. Lepple-Wienhues, in *Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques*, (W. Walz, Ed), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007, 435-450.
- [133] M. Asmild, N. Oswald, K. M. Krzywkowski, S. Friis, R. B. Jacobsen, D. Reuter, R. Taboryski, J. Kutchinsky, R. K. Vestergaard, R. L. Schrøder, C. B. Sørensen, M. Bech, *Receptors and Channels* 9, (2003) 49-58.
- [134] MD. IonWorks Quattro System. A high-throughput system for electrophysiological screening. Datenblatt. 2010. Sunnyvale, CA 94089 USA, Molecular Devices, Inc.
- [135] J. M. Perkel, *BioTechniques* 48, (2010) 25-29.
- [136] C. Farre, S. Stoelzle, C. Haarmann, M. George, A. Brueggemann, N. Fertig, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11, (2007) 557-565.
- [137] SBS. ANSI/SBS 1-2004: Microplates - Footprint Dimensions. 1-8. 2004. Society for Biomolecular Sciences.
- [138] SBS. ANSI/SBS 2-2004: Microplates - Height Dimensions. 1-9. 2004. Society for Biomolecular Sciences.
- [139] SBS. ANSI/SBS 3-2004: Microplates - Bottom Outside Flange Dimensions. 1-10. 2004. Society for Biomolecular Sciences.
- [140] SBS. ANSI/SBS 4-2004: Microplates - Well Positions. 1-13. 2004. Society for Biomolecular Sciences.
- [141] A. Lepple-Wienhues, D. Lassen, A. Hümmer, U. Czubayko, M. Knirsch, A. Golubovic, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 12, (2009) 73-77.
- [142] WPF. Company Insight: Revolutionary pipette. *World Pharmaceutical Frontiers* , 43. 2008. London, UK, Global Trade Media, a trading division of Cornhill Publications Limited.
- [143] J. Q. Ly, G. Shyy, D. L. Misner, *Clinics in Laboratory Medicine* 27, (2007) 201-208.
- [144] K. Schroeder, B. Neagle, D. J. Trezise, J. Worley, *J Biomol Screen* 8, (2003) 50-64.
- [145] Sophion. QPatch Amplifiers. Product Specification. 2010. Sophion Bioscience A/S.
- [146] Y. Tanaka. 16-Channel Patch-Clamp-Amplifier Triton+ (Tecella LLC). 2011.
- [147] Nanion. Catalog - Smart tools for ion channel research. Application Note. 2010. Nanion Technologies GmbH.
- [148] S. M. Frisch, H. Francis, *The Journal of Cell Biology* 124, (1994) 619-626.
- [149] S. M. Frisch, R. A. Screaton, *Current opinion in cell biology* (2001) 555-562.
- [150] M. Fejtl, U. Czubayko, A. Hümmer, T. Krauter, A. Lepple-Wienhues. Automating True Manual Patch Clamping. *Genetic Engineering & biotechnology News* 25[14]. 2005. New York, Mary Ann Liebert, Inc. publishers.
- [151] K. H. Schoenbach, R. P. Joshi, J. F. Kolb, C. Nianyong, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, S. J. Beebe, *Proceedings of the IEEE* 92, (2004) 1122-1137.
- [152] D. P. Tieleman, *BMC Biochemistry* 5, (2004) 10.
- [153] J. C. Weaver, Y. Chizmadzhev, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41, (1996) 135-160.
- [154] U. Zimmermann, in *Electromanipulation of Cells*, (U. Zimmermann and G. A. Neil, Eds), CRC Press, New York, 1996, 1-106.
- [155] J. C. Weaver, in *Electroporation Protocols for Microorganisms*, (J. A. Nickoloff, Ed), Humana Press, 1995, 1-26.
- [156] J. A. Nickoloff, *Electroporation Protocols for Microorganisms*, Humana Press, 1995.
- [157] G. Saulis, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, (1993) 249-265.



- [158] L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 83-95.
- [159] J. C. Weaver, K. T. Powell, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 111-126.
- [160] G. Pucihar, J. Krmelj, M. Rebersek, T. B. Napotnik, D. Miklavcic, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 58, (2011) 3279-3288.
- [161] Y. Huang, B. Rubinsky, *Biomedical Microdevices* 2, (1999) 145-150.
- [162] Y. Huang, B. Rubinsky, *Sensors and Actuators A: Physical* 89, (2001) 242-249.
- [163] Y. C. Lin, C. M. Jen, M. Y. Huang, C. Y. Wu, X. Z. Lin, *Sensors and Actuators B: Chemical* 79, (2001) 137-143.
- [164] P. M. Ghosh, Keese C.R., I. G. Giaever, *Biophys J* 65, (1993) 1602-1609.
- [165] M. B. Fox, D. C. Esveld, A. Valero, R. Luttge, H. C. Mastwijk, P. V. Bartels, A. van den Berg, R. M. Boom, *Anal Bioanal Chem* 385, (2006) 474-485.
- [166] J. Kinoshita, T. Y. Tsong, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 471, (1977) 227-242.
- [167] J. Gimsa, in *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*, (A. V. Delgado, Ed), Marcel Dekker Inc., New York, 2001, 369-400.
- [168] G. Fuhr, R. Hagedorn, R. Glaser, J. Gimsa, T. Mueller, *Journal of Bioelectricity* 6, (1987) 49-69.
- [169] I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik, Y. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko, M. P. Tarasevich, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 104, (1979) 37-52.
- [170] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, A. I. Sokirko, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 940, (1988) 275-287.
- [171] F. Riemann, U. Zimmermann, G. Pilwat, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 394, (1975) 449-462.
- [172] J. M. Crowley. Electrical Breakdown of Bimolecular Lipid Membranes as an Electromechanical Instability. *Biophysical Journal* 13[7], 711-724. 1973.
- [173] J. Gehl, *Acta Physiologica Scandinavica* 177, (2003) 437-447.
- [174] M. P. Rols, J. Teissie, *Biophys J* 58, (1990) 1089-1098.
- [175] E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, *Bioelect. Bioenerget.* 48, (1999) 3-16.
- [176] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, *Biophys J* 14, (1974) 881-899.
- [177] T. Y. Tsong, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 149-163.
- [178] B. Gabriel, J. Teissié, *Biophys J* 73, (1997) 2630-2637.
- [179] H. Bluhm, W. Frey, C. Gusbeth, M. Sack, C. Schultheiss. *Aufschluss und Abtötung biologischer Zellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder. Nachrichten - Forschungszentrum Karlsruhe* 35[3], 105-110. 2003. Karlsruhe, Forschungszentrum Karlsruhe.
- [180] E. Tekle, R. D. Astumian, P. B. Chock, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172, (1990) 282-287.
- [181] E. Tekle, R. D. Astumian, P. B. Chock, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, (1991) 4230-4234.
- [182] K. Nowak, E. Mix, J. Gimsa, U. Strauss, K. K. Sriperumbudur, R. Benecke, U. Gimsa, *Parkinson's Disease* (2011).
- [183] J. Kutchinsky, S. Friis, M. Asmild, R. Taboryski, S. Pedersen, R. K. Vestergaard, R. B. Jacobsen, K. Krzykowski, R. L. Schrøder, T. Ljungstrøm, N. Helix, C. B. Sørensen, M. Bech, N. J. Willumsen, *ASSAY and Drug Development Technologies* 1, (2003) 685-693.
- [184] O. Tovar, L. Tung, *Pacing and Clinical Electrophysiology* 14, (1991) 1887-1892.



- [185] C. Ionescu-Zanetti, A. Blatz, M. Khine, *Biomedical Microdevices* 10, (2008) 113-116.
- [186] J. Held, J. Gaspar, P. J. Koester, C. Tautorat, A. Cismak, A. Heilmann, W. Baumann, A. Trautmann, P. Ruther, O. Paul. *Microneedle Arrays for Intracellular Recording Applications*. IMTEK Poster Session 2008. 2008.
- [187] J. Olofsson, K. Nolkranz, F. Ryttsén, B. A. Lambie, S. G. Weber, O. Orwar, *Current Opinion in Biotechnology* 14, (2003) 29-34.
- [188] J. Rae, R. Levis, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 443, (2002) 664-670.
- [189] W. Krassowska, G. S. Nanda, M. B. Austin, S. B. Dev, D. P. Rabussay, *Annals of Biomedical Engineering* 31, (2003) 80-90.
- [190] G. Saulis, M. S. Venslauskas, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32, (1993) 221-235.
- [191] E. Neumann, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 28, (1992) 247-267.
- [192] J. Gimsa, D. Wachner, *European Biophysics Journal* 30, (2001) 463-466.
- [193] K. Kinosita, T. Y. Tsong, *Nature* 268, (1977) 438-441.
- [194] M. P. Rols, J. Teissie. *Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration*. *Biophysical Journal* 75[3], 1415-1423. 1998.
- [195] D. P. Tieleman, H. Leontiadou, A. E. Mark, S. J. Marrink, *J. Am. Chem. Soc.* 125, (2003) 6382-6383.
- [196] T. Kotnik, D. Miklavcic, *Biophys J* 90, (2006) 480-491.
- [197] J. Gimsa, D. Wachner. *A Polarization Model Overcoming the Geometric Restrictions of the Laplace Solution for Spheroidal Cells: Obtaining New Equations for Field-Induced Forces and Transmembrane Potential*. *Biophysical Journal* 77[3], 1316-1326. 1999.
- [198] J. Held. *Microneedle Electrode Arrays for Cellular Recording Applications*. 2010. Albert-Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau.
- [199] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, O. Paul. *Solid Silver Microneedle Electrode Arrays for Intracellular Recording Applications*. 7th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. *Conference Proceedings of the 7th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, 247-248. 2010. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [200] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul. *Microneedle Electrode Arrays with Dielectrophoresis Electrodes for Intracellular Recording Applications*. 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. *Conference Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays*, 295-296. 2008.
- [201] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul. *Characterization of the DRIE Fabrication of Cell-Penetrating Microneedles*. *Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2007*, 845-848. 2007. Berlin, Offenbach, VDE Verlag GmbH.
- [202] J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, M. Hagner, A. Cismak, A. Heilmann, O. Paul, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20 (2), (2010) 1-11.
- [203] H. P. Schwan, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 3-21.
- [204] F. J. Iglesias, C. Santamaria, M. C. Lopez, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 37-57.
- [205] G. A. Hofmann, in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, (E. Neumann, A. E. Sowers, and C. A. Jordan, Eds), Plenum Press, New York, 1989, 389-407.
- [206] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- [207] G. Fuhr, U. Zimmermann, S. G. Shirley, in *Electromanipulation of Cells*, (U. Zimmermann and G. A. Neil, Eds), CRC Press, New York, 1996, 259-328.
- [208] J. Gimsa, P. Marszalek, U. Loewe, T. Y. Tsong. *Dielectrophoresis and electrorotation of neurospora slime and murine myeloma cells*. *Biophysical Journal* 60[4], 749-760. 1991.

- [209] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Sakowski, W. Baumann, J. Gimsa. Dielectrophoretic Neuron Positioning on MEAs in Semiconductor Chips for the Extracellular Detection of the Neuronal Network Activity. 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays. Conference Proceedings of the 6th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays , 319-320. 2008. BIOPRO Baden-Württemberg GmbH.
- [210] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Sakowski, W. Baumann, J. Gimsa. Dielectrophoretic neuron trapping on semiconductor chips for the extracellular detection of the neuronal network activity. II1-O-017. 13th International Biotechnology Symposium (IBS) and Exhibition, Dalian, China. Abstracts of 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition 136S, 120-121. 2008. Amsterdam, Elsevier. 12-10-2008.
- [211] Kyocera. 68LCC (.443 SQ. CAV.) - Drawing PB-C87505. 1987. Kyocera.
- [212] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Held, J. Gaspar, P. Ruther, O. Paul, A. Cismak, A. Heilmann, J. Gimsa, W. Baumann. Local micro-invasive needle electroporation (LOMINE) of single cells attached on silicon chips. V5-O-036. 13th International Biotechnology Symposium (IBS) and Exhibition, Dalian, China. Abstracts of 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition 136S, 462. 2008. Amsterdam, Elsevier. 12-10-2008.
- [213] U. Tietze, Ch. Schenk, Halbleiter-Schaltungstechnik, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002.
- [214] TI. OPA129 - Ultra-Low Bias Current Difet® OPERATIONAL AMPLIFIER. 2007. Dallas, Texas, Texas Instruments Inc.
- [215] Fluxion. IonFlux System Electronics - Amplifiers. [Technical note]. 2009. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [216] Yamaichi. IC51 Series (Clamshell) - Plastic Lead Chip Carrier (PLCC). C-38-C-40. 2004.
- [217] NI. NI 625x Specifications. 371291 H-01. 2007. National Instruments Corporation.
- [218] Meder. CRF Series - 7 GHz High Frequency Reed Relay for 50 Ohm Impedance. 2009. Singen, Deutschland, MEDER electronic AG.
- [219] NI. DAQ M Series - M Series User Manual. 371022K-01. 2008. National Instruments Corporation.
- [220] LT. LT1351 - 250µA, 3MHz, 200V/µs Operational Amplifier. 2007. Linear Technology Corporation.
- [221] D. Colqhoun, in Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, (D. Ogden, Ed), The Company of Biologists Ltd., Cambridge, 1994, 101-139.
- [222] LT. LTC1563-2/LTC1563-3 Active RC, 4th Order Lowpass Filter Family. 156323fa. Rev A. 2005. Linear Technology Corporation.
- [223] M. Kreir, C. Farre, M. Beckler, M. George, N. Fertig, Lab Chip 8, (2008) 587-595.
- [224] Sophion. QPatch HT/HTX Automated Patch Clamp Systems. Product Specification. 2010. Sophion Bioscience A/S.
- [225] C. Ionescu-Zanetti, R. M. Shaw, J. Seo, Y. N. Jan, L. Y. Jan, L. P. Lee, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, (2005) 9112-9117.
- [226] D. T. Sawyer, A. Sobkowiak, J. L. Roberts, Electrochemistry for Chemists, John Wiley & Sons, 1995.
- [227] K. Cammann, H. Galster, Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden: Eine Einführung für Praktiker, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
- [228] C. Farre, A. Haythornthwaite, S. Stoelzle, M. Kreir, M. George, A. Brueggemann, N. Fertig. Port-a-patch and patchliner: high fidelity electrophysiology for secondary screening and safety pharmacology. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 12[1], 24-37. 2009.
- [229] Fluxion. Temperature Dependent hERG Channel Pharmacology and Kinetics on the IonFlux System. Application note. 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.

- [230] Cellectricon AB. Physiological Temperature changes hERG Inhibition significantly. Dynaflo<sup>®</sup> Application Note. 2008.
- [231] H. Guthrie, F. S. Livingston, U. Gubler, R. Garippa, *J Biomol Screen* 10, (2005) 832-840.
- [232] G. E. Kirsch, E. S. Trepakova, J. C. Brimecombe, S. S. Sidach, H. D. Erickson, M. C. Kochan, L. M. Shyjka, A. E. Lacerda, A. M. Brown, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 50, (2004) 93-101.
- [233] Heraeus. Platinum Resistance Temperature Detector. 30910015 Index B. 2010. Kleinostheim, Deutschland, Heraeus Sensor Technology GmbH.
- [234] IST. Datenblatt: Platin-Temperatursensoren. 2009. Wattwil, Schweiz, IST AG.
- [235] Sophion. QPatch 16/16X Automated Patch Clamp Systems. Product Specification. 2010. Sophion Bioscience A/S.
- [236] R. W. de Boer, A. van Oosterom, *Medical & Biological Engineering & Computing* 16, (1978) 1-10.
- [237] R. J. O'Neill, L. Tung, *Biophys J* 59, (1991) 1028-1039.
- [238] P. J. Koester, C. Tautorat, J. Gimsa, W. Baumann. Electroporation in Bioanalytical Sensor Chips - A new Tool for the Analysis of Intracellular Potentials in Adherently Growing Cells. *Proceedings 12. Symposium Maritime Elektrotechnik, Elektronik und Informationstechnik*, 99-105. 2007.
- [239] A. Stett, C. Burkhardt, U. Weber, P. van Stiphout, T. Knott, *Receptors and Channels* 9, (2003) 59-66.
- [240] F. Ryttsén, C. Farre, C. Brennan, S. G. Weber, K. Nolkranz, K. Jardemark, D. T. Chiu, O. Orwar. Characterization of Single-Cell Electroporation by Using Patch-Clamp and Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* 79[4], 1993-2001. 2000.
- [241] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke, *Biophys Journal* 68, (1995) 2588-2600.
- [242] A. Heilmann, F. Altmann, A. Cismak, W. Baumann, M. Lehmann. Investigation of cell-sensor hybrid structures by Focused Ion Beam (FIB) technology. 2006 MRS Fall Meeting. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 983, 0983-LL03-03. 2007. Materials Research Society.
- [243] A. Friedmann, A. Hoess, A. Cismak, A. Heilmann, *Acta Biomaterialia* 7, (2011) 2499-2507.
- [244] O. N. Osipenko, R. J. Tate, A. M. Gurney, *Circulation Research* 86, (2000) 534-540.
- [245] D. Franz. Validierung von mit On-Chip-Elektroden gemessener intrazellulärer Potentiale mittels Patch-Clamp - Diplomarbeit. 2011. Universität Rostock.
- [246] A. M. Brown. Drugs, hERG and sudden death. *Cell Calcium* 35[6], 543-547. 2004.
- [247] K. C. Tang, J. Reboud, Y. L. Kwok, S. L. Peng, L. Yobas, *Lab Chip* 10, (2010) 1044-1050.
- [248] A. Finkel, A. Wittel, N. Yang, S. Handran, J. Hughes, J. Costantin, *J Biomol Screen* 11, (2006) 488-496.
- [249] MD. IonWorks Barracuda High - Throughput Automated Patch-Clamp System. Datenblatt. 2010. Sunnyvale, CA 94089 USA, Molecular Devices, Inc.
- [250] I. Osetinsky. PATCH PLATE Technical Support Request 1. Persönliche Kommunikation. 2011.
- [251] V. H. John, T. J. Dale, E. C. Hollands, M. X. Chen, L. Partington, D. L. Downie, H. J. Meadows, D. J. Trezise, *J Biomol Screen* 12, (2007) 50-60.
- [252] A. E. Dubin, N. Nasser, J. Rohrbacher, A. N. Hermans, R. Marrannes, C. Grantham, K. Van Rossem, M. Cik, S. R. Chaplan, D. Gallacher, J. Xu, A. Guia, N. G. Byrne, C. Mathes, *J Biomol Screen* 10, (2005) 168-181.
- [253] MD. PatchXpress 7000A System. An automated parallel patch clamp system. Datenblatt. 2010. Sunnyvale, CA 94089 USA, Molecular Devices, Inc.
- [254] A. Brueggemann, S. Stoelzle, M. George, J. C. Behrends, N. Fertig, *Small* 2, (2006) 840-846.
- [255] Nanion. SyncroPatch<sup>®</sup> 96 Ion channel screening – the next generation. Application Note. 2010. Nanion Technologies GmbH.

- [256] Fluxion. IonFlux Plate Formats. [Technical note]. 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [257] Flyion. Comparison Chart. FLYSCREEN® 8500. [Data sheet]. 2004. Tübingen, flyion GmbH.
- [258] Sophion. QPlate Measurement Plate. Product Specification. 2010. Sophion Bioscience A/S.
- [259] J. Jensen, I. Spencer, N. Li, J. Johnson, Q. Chen, C. Ionescu-Zanetti. IonFlux: A Microfluidic Approach to Ion Channel Ensemble Recording for Ligand-gated and Voltage-gated Ion Channels. SBS 16th Annual Conference and Exhibition . 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [260] I. Osetinsky. PATCH PLATE Technical Support Request 2. Persönliche Kommunikation. 2011.
- [261] Cellectric AB. Rapid and Superior Ion Channel Drug Discovery - Dynaflo® HT System - Faster and Better Hit to Lead Screening. 2010.
- [262] Cellectric AB. Dynaflo® HT System: High Throughput Ion Channel Screening for Ligand and Voltage Gated Channels. 2010.
- [263] C. Ionescu-Zanetti, I. Spencer, J. Jensen. Enabling "Plate Reader" Simplicity in High Throughput Electrophysiology through Well Plate Integration with Microfluidics. SBS 14th Annual Conference and Exhibition . 2008. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [264] Nanion. The Patchliner®. Because quality does matter. Application Note. 2009. Nanion Technologies GmbH.
- [265] T. Knott. Abschlussbericht BioChance Plus: Ionenkanal-Assays mit Suspensionskulturen. 2008. Rostock, Deutschland, Cytocentrics AG.
- [266] Cytocentrics Bioscience GmbH. CytoPatch™ - The smart solution in automated patch clamping. 2006. Rostock, Germany, Cytocentrics Bioscience GmbH.
- [267] Flyion. FLYSCREEN® 8500 - Fully Automated Patch Clamp Robot. [Flyer]. 2008. Tübingen, flyion GmbH.
- [268] E. S. Trepakova, M. G. Malik, J. P. Imredy, J. R. Penniman, S. J. Dech, J. J. Salata, ASSAY and Drug Development Technologies 5, (2007) 617-628.
- [269] Nanion. The world's smallest patch clamp setup. Providing biggest results. Application Note. 2009. Nanion Technologies GmbH.
- [270] J. Xu, A. Guia, D. Rothwarf, M. Huang, K. Sithiphong, J. Ouang, G. Tao, X. Wang, L. Wu, ASSAY and Drug Development Technologies 1, (2003) 675-684.
- [271] P. van Stiphout, T. Knott, T. Danker, A. Stett. 3D Microfluidic Chip for Automated Patch-Clamping. Proceedings of the MST-Congress 2005 , 435-438. 2005. Berlin, VDI/VDE Innovation + Technik GmbH (VDI/VDE-IT).
- [272] Flyion. FLYSCREEN® 8500. [Data sheet]. 2007. Tübingen, flyion GmbH.
- [273] thinXXS. Sophion Bioscience: HTS Lab-on-Chip "QPLate". 2010. Zweibrücken, Deutschland, thinXXS Microtechnology AG.
- [274] H. Tao, D. Santa Ana, A. n. Guia, M. Huang, J. Ligutti, G. Walker, K. Sithiphong, F. Chan, T. Guoliang, Z. Zozulya, S. Saya, R. Phimmachack, C. Sie, J. Yuan, L. Wu, J. Xu, A. Ghetti, ASSAY and Drug Development Technologies 2, (2004) 497-506.
- [275] Sophion. Introducing QPatch 8 and 8X. Product Specification. 2010. Sophion Bioscience A/S.
- [276] Fluxion. IonFlux™ System - High Throughput Automated Patch Clamp with Plate Reader Simplicity. [Data sheet]. 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [277] Fluxion. Cell lines and ion channel targets on the IonFlux system. [Technical note]. 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [278] J. R. Penniman, D. C. Kim, J. J. Salata, J. P. Imredy, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 62, (2010) 107-118.
- [279] Cellectric AB. Full voltage control - fast voltage-gated ion channels - The Dynaflo® HT system - next generation integrated patch clamp technology. Application Note. 2010.

- [280] M. H. Bridgland-Taylor, A. C. Hargreaves, A. Easter, A. Orme, D. C. Henthorn, M. Ding, A. M. Davis, B. G. Small, C. G. Heapy, N. bi-Gerges, F. Persson, I. Jacobson, M. Sullivan, N. Albertson, T. G. Hammond, E. Sullivan, J. P. Valentin, C. E. Pollard, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54, (2006) 189-199.
- [281] T. J. Dale, C. Townsend, E. C. Hollands, D. J. Trezise, *Mol. BioSyst.* 3, (2007) 714-722.
- [282] G. Rast, C. Diefenbach, G. Hanauer, T. Krauter, A. Hümmer, A. Lepple-Wienhues, M. Fejtl. Patch Clamping hERG - Validation of an Automated Assay for Safety Studies. [www.eMagazineSCREENING.com](http://www.eMagazineSCREENING.com) [Automation & Robotics], 30-32. 2007.
- [283] Cellectricon AB. The Dynaflo<sup>®</sup> HT Plate: The unique Dynaflo<sup>®</sup> HT plate technology. 2010.
- [284] L. Guo, H. Guthrie, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52, (2005) 123-135.
- [285] Nanion. Temperature control Port-a-Patch<sup>®</sup> – The heat is on. Application Note. 2010. Nanion Technologies GmbH.
- [286] J. Johnson, N. Li, Q. Chen, I. Spencer, C. Ionescu-Zanetti, J. Jensen, *Biophys J* 98, (2010) 540a.
- [287] O. Scheel, C. Ehnert, G. Rascher-Eggstein, T. Knott, *Biophys J* 94, (2008) 998.
- [288] J. Falk, *European Life Science Journal* 3/2008, (2008) 34.
- [289] J. Falk, *European Life Science Journal* 2/2008, (2008) 28.
- [290] A. Lindgren, *European Life Science Journal* 1/2008, (2008) 31.
- [291] Flyion. FLYSCREEN<sup>®</sup> 8500 - Validation Applications. [Flyer]. 2009. Tübingen, flyion GmbH.
- [292] Flyion. Automated hERG Screening with the Flyscreen<sup>®</sup> 8500. 2006. Tübingen, flyion GmbH.
- [293] H. G. Marrero, J. R. Lemos, in *Patch-Clamp Analysis: Advanced Techniques*, (W. Walz, Ed), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2007, 325-352.
- [294] J. Costantin, S. Handran, D. Yamane, N. Yang. Poster: Primary Screening of a 1564 Compound Focused Diversity set Against the Human Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Using the IonWorks Quattro System. 2005. Sunnyvale, CA 94089 USA, Molecular Devices, Inc.
- [295] C. Mathes, S. Friis, M. Finley, Y. Liu, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 12, (2009) 78-95.
- [296] M. Sondermann, M. George, N. Fertig, J. C. Behrends, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, (2006) 545-551.
- [297] E. Pamir, M. George, N. Fertig, M. Benoit, *Ultramicroscopy* 108, (2008) 552-557.
- [298] Fluxion. IonFlux: Automated Patch Clamp System with Plate Reader Simplicity. *J Vis Exp*, e2392. 2010. JoVE.
- [299] Fluxion. hERG K<sup>+</sup> channel currents and pharmacology using the IonFlux system. Application note. 2010. CA, San Francisco, Fluxion Biosciences, Inc.
- [300] Flyion. iPatch - Second Generation Automated Patch Clamp. [Product Brochure]. 2010. Tübingen, flyion GmbH.
- [301] Novocontrol. Alpha-A Dielectric, Conductivity, Impedance and Gain Phase Modular Measurement System. Technical Specification Alpha-A Mainframe ZGS, ZG4 and ZG2 Test Interfaces. 2.4. 2010. Novocontrol Technologies GmbH & Co. KG.
- [302] Keithley. 6517B - Electrometer/High Resistance Meter. 2009. USA, Ohio, Cleveland, Keithley Instruments, Inc.
- [303] Keithley. Model 6517B - Reference Manual Rev. B. 6517B-901-01 Rev. B. 2009. USA, Ohio, Cleveland, Keithley Instruments, Inc.
- [304] Keithley. Model 2001 - Multimeter Specifications. SPEC-2001 Rev. H. 2009. USA, Ohio, Cleveland, Keithley Instruments, Inc.



# Anhang





## Inhaltsverzeichnis Anhang

A1	APC-Systeme – Sensorchips .....	140
A2	APC-Systeme – Systemaufbau.....	141
A3	APC-Systeme – Signableitung .....	142
A4	APC-Systeme – Automatisierung.....	143
A5	APC-Systeme – <i>Liquid-Handling</i> .....	144
A6	APC-Systeme – Literaturquellen.....	145
A7	APC-System – IonWorks™ HT .....	146
A8	APC-System – IonWorks™ Quattro.....	148
A9	APC-System – IonWorks™ Barracuda .....	150
A10	APC-System – PatchXpress® .....	152
A11	APC-System – QPatch® .....	154
A12	APC-System – Port-a-Patch® .....	156
A13	APC-Systeme – Patchliner® und SynchroPatch® 96 .....	157
A14	APC-System – CytoPatch™ .....	158
A15	APC-System – Dynaflow® HT .....	160
A16	APC-System – IonFlux™ .....	161
A17	APC-System – Flyscreen® .....	163
A18	Nadelelektroden-Chiptypen.....	164
A19	Aktuelle Elektrodenzuordnung .....	165
A20	Elektrodenzuordnung (Schachbrett) .....	166
A21	Veraltete Elektrodenzuordnung.....	167
A22	Chip-Drehung (4×90°).....	168
A23	DEP-Zellpositionierung mit DEP-Elektroden .....	169
A24	DEP-Zellpositionierung mit Nadelelektroden .....	170
A25	Ersatzschaltbild Chip-Träger: 68-CLCC .....	171
A26	Ersatzschaltbild Chip-Träger: <i>Flip-Chip</i> .....	173
A27	Ersatzschaltbild Chip-Sockel: Yamaichi.....	175
A28	Herstellung von Ag/AgCl-Elektroden.....	177

# A1 APC-Systeme – Sensorchips

Die Zuordnung der Literaturquellen zu den durchnummerierten Referenznummern (auf blauem Hintergrund) erfolgt in **Anhang A6**.

Bezeichnung	IonWorks HT	IonWorks Quattro	IonWorks Barracuda	PatchXpress 7000A	QPatch (8/16/16/16X)	QPatch HT/HTX	Port-a-Patch	Patchliner NPC-16	Synchro-Patch 96	CytoPatch	Dynaflow HT	IonFlux 16/HT	Flyscreen 8500
Patch-Clamp-Struktur	PatchPlate (single) 1 2	PatchPlate (single & PPC) 3 4	PatchPlate (single & PPC) 5 6	Seal-Chip <sub>16</sub> 10 12 13	QPlate 10	QPlate 10	NPC1 10 11 15	NPC16 7	k. A.	CytoPatch Chip 16	k. A.	IonFlux Plate 16	FlipTip, ChipTip 8 9
Material der Struktur	planar 1 2	planar 3 10 11	planar 5	planar 10 13	planar 10	planar 10	planar 10 11 15	planar 15 16	planar 17 18	planar 16	Fluidkanäle, lateral 19	Fluidkanäle 20	Pipette 16 21
Strukturen pro Chip	Polymer (Polyimid-Folie) 16 22 23	Polymer 3	Polymer 3	oberflächen-behandeltes Glas 10 16 24	SiO <sub>2</sub> auf Si 10 24 25 26	Kanäle & Si glasbe-schichtet 10 25	Borsilikat-glas 16 27	Borsilikat-glas 16 28	Borsilikat-glas 17	SiO <sub>2</sub> 29	Polymer 30	Polymer 30	Borsilikat-glas 9
Messkammern pro Chip	384 2 31	384 x 64 10	384 x 1 (single) 32 384 x 64 (PPC) 32	16 12 16 33 16 33	16 oder 48 10 16 28 16 28	48 (HT) 10 48 x 10 (HTX) 14 25	1 10 15 24	16 15 16 28 16 28	96 17	1 28	96 oder 384 34 35	20 x 8 x 2 (16) 20 20 x 32 x 2 (HT) 36	1 16 41
Gehäuse bzw. Chip-Träger	384 2 31	384 10	384 5	16 12 33	16 10	48 10	1 10 16 24	16 10 16 28 16 28	96 17	1 28	16 34 32 (HT) 34	8 (16) 20 32 (HT) 30	1 bis 6 16 41
Serien- und Pipetten-widerstand	384-Multiwell 2 16 27	384-Multiwell 6 10	384-Multiwell (SBS-Standard) 6	Chip 13	Multiwell 25	Multiwell 25	Chip 15	Glasplatte in Fluidik-kassette 15	Multiwell 17	Chip 34 35	Multiwell 34 35	96-, 384-Multiwell (SBS-Standard) 20 30 36	Plastik-mantel 20 30 36
Einmal-verwendung	(5-10) MΩ (Serienwid.) 2 ca. 3,4 MΩ (Pipette) 22	k. A.	k. A.	(1-3) MΩ (Pipette) 42	ca. 2 MΩ (Pipette) 26 43	k. A.	< 10 MΩ 44 45	< 10 MΩ 37	< 10 MΩ 18	ca. 8 MΩ 38 39	k. A.	k. A.	(2-5) MΩ (Serienwid.) 40 ca. 1 MΩ (Pipette) 41
Hersteller	JA 2	k. A.	k. A.	JA 10 13 46	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	JA 47	k. A.	k. A.	JA 48
	MD 16	MD	MD	AVIVA 48	thinXXS 48	thinXXS 46	Nanion 16	Nanion 16	k. A.	CCS BV	k. A.	k. A.	Flyion 16

Rechts neben der Spezifikation sind die dazugehörigen Referenzen aufgelistet. Alle Angaben ohne Quellenangabe wurden durch Schlussfolgerung abgeleitet.

## A2 APC-Systeme – Systemaufbau

Die Zuordnung der Literaturquellen zu den durchnummerierten Referenznummern (auf blauem Hintergrund) erfolgt in Anhang A6.

	IonWorks HT	IonWorks Quattro	IonWorks Barracuda	PatchXpress 7000A	QPatch (8/8X/16/16X)	QPatch HT/HTX	Port-a-Patch	Patchliner NPC-16	Synchro-Patch 96	CytoPatch	Dynaflow HT	IonFlux 16/HT	Flyscreen 8500
Anzahl paralleler Messkanäle	48	48	384	16	48	1	1	2, 4 oder 8	96	1	96	16 (16) 64 (HT)	2 - 6 (asynchron)
Durchsatz in Datenpunkten pro Tag (8 h)	2.000 bis 3.500 bzw. 300 Substanzen	2.300 bis 3.000	10.000 (10 h)	70 bis 300 bzw. > 500 Substanzen	250 bis 2.400	750 bis 7.000	20 bis 50	250 bis 750	5.000	134 bzw. 240 Zellen (Cyto-Patch100)	18.000	250 bis 1.000 (1 h), 10.000 (HT)	100 bis 1.000
Kosten pro Datenpunkt in US\$	< 2	0,75	k. A.	< 3,8	2,5 - 10	2 - 5	1,25 - 5	< 2,5	k. A.	< 3,2	k. A.	k. A.	< 1,6
Zellpositionierung	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck
Übergang in Ganzzellableitung	Perforation	Perforation	Perforation	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck oder Perforation	Unterdruck	k. A.	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck	Unterdruck oder Perforation
Abtastrate in kHz	≤ 10	10	k. A.	> 15	50 (500)	50 (500)	Verstärker abhängig	k. A.	k. A.	10	5, 10, 20	20	50
Patch-Clamp-Verstärker (Hersteller)	Eigenentwicklung	k. A.	k. A.	Technologie vom Axon MultiClamp 700	Eigenentwicklung	Eigenentwicklung	EPC 10 (HEKA)	EPC 10 (HEKA) (Double, Quadro) oder von Dagan	Triton+ (Tecella, als OEM)	von NPI und MCS	von Tecella	Tecella: Triton+ (16), Jet/Apollo (HT)	EPC 10 (HEKA)
Kompensation des Serienwiderstands	NEIN	NEIN	k. A.	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA	JA
Kapazitätskompensation	NEIN	NEIN	k. A.	JA	JA	JA	JA	JA	JA	k. A.	JA	JA	JA
Leckstrom-Subtraktion	JA	JA	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	JA	JA	k. A.	k. A.	k. A.	JA	k. A.
Temperierung	NEIN	k. A.	k. A.	NEIN	NEIN	NEIN	JA	JA	NEIN	k. A.	JA	JA (bis 40 °C)	JA (optional)
Hersteller	MD	MD	MD	MD	Sophion	Sophion	Nanion	Nanion	Nanion	CCS AG	Cellecticon	Fluxion	Flyion

Rechts neben der Spezifikation sind die dazugehörigen Referenzen aufgelistet. Alle Angaben ohne Quellenangabe wurden durch Schlussfolgerung abgeleitet.

# A3 APC-Systeme – Signalableitung

Die Zuordnung der Literaturquellen zu den durchnummerierten Referenznummern (auf blauem Hintergrund) erfolgt in Anhang A6.

	IonWorks HT	IonWorks Quattro	IonWorks Barracuda	PatchXpress 7000A	QPatch (8/8X/16/16X)	QPatch HT/HTX	Port-a-Patch	Patchliner NPC-16	Synchro-Patch 96	CytoPatch	Dynaflow HT	IonFlux 16/HT	Flyscreen 8500
<b>Giga-Seal bei Ganzzellableitung</b>	NEIN <sup>1 2</sup>	NEIN <sup>1 3</sup>	NEIN	JA <sup>1 4 5</sup>	JA <sup>2 6 7</sup>	JA <sup>1 8</sup>	JA <sup>2 9 10</sup>	JA <sup>2 6</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>12</sup>	NEIN <sup>13</sup>	k. A.	JA <sup>14 15 16 17</sup>
<b>typischer Seal-/Widerstand</b>	(50 - 600) MΩ <sup>1 18</sup>	(50 - 200) MΩ <sup>3 19</sup>	k. A.	> 1 GΩ <sup>2 20</sup>	(1 - 5) GΩ <sup>2 21</sup>	> 1 GΩ <sup>2</sup>	(1 - 5) GΩ <sup>2 22</sup>	> 1 GΩ <sup>2 23</sup>	> 1 GΩ <sup>24</sup>	(1 - 10) GΩ <sup>25 26</sup>	20 MΩ <sup>27</sup>	k. A.	(1 - 10) GΩ <sup>14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29</sup>
<b>Erfolgsrate für Ganzzellableitung in %</b>	60 bis 80 <sup>30</sup>	> 95 <sup>19</sup>	k. A.	54 bis 75 <sup>20 31</sup>	40 bis 95 <sup>1 32</sup>	k. A.	60 bis 90 <sup>9 10 33</sup>	70 bis 90 <sup>23</sup>	50 bis 80 <sup>11 24</sup>	75 <sup>12 35</sup>	loose patch <sup>13</sup>	k. A.	82 % (CHO) <sup>28</sup>
<b>Zeitdauer für stabile Ganzzellableitung</b>	> 1 h <sup>30</sup>	k. A.	k. A.	> 30 min <sup>34</sup>	> 20 min (Erfolg 67%) <sup>34</sup>	k. A.	> 20 min <sup>10</sup>	> 20 min <sup>22 23</sup>	k. A.	25 min (Seal > 0,5 GΩ, Erfolg > 60%) <sup>35</sup>	20 min <sup>13</sup>	k. A.	> 15 min <sup>16 29</sup>
<b>Einzelzelluntersuchung</b>	JA <sup>1 36</sup>	JA (PatchPlate vom HT) & NEIN (PatchPlate PPC) <sup>1</sup>	JA (PatchPlate) & NEIN (PatchPlate PPC) <sup>37</sup>	JA <sup>20 38</sup>	JA, aber nicht 8X/16X <sup>1</sup>	JA, aber nicht HTX <sup>1 39</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>6</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>6</sup>	JA <sup>40</sup>	NEIN <sup>41</sup>	JA <sup>42</sup>
<b>Einzelkanalableitung</b>	NEIN	NEIN	NEIN	k. A.	k. A.	k. A.	JA <sup>1 2 10 43</sup>	JA <sup>22 23</sup>	NEIN <sup>24</sup>	k. A.	NEIN	k. A.	k. A.
<b>Ganzzellableitung</b>	JA (perforated patch, loose patch) <sup>2 30 36</sup>	JA (perforated patch) <sup>1 19</sup>	JA	JA <sup>1 2 5 31</sup>	JA <sup>2 6 7</sup>	JA <sup>8</sup>	JA <sup>9 10 49</sup>	JA <sup>2 9 23</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>12 33 44</sup>	JA <sup>45</sup>	JA <sup>41 46</sup>	JA <sup>2 16 17 47</sup>
<b>Voltage Clamp</b>	JA <sup>30 36</sup>	JA <sup>12 19 48</sup>	JA	JA <sup>4 20 50</sup>	JA <sup>1 6</sup>	JA <sup>1 6</sup>	JA <sup>51</sup>	JA <sup>23 51</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>12</sup>	JA <sup>45</sup>	JA <sup>41 52</sup>	JA <sup>15 28</sup>
<b>Current Clamp</b>	NEIN <sup>2</sup>	k. A.	k. A.	NEIN <sup>2</sup>	NEIN <sup>2</sup>	NEIN <sup>2</sup>	JA <sup>2</sup>	JA <sup>23</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	JA <sup>2</sup>
<b>spannungsgesteuerte Ionenkanäle</b>	JA <sup>15</sup>	JA <sup>48</sup>	JA	JA <sup>1 2 5 20 38</sup>	JA <sup>1 2 7</sup>	JA <sup>1 2 8</sup>	JA <sup>9 51</sup>	JA <sup>23 51</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>12 26</sup>	JA <sup>45 53</sup>	JA <sup>41 52</sup>	JA <sup>15 29 42</sup>
<b>liganden-gesteuerte Ionenkanäle</b>	JA, aber eingeschränkt <sup>54</sup>	JA, aber eingeschränkt <sup>48</sup>	JA	JA <sup>1 2 5 20 38</sup>	JA <sup>1 2 7 34</sup>	JA <sup>1 2 8</sup>	JA <sup>9 33 51</sup>	JA <sup>9 23 51</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>12 26</sup>	JA <sup>45</sup>	JA <sup>41 52</sup>	JA <sup>29 42</sup>
<b>bereits untersuchte Zelltypen</b>	CHO, HEK etc. <sup>36 43</sup>	CHO, CHL <sup>3</sup>	k. A.	CHO, HEK <sup>4 38 55 56</sup>	CHO, HEK etc. <sup>43</sup>	k. A.	HEK, diverse <sup>9 51</sup>	HEK, diverse <sup>23 51</sup>	CHO, HEK etc. <sup>11</sup>	CHO, HEK, TE 671, CytoPAQ (eigene Zelllinie) <sup>25 33 35 57 58 59</sup>	jeder Zelltyp <sup>27 45</sup>	CHO, HEK etc. <sup>60</sup>	CHO, HEK etc. <sup>14 61 62</sup>

## A4 APC-Systeme – Automatisierung

Die Zuordnung der Literaturquellen zu den durchnummerierten Referenznummern (auf blauem Hintergrund) erfolgt in **Anhang A6**.

	IonWorks HT	IonWorks Quattro	IonWorks Barracuda	PatchXpress 7000A	QPatch (8/8X/16/16X)	QPatch HT/HTX	Port-a-Patch	Patchliner NPC-16	Synchro-Patch 96	CytoPatch	Dynaflow HT	IonFlux 16/HT	Flyscreen 8500
Aufbereitung von adhärenten Zellen (Erstellen einer Zellsuspension)	NEIN <sup>1</sup> NEIN <sup>2</sup>	NEIN <sup>3</sup> NEIN <sup>4</sup>	NEIN	NEIN <sup>5</sup> NEIN <sup>6</sup>	NEIN <sup>7</sup> NEIN <sup>8</sup>	NEIN	NEIN <sup>9</sup>	k. A.	NEIN	NEIN <sup>10</sup>	JA <sup>11</sup> JA <sup>12</sup>	NEIN <sup>13</sup> NEIN <sup>14</sup>	NEIN <sup>15</sup>
automatisierte Patch-Clamp-Ableitung	JA <sup>2</sup>	JA <sup>3</sup>	JA <sup>16</sup>	JA <sup>5</sup>	JA <sup>17</sup> JA <sup>18</sup>	JA <sup>19</sup>	JA <sup>9</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>9</sup>	JA <sup>9</sup>	JA <sup>20</sup>	JA <sup>11</sup>	JA <sup>13</sup>	JA <sup>15</sup> JA <sup>21</sup> JA <sup>22</sup>
automat. Liquid-Handling	JA <sup>2</sup>	JA <sup>3</sup>	JA <sup>16</sup>	JA <sup>5</sup> (Pipetten) <sup>19</sup>	JA <sup>17</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>7</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>9</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>9</sup> JA <sup>23</sup>	JA <sup>9</sup>	JA <sup>20</sup>	JA <sup>11</sup> JA <sup>24</sup> JA <sup>25</sup>	NEIN <sup>13</sup>	JA <sup>15</sup> JA <sup>21</sup> JA <sup>22</sup>
Robotik	JA <sup>2</sup>	JA	JA <sup>16</sup>	JA <sup>5</sup>	JA <sup>18</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>7</sup> JA <sup>19</sup>	NEIN	JA <sup>9</sup> JA <sup>23</sup>	JA <sup>9</sup>	JA <sup>20</sup>	JA <sup>26</sup>	teilweise <sup>13</sup>	JA <sup>15</sup> JA <sup>21</sup> JA <sup>22</sup>
Software	JA <sup>2</sup>	JA	JA <sup>16</sup>	JA	JA <sup>16</sup>	JA	JA <sup>9</sup> JA <sup>19</sup>	JA <sup>9</sup> JA <sup>23</sup>	JA <sup>9</sup>	JA <sup>20</sup>	JA	JA <sup>13</sup>	JA <sup>21</sup> JA <sup>22</sup>
automat. Chipwechsel	NEIN <sup>2</sup>	k. A.	JA <sup>16</sup>	NEIN <sup>5</sup>	JA <sup>17</sup>	JA <sup>27</sup>	NEIN <sup>9</sup>	NEIN	JA <sup>9</sup>	JA <sup>20</sup>	JA <sup>11</sup>	NEIN <sup>13</sup>	JA <sup>15</sup> JA <sup>21</sup>
Zeitdauer für autonomes Arbeiten	k. A.	< 1 h <sup>28</sup>	< 6 h <sup>16</sup>	k. A.	> 4 h <sup>7</sup> <sup>18</sup>	mehrere Stunden <sup>27</sup>	k. A.	3x NPC-16 <sup>29</sup>	k. A.	k. A.	4 h <sup>26</sup>	k. A.	k. A.
Grad der Automatisierung	teilauto- matisiert	teilauto- matisiert	vollauto- matisiert	teilauto- matisiert	vollauto- matisiert	vollauto- matisiert	teilauto- matisiert	teilauto- matisiert	vollauto- matisiert	vollauto- matisiert	vollauto- matisiert	teilauto- matisiert	vollauto- matisiert

Rechts neben der Spezifikation sind die dazugehörigen Referenzen aufgelistet. Alle Angaben ohne Quellenangabe wurden durch Schlussfolgerung abgeleitet.

## A5 APC-Systeme – Liquid-Handling

Die Zuordnung der Literaturquellen zu den durchnummerierten Referenznummern (auf blauem Hintergrund) erfolgt in **Anhang A6**.

	IonWorks HT	IonWorks Quattro	IonWorks Barracuda	PatchXpress 7000A	QPatch (8/8X/16/16X)	QPatch HT/HTX	Port-a-Patch	Patchliner NPC-16	Synchro-Patch 96	CytoPatch	Dynaflow HT	IonFlux 16/HT	Flyscreen 8500
<b>Perfusion</b>	extrazell. Seite 1	extrazell. Seite 2	extrazell. Seite 3	extrazell. Seite 1	extrazell. Seite 2 4	extrazell. Seite 1	intra- und extrazell. Seite 5 6 7 8	intra- und extrazell. Seite 1 2 6 7	intrazell. Seite 9 (k. A. zu extrazell.)	intra- und extrazell. Seite	extrazell. Seite	extrazell. Seite 10	intra- und extrazell. Seite 11 12 13
<b>Geschwindigkeit Perfusion (10 % bis 90 %)</b>	k. A.	k. A.	k. A.	10 ms bis 15 ms <sup>14</sup>	50 ms <sup>15</sup>	k. A.	100 ms (extrazell.) 10 s (intrazell.) <sup>16</sup>	50 ms (extrazell.) 10 s (intrazell.) <sup>16</sup> 17	k. A.	k. A.	25 ms <sup>18</sup> 19	100 ms <sup>20</sup>	50 ms (ChipTip) <sup>12</sup> 13
<b>Messung bei Substanzzugabe?</b>	NEIN <sup>1</sup>	NEIN	JA <sup>3</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	k. A.	JA	JA	k. A.	JA <sup>1</sup>
<b>Substanzauswaschung möglich?</b>	NEIN <sup>1</sup>	NEIN	k. A.	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	JA <sup>1</sup>
<b>Unbegrenzte Substanzzugabe und Auswaschung?</b>	NEIN <sup>1</sup>	NEIN	k. A.	JA <sup>1</sup>	NEIN <sup>1</sup>	NEIN	JA <sup>1</sup>	JA <sup>1</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	JA <sup>1</sup>

Rechts neben der Spezifikation sind die dazugehörigen Referenzen aufgelistet. Alle Angaben ohne Quellenangabe wurden durch Schlussfolgerung abgeleitet.



## A6 APC-Systeme – Literaturquellen

### APC-Systeme – Sensorchips (A1)

1 [231]	2 [144]	3 [248]	4 [134]	5 [249]	6 [250]	7 [35]	8 [141]	9 [150]	10 [39]
11 [251]	12 [252]	13 [253]	14 [64]	15 [254]	16 [124]	17 [255]	18 [147]	19 [135]	20 [256]
21 [257]	22 [94]	23 [126]	24 [129]	25 [258]	26 [183]	27 [60]	28 [5]	29 [239]	30 [259]
31 [34]	32 [260]	33 [143]	34 [261]	35 [262]	36 [263]	37 [264]	38 [265]	39 [266]	40 [40]
41 [267]	42 [268]	43 [100]	44 [136]	45 [269]	46 [270]	47 [271]	48 [272]	49 [273]	

### APC-Systeme – Systemaufbau (A2)

1 [231]	2 [144]	3 [124]	4 [34]	5 [5]	6 [249]	7 [252]	8 [143]	9 [39]	10 [235]
11 [145]	12 [64]	13 [129]	14 [254]	15 [264]	16 [255]	17 [262]	18 [259]	19 [40]	20 [272]
21 [132]	22 [38]	23 [274]	24 [253]	25 [35]	26 [275]	27 [224]	28 [269]	29 [228]	30 [147]
31 [266]	32 [261]	33 [276]	34 [277]	35 [267]	36 [134]	37 [251]	38 [248]	39 [258]	40 [183]
41 [60]	42 [94]	43 [278]	44 [265]	45 [119]	46 [279]	47 [257]	48 [280]	49 [281]	50 [215]
51 [282]	52 [283]	53 [284]	54 [270]	55 [285]	56 [286]	57 [229]	58 [146]		

### APC-Systeme – Signalleitung (A3)

1 [39]	2 [124]	3 [251]	4 [274]	5 [253]	6 [5]	7 [235]	8 [224]	9 [254]	10 [269]
11 [255]	12 [271]	13 [283]	14 [141]	15 [150]	16 [272]	17 [142]	18 [94]	19 [248]	20 [252]
21 [183]	22 [136]	23 [264]	24 [147]	25 [265]	26 [266]	27 [119]	28 [40]	29 [267]	30 [144]
31 [270]	32 [275]	33 [64]	34 [60]	35 [287]	36 [231]	37 [250]	38 [143]	39 [258]	40 [262]
41 [259]	42 [257]	43 [129]	44 [239]	45 [261]	46 [263]	47 [282]	48 [134]	49 [249]	50 [34]
51 [228]	52 [276]	53 [279]	54 [35]	55 [268]	56 [284]	57 [288]	58 [289]	59 [290]	60 [277]
61 [291]	62 [292]								

### APC-Systeme – Automatisierung (A4)

1 [231]	2 [144]	3 [251]	4 [248]	5 [252]	6 [274]	7 [64]	8 [290]	9 [254]	10 [265]
11 [261]	12 [119]	13 [259]	14 [263]	15 [40]	16 [249]	17 [235]	18 [100]	19 [39]	20 [266]
21 [272]	22 [132]	23 [5]	24 [279]	25 [283]	26 [262]	27 [224]	28 [134]	29 [124]	

### APC-Systeme – Liquid-Handling (A5)

1 [124]	2 [5]	3 [249]	4 [100]	5 [64]	6 [39]	7 [254]	8 [269]	9 [255]	10 [263]
11 [141]	12 [267]	13 [282]	14 [253]	15 [60]	16 [228]	17 [136]	18 [261]	19 [283]	20 [286]

## A7 APC-System – IonWorks™ HT

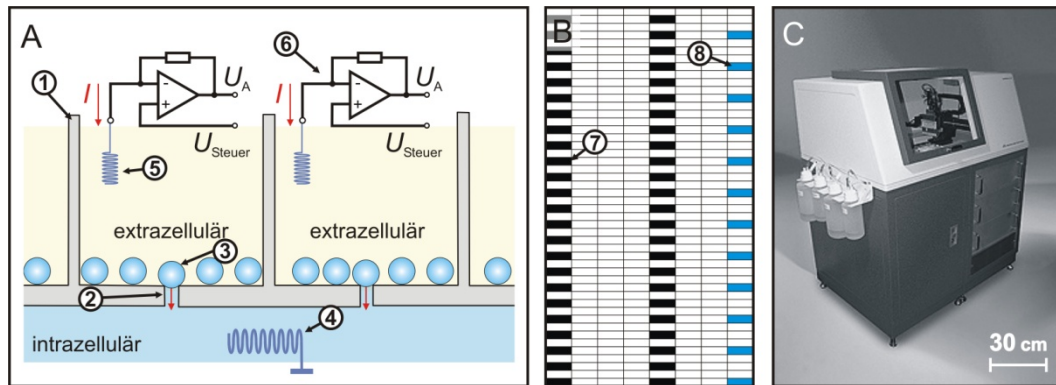
Das IonWorks™ HT von Molecular Devices (**Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**) war das erste kommerziell erhältliche planare APC-System [39]. Der Systemaufbau sowie das Funktionsprinzip des IonWorks™ HT wurden von Schroeder *et al.* [144] detailliert beschrieben. Für den Übergang in die Ganzzelleableitung werden membran-perforierende Stoffe bspw. das Antibiotikum Amphotericin B verwendet [34]. Die Zelle wird dafür mit Unterdruck über der lasergebohrten Öffnung im Substrat der sog. PatchPlate™ positioniert. Von Kiss *et al.* [94] wurde ein elektrisches ESB für die Vorgänge an der Schnittstelle Zelle-Öffnung vorgestellt, die der sog. *Loose-Patch*-Konfiguration entsprechen [293]. Der geringe *Seal*-Widerstand limitiert jedoch die Systemanwendung auf Zelllinien mit robuster und gleichmäßiger Expression spannungsgesteuerter Ionenkanäle [38]. Referenzmessungen zur Validierung des IonWorks™ HT am hERG-Kanal zeigten ein schlechtes Korrelationsergebnis mit dem klassischen *Patch-Clamp* [30]. Farre *et al.* [124] begründeten dieses Ergebnis mit dem geringen Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund der fehlenden *Giga-Seal*-Abdichtung. Andererseits berichteten Bridgland-Taylor *et al.* [280] bei ihren mit dem IonWorks™ HT gewonnenen Daten von einer guten Korrelation zum klassischen *Patch-Clamp*. Weitere Messungen wurden von Kiss *et al.* [94], Schroeder *et al.* [144] sowie von Guthrie *et al.* [231] vorgestellt. Teilweise kam es zu einer veränderten Wirkung der Substanzen gegenüber dem klassischen *Patch-Clamp*, die auf den verwendeten Kunststoff in den Substanz-Titerplatten zurückgeführt werden konnte [231]. **Abbildung A7-1** zeigt das Prinzip sowie ein Foto des IonWorks™ HT. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.

Das Gerätekonzept des IonWorks™ HT sieht eine Unterbrechung der Messung während der Substanzzugabe vor, da die Messelektroden zuvor aus den Messkammern entfernt werden müssen [231]. Dadurch ist es ausschließlich für langsame, ligandengesteuerte Kanäle geeignet, da die anfängliche Reaktion auf Substanzen nicht gemessen werden kann [35]. Die Auswirkungen dieser Unterbrechung wurden bisher nicht hinreichend erforscht [39]. Bei hERG-Experimenten können die mit dem klassischen *Patch-Clamp* angelegten Spannungspulsprotokolle zu einer ständigen Blockade führen, wenn während die Substanz einwirkt, Pulsprotokolle über mehrere Minuten angelegt werden [231]. Im IonWorks™ HT sowie im IonWorks™ Quattro wird daher ausschließlich vor und



nach der Substanzzugabe stimuliert. Das IonWorks™ HT wurde mittlerweile aus der Produktpalette von Molecular Devices entfernt.

Die von Finkel *et al.* [248] beschriebenen Modifizierungen (64 Öffnungen pro Messkammer) am Substrat der PatchPlates™ führten zur Entwicklung der *Population-Patch-Clamp*-Technologie, die im Nachfolgegerät IonWorks™ Quattro realisiert wurde.



**Abbildung A7-1: IonWorks™ HT**

**A:** Schematische Darstellung der *Patch-Clamp*-Ableitung mit der PatchPlate™. In der Mitte der 384 Messkammern (1) befindet sich im Substrat jeweils eine Öffnung (2) mit einem Durchmesser von 1 µm bis 2 µm. Zellen in Suspension werden in die Messkammern dispergiert. Das Öffnen der Zellmembran einer über dem Loch positionierten Zelle (3) erfolgt durch perforierende Stoffe in der intrazellulären Lösung. Eine gemeinsame Ag/AgCl-Badelektrode (4) referenziert das Innere aller Zellen von der Unterseite der PatchPlate™. Die Messung an einer einzelnen Zelle erfolgt von der extrazellulären Seite mit einer Ag/AgCl-Messelektrode (5). Das IonWorks™ HT besitzt 48 Messkanäle (6), mit denen an 48 Messkammern gleichzeitig gemessen wird. Typische *Seal*-Widerstände liegen bei  $\geq 50$  M $\Omega$ . Es ist der Querschnitt durch zwei Messkammern dargestellt. Umgezeichnete Abbildung aus [5]. Informationen aus [60, 94, 144].

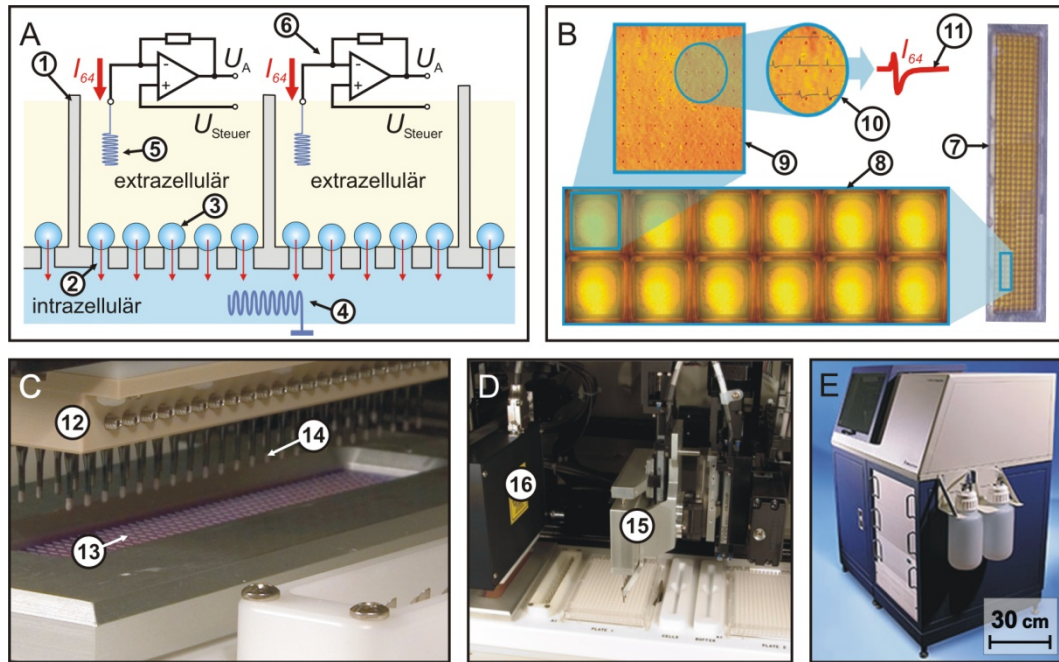
**B:** Schematische Darstellung (nicht skalierbar) der PatchPlate™ mit den 8x48 Messkammern. Repräsentative Darstellung für den festen Abstand der Messelektroden sowie der Fluidikköpfe durch Einfärbung von einzelnen Messkammern. Die Messelektroden sind in einem 2x24 Feld angeordnet und tauchen parallel in 48 Messkammern (7, schwarz eingefärbt). Die Substanzzugabe erfolgt über einen 12-Kanal-Dispenser an 12 Messkammern (8, blau eingefärbt) zeitgleich. Der definierte Abstand der Fluidikköpfe entspricht einer Reihe einer 96er Mikrotiter-Platte. Umgezeichnete Darstellung und Informationen aus [30, 34].

**C:** Außenansicht des IonWorks™ HT (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA). Abmessungen: ca. 148 cm x 83 cm x 141 cm (L x B x H). Bearbeitete Abbildung aus [35].

## A8 APC-System – IonWorks™ Quattro

Das IonWorks™ Quattro von Molecular Devices (**Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**) ist eine Erweiterung des IonWorks™ HT. Die Ganzzelleableitung erfolgt ebenfalls ohne Ausbildung eines *Giga-Seals* mit Hilfe von Perforation. Allerdings wird, im Gegensatz zum IonWorks™ HT, erstmalig die sog. *Population-Patch-Clamp* (PPC) Technologie angewendet. Bei der PPC-Technologie werden mehrere Zellen gleichzeitig mittels *Voltage-Clamp* untersucht und die Summe der resultierenden Ganzzellionenströme aller Zellen durch einen gemeinsamen Verstärker aufgezeichnet. Aufgrund der anschließenden Mittelwertbildung wird gegenüber der Zelleableitung an einzelnen Zellen der Einfluss der biologischen Variabilität der Zellkultur reduziert, die sich bspw. durch Zelltod und im *Seal*-Widerstand auswirkt. Des Weiteren werden dadurch Zell-zu-Zell-Unterschiede in der Population eliminiert, sodass die Erfolgsrate insgesamt gesteigert werden kann [60]. Bei der sog. PatchPlate™ PPC des IonWorks™ Quattro mit 384 Messkammern wird laut John *et al.* [251] der Gesamtstrom von 64 Zellen pro Kammer gemessen. Die Erfolgsrate liegt über 95 % bei einer vierfachen Durchsatzsteigerung gegenüber dem IonWorks™ HT. Andererseits verringert der gesteigerte Durchsatz die Komplexität der Versuchsprotokolle und begrenzt die Anzahl der Substanzzugaben, da die Messelektroden wie beim IonWorks™ HT zuvor entfernt werden müssen [39]. Für Messungen an einzelnen Zellen kann, wie auch beim QPatch® X in **Abbildung A11-1**, der Verstärkungsfaktor umgeschaltet werden, sodass auch die PatchPlate™ des IonWorks™ HT mit nur einer Öffnung pro Messkammer verwendet werden kann.

Idealerweise entspricht der mit der PatchPlate™ PPC über 64 *Patch-Clamp*-Öffnungen gemittelte Strom dem Mittelwert der Ströme von 64 einzelnen Zellen einer Messkammer. In der Praxis ist dies jedoch nur bedingt der Fall, da bspw. eine oder mehrere schlechte *Seals* nicht ausgeschlossen werden können. Finkel *et al.* [248] führten daher eine spezielle Leckstromkompensation ein. Die PPC-Technologie wurde von Finkel *et al.* [248], John *et al.* [251] sowie Dale *et al.* [281] anhand von Beispielexperimenten ausführlich vorgestellt. **Abbildung A8-1 A, B** veranschaulicht das Prinzip des PPC. **Abbildung A8-1 C-E** zeigt das Gerätesystem IonWorks™ Quattro. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.

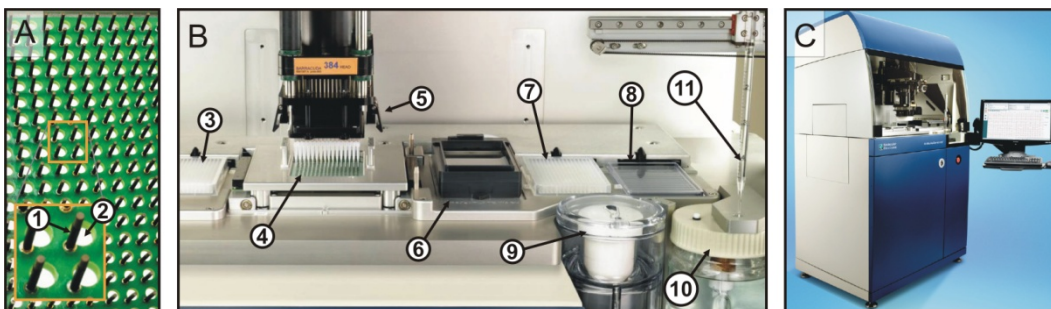


**Abbildung A8-1: IonWorks™ Quattro**

Schematische Übersicht des IonWorks™ Quattro-Systems für die PPC-Technik. **A:** Schematischer Querschnitt durch zwei Messkammern der PatchPlate™ PPC. In der Mitte jeder der 384 Messkammern (1) befindet sich ein Feld aus 8×8 Öffnungen (2) mit einem Durchmesser von 1 µm bis 2 µm. Umgezeichnete Abbildung aus [5]. Informationen aus [60, 248]. Zellen (3) in Suspension werden in die Messkammern dispergiert und durch Unterdruck über den Löchern positioniert. Das Öffnen der Zellmembran erfolgt durch perforierende Stoffe in der intrazellulären Lösung. Eine gemeinsame Ag/AgCl-Badelektrode (4) referenziert das Innere aller Zellen von der Unterseite der PatchPlate™. Die Messung erfolgt von der extrazellulären Seite mit jeweils einer Ag/AgCl-Messelektrode (5) gleichzeitig an nur 48 Messkammern. Das IonWorks™ Quattro besitzt 48 Messkanäle (6) mit umschaltbarer Verstärkung. Typische *Seal*-Widerstände liegen bei  $\geq 50 \text{ M}\Omega$ . **B:** Schematische Darstellung der PatchPlate™ (7) mit ihren 8×48 Messkammern. Vergrößerter Ausschnitt (8) von 2×6 Messkammern. Vergrößerter Ausschnitt (9) einer Messkammer mit einem Feld aus 8×8 Öffnungen im Substrat (rote Punkte). Ausschnitt und schematische Darstellung (10) der Einzelströme an neun Öffnungen einer Messkammer. Gesamtstrom  $I_{64}$  (11) von 64 Zellen. Die Mittelwertbildung von  $I_{64}$  liefert statistische Aussagen über Einzelströme einer Zelle. Umgezeichnete Abbildung aus [64]. **C:** Detailansicht des Elektronikkopfes (12) und der PatchPlate PPC™ (13). Der Elektronikkopf besitzt 48 Ag/AgCl-Messelektroden (14) für die Kontaktierung an 48 *Voltage-Clamp*-Verstärker. Die Verstärker sind umschaltbar zwischen *PPC* und *Standard-Patch-Clamp* [134]. Umgezeichnete Abbildung aus [294]. **D:** Detailansicht der Pipettiereinheit (15) mit einem 12-Kanal-Dispenser für Substanzzugaben etc. Links davon sitzt der Elektronikkopf (16). Informationen aus [134, 294]. **E:** Seitliche Außenansicht. Abmessungen (L x B x H): ca. 148 cm x 83 cm x 141 cm [134]. Umgezeichnete Abbildung von [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com) (Abruf: 9. März 2011).

## A9 APC-System – IonWorks™ Barracuda

Das IonWorks™ Barracuda von Molecular Devices (**Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**) ist die Weiterentwicklung des IonWorks™ Quattro und seit September 2010 kommerziell erhältlich. Mit dem Barracuda ist es möglich nicht nur spannungsgesteuerte sondern auch ligandengesteuerte Ionenkanäle zu untersuchen, wodurch eine wesentliche Einschränkung des IonWorks™ Quattro sowie des IonWorks™ HT behoben wurde. Hierfür wurde der Systemaufbau dahingehend verändert, dass Zugabe und Austausch von Substanzen während der Messung vorgenommen werden können. Mit 384 Verstärkerkanälen und einem 384-Kanal Pipettierkopf sind parallele Messungen an den 384 Messkammern der PatchPlate™ möglich. Die Ganzzelleableitung erfolgt ohne Ausbildung eines *Giga-Seals* mit Hilfe von Perforation und unter Anwendung der PPC-Technologie mit 64 Öffnungen pro Messkammer [260]. **Abbildung A9-1** zeigt den Aufbau des IonWorks™ Barracuda. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.



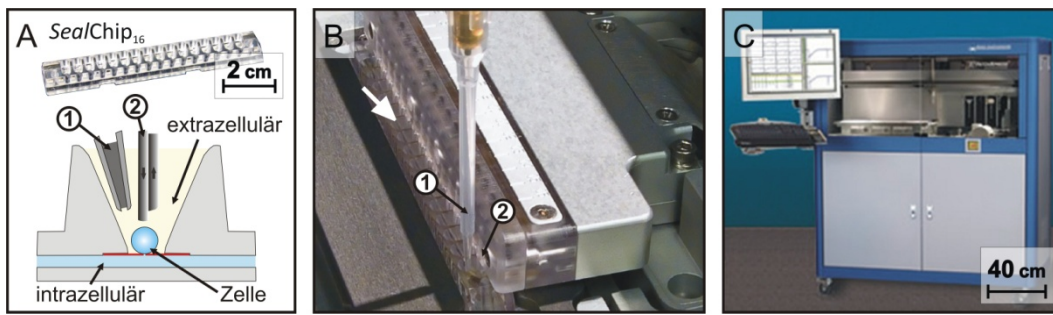
**Abbildung A9-1: IonWorks™ Barracuda**

**A:** Detailansicht der sog. Electrode Plate mit 384 Elektroden (1) und einem jeweils seitlich daneben liegenden Loch (2). Das Loch dient als Durchgang für die Pipettenspitze. Die Electrode Plate sitzt während der Messung über der PatchPlate™. Jeweils eine Elektrode taucht in die extrazelluläre Lösung einer der 384 Messkammern. Die elektrische Kontaktierung der 384 Elektroden erfolgt an jeweils einem Verstärkerkanal. **B:** Ausschnittsweise Darstellung vom Versuchsraum. Die sichtbaren Bestandteile sind: Mikrotiterplatte für Substanzen (3), die Electrode Plate (4), der 384-Kanal Pipettierkopf (5), die Ultraschall-Waschstation (6), Mikrotiterplatte für Substanzen (7), das sog. Zell-Boot (8), die Zell-Zentrifuge (9), das Zell-Vorratsgefäß (10) sowie der sog. CellPettor (11). Die PatchPlate™ liegt unterhalb der Electrode Plate. Nicht zu sehen sind der Vorratsplatz für die Pipetten sowie das sog. Buffer Boat auf der linken Seite. Der CellPettor ist ein zusätzlicher Pipettierer der den Transport der Zellsuspension zu dem Zell-Boot übernimmt. Das Zell-Boot soll den Zellverbrauch minimieren. Um Zellen in das System zu laden, muss der Anwender suspendierte Zellen an einer bestimmten Position im System bereitstellen. Die Waschstation dient der Reinigung der Pipettenspitzen mit Ultraschall, um Substanzreste zu entfernen. Für eine Vollautomatisierung wird der Barracuda um ein optionales Zell-Management (Zellaufbewahrung und Präparation der Zellsuspension) sowie um eine Robotersteuerung für die Handhabung der Titerplatten, PatchPlates™, Pipettenspitzen und Substanzplatten ergänzt. **C:** Seitliche Außenansicht. **A-C:** Umgezeichnete Abbildungen und Informationen aus [249].

Bei Vollautomatisierung kann das Gerät ohne Eingriff von außen bis zu sechs Stunden selbstständig arbeiten und erreicht dabei einen Durchsatz von 10.000 Datenpunkten pro Tag. Hierbei können bis zu acht Substanzzugaben pro Messkammer durchgeführt werden. Die PatchPlates™ des Barracuda besitzen das SBS-Standardformat für Mikrotiterplatten und sind daher nicht kompatibel zu den PatchPlates™ des IonWorks™ Quattro bzw. des IonWorks™ HT [250].

## A10 APC-System – PatchXpress®

Mit dem PatchXpress® von Molecular Devices (**Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**) können Ganzzelleableitungen parallel an 16 Einzelzellen vorgenommen werden. Über einen Pipettierroboter mit austauschbarer Pipette sind Substanz- und Konzentrationszugaben während der Messung individuell an jeder Zelle möglich [124]. Die Substanzzugabe erfolgt ressourcenschonend nach erfolgreich ausgebildeter Ganzzelleableitung. Es wird der sog. *SealChip<sub>16</sub>*<sup>TM</sup> verwendet, der von der **AVIVA Biosciences Corp. (San Diego, Kalifornien, USA)** produziert wird (**Abbildung A10-1 A**). **Abbildung A10-1 B, C** zeigt den Aufbau des PatchXpress®. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.



**Abbildung A10-1: PatchXpress®**

**A:** Aufbau und Funktionsweise des *SealChip<sub>16</sub>*<sup>TM</sup>. Oben: Der *SealChip<sub>16</sub>*<sup>TM</sup> besitzt 16 Messkammern, die in einer Reihe angeordnet sind. Der Abstand von Kammer zu Kammer beträgt 4,5 mm. Jede Messkammer (extrazellulärer Raum) besitzt eine planare *Patch-Clamp*-Öffnung ( $d = 1 \mu\text{m}$ ). Unterhalb des Chips befinden sich kleinere Kammern für die mikrofluidische Kontaktierung der intrazellulären Seite. Hergestellt wird der *SealChip<sub>16</sub>* (**AVIVA Biosciences Corp., San Diego, Kalifornien, USA**). Der *SealChip* wird in Lösung geliefert und muss vor seiner Verwendung präpariert werden [124]. Umgezeichnete Abbildung aus [253]. Unten: Substanzzugabe von oben über eine austauschbare Pipette (1). Das Auswaschen und Spülen erfolgt über die Waschstation (2). Die Messkammer ist mit 50  $\mu\text{l}$  bis 100  $\mu\text{l}$  extrazellulärer Lösung gefüllt. Umgezeichnete Abbildung aus [5]. **B:** *SealChip<sub>16</sub>* (weißer Pfeil) im Messsystem und 16-Kanal Waschstation (2) zum individuellen Spülen und Auswaschen jeder einzelnen Messkammer. Auf der Unterseite (nicht dargestellt) taucht jeweils eine von 16 Messelektroden (Ag/AgCl) in die Elektrolytlösung zur elektrischen Kontaktierung der intrazellulären Seite ein. Jede Messkammer ermöglicht die separate automatische Druckregelung für die Zellpositionierung, *Seal*-Bildung und Ganzzelleableitung [39]. Pipettierer (1) mit austauschbaren Pipetten zur Zugabe von Substanzen oder Zellen in eine Messkammer getaucht. **C:** Abmessungen des PatchXpress®: 147 cm x 76 cm x 168 cm (L x B x H). Die 16 integrierten *Patch-Clamp*-Verstärker basieren auf der Technologie des MultiClamp<sup>TM</sup> 700 von **Axon Instruments Inc.** (heute: **Molecular Devices LLC, Sunnyvale, Kalifornien, USA**). Veränderte Darstellung von [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com). (Abruf: 29. April 2011).

Die sehr gute Korrelation mit dem klassischen *Patch-Clamp* und die hohe Qualität der mit dem PatchXpress® ermittelten Daten wurde bereits in der Literatur beschrieben, bspw. durch Dubin *et al.* [252], die Tests am hERG-Kanal mit 70 verschiedenen Substanzen durchführten, deren Ergebnisse mit Referenzversuchen des klassischen *Patch-Clamp*-Aufbaus vergleichbar waren. Auch Ly *et al.* [143] betonten die sehr gute

Korrelation ihrer Daten zum klassischen *Patch-Clamp*. Allerdings stellten diese Autoren, wie auch wie Tao *et al.* [274] fest, dass einige Substanzen durch den im *SealChip*<sub>16</sub> verwendeten Kunststoff (Polystyren) absorbiert wurden, sodass sich die effektive Substanzkonzentration reduzierte. Weitere Versuche zur Validierung des PatchXpress® wurden u. a. von Penniman *et al.* [278], Trepakova *et al.* [268] sowie von Guo und Guthrie [284] beschrieben. Der Durchsatz des PatchXpress® entspricht dem Zwei- bis Zehnfachen klassischer *Patch-Clamp*-Aufbauten [38].

## A11 APC-System – QPatch®

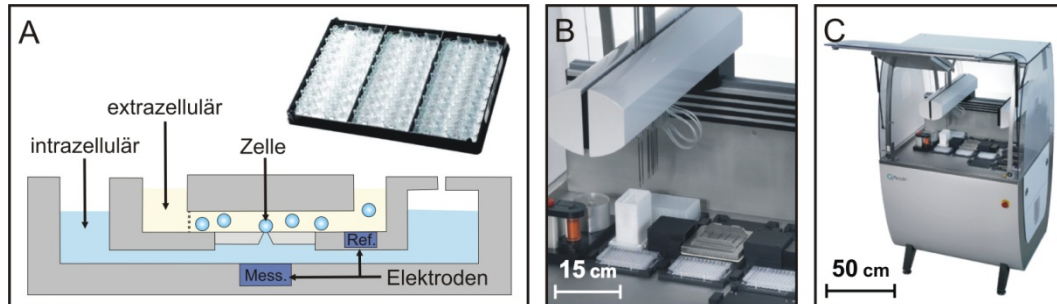
Sophion (**Sophion Bioscience A/S, Ballerup, Dänemark**) bietet mit der Produktfamilie QPatch® unterschiedlich ausgestattete *Patch-Clamp*-Systeme mit ähnlichem Grundaufbau an (**Abbildung A11-1 C**). Die Experimente und Signableitungen finden auf der sog. QPlate® in 16 oder 48 Messkammern statt [258]. Der Hersteller der QPlate® ist die **thinXXS Microtechnology AG (Zweibrücken, Deutschland)** [273]. Für die Fertigung der *Patch-Sites* wird ein Silizium-Substrat verwendet. Die Silizium-Chips sind in der QPlate® in ein Kunststoffteil eingebettet. Für eine schnelle mikrofluidische Substanzverteilung und geringe Substanzabsorptionen werden die Chipoberfläche sowie die Fluidkanäle mit SiO<sub>2</sub> beschichtet [100, 129, 258].

Je nach Anwendung wird zwischen der *Single-hole*- und der *Multi-hole*-Technologie unterschieden. Die *Multi-hole*-Technologie entspricht dabei der von Molecular Devices entwickelten PPC-Technik (**Abbildung A11-1 A, B**). Jedoch wird bei den *Multi-hole*-Systemen QPatch® 8X/16X/HTX (Kennung: X) der Gesamtstrom von nur 10 Zellen gemittelt. Die *Single-hole*-Systeme QPatch® 8/16/HT besitzen nur eine Öffnung pro Messkammer, sodass nur einzelne Zellen erfasst werden.

Entsprechend dem gewünschten Automatisierungsgrad sind zwei, vier oder acht Pipettierroboterköpfe und 16 oder 48 parallele *Patch-Clamp*-Verstärker im Einsatz [224]. Die Systeme QPatch® 8/8X mit zwei Pipettierroboterköpfen und 16 Verstärkern können nachträglich zum QPatch® 16/16X oder auch zum QPatch® HT/HTX erweitert werden [275]. Die QPlate® besitzt integrierte Mess- und Referenzelektroden [5, 133]. Asmild *et al.* [133] beschreiben zudem integrierte Mikropumpen. Eine Besonderheit des QPatch® ist die vollständige Kompensation des Serienwiderstandes [100]. Unter Nutzung einer Exklusivlizenz wendet Sophion die von Sherman *et al.* [121] entwickelte Kompensationstechnik an. Damit die Störeinkopplung durch Rauschen gering bleibt, ist die Entfernung der QPlate® zur Elektronik auf 10 mm begrenzt [145]. Alle Verstärkerkanäle (16 oder 48) werden parallel mit 500 kHz abgetastet. Es erfolgt anschließend eine digitale Reduzierung der Abtastrate auf 50 kHz mit einer resultierenden Bandbreite von 20 kHz [145]. Die *Multi-hole*-Systeme QPatch® 8X/16X/HTX besitzen umschaltbare Verstärkungen damit sie auch QPlates® mit *Single-hole*-Technologie verarbeiten können [224]. Die patentierte Zellpräparation erlaubt mehr als vier Stunden unbeaufsichtigte Arbeit [100].



Von Mathes *et al.* [295] und Kutchinsky *et al.* [183] wurden eine Vielzahl an Beispielmessungen an spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanälen vorgestellt. Für einige Zelllinien und Versuchsprotokolle berichtete Fermini [39] über eine hohe Qualität und gute Korrelation der Messergebnisse mit dem klassischen *Patch-Clamp*. Der Durchsatz wurde gegenüber dem klassischen *Patch-Clamp* um das Zehnfache gesteigert [295]. **Abbildung A11-1** zeigt den Aufbau des QPatch<sup>®</sup>. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.

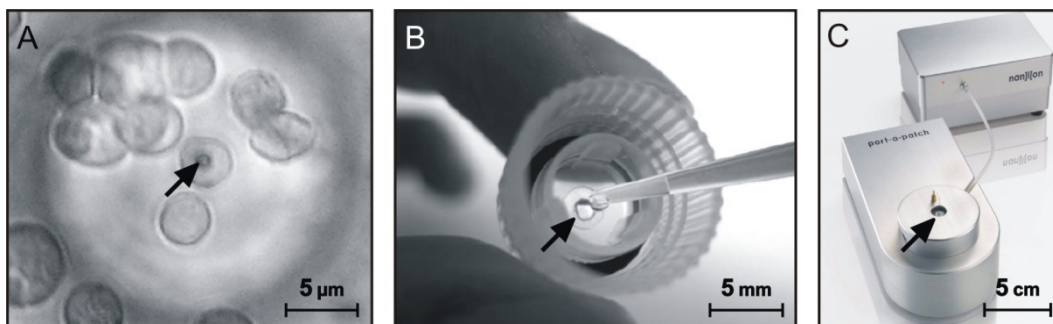


**Abbildung A11-1: QPatch<sup>®</sup>**

**A:** Aufbau und Funktionsweise der QPlate<sup>®</sup>. **Unten:** Skizziertes Funktionsprinzip der QPlate<sup>®</sup> mit *Single-hole*-Technologie. Die Zellen sind gelb dargestellt. Der obere Kanal enthält die extrazelluläre Lösung (gelblich gefärbt) und wird mit der Referenzelektrode (Ref.) referenziert. Der untere Kanal enthält die Elektrolytlösung (bläulich gefärbt) zur mikrofluidischen Kontaktierung der intrazellulären Seite für die Ganzzelleableitung. Die Messelektrode (Mess.) steht im elektrischen Kontakt mit der intrazellulären Seite. Die Referenz- und Messelektroden sind in die Fluidikkanäle der QPlate<sup>®</sup> integriert. Umgezeichnete Abbildung aus [5] und korrigiert nach [133]. Oben: Foto einer 48-Kanal QPlate<sup>®</sup> HT im Mikrotiterformat aus [295]. Die Kantenlänge beträgt 128 mm x 85 mm (L x B). Hersteller: **thinXXS Microtechnology AG (Zweibrücken, Deutschland)** [273]. **B:** Detailansicht eines QPatch<sup>®</sup> HT/HTX mit acht Pipettierköpfen (oben). Die integrierten Elektroden der QPlate<sup>®</sup> werden mit der Elektronik über Federstiftkontakte verbunden. Umgezeichnete Abbildung aus [224]. **C:** QPatch<sup>®</sup> HT/HTX mit 48 parallelen Messkanälen. Abmessungen des QPatch<sup>®</sup>: 104 cm x 95 cm x 169 cm (L x B x H).

## A12 APC-System – Port-a-Patch®

Das Port-a-Patch® (Nanion Technologies GmbH, München, Deutschland) ist das kleinste auf dem Markt erhältliche *Patch-Clamp*-System für Messungen an einzelnen Zellen [39]. Es eignet sich vor allem als Schnelleinstieg in die APC-Technik und liefert mit dem NPC®-1 Chip mit der klassischen *Patch-Clamp*-Technik qualitativ vergleichbare Ergebnisse [254]. Der NPC®-1 mit nur einer *Patch-Site* ist in **Abbildung A12-1 A, B** dargestellt und basiert auf einem Borosilikatglas-Substrat. Trotz der kleinen Bauform (**Abbildung A12-1 C**), handelt es sich beim Port-a-Patch® um ein teilautomatisiertes System mit optionaler Temperierung und optionaler intra- sowie extrazellulärer Perfusion. Für die Signalableitung ist der Port-a-Patch® um einen externen *Patch-Clamp*-Verstärker zu erweitern. Hierbei handelt es sich standardmäßig um den EPC-10 (HEKA) [269]. Anwendungsbeispiele wurden von Sondermann *et al.* [296], Farre *et al.* [228] sowie Kreir *et al.* [223] vorgestellt. Pamir *et al.* [297] beschrieben AFM-Untersuchungen an HEK 293 Zellen, die gleichzeitig mit dem NPC®-1 Chip in einem modifizierten Systemaufbau während der Signalableitung in der Ganzzellkonfiguration gemessen wurden. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.



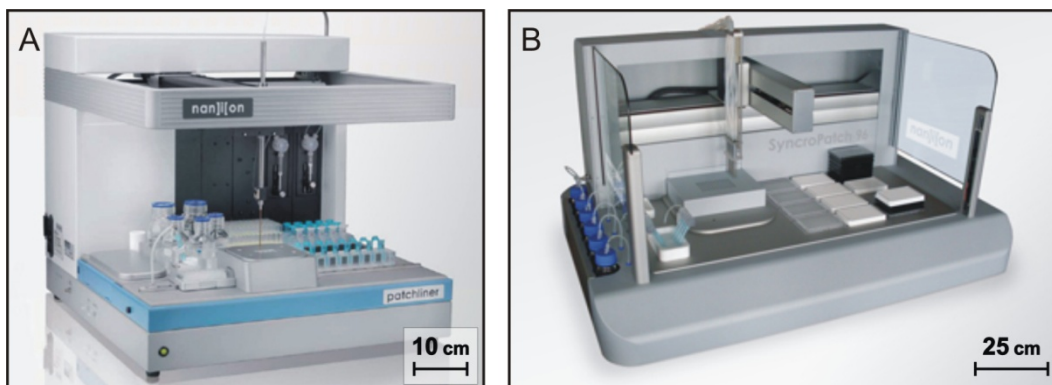
**Abbildung A12-1: Port-a-Patch®**

**A:** Mikroskopische Aufnahme der Chipoberfläche eines NPC-1. In der Mitte des ca. 100 µm dicken Glas-Chips (Borosilikat) befindet sich ein konisches Loch mit einem Durchmesser von ca. 1 µm, an dem die Zelle (schwarzer Pfeil) durch Ansaugen automatisch positioniert wurde [60]. Je nach Anwendung sind verschiedene Öffnungsdurchmesser erhältlich. Umgezeichnete Abbildung aus [254]. **B:** Der Glas-Chip (schwarzer Pfeil) ist standardmäßig in einem schraubbaren Kunststoffträger fixiert. Vor einem Experiment werden die intra- und extrazelluläre Lösung sowie die Zellen auf die Chipoberfläche per Hand aufgetragen. Umgezeichnete Abbildung aus [254]. **C:** Port-a-Patch®-Aufnahmeeinheit mit angeschlossener Pumpsteuerung im Hintergrund. Der Glas-Chip (schwarzer Pfeil) wird in die Aufnahmeeinheit per Hand eingesetzt [228]. Abmessungen der Aufnahmeeinheit: 17,5 cm x 9 cm x 7,5 cm (L x B x H). Nicht dargestellt sind der *Patch-Clamp*-Verstärker inkl. Messrechner sowie die optionale Temperierung und Perfusion.

## A13 APC-Systeme – Patchliner® und SynchroPatch® 96

Die APC-Systeme Patchliner® und SynchroPatch® 96 sind beide Produkte von Nanion (Nanion Technologies GmbH, München, Deutschland). Der SynchroPatch® 96 ist die aktuelle Neuentwicklung und ermöglicht parallele Signalableitungen an 96 einzelnen Zellen [255]. Diese Plattform basiert auf dem NPC®-96 Chip im 96er Mikrotiter-Format. Eine spezielle Behandlung der Chips ist vor ihrer Verwendung nicht notwendig [124].

Mit dem Patchliner® und dem dazugehörigen NPC®-16 Chip können nur bis zu acht Messungen gleichzeitig in 16 Messkammern erfolgen. Der NPC®-16 wird in Form einer speziellen Mikrofluidikkassette geliefert, die eine Vollautomatisierung sowie eine schnelle und präzise Perfusion über die individuell adressierbare Mikrofluidik erlaubt [64, 126]. Für den Patchliner® Double mit zwei parallel gemessenen Messkammern wird der EPC 10 USB Double *Patch-Clamp*-Verstärker (HEKA) verwendet. Der Patchliner®-Quattro mit vier parallelen Messkammern verwendet den EPC 10 USB Quadro (HEKA). Für den Patchliner® Octo mit acht parallel gemessenen Messkammern werden zwei *Patch-Clamp*-Verstärker vom Typ EPC 10 USB Quadro benötigt. Beispielmessungen wurden von Farre *et al.* [228] beschrieben. **Abbildung A13-1** zeigt den Patchliner® und den SynchroPatch® 96. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen beider Systeme ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.

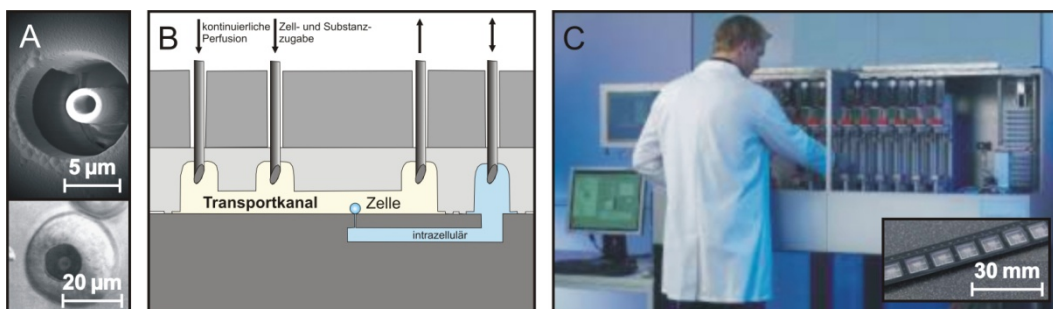


**Abbildung A13-1: Patchliner® und SynchroPatch® 96**

Patchliner® und SynchroPatch® 96 (Nanion Technologies GmbH, München, Deutschland). **A:** Mit dem Patchliner® können bis zu 48 Experimente ohne Benutzereingriff erfolgen, sofern das System mit drei NPC®-16 Chips geladen wird. Die *Patch-Sites* sind in einer Glasplatte eingelassen, die in einer oberen und einer unteren Fluidikkassette eingebettet wird. Von oben zugänglich sind in der Fluidikkassette fluidische Kanäle vorgesehen, über die mittels Pipettierroboterköpfen das Befüllen mit Zellen, die Perfusion und die Signalableitung erfolgt [254]. Nicht dargestellt sind die zusätzlich notwendigen *Patch-Clamp*-Verstärker inkl. Messrechner. Abmessungen der Aufnahmeeinheit: 62 cm x 56 cm x 53 cm (L x B x H). Umgezeichnete Abbildung und Informationen aus [264]. **B:** SynchroPatch® 96 mit Chips im Mikrotiter-Format, mit denen 96 einzelne Zellen parallel gemessen werden können. Umgezeichnete Abbildung aus [255].

## A14 APC-System – CytoPatch™

Der CytoPatch™-Automat und der dazugehörige CytoPatch™-Chip werden von der **Cytocentrics Bioscience GmbH (Rostock, Deutschland)** angeboten. Cytocentrics fokussiert sich auf qualitativ-hochwertige Ganzzelleableitungen mit hoher Erfolgsrate [239]. Hierfür wird die sog. *Cytocentering*-Technik angewendet, bei der Signalleitung und Zellpositionierung mit zwei voneinander unabhängigen Mikrofluidikkanälen durchgeführt werden. Der CytoPatch™-Chip besitzt dafür zwei konzentrische Öffnungen (**Abbildung A14-1 A**). Über die äußere Öffnung, auch *Cytocentering*-Kanal genannt, wird die zu untersuchende Zelle durch Unterdruck angesaugt und über der inneren Öffnung, dem sog. CytoPatch™-Kanal, positioniert. Auf diese Weise sollen Verunreinigungen der Messpipette, einer dem Aufbau einer *Patch*-Pipette des klassischen *Patch-Clamps* analogen Struktur, vermieden werden [266]. Die resultierende Erfolgsrate für stabile Ganzzelleableitungen mit *Giga-Seal*-Ausbildung liegt bei ca. 75 % [271]. Der Systemaufbau und die Funktionsweise sind in **Abbildung A14-1** dargestellt.



**Abbildung A14-1: CytoPatch™**

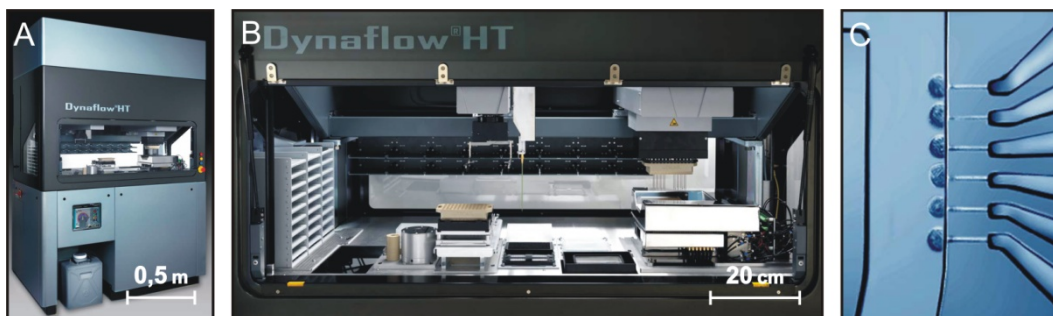
**A:** REM-Aufnahmen der *Patch*-Site im CytoPatch™-Chip [239, 271]. **Oben:** Der CytoPatch™-Chip besitzt zwei konzentrische Öffnungen. Der *Cytocentering*-Kanal (äußere Öffnung) dient dem Positionieren der Zelle. Der CytoPatch™-Kanal (innere Öffnung) entspricht einer *Patch*-Pipette. Umgezeichnete Abbildung aus [271]. **Unten:** Positionierte CHO-Zelle (Umriss erkennbar) auf der *Patch*-Site. Der *Cytocentering*-Kanal mit  $d = 12 \mu\text{m}$  (dunkel) hat die zu untersuchende Zelle ( $d_z \approx 32 \mu\text{m}$ ) angesaugt. Ganzzelleableitung über CytoPatch™-Kanal (heller Mittelpunkt). Umgezeichnete Abbildung aus [239]. **B:** Kontaktierung von Chip und Zelle. Der CytoPatch™-Chip ist umschlossen und abdichtet durch ein Silikongummi mit Mikro-Kanälen. Kanülen durchstechen das Silikongummi, um die Kanäle elektrisch und fluidisch zu kontaktieren. Über die mit Teflon® beschichteten Kanülen werden die Zelle, Substanzen etc. über den Transportkanal injiziert. Umgezeichnete schematische Darstellung aus [271]. **C:** CytoPatch™-Instrument mit mehreren einzelnen Messstationen für parallele *Patch-Clamp*-Ableitungen. CytoPatch™-Chip im Blistergurt für automatisierten Chipwechsel (kleines Fenster rechts-unten). Veränderte Abbildung aus [266].

Zu Beginn der Experimente durchstechen kleine Kanülen ein Silikongummi, das über dem CytoPatch™-Chip befestigt ist und die einzelnen Kanäle abdichtet (**Abbildung A14-1 B**). Auf diese Weise entsteht der fluidische und elektrische Kontakt zum Chip, dessen mikrofluidische Kanäle anschließend mit Pufferlösung gefüllt werden. Danach wird durch Unterdruck eine suspendierte Zelle auf dem Chip positioniert und durch stärkeres

Ansaugen ihre Membran für die Ganzzelleableitungen geöffnet. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen des CytoPatch™-Systems ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen. Für die Signalleitungen sind in den Zuleitungen der Kanülen Ag/AgCl-Elektroden eingebracht [271]. Ein Beispiel für eine komplette Versuchsdurchführung wurde von Knott [265] vorgestellt. Das CytoPatch™-System kann auf bis zu 20 *Patch-Clamp*-Einheiten erweitert werden, sodass mehrere Chips parallel und voneinander unabhängig untersucht werden können [266].

## A15 APC-System – Dynaflo<sup>®</sup> HT

Die 96 Messkammern des Dynaflo<sup>®</sup> HT (Celletricon AB, Mölndal, Schweden) sind auf der sog. Dynaflo<sup>®</sup> HT Plate untergebracht. Die Abmessungen der Dynaflo<sup>®</sup> HT Plate entsprechen dem Standard Mikrotiterplatten-Format. Der Zugriff auf den intrazellulären Raum einzelner Zellen erfolgt über den mikrofluidischen Kanal jeder Messkammer. Farre *et al.* [124] bezeichneten das Dynaflo<sup>®</sup> HT daher als ein Mehrkanal-Perfusionssystem. Jeweils sechs Kammern sind in einer Einheit zusammengefasst, deren Zellen gemeinsam in einem Kanal (Probenkammer, extrazellulärer Raum) liegen (**Abbildung A15-1 C**). Auf diese Weise können mit nur einer Mikrotiterplatte 16 Experimente parallel mit sechs Zellen pro Experiment durchgeführt werden. Aufgrund der nachfolgenden Mittelwertbildung aus sechs Einzelwerten erhöht sich die statistische Sicherheit, da Fehler und Ausreißer schnell erkannt werden [283]. Des Weiteren werden durch das Ansaugen der Zellen nur diejenigen Zellen an den Öffnungen der mikrofluidischen Kanäle festgehalten, die später auch gemessen werden. Dadurch binden keine Substanzen an Zellen, die nicht untersucht werden. Der Durchsatz liegt bei bis zu 10.000 Einheiten pro Tag im *Screening-Modus* [283]. Für die parallele Signalableitung und -verarbeitung der 96 Messkammern wird ein *Patch-Clamp*-Verstärker von Tecella verwendet [262]. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen des Dynaflo<sup>®</sup> HT ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen. Aufbau und Wirkungsweise der Dynaflo<sup>®</sup> HT Plate sind in [283] beschrieben. **Abbildung A15-1** zeigt das Dynaflo<sup>®</sup> HT. Für eine zusätzliche Steigerung des Durchsatzes sollen mit der Weiterentwicklung des Dynaflo<sup>®</sup> HT zukünftig Mikrotiterplatten mit 384 Kammern bearbeitet werden können.



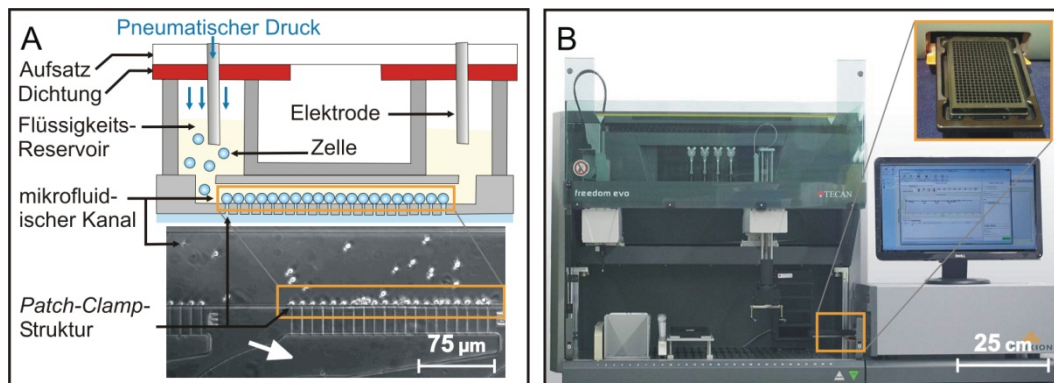
**Abbildung A15-1: Dynaflo<sup>®</sup> HT**

**A:** Gesamtaufbau. Umgezeichnete Abbildungen aus [262]. **B:** Geöffnetes System. Zwischenlagerung von Mikrotiterplatten (Links). Lagerung der Substanzen im Hintergrund. Plasma-Cleaner (Mitte-Links-Unten). **Mitte:** *Liquid-Handling*. **Mitte-rechts:** Ultraschall-Waschstation zum Reinigen der Pipetten. **Rechts:** Signalableitung mit 96 Elektroden. Umgezeichnete Abbildung aus [261]. **C:** Ausschließlich die gefangenen Zellen bleiben in der Messkammer zurück. Umgezeichnete Abbildungen aus [261].



## A16 APC-System – IonFlux™

Fluxion bietet mit dem IonFlux™ 16 sowie dem IonFlux™ HT zwei auf Mikrotiterplatten (96- bzw. 384-Well-Format) basierende Tischgeräte an. Diese als reine Lesegeräte konzipierten *Patch-Clamp*-Systeme sind für einen vollautomatisierten Betrieb erweiterbar, wobei mindestens ein Pipettier-Roboter benötigt wird, der das Befüllen (Zellen, Substanzen etc.) und das Einsetzen sowie den Austausch der Mikrotiterplatten übernimmt [276]. Bis zu vier IonFlux™ Systeme können mit einem einzelnen Pipettierroboter bedient werden [298]. Fluxion kombiniert im IonFlux™ mehrere Methoden anderer Systemanbieter, wie bspw. die von Molecular Devices entwickelte PPC-Technologie. Daraus ergibt sich ein gemittelter Datenpunkt aus dem Gesamtstrom von 20 einzelnen Zellen, die gemeinsam in einem Messkanal (Probenkammer, extrazellulärer Raum) liegen. Der mikrofluidische Systemaufbau ähnelt dem des Dynaflo® HT. Allerdings wird im Messkanal des IonFlux™ nur an zwei Stellen gemessen, sodass zwei Datenpunkte pro Experiment generiert werden. **Abbildung A16-1** zeigt die Funktionsweise und den Aufbau des IonFlux™.



**Abbildung A16-1: IonFlux™**

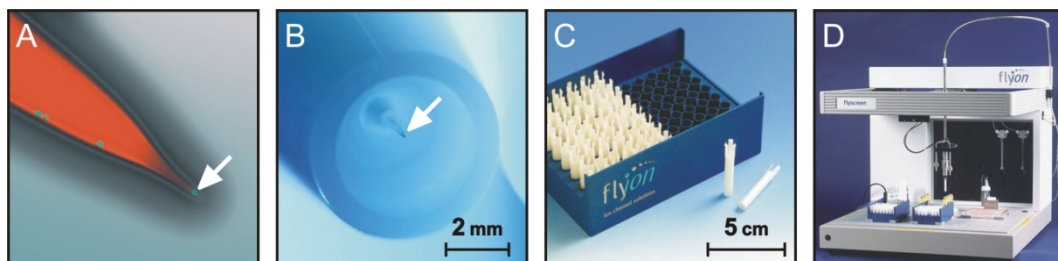
**A:** Grundlegender mikrofluidischer Systemaufbau der IonFlux™ Plate (Mikrotiterplatte). **Oben:** Umgezeichnete schematische Darstellung der IonFlux™ Plate aus [286]. Durch Aufsetzen eines elektro-pneumatischen Aufsatzmoduls im IonFlux™ erfolgt die Kontaktierung der Mikrotiterplatte. Mittels pneumatischem Druck werden die laminaren Flüssigkeitsbewegungen im mikrofluidischen Messkanal gesteuert. Ein fluidisches Netzwerk aus acht voneinander getrennten Reservoirs (nicht dargestellt) ermöglicht eine schnelle Substanzzugabe [256]. Für kontinuierliche Signalableitungen sind Referenzelektroden (Ag/AgCl) in das Aufsatzmodul integriert und tauchen in die extrazelluläre Lösung jeweils eines Messkanals ein. Auf dem Boden des Messkanals sind die Öffnungen für die Zellpositionierung und Signalableitung eingelassen. **Unten:** Mikroskopische Aufnahme von positionierten Zellen auf den *Patch-Sites* (Öffnungen) im Messkanal. Die innere Abmessung einer Öffnung beträgt ca. 1,5 µm x 1,5 µm [259]. Der Fangkanal (weißer Pfeil) ist über seine Öffnungen mit dem Zellinneren (Ganzzelleableitung) von 20 positionierten Zellen verbunden. Jeder Fangkanal (zwei pro Messkanal bzw. Experiment) besitzt eine Messelektrode (Ag/AgCl). **B:** IonFlux™ HT System (rechts) mit 64 *Patch-Clamp*-Verstärkern. Erweitert um einen Pipettierroboter Freedom Evo (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Abmessungen (IonFlux™): 50 cm x 50 cm x 25 cm (L x B x H). **Rechts oben:** Ausschnitt der IonFlux™ Mikrotiterplatte (384-Well-Format) eingelegt in den automatischen Einschub des IonFlux™ HT. Umgezeichnete Abbildungen aus [276, 286].

Mit dem IonFlux™ HT können 32 voneinander unabhängige Experimente parallel durchgeführt werden. Im Gegensatz zum IonWorks™ Quattro (**Anhang A8**) erfolgt die Signableitung kontinuierlich, sodass auch während der Substanzzugabe eine Messwertaufzeichnung stattfindet. Laut Ionescu-Zanetti *et al.* [263] bilden kontinuierliche Messwertaufzeichnungen die Grundlage für Untersuchungen an schnellen ligandengesteuerten Ionenkanälen. Eine ausführliche Beschreibung des Systemaufbaus ist [256, 259] zu entnehmen. Eine Zusammenfassung der bereits mit den IonFlux™-Systemen untersuchten Zelllinien und Ionenkanälen gibt [277]. Ergebnisse aus Versuchen am hERG-Kanal mit verschiedenen Blockern wurden in [299] anhand von Referenzliteratur vorgestellt. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen des Systems ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen.



## A17 APC-System – Flyscreen®

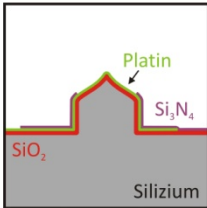
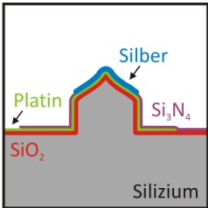
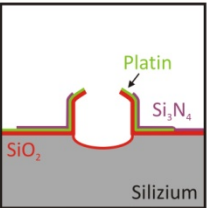
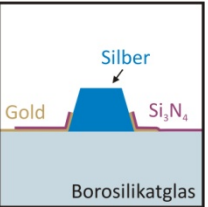
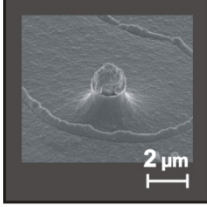
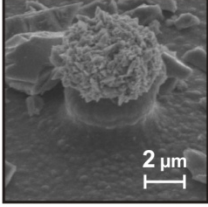
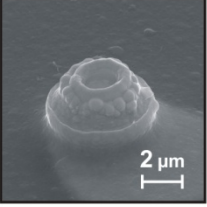
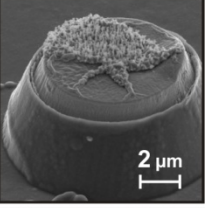
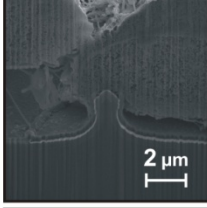
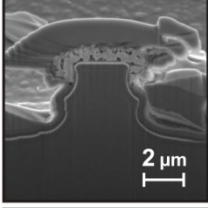
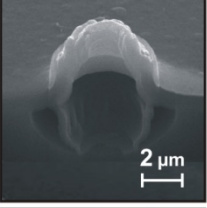
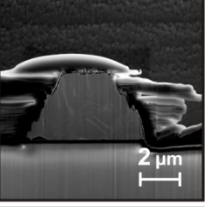
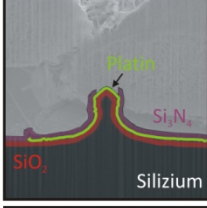
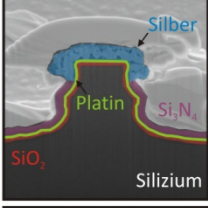
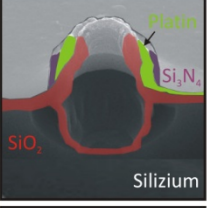
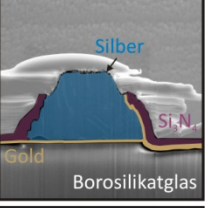
Die *Flip-the-Tip™*-Technologie fand in den Flyscreen®-Systemen der insolventen Flyion GmbH ihre Anwendung. Im Flyscreen® werden im Gegensatz zum klassischen *Patch-Clamp*-Verfahren Zellen in eine Pipette hinein gegeben. Durch leichtes Ansaugen wird eine einzelne Zelle in die Pipettenspitze gezogen (**Abbildung A17-1 A**). Durch einen stärkeren Saugpuls erfolgt dann der Übergang in die Ganzzelleableitung mit einer Erfolgsrate von bis zu 82 % für Messungen mit stabilem *Giga-Seal* (**Anhang A3**). In diesem Zusammenhang heben Lepple-Wienhues *et al.* [141] hervor, dass streng physiologische Elektrolytlösungen ohne notwendige Zusätze (bspw. Fluorid) verwendet werden können ohne dass der *Giga-Seal* gefährdet wird. In **Abbildung A17-1 D** ist das Flyscreen® 8500 mit sechs *Patch-Clamp*-Kanälen dargestellt. Die Pipetten aus Borosilikatglas sind von einem Plastik-Mantel umgeben und werden in Halterungen für 24, 48 oder 96 Stück aufbewahrt (**Abbildung A17-1 B, C**). Eine Systembeschreibung geben Fejtl *et al.* [132] sowie Lepple-Wienhues *et al.* [40]. Eine detaillierte Zusammenfassung der technischen Spezifikationen des Systems ist **Anhang A1-A5** zu entnehmen. Die Neuentwicklung von Flyion war der sog. *iPatch™*-Automat, der ebenfalls auf der *Flip-the-Tip™*-Technologie basierte [300].



**Abbildung A17-1: Flyscreen®**

**A:** Fluoreszenzmikroskopie einer FlipTip®-Pipettenspitze mit angefärbten GFP-exprimierenden Zellen (grün). Nur eine Zelle (weißer Pfeil) sitzt an der Spitze und wird untersucht. Umgezeichnete Abbildung aus [34]. **B:** Vergrößerte Darstellung einer FlipTip®-Pipettenspitze (weißer Pfeil). Die Abbildung zeigt die Kammer auf der intrazellulären Seite. Umgezeichnete Abbildung aus [150]. **C:** FlipTip® und ChipTip™ sind gebrauchsfertige Glas-Pipetten, die in einem Plastik-Mantel (weiß) eingelassen sind. Sie werden in Halterungen für 24, 48 oder 96 Stück aufbewahrt. Umgezeichnete Abbildung aus [267]. **D:** *Patch-Clamp* Roboter Flyscreen® 8500 mit bis zu sechs parallelen, asynchronen Kanälen. Umgezeichnete Abbildung aus [272].

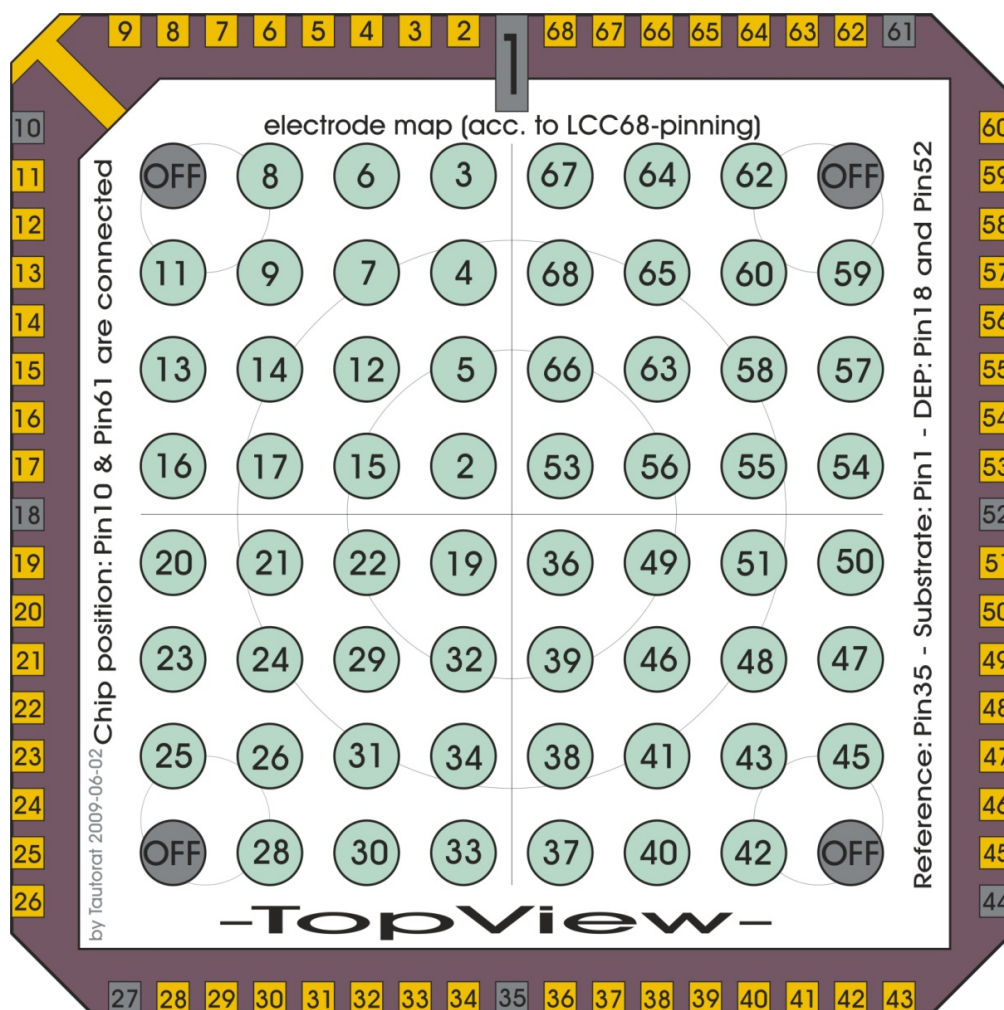
## A18 Nadelelektroden-Chiptypen

	A	B	C	D
<b>Name:</b>	Platin-Nadel	Galvanik-Silbernadel	Platin-Hohnadel	Massiv-Silbernadel
<b>Konzept:</b>				
<b>Seitenansicht: (REM)</b>				
<b>Querschnitt: (FIB &amp; REM)</b>				
<b>Querschnitt: (eingefärbt)</b>				
<b>Nadel-elektroden:</b>	64x Platin	64x Silber auf Platin	64x Platin	64x Silber
<b>Pitch (in µm):</b>	50, 75 oder 100	100	100	100
<b>Substrat:</b>	Silizium	Silizium	Silizium	Borosilikatglas
<b>Chip-Träger:</b>	68-CLCC	68-CLCC	68-CLCC	68-CLCC (Test: Flip-Chip)
<b>elektrische Kontaktierung:</b>	Golddraht-Bonden	Golddraht-Bonden	Golddraht-Bonden	Golddraht-Bonden (Test: Flip-Chip)
<b>verwendbare Elektroden:</b>	60* oder 64	60*	64	60*
<b>interne Referenzele.:</b>	JA (4x)	JA (1x)	JA (1x)	JA (1x)
<b>DEP-Elektroden:</b>	teilweise	NEIN	NEIN	NEIN
<b>Elektroden-zuordnung:</b>	siehe A21 (Abb. A-D)	siehe A19	siehe A21 (Abb. E&F)	siehe A19

\* Eckelektroden (A1, A8, H1 und H8) sind nicht kontaktiert

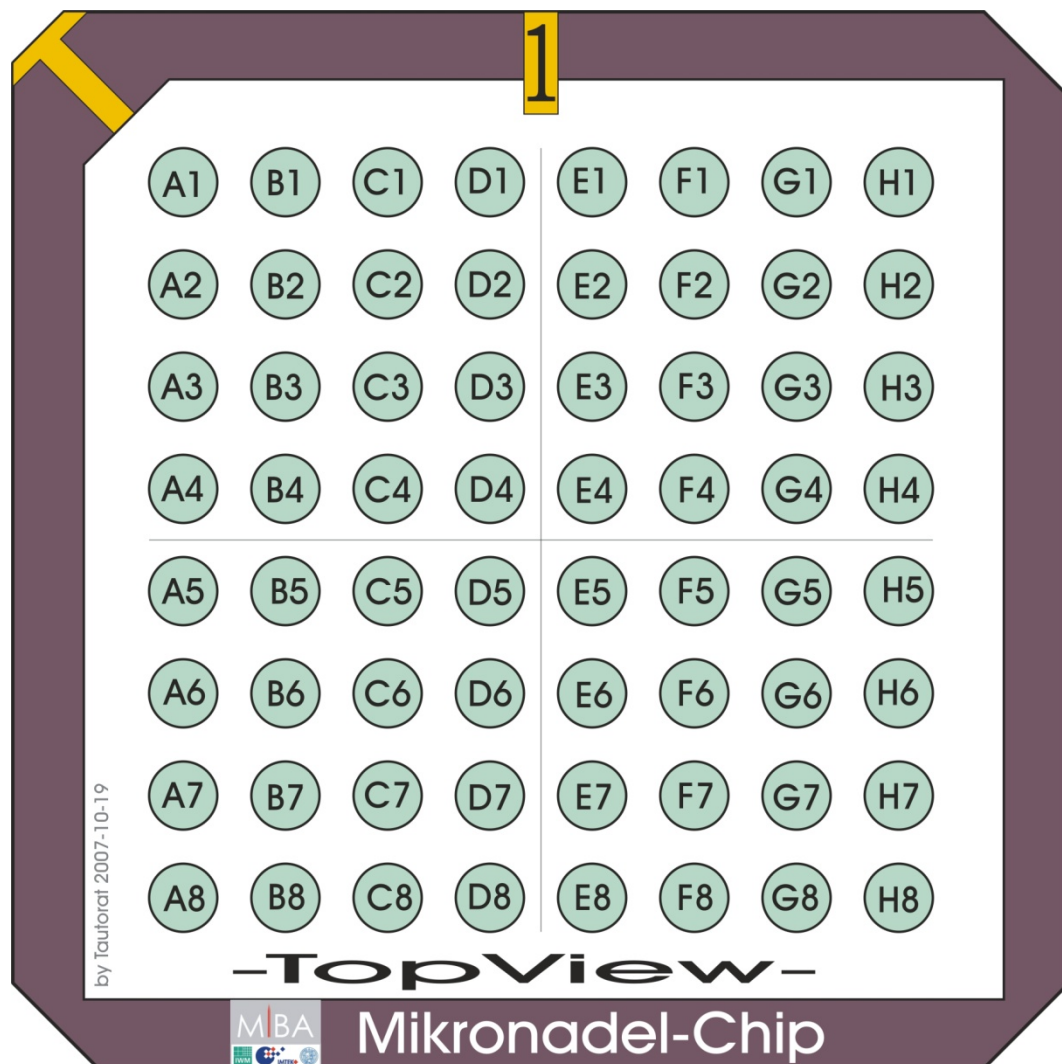
## A19 Aktuelle Elektrodenzuordnung

Bei der Vergabe der Elektrodenbezeichnungen handelt es sich um eine technische Zuordnung unter Einbeziehung der zugehörigen Pin-Bezeichnung. Die Zählrichtung der Pins erfolgt entgegen dem Uhrzeigersinn [211]. Die Elektrodenbezeichnung bzw. -zuordnung unter Einbeziehung der zugehörigen Pin-Bezeichnung hat allerdings zur Folge, dass es bspw. keine Elektrode mit der Bezeichnung Elektrode 1 geben kann, da der Pin 1 des 68-CLCC direkt an das sog. *Die-Attach-Pad* angeschlossen ist [211]. Beim *Die-Attach-Pad* handelt es sich um die metallisierte Fläche im Chip-Träger unterhalb des Sensorchips. Aufgrund mehrerer entwicklungsbedingter Modifikationen des Chip-Layouts existieren fünf verschiedene Zuordnungen der Elektroden zu den äußeren, elektrischen Kontakten (Pins) am Chip-Träger. Die teilweise verwendete Namensgebung der Elektrodenzuordnungen ist auf den jeweils verantwortlichen Chipdesigner zurückzuführen. Durch Integration der Chippositionserkennung in den Chip-Träger gibt es insgesamt sieben verschiedene Anschlussbelegungen der Sensor-Chips. Die Sensor-Chips der älteren Generationen wurden nach dem Gebrauch aussortiert. Ihre Elektrodenzuordnungen in **Anhang A21** gelten als veraltet.



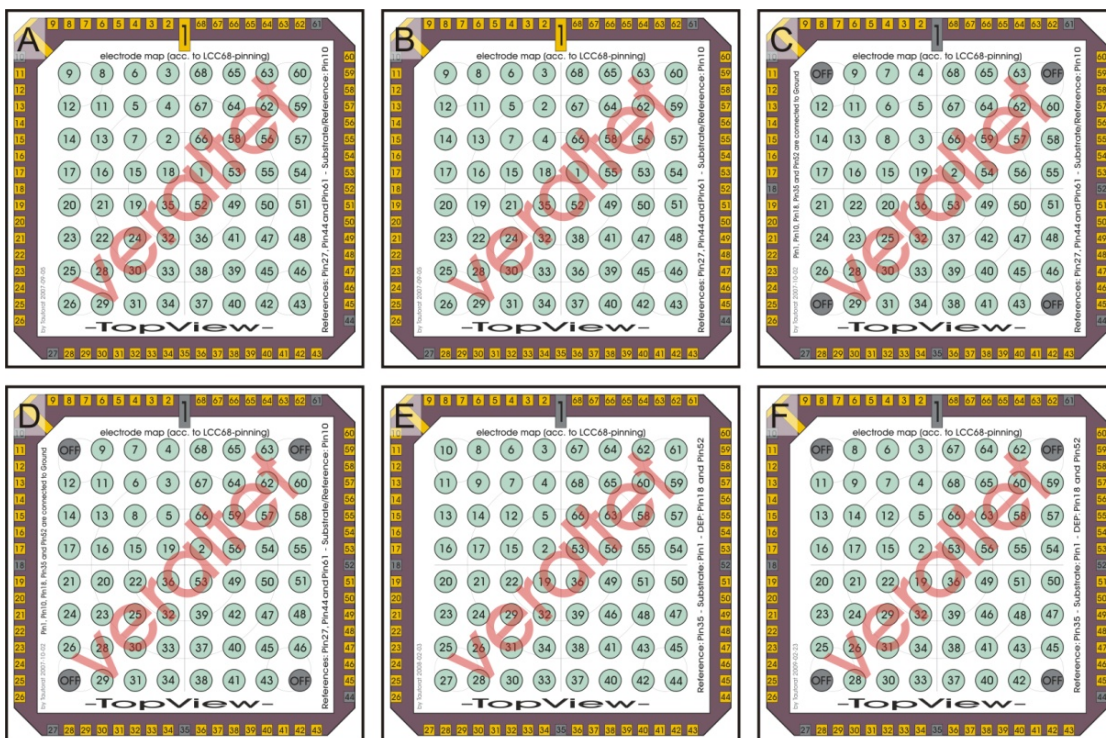
## A20 Elektrodenzuordnung (Schachbrett)

Um Missverständnisse für die Kommunikation außerhalb der Forschergruppe zu vermeiden, wurde eine zusätzliche Elektrodenzuordnung eingeführt, die die Elektrode entsprechend ihrer Lage im 8x8 MPSA bezeichnet. Hierfür wird das MPSA in acht Spalten (A bis H) und acht Zeilen (1 bis 8) eingeteilt. Diese Zuordnung wurde zusätzlich auf den Sensor-Chips für eine bessere Handhabbarkeit bei der mikroskopischen Betrachtung untergebracht.



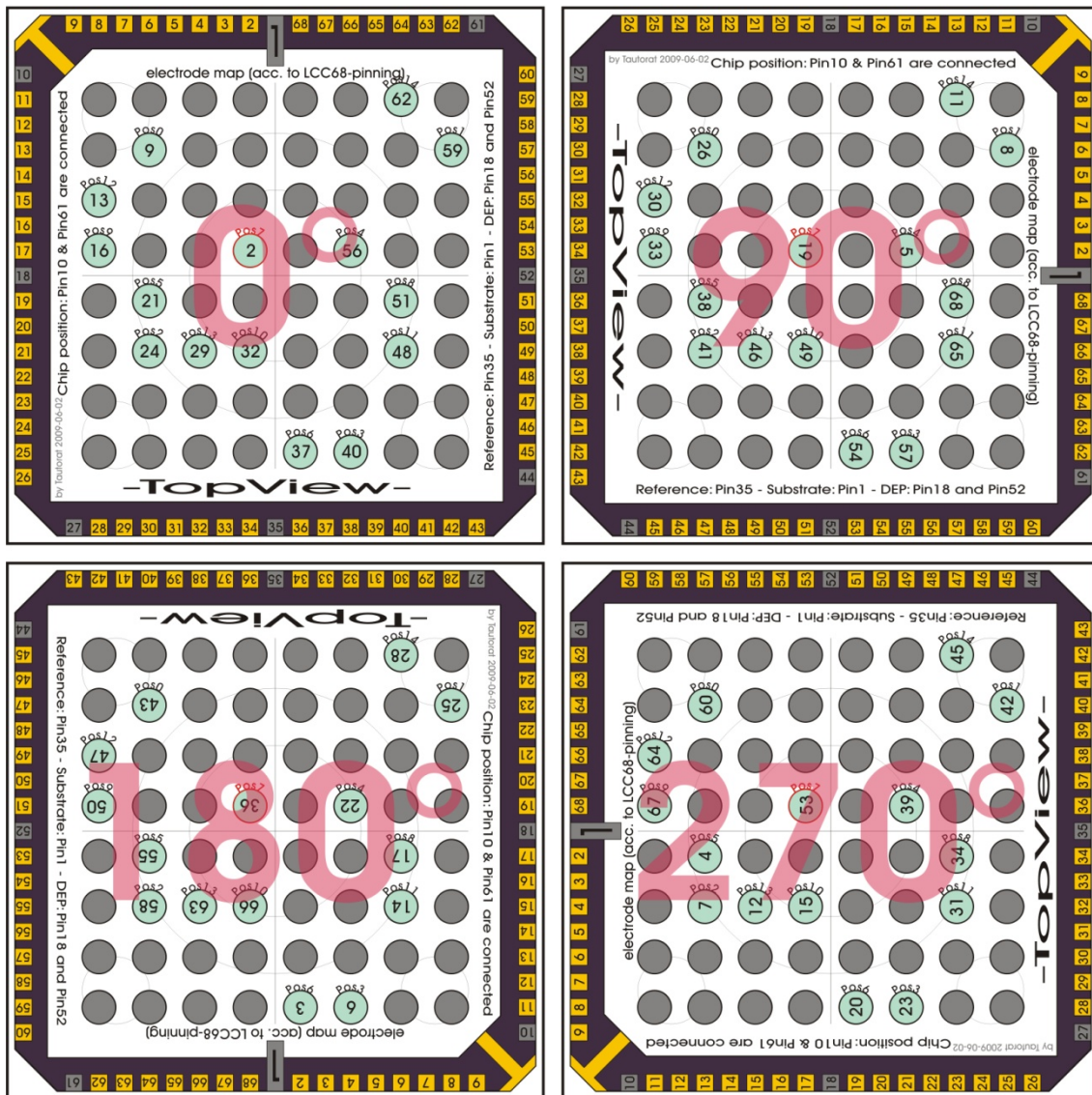


# A21 Veraltete Elektrodenzuordnung



## A22 Chip-Drehung (4×90°)

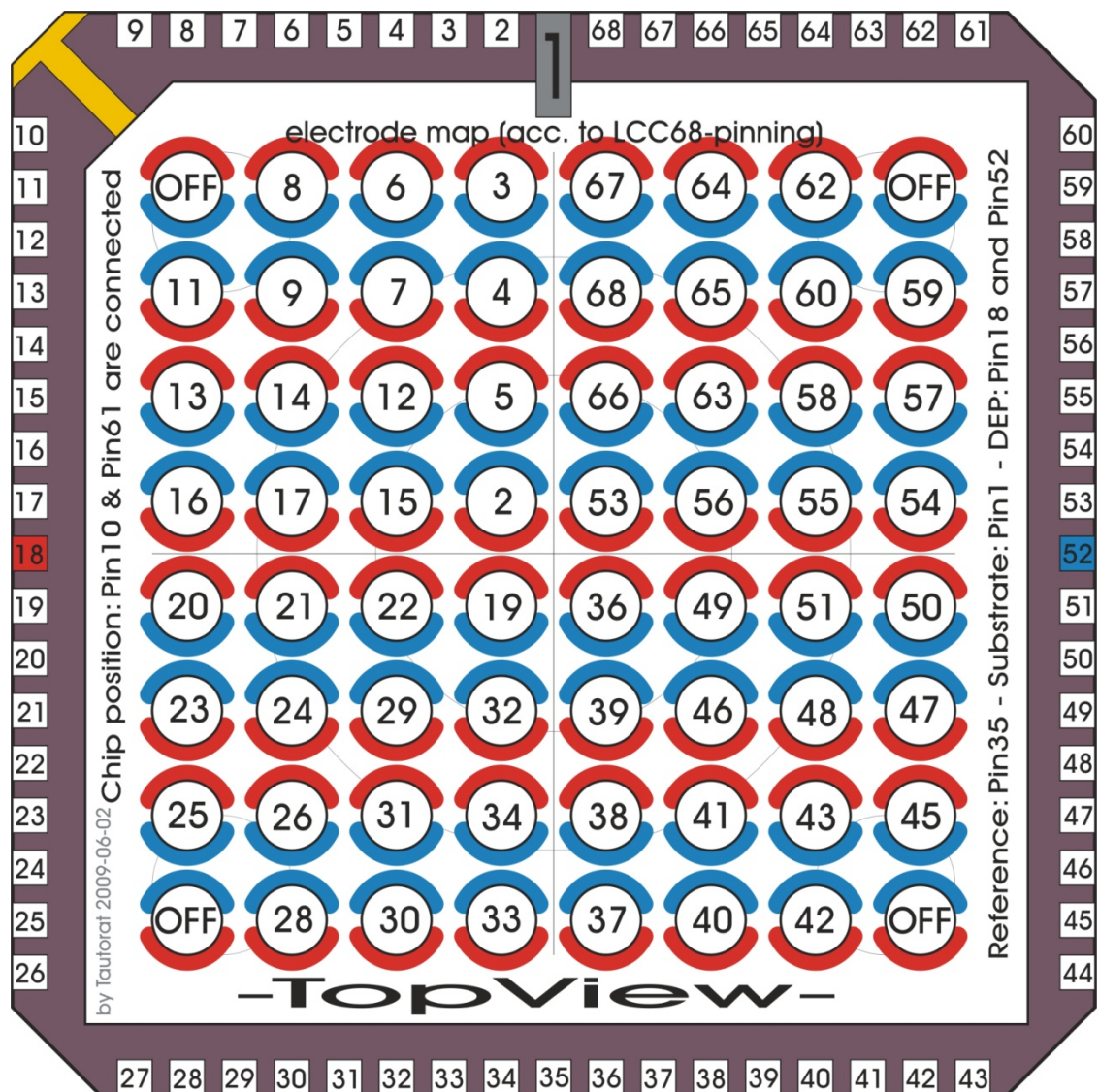
Um den schaltungstechnischen Aufwand in der Prototypenphase auf ein Minimum zu reduzieren, wurden zeitgleich nur 15 der insgesamt 60 kontaktierten Elektroden (4×15) eines Sensorchips mit der Messelektronik verbunden. Dieser Vereinfachung liegen die konstruktiven Eigenschaften von Chip-Sockel und Chip-Träger zugrunde, die das Einsetzen des Sensorchips mit vier verschiedenen Möglichkeiten erlauben. Unter Festlegung der Standard-Position (0°) erfolgte eine Zuordnung der drei anderen möglichen Chip-Positionen durch Drehung des Sensorchips im Uhrzeigersinn (es gilt: Draufsicht auf Sensorchip). Die nachfolgende Abbildung gilt für das aktuelle Systemkonzept mit 15 Messkanälen (Pos0 bis Pos14). Der 15. Kanal (Pos7) ist der *Voltage-Clamp*-Kanal. Die Abbildung zeigt für die vier Chip-Positionen (0°, 90°, 180° und 270°) die jeweils kontaktierten Elektroden anhand der Elektrodenzuordnung. Für Arbeiten mit dem Mikroskop wurde diese Darstellung in Form einer einstellbaren Drehscheibe verwendet.





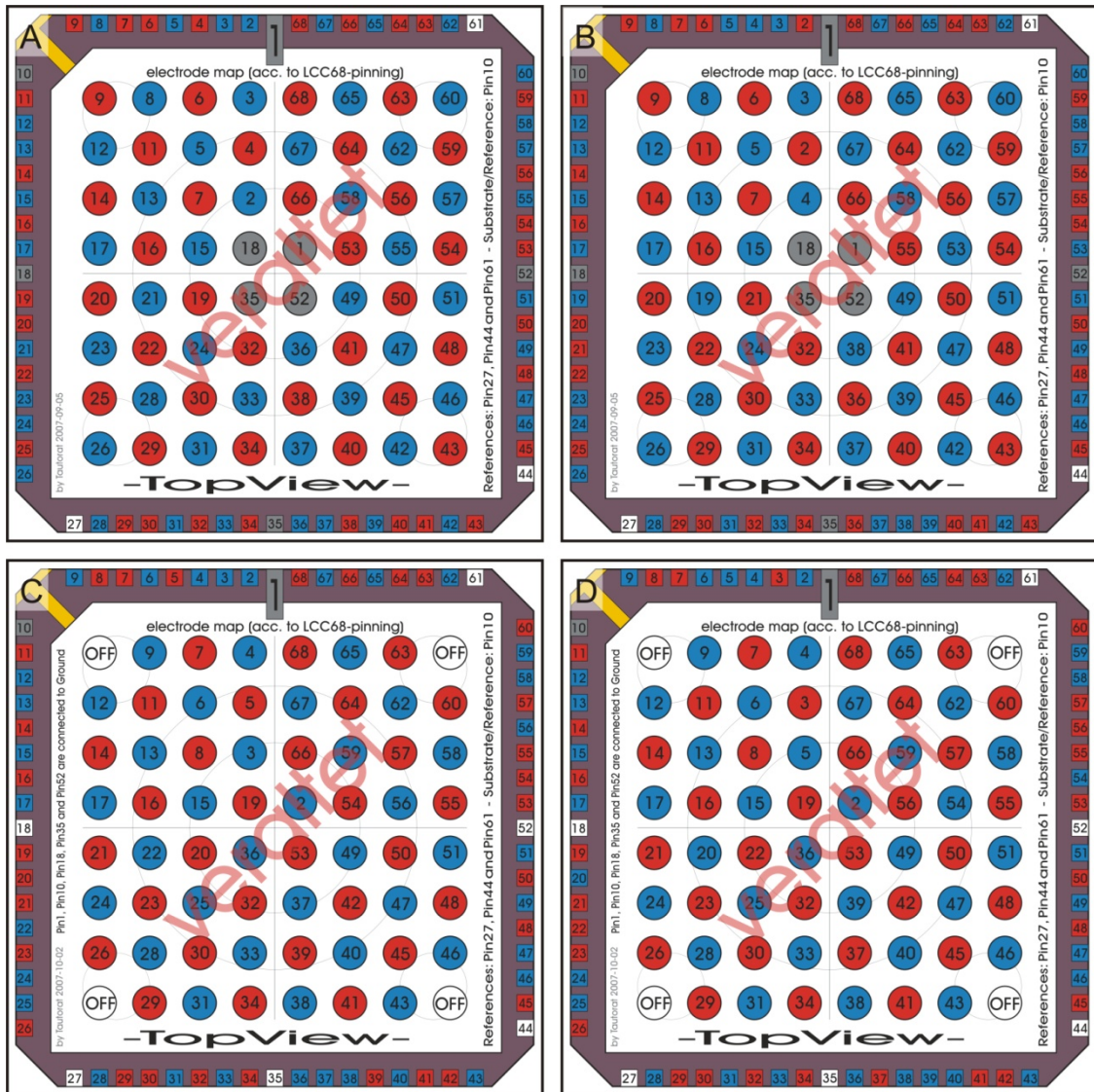
## A23 DEP-Zellpositionierung mit DEP-Elektroden

Eine weitere Metallisierung in der Prozessierung des Sensorchips führte zur Integration der nierenförmigen DEP-Elektroden. Die Farbkodierung in der nachfolgenden Abbildung zeigt die Zuordnung der DEP-Elektroden zu den Anschluss-Pins. Die DEP-Elektroden sind als farbige Kreisausschnitte dargestellt. Über Pin 18 (rot) und Pin 52 (blau) werden alle DEP-Elektroden parallel angeschlossen. Die Zuordnung der Nadelelektroden entspricht dem aktuellen Stand laut **Anhang A19**. Jeweils eine rot-markierte und eine blau-markierte DEP-Elektrode umschließt eine Nadelelektrode.



## A24 DEP-Zellpositionierung mit Nadelelektroden

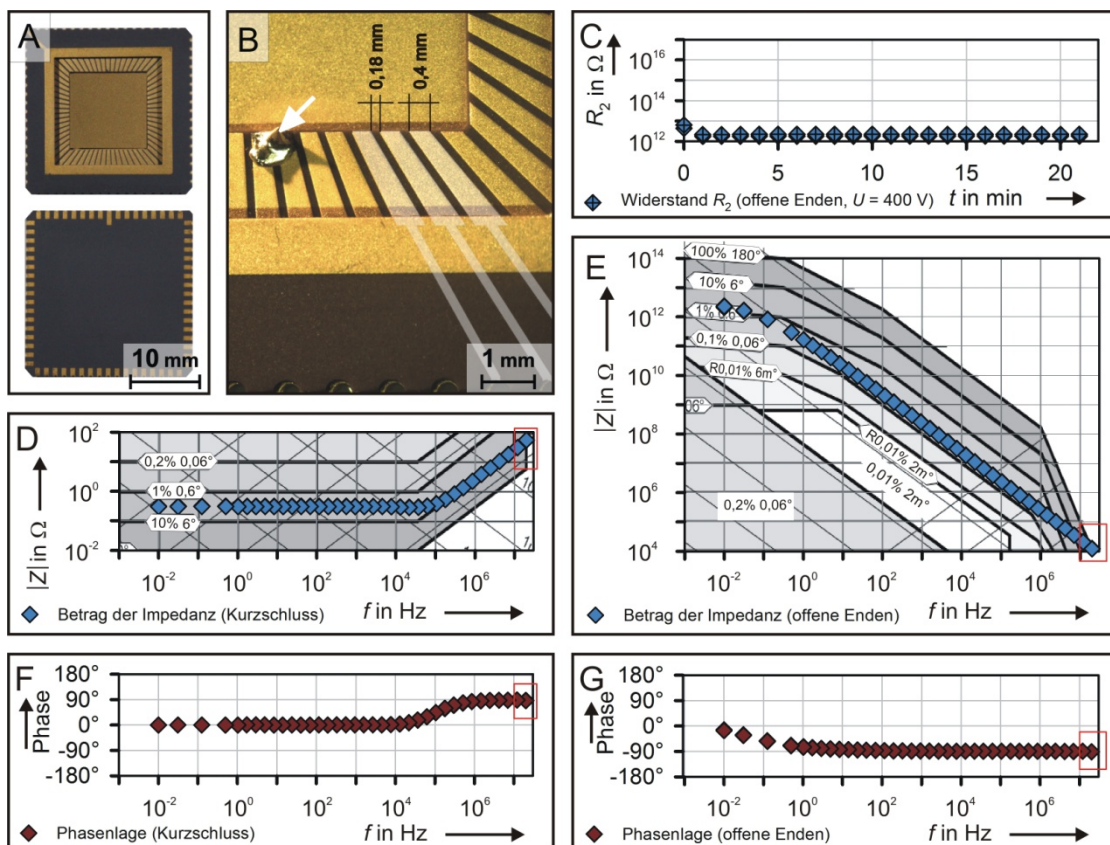
DEP-Zellpositionierungen mit Nadelelektroden wurden ausschließlich mit veralteten Chip-Generationen (**Anhang A21**) durchgeführt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen, dass der Anschluss der Nadelelektroden direkt über ihre Anschluss-Pins erfolgte. Für eine definierte Feldverteilung wurden die Elektroden im 8×8 MPSA abwechselnd in Form eines Schachbrettes kontaktiert.





## A25 Ersatzschaltbild Chip-Träger: 68-CLCC

**Abbildung A25-1** dokumentiert die Messergebnisse zur Erstellung eines ESB für den 68-CLCC Chip-Träger (6.2.1.4). Hierfür wurde die elektrische Kopplung zwischen zwei benachbarten Kontakten (Pin 53 und Pin 54) an drei Chip-Trägern ( $n = 3$ ) ermittelt. Die Auswahl dieser beiden Kontakte erfolgte zufällig. **Tabelle A25-1** beschreibt die einzelnen Untersuchungsschritte. Das resultierende ESB zeigt **Abbildung A25-2 A**, dessen Frequenzverhalten liegt in **Abbildung A25-2 B** nahezu deckungsgleich zu den gemessenen Werten aus **Abbildung A25-1 C-G** und bestätigt damit seine Gültigkeit.



### Abbildung A25-1: Ersatzschaltbild Chip-Träger 68-CLCC - Messergebnisse

Dokumentation der Messergebnisse zur Ermittlung des ESB des Chip-Trägers 68-CLCC (Kyocera) für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens. **A:** Chip-Träger ohne Sensorchip in Drauf- und Untersicht. **B:** Detailansicht der chipseitigen Kontakte (Pads) in Draufsicht. Kontaktabstand ca. 0,18 mm. Die Kontaktflächen sind vergoldet [211]. Weißer Pfeil zeigt gelöteten Kurzschluss der Kontakte auf der Chip-Seite zur Bestimmung von  $R_1$  und  $L_1$ . Drei Kontakte sind überlagert mit dem Verlauf der internen Metallisierung (Darstellung: weiß mit 50 % Transparenz) im Chip-Träger [211]. **C-G:** Überlagerte Darstellung der Messwerte von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca. 22 °C. Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 31 % (Fluke 971). **C:** Isolationswiderstand  $R_2$  abgetragen über die Messdauer (Elektrifizierungszeit). Messgerät: 6517 B (Keithley). Messspannung:  $U = 400$  V. **D-G:** Messgerät: Alpha-ANB mit ZG-2 (Novocontrol).  $U_{\text{eff}} = 1$  V. Roter Kasten: Umhüllt alle Messwerte oberhalb einer Genauigkeit von 10 % (Impedanz) bzw. 6° (Phase). Ausschluss dieser Werte für die Erstellung des ESB. **D, E:** Unterlegte Darstellung der Genauigkeit des Alpha-ANB bei Impedanzmessungen. Umgezeichnete Abbildung aus [301]. **D, F:** Betrag und Phase der Kurzschlussimpedanz (kurzgeschlossene Kontakte) abgetragen über die Frequenz. **E, G:** Betrag und Phase der Isolationsimpedanz (offene Kontakte,  $R_2 || C_1$ ) abgetragen über die Frequenz.

Tabelle A25-1: Ersatzschaltbild Chip-Träger 68-CLCC - Versuchsdurchführung

Nr.	Arbeitsschritt	Beschreibung	Hinweise
1.	Vorbereitung	Anlöten von Draht ( $l = 1,5 \text{ cm}$ , $d = 0,125 \text{ mm}$ , Silber 99,99 %) jeweils an die Lötseite der Kontakte	Verunreinigungen durch Flussmittel vermeiden
2.	Reinigung	Ultraschallbad ( $t = 15 \text{ min}$ ) in destilliertem Wasser Gerät: Sonorex Digital 10P (BANDELIN electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Dtl.), Wirkleistung: 100 % bei $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$	anschließend trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 2 \text{ h}$ )
		Waschen in Methanol (99,5 %, FLUKA 65550) $t = 15 \text{ min}$	mit Druckluft (Druckluft 67, Kontakt Chemie) Reste entfernt trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 5 \text{ h}$ )
3.	Lagerung	trocken, abgedeckte Petrischale, Raumtemperatur	Handschuhe tragen beim Umsetzen
4.	Kalibrierung	Kalibrierung des Messaufbaus: Alpha-ANB mit ZG2 (Novocontrol) mit Messkammer $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz (wie bei Messung) Messkammer: geschirmte Alu-Box, mit zwei BNC-Anschlüssen in ca. 2 cm Abstand zueinander	Kalibrierungen: - ALL Calibration ohne externe Anschlüsse, - Load Short&Open Calibration mit ZG2 und Modellzelle (Short und 100 $\Omega$ ), - Small Capacitance Calibration mit Messkammer Alle Verbindungskabel wurden auf Arbeitsfläche fest fixiert.
5.	Impedanz (offene Enden)	Impedanzmessung mit Alpha-ANB und ZG2 $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz, Messkammer Messergebnis: <b>Abb. A25-1 E, G &amp; Abb. A25-2 A</b>	Lötverbindung der Proben an BNC-Buchse in Messkammer Proben liegen auf einem Glasträger (Isolation) Beschränkung auf Impedanzwerte (10 mHz $\leq f \leq 5,4 \text{ MHz}$ ) innerhalb $\pm 10 \%$ Toleranz [301]
		Software: WinDETA 5.77 (Novocontrol) Aufzeichnung und Abspeichern der Daten	Mittelwert aus 5 Messwerten (Average = 5)
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: $21,9 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 33,2 % Luftfeuchte stabil
6.	Isolationswiderstand $R_2$ (offene Enden)	Widerstandsmessung mit 6517B (Keithley) in Messkammer mit aktiver Schirmung. 1 Messwert/min, Dauer: $t = 20 \text{ min}$ (Elektrifizierungszeit), $U = 400 \text{ V}$ , 2 T $\Omega$ Messbereich und ZeroCheck. Referenz: Keithley [302, 303] Messergebnis: <b>Abb. A25-1 C &amp; Abb. A25-2 A</b>	Lötverbindung der Probe an Buchsen in Messkammer. Fixierung aller Kabel, <i>Widerstand Keithley6517B.vi</i> für Initialisierung, Aufwärmphase: 1 h, interne Mittelwertbildung über 50 Werte, Dämpfung eingeschaltet, nicht alternierende Messmethode, Messfehler: größer $\pm 25 \text{ G}\Omega$ .
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $21,9 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: ca. $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 31 % Luftfeuchte stabil
7.	Kurzschlussimpedanz	Ablauf: siehe Nr. 5 Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A25-1 B</b> Messergebnis: <b>Abb. A25-1 D, F &amp; Abb. A25-2 A</b>	Beschränkung auf Impedanzwerte (10 mHz $\leq f \leq 10 \text{ MHz}$ ) Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Messkammer: Temperatur ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil Umgebung: ca. $21,6 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 32,6 % Luftfeuchte stabil
8.	Kurzschlusswiderstand ( $R_1$ )	Widerstandsmessung mit 2001 Multimeter (Keithley) Methode: 4-Draht-Messung + Relativmessung Referenz: Keithley [304] Kalibrierung: 06.07.2010 (Keithley) Messergebnis: <b>Abb. A25-2 A</b>	Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A25-1 B</b> Reinigung der Messkabel ( $l = 25 \text{ cm}$ ) und Buchsen ( $d = 4 \text{ mm}$ ) mit Kontaktspray (Kontakt 60, Kontakt Chemie). Relativmessung, um Zuleitungswiderstand zu eliminieren. Messbereich: 20 $\Omega$ , Aufwärmphase ca. 1 h
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 30,5 % Luftfeuchte stabil
9.	Ersatzschaltbild	Verwendung der Software WinFIT 3.2 (Novocontrol) Resultat: <b>Abb. A25-2 A, B</b>	Mittelwertbildung von $Z_s'$ und $Z_s''$ der drei Proben ( $n = 3$ ) Gauss- und danach Newton-Verfahren Bestimmung von $L_1$ (Werte aus Nr. 7 und Vorgabe von $R_1$ ) und $C_1$ (Werte aus Nr. 5 und Vorgabe von $R_1$ , $L_1$ und $R_2$ )

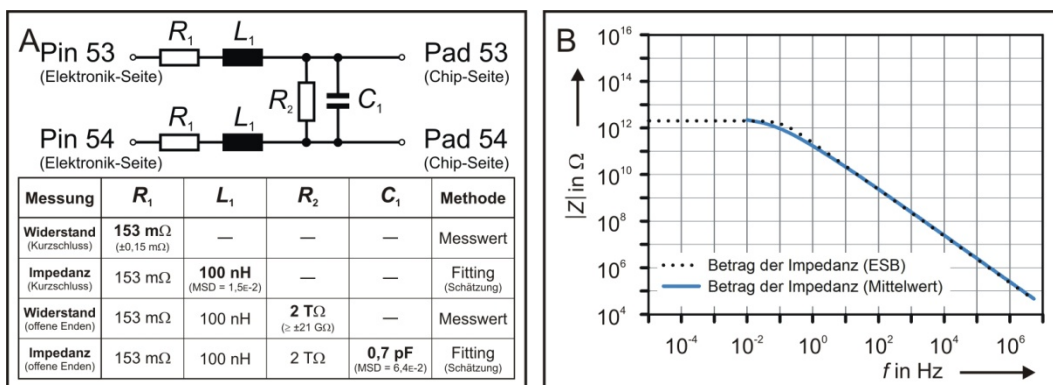
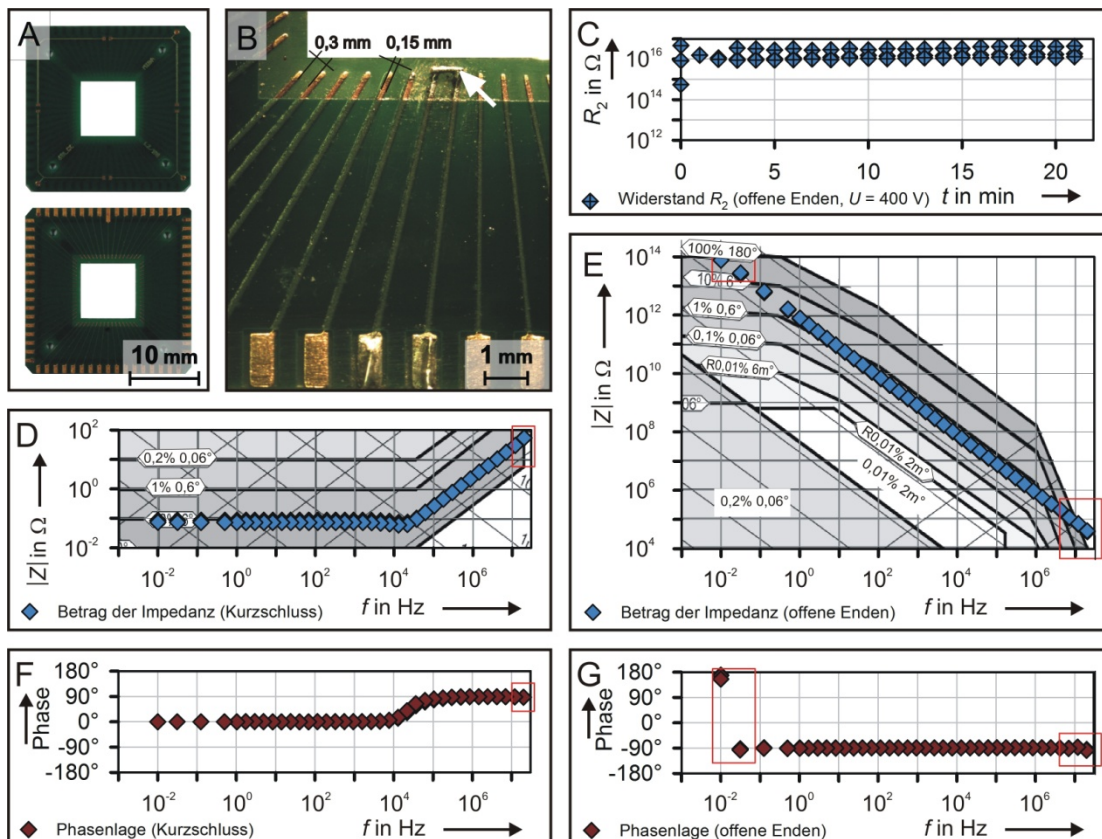


Abbildung A25-2: Ersatzschaltbild Chip-Träger 68-CLCC - Zusammenfassung

ESB des Chip-Trägers 68-CLCC (Kyocera) für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens anhand von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca.  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 31 % (Fluke 971). **A:** Modell des Ersatzschaltbildes und tabellarische Zusammenfassung der Einzelkomponenten. Parasitäre Anteile gegen Masse sind nicht berücksichtigt. **B:** Betrag der Impedanz des ESB (gestrichelter Kurvenverlauf) sowie der Messwerte (blaue Kurve) abgetragen über die Frequenz.

## A26 Ersatzschaltbild Chip-Träger: *Flip-Chip*

**Abbildung A26-1** dokumentiert die Messergebnisse zur Erstellung eines ESB für den Chip-Träger (Flip-Chip-Montage) aus Platinmaterial FR-4 (6.2.1.4). Hierfür wurde die elektrische Kopplung zwischen zwei benachbarten Kontakten (Pin 53 und Pin 54) an drei Chip-Trägern ermittelt (**Anhang A25**). **Tabelle A26-1** beschreibt die einzelnen Untersuchungsschritte. Das resultierende ESB zeigt **Abbildung A26-2 A**, dessen Frequenzverhalten liegt in **Abbildung A26-2 B** nahezu deckungsgleich zu den gemessenen Werten aus **Abbildung A26-1 C-G** und bestätigt damit seine Gültigkeit.



**Abbildung A26-1: Ersatzschaltbild Chip-Träger Flip-Chip - Messergebnisse**

Dokumentation der Messergebnisse zur Ermittlung des ESB des Chip-Trägers aus Platinmaterial für *Flip-Chip*-Montage für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens. Platinmaterial: FR-4. **A**: Chip-Träger ohne Sensorchip in Drauf- und Untersicht. **B**: Detailansicht der Kontakte (oben: chipseitig und unten: Elektronik-Seite) auf Unterseite des Trägers. Kontaktabstand (chipseitig) ca. 0,3 mm. Kontaktflächen sind vergoldet. Weißer Pfeil zeigt gelöteten Kurzschluss der Kontakte auf der Chip-Seite zur Bestimmung von  $R_1$  und  $L_1$ . **Mitte**: Lötstellen an zwei Kontakten (Elektronik-Seite) ausschließlich für diese Untersuchungen. **C-G**: Überlagerte Darstellung der Messwerte von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca. 21,5 °C. Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 32 % (Fluke 971). **C**: Isolationswiderstand  $R_2$  abgetragen über die Messdauer (Elektrifizierungszeit). Messgerät: 6517 B (Keithley). Messspannung:  $U = 400$  V. Messbereich von 20 T $\Omega$  wurde überschritten. **D-G**: Messgerät: Alpha-ANB mit ZG-2 (Novocontrol).  $U_{\text{eff}} = 1$  V. Roter Kasten: Umhüllt alle Messwerte oberhalb einer Genauigkeit von 10 % (Impedanz) bzw. 6° (Phase). Ausschluss dieser Werte für die Erstellung des ESB. **D, E**: Unterlegte Darstellung der Genauigkeit des Alpha-ANB bei Impedanzmessungen. Umgezeichnete Abbildung aus [301]. **D, F**: Betrag und Phase der Kurzschlussimpedanz (kurzgeschlossene Kontakte) abgetragen über die Frequenz. **E, G**: Betrag und Phase der Isolationsimpedanz (offene Kontakte,  $R_2 || C_1$ ) abgetragen über die Frequenz.

Tabelle A26-1: Ersatzschaltbild Chip-Träger *Flip-Chip* - Versuchsdurchführung

Nr.	Arbeitsschritt	Beschreibung	Hinweise
1.	Vorbereitung	Anlöten von Draht ( $l = 1,5 \text{ cm}$ , $d = 0,125 \text{ mm}$ , Silber 99,99 %) jeweils an die Lötseite der Kontakte	Verunreinigungen durch Flussmittel vermeiden
2.	Reinigung	Ultraschallbad ( $t = 15 \text{ min}$ ) in destilliertem Wasser Gerät: Sonorex Digital 10P (Fa. Bandelin), Wirkleistung: 100 % bei $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$	anschließend trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 2 \text{ h}$ )
		Waschen in Methanol (99,5 %, FLUKA 65550) $t = 15 \text{ min}$	mit Druckluft (Druckluft 67, Kontakt Chemie) Reste entfernt trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 5 \text{ h}$ )
3.	Lagerung	trocken, abgedeckte Petrischale, Raumtemperatur	Handschuhe tragen beim Umsetzen
4.	Kalibrierung	Kalibrierung des Messaufbaus: Alpha-ANB mit ZG2 (Novocontrol) mit Messkammer $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz (wie bei Messung) Messkammer: geschirmte Alu-Box, mit zwei BNC-Anschlüssen in ca. 2 cm Abstand zueinander	Kalibrierungen: - ALL Calibration ohne externe Anschlüsse, - Load Short&Open Calibration mit ZG2 und Modellzelle (Short und 100 $\Omega$ ), - Small Capacitance Calibration mit Messkammer Alle Verbindungskabel wurden auf Arbeitsfläche fest fixiert.
5.	Impedanz (offene Enden)	Impedanzmessung mit Alpha-ANB und ZG2 $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz, Messkammer Messergebnis: <b>Abb. A26-1 E, G &amp; Abb. A26-2 A</b>	Lötverbindung der Proben an BNC-Buchse in Messkammer Proben liegen auf einem Glasträger (Isolation) Beschränkung auf Impedanzwerte (60 mHz $\leq f \leq 4 \text{ MHz}$ ) innerhalb $\pm 10 \%$ Toleranz [301]
		Software: WinDETA 5.77 (Novocontrol) Aufzeichnung und Abspeichern der Daten	Mittelwert aus 5 Messwerten (Average = 5)
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: $21,3 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 33,5 % Luftfeuchte stabil
6.	Isolationswiderstand $R_2$ (offene Enden)	Widerstandsmessung mit 6517B (Keithley) in Messkammer mit aktiver Schirmung. 1 Messwert/min, Dauer: $t = 20 \text{ min}$ (Elektrifizierungszeit), $U = 400 \text{ V}$ , 200 T $\Omega$ Messbereich und ZeroCheck. Referenz: Keithley [302, 303] Messergebnis: <b>Abb. A26-1 C &amp; Abb. A26-2 A</b>	Lötverbindung der Probe an Buchsen in Messkammer. Fixierung aller Kabel, <i>Widerstand Keithley6517B.vi</i> für Initialisierung, Aufwärmphase: 1 h, interne Mittelwertbildung über 50 Werte, Dämpfung eingeschaltet, nicht alternierende Messmethode, Messfehler: größer $\pm 25 \text{ G}\Omega$ .
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 30,9 % Luftfeuchte stabil
7.	Kurzschlussimpedanz	Ablauf: siehe Nr. 5 Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A26-1 B</b> Messergebnis: <b>Abb. A26-1 D, F &amp; Abb. A26-2 A</b>	Beschränkung auf Impedanzwerte (10 mHz $\leq f \leq 9,1 \text{ MHz}$ ) Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Messkammer: Temperatur ca. $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil Umgebung: $21,4 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 33,4 % Luftfeuchte stabil
8.	Kurzschlusswiderstand ( $R_1$ )	Widerstandsmessung mit 2001 Multimeter (Keithley) Methode: 4-Draht-Messung + Relativmessung Referenz: Keithley [304] Kalibrierung: 06.07.2010 (Keithley) Messergebnis: <b>Abb. A26-2 A</b>	Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A26-1 B</b> Reinigung der Messkabel ( $l = 25 \text{ cm}$ ) und Buchsen ( $d = 4 \text{ mm}$ ) mit Kontaktspray (Kontakt 60, Kontakt Chemie). Relativmessung, um Zuleitungswiderstand zu eliminieren. Messbereich: 20 $\Omega$ , Aufwärmphase ca. 1 h
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwert: $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 31,1 % Luftfeuchte stabil
9.	Ersatzschaltbild	Verwendung der Software WinFIT 3.2 (Novocontrol) Resultat: <b>Abb. A26-2 A, B</b>	Mittelwertbildung von $Z_s'$ und $Z_s''$ der drei Proben ( $n = 3$ ) Gauss- und danach Newton-Verfahren Bestimmung von $L_1$ (Werte aus Nr. 7 und Vorgabe von $R_1$ ) und $C_1$ (Werte aus Nr. 5 und Vorgabe von $R_1$ , $L_1$ und $R_2$ )

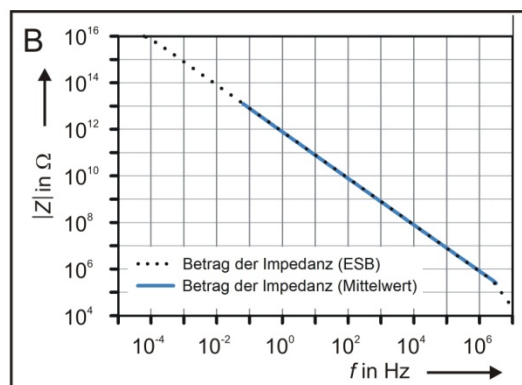
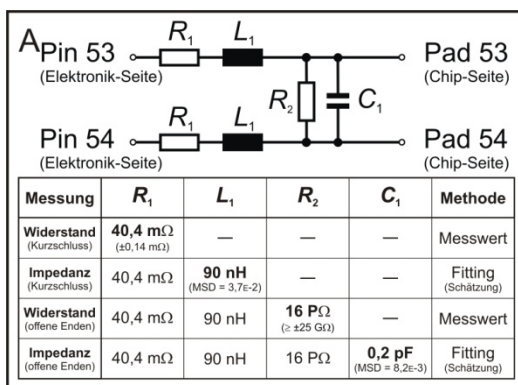


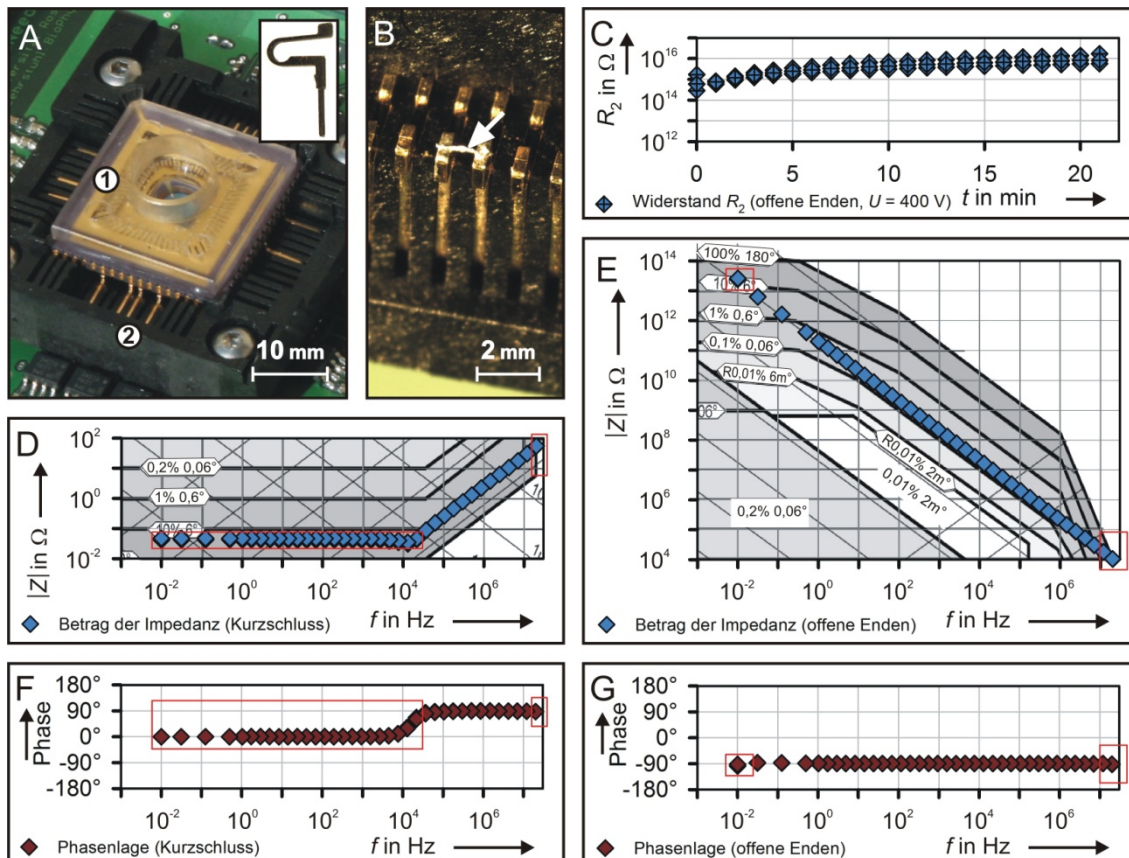
Abbildung A26-2: Ersatzschaltbild Chip-Träger *Flip-Chip* - Zusammenfassung

ESB des Chip-Trägers aus Platinenmaterial (FR-4) für *Flip-Chip*-Montage für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens anhand von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca.  $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 32 % (Fluke 971). **A:** Modell des Ersatzschaltbildes und tabellarische Zusammenfassung der Einzelkomponenten. Parasitäre Anteile gegen Masse sind nicht berücksichtigt. **B:** Betrag der Impedanz des ESB (gestrichelter Kurvenverlauf) sowie der Messwerte (blaue Kurve) abgetragen über die Frequenz.



## A27 Ersatzschaltbild Chip-Sockel: Yamaichi

**Abbildung A27-1** dokumentiert die Messergebnisse zur Erstellung eines ESB für den Chip-Sockel (6.2.2.3). Hierfür wurde die elektrische Kopplung zwischen zwei benachbarten Kontakten (Pin 53 und Pin 54) an drei Chip-Trägern ermittelt (**Anhang A25**). **Tabelle A27-1** beschreibt die einzelnen Untersuchungsschritte. Das resultierende ESB zeigt **Abbildung A27-2 A**, dessen Frequenzverhalten liegt in **Abbildung A27-2 B** deckungsgleich zu den gemessenen Werten aus **Abbildung A27-1 C-G** und bestätigt damit seine Gültigkeit.



**Abbildung A27-1: Ersatzschaltbild Chip-Sockel Yamaichi - Messergebnisse**

Dokumentation der Messergebnisse zur Ermittlung des ESB des Chip-Sockels IC51-0684-390-1 für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens. **A:** Sensorchip (1) eingesetzt in den Chip-Sockel (2). Rechts oben: einzelner Kontakt. **B:** Detailansicht der Kontakte des Chip-Sockels. Rasterabstand = 1,27 mm. Kontaktflächen sind vergoldet [216]. Weißer Pfeil zeigt gelöteten Kurzschluss der Kontakte auf der Chip-Seite zur Bestimmung von  $R_1$  und  $L_1$ . **C-G:** Überlagerte Darstellung der Messwerte von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca. 22 °C. Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 32 % (Fluke 971). **C:** Isolationswiderstand  $R_2$  abgetragen über die Messdauer (Elektrifizierungszeit). Messgerät: 6517 B (Keithley). Messspannung:  $U = 400$  V. Messbereich von 20 T $\Omega$  wurde überschritten. **D-G:** Messgerät: Alpha-ANB mit ZG-2 (Novocontrol).  $U_{\text{eff}} = 1$  V. Roter Kasten: Umhüllt alle Messwerte oberhalb einer Genauigkeit von 10 % (Impedanz) bzw. 6° (Phase). Ausschluss dieser Werte für die Erstellung des ESB. **D, E:** Unterlegte Darstellung der Genauigkeit des Alpha-ANB bei Impedanzmessungen. Umgezeichnete Abbildung aus [301]. **D, F:** Betrag und Phase der Kurzschlussimpedanz (kurzgeschlossene Kontakte) abgetragen über die Frequenz. **E, G:** Betrag und Phase der Isolationsimpedanz (offene Kontakte,  $R_2 || C_1$ ) abgetragen über die Frequenz.

Tabelle A27-1: Ersatzschaltbild Chip-Sockel Yamaichi - Versuchsdurchführung

Nr.	Arbeitsschritt	Beschreibung	Hinweise
1.	Vorbereitung	Anlöten von Draht ( $l = 1,5 \text{ cm}$ , $d = 0,125 \text{ mm}$ , Silber 99,99 %) jeweils an die Lötseite der Kontakte	Verunreinigungen durch Flussmittel vermeiden
2.	Reinigung	Ultraschallbad ( $t = 15 \text{ min}$ ) in destilliertem Wasser Gerät: Sonorex Digital 10P (Fa. Bandelin), Wirkleistung: 100 % bei $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$	anschließend trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 2 \text{ h}$ )
		Waschen in Methanol (99,5 %, FLUKA 65550) $t = 15 \text{ min}$	mit Druckluft (Druckluft 67, Kontakt Chemie) Reste entfernt trocknen bei ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ( $t > 5 \text{ h}$ )
3.	Lagerung	trocken, abgedeckte Petrischale, Raumtemperatur	Handschuhe tragen beim Umsetzen
4.	Kalibrierung	Kalibrierung des Messaufbaus: Alpha-ANB mit ZG2 (Novocontrol) mit Messkammer $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz (wie bei Messung) Messkammer: geschirmte Alu-Box, mit zwei BNC-Anschlüssen in ca. 2 cm Abstand zueinander	Kalibrierungen: - ALL Calibration ohne externe Anschlüsse, - Load Short&Open Calibration mit ZG2 und Modellzelle (Short und 100 $\Omega$ ), - Small Capacitance Calibration mit Messkammer Alle Verbindungskabel wurden auf Arbeitsfläche fest fixiert.
5.	Impedanz (offene Enden)	Impedanzmessung mit Alpha-ANB und ZG2 $U_{\text{eff}} = 1 \text{ V}$ , 10 mHz - 20 MHz, Messkammer Messergebnis: <b>Abb. A27-1 E, G &amp; Abb. A27-2 A</b>	Lötverbindung der Proben an BNC-Buchse in Messkammer Proben liegen auf einem Glasträger (Isolation) Beschränkung auf Impedanzwerte (20 mHz $\leq f \leq 10 \text{ MHz}$ ) innerhalb $\pm 10 \%$ Toleranz [301]
		Software: WinDETA 5.77 (Novocontrol) Aufzeichnung und Abspeichern der Daten	Mittelwert aus 5 Messwerten (Average = 5)
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 33 % Luftfeuchte stabil
6.	Isolationswiderstand $R_2$ (offene Enden)	Widerstandsmessung mit 6517B (Keithley) in Messkammer mit aktiver Schirmung. 1 Messwert/min, Dauer: $t = 20 \text{ min}$ (Elektrifizierungszeit), $U = 400 \text{ V}$ , 200 T $\Omega$ Messbereich und ZeroCheck. Referenz: Keithley [302, 303] Messergebnis: <b>Abb. A27-1 C &amp; Abb. A27-2 A</b>	Lötverbindung der Probe an Buchsen in Messkammer. Fixierung aller Kabel, <i>Widerstand Keithley6517B.vi</i> für Initialisierung, Aufwärmphase: 1 h, interne Mittelwertbildung über 50 Werte, Dämpfung eingeschaltet, nicht alternierende Messmethode, Messfehler: größer $\pm 25 \text{ G}\Omega$ .
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: ca. $21,8 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 31,7 % Luftfeuchte stabil
7.	Kurzschlussimpedanz	Ablauf: siehe Nr. 5 Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A27-1 B</b> Messergebnis: <b>Abb. A27-1 D, F &amp; Abb. A27-2 A</b>	Beschränkung auf Impedanzwerte ( $30 \text{ kHz} \leq f \leq 10 \text{ MHz}$ ) Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Messkammer: Temperatur ca. $22 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil Umgebung: ca. $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 33,3 % Luftfeuchte stabil
8.	Kurzschlusswiderstand ( $R_1$ )	Widerstandsmessung mit 2001 Multimeter (Keithley) Methode: 4-Draht-Messung + Relativmessung Referenz: Keithley [304] Kalibrierung: 06.07.2010 (Keithley) Messergebnis: <b>Abb. A27-2 A</b>	Kurzschlussbrücke am Ende der beiden Kontakte Bild: <b>Abb. A27-1 B</b> Reinigung der Messkabel ( $l = 25 \text{ cm}$ ) und Buchsen ( $d = 4 \text{ mm}$ ) mit Kontaktspray (Kontakt 60, Kontakt Chemie). Relativmessung, um Zuleitungswiderstand zu eliminieren. Messbereich: $20 \text{ }\Omega$ , Aufwärmphase ca. 1 h
		Temperaturmessung in Messkammer mit Glasfaser-Thermometer PicoSens (Opsens)	Ende der Glasfaser in Nähe der Probe positioniert Mittelwert: ca. $21,6 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil
		Überwachung Luftfeuchte- und Temperatur: Fluke 971.	Messung in Nähe der Messkammer vor und nach Messung Mittelwerte: ca. $21,7 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 30,8 % Luftfeuchte stabil
9.	Ersatzschaltbild	Verwendung der Software WinFIT 3.2 (Novocontrol) Resultat: <b>Abb. A27-2 A, B</b>	Mittelwertbildung von $Z_s'$ und $Z_s''$ der drei Proben ( $n = 3$ ) Gauss- und danach Newton-Verfahren Bestimmung von $L_1$ (Werte aus Nr. 7 und Vorgabe von $R_1$ ) und $C_1$ (Werte aus Nr. 5 und Vorgabe von $R_1$ , $L_1$ und $R_2$ )

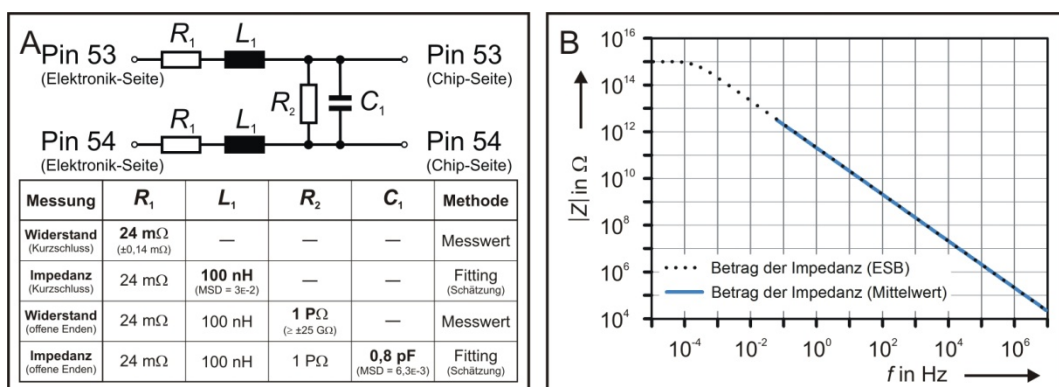
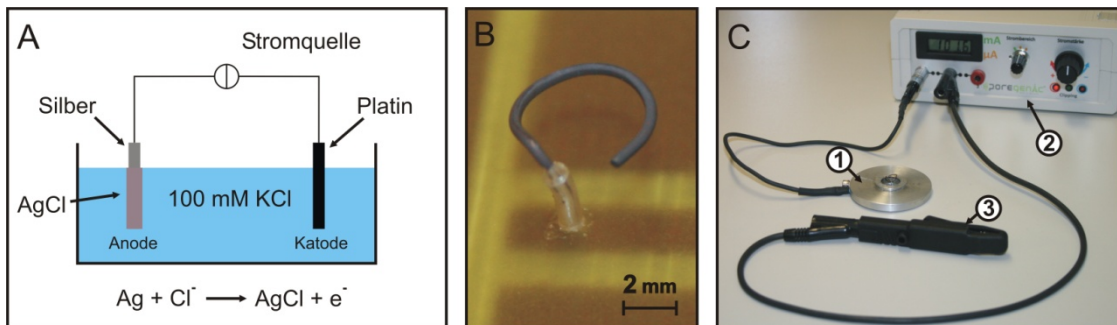


Abbildung A27-2: Ersatzschaltbild Chip-Sockel Yamaichi - Zusammenfassung

ESB des Chip-Sockel IC51-0684-390-1 für die Beschreibung seines Übersprechverhaltens anhand von drei Proben ( $n = 3$ ). Konstante Temperatur bei ca.  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Temperaturmessung: Fluke 971 und PicoSens (Opsens). Relative Luftfeuchte ca. 32 % (Fluke 971). **A:** Modell des Ersatzschaltbildes und tabellarische Zusammenfassung der Einzelkomponenten. Parasitäre Anteile gegen Masse sind nicht berücksichtigt. **B:** Betrag der Impedanz des ESB (gestrichelter Kurvenverlauf) sowie der Messwerte (blaue Kurve) abgetragen über die Frequenz.

## A28 Herstellung von Ag/AgCl-Elektroden

**Tabelle A28-1** enthält ein erprobtes Protokoll für die elektrochemische Beschichtung von Silberdrähten mit Silberchlorid zur Herstellung oder Erneuern von Bad- und Messelektroden. Das Verfahren wurde hauptsächlich aus den Beschreibungen von Cammann und Galster [227], Numberger und Draguhn [59] sowie Sawyer *et al.* [226] zusammengesetzt. Die Anordnung zur elektrochemischen Beschichtung sowie eine frisch beschichtete Ag/AgCl-Elektrode zeigt **Abbildung A28-1**.



**Abbildung A28-1: Elektrochemische AgCl-Beschichtung**

**A:** Prinzipdarstellung der Beschichtung. Silberdraht (Anode) und Platindraht (Katode) tauchen in eine 100 mM KCl-Lösung (Elektrolyt) ein. Über eine Stromquelle wird der Stromkreis zwischen Anode und Katode geschlossen. **B:** Beschichtungsergebnis einer frischen Ag/AgCl-Elektrode. Drahtdurchmesser:  $d = 0,5$  mm. Silberanteil: 99,99 %. Elektrodendurchmesser: ca. 5,5 mm. Beschichtete Elektrodenoberfläche: ca.  $0,27$  cm<sup>2</sup>. Beschichtungszeit:  $t = 30$  min. Stromstärke:  $I = 100$   $\mu$ A. Testmessungen (Puls: 40 ms,  $U = 10$  mV, Mittelwert aus 42 Messungen) in extrazellulären Puffer für HSF (14,75 mS/cm; pH 7,18; 322 mosmol/kg) mit zwei Elektroden diesen Typs haben gezeigt, dass sich zwischen ihnen ein Widerstand von nur 24 k $\Omega$  ausbildet. Elektrodenabstand (Mitte-Mitte): ca. 26,5 mm. **C:** Foto eines Geräteprototyps (2) mit einstellbarer Stromquelle zur Beschichtung der Badelektrode (1). Anschluss der Gegenelektrode (Platin) über ein Standard 4 mm Messkabel (3).

Der zu chlorierende Silberdraht ist die Anode und als Gegenelektrode (Katode) wird ein Platindraht verwendet. Je nach Elektrodengröße (Eintauchtiefe) wird ein definierter Strom durch eine angeschlossene Stromquelle vorgegeben. Das Silberchlorid kann sich auf dem Silberdraht aufgrund der Chlorionen im Elektrolyten bilden. Als Elektrolyt wird zumeist gelöstes KCl (20 mM bis 100 mM) und teilweise auch HCl Lösung verwendet. Aus der Literaturrecherche folgt der Ansatz, dass bei gleicher elektrischer Flussdichte eine längere Beschichtungszeit (kleiner Strom) zu einem besseren Beschichtungsergebnis mit höherer Lebensdauer der Elektrode führt. Es dürfen sich keinesfalls Blasen durch Elektrolyse bilden. Aus verschiedenen Literaturquellen ergab sich ein Richtwert für die Flussdichte von  $10$  mA $\cdot$ min $\cdot$ cm<sup>-2</sup>. Ein Beispiel für die damit erzielten Beschichtungsergebnisse liefert **Abbildung A28-1 B**. Die resultierende Farbe der Silberchloridschicht stimmt mit der Literatur überein. Demnach soll es sich um einen gleichmäßigen, matten und dunkelgrauen Überzug handeln, der leicht in eine bräunliche bzw. dunkellila Verfärbung übergeht. Das erprobte Beschichtungsprotokoll wurde in **Tabelle A28-1** zusammengefasst. Die darin aufgeführten Arbeiten sollen bei Raumtemperatur stattfinden.



**Tabelle A28-1: Protokoll zur Herstellung von Ag/AgCl-Elektroden**

Nr.	Arbeitsschritt	Beschreibung	Hinweise
1.	Vorbereitung	1. Silber 99,99 % auf gewünschte Länge bringen 2. feines Schleifpapier zum Anrauen der Oberfläche 3. 3x Spülen mit destilliertem Wasser 4. 3M HNO <sub>3</sub> mind. 1 min (ebenfalls Anrauen) 5. 3x Spülen mit destilliertem Wasser	Verunreinigungen vermeiden. HNO <sub>3</sub> zersetzt sich unter Lichteinwirkung leicht.
2.	Reinigung	1. Waschen in Tergazym (t ≥ 30 min) 2. 3x Spülen mit destilliertem Wasser <u>Alternative:</u> 1. Waschen in Trypsin (t ≥ 15 min) 2. 3x Spülen mit destilliertem Wasser 3. Waschen in Contrad (t ≥ 15 min) 4. 3x Spülen mit destilliertem Wasser	
3.	Installation	Einbau (Löten etc.) in Elektrodenhalter und Formgebung der Elektrode (bspw. Kreiselektrode)	Verunreinigungen vermeiden Die Installation und Formgebung kann auch vor dem Anrauen und der Reinigung erfolgen.
4.	Berechnung	Näherungsweise Berechnung der zu beschichtenden Elektrodenoberfläche (Eintauchtiefe). Berechnung von Beschichtungszeit und -strom	Elektrische Flussdichte: 10 mA·min·cm <sup>-2</sup>
5.	Beschichten	1. Elektrochemische Beschichtung des Silberdrahtes. 2. 3x Spülen mit destilliertem Wasser 3. 1 bis 2 Tage altern lassen	0,1 M KCl Lösung Elektrische Flussdichte: 10 mA·min·cm <sup>-2</sup> Silberdraht ist Anode (+) Platindraht ist Katode (-) Ag + Cl <sup>-</sup> ⇌ AgCl + e <sup>-</sup> Eintauchtiefe beachten! Es dürfen sich keine Blasen bilden!
6.	Lagerung	Trocken und lichtgeschützt lagern.	
7.	Entfernen	1. Entfernen der AgCl-Schicht mit NH <sub>4</sub> OH <u>Alternative:</u> Entfernen mit feinem Schleifpapier 2. gründlich Spülen mit destilliertem Wasser 3. Beschichtungsprozedur ab Reinigung (Nr. 2)	

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht hat. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

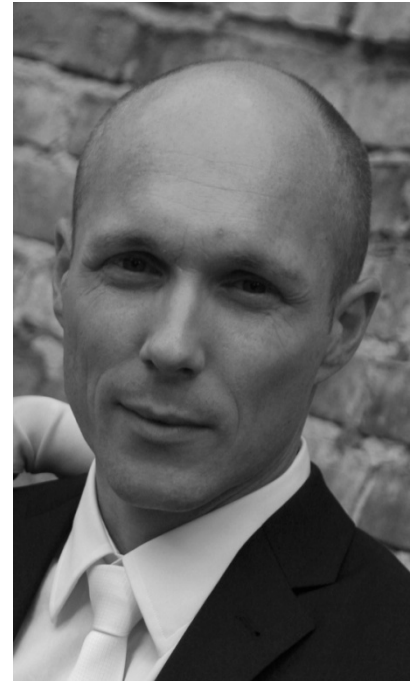
(Carsten Tautorat)

Rostock, 31.10.2012



# LEBENS LAUF

Name: Carsten Tautorat  
Adresse: Augustenstraße 74  
18055 Rostock  
E-Mail: tautica@web.de  
Geburtsdatum/-ort: 22.05.1979 in Rostock  
Familienstand: verheiratet



## Aktuelle Tätigkeit

Seit 05/2010

wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock  
BMBF-Drittmittelprojekt: „PoreGenic® Wirkstofftests und Grundlagenforschung an adhärent vernetzen Zellen“  
(Förderkennzeichen: 0315809)

## Studium

10/1998 - 10/2005

Studium der Elektrotechnik an der Universität Rostock  
Fachrichtung: Elektromechanische Konstruktionen/Gerätesysteme  
Abschluss: Diplomingenieur Elektrotechnik  
Gesamtnote: sehr gut  
Diplomarbeit: „Entwurf und Realisierung einer Testumgebung für einen neuronalen Silizium-Hybrid-Netzwerksensor“  
(Note: sehr gut)

## Berufspraxis

05/2010

wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock  
Staatliche Landesförderung. Projekt: „Evaluierung von Biosignalen gemessen mit 3D-Elektroden des PoreGenic® - Chips für die präklinische Wirkstoff-Forschung“

08/2009 - 04/2010

wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock  
ESF: Verbundvorhaben „Gewebe-generation - FLUXEL“

01/2007 - 07/2009

wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock  
BMBF-Verbundprojekte „Mikrostrukturen und Methoden für die Intrazelluläre Bioanalytik - MIBA“ (Förderkennzeichen: 16SV2339)

- 09/2005 - 06/2006 Arbeitnehmer bei der Hensel Elektronik GmbH, Rostock
- Entwicklung, Umsetzung und Produktionsbetreuung von Hard- und Softwarekomponenten, sowie von Baugruppen und Geräten
- 06/2005 - 08/2005 Studentische Hilfskraft bei der Bionas GmbH, Rostock (40h/Woche)
- 10/2004 - 05/2005 Studentische Hilfskraft an dem Institut für Biowissenschaften am Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock (19h/Woche)
- Entwicklung und Aufbau von elektronischen Schaltungen zur Inbetriebnahme neuronaler Silizium-Hybrid-Netzwerksensoren
- 02/2004 - 09/2004 Praktikum bei der Bionas GmbH, Rostock (40h/Woche)
- Hardwareentwicklung (Platinen-Layouterstellung, Prototypenfertigung und Testung)
  - Hardwarenahe Programmierung (VHDL)
- 09/2003 - 02/2004 Studentische Hilfskraft an dem Institut für Biowissenschaften am Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock (19h/Woche)
- 08/2003 - 10/2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Antriebstechnik und Mechatronik, Universität Rostock (13h/Woche)
- Entwicklung und Untersuchung von Schaltungen bei Trägerfrequenzmodulation in Powerlinesystemen
- 10/2000 - 07/2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock (ca. 10h/Woche)
- Entwurf und Test von Schaltungen mit Mehrträger-Verfahren
  - Studienarbeit: „Schaltungsentwurf und Untersuchungen von Trägerverfahren für PLC-Technologie im Feldbusbereich“ (Note: sehr gut)

## Schule

- 1994 bis 1997 Ahorngymnasium Rostock  
Abschluss: Abitur (Note: 2,2)

Rostock, den 31. Oktober 2012

## Thesen

*„It seems ironic that planar patch clamp was developed by academics but now the academics are waiting for this technology to become affordable.“*

Mathes, Expert Opinion on Therapeutic Targets, 10(2), pp. 319-327, 2006

Circa 95 % der ca. 220 humanen Zelltypen leben in adhärenen Zellnetzwerken.

Chipbasierte *Monitoring*-Systeme dienen der elektrophysiologischen Untersuchung von lebenden biologischen Zellen und bieten für die Pharmaforschung den Vorteil, dass sie der steigenden Nachfrage aus Politik, Gesellschaft etc. nach Ersatzmethoden für Tierversuche verstärkt nachkommen können.

Ionenkanäle gehören zu den TOP 5 der wichtigsten Wirkorte für Medikamente, da viele Krankheiten auf fehlerhafte Funktionen der Ionenkanäle zurückzuführen sind.

In der Pharmaforschung und Medizin besteht großes Interesse an effizienten Untersuchungsmethoden für das Ionenkanalverhalten.

Die klassische (manuelle) *Patch-Clamp*-Technik gilt weltweit als „Goldstandard“ für die Untersuchung von Ionenkanälen adhären wachsender Zellen. Alle automatisierten *Patch-Clamp*-Systeme (*APC*-Systeme) sind bisher ausschließlich für suspendierte Einzelzellen entwickelt worden.

Aufgrund des gesteigerten Informationsgewinns besteht ein großes Interesse an Ionenkanalanalysen von Zellnetzwerken im Forschungs- und Pharmabereich.

Mit der Lösung der technischen Herausforderungen kann das PoreGenic® *Patch-on-Chip*-System stabile Ganzzelleitungen und eine *Gigaseal*-Wahrscheinlichkeit über 80 % erreichen und somit die automatisierte Elektrophysiologie unter Berücksichtigung von Effekten auf die Zell-Zell-Kommunikation revolutionieren.

Systemstudien an den kommerziell erhältlichen *APC*-Systemen zeigen den Stand der Technik und helfen konzeptionelle Vor- und Nachteile zu berücksichtigen.

Es werden neue Technologien für eine hohe *Seal*-Qualität benötigt, die bspw. die *Patch-Site* vor Verunreinigungen schützen.

Aufgrund der Menge an generierten Messdaten (Netzwerkanalyse etc.) ist es notwendig die Daten bereits *online* in pharmakologisch relevante Werte umzuwandeln.

Die Technik der lokalen Elektroporation (LOMINE) soll automatisierte Ganzzellableitungen ermöglichen. Das lokale Öffnen der Zellmembran kann bspw. durch Fluoreszenzfärbungen, Rasterelektronenmikroskopie sowie *Focused-Ion-Beam*-Präparationen bestätigt werden. Modellbildung und Simulationen helfen geeignete Elektroporationsparameter festzulegen, die durch Experimente an Zellen bestätigt werden.

Die elektrische Zellmanipulation kann zusätzlich für die intra- und extrazelluläre Stimulation sowie zum Einbringen von Substanzen in ausgewählte Zellen des Netzwerks verwendet werden.



