

Feldeffekttransistoren als Sensoren neuronaler Systeme

Von Hans-Joachim Galla*

Die aktiven Komponenten des Nervensystems sind die individuellen Nervenzellen, die Neuronen, von denen das menschliche Gehirn etwa 10^{11} – 10^{12} enthält. Sie kommunizieren untereinander und mit Zielorganen. Dazu müssen sie Eingangssignale von anderen Neuronen über die Synapse durch chemische Transmitter und elektrische Signale aufnehmen. Die verschiedenen excitatorischen und inhibitorischen Impulse aus bis zu 10^4 Synapsen werden im Empfangsteil des Neurons integriert und als elektrisches Signal an die Zielzelle weitergeleitet. Das Signal selbst enthält nur wenig Information. Diese liegt vielmehr in der Verknüpfung von Ausgangspunkt und Ziel des Signals, d.h. die Information steckt in den Verschaltungen zwischen den Nervenzellen, also im *neuronalen Netzwerk*. Fragen, wie die Vielzahl der Eingangssignale zu einem Innensignal verarbeitet und wie dies wiederum das Ausgangssignal bestimmt, müssen beantwortet werden, um zu verstehen, wie dieses Netzwerk funktioniert. Dazu ist es notwendig, lokal elektrische Spannungen an definiert aufgebauten neuronalen Strukturen nicht-invasiv mit großer räumlicher und zeitlicher Auflösung zu messen.

Zur Untersuchung bestens geeignet sind Neuronen in Zellkultur. Fromherz et al.^[1] gelang es, Neuronen des Blutegels auf vorgezeichneten Proteinbahnen von etwa 10 µm Breite und mit definierter Geometrie wachsen zu lassen. Das Protein wurde aus der extrazellulären Matrix des Blutegels gewonnen, mit Rinderserumalbumin gemischt und als luftgetrocknete Proteinschicht auf einen Objektträger aufgetragen. Durch UV-Lithographie mit vorab produzierten Masken können entsprechende Bahnen hergestellt werden. Während auf einer homogenen Proteinschicht die Neuritenbäume mit irregulären Verzweigungen wachsen, führen lineare Proteinbahnen zu linearen Fortsätzen, und verzweigte Bahnen erzeugen Verzweigungen der Neuronen. Mit diesen Zellkultursystemen kann man nunmehr die Signalausbreitung im Neuritenbaum untersuchen. Ziel der Arbeiten ist es, Netzwerke mit Synapsen an definierten Positionen aufzubauen.

Zur Messung der Membranspannung bieten sich spektroskopische und elektrische Meßmethoden an. Dazu können zum einen Fluoreszenztechniken verwendet werden^[2]: Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Aktionspotentials kann mit „spannungsabhängigen Farbstoffen“ spektroskopisch verfolgt werden; derartige Farbstoffe ändern in der Nervenzellmembran potentialabhängig ihre Fluoreszenzintensität. Fromherz und Vetter konnten zeigen, daß die kultivierten Zellen in der Fortleitung des Aktionspotentials der in-vivo-Situation entsprechen, d.h. Aktionspotentiale, die in Bereichen außerhalb des Somas induziert werden, laufen zum Soma und zur Peripherie, wobei die Ausbreitungsgeschwindigkeit *in vitro* der *in vivo* gleicht. Allerdings ist bei dieser Technik die relative Fluoreszenzintensitätsänderung gering, und die Empfindlichkeit ist ortsabhängig. Zwar ist

durch Optimierung der chemischen Struktur der Farbstoffe mit einer Auflösung von bis zu 1 µm zu rechnen, jedoch liegt der Nachteil dieser Methode darin, daß es nicht möglich ist, einzelne Neuronen im Netzwerk selektiv anzufärben und zu vermessen und daß die meisten Farbstoffe stark phototoxisch sind.

Diese Probleme können durch die Bildung eines direkten elektrischen Kontaktes mit der Zelle umgangen werden. Ziel dieses noch interessanteren und zukunftsweisenderen Meßverfahrens ist es, eine bidirektionale Verbindung zwischen Halbleitermaterialien und Neuronen, also eine künstliche „Silicium-Neuron-Synapse“ herzustellen.

Die einfachste und klassische Methode, einen elektrischen Kontakt mit einer Zelle herzustellen, ist das Einstechen einer Kapillarelektrode in den Zellkörper oder in Längsrichtung in das Innere eines Axons, wenn dieses einen genügend großen Durchmesser aufweist. Eleganter ist es, die von Neher und Sakmann^[3] entwickelte Patch-Clamp-Technik im sogenannten Gesamtzellverfahren (Whole Cell Mode) zu verwenden. Hierbei wird die Zelloberfläche durch Unterdruck an die Pipette angepreßt. Bei Erhöhung des Unterdrucks bricht ein Membranfragment aus der Zellmembran heraus, wodurch eine Verbindung zwischen Pipette und Zellinneren mit geringem elektrischem Widerstand entsteht. Beide Methoden haben jedoch bei der Untersuchung neuronaler Netzwerke den Nachteil, daß sie invasiv sind und daß es schwierig ist, die Verbindung über mehrere Stunden oder Tage aufrechtzuerhalten. Weiterhin ist es nur schwer möglich, mehrere Elektroden gleichzeitig an einer Zelle zu verwenden.

Eine deutliche Verbesserung brachten da die extrazellulären Elektroden. Dazu läßt man die Zellen auf speziell vorbereiteten Kulturoberflächen mit einer planaren Anordnung von Elektroden wachsen. Mikroelektroden einer Größe von etwa 10×10 µm können Aktionspotentiale von individuellen Neuronen in einem Abstand von 40 µm vom Elektrodenmittelpunkt aufzeichnen. J. Pine^[4] konnte mit einer Anordnung von 32 Mikroelektroden pro Kulturschale zeigen, daß Aktionspotentiale von einzelnen Neuronen aufgenommen werden können und daß es gleichzeitig möglich ist, Aktionspotentiale durch Stimulation des Zellkörpers oder der neuronalen Fortsätze zu erzeugen. Diese Methode ist nicht-invasiv und der Kontakt zwischen Zelle und Elektrode kann über Wochen aufrechterhalten werden. Allerdings gelang es nicht, synaptische Potentiale unterhalb des Schwellenwertes aufzuzeichnen. Darüber hinaus besteht die Gefahr, daß Signale von mehreren Zellen gleichzeitig aufgenommen werden und daß ein Strompuls durch die Elektrode mehr als eine Zelle gleichzeitig anregt.

Eine weitere Verbesserung brachte hier die sogenannte Loose-Patch-Methode^[5], die die Zellmembran nicht aufbricht und die daher nicht-invasiv ist. Diese Methode wurde durch die Verwendung der in Abbildung 1 skizzierten „Sprungbrettelektrode“ deutlich verbessert^[6]; dabei wird eine dauernde Verbindung zwischen der Elektrode und dem Zellkörper hergestellt. Die Mikroelektrode besteht aus ei-

[*] Prof. Dr. H.-J. Galla
Institut für Biochemie
Wilhelm-Klemm-Straße 2, W-4400 Münster

nem p-Silicium-Sockel, der auf dem Boden der Kulturschale befestigt ist. Ein langer flexibler Arm (das „Sprungbrett“) bildet über einen Goldleiter, der zwischen zwei isolierenden Schichten eingebettet ist, den Kontakt zur Zelloberfläche. Diese Sprungbrettelektrode kann auf mehrere Neuronen in Kultur positioniert und für Langzeitmultielektrodenregistrierungen und Stimulationen verwendet werden. Aktionspotentiale können mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden, jedoch werden auch hier Signale unterhalb des Schwellenwertes nicht registriert. Das Ziel, ein induziertes Aktionspotential mit der gleichen Sprungbrettelektrode zu messen, mit der die Zelle stimuliert wurde, konnte bisher nicht erreicht werden.

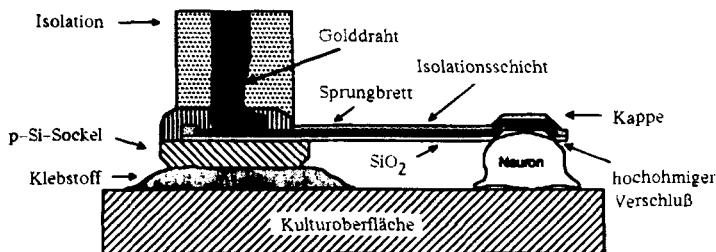


Abb. 1. Anordnung zur Aufnahme und Induktion von Aktionspotentialen durch eine „Sprungbrettelektrode“. Die Metalloberfläche liegt kappenförmig auf dem Neuron auf und ist seitlich hochohmig verschlossen. Dieser Aufbau entspricht der Loose-Patch-Elektrode. Das aufgenommene Signal ist kapazitiver Natur (nach [6]).

Einen deutlichen Schritt voran bei der Analyse der Signalverarbeitung in kleinen neuronalen Netzwerken erbrachte nun der Einsatz von Feldeffekttransistoren (FETs) als Spannungssonden. Fromherz et al.^[7] haben dazu Neuronen direkt auf einer dünnen isolierenden Schicht des Gate-Oxids auf n-Silicium wachsen lassen. Die Spannungsänderungen in der Zelle bei einem Aktionspotential wirken durch kapazitive Kopplung so auf den Source-Drain-Strom, wie Spannungsänderungen an einem Metallgitter.

Abbildung 2 zeigt das Untersuchungsobjekt, ein Blutegel-Neuron, die Retziuszelle. Diese ist mit dem Zellkörper, an

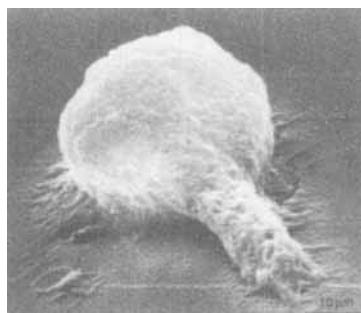


Abb. 2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Retziuszelle auf einem Feldeffekttransistor (FET). Die Zelle bedeckt das mit einer Poly-L-lysin-Schicht bedeckte Gate. Die Umrisse von Source und Drain sind unter der durch die Fixierung geschrumpften Zelle erkennbar. Der Balken entspricht einer Länge von 10 µm (nach [7]).

dem noch ein kurzes Stück des Neurits zu sehen ist, in direktem Kontakt auf das metallfreie Gate eines p-Kanal-Feldeffekttransistors aufgebracht. Bei frisch isolierten Zellen betragen die Aktionspotentiale 40 bis 60 mV. Der FET wurde auf

der Oberfläche von n-Silicium durch Diffusion von Bor in Source und Drain hergestellt. Die aufgebrachte 1 µm dicke isolierende SiO₂-Schicht ist unterbrochen, der Kanal mit dem Gate-Oxid von etwa 20 nm Dicke belegt (Abb. 3 rechts). Mit einer Glaspipette wurde das Neuron auf das zur Anheftung mit Polylysin beschichtete Gate aufgebracht (Abb. 3 links). Abbildung 4 oben zeigt den Aufbau schema-

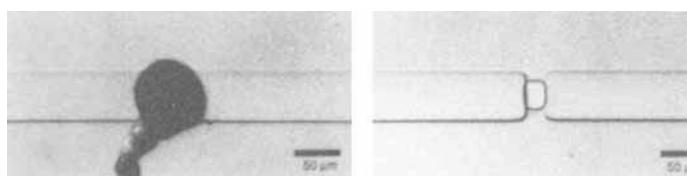


Abb. 3. Links: Aufsicht auf den mit einem Neuron belegten FET. Das horizontale, 50 µm breite Band gibt Source und Drain wieder. Rechts: Aufsicht auf den FET. Der sichtbare Abstand zwischen Source und Drain beträgt 16 µm. Die 1 µm dicke Isolationsschicht aus SiO₂ ist in der Mitte auf einer Fläche von 22 x 30 µm unterbrochen. Dieser Bereich ist mit einer 20 nm dicken Gate-Oxid-Schicht belegt (nach [7]).

tisch. Durch kapazitive Kopplung wirkt die Zelle auf den Source-Drain-Strom in Analogie zu einer Spannungsänderung an einem Metallgate. Die Neuron-Si-Kontaktzone ist ein FET, wobei die positiven Spannungsänderungen im Neuron während des Aktionspotentials das Oberflächenpotential des Si durch Reduktion der Dichte an Defektelektronen anhebt. Eine deutliche Erniedrigung des Source-Drain-Stromes ist zu beobachten (Abb. 4 unten). Die Spannungsände-

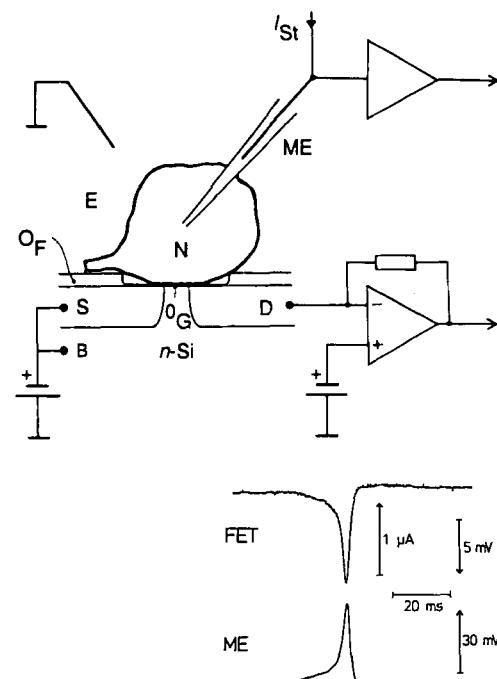


Abb. 4. Oben: Schematische Darstellung des Meßaufbaus: Das Neuron N liegt direkt auf der dünnen Gate-Oxid-Schicht O_G eines Feldeffekttransistors auf. Source S und Drain D sind durch eine dicke SiO₂-Schicht O_F isoliert. Die Elektrolytlösung E ist geerdet, die Source mit einer positiven Vorspannung versehen, so daß ein p-Kanal-FET vorliegt. Änderungen des Membranpotentials wirken kapazitiv auf die Trennschicht und modulieren den zu messenden Source-Drain-Strom. Die eingestochene Mikroelektrode (ME) dient hier lediglich der Stimulation und der vergleichenden Messung des Aktionspotentials. I_{St} = Stimulationssstrom, B = Bulk-Silicium. Unten: Messung des Aktionspotentials. Das durch die eingestochene Mikroelektrode (ME) bestimmte Membranpotential ist dem Source-Drain-Strom am FET gegenübergestellt (nach [7]).

rung am Gate beträgt etwa 25 % der intrazellulären Änderung des Membranpotentials von bis zu 40 mV. Die Form des Aktionspotentials bleibt in der Antwort am FET erhalten. Dieses Verfahren eignet sich zur Messung von spontanen oder stimulierten Aktionspotentialen. Bei einer repetitiven Folge von Stimuli im Abstand von 30 ms wurde von Fromherz et al. eine perfekte Übereinstimmung des Induktionssignals mit der Antwort am FET festgestellt. Es sind auch Signale unterhalb des Schwellenwertes meßbar.

Noch gibt es Probleme mit dieser Technik. Eine reproduzierbare Kopplung zwischen dem Neuron und der Sperrschicht wird nicht in allen Experimenten erreicht, ebenso gelingt die unbeschädigte Isolation der Neuronen nicht immer. Es ist jedoch bereits jetzt absehbar, daß die direkte Kopplung zwischen Neuron und Siliciumoberfläche den metallischen Mikroelektroden (vgl. Abb. 1) mit extrazellulären Spannungsamplituden von unter 1 mV deutlich überlegen ist. Ob es einen Vorteil gegenüber der Verwendung spannungsabhängiger Farbstoffe gibt, die die Zelle in ihrer Funktion beeinflussen können, wird der Arbeitskreis Fromherz sicherlich bald berichten. Das Ziel, eine Spannungsdetektion an Neuronenkulturen durch entsprechende Transistoran-

ordnung auf einem Chip mit Auflösungen von 1 μm und darunter zu erreichen, ist in greifbare Nähe gerückt. Die Annahme, daß die bidirektionale Neuron-Silicium-Synapse bereits eine „Online“-Verbindung zum Gehirn herstellen könnte, ist sicherlich verfrüht. Die Erwartung, über ein Interface zum Nervensystem z.B. paralyisierte Muskeln zu stimulieren oder eine Prothese direkt an das Nervensystem des Amputierten anzukoppeln und dann künstliche Gliedmaße vom Gehirn aus zu steuern, scheint in absehbarer Zeit^[8, 9] erfüllbar. Die Etablierung der Neuron-Silicium-Synapse ist eine wesentliche Voraussetzung zum Erreichen dieses Ziels.

- [1] P. Fromherz, H. Schaden, T. Vetter, *Neurosci. Lett.* **1991**, *129*, 77.
- [2] P. Fromherz, T. Vetter, *Z. Naturforsch. C* **1991**, *46*, 687.
- [3] E. Neher, B. Sakmann, *Nature* **1976**, *260*, 799.
- [4] J. Pine, *J. Neurosci. Methods* **1980**, *2*, 19.
- [5] W. Stuhmer, W. M. Roberts, W. Almers in *Single-Channel Recording* (Hrsg.: B. Sakmann, E. Neher), Plenum, New York, **1983**, S. 123.
- [6] W. G. Regehr, J. Pine, D. Rutledge, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1988**, *35*, 1023.
- [7] P. Fromherz, A. Offenbässer, T. Vetter, J. Weis, *Science* **1991**, *252*, 1290.
- [8] S. Williams, *Science* **1990**, *248*, 555.
- [9] I. Amato, *Science* **1991**, *253*, 34.

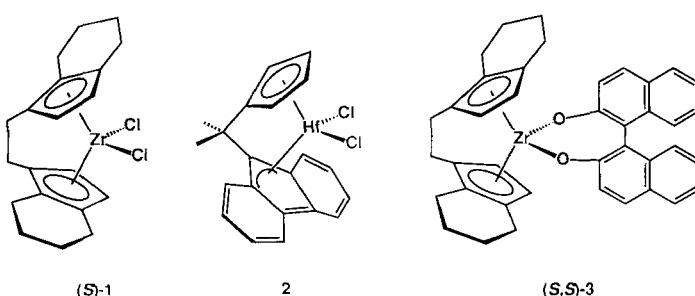
Synthese optisch aktiver Makromoleküle mit löslichen Metallocen-Katalysatoren

Von Jun Okuda*

Wenn man bedenkt, wie effizient die Natur unter milden Bedingungen molekular einheitliche Makromoleküle in optisch reiner Form herstellen kann, scheint die gezielte Synthese von organischen Polymeren mit definierter Mikrostruktur und enger Molmassenverteilung noch in weiter Ferne zu liegen. Eines der Ziele der synthetischen Chemie besteht daher darin, strukturell wie funktionell charakterisierte Katalysatoren zu entwickeln, mit denen ungesättigte Monomere in einer lebenden Polymerisation und im Falle prochiraler Monomere auch stereospezifisch miteinander verknüpft werden können.

Vor einigen Jahren wurde gefunden, daß Methylalumoxan als Cokatalysator die Aktivität löslicher Ziegler-Natta-Katalysatoren auf der Basis von Metallocenen der 4. Gruppe erheblich steigert^[1]. Kurz darauf wurde für die Polymerisation von Propen die grundsätzliche Möglichkeit aufgezeigt, die Taktizität des gebildeten Polypropylen über die Struktur des Übergangsmetallkatalysators zu steuern^[2]. Mittlerweile gilt seit den grundlegenden Arbeiten von Turner et al.^[3a], Jordan^[3b] sowie anderen als gesichert, daß ein 14-Elektronen-Alkyl-Kation des Typs $[\text{Cp}_2\text{MR}]^+$ das aktive Zentrum für das Kettenwachstum ist^[3]. Die entscheidende Rolle einer α -agostischen Wechselwirkung der wachsenden Polymerkette mit dem Übergangsmetallzentrum wurde vor kurzem durch elegante kinetische Untersuchungen von Brintzinger

et al.^[4a] und Bercaw et al.^[4b] nachgewiesen. Gegenwärtig ist man bemüht^[5], die kritischen Parameter für die Stereoregularität der α -Olefin-Polymerisation aufzuschlüsseln^[5a] und eindeutige Beziehungen zwischen den Eigenschaften der Liganden des katalytisch aktiven Übergangsmetallkomplexes und der Polymerstruktur herzustellen^[5b]. So ergibt die Polymerisation von Propen mit dem von Brintzinger entwickelten C_2 -symmetrischen Zirconocen (*R,S*)-[1,1'-Ethylidienbis(4,5,6,7-tetrahydro-1-indenyl)]zirconiumdichlorid **1** als Racemat hochisotaktisches Polypropylen, wobei aufgrund der Defektstruktur der Polymerkette auf eine „enantiomeric site control“ geschlossen werden kann^[2b]. Das achirale Titanocen-Derivat $[\text{Cp}_2\text{TiPh}_2]$ dagegen ergibt unter Kettenendkontrolle isotaktisches Blockpolymer^[2a]. Das C_5 -symmetrische Hafnocen **2** mit einem verbrückten Cyclopentadienyl-Fluorenyl-Ligandsystem schließlich liefert syndiotaktisches Polypropylen^[6].



[*] Dr. J. Okuda

Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, W-8046 Garching