

*Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie*

*der Universität Würzburg*

*Direktor: Professor Dr. med. Ernestus*



**Entwicklung einer Methode zur Herstellung von  
kommunizierenden Neuronen-Netzwerken auf  
Multielektroden Arrays**

*Inaugural - Dissertation*

*zur Erlangung der Doktorwürde der*

*Medizinischen Fakultät*

*der*

*Julius - Maximilians - Universität*

*vorgelegt von Manuel Wesche*

*aus Köln*

*Würzburg, August 2012*

Name: Wesche, Manuel

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

17.9.12

---

Datum

Unterschrift

**Referent: Professor Doktor Ralf-Ingo Ernestus**  
**Koreferent: Professor Doktor Michael Sendtner**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2013**

**Der Promovend ist Arzt**





*Wer zur Quelle gelangen will, muss gegen den Strom schwimmen.*

*Hermann Hesse*







---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biologische Grundlagen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Synapsen .....	1
1.1.2. Verschaltung von Nervennetzwerken .....	1
1.1.3. Modelle neuronaler Verschaltung .....	2
1.1.4. Synfirechains .....	4
<b>1.2. Zellkultur auf Multielektroden-Arrays.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. MEAs .....	5
1.2.2. Kalzium-Imaging .....	6
1.2.3. Unterteilung des Netzwerkes in Subpopulationen.....	6
1.2.3.1. Cluster aus Agarose .....	6
1.2.3.2. Cluster aus Star-PEG .....	7
<b>1.3. Das Bioelektronische Interface .....</b>	<b>8</b>
1.3.1. MEAs .....	8
1.3.2. Die Impedanz des Elektrolyt-/Elektrodeninterfaces.....	11
1.3.3. Zell-Elektroden Interfaces.....	12
1.3.3.1. Nanoporöse Schnittstelle.....	12
<b>1.4. Microcontact Printing.....</b>	<b>14</b>

---

---

1.5 Ziel der Arbeit .....	16
<b>2. Methoden und Material.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. MEA-Technologie.....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Chip-Fabrikation.....	21
2.1.2. Verkapselung.....	23
2.1.3. Verstärkersystem und Software.....	24
2.1.4. MCS-CHIPS und Verstärker .....	25
<b>2.2. Zellkultur.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. Die Gewinnung von Neuronen aus Rattencortex.....	26
2.2.2. Aussaat und Inkubation .....	27
2.2.3. Co-Kulturen .....	28
2.2.4. Lebend-Tot-Färbungen .....	29
2.2.5. Gliawachstum .....	30
<b>2.3. Verbesserung des Bioelektronischen Interfaces.....</b>	<b>30</b>
2.3.1. Nanoporen.....	30
2.3.2. Senkung der Elektrodenimpedanz mit Platinum-Black.....	31
2.3.3. Zellen auf modifizierten Elektroden.....	32
<b>2.4. Herstellung von neuronalen Subpopulationen.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. Das Maskendesign .....	33
2.4.2. Stempel .....	35

---

---

2.4.3. Aktivierung der Stempel .....	36
2.4.4. Verarbeitung der Agarose .....	37
2.4.5. Star-PEG .....	38
2.4.6. Zellen auf APTES .....	40
2.4.7. Verbesserung des Zell-Oberflächenkontakts mit PECM .....	40
2.4.8. Antikörper-Fluoreszenz-Färbung .....	45
2.4.9. Messungen mit Atomic Force Microscopy (AFM).....	45
2.4.10. Kalzium-Imaging .....	46
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Zellkultur.....</b>	<b>49</b>
3.1.1. Zellwachstum.....	49
3.1.2. Aufzeichnung erster Nervensignale .....	51
<b>3.2. Verbesserung des Zellelektroden-Interfaces.....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Nanoporen.....	52
3.2.1.1. Zellen auf nanoporösen Oberflächen.....	54
3.2.1.2. Impedanzspektroskopie auf Oberflächen mit Nanoporen .....	54
3.2.2. Platinabscheidung.....	56
3.2.2.1. Zellen auf Oberflächen mit platinieren Goldelektroden .....	57
<b>3.3. In Subpopulationen unterteilte Netzwerke.....</b>	<b>60</b>
3.3.1. Cluster aus Agarose .....	60

---

3.3.2. Cluster aus Star-PEG .....	62
3.3.4. Zellen auf geclusterten Oberflächen .....	66
3.3.4.1. Zellen auf reinem APTES .....	66
3.3.4.2. Verbesserung des Zell-Oberflächenkontaktes mit PECM .....	69
3.3.5. Immunfärbung mit Anti-GFAP und Anti-MAP2 .....	73
3.3.6. Protein-Modifikation und AFM-Messungen.....	75
3.3.7. Calcium-Imaging .....	78
3.3.7. Neuronencluster auf MEAs .....	81
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1. Neuronenkultur .....	87
4.2. Verbesserung des Zell-Elektroden-Interfaces.....	90
4.3. Herstellung von neuronalen Subpopulationen.....	92
4.4. Neurone auf geclusterten Chips .....	95
4.4.1. Zellen auf geclusterten Siliziumoxid-Chips .....	95
4.4.2. Kalzium-Imaging .....	97
4.4.3. Zellen auf geclusterten MEAs .....	99
<b>4. Aussicht .....</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>101</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>104</b>

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

Al	Aluminium
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
APTES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
Au	Gold
DIC	Differential Interference Contrast
DIV	Days in vitro
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular Matrix
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
GBSS	Geys Balanced Salt Solution
GMBS	Malmeimido-Butyryloxy-Succimidester
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hz	Hertz
MEA	Multielektroden Array
PDL	Poly-D-Lysin
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECM	Polylysin + ECM-Gel
POP	Polyethylen
Pt	Platin
Star-PEG	sternförmiges Polyethylenglycol
SEM	Scanning Electron-Microscopy
μCP	Microcontact Printing

---



---

# 1. Einleitung

## 1.1. Biologische Grundlagen

### 1.1.1. Synapsen

Im Jahre 1891 fand der Spanier Ramon y Cajal heraus, dass Nervenimpulse nur in eine Richtung weitergeleitet werden, und postulierte einen Spalt zwischen selbstständigen Neuronen. Dieser Spalt, der erst im Zeitalter der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden konnte, erhielt schon 1897 den Namen „Synapse“. Im Nervensystem gibt es zwei Sorten von Synapsen: elektrische, die einen Nervenimpuls direkt über Gap Junctions, d.h. Ionenkanäle in den Zellmembranen von angrenzenden Zellen, von einer Zellmembran auf die nächste übertragen, und chemische, die sich zur Weiterleitung von einem auf das nächste Neuron chemischer Transmitter bedienen. Von einem präsynaptischen Neuron in den zwischenneuronalen synaptischen Spalt ausgeschüttete Transmitter binden an Rezeptoren der postsynaptischen Zellmembran (2. Neuron) und bewirken dort je nach Transmittersorte die Öffnung verschiedener Ionenkanäle. Die Öffnung von Natriumkanälen führt an der postsynaptischen Membran zu einer Depolarisation, die nach Fortleitung und Erreichen des Schwellenpotentials am Axonhügel des Neurons ein Aktionspotential generieren kann. Die Öffnung von Chloridkanälen durch inhibierende Transmitter, wie z. B. GABA und Glycin, bedingt eine Hyperpolarisation und senkt die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Aktionspotentials.

### 1.1.2. Verschaltung von Nervennetzwerken

Da an einem Neuron mehrere tausend Axone mit ihren präsynaptischen Anteilen enden, die erregende und hemmende Potentiale generieren, entscheidet die Summe aller Potentiale darüber, ob ein Aktionspotential von diesem Neuron gebildet werden wird, also ob es zur Weiterleitung neuronaler Information kommt. 1949 stellte Donald O. Hebb die These auf, dass die Bahnung zwischen Neuronen besonders stark werde (und damit eine Weiterleitung von elektrischer Information), wenn sie zeitgleich oder minimal zeitversetzt erregt würden <sup>1</sup>.

---

Wird also ein Neuron X von drei Neuronen A, B und C zeitgleich erregt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die einlaufende Information stark genug ist, um an folgende Neurone des Netzwerks weitergeleitet zu werden. Innerhalb dieses Netzwerkes wird sich also abhängig von der Verschaltung mit umliegenden Neuronen ein Subnetzwerk ausbilden, das aus synchron erregten Neuronen besteht. Tatsächlich neigen Neuronennetze *in vitro* ab dem 14. Tag in Kultur zur Ausbildung von sogenannten Bursts, d.h. synchron abgefeuerten Aktionspotentialen <sup>2</sup>. Damit in einer Population von Neuronen synchrone Entladungen entstehen können, müssen in dieser Population wenigstens 20-40 Zellen miteinander verknüpft sein <sup>3</sup>. Zwischen solchen über das Netzwerk synchronisierten Entladungen halten spezielle Neurone das elektrische Niveau der Neuronenkultur aufrecht, von dem aus es regelmäßig zu neuen Bursts kommen kann <sup>4</sup>. An der Synchronisierung von Nervenzellen scheinen ebenfalls Astrozyten durch Ausschüttung von Glutamat, welches auf extrasynaptische neuronale NMDA-Rezeptoren wirkt, beteiligt zu sein <sup>5,6</sup>. Im menschlichen Gehirn existieren weit mehr Neurone, als es Funktionen gibt, die vom Gehirn ausgeführt werden. Dies lässt darauf schließen, dass solche Funktionen nicht von Einzelneuronen prozessiert werden, sondern von Netzwerken aus mehreren hundert bis tausend Einzelneuronen. Es bleibt die Frage, wie synchronisierte Netze ihren Informationsgehalt an andere Netze weiterleiten und so überhaupt erst eine differenzierte Verarbeitung der Impulse erlauben.

### 1.1.3. Modelle neuronaler Verschaltung

Ursprünglich gingen Forscher davon aus, dass neuronale Informationen ausschließlich durch Variationen der Aktionspotential-Entladungsrate in neuronalen Verbänden verschlüsselt seien. Mittlerweile zeigt sich jedoch, dass Synchronität zwischen einzelnen Gruppen von Neuronen (bzw. deren untereinander synchrone Erregung) eine wesentliche Rolle bei der Informationsverarbeitung und der Signalausbreitung (siehe Kapitel 1.1.4.) spielen <sup>7-10</sup>. Tanaka et al. stellten beeindruckend dar, wie die Einzelinformationen von Formen und Farben über ein auf der Retina abgebildetes Objekt in unterschiedlichen benachbarten kortikalen Arealen des Temporallappens verschaltet werden <sup>11</sup>. Um dennoch ein zusammenhängendes Bild wahrnehmen zu können, werden diese Areale (verantwortlich für

---



---

strukturellen Einzelinformationen) durch synchrone, d.h. zeitlich korrelierende, Erregungen miteinander verknüpft.

Riehle et al. zeigten, dass zu Beginn der Vorbereitung eines Bewegungsablaufes im Affengehirn zur Integration verschiedener Bewegungsparameter (wie z.B. sensorischer Informationen mit propriozeptiven Informationen) eine zeitliche Korrelation zwischen verschiedenen Neuronengruppen unterschiedlicher Hirnareale stattfindet. Diese Synchronisierung geht einem Anstieg der Entladungsrate von Aktionspotentialen dieser Neuronengruppen voraus, wenn die tatsächliche Ausführung der Bewegung beginnt. Die Autoren vertreten die Hypothese, dass Synchronität vor allem bei kognitiven Vorgängen eine Rolle spielt, während Veränderungen der Entladungsrate eher bei externen Vorgängen wie der Bewegungsausführung von Bedeutung sind <sup>12,13</sup>. Ebenso konnte die Bedeutung der Synchronisation in Neuronenverbänden von Affengehirnen <sup>14,15</sup> und Katzegehirnen <sup>16</sup> nachgewiesen werden, die für die Verarbeitung von visuellen Signalen verantwortlich sind. Da die Identifikation optischer Merkmale innerhalb von ca. 200 ms abgeschlossen sein kann, bleibt nur ein geringer Spielraum, um über die Variation der Entladungsrate Information zu codieren. Vor einer Veränderung dieser Entladungsrate kommt es zu zeitlich kohärenten (synchrone) Entladungen. Dabei codieren synchrone Reizantworten der Neurone für zusammengehörige Anteile eines Bildobjektes, asynchrone Antworten werden als inkohärent interpretiert. Zwischen Brodmann-Arealen, die für die Verarbeitung von sensorischen Reizen verantwortlich sind, und solchen, die für Bewegung codieren, wurden synchrone Aktivitäten im Beta-Frequenzbereich detektiert, die visuelle Wahrnehmung mit der Entwicklung von Bewegungen verknüpfen <sup>11</sup>. Neben Synchronität, die durch externe Reize (z.B. visuelle Stimuli) hervorgerufen wird, gibt es auch synchrone Entladungen, die innerhalb des Gehirns ohne Reizung von außen und eine dadurch bedingte Veränderung der Entladungsrate entstehen und für kognitive Funktionen von Bedeutung sind <sup>7,17</sup>. Bei deren Entstehung spielen Oszillationen im Gamma- und Beta-Frequenzbereich eine große Rolle. Eine Oszillation in neuronalen Netzen bezeichnet das Hin- und Herschwingen zwischen zwei physiologischen Zuständen der Neurone in Depolarisationszyklen einer bestimmten Frequenz (lat. oscillare: schaukeln). Zeitlich voneinander versetzt eintreffende EPSPs können durch Oszillationen folgendermaßen synchronisiert werden: Nur während der Spitze eines

---

zellulären Depolarisationszyklus (bzw. Oszillationszyklus) kann das EPSP ein Aktionspotential auslösen<sup>18,19</sup>.

#### 1.1.4. Synfirechains

Wie werden elektrische Signale über eine Verschaltung mehrerer unterschiedlich stark ausgeprägter Synapsen über weite räumliche Distanzen zwischen neuronalen Einheiten geleitet, ohne dass Information verloren geht? Ein Modell zur Erklärung dieser Problematik, das erstmals von Abeles 1982 eingeführt wurde, liefern die sogenannten *Synfirechains*<sup>20</sup>. *Synfirechains* bezeichnen die Anordnung von Neuronen in vertikal orientierten Schichten. Die Neuronen einer Schicht sind miteinander verknüpft. Die elektrischen Impulse einer Schicht werden im Folgenden vorwärts (horizontal) auf die nächste Schicht von Neuronen übertragen. Dabei können sie diese Folgeschicht, sollte sie von den meisten Elementen der vorgeschalteten Neuronen angesteuert werden, vollständig und synchron erregen. Voraussetzung hierfür ist, dass das neuronale Signal, welches von einer Schicht an die nächste weitergegeben wird, stark genug synchronisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen 20 und 40 Neurone innerhalb einer Schicht vorhanden sein müssen, damit es zu synchroner Aktivität innerhalb dieser Population und damit zur effizienten Signalweiterleitung kommen kann. Auch wenn ihre Existenz in Nervenzellverbänden noch nicht bewiesen ist, so zeigen intrazelluläre Elektrodenableitungen aus visuellen Cortices von Katzen, dass typische Zellerregungsmuster in Hirnschnittpräparaten (engl. *Brainslices*) und *in vivo* nachgewiesen werden können, wie sie aus dem Modell der *Synfirechains* vorhergesagt werden können<sup>21</sup>. Computermodelle konnten eindrucksvoll zeigen, dass eine Störung der Synchronität innerhalb von Neuronenverbänden eine Reduktion der Signalübertragung via Ketten synaptischer Verschaltungen zur Folge hatte<sup>22</sup>. Auch asynchrone Erregung kann sich in einer *Synfirechain* fortsetzen, ist jedoch anfälliger gegen äußere Einflüsse und wird sich wahrscheinlich im Verlauf der Kette abschwächen und verlorengehen. Pulvermüller überträgt das Modell in seinem Review anschaulich auf die Bildung von Worten im syntaktischen Sprachzentrum.<sup>23</sup>

---

---

## 1.2. Zellkultur auf Multielektroden-Arrays

### 1.2.1. MEAs

Seit mehreren Jahrzehnten beschäftigt sich die neurowissenschaftliche Forschung mit der Signalverarbeitung in neuronalen Verbänden des menschlichen Gehirns. Verschiedene Ansätze bemühen sich unabhängig voneinander damit, Zugang zu dieser Form der Signalverarbeitung zu erlangen. Mit speziell gefertigten Multielektroden-Arrays (MEAs) erfolgen Ableitungen aus funktionstüchtigen Gehirnen von Versuchstieren. Es wird hierbei untersucht, wie Nervenverbände auf äußere Stimuli in Form von somatosensorischen, visuellen und akustischen Signalen mit Veränderung der Aktionspotentialfrequenz und zeitlicher Kohärenz reagieren<sup>24</sup>. Eine Alternative stellt die Arbeit mit flachen Multielektroden-Arrays dar, die außerhalb des tierischen Organismus für Experimente *in vitro* benutzt werden können<sup>25</sup>. Auf die Oberfläche eines MEAs werden Hirnschnittpräparate übertragen, um die Nervenimpulse dieses elektrisch aktiven Gewebes messen, sowie in zeitlichem und räumlichem Zusammenhang auswerten zu können<sup>26</sup>. Ein wesentlicher Nachteil der MEA-Technologie besteht darin, dass es nicht möglich ist, Interaktionen einzelner Neurone bzw. an Synapsen darzustellen. Nur tendenzielle Aktivität in meistens größeren Zellverbänden kann sichtbar gemacht werden. Die Größe der Elektroden und der bisher durch kapazitive Kopplung festgelegte minimale Abstand zwischen den Elektroden limitieren die Anzahl an Elektroden und damit die Auflösung elektrischer Einzelsignale. Um nur eine Schicht von Neuronen auf einem MEA zu kultivieren, werden darauf aus Rattencortices präparierte Neurone übertragen, die an der Oberfläche adhären und neue neuronale Netzwerke ausbilden. Die Netzwerke können nach einer bestimmten Inkubationszeit elektrophysiologisch untersucht werden. Die Entwicklung solcher Neuronennetzwerke kann so während einer bestimmten Zeitspanne verfolgt werden. Von vielen Arbeitsgruppen ist beschrieben worden, dass innerhalb dichter neuronaler Netze *in vivo* eine synchronisierte Aktivität der Nervenzellen in Form von sogenannten Bursts zu beobachten ist<sup>27</sup>.

---

### 1.2.2. Kalzium-Imaging

Ein weiteres häufig verwendetes Verfahren zur Sichtbarmachung elektrischer Aktivität in neuronalen Netzwerken mittels Lichtmikroskopie ist das sogenannte Kalzium-Imaging<sup>28,29</sup>. Es kann unabhängig von der Qualität des Zell-Elektroden-Interfaces mit einem hohen räumlichen Auflösungsvermögen eingesetzt werden. Dabei wird ein Fluoreszenz-Farbstoff, der mit Kalzium-Ionen ein Chelat bildet, nach Eintritt in die Zelle von zelleigenen Esterasen gespalten, so dass dadurch die Zelle nicht mehr verlassen werden kann<sup>30,31</sup>. Nach Bindung von Kalzium-Ionen beginnt der Farbstoff unter Anregung mittels Licht einer bestimmten Wellenlänge (Fluo-4 bei 488 nm) zu fluoreszieren. Mit dem Verfahren kann der intrazelluläre Kalziumspiegel und auch Änderungen während elektrophysiologischer Aktivität innerhalb eines Gewebes bildlich dargestellt werden.

### 1.2.3. Unterteilung des Netzwerkes in Subpopulationen

#### 1.2.3.1. Cluster aus Agarose

Agarose ist ein hauptsächlich aus verschiedenen Algengattungen gewonnenes Polysaccharid, welches sich durch hohe Gelierfähigkeit auszeichnet. Kang et al. führten 2009 eine Methode ein, mit der auf einem MEA Mikroammern aus Agarose gebaut werden konnten, ein. Eingesetzt wurde hier MIMIC (*micromolding in capillary*), eine Technik der weichen Lithographie, die die Aussparungen eines Stempels mit Hilfe der Kapillarkräfte füllt. Die flüssige, heiße Agarose gelangt durch diese Kapillarkräfte unter den vorher positionierten Stempel und um die Strukturen herum, härtet dort aus, verbleibt nach Entfernen des Stempels auf der Oberfläche und bildet 64 Kammern aus. Jede Kammer umgibt eine Elektrode und soll so dafür sorgen, dass Zellen in jeder Kammer in unmittelbarer Elektrodennähe und dicht beieinander wachsen können. Das zellfreundliche Material PDL wurde als Wachstumsschicht dort verwendet, wo die Agarose um die Elektroden herum entsprechend der Stempelstrukturierung kreisförmig ausgespart war; Agarose selbst ist zellabweisend. Die Agaroseschicht war 50 µm dick und wurde durch PDMS-Stempel auf die Oberfläche übertragen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mit Hilfe der Kammern Neurone erfolgreich in großer Dichte dem Design folgend um die Elektroden herum wuchsen

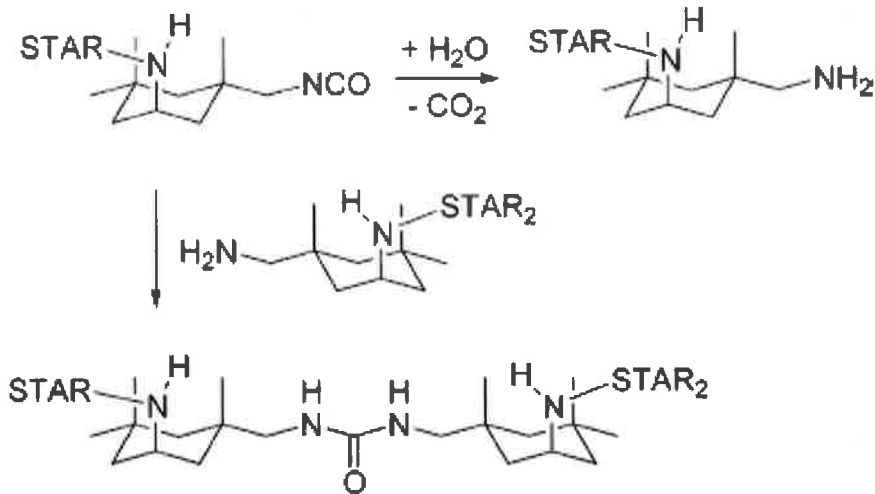
---

und dass sogar Nervenimpulse abgeleitet werden konnten<sup>32</sup>. In einem anderen Ansatz wurde ein PDMS-Stempel in die noch flüssige Agarose gedrückt, um die Agarose entsprechend der Stempeloberflächenstrukturierung dort vollständig zu verdrängen, wo die Neuronenkammern entstehen sollten<sup>33</sup>.

### 1.2.3.2. Cluster aus Star-PEG

Da sich der Ansatz, mit Agarose ein Cluster unterschiedlich großer Kreiskammern zu konstruieren, nach mehreren Vorexperimenten als unbefriedigend für den Ansatz der vorliegenden Arbeit herausgestellt hatte (siehe Resultate und Diskussion), wurde eine andere Substanz, die zellabweisend wirkt und in Form des Clusters leicht auf ein MEA übertragbar ist. Es wurde dazu Isocyanat-terminiertes sternförmiges Polyethylen-Glykol (STAR-PEG) verwendet, das nicht wie die flüssige Agarose mittels Kapillarkräften unter den Stempel und zwischen die Strukturen gesaugt wurde, um dort auszuhärten, sondern gleichmäßig auf der Stempeloberfläche verteilt und dann auf das Substrat mittels eines Fineplacers übertragen wurde. Reska und Rinklin hatten gezeigt, dass Star-PEG erfolgreich mittels  $\mu$ CP zum gerichteten Wachstum von Insektenneuronen in geringen Populationsdichten auf MEAs verwendet werden kann<sup>34,35</sup>.

Polyethylenglycol ist ein Polymer des Ethylenglycols, das auf Grund seiner geringen Toxizität in Medizin, Pharmazie und in der zellbiologischen Forschung eingesetzt wird. Es ist chemisch inert und auf Grund seiner Wasserlöslichkeit leicht zu verarbeiten. In Anwesenheit von Wasser kommt es zwischen den einzelnen Star-PEG Molekülen zu einer Kreuzverknüpfung. Die Isocyangruppen des einen Star-PEG Moleküls reagieren mit den Aminogruppen eines anderen Moleküls zu einer Harnstoffgruppe, wobei es zur Polymerisierung des Star-PEGs kommt. Sobald die Moleküle vollständig auspolymerisiert sind, verlieren sie ihre wasser- und proteinbindende Eigenschaft und wirken stark zellabweisend<sup>36-39</sup>. Diese Eigenschaft ist in dieser Arbeit relevant, da Areale mit zellabstoßenden Eigenschaften benötigt wurde, die von zellbindenden Bereichen durchsetzt waren.



**Abbildung 1:** Reaktion der Polymerisation von Star-PEG-Molekülen in Anwesenheit von Wasser (Reska, FZJ, unveröffentlicht)

Wenn man Star-PEG vor der vollständigen Polymerisation auf eine Oberfläche mit bestimmten chemischen Eigenschaften überträgt, kann es an die dort vorhandenen funktionellen Gruppen binden. So kann es z.B. an die Aminogruppen von APTES, einem Aminosilan, oder in einer Proteinmischung binden. Um eine vorzeitige Kreuzreaktion der Moleküle untereinander durch Feuchtigkeit in der Luft zu vermeiden, wird Star-PEG unter Argonschutz-Atmosphäre in einer *Glove-box* aufbewahrt und vor jedem Experiment abgefüllt.

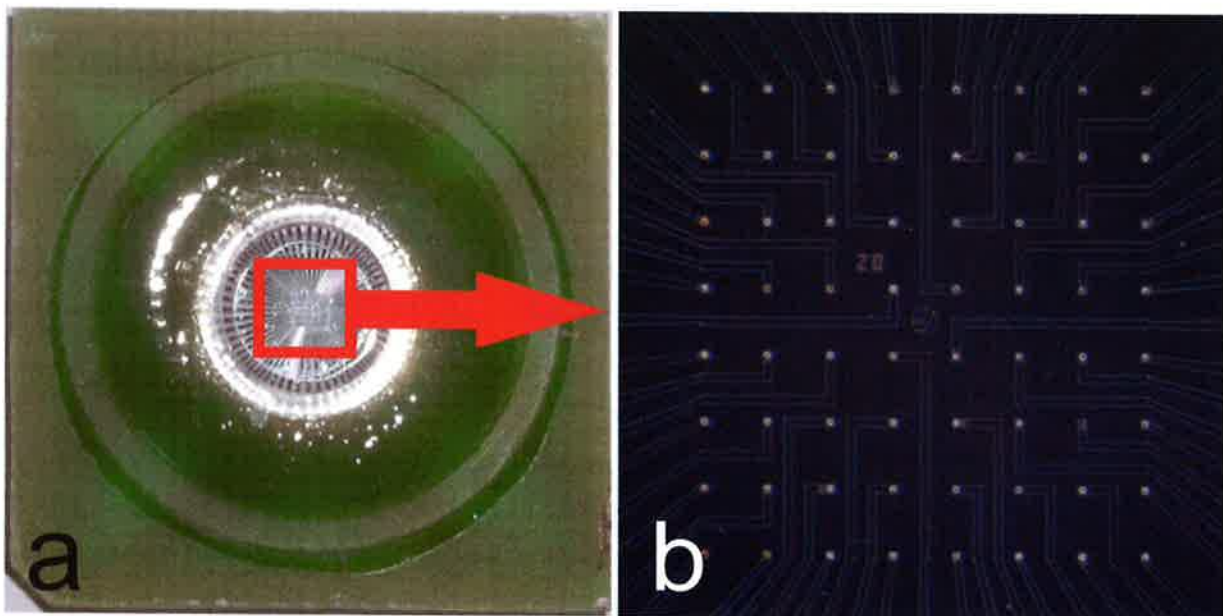
## 1.3. Das Bioelektronische Interface

### 1.3.1. MEAs

1976 wurde von E. Nehler und B. Sackman die *Patch-Clamping* Methode zur Erforschung von Strömen durch Ionenkanäle in Zellmembranen veröffentlicht<sup>40,41</sup>. Dieses elektrophysiologische Verfahren ist seither unentbehrlich zur Erforschung neuronaler Elektrizität. Es hat jedoch den Nachteil, dass die zu untersuchende Nervenzelle geschädigt wird und innerhalb weniger Stunden abstirbt. Dies verhindert Untersuchungen über einen langen Zeitraum, bzw. Wiederholungsmessungen in täglichen oder wöchentlichen Intervallen. MEAs haben diesen Nachteil nicht. Das erste Mal wurden sie 1972 von C.A.

Thomas zur Signalableitung aus Muskelzellen verwendet<sup>52,43</sup>. Da die Zellmembran während der Ableitungen intakt bleibt, ist eine rein extrazelluläre Ableitung von elektrischen Impulsen möglich. Gleichzeitig können MEAs mit einfachen Reinraumtechniken in wenigen Lithographieschritten hergestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MEAs bestehen aus 8 x 8 Elektroden aus planarem Gold. Diese Mikroelektroden können je nach Fabrikation unterschiedliche Durchmesser und Abstände zueinander aufweisen<sup>44</sup>.

MEAs sind zu wichtigen Instrumenten der modernen Neurowissenschaften geworden. Es ist gelungen, mit Hilfe von Mikroelektroden Signale aus der Großhirnrinde von Menschen und Tieren aufzunehmen, die Aufschluss über die Signalverarbeitung sensorischer Informationen aus dem visuellen und auditiven Kortex geben<sup>45</sup>. *In vitro* konnte auf MEAs das Lernverhalten in neuronalen Netzen simuliert werden<sup>46</sup>. Von den Mikroelektroden der Chips aus kann man Neurone ebenfalls erregen und den Verlauf der Erregung über mehrere Elektroden hinweg nachvollziehen. MEAs werden mittlerweile den verschiedenen Anwendungen angepasst in verschiedenen Formen gebaut; auch dreidimensionale MEAs und MEAs auf flexiblen Materialien zur verbesserten Anwendung *in vivo* wurden veröffentlicht<sup>47</sup>. Weiterhin kommt MEAs im Bereich der Bio-Sensorik eine Bedeutung zu<sup>48,49</sup>.

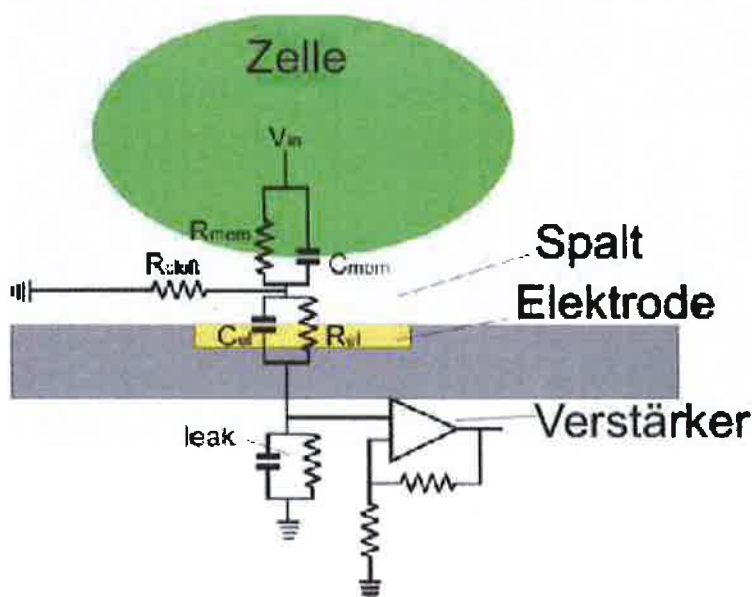


**Abbildung 2:** a) Verkapserter MEA-Chip (Jülich) b) Vergrößerung von a, Elektrodendurchmesser 20 µm

In Abbildung 2 ist ein MEA zu erkennen. In 2a ist der Chip bereits in einem Carrier-System verkapstelt. Bildteil 2b zeigt eine Vergrößerung der rot markierten Fläche aus 2a. Beide Chips

sind zwar gleich prozessiert und haben daher identische elektrische Strukturen und Eigenschaften. Jedoch wurden verschiedene Wafermaterialien verwendet: Borafloat (2a), welches transparent und daher gut geeignet für Durchlichtmikroskopie ist, und Silizium (2b), welches kontrastreichere Bilder in der Auflichtmikroskopie ermöglicht. Ein MEA besteht aus 64 quadratisch angeordneten Einzelelektroden, die in einen Elektrolyten eintauchen. Die elektrischen Eigenschaften der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt sind determinierend für die Signalübertragung zwischen beiden. Das Potenzial zwischen Elektrode und Elektrolyt wird gegen einen Referenzwert einer Badelektrode (Referenzelektrode) gemessen, die in die Elektrolytlösung eintaucht und an der Masse (0 Volt) anliegt.

Die Grenzfläche hat zwei wichtige elektrische Eigenschaften: Stark vereinfacht wirkt sie einerseits wie eine Kapazität. Eine Spannungsänderung im Elektrolyten bewirkt durch sogenannte kapazitive Kopplung eine messbare Ladungsverschiebung in der Elektrode. Auf der anderen Seite stellt sie einen Ohmschen Widerstand dar. Durch galvanische Redoxreaktionen zwischen Elektrode und Elektrolyt werden Elektronen direkt von dem Elektrolyten auf die Elektrode übertragen und umgekehrt. Der daraus resultierende Strom ist ebenfalls messbar. Um diese Eigenschaften zu beschreiben, kann man ein Ersatzschaltbild einführen, das eine Kapazität in Parallelschaltung mit einem Ohmschen Widerstand über die Grenzfläche darstellt:



**Abbildung 3:** Ersatzschaltbild eines Zell-Elektroden-Interfaces



### 1.3.2. Die Impedanz des Elektrolyt-/Elektrodeninterfaces

Die Impedanz (Symbol  $Z$ ) beschreibt das Verhältnis einer Wechselspannung zu ihrem resultierenden Wechselstrom und setzt sich aus einem sogenannten Imaginärteil, dem oben beschriebenen Blindwiderstand  $X_c$ , und einem Realteil, einem frequenzunabhängigen Ohmschen Widerstand, zusammen.

$$Z_C = \frac{1}{j\omega C}.$$

Die Formel beschreibt, dass die Impedanz  $Z_c$  von der Kapazität der Elektrode sowie von der Frequenz der angelegten Wechselspannung abhängig ist. Sie ist beiden Größen invers proportional, d.h. umso größer Frequenz und Kapazität, desto geringer wird die Impedanz. Der resultierende Wechselstrom ist um den Faktor  $j$  phasenverschoben. Die Übertragung von Aktionspotentialen am bioelektronischen Interface wird durch die Impedanz stark beeinflusst. Je größer die Impedanz einer Elektrode ist, desto höher wird das signalbeeinflussende Spannungs-Rauschen der Elektrode sein, woraus sich ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Daher wird versucht, die Impedanz so gering wie möglich zu halten. Um die Impedanzen von Elektroden bzw. von Elektroden-/Elektrolytgrenzflächen zu quantifizieren, wird u.a. die Impedanzspektroskopie eingesetzt. Durch einen sogenannten Potentiostaten wird gemessen, welchen Wechselstrom eine an den zu untersuchenden Elektroden angelegte Wechselspannung hervorruft. Daraus wird von einer Software die Impedanz errechnet und graphisch dargestellt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Oberfläche eines Elektrodenarrays so zu modifizieren, dass eine bessere Signalüberleitung zwischen Elektrolyt und Mikroelektrode erreicht werden kann. Wie oben beschrieben, sorgt die Impedanz für ein verstärktes Spannungs-Rauschen und wirkt sich negativ auf das Signal-Rauschverhältnis aus. Ziel ist es also, die Impedanz der Mikroelektroden möglichst zu verringern. Da die Impedanz invers proportional zur Kapazität der Elektrode ist, und die Kapazität mit steigender Oberfläche ansteigt, führt eine Vergrößerung der elektrisch aktiven Oberfläche zu einer Abnahme der Impedanz. Zu diesem Zweck werden verschiedene Verfahren der Nanostrukturierung eingesetzt, wie z.B. die Beschichtung mit Iridiumoxid-<sup>50</sup> oder Titanitridoberflächen, Kohlenstoffnanoröhren<sup>51,52</sup> und Nanodrähte<sup>53,54</sup>. In der

vorliegenden Arbeit waren elektrochemische Platin-Abscheidungen das Verfahren der Wahl, auf die im Verlauf weiter eingegangen wird.

### 1.3.3. Zell-Elektroden Interfaces

Gehen wir nun von dem für diese Arbeit relevanten Fall aus, dass eine Zelle die Elektrode bedeckt. Zelle und Elektrode sind von einer Elektrolytlösung umgeben. Zwischen Zelle und Elektrode besteht ein Spalt. Die Zelle selbst kann ebenfalls mit einem Ersatzschaltbild bezüglich ihrer elektrischen Eigenschaften beschrieben werden. Ihre Zellmembran hat einen kapazitiven und einen Ohmschen Anteil. Sobald eine Depolarisation der Nervenzelle eintritt, kommt es im Spalt zu einer Spannungsänderung in Referenz zur umgebenden, an Masse angelegten Elektrolytlösung. Diese Spannungsänderung wird kapazitiv an die Elektrode gekoppelt und kann an ein Verstärkersystem weitergeleitet werden. In der Bioelektronik spielt die elektrische Kopplung des Elektrolyts an die Elektrode eine wesentliche Rolle für die erfolgreiche Überleitung eines elektrischen Signals auf die Elektrode. Sollen, wie in dieser Arbeit, Nervenimpulse abgeleitet werden, beeinflussen im Wesentlichen zwei Faktoren die Güte der Ableitungen, erstens die oben beschriebene Impedanz der Mikroelektrode, und zweitens der Widerstand, den der Spalt zwischen Zelle und Elektrode darstellt (*Seal-Resistance*)<sup>55</sup>. Der Spalt zwischen Zelle und Elektrode stellt einen Widerstand dar, der Leckströme von Ionen im Spalt verhindert und damit ein Absinken der Spannung, die im Spalt herrscht. Je dichter eine Zelle an die Oberfläche bindet, desto größer wird der Widerstand sein, d.h. es liegt eine hohe Spannung an, die nicht oder nur geringfügig durch abfließende Ladungen verringert wird<sup>56</sup>. Um, diese *Seal-Resistance* zu vergrößern<sup>57</sup>, wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt: Mit speziellen Mikrokäfigen wird z.B. versucht, Zellen mechanisch nahe an dem Substrat zu halten<sup>58,59</sup>.

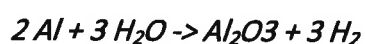
#### 1.3.3.1. Nanoporöse Schnittstelle

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Nanoporen. Nanoporen erlauben eine enge Zell-Substratbindung<sup>60</sup>. Es wurde vermutet, dass die Fortsätze und die Membranen der Neurone in die Poren protrahieren würden, wie es bei Experimenten mit Osteoblasten beobachtet

---

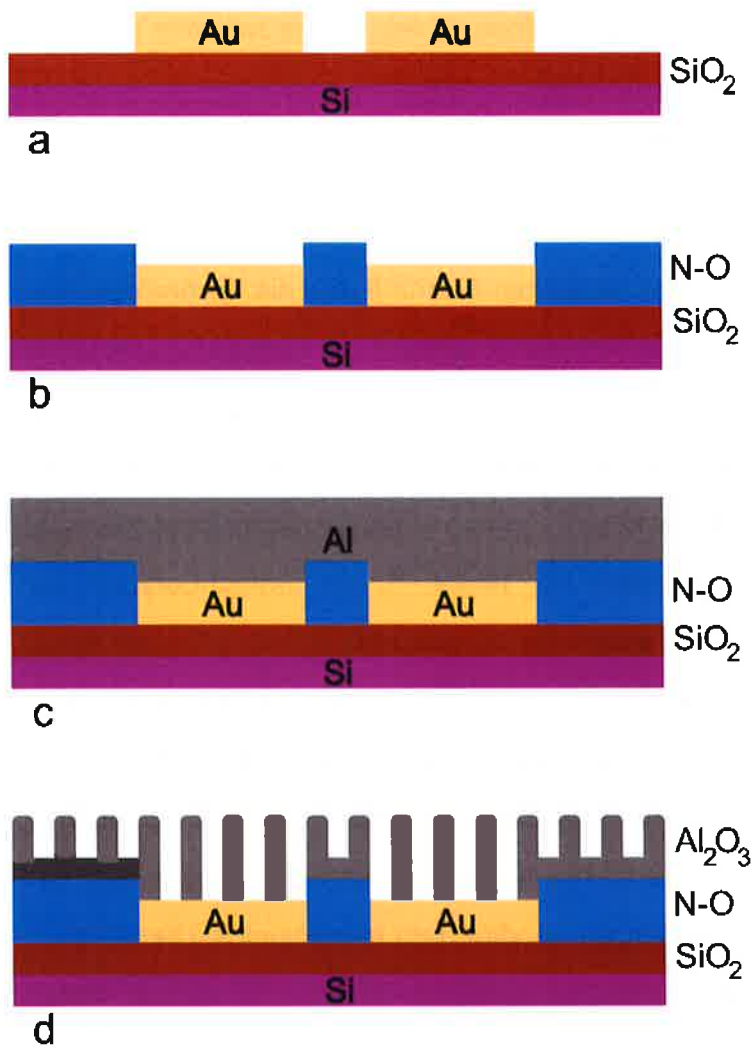
worden war<sup>61</sup>. Dadurch hätte eine ausreichende Abdichtung des Spaltes zwischen Zelle und Elektrode erreicht werden können. Mit dem im folgenden Abschnitt geschilderten Verfahren zur Herstellung von Nanoporen auf MEA-Oberflächen, wurde erwartet, eine Erhöhung der Seal-Resistance erreichen zu können.

In der Medizintechnik und besonders in der modernen Prothetik hat die Technologie von nanoporösen Oberflächen einen besonderen Stellenwert erreicht. Sie können für zahlreiche Anwendungen verwendet werden<sup>62</sup>; genannt seien hier die Sequenz-spezifische DNA-Detektion<sup>63</sup>, die Separation und Sortierung von Biomolekülen *in vivo* entsprechend ihrer Größe oder Ladung<sup>64</sup>, das sogenannte Biosensing<sup>65-67</sup>, das u.a. bei der Blutglukose-Messung<sup>68</sup> und bei der Cholesterinmessung Verwendung findet<sup>69</sup>, die Immunisolation zur Abschirmung eines organischen Implantats gegen die Immunzellen des Empfängers durch nanoporöse Membranen und die Abgabe von kontrollierten Medikamentendosen durch Nanoporen<sup>70,71</sup>. Auch in der Prothetik finden Nanoporen zur Oberflächenmodifikation der Implantate Verwendung<sup>61,72</sup>. Nanoporöse Oberflächen können aus verschiedenen Materialien und durch unterschiedliche Verfahren hergestellt werden. Masuda war der erste, der defektfreie nanoporöse Oberflächen aus anodisiertem Aluminiumoxid herstellte<sup>73</sup> (siehe Abbildung 4). Dabei wird in einer elektrochemischen Reaktion in saurem Milieu Aluminium, das auf die Oberfläche des MEAs im Reinraum aufgedampft wurde, zu Aluminiumoxid oxidiert, das sich in Form von Nanoporen organisiert. Die chemische Reaktionsformel lautet:



Nanoporen aus Aluminiumoxid besitzen eine hohe Biokompatibilität und sind daher für den Einsatz in der Zellkultur bestens geeignet<sup>60,74</sup>.

---



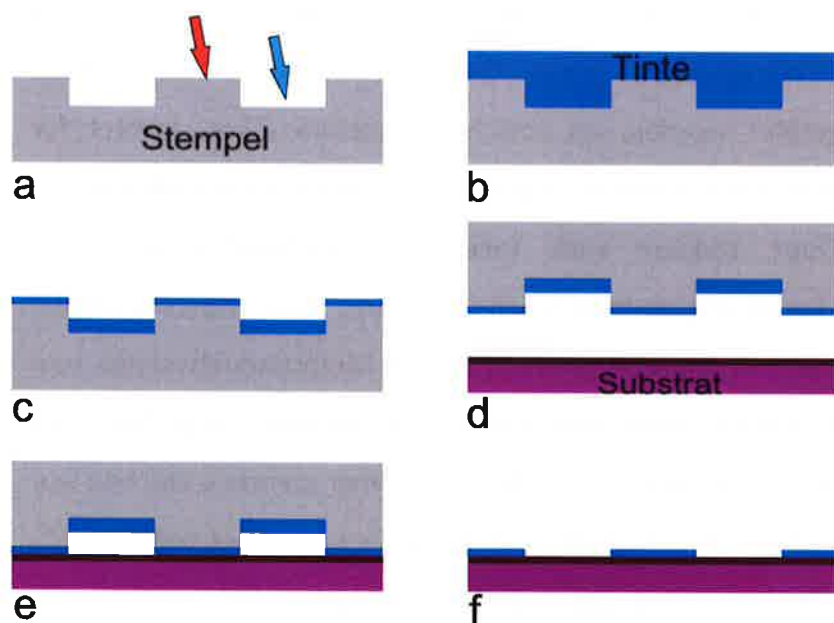
**Abbildung 4:** Herstellung eines MEAs mit Nanoporen aus Aluminiumoxid, a) auf eine Siliziumoxidoberfläche wird Gold aufgedampft und b) anschließend eine elektrisch isolierende Passivierung aufgebracht, c) eine aufgedampfte Schicht Aluminium wird d) durch elektrochemische Anodisierung mit Nanoporen versehen

## 1.4. Microcontact Printing

Das Prinzip des  $\mu\text{CP}$  wurde 1993 von Kumar und Whitesides eingeführt<sup>75-78</sup>. Seither für verschiedene Anwendungen verwendet, spielt diese Methode unter anderem eine große Rolle in der Neurotechnologie, wenn man das Wachstum und die Ausbreitung von Zellen und ihren Fortsätzen räumlich begrenzen möchte<sup>79</sup>. Das Prinzip ist preiswert und unkompliziert in seiner Durchführung. Eine Struktur, die auf eine Oberfläche übertragen werden soll, z.B. ein Proteinraster, entlang dessen die Axone eines Neurons wachsen sollen, wird auf einen Stempel übertragen, der typischerweise aus polymeren Verbindungen

besteht, z.B. aus Polydimethylsiloxan (PDMS) oder Polyolefinen (POP). Beide Substanzen werden gesondert unter „Methoden und Material“ beschrieben (s.S. 24). Als Vorlage kann ein prozessierter Wafer dienen, auf den in Reinraum-Technologie die Dimensionen der Strukturvorlage (Maske) übertragen worden sind. Der Stempel wird anschließend mit einer Tinte beschichtet, die die zu übertragende Substanz enthält. Durch Übertragen und Abdrücken des beschichteten Stempels wird die Tinte auf das zu beschichtende Substrat übertragen und bindet an dessen Oberfläche. Der Stempel kann entfernt werden und die zu stempelnde Struktur verbleibt auf dem Substrat. Zu unterscheiden sind zwei Sorten von Stempelgestaltung: Beim nicht-inversen Stempel wird die zu übertragende Struktur durch Auswölbungen aus dem Stempel repräsentiert, d.h. die Tinte stellt nach der Übertragung die Struktur genau dar. Beim inversen Stempel ist es umgekehrt; die Tinte spart die Struktur aus und umgibt sie (Siehe Abbildung 5).

Das Prinzip bietet folgende Vorteile: Sind Chip und Stempelwafer fertig prozessiert, kann man sie häufig, auch in neuer Kombination wiederverwenden. Im Vergleich zu zeitintensiven und kostspieligen Reinraumverfahren ist das  $\mu CP$  zeitsparend und preiswert.



**Abbildung 5:** Prinzip des  $\mu CP$ ; beim inversen Patterning entspricht die zu übertragende Struktur den Einsenkungen im Stempel (blauer Pfeil), beim nicht-inversen Patterning ist die Struktur durch die Vorwölbungen repräsentiert (roter Pfeil). Ein Stempel (z.B. PDMS) wird mit einer zu übertragenden Tinte (z.B. Protein) beschichtet (a+b), durch Spincasting wird überschüssige Tinte gleichmäßig entfernt (c), mittels Fineplacer wird der Stempel auf das Substrat gebracht (d+e+f)

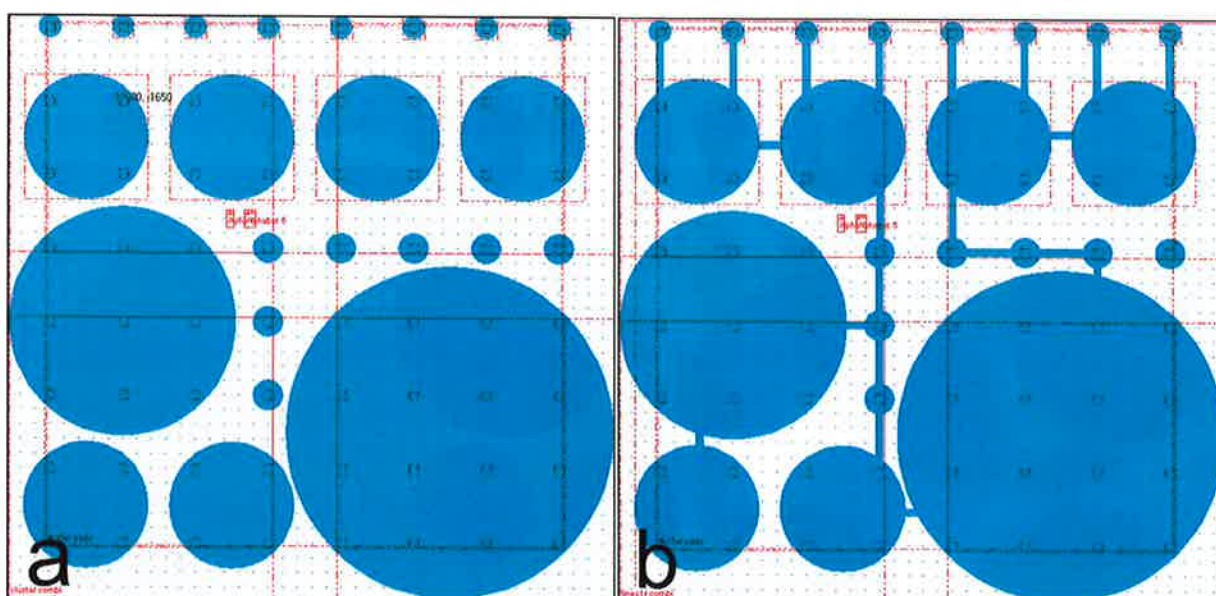
## 1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, um auf einem MEA ein in mehrere Einheiten unterteiltes Netzwerk neuronaler Zellen zu erzeugen, die imstande sind, miteinander über neuritische Verbindungen zu kommunizieren. Ein solches speziell geformtes Neuronennetzwerk sollte der Forschung in Zukunft die Möglichkeit geben, Informationen über die Verarbeitung von Nervensignalen in neuronalen Netzwerken zu erlangen. Die Entwicklung neuer gezielterer Methoden im Bereich der Neuroregeneration und Neuroprothetik könnte dadurch möglich gemacht werden.

Der erste Schritt der vorliegenden Arbeit sollte es sein, auf MEAs dichte Kulturen von Neuronen zu züchten, diese mindestens drei Wochen am Leben zu erhalten und anschließend mittels eines Verstärkersystems Messungen mit diesen Kulturen vorzunehmen. Es sollte untersucht werden, ob die Neuronen in der Kultur vital waren und ob sie Aktionspotentiale bildeten, bzw. ob diese Aktionspotentiale von unserem MEA-System detektiert werden konnten. Verwendet wurden ausschließlich Nervenzellen aus dem Neocortex von Rattenembryos, die vor jeder Kultur präpariert werden mussten. In zahlreichen internationalen Arbeitsgruppen waren bereits Messungen aus dichten Neuronenpopulationen durchgeführt worden. Im Forschungszentrum Jülich, Institut für komplexe Systeme, wurde jedoch ein von anderen Gruppen abweichendes Verstärkersystem verwendet. Nicht nur die Chips, sondern auch Teile von Verstärkerhardware und Verstärkersoftware wurden im Forschungszentrum Jülich produziert. Standardmäßig kamen in anderen Instituten die kommerziell erworbenen Systeme von Multichannelsystems zum Einsatz. Eine Hürde bestand somit darin, Nervenimpulse aus dichten Kulturen erstmals mit unserem eigenen System zu messen. Der vitale Erhalt der Zellen über mehrere Wochen war wichtig, da Neurone erst nach einigen Tagen *in vitro* intensiviert Axogenese betreiben<sup>80</sup>. Ab Tag 9 bis 14 wurden in anderen Arbeitsgruppen erste Aktionspotentiale gemessen<sup>81</sup>, während Bursts (über das Netzwerk synchronisierte Massenentladungen von Neuronen) erst ab dem 14. Tag auftraten und ihre Wahrscheinlichkeit bis zum 21. Tag *in vitro* (engl. DIV) nochmals zunahm<sup>82</sup>. Innerhalb eines solchen Netzwerks ist eine Prozessierung verschiedener Funktionen jedoch nicht mehr möglich, da sich Aktionspotentiale nach einiger Zeit über ein geschlossenes Netzwerk, wie man es in dichten Neuronenkulturen auf MEAs

---

findet, synchron ausbreiten. Es enthält also nur noch eine einzige Information, die durch die Entladungsrate sämtlicher Neurone dieses Verbandes codiert wird. Erst durch die funktionsabhängige Verschaltung und Kommunikation unabhängiger Verbände untereinander kann man verschiedene Informationen codieren und decodieren. Auch das Gehirn ist räumlich sowie zeitlich in verschiedene Einheiten aufgeteilt. Um sich den genauen Prinzipien der Signalverarbeitung *in natura* zu nähern, muss also auch *in vivo* eine Möglichkeit geschaffen werden, neuronale Verbände unabhängig bzw. im gerichteten Austausch miteinander zu untersuchen. Daher sollte nach der erfolgreichen Züchtung von dichten neuronalen Kulturen und Messung elektrischer Aktivität das große neuronale Netzwerk auf einem MEA in kleinere Subpopulationen von Zellen unterteilt werden. Die Neurone sollten räumlich getrennt voneinander in runden Kammern wachsen, die über Kanäle miteinander in Verbindung stehen. So sollte die Interaktion räumlich voneinander getrennter neuronaler Netzwerke auf verschiedene Parameter untersucht werden. Jede räumlich eigenständige Kammer repräsentiert eine in sich geschlossene Population von Neuronen, die z.B. im Stande sind, synchrone elektrische Aktivität zu erzeugen.



**Abbildung 6:** a) Design des auf MEAs zu übertragenden Clusters ohne Kanäle; b) Cluster-Design mit Kanälen in denen die Neurite der Neurone verlaufen sollen. Dadurch soll eine Kommunikation zwischen den Neuronen unterschiedlicher Kammern ermöglicht werden

Zu diesem Ziel wurden zwei verschiedene Cluster-Designs entworfen, die beide aus insgesamt 22 kreisrunden Kammern bestehen, in denen Neurone wachsen können (Abbildung 6). In 6a stehen die Kammern untereinander nicht in Kontakt. Hier interessierte

zunächst, wie klein die Kammern gewählt werden können, damit darin noch erfolgreich Neurone wachsen und für eine bestimmte Zeit überleben können. Gleichzeitig konnte so beobachtet werden, wie viele Zellen in jeder Kammer wachsen würden. Da die Kammern nicht wie in 6b über Kanäle miteinander verbunden waren, konnte jede Kammer mit den darin befindlichen Neuronen separat betrachtet und elektrisch bzw. mit Hilfe von Kalzium-Imaging gemessen werden. Es sollte geprüft werden, ob sich innerhalb der Einzelkammern weitere Subpopulationen ausbildeten, ob synchrone Aktivität innerhalb der Einzelkammern zu messen war, und ab welcher Kammer-/Populationsgröße diese Eigenschaften zu beobachten sein würden.

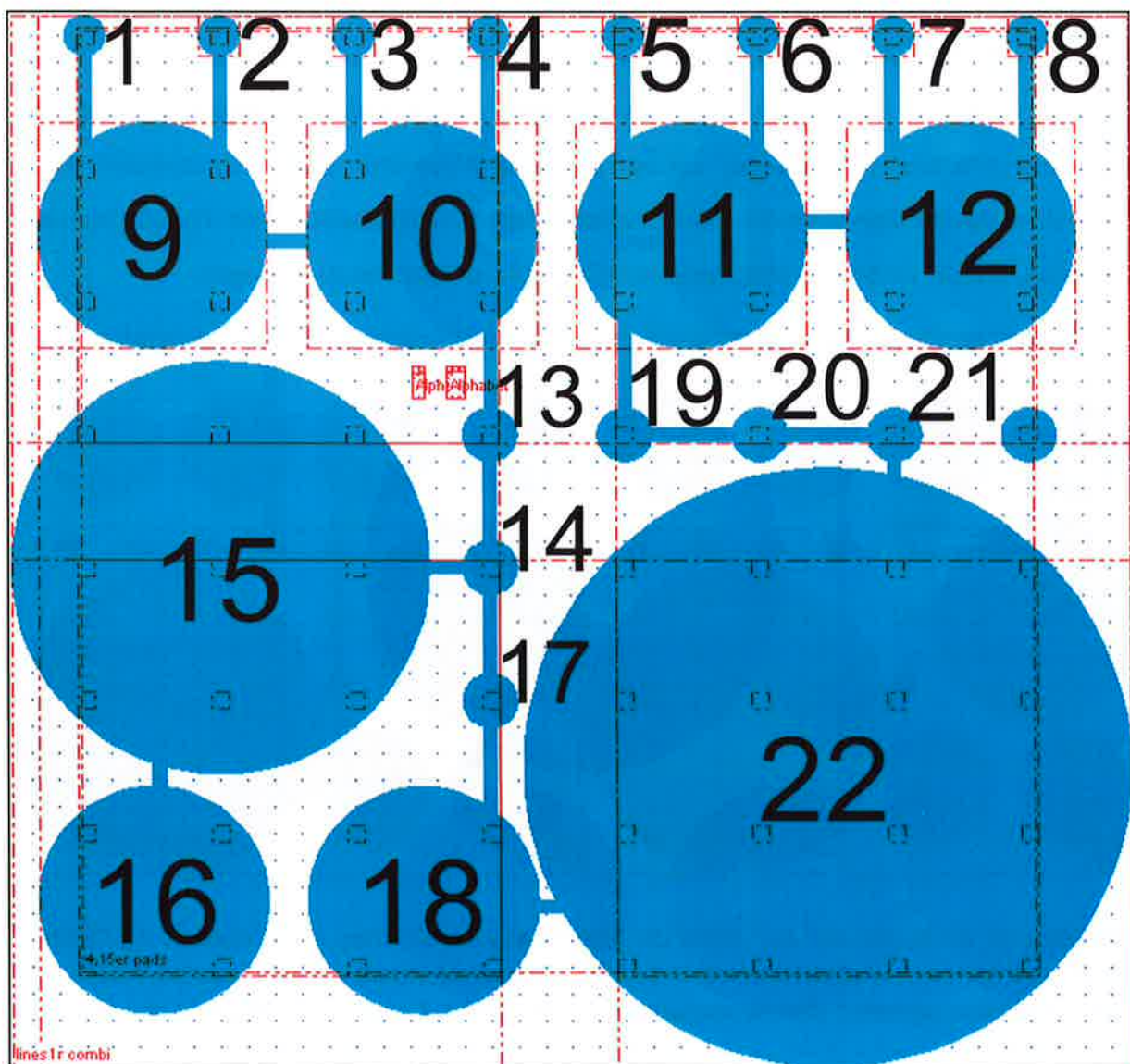


Abbildung 7: Vergrößerung des Clusters aus 25b) mit Nummerierung



In 6b wurden wischen ausgewählten Kreisstrukturen Verbindungen (Kanäle) eingefügt. Sie waren mit einer Breite von 10  $\mu\text{m}$  so schmal, dass nur Neuriten und gegebenenfalls Einzelzellen darin adhäreren konnten. Mit Hilfe der Kanäle sollten die Neurone über Axone miteinander kommunizieren. So sollte beobachtet werden, wie elektrische Signale sich von Subpopulation zu Subpopulation ausbreiteten. Besonderes Interesse sollte dabei der praktischen Untersuchung von *Synfire-Chains* gelten, da die Kammern als vertikal organisierte Schichten betrachtet werden können, die über zahlreiche axonale Kontakte innerhalb der Kanäle miteinander kommunizieren können.

Zukünftig sollte es dadurch möglich werden, die spontane Aktivität der Neuronen in den Kreiskammern zu messen und mittels speziellen Softwareprogrammen Korrelationen zwischen den Kammern zu detektieren. Anschließend besteht weiterhin die Möglichkeit, die Neurone an einer bestimmten Stelle (z.B. mittels Patch-Clamp Technik) zu stimulieren und die Erregungsausbreitung in angrenzende Kammern zu untersuchen. Die Signale der einzelnen Kammern können verglichen und Signal-Kohärenz - wenn vorhanden - zwischen den verschiedenen Einzelelektroden festgestellt werden. Neuronen in jeder beliebigen Kammer können stimuliert werden. Daher können Aktivitäten von verschiedenen stimulierten Startpunkten einzeln oder kombiniert abgeleitet und interpretiert werden. Auch die Länge des jeweiligen Ausbreitungsweges, ist durch Auswahl von Stimulations- und Messpunkt variabel. Gleichzeitig können durch die unterschiedlichen Kammergrößen die Signalqualitäten verschieden großer neuronaler Verbände miteinander verglichen werden.

Der Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit war es, ein geeignetes Verfahren zu finden, um die in der Abbildung 6 sichtbare Struktur auf die Oberflächen von MEAs zu übertragen und ein gerichtetes Neuronen-Wachstum zu ermöglichen. Hierfür gab es verschiedene Ansätze, die nachfolgend kurz vorgestellt werden sollen.

Ein geläufiges Verfahren, um ein selektives Wachstum von Zellen auf Silizium-Oberflächen zu ermöglichen, ist die Kombination von zell- bzw. protein-aversiven Substanzen mit Substanzen, die die Adhäsion von Zellen begünstigen. In den blauen Kreisen der Abbildung 7 sollen die Neurone wachsen; an diesen Stellen wird ein neurophiles Substrat auf die Oberfläche aufgetragen, das das neuronale Wachstum und die Bindung der Nervenzellen begünstigen soll. Solche Substanzen sind z. B. Proteine der extrazellulären Matrix (ECM-Gel)

---

<sup>35,83,84</sup> oder reines Laminin <sup>82,85,86</sup> in Kombination mit Poly-Lysin oder APTES <sup>87</sup>. Um die Kammern herum sollen keine Neurone wachsen; hier wird eine Tinte aufgebracht, die zellabstoßend wirkt. Als zellaversive Substanzen werden für unterschiedliche Zellkulturen in der Literatur folgende Stoffe eingesetzt: Epoxsilan <sup>88</sup>, Dimethyldichlorosilan (DMCS) <sup>89</sup>, Alkyltrichlorosilane<sup>90</sup>, Polyethylenglykol <sup>34-39</sup> und Agarose <sup>32,33,91</sup>. Um für das hier entwickelte Cluster eine optimale Kombination aus zellaversiven und zellfreundlichen Substanzen zu finden, wurden aufeinander folgende Untersuchungen mit verschiedenen Beschichtungen der Chipoberflächen durchgeführt. Mittels Kalzium-Imaging sollten die Neurone im Cluster auf Silizium-Chips auf spontane elektrische Aktivität untersucht werden. Dabei sollte geprüft werden, ob die Zellen spontane elektrische Aktivität aufwiesen und ob bei fehlender spontaner Aktivität die Zellen im Netzwerk durch pharmakologische Stimulation mit Glutamat und Bicucullin elektrische Aktivität zeigen würden.

---

---

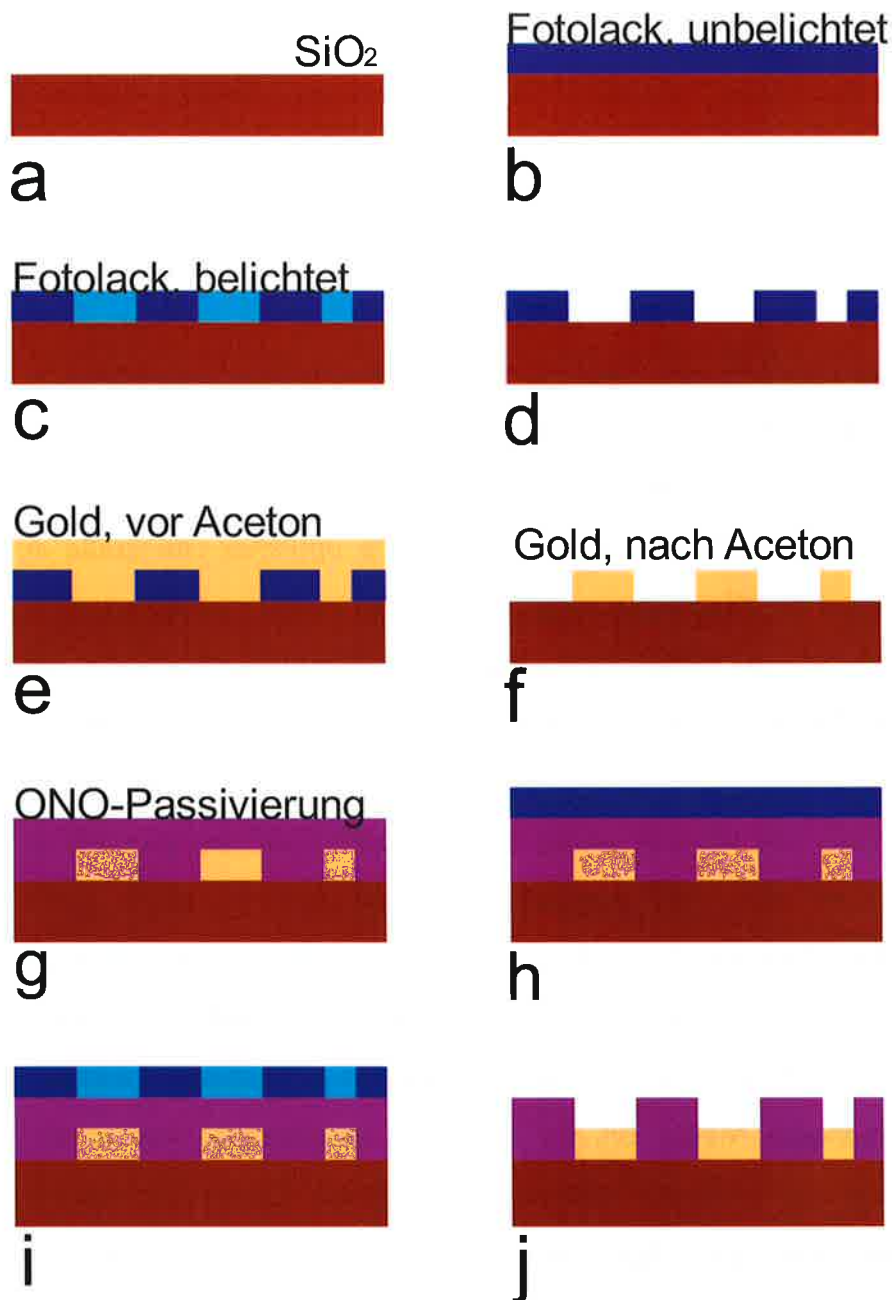
## 2. Material und Methoden

### 2.1. MEA-Technologie

#### 2.1.1. Chip Fabrikation

MEA-Chips wurden unter Verwendung von Standard-Reinraum-Technologie prozessiert. P-dotierte 4-inch Silizium-Wafer wurden unter feuchten Bedingungen oxidiert, um darauf eine 1µm hohe Siliciumoxidschicht wachsen zu lassen. Mikroelektroden, Kontaktanschlüsse (bond pads) und Versorgungsleitungen wurden anschließend mit Hilfe optischer Lithografie in einem Zweischichtverfahren auf der Oberfläche aufgebracht. Dabei wurde ein Fotolack (LOR 3B/nLOF202, Micro-Resist Technology GmbH, Berlin, Deutschland) mittels Spincoating auf der Chipoberfläche verteilt (Abbildung **8b**). Mit einer Lithografiemaske, die Licht selektiv entsprechend der zu prozessierenden Strukturen (Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktstellen) passieren lässt, und UV-Licht wurde der Lack entwickelt und dort wo er während der Belichtung nicht dem Licht ausgesetzt war, unentwickelt mittels eines alkalischen Entwicklers entfernt (MIF 326, Microchemicals GmbH, Ulm, Deutschland) (**8c+d**). Metallschichten (10 nm Ti, 150 nm Au, 5 nm Ti) wurden mit Elektronenstrahlen nacheinander aufgebracht (**8e**). Aceton sorgte für die Ablösung des verbliebenen Lacks mit darauf befindlichem überflüssigem Metall (**8f**). Im folgenden Arbeitsschritt wurden die Strukturen passiviert, d.h. mit einer elektrisch isolierenden Schicht aus 400 nm Siliziumnitrit und 400 nm Siliziumoxid bedampft (**8g**). Dies wurde mit Plasma unterstützter Dampfabcheidung durchgeführt. Abschließend wurde die Passivierungsschicht über den elektrischen Anschlüssen und den Mikroelektroden mittels reaktivem Ionen Ätzen (RIE) in CHF<sub>3</sub> entfernt. Auch hier kam Fotolack in einem lithografischen Arbeitsschritt zum Einsatz (**8h-j**). Sollte zusätzlich noch eine Beschichtung mit Nanoporen erfolgen, musste in einem zusätzlichen Prozessschritt Aluminium mit einer Schichtdicke von 800 nm mittels thermischer Bedampfung abgeschieden werden.

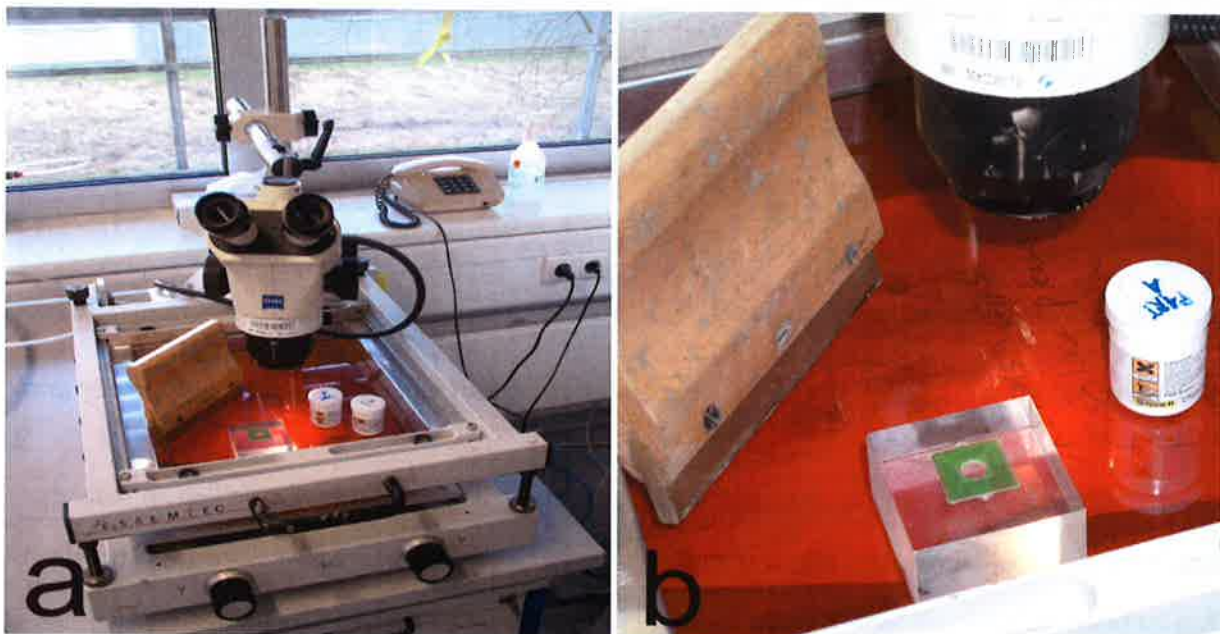
---



**Abbildung 8:** Prozessierungsschritte eines MEA-Chips mit Hilfe photolithografischer Verfahren. Ein Siliziumwafer (a) wird mit einem Fotolack beschichtet (b) und über eine Belichtungsmaske belichtet (c). Ein alkalischer Entwickler löst den belichteten Teil des Lacks ab (d), anschließend wird Gold aufgedampft (e). Überschüssiger Lack und darauf befindliches Gold werden durch Aceton abgelöst (f). Es wird dann eine elektrische Isolationsschicht aufgetragen (h), die entlang der Elektroden und Leiterbahnen mittels Lithografie geöffnet wird (h-j)

### 2.1.2. Verkapselung

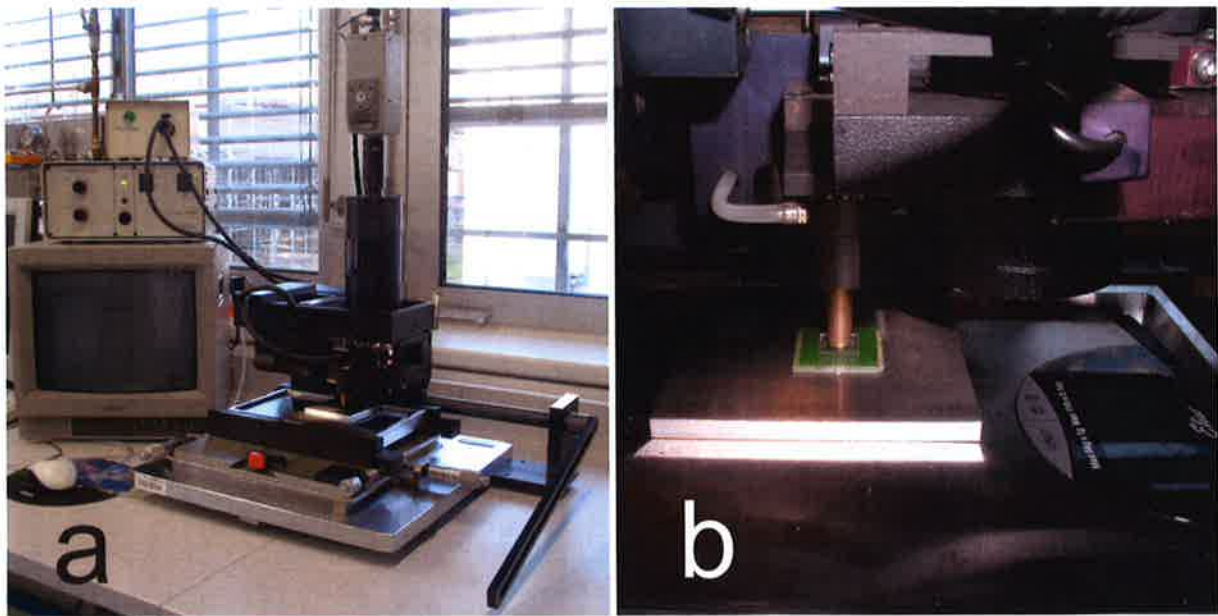
Um das Anwachsen von Neuronen auf der Elektrodenfläche zu gewährleisten und um den MEA mit einem Verstärkersystem zum Aufnehmen von Nervensignalen zu verbinden, mussten die im Reinraum hergestellten Chips verkapselt werden. Sie wurden in einem Bad mit Aceton und 70 % Ethanol im Verhältnis 1:1 gereinigt. Dadurch sollten noch vorhandene Lackreste von den Elektrodenflächen entfernt werden. Anschließend wurden die Chips mit bidestilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Um die Chips mit dem Träger (*Carrier*) zu verbinden, wurde ein Flip-Chip-Prozess verwendet. Silberkleber (EPO-tek H20, EPOTEK Technologies Inc., Billerica, USA) wurde mit Hilfe einer Kunststoffmaske auf den 64 Metallkontakten des Carriers aufgebracht (Abbildung 9).



*Abbildung 9: Verkapselung von MEAs, a) Schablone und Mikroskop zum Aufbringen von leitfähigem Silberkleber auf die Kontaktstellen; b) Vergrößerung von a*

Die Chips wurden dann mit einem Fineplacer so auf den Carrier übertragen (Abbildung 10), dass ihre Metallanschlüsse (*Bond pads*) genau auf den mit Silberkleber versehenen Metallkontakten des Carriers positioniert waren. Dann wurde der Kleber in einem Ofen bei 150 °C für 1,5 Stunden erhitzt. Anschließend wurde Unterfüllklebstoff mit elektrisch isolierenden Eigenschaften (type Epo-tek U300, EPOTEK Technologies Inc., Billerica, USA)

zwischen die Rückseite des Carriers und den Chip gefüllt und nochmals in 150 °C für eine Stunde ausgehärtet. Nun wurden innerer und äußerer Glasring auf Chip und Carrier angebracht, um später einerseits flüssige Zellsuspensionen einfüllen zu können und andererseits die Zellen räumlich vom potentiell zelltoxischen Unterfüllklebstoff zu trennen. Zum Befestigen wurde PDMS (Typ 96-083, Sylgard, Dow Corning, Midland, USA) als Klebstoff verwendet. Die Carrieroberfläche innerhalb des großen Glasrings wurde zusätzlich mit PDMS beschichtet. Die Aushärtung wurde nochmals bei 150 °C vorgenommen.



*Abbildung 10: VerkapSELUNG von MEAs, Fineplacer zur Übertragung der Chips auf Carrier und für das µCP*

Für das spätere Stempeln wurde der innere Glasring weggelassen. Zusätzlich wurde das Loch im Carrier weiter ausgefeilt, um mehr Platz für das Aufbringen des Stempels auf dem Chip zu haben. Der Spalt zwischen Carrier und Chip wurde mit PDMS abgedichtet.

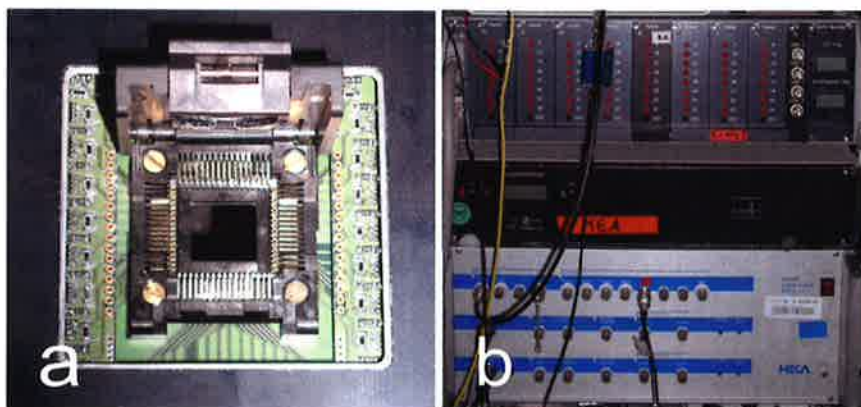
### 2.1.3. Verstärkersystem und Software

Im ICS-8 des Forschungszentrums Jülich wird ein dort gebautes sogenanntes BIOMOL-Verstärkersystem verwendet (siehe Abbildung 11)<sup>92</sup>. Ein Vorverstärker (zusammen mit der Haltevorrichtung (Kontaktierung) für den MEA-Chip (11a) ist mit dem Hauptverstärker (11b) verbunden. Die Elektrolytlösung wurde mit einem chloridierten Silberdraht, der in die Flüssigkeit eintauchte, auf Massepotential gelegt. Über 64 Kanäle wurde parallel mit einer

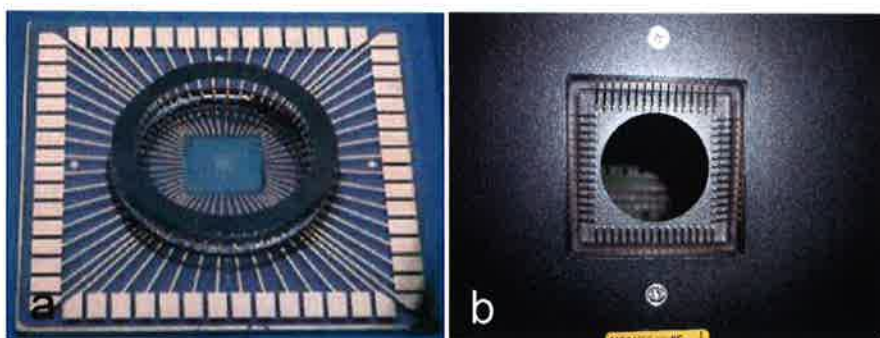
Frequenz von 10 KHz pro Kanal gemessen. Zur Datenaufnahme und -verarbeitung dient die MED 64 Conductor 3.1 Software (Alpha MED Sciences, Japan).

#### 2.1.4. MCS-CHIPS und Verstärker

Bei Multichannelsystems GmbH (Reutlingen, Deutschland) wurden MEAs aus Glas mit 60 planaren Elektroden, die ebenfalls quadratisch angeordnet waren, bestellt. Die Elektroden aus Gold hatten einen Durchmesser von  $30\ \mu\text{m}$  und einen Zwischenelektroden-Abstand von  $200\ \mu\text{m}$  (Abbildung 12). Zur Verringerung der Elektrodenimpedanz waren die Elektrodenoberflächen mit Titannitrit beschichtet. Das Elektroden-Array wurde von einem Glasring umgeben, in welchen die Zellsuspension bzw. das Medium mit einem Volumen von 2 ml pipettiert werden konnten.



*Abbildung 11: a) MEA-Vorverstärker mit Kontaktierer (Klappe geöffnet); b) MEA-Hauptverstärker*



*Abbildung 12: a) MCS-MEA, Goldelektroden  $30\ \mu\text{m}$  Durchmesser,  $200\ \mu\text{m}$  Abstand; b) MCS-Vorverstärker*

## 2.2. Zellkultur

### 2.2.1. Gewinnung von Neuronen aus Rattencortex

Bevor Zellen auf der Chipoberfläche ausgesät werden konnten, um an die Oberfläche anzubinden und dichte Kulturen zu bilden, musste diese mit speziellen Verfahren so beschichtet werden, dass ein Anbinden der Neurone (bzw. der HL1-Zellen in Kontrollexperimenten) und damit eine Kopplung zwischen Zelle und Mikroelektrode ermöglicht wurde. Als Beschichtungssubstanzen dienen in verschiedenen Protokollen ECM (ein Gel, das aus Proteinen neuronaler extrazellulärer Matrix besteht) und PDL bzw. PLL, d.h. polymerisiertes Lysin in zwei isomeren Formen. Die Substanzen können miteinander kombiniert werden. Im ICS wird PECM zur Beschichtung verwendet, d.h. eine Kombination aus ECM Gel (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und PDL (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Im folgenden wurden auch Experimente mit dem IIT durchgeführt, in denen zur adhäsiven Beschichtung der Chips eine Kombination aus Laminin und PLL verwendet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde PECM in bidestilliertem Wasser unter sterilen Verhältnissen im Verhältnis 1:100 in GBSS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) verdünnt. 100 µl wurden in den inneren MEA-Ring pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Chipfläche mit bidestilliertem Wasser gespült.

Im nächsten Schritt konnten nun die Zellen ausgesät werden. Neuronale Zellen wurden aus Gehirnen von Wistar Rattenembryonen präpariert (Schwangerschaftstag 18). Das gesamte embryonale Gehirn wurde entnommen. Die Hemisphären wurden von Hippocampus und Striatum getrennt und in 20 mM HBSS<sup>-</sup>-Lösung (Hanks Balanced Salt Solution Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt, die weder Kalzium- noch Magnesiumionen enthält. Diese Lösung erlaubt die vollständige Dissoziation der neocortikalen Neuronenverbände, die mit Hilfe einer in Gasflamme geglätteten Glaspipette vorgenommen wurde. Die mechanische Auflösung der Hemisphären erfolgte so lange, bis keine festen Kortextbestandteile mehr sichtbar waren. Die Neurone wurden im folgenden Arbeitsschritt von Glia und meningealen Trümmern getrennt, indem die Zellsuspension in 20 mM HBSS<sup>+</sup> (Hanks Balanced Salt Solution Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt wurde. Die

---



HBSS<sup>+</sup>- und HBSS<sup>-</sup>-Lösungen wurden zusätzlich mit Glucose (1 mM), Natriumdihydrogencarbonat (1 mM), Natriumpyruvat (1 mM) sowie mit HEPES (10 mM) angereichert. Der an Neuronen reiche Überstand wurde abpipettiert und in einem Falcontube zwei Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert. Die Flüssigkeit über dem entstandenen Zellpellet wurde entfernt, die Zellen in Neurobasalmedium gelöst. Das Neurobasal-Medium, das während der gesamten Zellkultur verwendet wurde, setzte sich zusammen aus Neurobasal Medium (Neurobasal TM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dem Glutamin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zugesetzt wurde. Supplement B27 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ein weiterer Bestandteil, wurde 1993 entwickelt und enthält 20 in ihrer Konzentration optimierte Zusätze, die das Wachstum von Nervenzellkulturen fördert<sup>93</sup>. Es stellt eine Alternative zu von anderen Arbeitsgruppen verwendetem foetalem Kälberserum (FBS) dar<sup>94</sup>. Um Kontamination durch bakterielle Keime zu verhindern, wird zum Medium noch Gentamicin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) als Breitspektrumantibiotikum hinzugefügt. Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer ermittelt.

### 2.2.2. Aussaat und Inkubation

Auf dem Chip musste eine Zelldichte auf dem Chip erreicht werden, die die Elektroden an der Oberfläche ausreichend bedeckten, aber nicht (wenn sie zu hoch war) zu einem überschießenden Wachstum von Glia führte. Andere Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedliche Konzentrationen zwischen 1000 und 5000 Zellen/mm<sup>2</sup>, um diese optimale Zelldichte auf der Chip-Oberfläche zu erreichen<sup>81,95-97</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Neuronenzahlen experimentiert, die auf dem Chip ausgesät wurden, um ebenfalls eine für unser MEA-System optimale Dichte der Neuronenkultur zu erzielen. Zunächst wurden 25.000 Zellen auf einem Chip ausgesät, wobei der äußere Glasring, wie in Jülich üblich, mit 500 µl Zellsuspension gefüllt wurde. In diesem Volumen verteilten sich demnach die 25.000 Neurone. Im Verlauf wurden 50.000, 75.000 und schließlich 100.000 Zellen auf den Chip aufgebracht. Da auf diesem Wege keine ausreichend dichten Kulturen gezüchtet werden konnten (siehe Resultate), wurde ein Protokoll verwendet, das in Genua eingesetzt wird<sup>82,94,97</sup>. Hierbei wird eine kleine Menge einer Zellsuspension in den inneren

MEA-Ring pipettiert (100  $\mu$ l), für vier Stunden inkubiert bis anschließend das Volumen auf bis zu 700  $\mu$ l aufgefüllt wird. Dieses Vorgehen sollte die konzentrierte Verteilung der Neurone auf der Elektrodenfläche ermöglichen. Dieses Protokoll wurde allerdings in modifizierter Form verwendet; z.B. wurde die PECM-Beschichtung beibehalten und aufgrund der bei uns verwendeten MEAs ein kleineres Volumen für die Zellkultur verwendet (500-700  $\mu$ l im Vergleich zu 1.000  $\mu$ l in Genua). 100  $\mu$ l der Zellsuspension (500 Zellen/ $\mu$ l) wurden in den inneren Ring eines verkapselten MEA-Chips pipettiert, welcher am Tag zuvor mit 1 % PECM beschichtet worden war. Nach der Präparation wurden die Zellen für zehn Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um sich erholen zu können, bevor mit der Verbringung in die veränderte Atmosphäre im Inkubator ein weiterer Stressfaktor auf die Neurone einwirkte. Nach vier Stunden Inkubation (37 °C; 5 % CO<sup>2</sup>) waren die Zellen bereits ausreichend an die Oberfläche adhärirt, und das Volumen des Neurobasalmediums wurde auf ca. 700  $\mu$ l aufgefüllt. Die Inkubation wurde anschließend für 14-21 DIV fortgeführt. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt (ca. 300-400  $\mu$ l). Durch Probleme, die mit diesem Vorgehen auftraten (siehe Resultate), wurde anschließend wieder zum ursprünglichen Protokoll übergegangen. Von nun an wurden 120.000 Zellen in 500  $\mu$ l auf das Substrat aufgetragen, um eine ausreichende Zelldichte zu erreichen.

### 2.2.3. Co-Kulturen

Um besonders in weniger dichten Neuronenkulturen ebenfalls eine ausreichende Konzentration an Wachstumsfaktoren zu haben, die das neuronale Wachstum begünstigen (wie z.B. Fibroblast Growth Factor<sup>98</sup>), wurden auf halben Glasdeckplättchen Co-Kulturen aus Glia und Neuronen gezüchtet, die nach einer Inkubationszeit von circa acht Stunden in das Medium der MEAs gelegt wurden<sup>99,100</sup>. Die Glasplättchen waren ebenfalls nach Hydrophilisierung der Oberfläche (in der Bunsenbrenner-Flamme) mit PECM beschichtet worden.

---

#### 2.2.4. Lebend-Tot-Färbungen

Um die Vitalität der in Kultur wachsenden Neurone quantifizieren zu können, wurde mit der sog. Lebend-Tot-Färbung ein spezielles Färbeverfahren durchgeführt, wobei vitale und bereits abgestorbene Zellen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen gefärbt wurden: Die lebendigen Neurone mit Calcein (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), die toten mit Ethidiumhomodimer<sup>101-103</sup>. Das Prinzip beruht darauf, dass nicht-fluoreszierendes Calcein in Zellen eindringt und von in vitalen Zellen enthaltenen Esterasen in seine fluoreszierende Form umgewandelt wird. Lebendige Zellen leuchten somit im Fluoreszenzlicht grün. Ethidiumhomodimer kann nur die defekten Membranen toter Neurone penetrieren und beginnt nach Bindung an Nukleinsäuren rot zu fluoreszieren.



*Abbildung 13 Fluoreszenz- und DIC-Mikroskop (Apotome, Zeiss AG, Deutschland)*

Nach der Inkubation wurden Calcein und Ethidiumhomodimer in die Medien der zu untersuchenden Neuronenkulturen pipettiert, so dass beide in einer Verdünnung 1:1.000 im Medium enthalten waren. Nach kurzer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur konnten die Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Apotommikroskop Imager Z1 Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die beste Auflösung wurde mit einem Wasseremersionsobjektiv 20facher Vergrößerung (Objectiv WN-Achroplan, Carl-Teiss AG, Oberkochen, Deutschland) erzielt, das in das flüssige Neurobasalmedium eingetaucht wurde.

### 2.2.5. Gliawachstum

Da Neurone unter normalen Umständen den Zellzyklus nicht mehr durchlaufen und in einer genetischen Ruheposition verharren, teilen sie sich nach Abschluss ihrer Differenzierung nicht weiter. Gliazellen jedoch können sich mitotisch teilen<sup>104</sup>. Elektrophysiologische Studien mit MEAs *in vivo* haben gezeigt, dass das Wachstum von Glia die Impedanz einer Elektrode erhöht und sich dadurch negativ auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirkt<sup>105</sup>. Um das Wachstum der Glia bei größtmöglicher Dichte der Neurone zu reduzieren, wurde eine zytotoxische Substanz eingesetzt, die die Mitose der Glia verhindern sollte, ohne die Entwicklung der Neurone zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wird seit langem die Substanz Zytarabin C (ARAC) verwendet, die seit langem erfolgreich zu diesem Zweck verwendet wird<sup>106,107</sup>. Nach 24 Stunden in 1 % NB-Medium, wurden der Neuronenkultur für sechs Stunden AraC hinzugefügt (5 µl einer 20 mM Stocklösung), bevor sie mit NB-Medium gespült, und anschließend in 2 %igem NB-Medium weiter für 14 bis 21 Tage inkubiert wurde.

## 2.3. Verbesserung des Bioelektronischen Interfaces

### 2.3.1. Nanoporen

Um die Signalübertragung von Neuron auf Elektrode zu verbessern, wurde versucht, die Seal-Resistance im Spalt zwischen Elektrode und Zelle mit Nanoporen aus Aluminiumoxid zu erhöhen. Die von Aluminium bedeckten Mikroelektroden wurden in einer speziell angefertigten elektrochemischen Zelle anodisiert, die aus PMMA hergestellt war. Die Anodisierung wurde in 0,3 mol/l Oxalsäure (Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei eine Spannung von 40 Volt zwischen Substrat und Counterelektrode angelegt wurde. Die aktive Oberfläche des mit Aluminium bedeckten Chips, die mit Oxalsäure in Kontakt kam, betrug 0.35 cm<sup>2</sup>. Ein Platinplättchen (0.36 cm<sup>2</sup>) diente als Gegen-Elektrode und wurde in einem Abstand von 2,5 cm zum MEA befestigt. Während des Vorgangs der Anodisierung wurde der Verlauf des Stroms als Kontrollparameter für das Wachstum der Nanoporen aufgezeichnet. Sobald die elektrische Spannung von 40 Volt anlag, stieg der gemessene Strom für einige Minuten an, da die sich entwickelnden Nanoporen die Oberfläche vergrößerten, an der der Elektronentransfer und

---

die Oxidation des Aluminiums stattfanden. Sobald das Gold der planaren Elektroden vom Grund der Poren erreicht wurde, hörte die elektrochemische Reaktion auf und der gemessene Strom fiel ab. Wenn die Stromabnahme sistierte und der Strom ein Plateau erreichte, wurde die anliegende Spannungsquelle abgeschaltet. Nach der Anodisierung wurde der Chip in 5 %iger Phosphorsäure für 35 Minuten bei Raumtemperatur eingelegt (KMF-Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland). Dieser Vorgang sollte die noch vorhandene Barriere aus dünnem Aluminiumoxid am Porengrund entfernen und so einen direkten Kontakt mit den darunterliegenden Goldelektroden herstellen. Vor der Verkapselung des Chips, um ihn für die Zellkultur vorzubereiten, wurde überflüssiges Aluminium, das den Chip noch bedeckte, mit  $\text{HgCl}_2$  in wässriger Lösung entfernt und anschließend das zelltoxische  $\text{HgCl}_2$  für mehrere Stunden in Wasser ausgewaschen. Nach der Anodisierung sollten die Elektroden der verwendeten Chips elektrisch charakterisiert werden. Mit dem Verfahren der Impedanzspektroskopie, wurden die elektrischen Ströme durch die Elektroden gemessen, wenn eine elektrische Wechselspannung in einem Frequenzbereich zwischen 10 Hz und 10 KHz angelegt wurde. Ströme wurden außerdem bei solchen Proben gemessen, bei denen die anodisierte Oberfläche (Nanoporen) mit konzentrierter Kalilauge entfernt worden war und bei Proben mit flachen Goldelektroden derselben Produktionsreihe, von deren Oberfläche das Aluminium ohne eine anschließende Anodisierung mit  $\text{HgCl}_2$  entfernt worden war. Diese Chips dienten als Referenz, um die elektrischen Eigenschaften baugleicher einfacher Mikroelektroden mit denen der Nanoporenchips vergleichen zu können.

### 2.3.2. Senkung der Elektrodenimpedanz mit Platinum-Black

Wie bereits beschrieben, verhält sich die Impedanz der Elektroden invers proportional zu ihrer Kapazität und damit ihrer Oberfläche. Um eine bessere Qualität der Signalüberleitung vom Elektrolyt auf die Elektrode zu erreichen, wurde mit Hilfe eines von Staiger und Desai beschriebenen Verfahrens versucht<sup>108,109</sup>, die Oberfläche der 64 Elektroden eines MEA-Chips zu vergrößern. Zu dem Zweck wurde mittels eines elektrochemischen Verfahrens Platin auf den planaren Elektroden zur Abscheidung gebracht. Bei diesem Verfahren werden Platinionen aus einer Platinchloridlösung

(Hexachloroplatinsäure, Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) an einer bzw. 64 Arbeitselektroden reduziert. Das entstehende elementare Platin setzt sich auf den Elektroden ab und erzeugt dabei Strukturen, die eine hohe Oberfläche haben. Die benötigte Spannung, die zur Reduktion nötig war, wurde von einem Potenziostaten (Electrochemical Analyser, CH-Instruments Inc., Austin TX, USA) erzeugt, der von einer Computersoftware angesteuert wurde. Der Ablauf des Experiments war wie folgt strukturiert.

Die Elektroden des MEA-Chips wurden mit einer Arbeitselektrode verbunden. Eine Referenzelektrode wurde mit einem aktivierten Platindraht verbunden und in die auf den Chip aufgebrachte Platinchlorid-Lösung getaucht. Eine in der Literatur beschriebene Schwierigkeit besteht darin, dass die Schicht elektrochemisch abgeschiedenen Platins gegenüber mechanischen Einflüssen nicht stabil ist und sich teilweise schnell vom Substrat ablöst. Desai et al. verwendeten während der Abscheidung ein Ultraschallbad, um alle instabilen Anteile mechanisch zu entfernen<sup>109</sup>. Wir entwickelten ein Protokoll, das zwischen negativen und positiven Spannungswerten (-0,7 V bis 0,8 V) hin- und herschaltet. So sollten alle instabilen Teile der Abscheidung re-oxidiert werden und nur mechanisch stabile Anteile an der Elektrode haften. Während der elektrochemischen Abscheidung von Platin auf den Goldelektroden wurde der Verlauf des an den Elektroden gemessenen Stromes aufgezeichnet und wurden mikroskopische Aufnahmen von den Elektroden vor und nach der Abscheidung angefertigt.

### 2.3.3. Zellen auf modifizierten Elektroden

Im nächsten Schritt wurde das Wachstumsverhalten von Neuronen auf den modifizierten Oberflächen geprüft. Daher sollte untersucht werden, ob die Zellen eine ebenso dichte Population erzeugen würden, wie vorher auf planaren Goldelektroden, oder ob die Nanoporen und die Platinkristalle die Kultur negativ oder positiv beeinflussen würden. Zunächst wurden Neurone auf der nanoporösen Oberfläche gezüchtet. Zu diesem Zweck wurden anodierte MEAs verkapselt und die oben geschilderte Nervenzellkultur auf den MEAs durchgeführt. Als Kontrolle dienten Kulturen aus HL1-Zellen, benigne Vorhoftumorzellen der Maus, die sich durch schnelle Proliferation sowie elektrophysiologisch durch gut messbare myogene Aktionspotentiale auszeichnen. HL-1

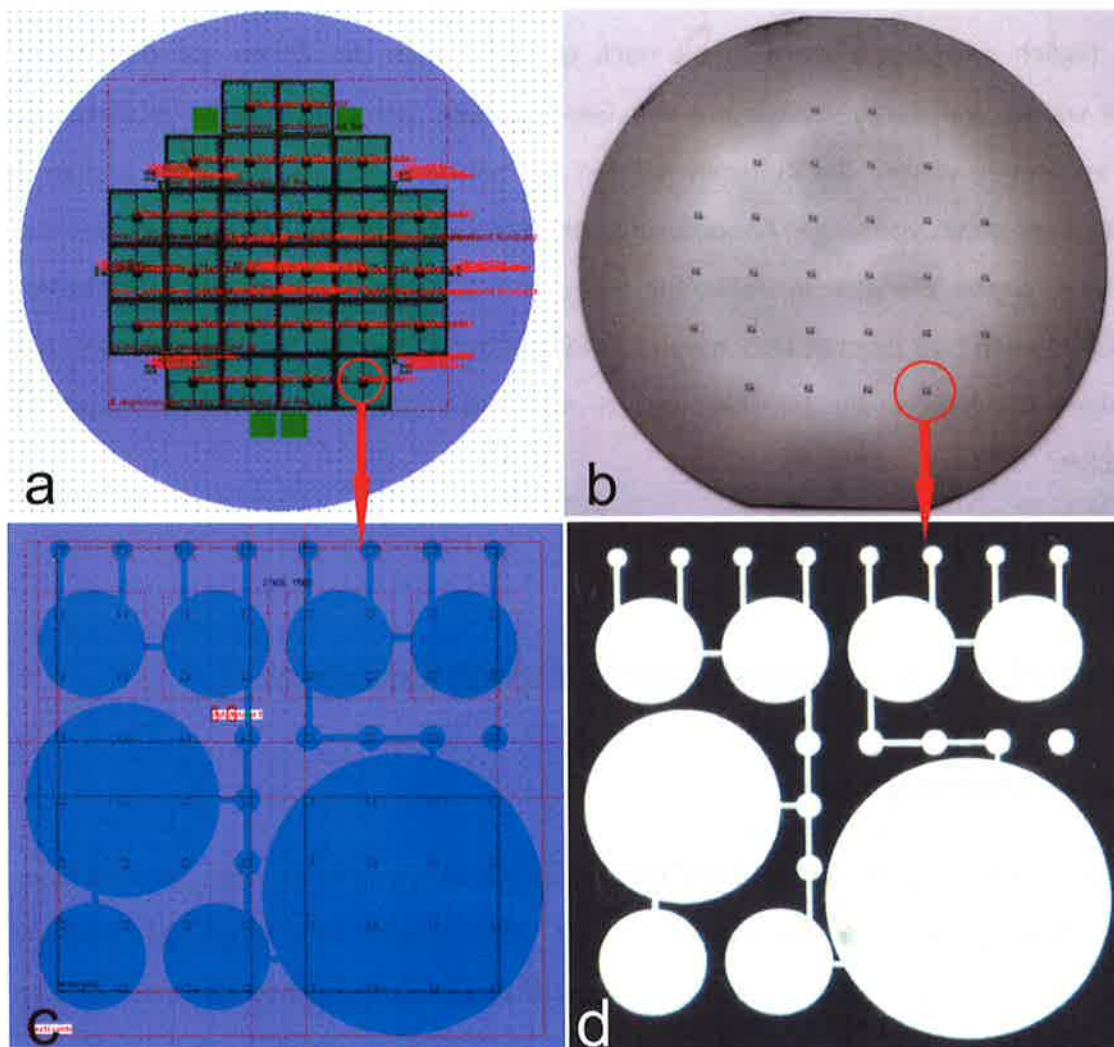
Zellen, die konfluierend in einer Zellkulturflasche gewachsen waren, wurden gesplitted, d.h. mittels Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vom Flaschenboden gelöst und in Einzelzellen aufgetrennt. Nach Zentrifugation bei 1700 UPM, Resuspension in 1 ml HL-Medium und Zellzählung in einer Neubauer-Kammer, konnten Zellen auf den MEAs mit nanoporöser Oberfläche ausplattiert werden. Dazu wurden der Zellsuspension von 4 ml 100 µl entnommen, die in den inneren MEA-Ring pipettiert wurden und nach einer Stunde auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt wurden. Die Chips waren vorher mit Fibronectin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und Gelatine für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet worden. Da HL-1 Zellen zu häufiger mitotischer Teilung fähig sind, musste das Medium der Kulturen täglich gewechselt werden, bis nach ca. 3-4 Tagen die Zellen auf den MEAs konfluent waren und durch Ausbildung von Gap-Junctions untereinander zu elektrischer Aktivität im Stande waren. Die Kulturen wurden mit solchen verglichen, die auf planaren Goldelektroden ohne vorherige Anodisierung im gleichen Zeitraum gewachsen waren. Anschließend wurde die gleiche Zellkultur auf den MEAs mit Platinum-Black-Elektoden durchgeführt. Auch hier dienten unbehandelte Goldelektroden als Referenz. Nach zwei- bis dreiwöchiger Inkubation wurden Messungen mit oben genanntem Verstärkersystem durchgeführt.

## 2.4. Herstellung von neuronalen Subpopulationen

### 2.4.1. Das Maskendesign

Im folgenden Schritt mussten die Stempel hergestellt werden, mit deren Hilfe Agarose bzw. Star-PEG in Form des entwickelten Clusters auf die Siliziumoberflächen übertragen werden sollten. In Abbildung 14 ist der Entwurf einer Wafer-Maske zu sehen. Sie wurde mit Hilfe der Software CleWin (WieWeb Software, Hengelo, Niederlande) geschrieben und diente als Vorlage für die Abformung eines Silizium-Wafers, der mit der Technik der Fotolithographie hergestellt und mir freundlicherweise durch Marko Banzet (Institut für komplexe Systeme, ICS-8, FZ Jülich) zur Verfügung gestellt wurde (siehe Abbildung 14). Hierbei wird ein Silizium-Wafer, der später als Gussform für die Stempel dienen wird, mit einem Fotolack beschichtet. Entsprechend der abzuformenden Struktur wird dieser durch eine Fotomaske belichtet.

Abhängig davon, ob der Stempel später invers oder nicht-invers stempeln soll, verwendet man einen Positivlack (dort, wo das Licht auf den Lack trifft, wird dieser weicher bzw. löslicher im Entwickler) oder einen Negativlack (dort, wo das Licht auf den Lack trifft, härtet dieser durch Quervernetzung aus und wird weniger angreifbar durch einen Entwickler). Ein Entwickler (AZ 326 MIF, Microchemicals GmbH, Ulm, Deutschland) entfernt anschließend nicht-ausgehärteten Lack. Im nächsten Schritt wird der Wafer einem Ätzmittel ausgesetzt, das die Struktur zur Stempelabformung dort in die Oberfläche ätzt, wo sich kein Lack befindet.



**Abbildung 14:** a) Entwurf des Wafers als Stempelvorlage; b) Siliziumwafer als Stempelvorlage; c) Vergrößerung von a; d) Vergrößerung von b



### 2.4.2. Stempel

Die auf dem Wafer prozessierten Strukturen dienten als Negativ für den Abguss der Stempel. Wichtig war hierfür die Wahl eines geeigneten Kunststoffes, der für die Abformung der Stempel geeignet war. Für die Cluster aus Agarose und die ersten Stempel für Star-PEG- $\mu$ CP wurde PDMS als Material für die Stempel verwendet (Sylgard 184, Dow Corning Cooperation, Midland, USA). Um härtere Stempel abformen zu können wurde anschließend der Kunststoff Polyolefin (POP) für weiteres  $\mu$ CP eingesetzt.

#### PDMS

Auf dem Wafer wurde das PDMS ausgegossen, das über Nacht bei 60° Celsius aushärtete und am nächsten Tag vom Wafer abgelöst wurde. Dieser war vorher in einer Glovebox Fluor-silanisiert worden, um ein leichtes Ablösen des PDMS zu ermöglichen<sup>76</sup>. Aus dem PDMS wurden nun die Stempel ebenmäßig herausgeschnitten.

Polydimethylsiloxan ist ein anorganisches Siliziumpolymer (Silikon), welches chemisch inert und ungiftig ist. Es wird vielseitig verwendet, z.B. als Arzneimittel und als Gleitstoff. In der Bioelektronik ist es ein etabliertes und oft verwendetes Material, z.B. für die Herstellung von Stempeln für das  $\mu$ CP<sup>110,111</sup>. Es kann leicht in Plasma oder Schwefelsäure gelöst hydrophilisiert werden. Vor dem eigentlichen Stempelvorgang wurden die Siliziumchips mit 3-Aminopropyl-Triethoxysilan (APTES) beschichtet, einem speziellen Aminosilan, das die kovalente Bindung des Star-PEGs auf der Siliziumoberfläche durch Bindung an die Aminogruppen des Silans möglich machte. Diese Silanisierung wurde in einem Exikkator bei 5 mbar Atmosphären-Druck durchgeführt. Durch die funktionellen Gruppen des Silans können auch Proteine und Zellen an die Oberfläche adhären; innerhalb der Kreiskammern des Clusters (in denen sich kein Star-PEG befinden würde) sollten Neurone an die Silan-beschichtete Oberfläche binden<sup>87</sup>. Auf Stempeln, deren Oberfläche nicht hydrophil genug war, konnte sich die wässrige Star-PEG Lösung erfahrungsgemäß nicht gleichmäßig verteilen (Rinklin, unveröffentlicht). Stattdessen kam es zu Tröpfchenbildung auf den Stempeln, die zu körniger und unzusammenhängender Benetzung mit Star-PEG führte.

## POP

Polyolefin-Plastomer (POP) ist ein robuster Kunststoff, der durch Polymerisation von Alkenen entsteht und ebenfalls besonders in Technik und Forschung vielseitig einsetzbar ist <sup>112</sup>. Es ist im ausgehärteten Zustand deutlich härter als PDMS. Die Abformung der POP-Stempel erfolgte anders als bei PDMS-Stempeln. POP ist bei Zimmertemperatur fest, kann also nicht ausgegossen werden. Die Grundsubstanz wurde zwischen dem Wafer, der das Negativ der auf das POP zu übertragenden Struktur auf seiner Oberfläche trug, und einem silanisierten Siliziumoxid-Wafer in eine Presse (engl. Nano-Imprinter) eingespannt. Unter hohem Druck und bei einer Temperatur von 90 °C wurde das flüssige POP in das Stempeldesign auf dem Wafer gepresst. Nach anschließender Aushärtung des POP bei Raumtemperatur konnte das POP von Wafer und Silizium-Platte getrennt werden <sup>113</sup>. Die Einzelstempel mussten im Folgenden mit einer Schere aus der POP-Platte herausgetrennt werden.

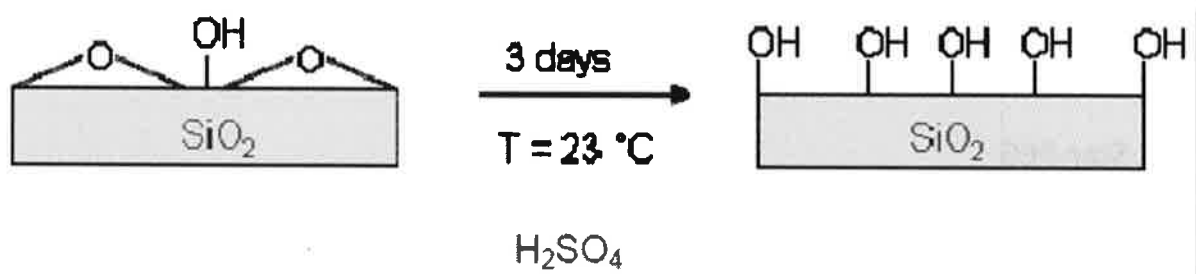
### 2.4.3. Aktivierung der Stempel

In der Literatur werden verschiedene Verfahren beschrieben, um Oberflächen zu aktivieren bzw. hydrophiler zu machen und damit eine gleichmäßige Adhäsion und Verteilung von Substanzen auf der Oberfläche zu ermöglichen.



*Abbildung 15: Plasmaofen zur Aktivierung von Oberflächen*

Typischerweise wird in Argon-/Sauerstoffplasma aktiviert<sup>114,115</sup> (s. Abbildung 15). Hier entstehen durch Elektronen, die im Feinvakuum aus einer erhitzten Kathode in Richtung Anode austreten, reaktive Sauerstoffradikale. Diese binden an die Oberfläche und bewirken die Bildung von polaren Hydroxylgruppen an der Oberfläche. Dabei wird die Oberflächenenergie erhöht. Daneben können Säuren, wie z.B. Schwefelsäure oder Salpetersäure zur Hydrophilisierung eingesetzt werden<sup>114,116</sup> (Abbildung 16). Bei der Bestrahlung mit UV-Licht entsteht Ozon an der Oberfläche, welches ebenfalls aktivierend wirkt<sup>117,118</sup>.



**Abbildung 16:** Aktivierung einer Siliziumoxid-Oberfläche in Schwefelsäure durch die chemische Bereitstellung von Hydroxy-Gruppen auf der Oberfläche (Rinklin, FZI, ICS8, unveröffentlicht)

#### 2.4.4. Verarbeitung der Agarose

Um 2 % Agaroselösung herzustellen, wurden 0,5 g Agarosepulver (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 25 ml MilliQ-Wasser bei einer Temperatur von 90 °C unter ständigem Umschwenken aufgelöst. Zunächst wurde in in Kontrollexperimenten die zellabweisende Eigenschaft der Agarose verifiziert. Zum Abformen der gewünschten Struktur wurden PDMS-Stempel mit der erstellten Struktur im Sauerstoffplasma (für 6 Min bei 80 Watt Leistung und einem Millibar Sauerstoffdruck) hydrophilisiert und im ersten Schritt auf einer silanisierten Glasoberfläche positioniert. Hierbei musste die Oberfläche mit der Struktur nach unten platziert werden, damit die Agarose unter den Stempel und um die Kammern herum gelangen konnte, um dort auszuhärten. Das Glasplättchen bzw. die verkapselten MEAs waren vorher ebenfalls in Sauerstoffplasma hydrophilisiert worden (6 Min, 30 Watt, 1 mbar Sauerstoffdruck). Die Aktivierung sollte die Adhäsion der flüssigen Agaroselösung an Glas und Stempel erleichtern,

um eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Agarose unter dem Stempel zu gewährleisten. Die bei 80 °C flüssige Agarose wurde mit einer Pipette von zwei Seiten des Stempels auf das Glasplättchen aufgebracht. So sollte gewährleistet sein, dass die Luft unter dem Stempel, verdrängt durch die eindringende Agarose, entweichen konnte. Erst im nächsten Schritt wurde der Stempel exakt ausgerichtet auf ein Multielektrodenarray gebracht und hier die Unterfüllung des Stempels wiederholt. In einem zweiten Ansatz, entsprechend Morigchi, 2004<sup>33</sup>, wurde ein Tropfen der Agarose auf die Glasoberfläche pipettiert und anschließend wurde der Stempel mit der strukturierten Oberfläche in die Agarose hineingedrückt. Die Agarose härtete wie oben beschrieben aus, der Stempel wurde abgenommen und der entstandene Abdruck lichtmikroskopisch untersucht.

#### 2.4.5. Star-PEG

Zunächst wurden PDMS-Stempel (184, Sylgard, Dow Corning, Midland, USA) verwendet. Die Stempel (entsprechend Rinklins Protokoll) wurden für eine Minute in 30 % Schwefelsäure gebracht und anschließend gründlich mit entmineralisiertem Wasser (MilliQ-Wasser) gespült. Ein Tropfen Star-PEG-Tinte wurde auf die aktivierten Stempeloberflächen aufgetragen und der überschüssige Tintenrest nach 15 minütiger Inkubation mit 6500 UPM 40 sec. lang abzentrifugiert. Die Stempel wurden mit Hilfe eines Fineplacers auf die Substrate übertragen. Von dem Zeitpunkt an wurden Stempel aus POP für die Übertragung der Star-PEG-Cluster benutzt. Nach jeder Anwendung wurden die Stempel in Helmanex (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) und Ultraschallbad für zwei Stunden gereinigt, um anschließend wiederverwendet zu werden. Um die Star-PEG-Tinte effizient vom Stempel auf das Substrat zu übertragen, war es wichtig, dass die Tinte gleichmäßig auf der Stempeloberfläche verteilt war. Dies sollte dadurch gewährleistet werden, dass die Stempeloberfläche durch Hydroxylgruppen aktiviert und dadurch für Bindungen zugänglich gemacht werden konnte. Um die optimale Prozedur zur Aktivierung der Oberflächen herauszufinden wurden nacheinander Versuche mit Sauerstoffplasma und Schwefelsäure unter Veränderung von Parametern wie Expositionszeit und Säurekonzentration bzw. Sauerstoffdruck durchgeführt. Um quantifizieren zu können, wie stark hydrophil eine Oberfläche ist, besonders nachdem sie in Säure oder Sauerstoffplasma aktiviert worden ist,

---

---

wurde ein Kontaktwinkelmessgerät (Contact Angle OCA, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) verwendet. Über einen Tropfen Wasser definierten Volumens, der auf die zu verwendende Stempeloberfläche aufgebracht wurde, konnte je nach Hydrophilie des Stempels und der damit verbundenen Tropfenform der Kontaktwinkel zwischen Tropfen und Oberfläche berechnet werden. Dieser Kontaktwinkel ist umgekehrt proportional zur Hydrophilie des Stempels und kann Aufschluss darüber geben, ob die Aktivierung zu stark oder zu schwach war. Aus Kontaktwinkelmessungen auf optimal aktivierten PDMS-Stempeln war ein erstrebenswerter Kontaktwinkel zwischen 60 ° und 90 ° bekannt, der auch auf dem POP erreicht werden sollte. Zunächst wurden die Aktivierungen im Sauerstoffplasma durchgeführt. Die Parameter wurden nach jeder Aktivierung mit darauf folgender Kontaktwinkelmessung verändert. Um das Spektrum der Parameter vollständig auszuschöpfen (also von intensiver bis zu geringer Aktivierung), wurde mit hoher Leistung (200 Watt), hohem Sauerstoffdruck (2 mbar) und langer Expositionsdauer (16 Min) im Plasma begonnen. Diese Parameter wurden dann einzeln nacheinander herunter reguliert, solange die Oberflächenhydrophilie zu hoch war. Nachdem die Aktivierung auch bei schwach gewählten Parametern (10 Watt Leistung, 0,3 mbar Sauerstoffdruck, 10 Sec Expositionsdauer) zu stark war (siehe Resultate), wurde im nächsten Schritt mit Schwefelsäure unterschiedlicher Konzentration aktiviert. Auch hier wurde begonnen, die Stempel in 98 % Säure und für zwei Minuten zu inkubieren, die Konzentration (jeweils um 10 % Vol.) und die Einwirkzeit (auf 20 Sekunden) wurden sukzessive reduziert. Erst im dritten Schritt wurden die Stempel im inaktivierten Zustand belassen und die Hydrophilie der Oberfläche ohne vorherige Hydroxylierung gemessen. Nach jeder Kontaktwinkelmessung wurde ein Tropfen der vorbereiteten Star-PEG-Tinte auf den aktivierten Stempel aufgetragen und die Stempeloberfläche auf dem Substrat mittels eines Fineplacers positioniert. Als Substrate wurden zunächst silanisierte reine Silizium/Siliziumoxid-Chips verwendet, die keine Elektroden besaßen. Anschließend wurden die Stempel auf MEA-Oberflächen übertragen. Um die Tinte herzustellen, wurde das Star-PEG-Polymer in trockenem Tetrahydrofuran (THF, Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für eine fünfminütige Präpolymerisation wurde Milli-Q-Wasser im Verhältnis 1:5 hinzugegeben und die Lösung auf Eis gestellt. Auf den in Schwefelsäure aktivierten Stempeln wurde nun jeweils ein Tropfen der in Wasser verdünnten Star-PEG-Tinte verteilt und die Tropfen für 15 Minuten an die Stempeloberfläche zur Adhäsion und Kreuzreaktion belassen. Überflüssiges

---

Star-PEG wurde anschließend mit einem Spin-Coater (6500Upm, 40 Sekunden) abzentrifugiert. Mit Hilfe eines Fineplacers wurden die bedeckten Stempel auf die mit APTES silanisierten Chips gesetzt und vorsichtig unter Verwendung einer Waage angedrückt.

#### **2.4.6. Zellen auf APTES**

Zu diesem Zweck wurden zunächst nach dem gleichen Prinzip wie bei den vorherigen Kulturen Neurone auf den bestempelten Silizium/Siliziumoxid-Chips ausgesät, also vorerst nicht auf verkapselten MEAs. Diese wurden sechs Tage bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Zur Überprüfung der Vitalität der Neurone wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein/Ethidiumhomodimer durchgeführt und eine Bildgebung mittels DIC-Lichtmikroskopie sowie mit Fluoreszenzmikroskopie gemacht. Im nächsten Schritt wurden die verkapselten MEAs verwendet, die vorher mit der Star-PEG-Struktur bestempelt worden waren. Die Elektroden waren mit Platin elektrochemisch beschichtet worden. Neurone wurden in der Dichte von 120.000 Zellen pro Chip ausgesät und für drei Wochen inkubiert, genaues Protokoll siehe Zellkultur.

#### **2.4.7. Verbesserung des Zell-Oberflächenkontakts mit PECM**

Es bestanden vier Optionen, um zu erreichen, dass die Neurone fester an die Oberfläche binden konnten, als es für reine APTES-Oberflächen zu erwarten war:

Erstens konnte man nachträglich (nach dem Stempeln) ein sogenanntes Backfilling durchführen, d.h. die gesamte Oberfläche (inklusive des Star-PEG-Clusters) mit PECM beschichten, wobei das Protein nicht an das auspolymerisierte Star-PEG binden können sollte.

Zweitens war es möglich, eine zusammenhängende Schicht von Star-PEG im noch frischen, d.h. nicht-polymerisierten Zustand mit Protein nicht-invers zu bestempeln und beide (Star-PEG und Protein) kovalent aneinander bindend aushärten bzw. zu Ende polymerisieren zu lassen. Hierbei wurden keine inversen Star-PEG Stempel, sondern nur nicht-inverse Stempel mit PECM-Beschichtung benötigt.

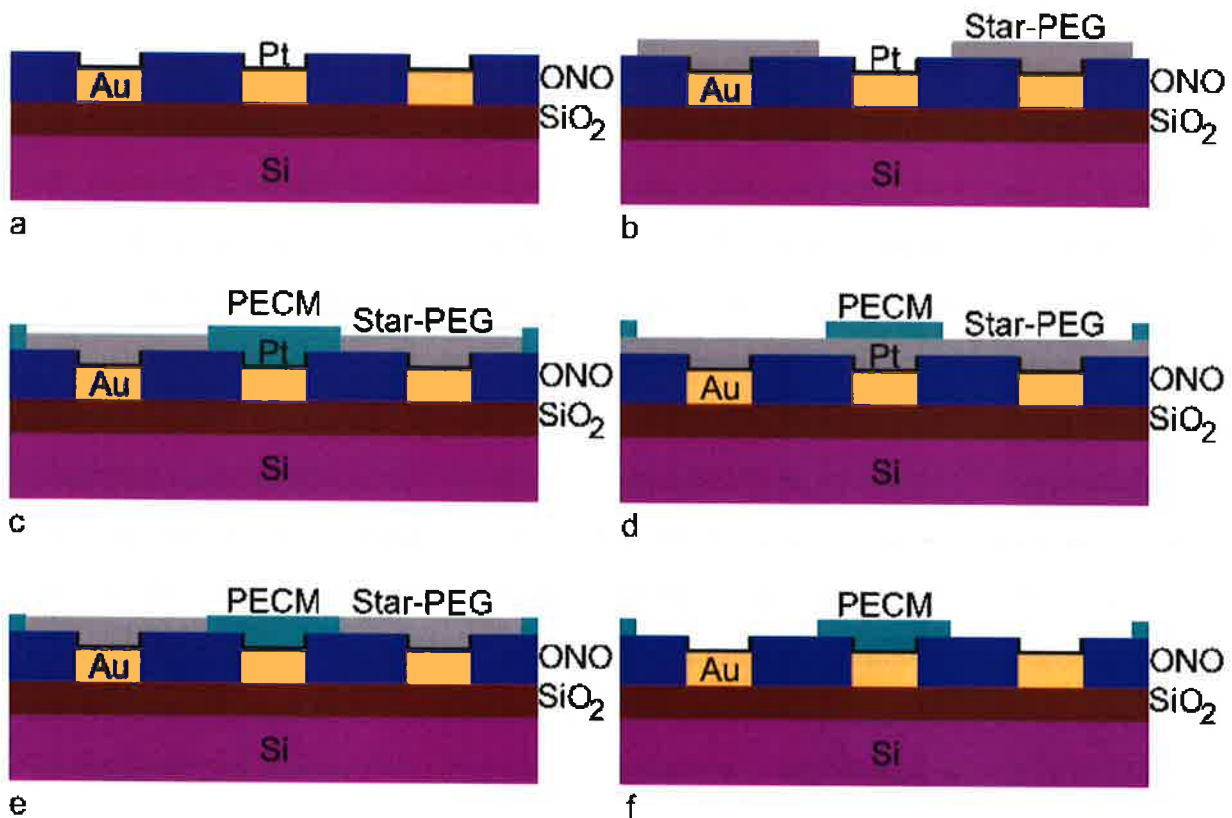
---

Die dritte Option war ein Doppelstempelexperiment, d.h. nach dem inversen Stempeln mit Star-PEG nicht-invers die Kammern und Kanäle dazwischen nochmals mit PECM nachzustempeln.

Viertens, als Kontrolle konzipiert, wurde auf eine zellaversive Substanz wie Star-PEG verzichtet und ein Cluster direkt aus PECM auf eine präaktivierte Oberfläche übertragen. In Abbildung 41 sind die vier Ansätze dargestellt, die nachfolgend nacheinander getestet wurden.

### *Backfilling* mit Proteinen

Beim *Backfilling* wird auf die Oberfläche des Substrats (aus APTES und Star-PEG) ein Protein aufgebracht, das selektiv die Bindung an protein-aversiven Substanzen wie z.B. Star-PEG meidet und nur an proteinfreundliche Areale der Oberfläche bindet (z.B. Hexadecanethiol<sup>119</sup>, APTES<sup>87,90,120</sup>). In der vorliegenden Arbeit handelte es sich bei dem Protein einerseits um



**Abbildung 17:** *Herstellungsweg zu einem MEA mit Neuronencluster; a)+b) Reinraumprozesse, Platindeposition und Bestempelung mit Star-PEG; c) Backfilling mit Protein (erwünschtes Ergebnis); d) nicht-inverses Stempeln von PECM auf homogene Star-PEG-Schicht; e) Doppelstempel, PECM in vorher übertragenes Cluster aus Star-PEG; f) PECM-Cluster ohne Star-PEG*

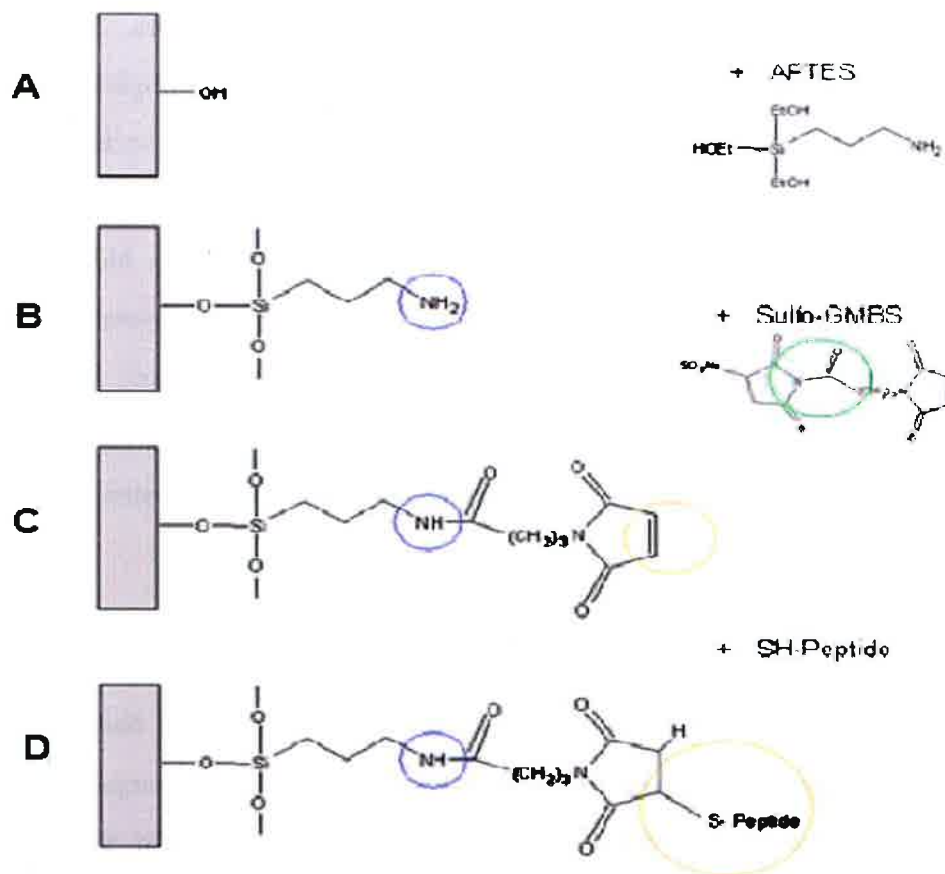
PECM und andererseits im Vergleich dazu um Laminin/PDL, wie es im IIT in Genua zur Oberflächenbeschichtung von MEAs verwendet wird. Das Protein sollte dabei den Grenzen der Clusterstrukturierung folgen und ausschließlich kovalent an die Aminogruppen des APTES innerhalb der Kreise binden. Einmal an das APTES innerhalb der Kreise gebunden, sollte es eine stärkere Adhäsion der Zellen an die mit Protein beschichtete Oberfläche bewirken, als es auf reinem APTES der Fall war. Nachdem die Chips mit dem Cluster aus Star-PEG eine Nacht in Wasser zur Polymerisation verblieben und am nächsten Tag getrocknet worden waren, wurden die Chips für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 % PECM-Lösung (FITC-markiert) inkubiert. Die Proben wurden während dessen vor direkter Lichteinwirkung geschützt, um eine vorzeitige Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben mehrmals mit sterilem entmineralisiertem Wasser gespült, um Reste des Proteins besonders von der Star-PEG-Struktur abzuwaschen.

#### **Crosslinking mit Sulfo-GMBS**

Um Proteine noch stärker (kovalent) mit der Substratoberfläche zu verbinden, werden sogenannte Kreuzverknüpfher (*engl. Crosslinker*), wie z.B. Sulfo-GMBS oder Glutaraldehyd verwendet<sup>121</sup>. Das Prinzip beruht darauf, dass Aminogruppen-enthaltende Substanzen (im Falle dieser Arbeit Aminogruppen von APTES) und Sulfhydrylgruppen-enthaltende Moleküle (z.B. Cystin im Proteingemisch) über ein weiteres Molekül quervernetzt werden (Abbildung 18). Der N-[maleimidobutyryloxy]-succimid-Ester bindet mit seiner Succimid-Ester-Gruppe an die Aminogruppe des Silans und mit seiner Maleimido-Gruppe an die Thiolgruppe der Aminosäure Cystin<sup>122</sup>. Sulfoniert ist GMBS auch wasserlöslich. Entsprechend eines Protokolls von Adamiak (FZJ) das pulverförmige Sulfo-GMBS (Dojindo Laboratories, Japan) in einer Konzentration von 1 mM in einer PH-Pufferlösung (pH 8,2) gelöst und in 100 µl der Lösung auf die Substrate (MEA-Chips und Silizium-Chips) aufgebracht. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Substrate einmal mit PB 8,2 und zweimal mit bi-distilliertem Wasser gespült. Die Chips wurden im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet, anschließend die übliche Rückfüllung mit PECM (FITC-markiert) durchgeführt.

---





**Abbildung 18:** Kreuzverknüpfung von Protein und Silan über den Crosslinker GMBS; A: Ein Aminosilan bindet an die hydroxylierte Oberfläche, B+C: GMBS bindet mit seiner Succimidestergruppe an die Aminogruppe des Silans, D: die Malmeidogruppe bindet an die funktionelle Gruppe des Proteins (Adamiak, FZJ, unveröffentlicht)

### PECM auf homogener Star-PEG-Schicht

Um eine scharfe Abgrenzung zwischen dem Protein innerhalb der Kreisstrukturen und dem umgebenden Star-PEG zu erreichen, kann das Protein auf das noch nicht polymerisierte Star-PEG gestempelt werden. Dazu wurden nicht-inverse POP-Stempel der zu übertragenden Struktur mit PECM (FITC-markiert) beschichtet. Die Stempeloberfläche wurde dafür zehn Minuten in 1 % PECM-Lösung inkubiert und vorsichtig in einem Luftstrom getrocknet. Auf in Schutzatmosphäre silanisierte Siliziumchips wurde ein Tropfen Star-PEG-Tinte (Mischung 1:5 mit entmineralisiertem Wasser) gegeben, der nach oben geschilderten Protokollen sieben Minuten einwirken gelassen wurde, um ihn dann bei 2500 UPM, 40 Sekunden im Spincoater abzuzentrifugieren und zwei Stunden trocknen bzw. polymerisieren zu lassen. Auf das noch

frische Star-PEG stempelte ich anschließend das PECM mit Hilfe des Fineplacers. Star-PEG und Protein reagierten 20 Minuten miteinander, dann wurden die Stempel abgenommen. Um möglicherweise eine bessere Übertragung des PECMs auf die MEA-Oberfläche zu erreichen, wurde vor der Inkubation mit PECM als Tinte ein weiterer Schritt eingefügt. Die Stempel wurden für fünf Minuten in 10 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gelegt, anschließend überschüssiges SDS mit sterilem entmineralisiertem Wasser abgespült und der Stempel im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Anschließend wurde er in der Protein-Tinte für 20 Min. inkubiert. Das SDS sollte eine moderat-höhere Hydrophilie der Stempeloberfläche erzielen und eine größere Menge des Proteins zur Adhäsion an den Stempel befähigen.

#### **Doppelstempelexperiment mit inversen und nicht inversen Stempeln**

Da nicht bekannt ist, wie die homogene Star-PEG-Schicht die extrazellulären Ableitungen aus den Neuronen beeinflussen wird, wurde zusätzlich mit einer Doppelstempeltechnik experimentiert. Hierbei wurde zuerst mit Star-PEG das Cluster invers nach der oben beschriebenen Technik auf die Chips (Siliziumoxid und MEAs) übertragen. Anschließend wurde das Cluster mit PECM nicht-invers in die kreisrunden Aussparungen im Star-PEG übertragen. Um den Stempel mit PECM genau nach der Struktur aus Star-PEG auszurichten, wurde ein Fineplacer verwendet.

#### **Zellen auf reinem PECM**

Als Kontrolle wurden abschließend Experimente ohne eine zellaversive Substanz (Star-PEG) durchgeführt; hier wurde PECM (FITC-markiert) auf aktivierte Silizium-Chips gestempelt. Im nächsten Schritt wurde das Experiment auf MEA-Chips wiederholt. Dazu wurden - anders als bei der Übertragung von Star-PEG - nicht-inverse Stempel verwendet, da das Protein das Cluster darstellen sollte. Nach jedem oben beschriebenen Ansatz wurde eine Kontrolle der Übertragungsqualität des Proteinclusters auf den Chip mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt und anschließend Neurone in der üblichen Dichte ausgesät.

---

### 2.4.8. Antikörper-Fluoreszenz-Färbung

Um Gliazellen von Neuronen in den Kulturen zu unterscheiden, besonders wenn sie dicht gewachsen sind, und die Qualität der elektrischen Aktivität im Netzwerk abschätzen zu können, ist es erforderlich eine spezifische Färbung der unterschiedlichen Zelltypen mittels Antikörpern durchzuführen. An Strukturen von Gliazellen bindet der Antikörper Anti-GFAP, der gegen Intermediärfilament-Proteine in Astrozyten gerichtet ist. Neurone werden z.B. durch Anti-MAP2, ein Protein in neuronalen Mikrotubuli, markiert<sup>20,123-128</sup>. Die Erstantikörper entstammen zwei unterschiedlichen Tierarten (in diesem Fall Maus und Kaninchen). Um die Zellen anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie darstellen zu können, werden Zweitantikörper eingesetzt, die mit Farbstoffen verschiedener Wellenlängen beladen und gegen die Erstantikörper (jeweils einer Tierart) gerichtet sind. Nach mehrmaligem Waschen der zu untersuchenden Proben (Silizium-Chips nach 10 bzw. 14 DIV) mit PBS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden die freien Antigenstrukturen auf der Zelloberfläche mit Serum (Pferde Serum HKS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) über Nacht bei 4 °C blockiert, um eine spezifischere Bindung der eingesetzten Primärantikörper zu erreichen. Im nächsten Schritt wurde das Substrat für 15 Minuten mit Triton X bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert, um eine Membran-Durchlässigkeit für die Antikörper zu erzielen. Der Chip wurde anschließend für 90 Minuten in 25 µl der Antikörpersuspension (Anti-GFAP (Kaninchen), Verdünnung 1:200; Anti-MAP2 (Maus), Verdünnung 1:500; Millipore, Billerica, MA, USA) in Dunkelheit und feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach erneuter Waschung in PBS wurde der Vorgang für 30 Minuten mit den Zweitantikörpern wiederholt. Nach Verkapselung des Chips auf einem Objektträger mittels Mounting Medium (Dako Inc., Carpinteria, CA, USA) konnte die Probe lichtmikroskopisch untersucht werden.

### 2.4.9. Messungen mit Atomic Force Microscopy (AFM)

Um die Schichtdicke des auf die Oberfläche aufgebracht Proteins zu untersuchen wurde ein *Atomic Force Microscope* (AFM Multimode 5, Nanoscope Controller, Bruker AXS, Santa Barbara, CA, USA) verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die Schichtdicke während der

Kultur in Neurobasalmedium in Abwesenheit von Zellen durch thermodynamische Prozesse abnehmen würde, ob die Verwendung verschiedener Proteingemische die kovalente Bindung an Star-PEG/APTES verstärken kann und wie Neurone an Protein-Oberflächen unterschiedlicher Ladung binden würden. Es wurde ECM-Gel verwendet, das erstens mit Polylysin (1:100 in GBSS), zweitens mit Polyarginin und drittens mit Polyglutamat gemischt wurde. Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Glia-Zellen auf Proteinen verschiedener Ladungen wurde die Protein-Schicht kurz nach dem Stempelvorgang mit einem AFM geprüft. Nach anschließenden zehn Tagen in Kulturmedium (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Kulturen dem Medium entnommen, in sterilem bidestilliertem Wasser gereinigt, getrocknet und dann erneut mit einem AFM mikroskopiert. Parallel dazu wurden auf Silizium-Chips mit Clustern unterschiedlicher Proteine Zellkulturen angelegt, die nach 10 – 14 Tagen lichtmikroskopisch untersucht wurden.

#### 2.4.10. Kalzium-Imaging

Für das Kalzium-Imaging wurde eine hochauflösende Kamera (ImageEM Enhanced, Model C9100-13, Hamamatsu K.K., Hamamatsu-Stadt, Japan) und eine bildverarbeitende Software (Hokawo Imaging Software, Hamamatsu K.K., Hamamatsu-Stadt, Japan) verwendet. Der Fluo-4-Farbstoff (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde in sterilem DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst. Der Farbstoff wurde anschließend in einer Konzentration von 1 mg/l in eine Petrischale pipettiert, die den zu untersuchenden Chip (Neuronenkultur nach verschiedenen Tagen *in vitro*) in 3 ml Neurobasalmedium enthielt. Zum Vergleich wurden Chips mit Kulturen nach 10 *DIV*, nach 16 *DIV* und nach 21 *DIV* verwendet. Beide Clusterformen (mit und ohne Verbindungskanäle) wurden verwendet. Zur Kontrolle wurden Neuronenkulturen auf homogenem PECM auf Glas verwendet (ausgesät in gleicher Konzentration wie auf den Chips mit Cluster). Diese wurden ebenfalls nach 10, 16 und 21 *DIV* mit Fluo-4-Farbstoff inkubiert, um sie anschließend zu untersuchen. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Untersuchung mit Fluoreszenzlicht (488 nm) durchgeführt. Aufgezeichnet wurden Filmsequenzen von 1 min. Länge. Zunächst betrachtete ich Kulturen, die nicht mit Stimulanzen behandelt worden waren. Im nächsten Schritt wurden 3 µl 10 mM Glutamat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in das Medium der

---

Hälfte der Kulturen pipettiert und erhöhte die Konzentration bei ausbleibender Netzwerk-Aktivität alle fünf Minuten. Parallel dazu wurden ca. 3  $\mu$ l 16  $\mu$ M Bicuculline - Methiodid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in die andere Hälfte der Petrischalen mit Neuronen-Kulturen pipettiert. Schließlich wurden beide Stoffe in den Medien kombiniert. Für jedes Experiment wurden die fluoreszierenden Neuronen beobachtet und geprüft, ob eine elektrische Aktivität durch Veränderungen in der Intensität der Fluoreszenz festzustellen war.

---

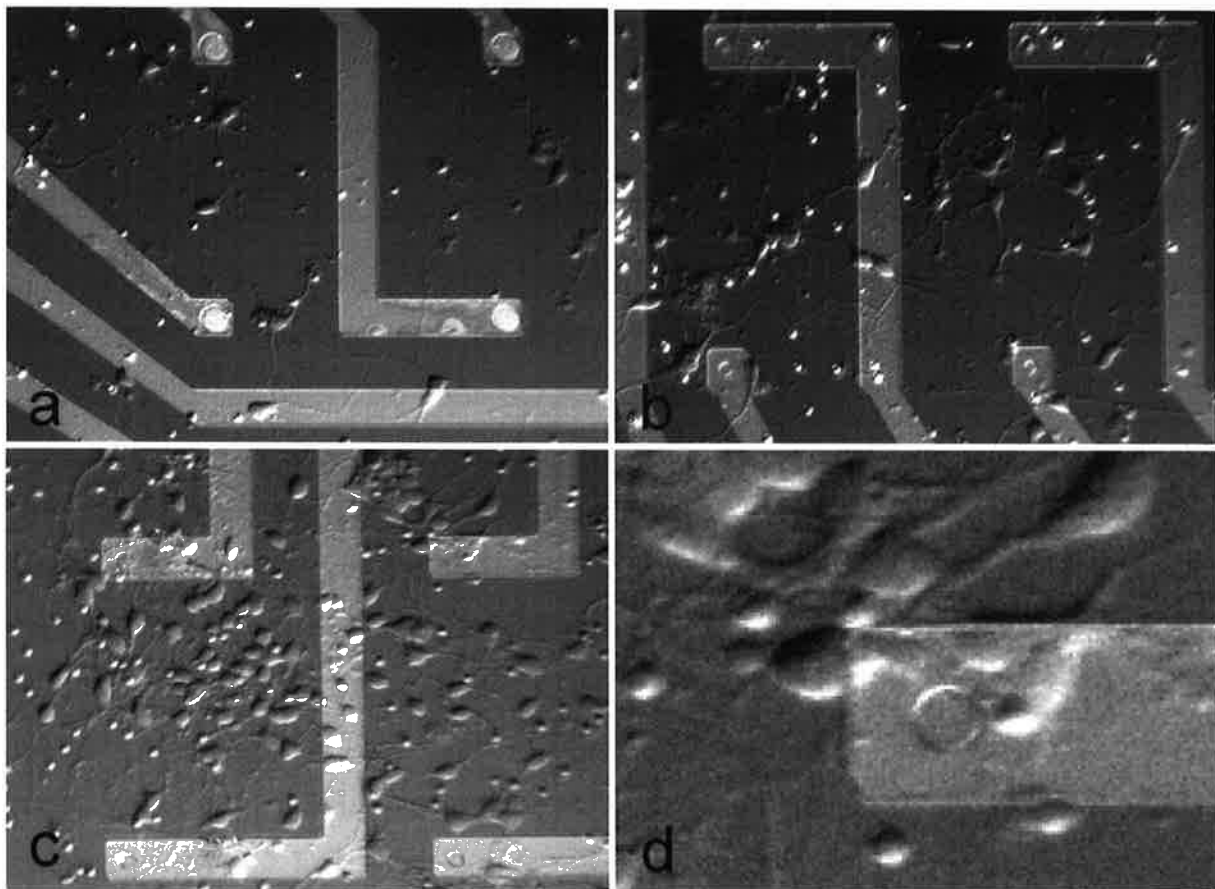


## 3. Ergebnisse

### 3.1. Zellkultur

#### 3.1.1. Zellwachstum

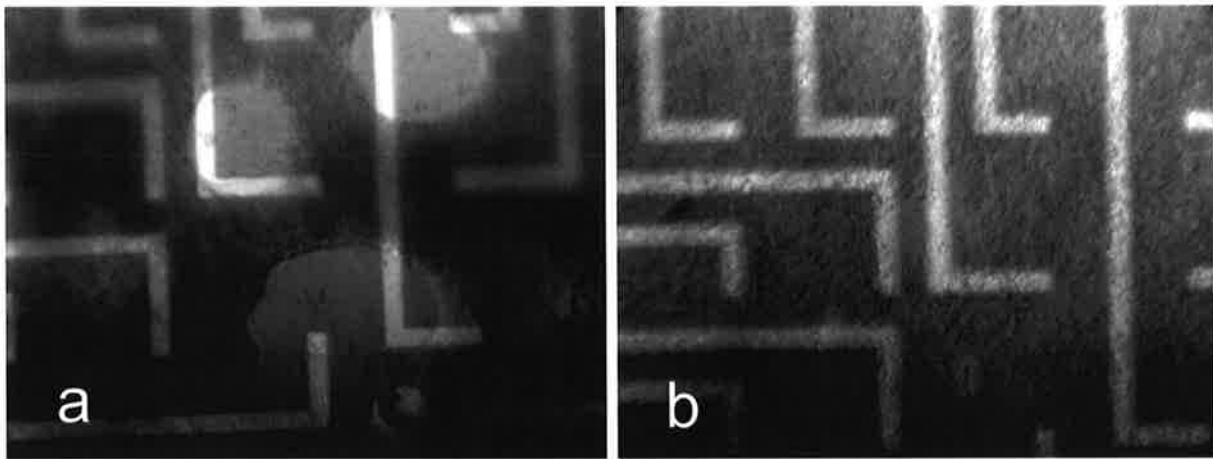
Abbildung 19 zeigt die ersten Zellkulturen, auf denen Zellmengen von 25.000 – 120.000 im großen MEA-Ring ausgesät worden waren. Man sieht, dass sie nicht dicht genug sind, um ausreichend viele Elektroden abzudecken.



**Abbildung 19:** Neuronenkulturen auf MEAs mit unterschiedlichen Zelldichten nach 3 DIV, es sind vier Elektroden zu erkennen; a) 25.000 Zellen/MEA; b) 50.000 Zellen/MEA; c) 75.000 Zellen/MEA; d) Vergrößerung von c), trotz der Nähe einzelner Neurone zur Elektrode ist diese unbedeckt

Bei höheren Zelldichten ab 150.000 Zellen pro MEA begann die Kultur sich weiter zu verdichten. Nach nur 14 Tagen *in vitro* hatte sich über den Elektroden ein dichter Zellrasen aus mehreren Schichten von Zellen gebildet, so dass Einzelzellen nicht mehr zu

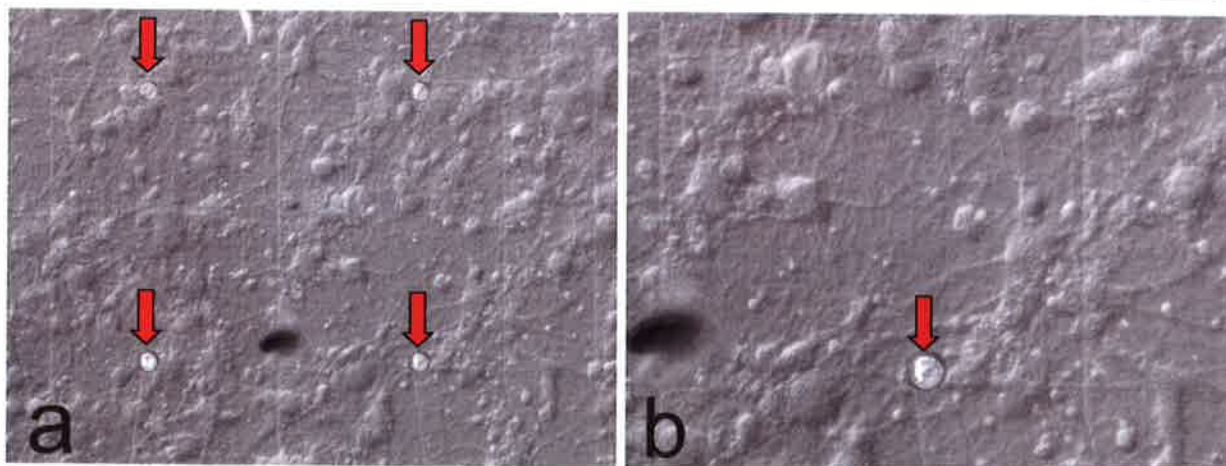
unterscheiden waren. In einigen Fällen bildeten sich kreisrunde Aussparungen in dieser Zellschicht aus, die bis auf die MEA-Oberfläche herunterreichten (Abbildung 20a).



**Abbildung 20:** Neuronenkultur nach 14 DIV, a) in der konfluierenden Zellschicht aus Neuronen und Glia sind durch Minderversorgung der Zellen Löcher entstanden, b) geschlossene mehrlagige Zellschicht aus Neuronen und Glia

Neuriten waren nicht mehr erkennbar. Auch waren aus solchen Kulturen keinerlei elektrische Signale nachweisbar, die sich deutlich vom Rauschen hervorgehoben hätten. Alle Kulturen, die mit ARAC behandelt worden waren, um die Proliferation von Gliazellen zu unterbinden, gingen *in vitro* nach zwei Tagen der Inkubation zu Grunde. In weiteren Zellkulturen wurde die Substanz daher nicht mehr verwendet. In den Experimenten, in denen kleine Volumina von Zellsuspension ausschließlich auf die Elektrodenoberfläche gebracht wurden, starben ca. 60 % der Neurone nach 1- 4 Tagen ab. Etwa 80 % der verbleibenden ausgesäten Neurone konzentrierten sich auf den Randbereich, während das MEA fast unbedeckt blieb. Aus diesem Grund wurden wieder größere Volumina von 500  $\mu$ l der Zellsuspension in den äußeren MEA-Ring gefüllt. Die optimale Zelldichte von circa 1.000 Neuronen pro  $\text{mm}^2$  konnte erreicht werden, indem 120.000 Zellen auf dem MEA ausgesät wurden. In Abbildung 21 erkennt man einen lichtmikroskopischen Ausschnitt eines mit Neuronen bedeckten MEA-Chips. Zu sehen sind vier Mikroelektroden aus planarem Gold mit den zugehörigen Leiterbahnen. Die Zellen liegen einschichtig zum Teil in Gruppen eng benachbart. Zwischen solchen Gruppen, aber auch zwischen Einzelzellen, befinden sich nur durch Neuriten ausgefüllte Lücken, die in räumlicher Ausdehnung bis zu 100  $\mu$ m betragen. Alle vier Elektroden sind vollständig oder teilweise mit Neuronen bedeckt. Diese haben dendritische Verknüpfungen untereinander hergestellt.



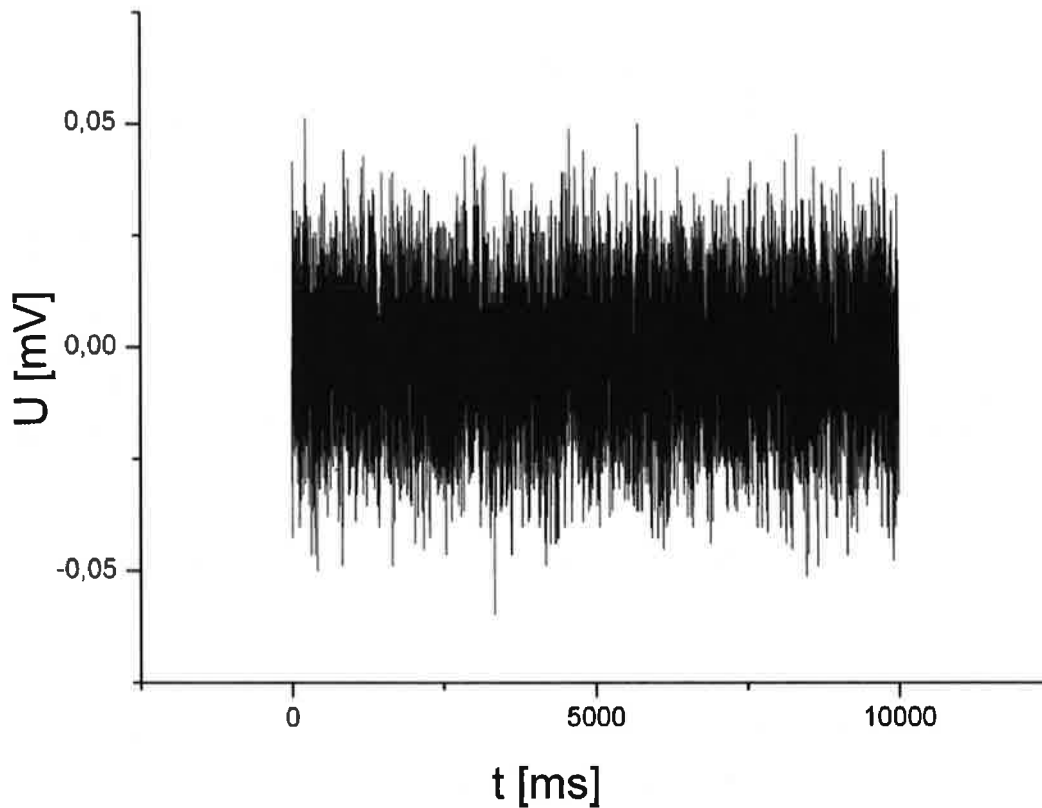


**Abbildung 21:** a) Dichte Neuronenkultur auf einem MEA nach 14 DIV, es sind vier Elektroden zu erkennen (Pfeile); b) Vergrößerung von a, gut ausgebildete neuritische Verbindungen zwischen den Neuronen

Nachdem die Zellkultur erfolgreich in der gewünschten Dichte auf den MEAs wuchs und über den 21. Tag *in vitro* hinaus vital erhalten werden konnte, war das nächste Ziel, Aktionspotentiale aus dieser dichten Neuronenkultur zu messen.

### 3.1.2. Aufzeichnung erster Nervensignale

In Abbildung 22 ist die Ableitung von einer planaren Goldelektrode (20  $\mu\text{m}$  Durchmesser) in graphischer Darstellung zu sehen. Aus dem Hintergrundrauschen, welches von Spitze zu Spitze 50  $\mu\text{V}$  beträgt, lassen sich keine Aktionspotentiale abgrenzen. Zur Verbesserung der elektrischen Ableitung wurden die verwendeten Mikroelektroden mit Nanostrukturierungsverfahren modifiziert. Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse von zwei in dieser Arbeit verwendeten Ansätze, basierend auf nanoporösem Aluminium und Platinum Black, vorgestellt.

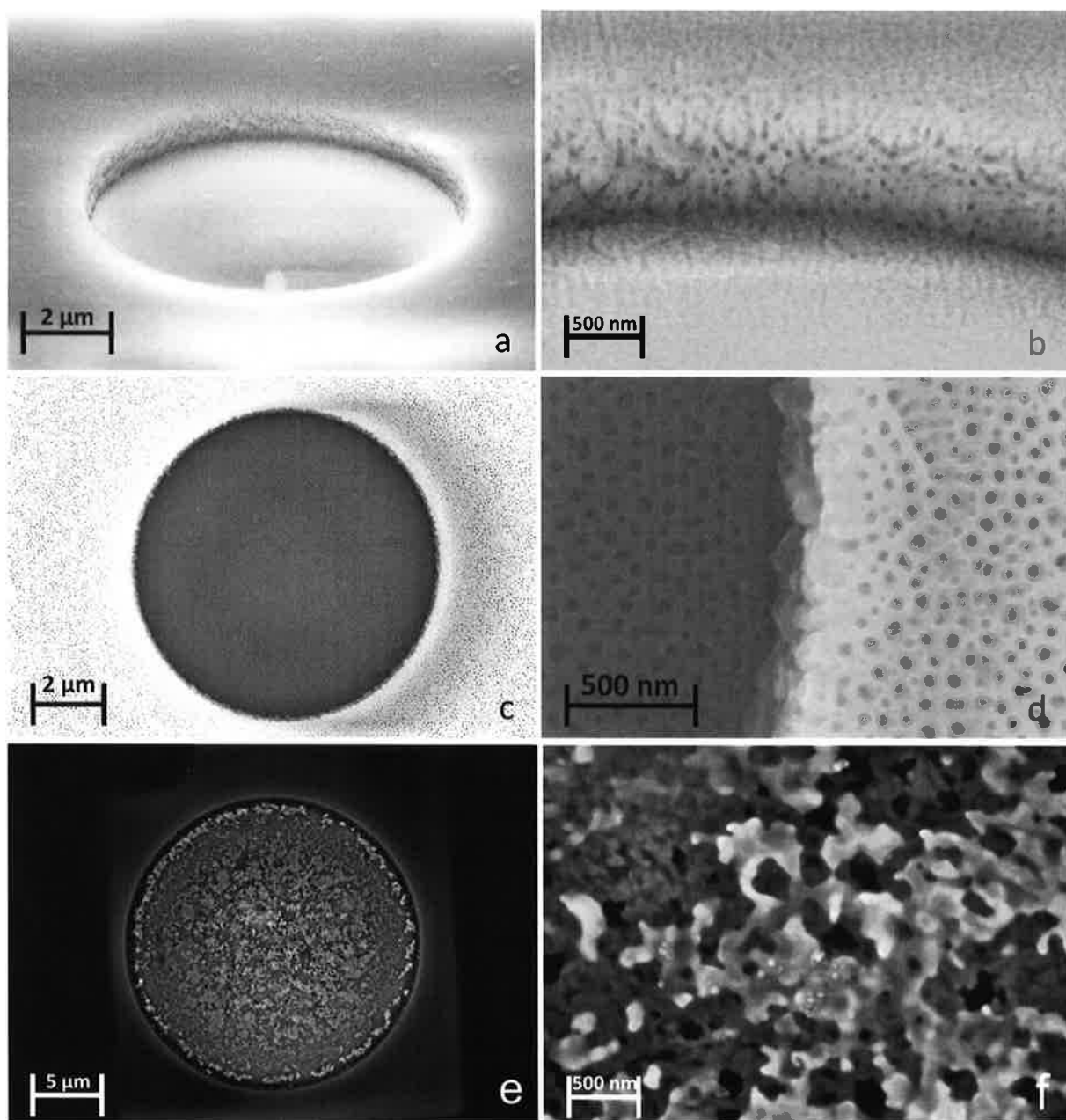


*Abbildung 22: Aus Kanal 4 abgeleitetes elektrisches Signal, aus dem Rauschen sind keine Aktionspotentiale mehr abgrenzbar; zur Verbesserung der elektrischen Ableitung sollen die Elektroden mit Nanostrukturierungsverfahren modifiziert werden.*

## 3.2. Verbesserung des Zellelektroden-Interfaces

### 3.2.1. Nanoporen

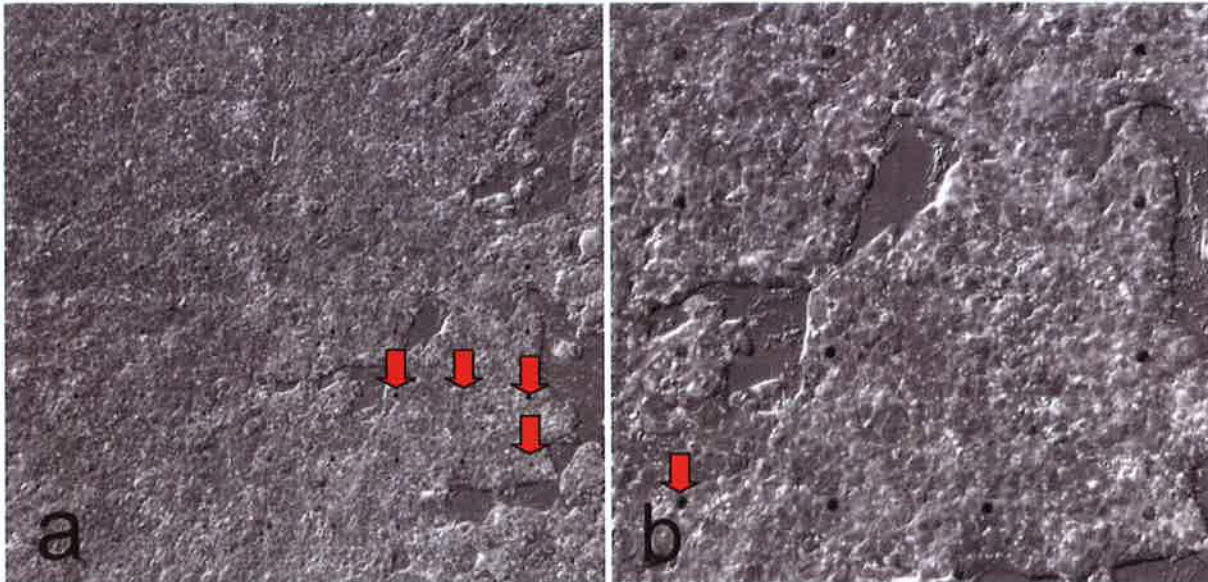
Abbildung 23 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von nicht verkapselten nanoporösen MEAs. Sie wurden mit dem Elektronenmikroskop Gemini 1500 Standard (Carl Zeiss AG, Deutschland) gemacht. Man kann deutlich erkennen, dass die Isolationsschicht ebenso wie die Elektroden von einer nanoporösen Aluminiumoxidschicht bedeckt wird. Die Schicht setzt sich ununterbrochen über die Grenze zwischen Elektrode und Passivierung fort. Die Poren sind unregelmäßig angeordnet und haben einen ungefähren Durchmesser von 50 nm. Bei solchen Elektroden, bei denen die nanoporöse Schicht nach der Anodisierung und vor der Messung entfernt wurde, kann man eine raue Oberfläche wahrnehmen (23 e+f), wenn man sie mit den normalen, glatten Goldelektroden vergleicht.



*Abbildung 23: a-d) REM-Aufnahmen von nanoporösen MEA-Oberflächen, Goldelektroden; e) Goldelektrode nach Entfernung der Nanoporen von der Oberfläche mittels KOH; f) Vergrößerung von e*

### 3.2.1.1. Zellen auf nanoporösen Oberflächen

In Abbildung 24 sieht man, dass die HL-1-Zellen der Kontrolle nach 4 Tagen *in vitro* in einer konfluierenden Schicht auf dem MEA mit nanoporöser Oberfläche gewachsen sind.



**Abbildung 24:** a) HL1-Zellen nach 4 DIV auf Goldelektrode (Pfeile) mit nanoporöser Oberfläche, b) Vergrößerung von a

Abbildung 25 zeigt die elektrische Aktivität der HL-1-Zellen über einer Elektrode. Die Abbildung ist repräsentativ für 59 der 64 Elektroden; bei den restlichen fünf Elektroden war das Signal-Rausch-Verhältnis durch Kurzschlüsse der Kontakte durch Silberkleber zu schlecht, um qualitative Messungen durchzuführen. In drei verschiedenen HL 1 Kulturen waren nach vier Tagen *in vitro* deutliche Aktionspotentiale sichtbar, die bis zu 300  $\mu\text{V}$  betrugen. Neurone konnten auf Nanoporen ebenso erfolgreich gezüchtet und für zwei bis drei Wochen am Leben erhalten werden, wie es bei herkömmlichen MEAs ohne Nanoporen der Fall war. Aktionspotentiale konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt aus diesen Neuronen abgeleitet werden.

### 3.2.1.2. Impedanzspektroskopie auf Oberflächen mit Nanoporen

Bei den MEAs (Elektrorendurchmesser 20  $\mu\text{m}$ ) mit einer nanoporösen Oberfläche wurde eine Impedanz gemessen, die der gemessenen Impedanz der Chips entsprach, von deren Oberfläche die Nanoporen nach der Anodisierung mit konzentrierter Kalilauge abgelöst

worden waren. Die Impedanz der flachen Goldelektroden, die nicht von einer nanoporösen Schicht bedeckt waren, war auffällig größer (Siehe Graph 1).

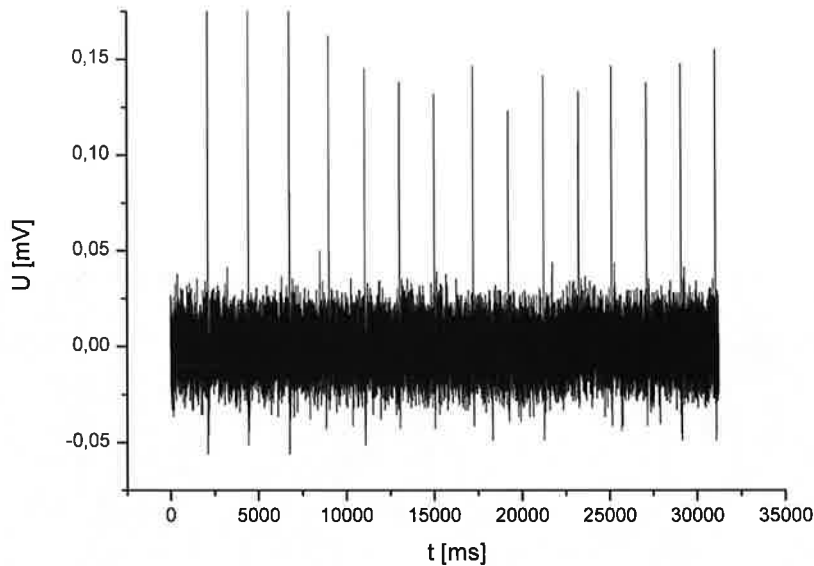
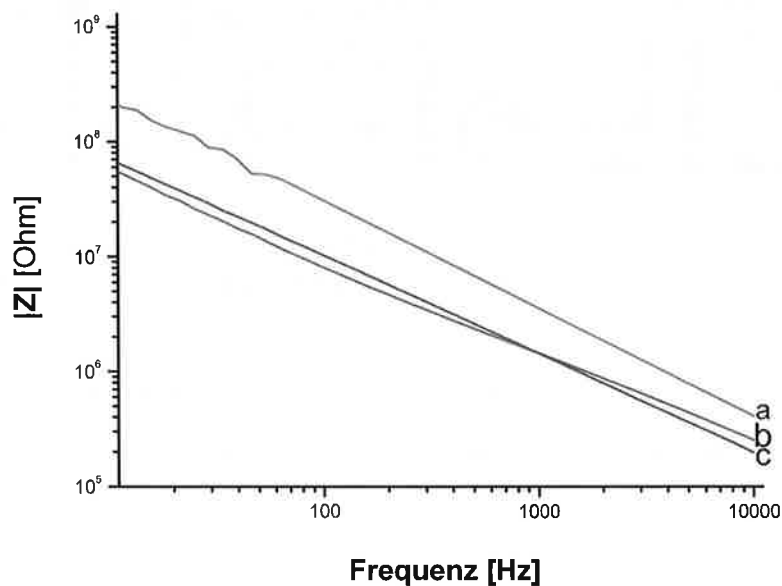


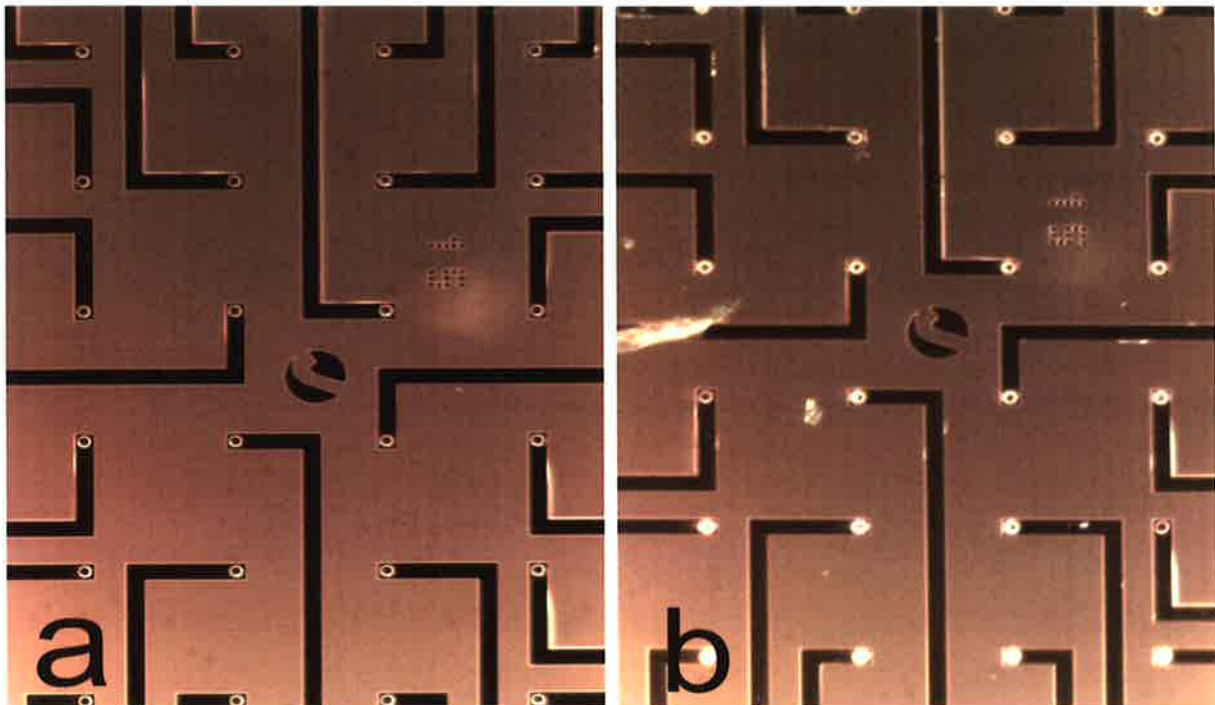
Abbildung 25: Aktionspotentiale aus einer HL-1-Kultur nach 4 DIV



Graph 1: Darstellung von drei Impedanzspektroskopien; a) pink: Kontrollmessung mit einer Goldelektrode (20  $\mu\text{m}$ , Chip aus gleicher Prozessierung) ohne Nanoporen; b) rot: Messung mit einer Goldelektrode (20  $\mu\text{m}$ ) mit einer Oberfläche aus Nanoporen, c) blau: Messung mit einer Goldelektrode (20  $\mu\text{m}$ ), nachdem die nanoporöse Oberfläche durch KOH entfernt wurde (M. Wesche, 2011, zur Publikation eingereicht)

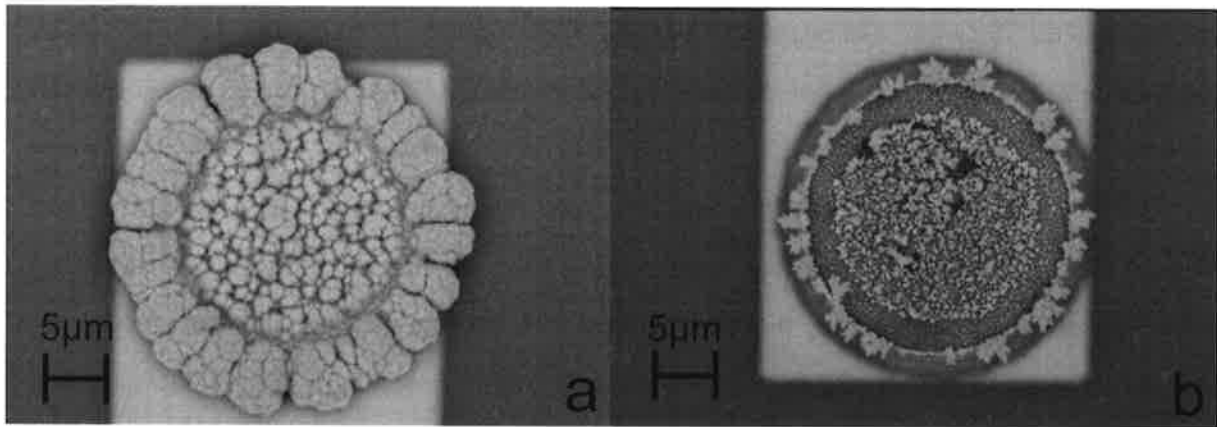
### 3.2.2. Platinabscheidung

Um die Impedanz der Mikroelektroden zu senken und damit das Signal-Rausch-Verhältnis an den Elektroden zu verbessern, sollte auf den Elektroden elektrochemisch Platin abgeschieden werden. Damit sollte eine Vergrößerung der Elektrodenoberfläche erreicht werden. In **Abbildung 26b** erkennt man, dass die Elektroden von einer ringförmigen, das Licht reflektierenden Struktur umgeben sind, so dass die Elektroden im Vergleich zum Zustand vor der Deposition vergrößert imponieren.



**Abbildung 26:** a) Lichtmikroskopisches Bild von Elektroden ( $15\mu\text{m}$  Durchmesser) eines MEAs vor der elektrochemischen Abscheidung von Platin, b) dieselben Elektroden nach der Deposition von Platin

In **Abbildung 27** kann man elektronenmikroskopische Bilder von zwei Goldelektroden der gleichen Probe sehen, auf deren Oberfläche sich Strukturen von Platin gebildet haben.



*Abbildung 27: REM-Aufnahmen von zwei Goldelektroden nach der elektrochemischen Abscheidung von Platin, unterschiedliche Ausprägung der Struktur*

Während im linken Bildteil eine deutliche Struktur zu erkennen ist, hat an der Elektrode im rechten Bildteil nur eine schwache Deposition stattgefunden. Solche Variationen traten gelegentlich in verschiedenen Proben unter gleichen Depositionsbedingungen statt. Tatsächlich erwiesen sich die entstandenen Strukturen als sehr widerstandsfähig und blieben sogar nach zweistündiger Reinigung der Chips in einem Ultraschallbad beständig.

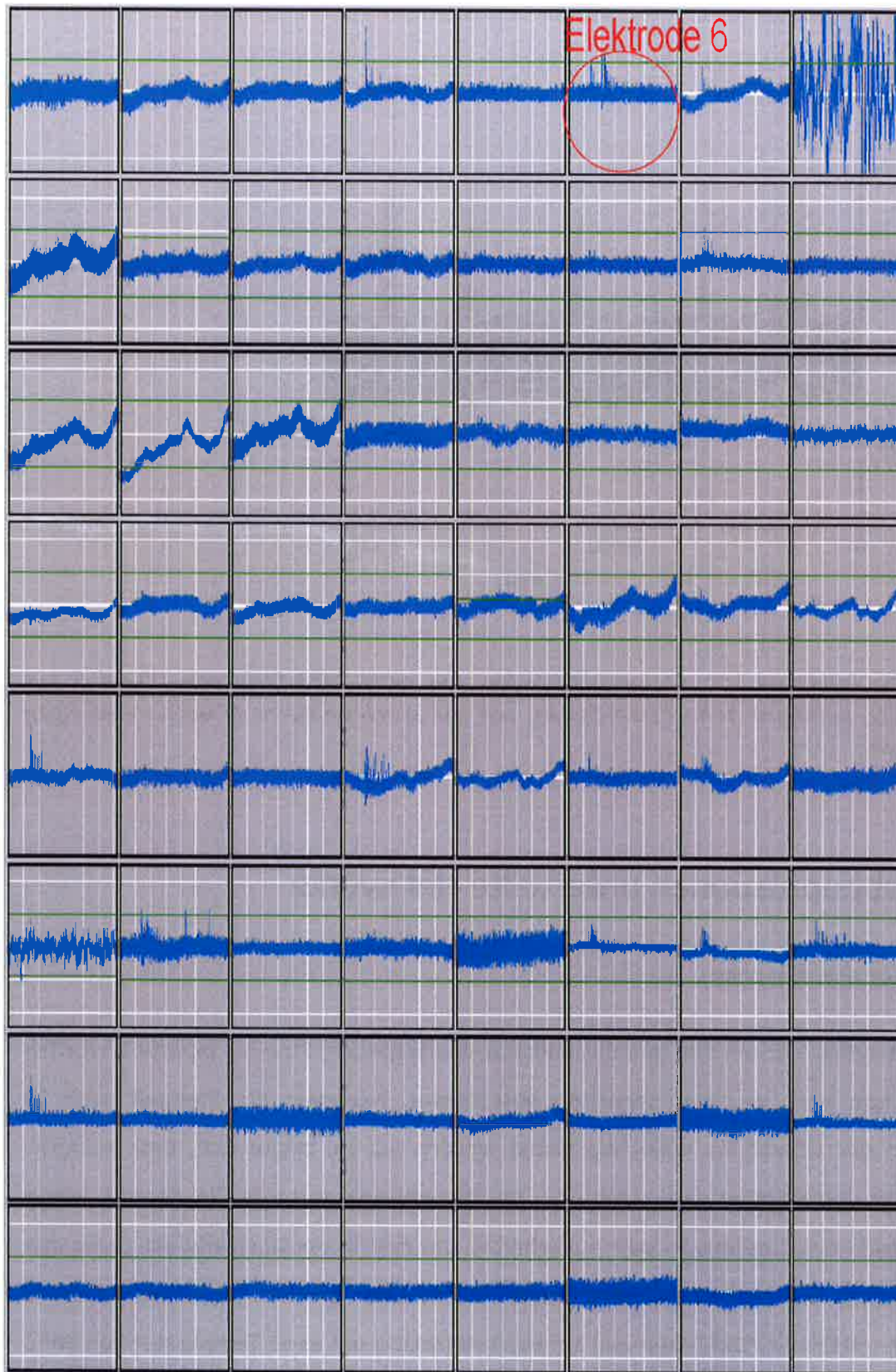
### 3.2.2.1. Zellen auf Oberflächen mit platinieren Goldelektroden

Nachdem die Elektrodenoberflächen mittels nanoporösem Aluminium und Platinum Black modifiziert worden waren, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob Zellen in ausreichender Dichte auf den veränderten Oberflächen würden wachsen können. Außerdem wurde untersucht, ob sich durch eine Verbesserung der elektrischen Eigenschaften der Elektroden auch elektrische Signale aus Zellen ableiten ließen. Die Neurone konnten erfolgreich in der oben beschriebenen Dichte ausgesät werden und bildeten nach 6-10 Tagen Netze neuritischer Verbindungen untereinander aus. Nach einer erneuten Neuronen-Zellkultur auf den platinieren MEA-Chips gelang es, mit Hilfe des oben beschriebenen Verstärkersystems, Signale aus den Neuronen abzuleiten. Nachdem die dem Inkubator entnommenen Kulturen für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen worden waren, damit sie sich an die veränderten klimatischen Bedingungen gewöhnen konnten, zeigten sich erste Aktionspotentiale und anschließend sogar einzelne Bursts, d.h. mehrere synchron auftretende Aktionspotentiale über einer oder mehreren Elektroden, als Zeichen

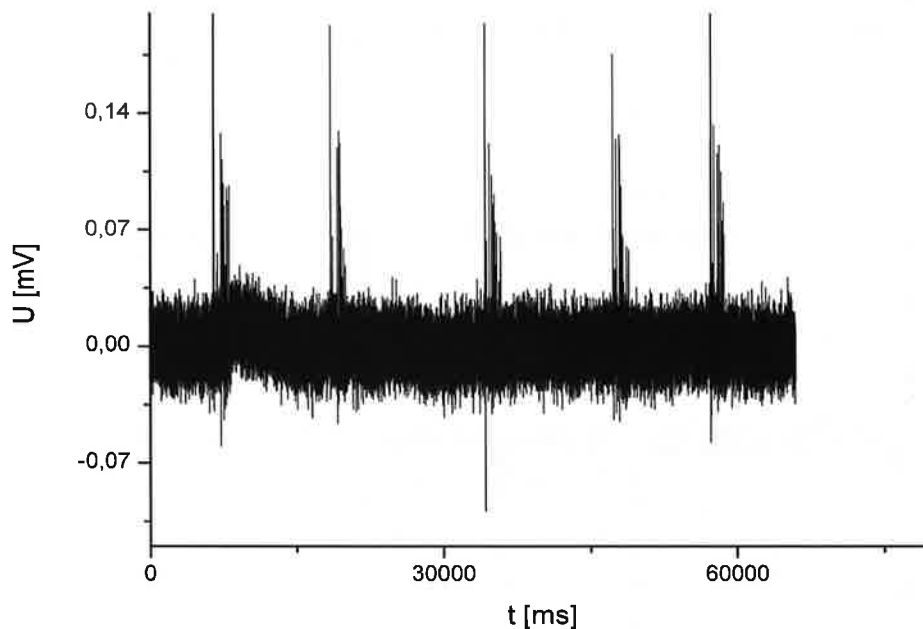
synchronisierter Aktivität. Gemessen wurde die Spannung in Milli-Volt gegen die Zeit in msec. Es wurden 20 Messungen auf drei verschiedenen MEAs für jeweils 60 Sekunden durchgeführt. In Abbildung 28 stellt jedes der 64 Felder die Messung über einer Elektrode dar. Über 19 von 64 Elektroden konnte eine elektrische Aktivität in Form von Aktionspotentialen gemessen werden. In Abbildung 29 ist die Ableitung über Elektrode sechs nochmals genauer zu erkennen. Die durchschnittliche Amplitudenhöhe der zu messenden Aktionspotenziale lag bei ca. 150  $\mu\text{V}$  und einer zeitlichen Dauer von 1-3 Millisekunden. Das Rauschen betrug Spitze zu Spitze 30  $\mu\text{V}$ . Um zu prüfen, ob die gemessenen Signale wirklich neuronalen Ursprungs oder nur Störartefakte sind, wurde dem Medium nach der Messung SDS, eine zelltoxische Substanz, hinzugefügt. Es wurde untersucht, ob die Aktionspotentiale nach Absterben der Neurone tatsächlich verschwinden oder ob es sich um Artefakte handelte; tatsächlich verstummten sämtliche Aktionspotentiale nach Zugabe des SDS.

---





*Abbildung 28: Mit MED 64 aufgezeichnete Messungen über 64 Elektroden eines MEA-Chips (Elektroden mit Platin modifiziert)*



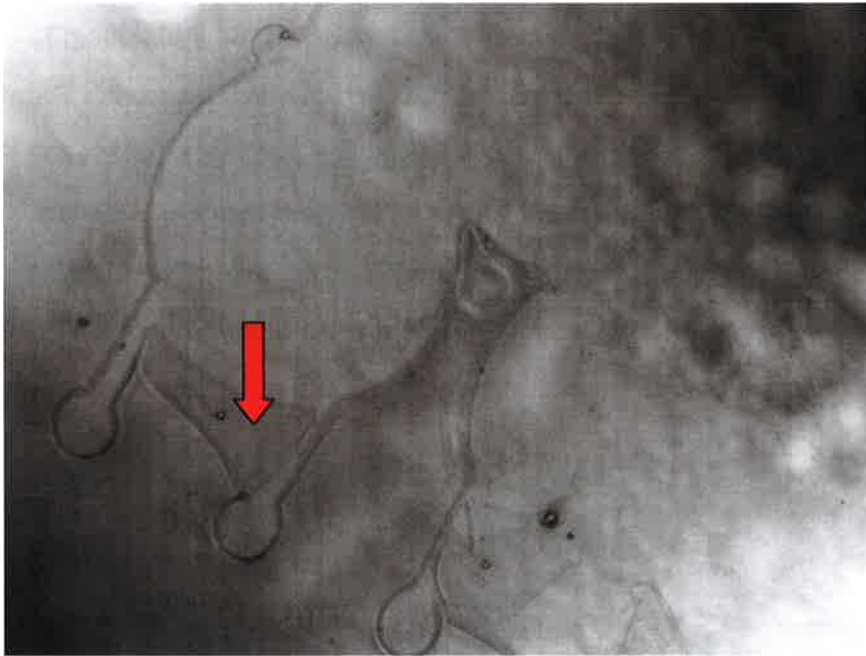
*Abbildung 29: Ableitung von Aktionspotentialen von einer MEA-Elektrode (Kanal 6 aus Abbildung 28), sichtbare hohe Einzel-Spikes, auf die synchronisierte Massenentladungen (Bursts) folgen*

### 3.3. In Subpopulationen unterteilte Netzwerke

#### 3.3.1. Cluster aus Agarose

Der Agarosetropfen, der um den (auf das Substrat übertragenen) Stempel pipettiert worden war, war schon nach wenigen Sekunden ausgehärtet. Nachdem die Stempel nach 30 Minuten von der Oberfläche vorsichtig gelöst worden waren, zeigte sich, dass keinerlei Agarose unter den Stempel gedrungen war. Bei Raumtemperatur war die Agarose schon beim Aufbringen des Tropfens zu weit ausgehärtet, um mittels der Kapillarkräfte unter den Stempel gesaugt werden zu können. Daher wurde das gleiche Experiment dreimal (Glasplättchen/MEA mit PDMS-Stempel) auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 90 °C durchgeführt. Die Pipettenspitzen wurden ebenfalls aufgewärmt. In Abbildung 30 sieht man nach Entfernung der Stempel einen Ausschnitt der von Agarose gebildeten Struktur auf der Glasoberfläche. Die kleinen Kreise, Elemente von zwei großen Kreisen und die dazwischenliegenden Leiterbahnen sind gut zu erkennen. Es wird auch deutlich, dass die

Agarose den Stempel nicht vollständig unterminiert hat. In weiterer Entfernung von der Stempelkante sind keine Agarosestrukturen mehr zu erkennen. Zwischen den Leiterbahnen löst sich die Agarose von der Glasoberfläche ab (Pfeile).

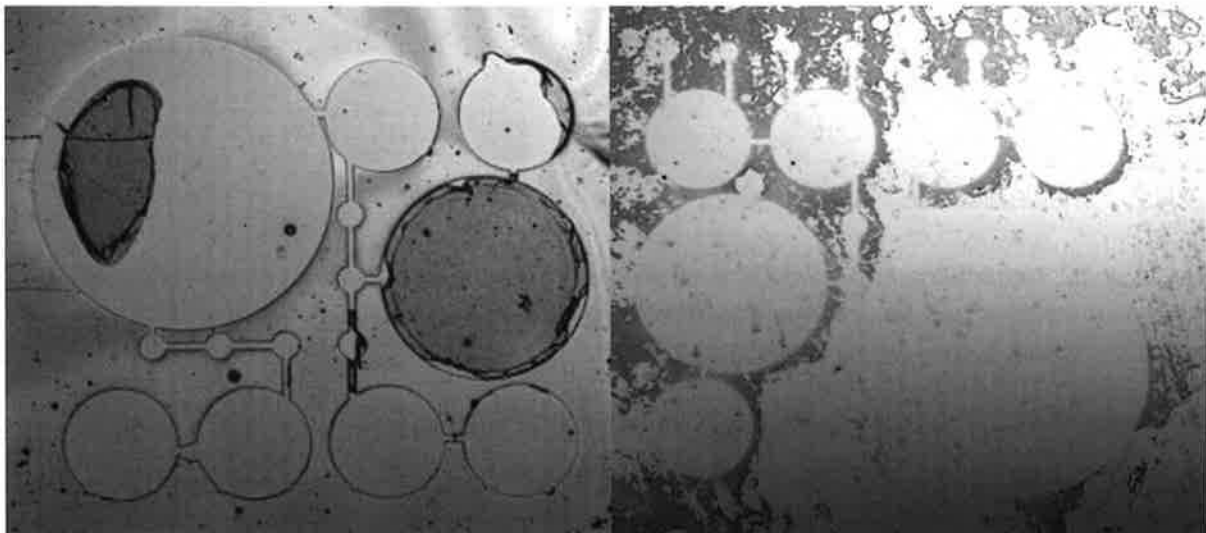


*Abbildung 30: Lichtmikroskopische Darstellung der Abformung des Clusters aus Agarose; nur die stempelrandnahen Strukturen konnten dargestellt werden; die Agarose löst sich an einigen Stellen von der Siliziumoberfläche (Pfeil)*

Der gleiche Versuch wurde dreimal auf einem MEA-Chip durchgeführt, auf den mit dem oben beschriebenen Fineplacer den Stempel aus PDMS nach der Anordnung der Elektroden ausgerichtet auf die Mikroelektrodenfläche aufgebracht und die heiße Agarose entlang der Stempelkante pipettiert wurde. Die Agarose härtete trotz Erhitzung des Chips auf der Heizplatte aus, bevor sie den Stempel unterminiert und so die Clusterstruktur abgeformt hatte. Im zweiten Versuchsansatz zeigte sich, dass zwar die Agarose die Glas- bzw. anschließend die MEA - Oberfläche gleichmäßig bedeckte und dass die Kreisstrukturen des Stempels in die Agarose übertragen worden waren, jedoch war auch am Boden der Kreise, die eigentlich frei von Agarose zur Adhäsion von Neuronen sein sollten, Agarose, die während des Anpressvorgangs nicht durch die Strukturen verdrängt worden war.

### 3.3.2. Cluster aus Star-PEG

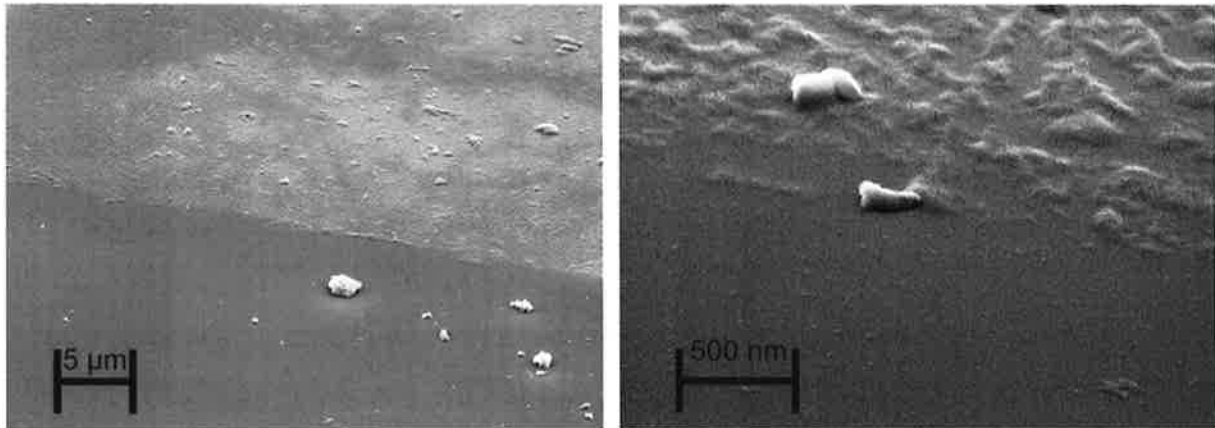
Die PDMS-Stempel ließen sich leicht herstellen. Nach der Aktivierung der Stempel adhärierte das Star-PEG während der 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur gleichmäßig auf der Oberfläche, wie man schon mit der Optik des *Fineplacers* sehen konnte. Abbildung 31 zeigt einen Star-PEG-Abdruck, der das zu übertragende Cluster deutlich darstellt. Die Einzelstrukturen sind zu erkennen. Dass im oberen Bildteil acht kleine Kammern fehlen, lag an einer einmaligen Fehlprozessierung des Vorlage-Wafers. Es ist zu erkennen, dass sich innerhalb zweier Kreisstrukturen Star-PEG-Tinte durchgedrückt hat, die eigentlich nicht in das Kreis-Innere gelangen sollte. Ein Kreis ist sogar völlig mit dem zellabweisenden Star-PEG gefüllt.



**Abbildung 31:** a) Darstellung des Clusters mit Star-PEG auf Siliziumoxid-Chip, der Stempel aus PDMS war in 30 % Schwefelsäure aktiviert worden; b) Darstellung des Clusters mit Star-PEG, der Stempel aus POP war im Sauerstoffplasma aktiviert worden

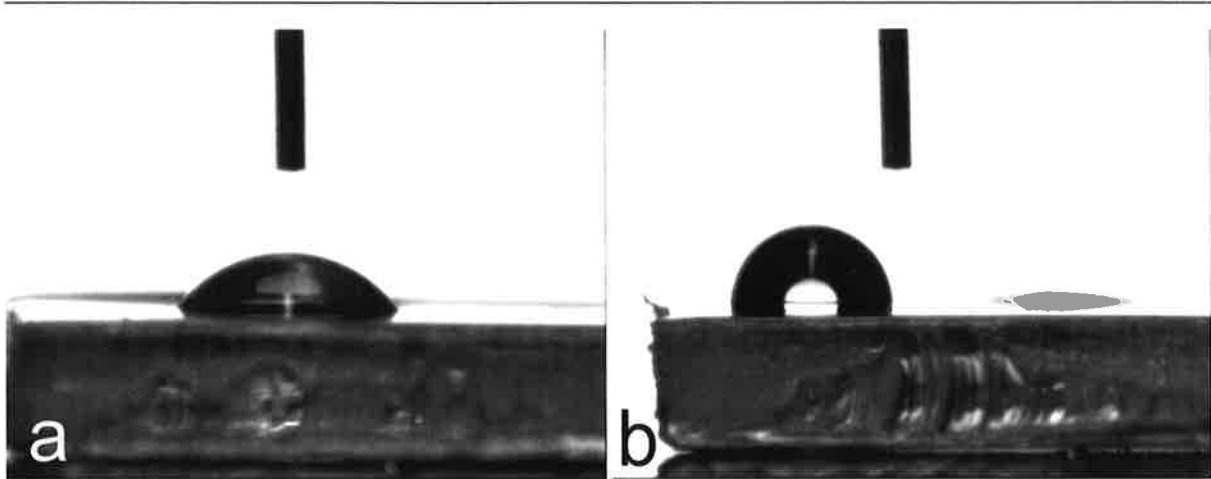
Während zehn Kontrollexperimenten geschah reproduzierbar das Gleiche: Es kam zu einer Übertragung des Star-PEGs in einige der Kreisstrukturen hinein. Um dem entgegenzuwirken, wurden im Anschluss POP-Stempel verwendet, die härter waren als die Stempel aus PDMS. In Abbildung 31b sieht man den Stempelabdruck nach einer ersten Aktivierung im Sauerstoffplasma. Die Strukturen des Clusters zeichnen sich bereits ab, Teile des Star-PEGs sind jedoch nicht übertragen worden, und die vorhandene Schicht ist mit löchrigen Aussparungen durchsetzt. Der Siliziumchip wurde elektronenmikroskopisch hinsichtlich der Dicke der aufgestempelten Star-PEG-Schicht untersucht. In Abbildung 32 ist der Rand einer

Neuronen-Kammer zu erkennen. Im oberen Teil sieht man die durch den Stempel aufgebraachte Star-PEG-Schicht, im unteren Teil fehlt das Star-PEG entsprechend der auf dem Stempel vertieft liegenden kreisrunden Struktur, in der während der Zellkultur die Nervenzellen wachsen sollen. Das Bild **32b** auf der rechten Seite zeigt eine Vergrößerung von **32a**. Hier erkennt man deutlich, dass die Star-PEG-Schicht nicht homogen auf die Silizium-Oberfläche, sondern ungleichmäßig mit Aussparungen übertragen wurde.



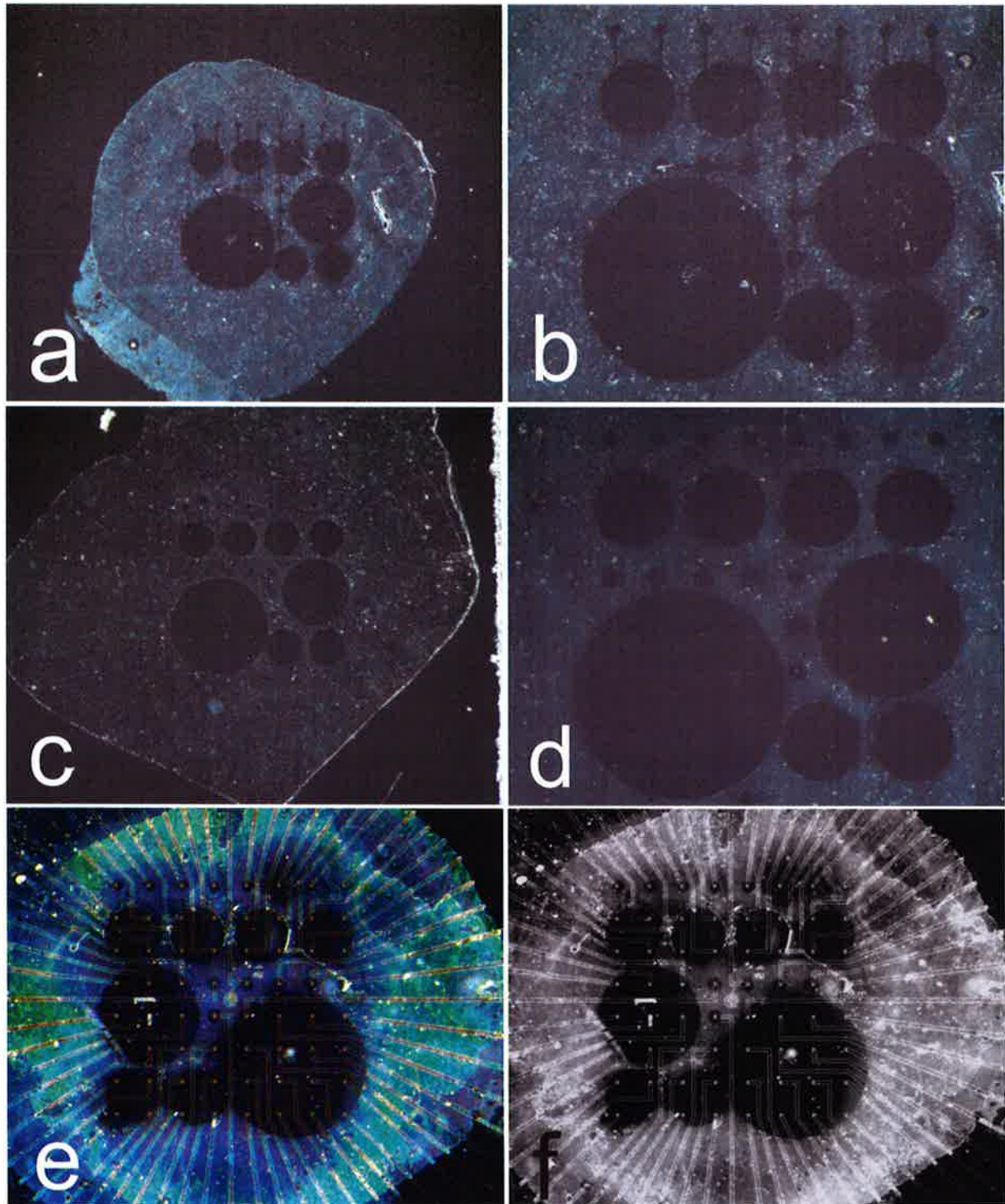
*Abbildung 32: a) REM-Aufnahme des Clusters aus Star-PEG in Bild 35; b) Vergrößerung von a*

Um eine bessere Übertragung zu ermöglichen, wurde in der nächsten Versuchsreihe die Verweildauer im Plasma verringert, wobei die anderen Parameter konstant belassen wurden, ohne bessere Ergebnisse zu erzielen. Im nächsten Schritt wurde neben der Expositionszeit auch die Leistung reduziert. Es zeigte sich, dass selbst bei geringer Leistung von 5 –10 % (10 bzw. 20 Watt) und Zeiten von 10 Sekunden im Plasma der Kontaktwinkel deutlich unter  $60^\circ$  lag. Die erzielten Star-PEG-Stempel glichen alle der Abbildung **31b**. Auch eine abschließende Reduktion des letzten Parameters, des Sauerstoffdrucks, veränderte das Ergebnis nicht.

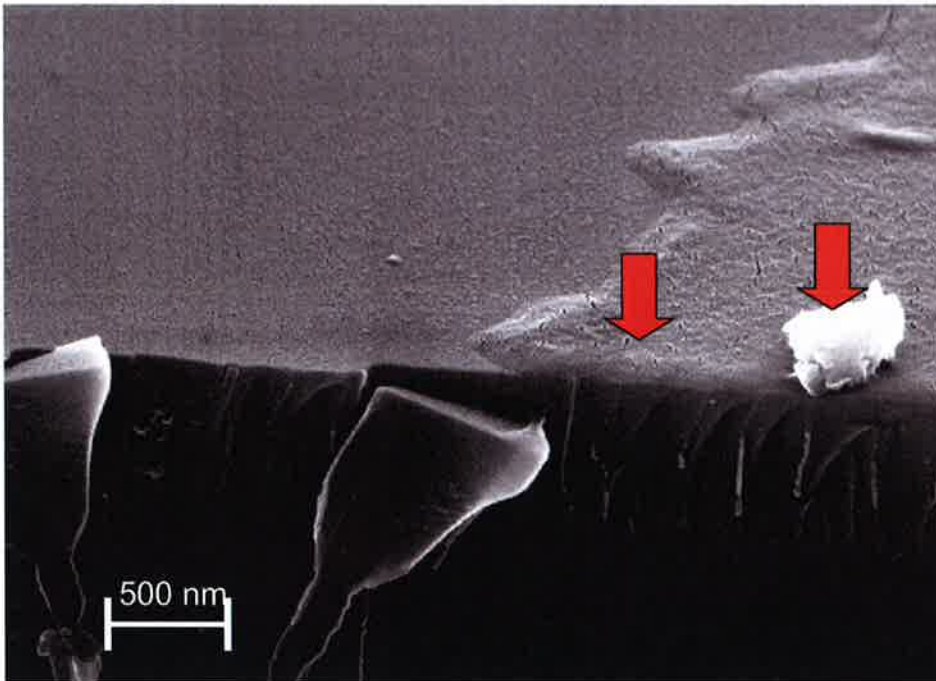


*Abbildung 33: Kontaktwinkelmessung auf Oberflächen von POP-Stempeln; a) Oberfläche Minimalparametern im Sauerstoffplasma aktiviert, Kontaktwinkel 44°; ähnlich stellten sich auch die Kontaktwinkelmessungen auf POP nach Aktivierung in Schwefelsäure dar, b) Oberfläche nicht aktiviert, Kontaktwinkel 82°*

Die Oberfläche war trotz der niedrigen Aktivierungsparameter im Plasma zu hydrophil. (Abb. 33a) Da die Plasmaaktivierung zu intensiv war, wurden die Stempel in unterschiedlichen Konzentrationen von Schwefelsäure hydrophilisiert. In höheren Konzentrationen stellte sich das gleiche Problem der zu starken Hydrophilie dar. Umso geringer die Konzentration demgegenüber jedoch gewählt wurde, desto unzuverlässiger wurde das Ergebnis. Die Kontaktwinkel schwankten stark, auch bei Proben gleicher Säurekonzentration. Im dritten Schritt, der eigentlich als Kontrolle vorgesehen gewesen war), wurden Stempel verwendet, die nicht aktiviert worden waren. Es zeigte sich, dass die Kontaktwinkel auf unbehandelten POP-Oberflächen reproduzierbar zwischen 70° und 100° lagen. Mit diesen Stempeln wurde ebenfalls das beste Ergebnis beim Microcontact-Printing erzielt. Es konnte eine homogene Star-PEG-Schicht auf die Siliziumchips übertragen werden, die die Strukturen des Clusters scharf begrenzt und bis auf Einzelartefakte intakt darstellte. In Abbildung 34 sieht man die Star-PEG-Struktur in der lichtmikroskopischen Aufnahme. Im REM-Bild (Abbildung 35) erkennt man, dass das Star-PEG (rechts im Bild) gleichmäßig eine sich deutlich vom Chip (linke Bildhälfte) abhebende Schicht bildet, die nicht von Unregelmäßigkeiten unterbrochen wird.



*Abbildung 34: Star-PEG-Stempel mit Clusterstrukturen auf Siliziumoxid mit (a+b) und ohne Verbindungskanäle (c+d); e) Star-PEG-Stempel (zweifach gestempelt) auf einem MEA, f) kontrastverbessertes Bild von e*



*Abbildung 35: REM-Bild von einem Star-PEG-Cluster, rechts: die geschlossene Star-PEG-Schicht, vorn: die Bruchkante des Chips mit zwei Silizium-Splittern und ein Artefakt (dicker Pfeil)*

### 3.3.4. Zellen auf geclusterten Oberflächen

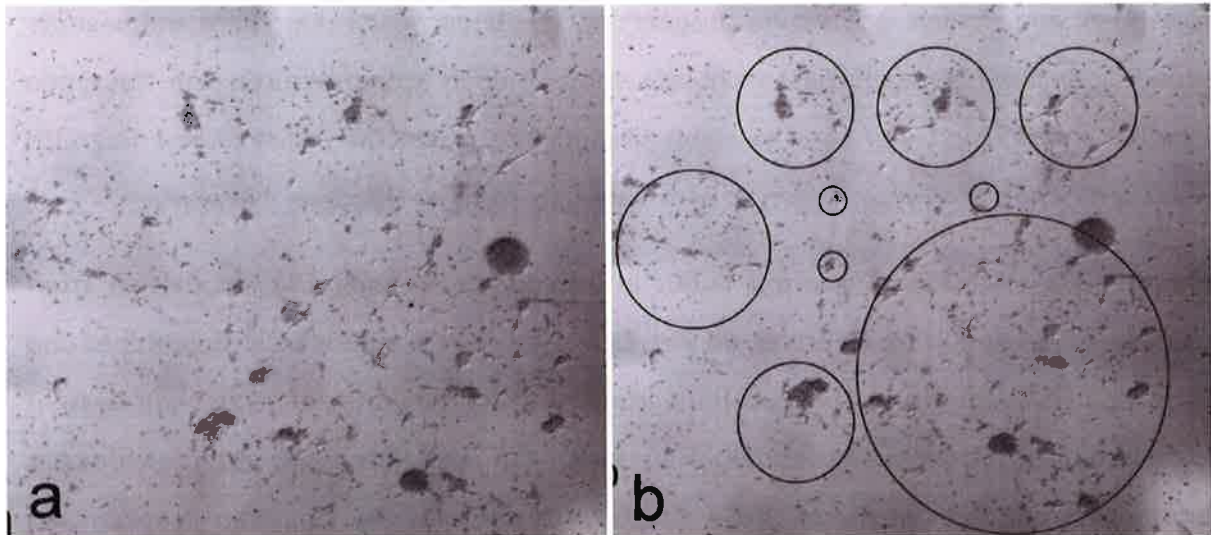
#### 3.3.4.1. Zellen auf reinem APTES

Als erstes wurde geprüft, wie Neurone auf reinem APTES (umgeben vom zellaversiven Star-PEG) wachsen. In Abbildung 36 sieht man einen Ausschnitt des gestempelten Areals auf dem Silizium-Chip. Man erkennt mehrere voneinander räumlich unabhängige Neuronenverbände. Nervenzellen dieser Verbände stehen untereinander über axonale Verbindungen in Kontakt. Diese Axone wachsen sogar entsprechend dem Kreisrund der Clusterstruktur. Der Übergang zwischen Star-PEG und APTES ist dadurch gut abgrenzbar. In Abbildung 36b sind zur Orientierung zusätzlich die kreisförmigen Kammern der Stempelstruktur über das Bild gelegt, damit ersichtlich wird, dass die Zellen tatsächlich in den Aussparungen der Star-PEG Schicht auf der APTES-Oberfläche angewachsen sind. Zwischen diesen Strukturen, d.h. in dem Bereich, in dem Star-PEG die Oberfläche bedeckt, haben sich keine Zellpopulationen gebildet. Bis auf wenige Einzelneurone befinden sich hier keine lebendigen Zellen. An einigen Stellen, an denen im Clusterdesign Verbindungskanäle zwischen den Kammern

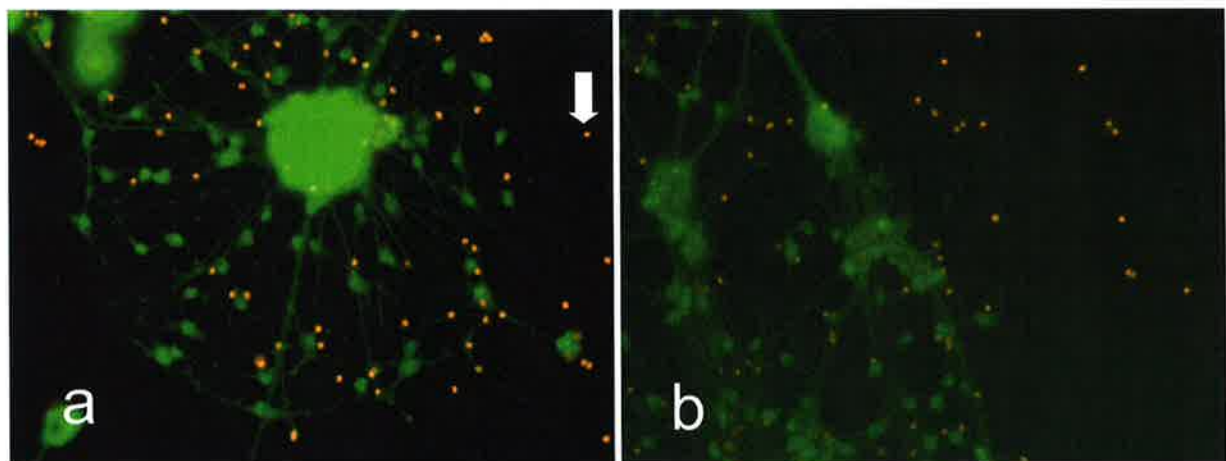


vorgesehen sind, haben sich Axone ausgebildet, die benachbarte Kammern miteinander verbinden. Sichtbar ist auch, dass nicht alle vorgesehenen Kreisstrukturen von Neuronen ausgefüllt worden sind. Auf zwei weiteren Siliziumchips waren die Zellen nicht erfolgreich gewachsen. Schon nach sechs Tagen *in vitro* waren die meisten Neurone abgestorben.

Abbildung 37a zeigt Ausschnitte der Kultur in Lebend-Tot Färbung. Die mit Calcein grüngefärbten Zellen sind vitale Neurone, die deutlich erkennbar in einem Kreis angeordnet und über Axone verbunden sind. Die leuchtend grüne ca. 2 cm durchmessende Struktur besteht aus zahlreichen zusammenliegenden Neuronen, die mit ihrer größeren Lichtdichte (Fluoreszenz) das Bild an dieser Stelle überbelichtet haben. Die kleineren orange-roten Punkte repräsentieren die abgestorbenen, durch Ethidium-Homodimer gefärbten Neurone, die verteilt innerhalb und außerhalb der Kreisstruktur liegen. Eine Zählung der toten und vitalen Zellen ergab ein Verhältnis tot : vital von 58 : 53 Zellen, wobei der große Zellhaufen in der Mitte nur als Einzelzelle gezählt wurde; darin sind jedoch viele Zellen zusammengelagert. In Abbildung 37b erkennt man den Übergang von der dichten Neuronenkultur auf dem Chip und dem Areal, in dem durch den Stempel Star-PEG aufgebracht wurde. In der linken Bildhälfte (kein Star-PEG, APTES) wachsen die Neurone in dichter vitaler Kultur. Zu beachten sind die zahlreichen und kräftigen axonalen Verbindungen. Im rechten Bildteil (Star-PEG) sind ausschließlich einzelne tote Neurone zu erkennen. Der Übergang ist entsprechend der Stempelkante scharf abgrenzbar.



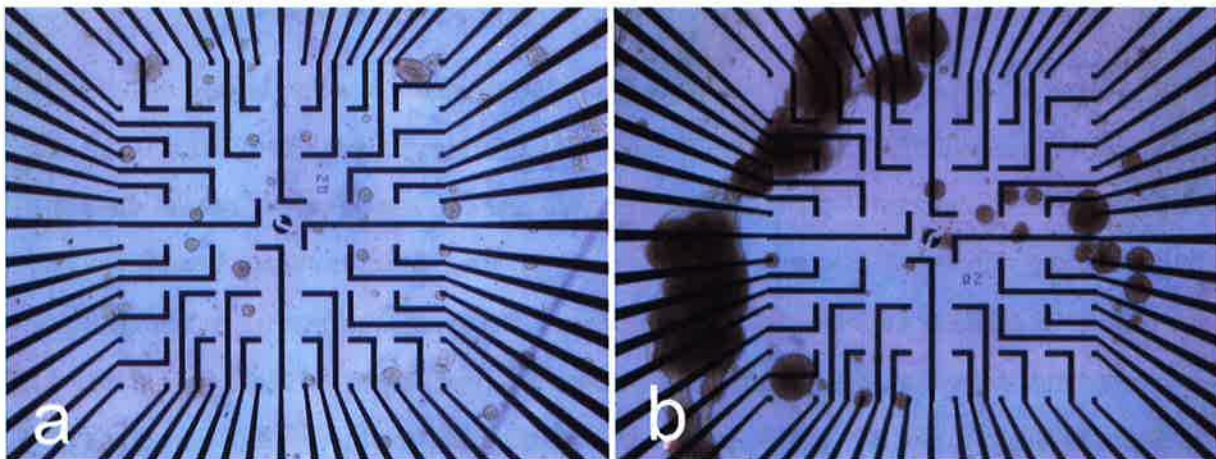
**Abbildung 36:** a) Neurone nach 6 DIV auf APTES-Kammern umgeben von Star-PEG auf Siliziumoxid-Chips; b) wie a) mit eingefügten Kreisen zur Sichtbarmachung des Clusters



**Abbildung 37:** Lebend-Tot-Färbung der Kultur aus Abbildung 36, die Zellen folgen streng den vorgegebenen Strukturen; a) in der Kreisstruktur 15 (siehe Abb. 26) wachsende Neurone; roter Pfeil zeigt auf eine vitale Zelle, weißer Pfeil zeigt auf eine tote Zelle; die Neuriten folgen der Rundung des Kreises; b) Neurone am äußeren Übergang zwischen Star-PEG-Schicht (rechts) und silanisierter Oberfläche (links)

In Bildteil a der Abbildung 36 erkennt man, dass erste Neurone sich von der Oberfläche abzulösen beginnen. Bereits nach zwei Wochen waren sämtliche Neurone abgestorben bzw. hatten sich abgelöst und trieben als Zellhaufen mit mehreren hundert Zellen im Medium. Die Neurone auf den MEA-Chips, die nur mit APTES in einem Star-PEG-Cluster beschichtet waren, konnten nicht erfolgreich gezüchtet werden. In Abbildung 36b erkennt man, dass bereits nach drei Tagen fast alle Zellen abgestorben waren. Die meisten der überlebenden Zellen lösten sich von der Oberfläche und bildeten runde Zellkonglomerate, die frei im Medium trieben. Daraufhin wurden Kontrollkulturen mit Neuronen auf 12 Siliziumchips und

6 MEAs angefertigt, die entweder homogen mit APTES beschichtet waren oder nochmals aus auf APTES gestempelten Star-PEG-Clustern bestanden. In beiden Fällen wurden die Kulturen länger als 14 DIV inkubiert. Es bestätigte sich, dass alle Neurone auf den bestempelten APTES-Oberflächen schon nach sechs DIV abgestorben waren oder frei im Medium ohne Kontakt zur Oberfläche trieben. Diese Entwicklung war auch in den drei Kontrollkulturen erkennbar, die in Genua in Kooperation mit dem IIT (Istituto Italiano da Technologia) entstanden sind. Dafür waren Chips, mit der gleichen Beschichtung wie oben beschrieben nach Italien versendet worden, die dort mit Neuronen aus Mäuse-Hippocampi 11 Tage inkubiert wurden. (Abbildung 38)



*Abbildung 38 Star-PEG Cluster auf APTES auf Jülicher MEA, Neuronenkultur (durchgeführt im IIT, Genua, Italien) nach 3 DIV (a), nach 16 DIV haben sich die Zellen von der Oberfläche abgelöst und zu Haufen zusammengelagert (b)*

Schon nach drei Tagen begannen die Neurone auf den MEAs, die nur mit Star-PEG auf APTES bestempelt waren, sich von der Oberfläche zu lösen und im Verlauf Zellklumpen zu bilden (Abbildung 38 a+b). Das weitere Ziel bestand damit darin, die Oberfläche so zu modifizieren, dass ein fester Zell-Chip-Kontakt hergestellt werden konnte, der auch über einen Zeitraum von mehreren Wochen konstant blieb.

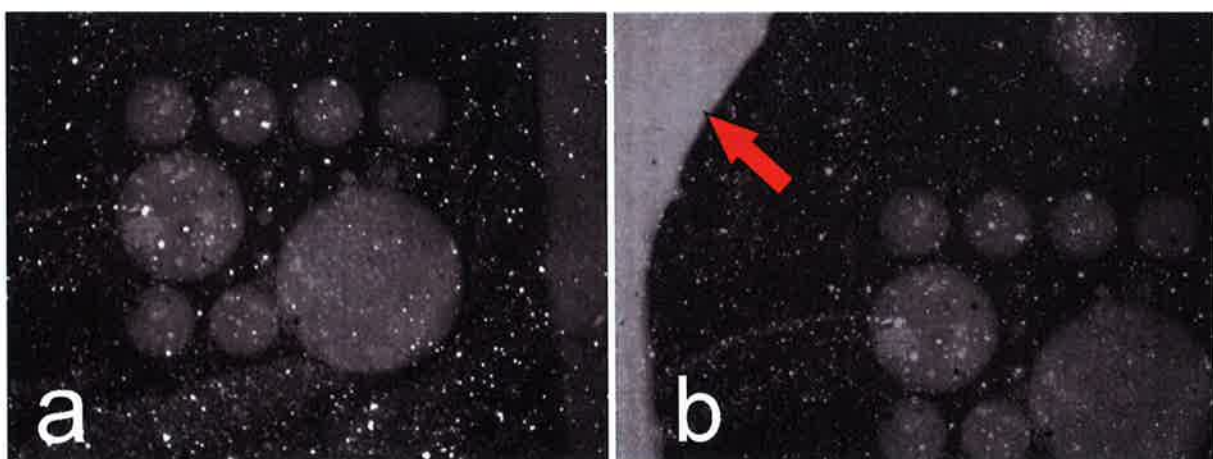
### 3.3.4.2. Verbesserung des Zell-Oberflächenkontaktes mit PECM

#### *Backfilling mit PECM*

Der erste Ansatz war, PECM, das sich bereits als Oberflächenbeschichtung für Neurone bewährt hatte, nach dem Stempelvorgang auf die Oberfläche zu bringen. Es wurde eine

Versuchsreihe mit drei Siliziumchips begonnen, auf die PECM aufgebracht wurde, nachdem erfolgreich mit Star-PEG das Cluster gestempelt worden war. Zur Kontrolle waren drei Chips ohne Stempel mit PECM (also mit Standardbeschichtung) vorbereitet worden. Alle sechs Chips wurden mit Neuronen der gleichen Präparation inkubiert. Auf den Kontrollchips mit homogener PECM-Beschichtung (also ohne Star-PEG) wuchsen die Neurone in guter Dichte und mit hoher Überlebensrate für die Dauer der Inkubation von 14 Tagen. Auf den Chips mit PECM-*Backfilling* überlebten die Neurone mit vergleichbar hoher Überlebensrate und in hoher Dichte, ohne allerdings den Strukturen des Clusters entsprechend zu wachsen. Unbeeinflusst von diesen bedeckten sie homogen die Oberfläche, auch an den Stellen, an denen durch Star-PEG eigentlich eine Zelladhäsion verhindert werden sollte.

Um zu prüfen, woran dieses übergreifende Zellwachstum liegen konnte, wurde das gleiche Experiment erneut durchgeführt, wobei diesmal das Proteingemisch der Beschichtung mit einem mit FITC präparierten Poly-Lysin angereichert war<sup>121</sup>. Das Ergebnis zeigte, dass der Chip vollständig mit PECM überzogen war. Um die kreisrunden Kammern herum, wo das Star-PEG die Oberfläche bedeckte, war eine minimal geringere Fluoreszenz zu beobachten. Es wurden daher neue Star-PEG-Cluster auf Siliziumchips produziert und diese für eine Nacht in entmineralisiertes Wasser gelegt, um eine vollständige Polymerisation der Star-PEG-Moleküle zu erreichen. Am nächsten Tag wurden die Chips erneut mit FITC markiertem PECM beschichtet und viermal mit entmineralisiertem Wasser gewaschen.



**Abbildung 39:** a) Fluoreszenzlichtmikroskopisches Bild nach *Backfilling* mit PECM (FITC-markiert); Kreisstrukturen fluoreszieren schwach nachdem hier PECM adhärert hat; b) nach rechts unten versetztes Bild von a, links oben der Übergang von Star-PEG (schwarz) und APTES-Oberfläche (weiß); weiße Punkte sind Artefakte

Abbildung 39 wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Man erkennt die fluoreszierenden Kreisstrukturen, in denen FITC-markiertes PECM an die APTES-Oberfläche gebunden hat. In Abbildung 39b ist das gleiche Cluster zu sehen, der Pfeil markiert die Grenze des Star-PEGs. Links ist das fluoreszierende Protein zu erkennen, welches an APTES gebunden vorliegt, rechts vom Pfeil der Star-PEG-Abdruck, an den kaum Protein gebunden hat. Die Proteinschicht ist sehr dünn: Die Ränder sind unscharf begrenzt und das Protein ist transparent. Erst nach einer Bildnachbearbeitung konnten die Kreisstrukturen kontrastreich genug dargestellt werden. Die Ausnahme bildeten zwei MEAs, auf denen im Vergleich zu unserer Oberflächenbeschichtung mit PECM ein Backfilling mit Laminin und PDL (Standard im IIT) auf die Star-PEG-Struktur durchgeführt worden war. Auch Neurone, die auf Laminin/PDL-Oberflächen inkubiert worden waren, lösten sich nach 11 Tagen *in vitro* vollständig vom Untergrund ab.

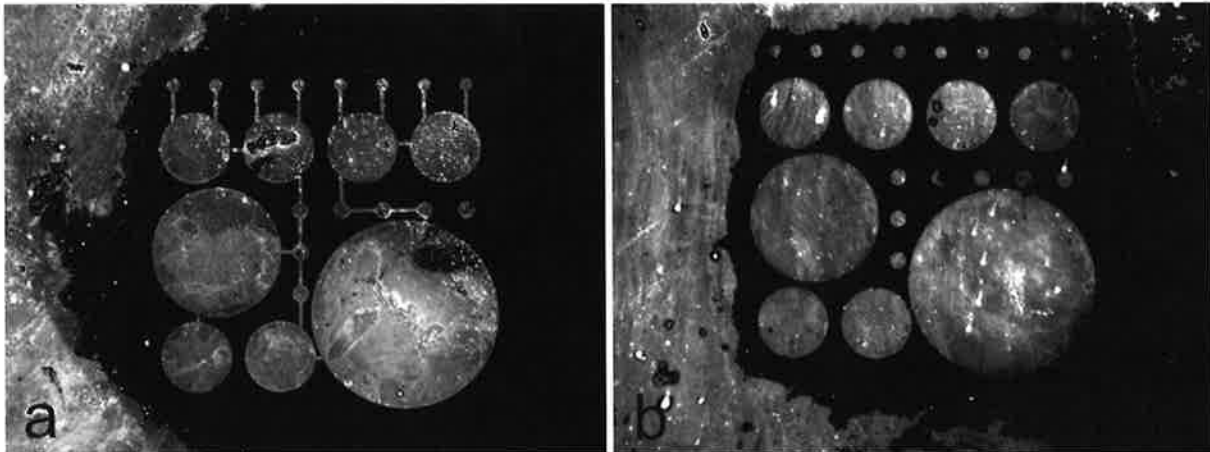
### *Crosslinking mit Sulfo-GMBS*

Um eine stärkere Bindung von Protein an APTES zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt ein Quervernetzer verwendet, Sulfo-GMBS, der eine starke kovalente Bindung der Aminogruppen des APTES über die Malmeidogruppen des GMBS an die Thiolgruppen von Cystein im Proteingemisch ermöglicht<sup>129</sup>. Es konnte im Experiment gezeigt werden, dass das Star-PEG vom markierten Protein tatsächlich ausgespart wurde. In Wiederholungen des gleichen Versuchs hatte das Protein jedoch auch an die Star-PEG-beschichteten Teile der Oberfläche gebunden, so dass eine Fluoreszenz beobachtet wurde, die nicht auf die Kreisstrukturen begrenzt war. Teile des Clusters konnten dadurch von der Umgebung nicht mehr abgegrenzt werden. In drei weiteren Kontrollexperimenten wurde sogar kein Protein an das APTES der Kreise, sondern ausschließlich an das umgebende Star-PEG gebunden.

### *PECM auf homogener Star-PEG Schicht*

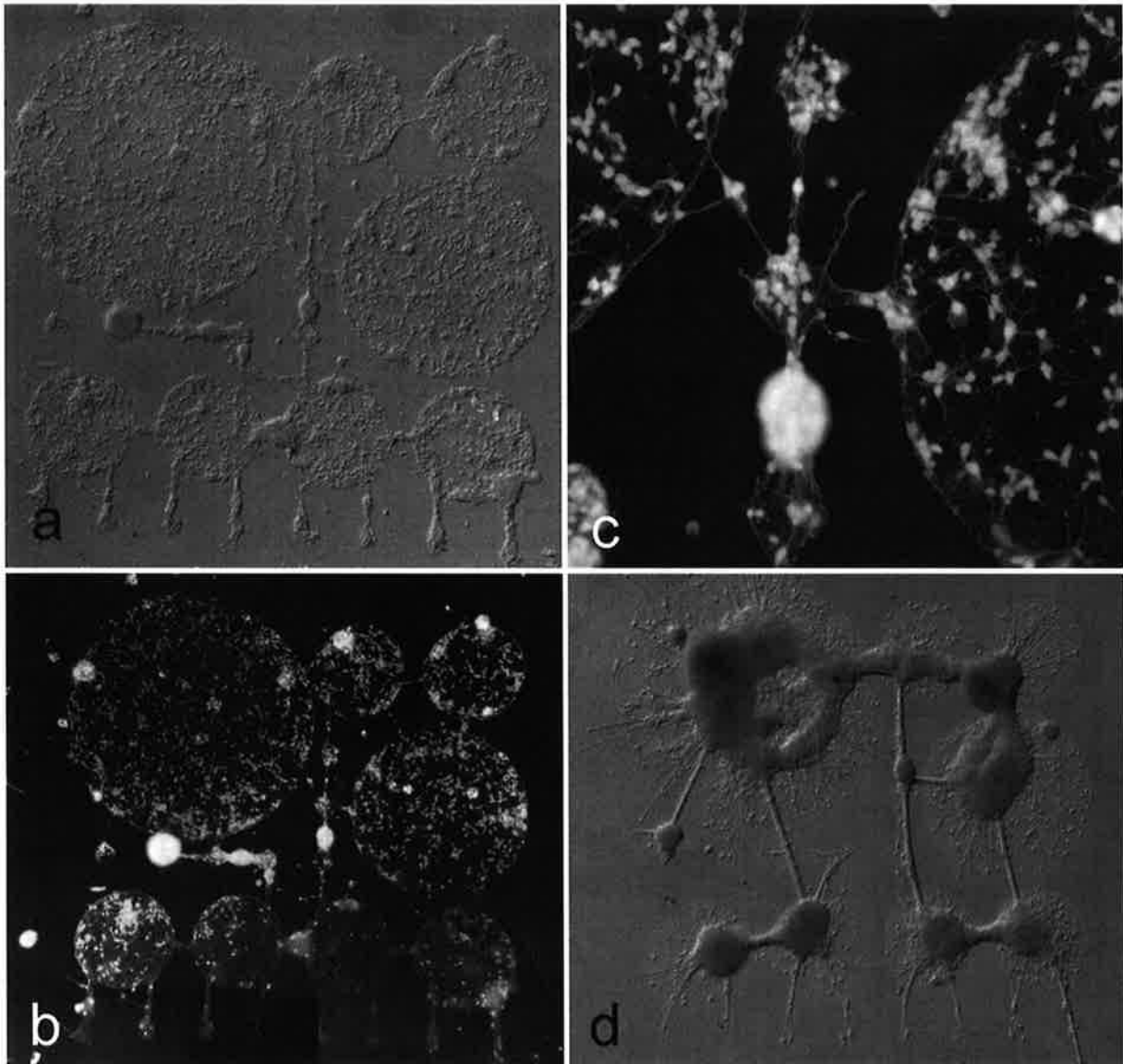
In Abbildung 40 sind zwei Cluster aus PECM zu erkennen, die erfolgreich auf Siliziumchips mit homogener Star-PEG-Schicht übertragen werden konnten. Hierbei handelt es sich um einen Clustertyp mit Kanälen (Abb. 40a) und einen Clustertyp ohne Kanäle (40b). Die kreisförmigen Strukturen heben sich kontrastreich von der sie umgebenden Oberfläche (Star-PEG) ab. Unterschiede in der Intensität des Fluoreszenzlichts zeigen leichte Unterschiede der Schichtdicke des übertragenen PECMs an. Es konnten erfolgreich Zellen auf diesen

Strukturen gezüchtet werden, allerdings zu ca. 10 % auch außerhalb der Kreise auf Star-PEG, d.h. in einem Bereich, in dem eigentlich keine Zellen bzw. Neuriten wachsen sollten. In einer folgenden Kontrollkultur wurde daher eine dickere Schicht von Star-PEG auf die Oberfläche aufgebracht, indem die Tinte statt für 7 Minuten für 15 Minuten auf dem Silizium-Chip inkubiert wurde, bevor die überflüssige Tinte abzentrifugiert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 zu sehen.



**Abbildung 40:** PECM-Cluster (FitC-markiert) mit (a) und ohne (b) Verbindungskanäle auf homogener Star-PEG-Schicht; die PECM Cluster auf reinem aktiviertem Siliziumoxid sahen genauso aus

Das Zellwachstum blieb daraufhin auf Kreise und Kanäle begrenzt. Nach 16 DIV hatte sich die Morphologie der Zellkultur verändert. Es hatten sich innerhalb der Kammern Zellhaufen gebildet, die über dicke Bündel von neuritischen Fortsätzen, die teilweise den Kanälen zwischen den Kammern folgten in Verbindung standen. Die Frage, ob es sich hierbei um eine Agglomeration von Neuronen handelte, die sich nachträglich zusammengelagert hatten, oder um eine Proliferation von in der Kultur enthaltenden Gliazellen, machte eine Antikörperfärbung zur Unterscheidung von Glia und Neuronen erforderlich.

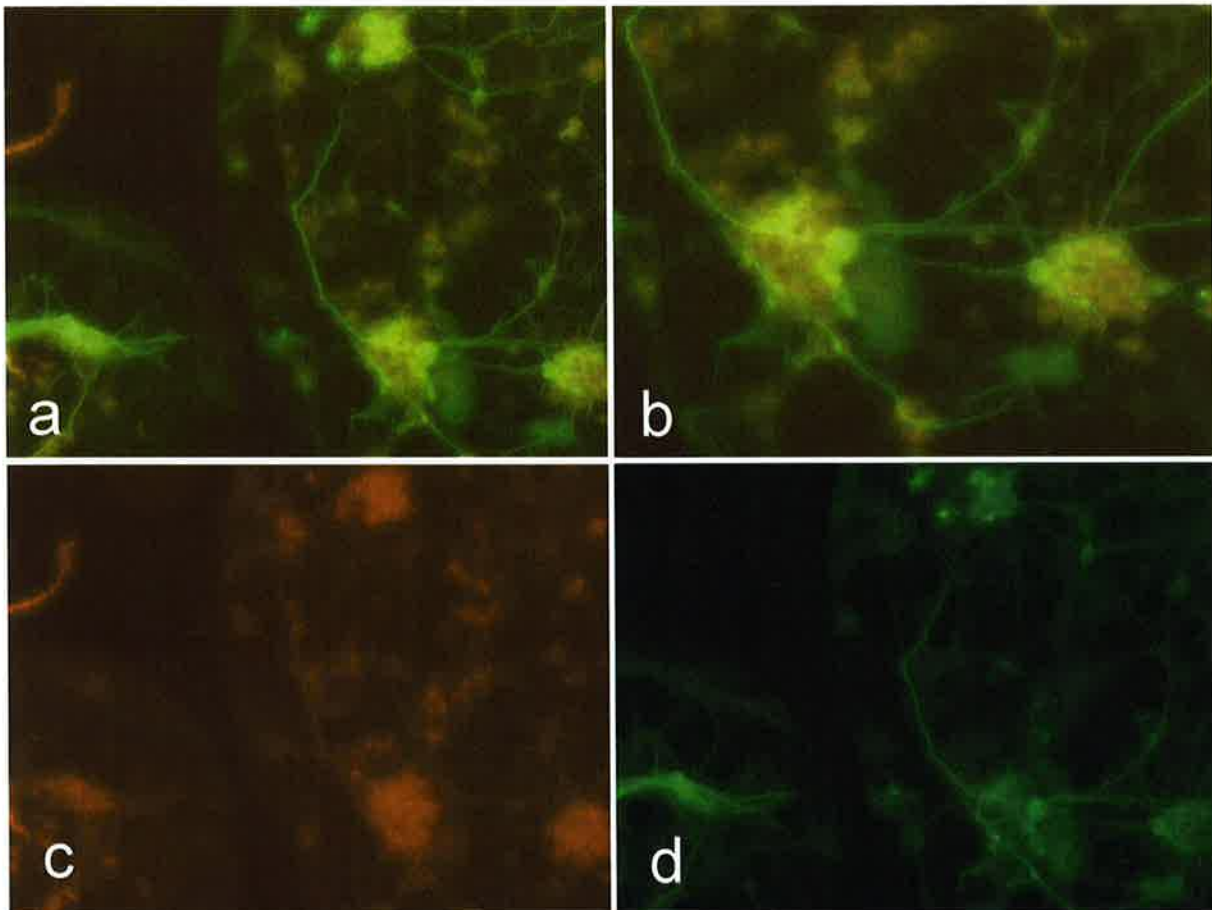


**Abbildung 41:** a) Neuronenkultur auf PECM/Star-PEG nach 9 DIV, Inkubation des Star-PEGs für 15 Min; b) Kultur aus a mit Calceinfärbung zur Darstellung vitaler Zellen; c) Vergrößerung von b, gut erkennbare Neuriten; d) Neuronenkultur auf PECM/Star-PEG nach 16 DIV, Inkubation des Star-PEGs für 15 Min

### 3.3.5. Immunfärbung mit Anti-GFAP und Anti-MAP2

In Abbildung 42 sind Aufnahmen verschiedener Ausschnitte einer in Kammern unterteilten Neuronenkultur nach 16 DIV zu sehen, die mit Anti-MAP2 und Anti-GFAP gefärbt worden ist. Neurone und ihre Fortsätze fluoreszierten grün, während Glia rot fluoreszierten. In jeder der aufgenommenen Subpopulationen erkennt man zahlreiche verteilt liegende Gliazellen, während einzeln liegende Neurone eher spärlich sind. Wie schon vorher in der DIC-Lichtmikroskopie, imponieren Gruppen von agglomerierten Zellen. Diese Zellhaufen setzen sich entsprechend der Wellenlängen der Fluoreszenzen, aus beiden Zelltypen, Neuronen und

Glia zusammen, wenngleich in einigen Agglomerationen Areale von Glia und Neuronen deutlich zu unterscheiden sind. Die Neurone sind räumlich hauptsächlich in diesen Zellhaufen zu finden. Zwischen den Neuronen breiten sich zahlreiche Neurite aus. Besonders auffällig sind die Neurite der Neurone in Bildteil c), die als Bündel in einer Kreisstruktur liegen und einen Zellhaufen mit dem anderen zu verbinden scheinen.



**Abbildung 42:** a) Immunfärbung mit Anti-GFAP (rot) und Anti-MAP2 (grün) von Zellen auf einem Protein/Star-PEG-Cluster nach 16 DIV; b) Vergrößerung von a; c)+d) Bilder der gleichen Kultur aber unterschiedlichen Kreiskammern

#### ***Zellen auf Oberflächen mit Doppelstempel***

Die Versuche, in denen zunächst mit einem inversen Stempel Star-PEG und anschließend mit einem nicht-inversen Stempel PECM auf die Oberfläche übertragen worden war, zeigten im Vergleich zu Stempeln mit PECM in der Lichtmikroskopie ebenfalls eine gute PECM-Übertragung auf homogene Star-PEG-Schichten in ausreichend gestempelte Star-PEG Cluster. Die Kreise aus PECM waren gegenüber den kreisförmigen Aussparungen im Star-PEG leicht verschoben. Die Neuronenkultur auf Si-Chips war vergleichbar mit der Kultur auf



PECM/homogenem Star-PEG. Die Zellen wuchsen spezifisch innerhalb der Kreisstrukturen, ohne auf der Star-PEG-Schicht zu adhären. Nach 16 Tagen *in vitro* hatten sich die Zellen ebenfalls zu Haufen innerhalb der Kreisstrukturen zusammengelagert, die über dicke Bündel von Neuriten miteinander in Verbindung standen.

#### *Zellen auf reinem PECM*

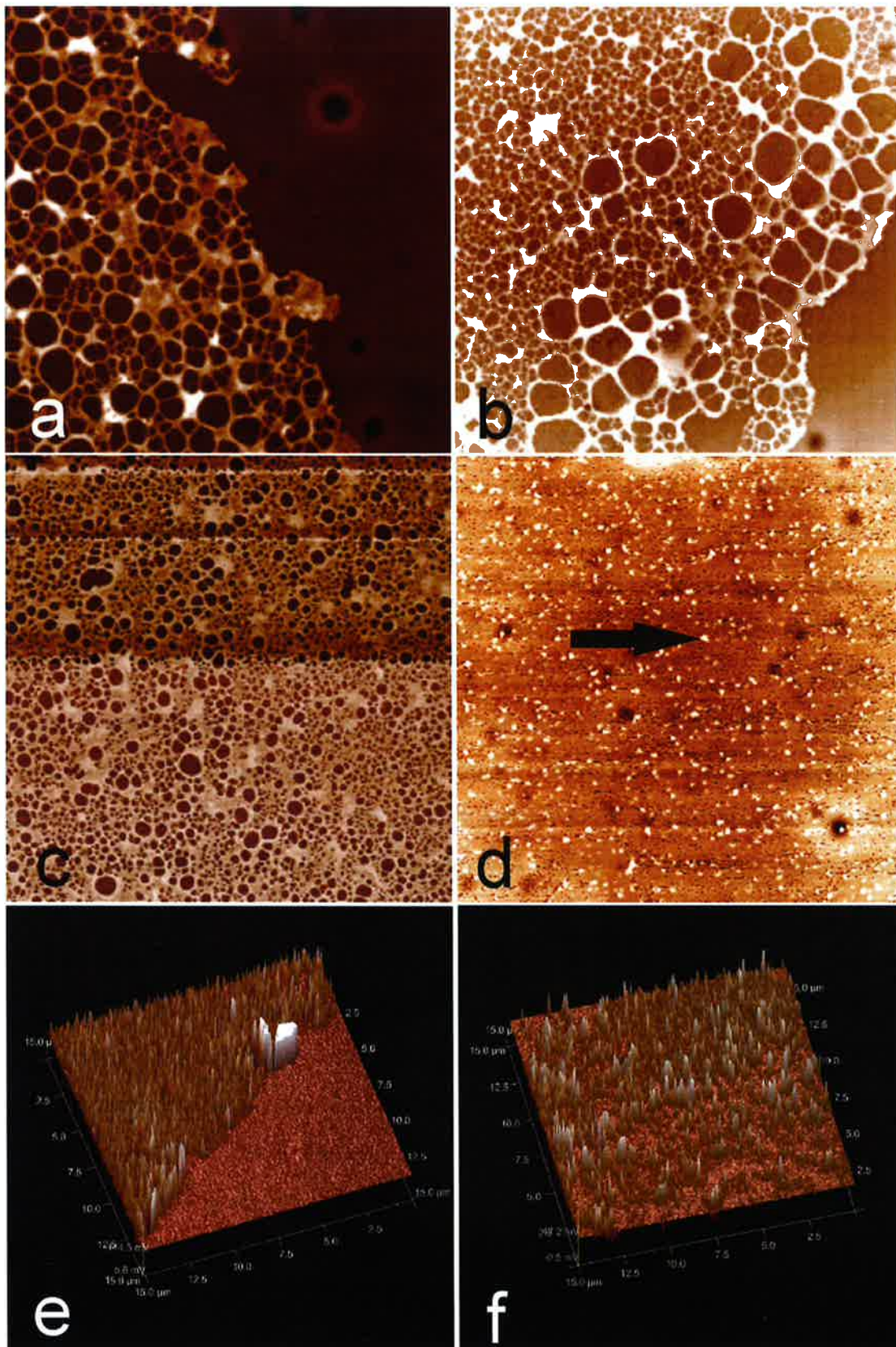
Auch auf reinem PECM konnte nach wenigen Tagen ein erfolgreiches Neuronenwachstum entsprechend der Einteilung des Clusters in Kammern beobachtet werden. Hier wuchsen jedoch auch in den Zwischenräumen, wenn auch in geringerer Dichte als in den Kammern, Neurone, die auf den anderen Chips durch eine Star-PEG-Schicht frei von Neuronen geblieben waren. Diese Beobachtung wurde später auch bei Neuronen gemacht, die auf ausschließlich mit PECM bestempelten MEAs wuchsen. Ab DIV 3 breiteten sich die Neuriten auch über die Grenzen der Kammern hinaus auf den Zwischenräumen, die frei von Zellen und Neuriten bleiben sollten, aus.

### 3.3.6. Protein-Modifikation und AFM-Messungen

Es wurde untersucht, ob durch Verwendung verschiedener Polyaminosäuren, nämlich Polylysin, Polyarginin und Polyglutamat, die mit ECM-Gel gemischt wurden, eine Verbesserung der kovalenten Bindung des Proteins an die Substratoberfläche (APTES und APTES/Star-PEG) erreicht werden konnte. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich Neurone während einer Zeit von zwei Wochen auf den unterschiedlich geladenen Proteinoberflächen würden kultivieren lassen. Abbildung 43 zeigt Oberflächenaufnahmen mit AFM. Zu erkennen ist eine Silizium/Star-PEG-Oberfläche, die mit Polylysin in ECM bestempelt wurde. Von zahlreichen runden Aussparungen durchsetzt beträgt die durchschnittliche Schichtdicke des Proteins 25 nm. Abbildung 43b zeigt die gleiche Probe nach 10 DIV. Das Protein ist zwar noch homogen verteilt, die Schichtdicke hat jedoch während der Zeit im Medium um 5 nm abgenommen. Die Abbildungen 43c und 43d zeigen 3D-Bilder der Oberflächenstruktur von Poly-Arginin auf Silizium/Star-PEG-Oberflächen nach 0 (c) und 10 DIV (d). Auch Abb. 43e und 43f präsentieren die zweidimensionale Struktur von Poly-Glutamat auf Silizium/Star-PEG-Oberflächen nach 0 (e) und 10 DIV (f). Die Schichtdicke

des Poly-Arginins hat nach 10 DIV um ca. 12 nm abgenommen, die des Poly-Glutamats um 20 nm. Da sich im Protein unregelmäßige Aussparungen gebildet hatten, war die Schicht des Poly-Arginins nach 10 DIV nicht mehr homogen auf der Oberfläche verteilt. Das Poly-Glutamat scheint sich an den Stellen, an denen die Oberfläche mit AFM untersucht wurde, vollständig von der Oberfläche gelöst zu haben. Nur noch Protein-Granula (Abb. 43d, schwarzer Pfeil) sind auf der Schicht aus Star-PEG übrig geblieben.

---

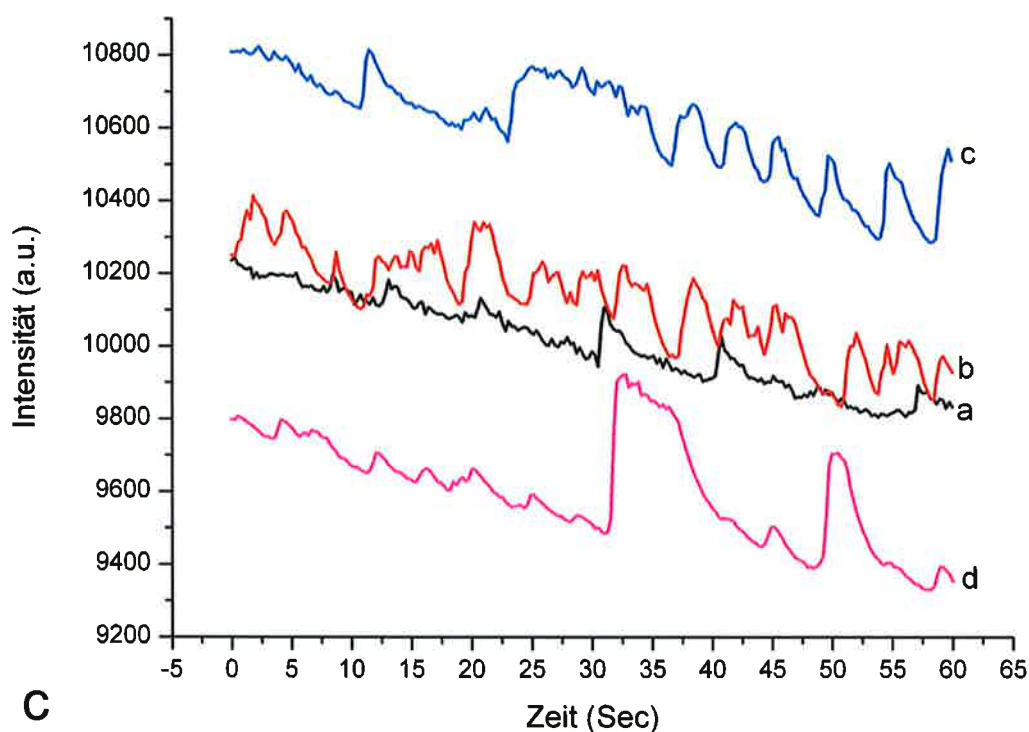
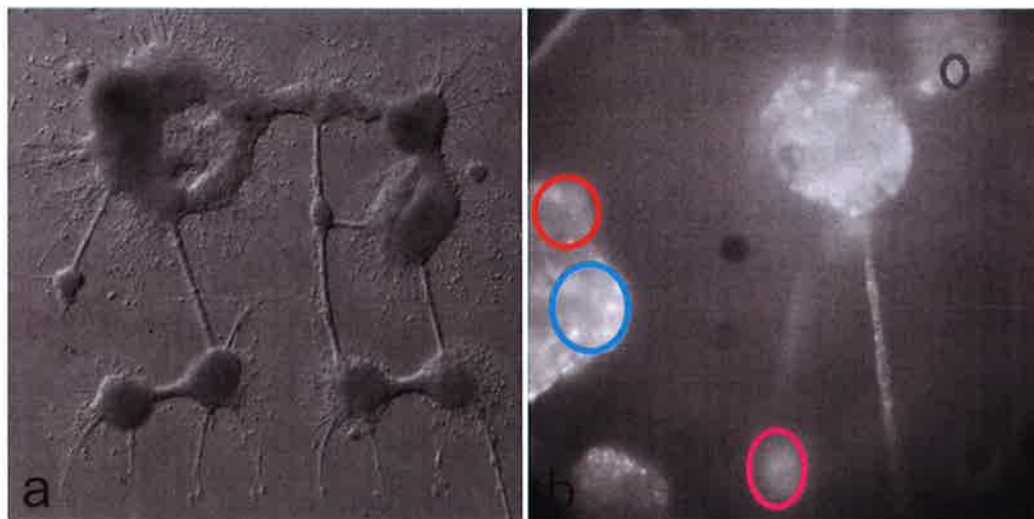


**Abbildung 43:** AFM-Aufnahmen von Proteinschichten auf Silizium-Chips; a) Polylysin DIV 0; b) Polylysin DIV 10; c) Polyglutamat DIV 0; d) Polyglutamat DIV 10; e) Polyarginin DIV 0; f) Polyarginin DIV 10

### 3.3.7. Kalzium-Imaging

Um auf Silizium-Chips eventuelle elektrische Aktivität im Zellverband, bzw. in den unterschiedlichen Subpopulationen feststellen zu können, wurde das Kalzium-Imaging nach 10, 16 und 21 DIV durchgeführt. Bei allen 12 untersuchten Kulturen zeigte sich nach 10 Minuten Inkubation mit Fluo-4-Farbstoff ein Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz durch Aufnahme des Farbstoffs in die Zelle. In den Kontrollkulturen auf Glas zeigte sich an keinem der Tage (DIV 10, 16, 21) eine spontane Aktivität, repräsentiert durch niedrig- oder hochfrequente Änderungen der Intensität der Fluoreszenz. Ebenso blieben die Kulturen nach Anregung mit Bicucullin und Glutamat elektrisch stumm. Auch bei den Kulturen, die ohne Verbindungskanäle zwischen den Kreisen geclustert waren, zeigte sich an keinem Tag eine spontane elektrische Aktivität. Nach Stimulation mit Bicucullin konnte in einer Subpopulation auf einem Silizium-Chip für ca. eine Minute eine schwache niedrigfrequente Aktivität beobachtet werden. Innerhalb dieser Population feuerten einige Zellen in einem bestimmten Bereich der Population synchron, während andere Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft stumm blieben bzw. die Signalintensität zu schwach war, um von der Kamera detektiert zu werden. Auch Einzelzellen zeigten Aktivität. Nachdem die Aktivitäten verstummt waren, konnten weder durch weitere Zugabe von Bicucullin noch von Glutamat weitere Signale provoziert werden. Daneben ließ sich auch nach Anregung keine Aktivität in weiteren Kulturen nachweisen. Bei einer Kultur, die Neurone in einem Cluster mit Verbindungskanälen enthielt, konnte nach Tag 16 erstmals Aktivität in mehreren Subpopulationen gezeigt werden. Diese Signale traten ca. drei Minuten nach Entnahme aus dem Inkubator auf und blieben über mehrere Minuten während der gesamten Untersuchung konstant. In Abbildung **44b** ist eine Subpopulation nach Inkubation mit Fluo-4 zu erkennen. Das niederfrequente Wechseln der Lichtintensität wurde im Film aufgezeichnet. Danach wurden mit einer speziellen Software (Hokawo Imaging Software, Hamamatsu K.K., Hamamatsu-City, Japan) die Intensitäten in unterschiedlichen Arealen sowohl innerhalb und außerhalb der Probe miteinander verglichen. Diese Areale sind mit verschieden farbigen Ellipsen markiert. Abbildung **44c** zeigt die Änderungen der Areale im Zeitverlauf von einer Minute. Zu sehen sind Linienverläufe, die der Farbe der Ellipsen aus **44b** entsprechen. Abbildung **45** ist so strukturiert wie Abbildung **44**, zeigt jedoch einen Ausschnitt einer anderen Probe.

---

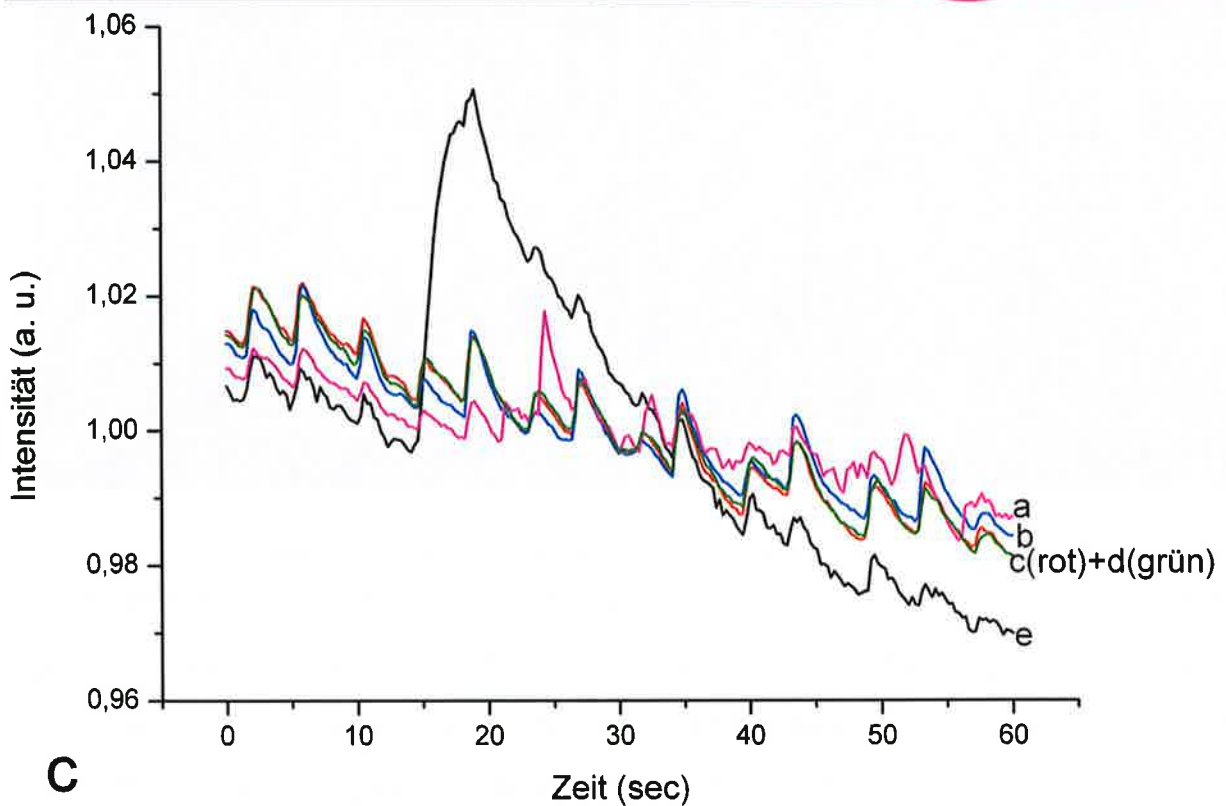
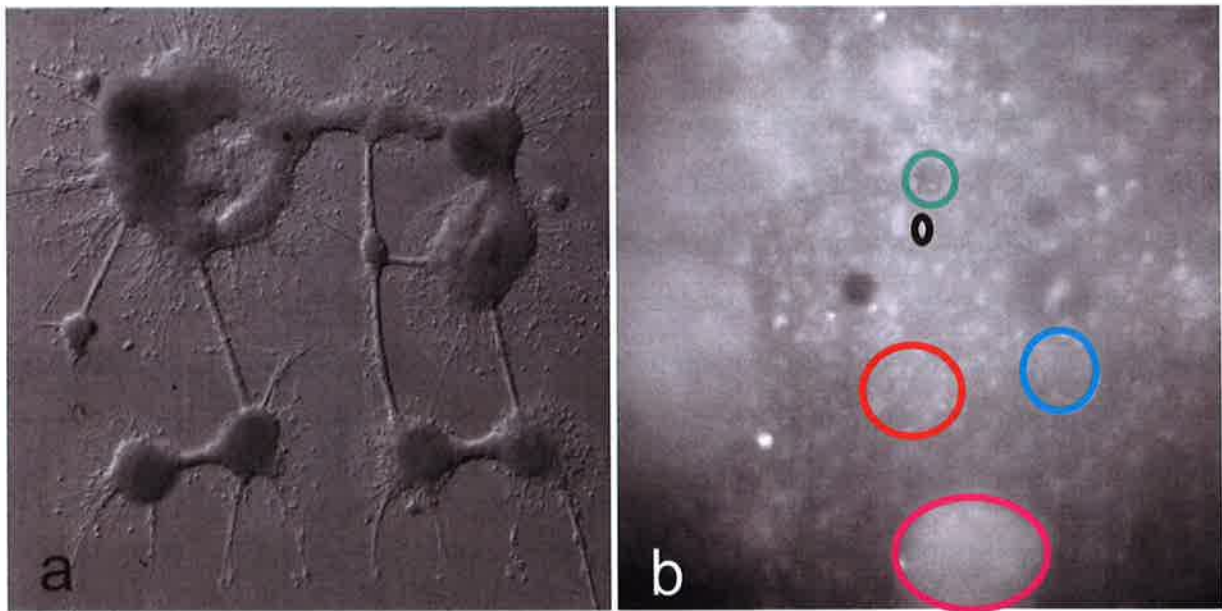


**Abbildung 44:** a) Zellkultur auf Silizium-Chip nach 16 DIV; b) Calcium-Imaging mit Fluo-4, Ellipsen um Gruppen von Zellen, die Kalzium-Oszillationen aufweisen (Ausschnitt aus Cluster); c) grafische Darstellung der Oszillationen der vier markierten Zellgruppen während einer Minute, die Linienfarben entsprechen den Farben der Ellipsen aus b

Es ist erkennbar, dass die Kalziumströme in der Zelle zu oszillieren scheinen. Ca. alle zwei bis drei Sekunden kommt es zu einem raschen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels, der dann bis es zu einem erneuten Anstieg langsam abfällt. Vergleicht man die Kurven der Abbildung 44c miteinander, erkennt man, dass die Areale innerhalb einer Subpopulation (blaue und rote Ellipse) zwar nicht identische Kalziumströme aufweisen, dass jedoch in der zweiten Hälfte des Messvorgangs beide Areale in ähnlichen Frequenzen oszillieren. Auch das

Areal in einer entfernter liegenden Subpopulation (pinke Ellipse) zeigt Oszillationen mit einer vergleichbaren Frequenz. Die schwarze Kurve zeigt Oszillationen, die nicht mit denen der anderen Areale zu korrelieren scheinen. Außerdem fällt hier der feiner gezackte Kurvenverlauf mit kleinen Erhebungen in höherer Frequenz auf. In Abbildung 45, die aus einer einzelnen Subpopulation entstanden ist, sieht man, dass die Kurven der unterschiedlichen Areale (alle farbigen Ellipsen) miteinander zu korrelieren scheinen. Die Frequenzen der Oszillationen der unterschiedlichen Areale sind fast identisch. Die pinke Kurve unterscheidet sich von den anderen durch eine höhere Frequenz niedrigerer Amplituden.

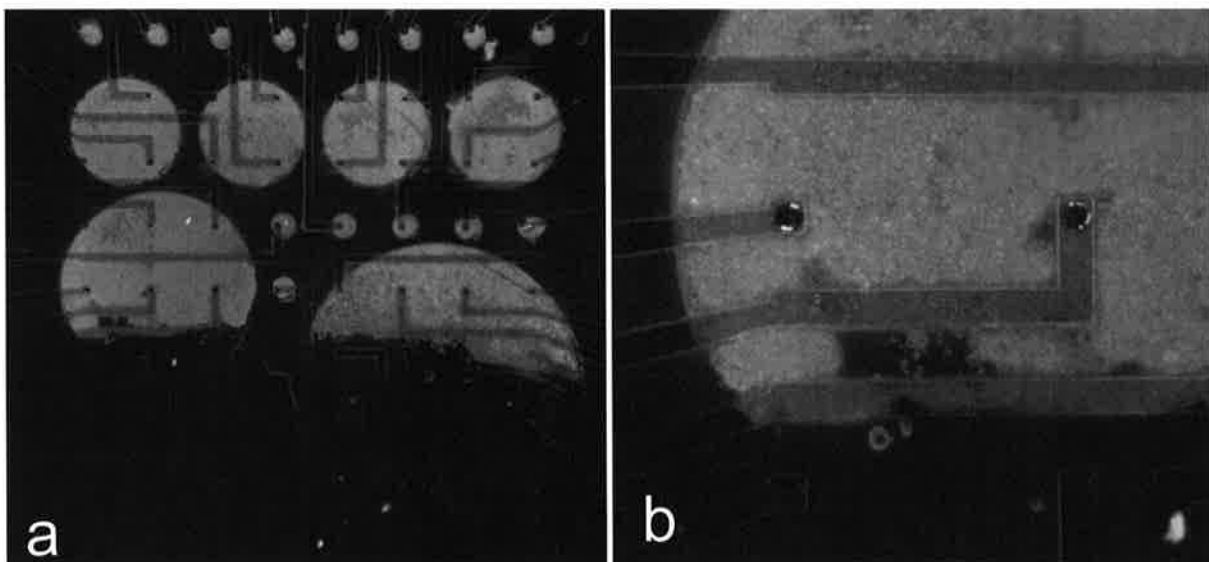
---



**Abbildung 45** a) Zellcluster nach 16 DIV, ein anderer Ausschnitt einer Neuronenkammer als in Abb. 44, b) Calcium-Imaging mit Fluo-4, Ellipsen um Gruppen von Zellen, die Kalzium-Oszillationen aufweisen (Ausschnitt aus Cluster); c) grafische Darstellung der Oszillationen der vier markierten Zellgruppen während einer Minute, die Linienfarben entsprechen den Farben der Ellipsen aus b, es wird deutlich, dass alle Zellen innerhalb dieser Neuronenkammer synchrone Erregungsmuster zeigen

### 3.3.7. Neuronencluster auf MEAs

Nachdem die Clusterung von Neuronen auf Silizium-Chips gelungen war, wurden im nächsten Schritt PECM-Cluster auf MEA-Chips übertragen. Da sich die Technik des Backfillings auf Silizium-Chips als nicht ausreichend effektiv herausgestellt hatte, wurde auf MEAs darauf verzichtet. Zunächst wurden PECM-Cluster auf homogenes Star-PEG gestempelt. In **Abbildung 46** erkennt man, dass die Kreiskammern nicht vollständig auf die Oberfläche übertragen worden sind. Nur die oberen Teile des Clusters sind in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern zu sehen.

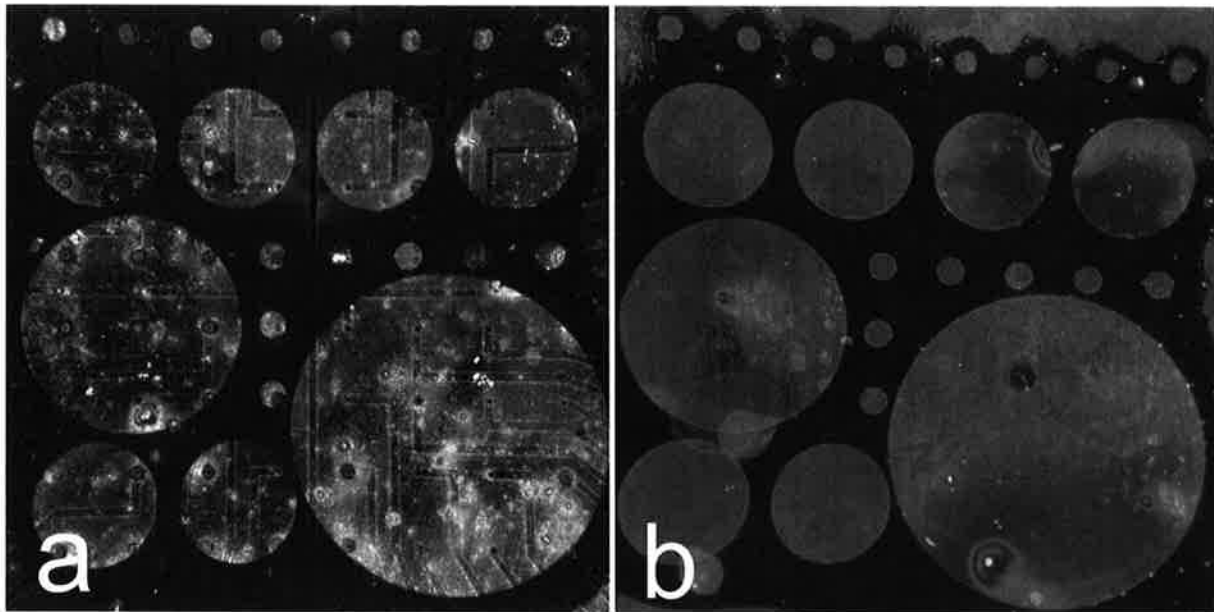


**Abbildung 46:** a) Übertragung von PECM (FitC-markiert) auf die Oberfläche eines MEAs, das Cluster ist in der unteren Hälfte nicht vollständig übertragen worden; b) Vergrößerung von a

Um eine vollständige Übertragung der gesamten Stempelfläche zu erreichen, war es wichtig, dass die MEAs, wie bei den Silizium-Chips, vollkommen ebenmäßig auf dem Untergrund lagen. Daher wurden im folgenden Schritt Aluminiumchips (5 mm Durchmesser; 3 mm hoch) als Sockel verwendet, auf denen die MEAs beim Stempeln abgelegt werden konnten. In **Abbildung 47a** erkennt man kreisrunde Strukturen aus fluoreszierendem PECM, welches auf die Oberfläche eines MEAs gestempelt wurde, die homogen mit Star-PEG beschichtet ist. Die Kreiskammern sind erfolgreich mit den 64 Elektroden des Arrays in Deckung gebracht. Im Vergleich zu dem Cluster auf einem Silizium-Chip, der als Kontrolle angefertigt wurde, erkennt man, dass das PECM zwar deutlich die Kreisstrukturen darstellt, jedoch in den

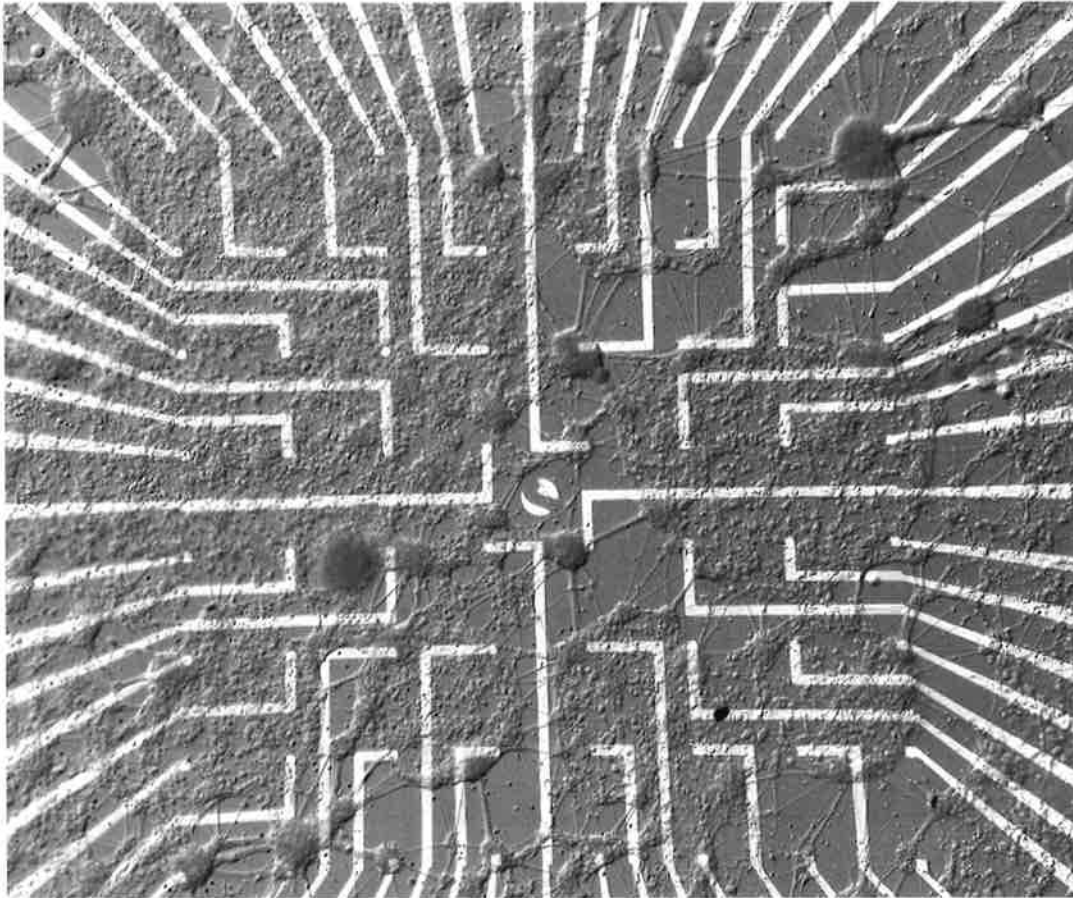


Kreisen keine homogene Schicht ausbildet. Die Kreise sind von Arealen unterschiedlicher Fluoreszenz bedeckt, d.h. das PECM wurde nicht gleichmäßig übertragen.



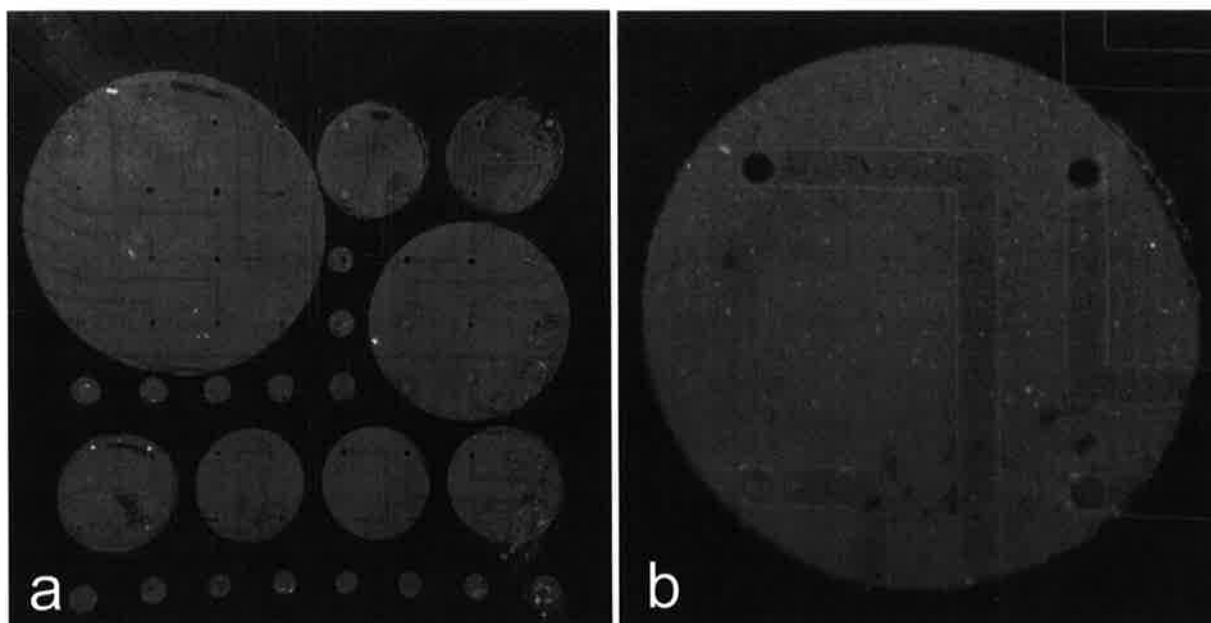
**Abbildung 47:** a) Übertragung eines PECM-Clusters auf ein Jülicher MEA; b) im Vergleich dazu die Übertragung eines PECM-Clusters auf einen Siliziumoxid-Chip ohne Leiterbahnen und Elektroden

In Abbildung 48 ist eine Neuronenkultur auf dem MEA aus Abb. 47a nach 10 DIV zu erkennen. Die Neurone auf diesem Chip haben im Gegensatz zu Neuronen auf zahlreichen anderen MEAs desselben Experiments, die bereits nach zwei Tagen *in vitro* abgestorben waren, überlebt und eine dichte Kultur ausgebildet. Die Kreisstrukturen sind nur unvollständig dargestellt; auch auf der umgebenden Star-PEG-Oberfläche haben Neurone gebunden. Um eine bessere, homogenere Übertragung des Proteins auf den MEA-Chip zu ermöglichen, war im nächsten Schritt der Stempel vor der Inkubation in Protein für 5 Minuten mit SDS behandelt worden. In Abbildung 49 kann man erkennen, dass das PECM die Oberfläche homogen mit einer ausreichenden Menge (höhere Intensität der Fluoreszenz) beschichtet.



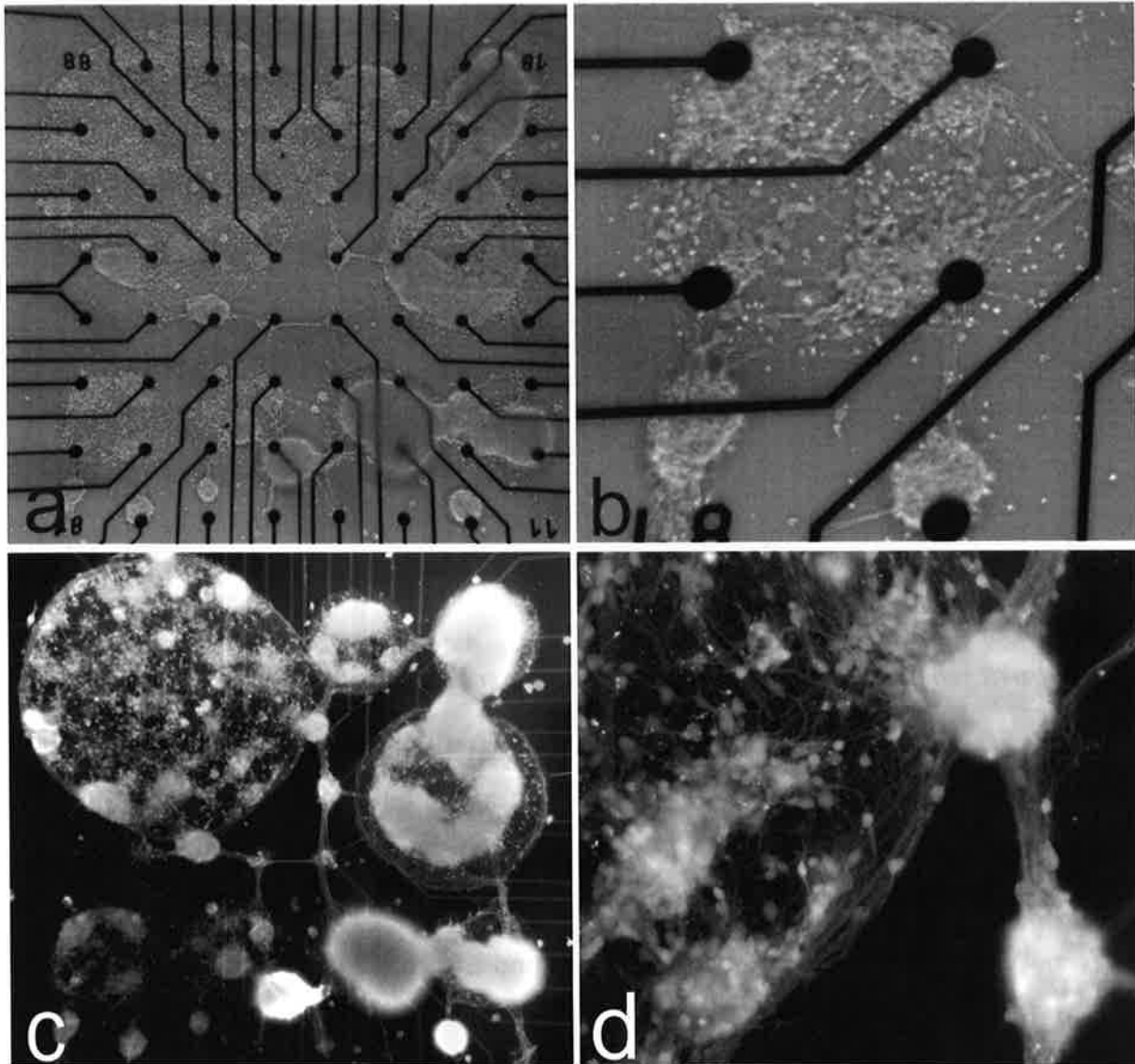
**Abbildung 48:** Zellen auf einem MEA-Chip (Jülich) nach drei DIV, die Zellen sind nicht auf das Cluster begrenzt

Die Neurone, die auf diesen MEAs in einer Dichte von 120.000/MEA ausgesät wurden, starben vollständig innerhalb von zwei Tagen ab. Dieses Ergebnis wiederholte sich während der nachfolgenden 5 Zellkulturen. Um herauszufinden, ob Substanzen in der Verkapselung der MEAs für dieses Absterben der Zellen verantwortlich sein könnte, wurden sterilisierte Carrier, mit denen die Chips normalerweise verkapselt werden, in Petrischalen gebracht, die Si-Chips mit Neuronen-Kulturen (2 DIV) enthielten. Zur Kontrolle wurden Petrischalen mit Neuronen-Kulturen derselben Präparation verwendet, die keinen Carrier enthielten. Nach 7 DIV wurde die Vitalität der Kulturen mit einer Calcein-Färbung untersucht. Es zeigte sich, dass die Neurone in den Schalen, die einen Carrier enthielten, abgestorben waren, während die Kontrollkulturen eine hohe Zellvitalität aufwiesen. Es waren also Stoffe aus dem Carrier, die in das Medium diffundierten und die Neurone schädigten. Daraufhin wurden in folgenden Kulturen außer den in Jülich verwendeten Chips kommerziell erworbene MEAs von Multi-Channel-Systems verwendet, Reutlingen, Deutschland.



**Abbildung 49:** a) Übertragung eines PECM-Clusters auf ein Jülicher MEA bei höheren Stempelstrukturen und festerem Anpressdruck; b) Vergrößerung von a

Tatsächlich gelang es, auf den kommerziell erworbenen Chips von MCS das Cluster aus Protein auf eine homogene Star-PEG-Schicht zu übertragen und auf dem Cluster Neurone zu züchten. Bereits nach drei Tagen *in vitro* bildeten die Zellen neuritische Fortsätze aus, die den Grenzen der Proteinkammern und -kanäle folgten. Eine Lebendfärbung mit Calcein bewies die Vitalität der Zellen. Neben Neuronen und Glia, die einzeln auf der Oberfläche adhärirt haben, ist es bereits nach DIV 3 zur Bildung von Zellhaufen innerhalb der Kreisstrukturen gekommen. Die Zelldichte der Neuronen innerhalb der Kammern erscheint optimal. Die meisten der 60 Elektroden sind von Zellen bedeckt. Man kann außerdem erkennen, dass in den Kanälen zwischen den Kammern Bündel von zahlreichen Neuriten verlaufen und dass die Kanäle mit Ausnahme von wenigen Einzelzellen frei von Neuronen und Glia sind. Wenn man die Abbildungen 48 und 50 vergleicht, erkennt man, dass die Zellen aus Abbildung 50 auf die Strukturen aus Protein begrenzt wachsen, während die Areale zwischen den Kammern und Kanälen –so wie gewünscht- frei von Zellen bleiben. Nach 16 Tagen *in vitro* hatten sich wie schon vorher bei geclusterten Kulturen auf Silizium-Chips, dichte Agglomerate von Zellen gebildet. Nach 21 Tagen *in vitro* hatten einige der Zellhaufen begonnen, sich teilweise von der Oberfläche zu lösen und nur noch über kleine Haftstellen mit dieser verbunden in der Lösung zu treiben.



**Abbildung 50:** a) Neuronenkultur auf PECM/Star-PEG-Cluster nach 3 DIV auf einem MEA von Multichannel-Systems GmbH, Reutlingen, Deutschland; b) Vergrößerung eines Kreises aus a; c) Calcein-Lebendfärbung von a; d) Vergrößerung von c, Zellen und Neuriten/Neuritenbündel deutlich erkennbar

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dichte Neuronenkulturen auf MEAs zu generieren und diese Kulturen entsprechend einer speziell entwickelten räumlichen Anordnung in miteinander kommunizierende Subpopulationen zu unterteilen. Mit Hilfe des Microcontact-Printings und einer Kombination aus zellaversivem Star-PEG und Zell-freundlichem Protein gelang es, ein stabiles homogenes Wachstumscluster auf einen MEA-Chip zu übertragen und für mehrere Tage auf diesem Cluster Neuronenkulturen zu züchten, die eine hohe Zelldichte aufwiesen. Mit Hilfe von Kalzium-Imaging konnte die elektrische Aktivität der Zellverbände gezeigt werden.

### 4.1. Neuronenkultur

Wie von Ito et al. beschrieben, ist die optimale Dichte von Neuronenkulturen entscheidend für die Ausbildung elektrischer Aktivität innerhalb des neuronalen Netzwerks<sup>2</sup>. Auch das Überleben der Nervenzellen ist an eine bestimmte Zelldichte gebunden. Dabei wird besonders die Rolle von Glia in der Kultur diskutiert: Dies umfasst die Bildung von neurotrophen Faktoren durch Glia und Neurone sowie die Entgiftung von Sauerstoff in zu hohen Konzentrationen durch Glia. Wird die Zelldichte in der Kultur zu hoch, kann dies zu einer verstärkten Proliferation von Gliazellen führen<sup>104</sup>, die eine Signalleitung mit MEAs unmöglich machen kann. Es stellte sich zunächst als schwierig heraus, Neuronenkulturen in der geeigneten Dichte auf Jülicher MEAs zu kultivieren. Die ersten Kulturen waren nicht dicht genug, um Signale abzuleiten. In der Literatur konnte gezeigt werden<sup>2</sup>, dass bei Unterschreiten eines Schwellenwerts von 100 Neuronen/mm<sup>2</sup> keine elektrische Aktivität im Netzwerk detektiert werden kann. Dies lag wahrscheinlich unter anderem daran, dass die wenigen Zellkörper zu weit von den Elektroden entfernt lagen, um ein Signal messen zu können<sup>2</sup>. Auch die Dichte der in der Kultur entstehenden Neurite, die die Neurone untereinander ausbilden, ist für das Auftreten von synchronen elektrischen Ereignissen sowie deren Form und Frequenz ausschlaggebend. In dünneren Kulturen konnte in der vorliegenden Arbeit eine geringe Vernetzung der Neurone untereinander beobachtet werden, wie auch bei Ito<sup>2</sup>, eine weitaus geringere Neuritendichte beobachtet worden war. Nachdem Zellzahlen von über 120.000/Chip ausgesät worden waren, wurde die Bildung

---

eines dichten Zellrasens nach ca. 10 DIV beobachtet, der auf die Proliferation von in der Kultur enthaltene Glia zurückzuführen zu sein schien. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl von Gliazellen während der Entwicklung einer Neuronen-Kultur *in vitro* durch Proliferation zunimmt<sup>2,130</sup>. Auf den Chips von Multichannel Systems konnte kein derartiges Wachstum beobachtet werden. Auch bei ausgesäten Zellzahlen von 200.000, wurde keine entsprechende Proliferation beobachtet. Das Volumen des Neurobasalmediums ist auf diesen Chips mit 1 ml größer gewesen als auf den herkömmlichen, in Jülich eingekapselten MEAs (500  $\mu$ l). Außerdem gab es keine Unterteilung in einen inneren und einen äußeren Ring. Es scheint daher so, dass die Konzentration von bestimmten Wachstumsfaktoren, die auf den kleinvolumigen MEAs aus Jülich (500 – 700  $\mu$ l) und abhängig von der Dichte der sie bildenden Zellen in der Kultur kumulieren, die Proliferation von Glia günstig beeinflusst. Die Mulde, die der innere Ring auf Jülicher Chips bildet, könnte weiterhin beitragen zu dieser Verdichtung, wenn man annimmt, dass sich die Wachstumsfaktoren in der Senke des inneren Rings konzentrieren. Die löchrigen Aussparungen, die bei einigen Kulturen beobachtet wurden, erklären sich am ehesten durch eine Mangelversorgung einiger Zellgruppen innerhalb des mehrschichtigen Zellrasens, die zum Absterben dieser Zellen geführt haben. Aus solchen dichten Zellrasen konnten keine elektrischen Signale gemessen werden. Dichte Rasen aus Gliazellen (Glia-Narbe) führten bei Ableitungen mit MEAs *in vivo* zu einer Zunahme der Elektrodenimpedanz und zu einer damit verbundenden Abnahme der gemessenen Signalqualität<sup>105</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass einige Bestandteile der Glianarbe, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entstehung aus verschiedenen Zelltypen besteht, inhibitorisch auf die Axogenese wirken<sup>131</sup>. In der Literatur wird außerdem beschrieben, dass ab einer Zelldichte von 1.000 Neuronen/ $\text{mm}^2$  die elektrische Aktivität nicht weiter ansteigt; im Gegenteil nehmen die Frequenz und die Dauer von Bursts ab, wofür von Ito et al. die Zunahme inhibitorischer Subpopulationen verantwortlich gemacht wird<sup>2</sup>. Es bleibt fraglich, ob auch die steigende Zahl der Gliazellen für eine Verringerung der elektrischen Aktivität durch Bildung inhibitorischer Faktoren verantwortlich sein könnte. Seil und Blank hatten gezeigt<sup>107</sup>, dass Cytarabin, das einer Kultur aus zerebellären Zellen zugegeben wird, die Ausbreitung von Astrozyten und Oligodendrozyten reduziert. Die Autoren argumentierten, dass dadurch die gestiegene Neuritendichte der Neurone erklärbar sei, die normalerweise mit den teilungsfähigen Gliazellen um Nährstoffe im Medium konkurrieren. Darüber hinaus wurden auch Körnerzellen getötet, während Purkinjellen in großer Zahl

---

---

überlebten<sup>102,107</sup>. Der Einsatz von Cytarabin bei den Kulturen zur Unterdrückung der Proliferation von Astrozyten in der Kultur zeigte keine Reduktion der glialen Zellschicht, sondern tötete alle der in Kultur befindlichen Zellen (auch Neurone) ab. In anderen Veröffentlichung wird berichtet, dass die Astrozyten trotz Zugabe von AraC in großer Zahl überlebten<sup>100,132</sup>. Das würde für die Kulturen, in denen viele Astrozyten durch Anti-GFAP-Färbung nachgewiesen werden konnten, ein Problem darstellen. Der Tod der neuronalen Zellen (Kortex) ist wohl durch die bereits beschriebene Neurotoxizität von ARAC zu erklären<sup>133</sup>. Die elektrische Aktivität, die mit Hilfe der MEAs aus HL-1-Kulturen gemessen werden konnte, bewies, dass die MEAs durchaus funktionstüchtig waren. Dass zunächst keine Signale aus ausreichend dichten neuronalen Kulturen gemessen wurden, war daher am ehesten darauf zurückzuführen, dass die gemessenen Signale nicht stark genug von der Zelle auf die Elektroden übergeleitet wurden. Spannungen, die durch Depolarisationen von Neuronen an extrazellulären Elektroden gemessen werden können, sind erfahrungsgemäß geringer als solche von anderen elektrogenen Zellen (HL-1-Zellen) und damit schwieriger zu detektieren<sup>134,135</sup>. Entscheidend für die Signalqualität an den Elektroden ist hierbei zunächst die Auswahl der richtigen Elektrodengröße. Große Elektrodendurchmesser haben den Vorteil, dass das Signal besser detektiert werden kann, da mit steigender Elektrodengröße die Impedanz der Elektrode sinkt. Zudem ist bei großen Elektroden die Wahrscheinlichkeit höher, dass Neurone exakt auf der Elektrodenfläche adhärieren und damit ein deutliches elektrodennahes Signal gemessen werden kann. Bei kleineren Elektrodendurchmessern kommen die Neurone oft neben oder weiter entfernt von den Elektroden zur Adhäsion. Dies wirkt sich negativ auf die Signalintensität aus. Der entscheidende Nachteil bei großen Elektroden ist die Einschränkung der von vornherein geringen räumlichen Auflösung von Signalen in der Kultur. Während die kleinen Elektroden durch ihre geringe räumliche Ausdehnung meistens nur von Einzelzellen bedeckt werden und damit Signale von Einzelzellen im Netzwerk messen, können über den großen Elektroden ganze Zellhaufen liegen. Somit wurden Signale ganzer Zellverbände gemessen, über Einzelsignale konnte jedoch keine Aussage getroffen werden.

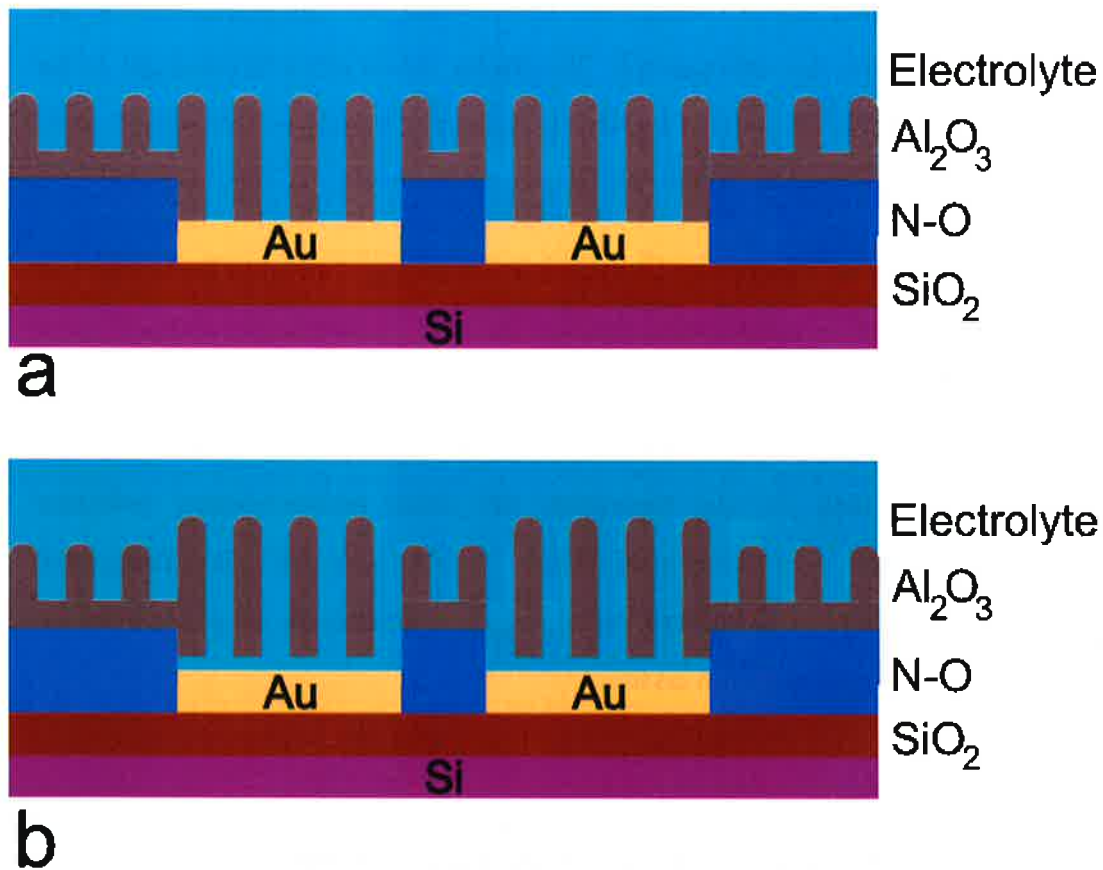
---

## 4.2. Verbesserung des Zell-Elektroden-Interfaces

Zur Verbesserung des Interfaces zwischen Zelle und Elektrode wurden zwei Verfahren zur Modifikation der Oberfläche eingesetzt. Wie schon oben erwähnt, sollte durch die Strukturierung mit Nanoporen eine Erhöhung der *Seal-Resistance* erreicht werden. Gleichzeitig war auch von Interesse, welchen Einfluss dieselben Nanoporen auf die Impedanz der Mikroelektroden haben würden. Das Aluminiumoxid ist schließlich ein elektrischer Isolator<sup>136</sup> und da nur die Elektrodenfläche unter den Nanoporen freiliegte und damit zur kapazitiven Kopplung im Stande, wurde angenommen, dass die Impedanz deutlich erhöht werden würde. Das wiederum hätte eine Verschlechterung der Signalqualität bedeutet und den positiven Einfluss der erhofften vergrößerten *Seal-Resistance* verringert. Ob diese Hypothese zutrifft, wurde mittels der Impedanzspektroskopie überprüft. Die unregelmäßige Anordnung der Nanoporen, im Vergleich zu Poren in der Literatur<sup>137</sup>, lässt sich durch die Art der Anodisierung des dünnen Aluminiumfilms (800 nm) erklären, die den Nanoporen nicht genug Zeit lässt, sich in einer hexagonalen Struktur anzuordnen. Wider aller Erwartungen konnte beobachtet werden, dass die Impedanz geringer war als bei den regulären Goldelektroden aus dem gleichen Prozess, von denen die Aluminiumschicht ohne eine Anodisierung durch  $\text{HgCl}_2$  entfernt worden war. Daher konnte geschlossen werden, dass der Anodisierungsprozess die Goldoberfläche modifiziert haben könnte. Zur Kontrolle wurden bei anodisierten Chips nach der Anodisierung die Nanoporen von der Oberfläche durch konzentrierte Kalilauge entfernt und die Impedanz erneut gemessen. Dabei konnte eine Übereinstimmung der Impedanzen der Elektroden mit Nanoporen und der Elektroden, von denen die Poren entfernt worden waren, festgestellt werden. In den daraufhin angefertigten REM-Bildern konnte deutlich erkannt werden, dass die Elektrodenoberfläche der Goldelektroden nach Entfernung der Nanoporen rauer ist als bei normalen Goldelektroden. Diese Rauigkeit der Oberfläche könnte einerseits durch thermische Entwicklungen an den Elektroden während des Anodisierungsprozesses und andererseits durch Redoxreaktionen am Gold zu erklären sein. Die dadurch vergrößerte Oberfläche der Elektroden könnte einen Anstieg in der Elektrodenkapazität und damit zur Abnahme der Impedanz führen. Im Falle, dass die nanoporöse Schicht, wie schon in anderen Veröffentlichungen beobachtet, sich durch Gasentwicklung beim Anodisierungsvorgang vom Substrat einige Nanometer ablöst, könnten sich elektrische Signale durch die Badlösung, die



dann in direktem Kontakt zur Elektrodenoberfläche unter der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Schicht stünde, fortleiten.



*Abbildung 51 a) MEA-Oberfläche bedeckt von nanoporösem Aluminiumoxid; b) teilweise Ablösung der nanoporösen Schicht mit Bildung von elektrolythaltigen Kammern*

Das erklärt, warum die schlechten Leitereigenschaften des Aluminiumoxids keinen negativen Einfluss auf die Elektrodenimpedanz darunter haben. Weiterhin wurde untersucht, ob lebende Zellen auf der nanoporösen Oberfläche gut wachsen oder nicht und ob aus Kulturen mit HL1 Zellen und Neuronen elektrische Signale abgeleitet werden konnten. Aus HL-1-Zellen ließen sich erfolgreich Signale ableiten, wie es auch bei unbehandelten MEAs (Goldelektroden) der Fall ist. Erstaunlich war die geringe Amplitudenhöhe von max.  $300 \mu\text{V}$ , im Vergleich zu Messungen auf planaren Goldelektroden in der Literatur<sup>135</sup>. Der Effekt einer erhöhten Seal-Resistance machte sich demnach nicht bemerkbar, was daran lag, dass die Durchmesser der Nanoporen zu gering waren, als dass die Membranen der Zellen hätten hinein wachsen und eine Versiegelung bewirken können. Dass von den Neuronen keine Signale gemessen werden konnten, erklärt sich dadurch, dass die Impedanz der Elektroden

(wenn auch im Vergleich zu normalen planaren Goldelektroden etwas gesenkt) immer noch zu hoch für qualitative Ableitungen neuronaler Aktionspotenziale war. Eine Erhöhung der Seal-Resistance blieb ebenfalls durch mangelndes Einwachsen der Zellmembranen in die Poren aus. Obwohl sich MEAs mit nanoporöser Oberfläche als nützliche Werkzeuge in der Biosensorik herausstellen könnten, sind sie zur Ableitung starker Signale aus Neuronen, nicht geeignet.

Anders verhielt es sich mit den platinieren Oberflächen. Es gelang, eine gute Detektion von Aktionspotentialen mit einer ausreichenden Amplitudenhöhe zu erreichen. Entsprechend der Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen<sup>108,109</sup> nahm die Elektroden-Kapazität durch eine Vergrößerung der Oberfläche zu und die Impedanz entsprechend ab. Mit den platinieren Elektroden gelang es, aus Neuronen der oben beschriebenen Zellkultur Aktionspotentiale abzuleiten. Die unterschiedlichen Größen der an den Elektroden entstandenen Strukturen könnten sich durch verschiedene Widerstände an den Kontakten und in den Versorgungsleitungen erklären lassen.

### 4.3. Herstellung von neuronalen Subpopulationen

In der vorliegenden Arbeit war die Auswahl eines geeigneten Verfahrens wichtig, um ein gerichtetes Neuronenwachstum in den Kreiskammern des oben vorgestellten Designs zu ermöglichen. Berdondini et al. (Sensors and actuators B: Chemical, 2006) veröffentlichten ein Neuronen-Cluster aus fünf miteinander über Verbindungskanäle in Kontakt stehende Kammern<sup>95</sup>, die mittels Reinraumtechnologie aus SU-8 produziert worden waren. SU-8 ist ein Fotolack, der in der Reinraum-Technologie Verwendung findet. Da die SU8-Schicht sehr hoch (350 µm) sein musste (lange Prozessierungszeit unter Reinraumbedingungen) und jede Kammer von Hand mit Neuronen gefüllt werden musste, wurde diese Technologie in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Abrams et al. (Nanoletters, 2007) verwendeten zur Herstellung von Neuronenclustern die Technologie von Kohlenstoffnanoröhren, an denen auf MEAs Neurone erfolgreich auch über einen langen Zeitraum adhären konnten. Dieses Konzept wurde ebenfalls in einem Reinraum verwirklicht und war daher in der jeweiligen Produktion zeitintensiv<sup>51,52</sup>. Ein wesentlicher Grund, diese Technologie in der vorliegenden Arbeit nicht zu verwenden, war, dass Kohlenstoffnanoröhren elektrisch leitend sind. Hanein

---

hatte ausschließlich die Elektroden damit beschichtet, um darauf Neurone adhären zu lassen. Es wurde jedoch in den Kreiskammern auch zwischen den Elektroden eine Oberflächenbeschichtung benötigt, an die die Neurone adhären konnten. Über die Kohlenstoffnanoröhren wären in dem beschriebenen Design dadurch alle Elektroden kurzgeschlossen gewesen, was elektrische Ableitungen unmöglich gemacht hätte. Daher sollte das Cluster durch eine Kombination aus Arealen zellaversiver Substanzen und Arealen zellfreundlicher Substanzen konstruiert werden. Diese Areale konnten je nach Substanz durch  $\mu$ CP (im Falle von Star-PEG) oder MIMIC (im Falle von Agarose) auf das Substrat übertragen wurde.

Bei der Herstellung eines Clusters aus Agarose traten verschiedene Probleme auf. Die Agarose unterminierte nicht in ausreichendem Maß den Stempel. Da anfänglich Agarose an allen vier Stempelrändern aufbracht wurde, wurde vermutet, dass die unter dem Stempel befindliche Luft nicht entweichen könne und daher die Agarose nicht unter den Stempel gelangte. Das Resultat verbesserte sich jedoch auch nicht, als die Tropfen nur noch an zwei gegenüberliegenden Seiten aufbracht wurden, damit die Luft entweichen konnte. Nun wurde geschlussfolgert, dass die flüssige Agarose während der Übertragung auf den Chip auskühlte und aushärtete, bevor sie durch Kapillarkräfte den Spalt zwischen Substrat und Stempel hätte ausfüllen können. Zwar unterminierte die Agarose den Stempel nach Verwendung einer Heizplatte, jedoch immer noch nicht ausreichend, um die Struktur vollständig abzuformen. Es gestaltete sich als schwierig, die Schmelztemperatur der Agarose von 37 °C mit einer Heizplatte bei Raumtemperatur der Umgebung aufrecht zu erhalten. Die Topografie des Stempels erschwerte diesen Vorgang noch: Im Gegensatz zu den gleichmäßig angeordneten Kreisen im Experiment von Kang <sup>32</sup> waren die Strukturen des Clusters inhomogen angeordnet und geformt. Die Agarose musste demnach unterschiedlich weite Strecken von den Stempelrändern zurücklegen; ein kleiner Kreis wird schneller umschlossen als eine große Kreiskammer. Auch im alternativen Versuchsaufbau von Moriguchi <sup>33</sup>, in dem die Agarose durch den Anpressdruck des Stempels von den Strukturen verdrängt wurde, bestand das gleiche Problem. Bevor die Agarose vollständig verdrängt war, war sie (wahrscheinlich durch den kühlen Stempel aus POP) ausgehärtet und bedeckte die Oberfläche der Kreisböden, die frei von Agarose bleiben sollten.

---

---

Das zweite Problem, das beim Clustern mit Agarose auftrat, war, dass die Agarose, die Strukturen geformt hatte, sich schnell wieder von der Oberfläche ablöste. Dies könnte einerseits beim Abheben des Stempels durch starke Zugkräfte (starke Adhäsion an die Stempeloberfläche) geschehen sein und andererseits durch eine zu schwache Bindung an die silanisierte Substrat-Oberfläche. Es hätte eventuell eine andere Sorte von Agarose mit geringerer Schmelztemperatur verwendet werden können, es wurde jedoch mit dem  $\mu$ CP mit Star-PEG für ein alternatives Verfahren eingesetzt, um eine zellabstoßende Schicht zu erzeugen. Für die Übertragung des Star-PEGs schien die Technik des  $\mu$ CP am effektivsten und am kostengünstigsten zu sein. Die Stempel und die benötigten Tinten konnten schnell und reproduzierbar hergestellt werden. Der Stempelvorgang selbst war an einem Arbeitstag durchführbar. Ein Cluster vergleichbaren Designs war bisher nicht mittels  $\mu$ CP hergestellt worden. Bei der Verwendung von PDMS-Stempeln stellte sich mir das Problem, dass in die Kreise mit größeren Durchmessern Star-PEG übertragen wurde, obwohl die Oberfläche in den Kreisen Star-PEG-frei und zelladhäsiv bleiben sollten. Es wurde vermutet, dass sich die Stempeloberfläche durch mechanische Verformung bei einem hohen mechanischen Druck bis auf das Substrat durchgedrückt hatte. In der Literatur wird dieses Phänomen als *Sagging* oder *roof-collapse* bezeichnet und in Abhängigkeit zur räumlichen Ausdehnung der Strukturen auf dem Stempel gebracht<sup>138-140</sup>. Auch bei einer Verringerung des Druckes des Stempels auf das Substrat trat das *Sagging* auf. Da die Durchmesser der Strukturen nicht verändert werden konnten, ohne das Cluster funktional zu verändern, wurde ein härteres Material zur Herstellung der Stempel verwendet, nämlich POP. Nachteilig bei der Verwendung von POP ist, dass die Weiterverarbeitung der Grundsubstanz des POP zu Platten, die dann im Reinraum abgeformt werden können, sehr kostenaufwändig ist. POP ist zwar in der Literatur zum Einsatz beim  $\mu$ CP mit Protein beschrieben<sup>112</sup>, jedoch war POP bisher nicht zum  $\mu$ CP mit Star-PEG verwendet worden. Es war daher nicht bekannt, wie die Stempeloberfläche optimal vorbereitet werden musste, um eine gleichmäßige Verteilung der Star-PEG Tinte darauf zu ermöglichen, ohne eine kovalente Verbindungen zwischen Stempel und Star-PEG zu erzeugen, damit die Tinte ausreichend vom Stempel auf das Substrat übertragen werden konnte. Nur so konnten die kreisförmigen Strukturen des in der vorliegenden Arbeit entworfenen Clusters in Star-PEG kontrastreich hergestellt werden. Bei PDMS-Stempeln hatte Rinklin (ICS 8, FZI, unveröffentlicht) beobachtet, dass bei zu geringer Hydrophilie der Oberfläche die Tinte nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt war, bei

---

---

Aktivierung in Sauerstoffplasma die Oberfläche jedoch so energiereich war, dass kein Star-PEG mehr übertragen werden konnte. Optimale Ergebnisse erzielte er bei Aktivierung in 30 % Schwefelsäure. Daher wurden die Resultate bei der Stempelaktivierung in Plasma und Säure verglichen sowie ohne vorherige Aktivierung der Oberfläche. Die Ergebnisse zeigten, dass eine optimale Verteilung von Star-PEG auf dem Stempel und eine dadurch optimale Übertragung des Star-PEGs auf das Substrat ohne die vorherige Aktivierung der Stempeloberfläche erzielt werden konnte. Bei Aktivierung in Plasma und Säure war die Bindung zwischen Stempel und Star-PEG zu hoch für eine ausreichende Übertragung gewesen. Dies zeigten die REM-Aufnahmen, in denen die Star-PEG-Schicht inhomogen und löchrig auf den Substraten imponierte. Die Oberflächenenergie von inaktiviertem POP scheint demnach höher zu sein als bei PDMS im inaktivierten Zustand.

## 4.4. Neurone auf geclusterten Chips

### 4.4.1. Zellen auf geclusterten Siliziumoxid-Chips

Nachdem die Übertragung des Star-PEGs auf APTES gelungen war, sollten Neurone in ausreichender Dichte auf den Kreisstrukturen wachsen gelassen werden, während die dazwischen liegenden Areale aus Star-PEG ausgespart wurden. Zunächst wurde geprüft, ob auf reinem APTES Zellen adhären würden. Ranieri (Journal of biomedical materials research, 1993) hatte beschrieben, dass APTES zwar durch kovalente Bindung von Proteinen (an die Aminogruppen des Silans) indirekt die Adhäsion von Zellen begünstigte, dass das APTES direkt die Neurone jedoch nicht in ausreichendem Maße gebunden hatte<sup>87</sup>. Es konnte zwar eine geringe Adhäsion von Neuronen an reines APTES beobachtet werden, die den Grenzen der Kreiskammern folgte, die Neurone lösten sich nach wenigen Tagen jedoch von der Oberfläche oder starben bei zu geringer Adhäsion nach 1 DIV. Ergänzend zum APTES wurde also ein Protein benötigt, das innerhalb der Kreise/Kanäle an die APTES-Oberfläche band, das Star-PEG jedoch aussparte. Die Technik des Backfillings mit Protein warf das Problem auf, dass das Protein auch an Star-PEG adhärte, wo eigentlich kein Protein binden sollte, und zweitens, dass die Menge des spontan an APTES bindenden Proteins sehr gering war. Das erste Problem erklärte sich dadurch, dass innerhalb des kurzen Zeitraums bis

---

das Protein nach dem Stempelvorgang zum Rückfüllen auf die Oberfläche gebracht wurde, die Isocyangruppen des Star-PEGs noch nicht ausreichend auspolymerisiert waren. Weiterhin erklärte es sich dadurch, dass restliches Protein von der Oberfläche nicht ausreichend entfernt worden war. Um dem vorzubeugen, wurden die Star-PEG-Oberflächen für eine Nacht in Wasser belassen, damit das Star-PEG auspolymerisieren konnte. Außerdem wurde nicht gebundenes Protein gründlich mit steriler PBS-Lösung und entmineralisiertem Wasser von der Oberfläche abgewaschen.

Das zweite Problem bedurfte des Einsatzes eines Crosslinkers: GBMS. Zwar gelang es in einigen Versuchen, das Protein daraufhin in größerer Menge an die Strukturen stärker kovalent zu binden, wodurch eine Zunahme der Schichtdicke des fluoreszierenden Proteins zu beobachten war. Jedoch band der Crosslinker in vielen Experimenten auch an das Star-PEG und sorgte so für eine unspezifische Bindung des Proteins auch über die Clustergrenzen hinaus. Der Crosslinker schien mit hoher Affinität an nicht vollständig polymerisierte Isocyan-Gruppen im Star-PEG zu adhären. Auch eine längere Inkubation der Star-PEG-Cluster in Wasser konnte dieses Problem nicht beheben, weshalb von der Technik des Rückfüllens Abstand genommen wurde und das  $\mu$ CP mit Protein auf homogenes Star-PEG und dem Doppelstempeln mit Protein in inverse Cluster aus Star-PEG hinein verwendet wurde. Beide Ansätze waren erfolgreich, wobei das Stempeln von Protein auf Star-PEG leichter in der Handhabung war, da beim Doppelstempeln das Star-PEG-Cluster erfolgreich übertragen werden und das inverse Cluster mit dem nicht-inversen Cluster aus Protein genau in Deckung gebracht werden musste, was bei leichten statischen Veränderungen der verschiedenen Stempel zu deutlichen Verschiebungen der Cluster gegeneinander führte. Nach der erfolgreichen Herstellung von Protein-/Star-PEG-Clustern konnten Neurone erfolgreich und in ausreichender Dichte auf den Siliziumchips für drei Wochen *in vitro* gezüchtet werden. Nach 14 Tagen begannen die Neurone, sich unerwarteterweise von ihren ursprünglichen Adhäsionsstellen im Kreis zu lösen und sich in Zellhaufen (hauptsächlich in der Kreismitte) zu organisieren. Die neuritischen Fortsätze verblieben trotz der Wanderung der Zellkörper an ihren ursprünglichen Stellen im Kreis und erschienen zum Teil sternförmig, zum Teil kreisförmig zu den Zellkörpern laufend. Eine Immunfärbung gegen GFAP (Astrozyten) und MAP2 (Neurone) zeigte, dass diese Zellhaufen gleichermaßen aus Glia und Neuronen bestanden. Es wurde vermutet, dass der Grund für die Bewegung der Zellkörper und ihrer Zusammenlagerung ein Abbau der auf der Oberfläche befindlichen Proteinschicht

war. Das konnte zum einen an thermodynamischen Diffusionsprozessen des Proteins (abhängig von der Stärke der kovalenten Bindung an die Substratoberfläche) liegen oder an der Aktivität zellulärer Proteasen. An der Stelle, wo die Konzentration von künstlich aufgetragenen Proteinen der extrazellulären Matrix abnahm, lagerten sich Zellen dichter aneinander, um in der natürlichen extrazellulären Matrix der Nachbarzellen einen stabileren Verbindungsanker zu finden. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden Schichtdicke-Messungen mit einem Atomic-Force-Mikroskop (AFM) durchgeführt und die Degradation des Proteins in Neurobasalmedium beobachtet.

#### 4.4.2. Kalzium-Imaging

Das Kalzium-Imaging auf Siliziumchips warf zwei wesentliche Fragen auf. Warum war in zwei Kulturen eine ausgeprägte Aktivität zu beobachten, während in vielen Kulturen keine Aktivität sichtbar war, und wie ließen sich die Signale in den besagten zwei Kulturen interpretieren?

Versuche mit Kalziumfarbstoffen wie z.B. Fluo-4 sind anfällig für Störungen. Ist z.B. die Konzentration des Farbstoffes in der Zelle zu groß, puffert er die geringen Veränderungen des Kalziumspiegels im Zytosol ab<sup>141</sup>, ohne dass eine Veränderung der Fluoreszenz zu beobachten wäre. Auch eine zu starke Beleuchtung der mit Farbstoff beladenen Zellen sorgt dafür, dass ein Zwischenprodukt aus dem Farbstoff entsteht, welches zwar fluoreszierend, jedoch nicht Kalzium-bindend ist<sup>142,143</sup>. Bei Fluo-2, einem Vorgänger von Fluo-4 wurde außerdem beobachtet, dass es sich teilweise in den Zellorganellen, wie z.B. in den Mitochondrien, anreichert und dadurch im Zytosol nicht für Reaktionen mit Kalzium zur Verfügung steht<sup>141,142</sup>. Es besteht auch die Möglichkeit, dass in den Kulturen keine spontane elektrische Aktivität vorhanden war, obwohl die Zellen, wie die Calcein-Färbungen zeigen konnten, lebendig waren. Um dies zu prüfen, war es sinnvoll, die Kalzium-Färbung mit elektrophysiologischen Messungen zu kombinieren, wodurch gezeigt werden kann, ob elektrische Aktivität im Netzwerk vorhanden ist oder nicht. Dabei ist der Einsatz der Patch-Clamping-Technik sinnvoll, da im Gegensatz zur extrazellulären Ableitung auch EPSPs darstellbar sind.

Dennoch lassen sich über die gewonnenen Beobachtungen in zwei Kulturen einige Aussagen machen. Sogenannte Kalziumoszillationen, die in verschiedenen Körpergeweben zu finden sind und verschiedene zelluläre biochemische und elektrophysiologische Reaktionen schalten, verbreiten sich über Gliazellen ebenso wie über Neurone in Form von intrazellulären Kalziumwellen in unterschiedlichen Oszillationsfrequenzen<sup>144</sup>. Dabei spielen Übertragungen von Zelle zu Zelle durch Neurotransmitter und Gap Junctions eine große Rolle<sup>145</sup>. Die in beiden Kulturen beobachteten Signale, gleichmäßig und in einer Frequenz geringer als 1 Hz wechselnder Lichtintensitäten, werden wahrscheinlich durch diese Kalziumoszillationen hervorgerufen. Da die Oszillationsfrequenzen der Wellen, die sich über Gliazellen ausbreiten, normalerweise noch wesentlich geringer sind als in Neuronen durch Aktionspotentiale hervorgerufene Kalziumoszillationen<sup>144</sup>, könnte es gut sein, dass die hier zu beobachtenden Wellen durch Aktionspotenziale von Nervenzellen hervorgerufen wurden. Dabei scheint die Dichte des Gewebes von großer Bedeutung für die Entstehung von spontaner Aktivität zu sein. In verstreut liegenden Neuronen geringer Dichte waren zu keinem Zeitpunkt Oszillationen oder einzelne Signale wahrzunehmen, sondern nur in dicht beieinander liegenden Zellen in Zellgruppen. In **Abbildung 45** ist erkennbar, dass sich in allen (durch verschiedenfarbige Ellipsen markierten) Arealen innerhalb einer Kreisstruktur völlig synchrone Signale messen lassen. Die gesamte Subpopulation oszilliert also synchronisiert. Da eine benachbarte Population durch die hohe Vergrößerung während dieser Messung nicht beobachtet werden konnte, lässt sich über eine Signalausbreitung oder eine weiterreichende Synchronisierung auch über die Kreisgrenzen hinaus hier noch keine Aussage machen. In zukünftigen Experimenten mit dem neuen Neuronencluster könnte jedoch genau diese Fragestellung untersucht werden. In **Abbildung 44** sind benachbarte Subpopulationen, die aus Konglomeraten von Zellen bestehen, zu erkennen. Innerhalb einer Subpopulation (rote und blaue Ellipse) findet sich ebenfalls synchrone Aktivität, wobei einzelne Amplituden der beiden Schwingungen nicht identisch sind. Möglich wäre, dass sich sogar innerhalb einer Subpopulation Gruppen von Neuronen gebildet haben, die nicht vollständig synchron zueinander feuern. Die in den anderen beiden Zellgruppen gemessenen Signale (schwarze und pinke Ellipse) unterscheiden sich untereinander und von den beiden anderen markierten Arealen. Da auch hier keine genügende Darstellung der Beziehungen der Cluster zueinander bzw. des Verlaufs der Neuriten gemacht werden konnte, kann keine



---

Aussage getroffen werden, ob die gezeigten Populationen miteinander (über Neuriten) verbunden oder völlig unabhängig voneinander aktiv sind.

#### 4.4.3. Zellen auf geclusterten MEAs

Die anfänglichen Schwierigkeiten, auf MEA-Chips Strukturen in der Größe des Clusters zu übertragen, erklären sich wie folgt. Erstens war es wichtig, dass die MEAs völlig ebenmäßig auflagen, was durch PDMS- und Underfill-Rückstände beim Einkapseln erschwert wurde. Die eingesetzten Aluminiumchips, auf denen der Chip völlig planar lag, hoben den Chip ein wenig an, wodurch die Unebenheiten auf der Rückseite des MEAs nicht die Ablage berührten. Zweitens unterschied sich der MEA von den Siliziumchips, auf die das Cluster mittels  $\mu$ CP übertragen worden war, dadurch, dass die Leiterbahnen und die Platinkristalle auf den Elektroden nach oben hervorstanden. Die harten POP-Stempel konnten sich bei leichten Anpressdrücken diesen Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche nicht anpassen und das Cluster imponierte inhomogen. Feste Anpressdrücke führten auch bei POP zu *Sagging* des Stempeldaches. Um dem *Sagging* bei größeren Anpressdrücken entgegen zu wirken, wurden neue Wafer als Stempelvorlage prozessiert, die mit höheren Stempelstrukturen ausgestattet waren (10  $\mu$ m statt 2  $\mu$ m). Mit diesen höheren Strukturen und durch festeres Andrücken der Stempel, gelang eine optimale Clusterübertragung auch auf MEAs. Auf gleichmäßig übertragenen Clustern aus Protein wuchsen schließlich mit hoher Präzision Zellen innerhalb der Kreise und Neurite in den Verbindungskanälen. Bei den MEAs, auf die Protein ohne Star-PEG gestempelt worden war, ließen sich zwar Zellen kultivieren. Diese folgten jedoch nicht mit ausreichender Spezifität den Strukturen. Dass auch zwischen den Kreisen ungeplant Neuriten wuchsen, die sich im Verlauf immer weiter ausbreiteten, erklärt sich durch den Mangel an zellaversiver Substanz auf diesen Chips.

---

## 4. Zusammenfassung und Aussicht

Ziel dieser Arbeit war es, dichte neuronale Zellkulturen auf MEAs in kleinere Subpopulationen aus Nervenzellen zu unterteilen. Dazu sollte ein Verfahren etabliert werden, das es ermöglicht, dass die Neurone in speziellen Kreisstrukturen auf der MEA-Oberfläche anbinden, für einen Zeitraum von mindestens drei Wochen überleben und nach Ausbildung neuritischer Kontakte untereinander spontane elektrische Aktivität zeigen. Um die kreisförmigen Neuronenkammern herum musste demgegenüber gewährleistet sein, dass dort weder Glia noch Neurone adhären können, um eine scharfe Abgrenzung der neuronalen Subpopulationen zu erreichen und zu verhindern, dass es zu unerwünschten, also nicht geplanten Kontakten zwischen den Neuronengruppen kommt. Mit Hilfe von  $\mu$ CP einer zellfreundlichen (PECM) und einer zellaversiven Substanz (sternförmiges Polyethylenglycol) gelang die Konstruktion eines Clusters, das die oben genannten Bedingungen erfüllte. Es konnte gezeigt werden, dass auf Silizium-Chips sowie auf MEAs das von mir entwickelte Cluster reproduzierbar übertragen werden konnte. Darin konnten Neurone über mehrere Wochen stabil wachsen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, in Zukunft das Verhalten von Neuronen innerhalb isolierter Netzwerke bzw. innerhalb von Netzwerken, die über neuritische Fortsätze miteinander kommunizieren können, zu untersuchen. Die beiden Entwürfe des Clusters, mit Verbindungskanälen und ohne, lassen den direkten Vergleich von Netzwerken zu, die entweder miteinander in Verbindung stehen oder vollkommen isoliert sind. Es kann untersucht werden, in wie weit sich Neuronengruppen, die jeweils synchronisierte (oder asynchrone) Aktivität aufzeigen, über axonale Pfade beeinflussen. Werden sich verschiedene Erregungsmuster auch zwischen den Kammern verbreiten und einander angleichen? Wird innerhalb einer Kammer eine Gruppe von Neuronen stimuliert (z.B. mittels Patch-Clamp-Technologie), kann der Verlauf der Erregungsausbreitung über die einzelnen Kammern hinaus via axonaler Kanäle verfolgt werden. Durch die unterschiedlichen Größen der Kammern erlaubt das Cluster die Untersuchung von Erregungsmustern und neuronaler Synchronität in Netzwerken unterschiedlicher räumlicher Ausdehnung und unterschiedlicher Neuronenanzahl. Besonders das theoretische Modell der *Synfire-Chains* könnte mit dieser Anordnung neuraler Schichten auf seine tatsächliche Bedeutung in kommunizierenden Nervennetzen hin geprüft werden. Werden die Neurone einzelner Kammern abgetötet, kann außerdem

---

geprüft werden, wie sich der Verlust einer Subpopulation auf den gesamten Verband auswirkt. Die Größe und der Abstand der Kammern voneinander machen ein räumlich abgegrenztes Eingreifen, z.B. mit einem Laser, möglich. Anschließend könnte mit Stammzellen, z.B. induzierten Stammzellen, versucht werden, die Integrität des Netzes wiederherzustellen, um zu prüfen, in wie weit sich die elektrische Aktivität des Ursprungsnetzwerks wiederherstellen lässt. Wenn man sich vor Augen führt, vor welche Herausforderungen sich die neurochirurgische Forschung im Bereich der Reduktion und der Reversibilität des Zelluntergangs bei intrazerebralen Blutungen und Schädel-Hirn-Traumata gestellt sieht, bekommt die Thematik der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung. Besonderes Augenmerk kann auf einer Kombination der extrazellulären Signalleitung mittels MEAs und dem Kalzium-Imaging liegen. Man würde damit die hohe zeitliche Auflösung der MEAs mit der Darstellung einzelner Aktionspotentiale hoher räumlicher Auflösung des Kalzium-Imagings verbinden. Dadurch könnte man die Entstehung von Kalziumoszillationen von Glia und Neuronen in Zusammenhang mit elektrischer Aktivität in Neuronen bringen. Insgesamt ist es mit der Entwicklung des Neuronen-Clusters auf MEAs gelungen, ein Werkzeug zu konstruieren, welches sich als sehr nützlich in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung herausstellen kann. Es wird dazu beitragen, in Zukunft die Informationscodierung von Neuronen-Netzen nachvollziehen zu können und dadurch die therapeutische Intervention in Neuronen-Verbände (z.B. des menschlichen Gehirns) effektiver zu gestalten. Im Bereich der tiefen Hirnstimulation, zur Behandlung von Krankheitsbildern wie Parkinson, Dystonie, Epilepsie und Depression, ist es für eine Verbesserung der Therapie unerlässlich, mehr über die genaue Ausbreitung und zeitliche Korrelation von Nervensignalen zu verstehen. Damit könnten einerseits unverstandene Nebenwirkungen reduziert und die Effizienz der Stimulation gesteigert werden.

---

## Danksagung

Ich möchte mich bei den Menschen bedanken, die mich beim Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt und in ihrem Verlauf begleitet haben:

Herrn Professor Offenhäusser, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit in seinem Institut zu absolvieren, obwohl ich aus einer fachfremden Disziplin gekommen bin.

Herrn Professor Ernestus, der diese Arbeit als mein Doktorvater betreut hat und mich in meinem Wunsch bestärkt und unterstützt hat, einen etwas ungewöhnlichen Weg zu gehen.

Dr. Wolfrum, der mir als Arbeitsgruppenleiter stets mit guten Ratschlägen geholfen hat und der in jeder Situation ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau Professor Sirén für konstruktive Vorschläge zu dieser Dissertation.

Dr. Blau, der mir in zahlreichen Experimenten von Genua aus mit wichtigen Materialien für meine Arbeit ausgeholfen hat.

Philipp Rinklin, für die zahlreichen geduldigen Unterrichtseinheiten in Software-Benutzung.

---

Meinen Eltern, die mir den Weg bis hierher geebnet haben und mich verständnisvoll in meinen Lebensplänen unterstützt haben.

Meiner Freundin Merel, die mir eine aufmerksame und geduldige Zuhörerin gewesen ist.

Meinen Freunden Verena und Stephan, die mich aufgefangen haben, wenn sich fachliche Frustration eingestellt hatte.

Meinem Kollegen Janis Brusius, der mich in zahlreichen fruchtbaren Diskussionen zu neuen Ideen inspiriert hat und mir stets ein guter Zuhörer gewesen ist.

Meinem Kollegen Hossein Robotjazi, Sommerstudent aus dem Iran, der mich bei der Durchführung der Oberflächenexperimente mit PECM/APTES unterstützt hat.

Dem Kollegium des Instituts für komplexe Systeme (ICS 8).

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Hebb, D.O. Drives and the CNS. *History of Psychology* 1-14(1955).
  2. Ito, D. et al. Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays. *Neuroscience* **171**, 50-61(2010).
  3. Shein Idelson, M., Ben-Jacob, E. & Hanein, Y. Innate synchronous oscillations in freely-organized small neuronal circuits. *PloS one* **5**, e14443(2010).
  4. Shein, M. et al. Management of synchronized network activity by highly active neurons. *Physical biology* **5**, 036008(2008).
  5. Fellin, T. et al. Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15037-42(2009).
  6. Fellin, T. et al. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* **43**, 729-43(2004).
  7. Engel, a K. et al. Temporal binding, binocular rivalry, and consciousness. *Consciousness and cognition* **8**, 128-51(1999).
  8. Brecht, M. et al. Correlation Analysis of Corticotectal Interactions in the Cat Visual System Correlation Analysis of Corticotectal Interactions in the Cat Visual System. *Journal of Neurophysiology* 2394-2407(2011).
  9. Brecht, M., Singer, W. & Engel, A.K. Amplitude and direction of saccadic eye movements depend on the synchronicity of collicular population activity. *Journal of neurophysiology* **92**, 424-32(2004).
  10. Brecht, M. et al. Synchronization of visual responses in the superior colliculus of awake cats. *Neuroreport* **12**, 43-7(2001).
  11. Tanaka, K. Neuronal Mechanisms of object recognition. *Nature* **262**, 685-688(1993).
  12. Riehle, a et al. Dynamical changes and temporal precision of synchronized spiking activity in monkey motor cortex during movement preparation. *Journal of physiology, Paris* **94**, 569-82(2000).
  13. Riehle, a Spike Synchronization and Rate Modulation Differentially Involved in Motor Cortical Function. *Science* **278**, 1950-1953(1997).
  14. Jermakowicz, W.J. et al. Relationship between spontaneous and evoked spike-time correlations in primate visual cortex. *Journal of neurophysiology* **101**, 2279-89(2009).
  15. Maldonado, P. et al. Synchronization of neuronal responses in primary visual cortex of monkeys viewing natural images. *Journal of neurophysiology* **100**, 1523-32(2008).
-

16. Maldonado, P.E. & Babul, C.M. Neuronal activity in the primary visual cortex of the cat freely viewing natural images. *Neuroscience* **144**, 1536-43(2007).
17. Singer, W. Neuronal Synchrony : A Versatile Code for the Definition of Relations ? Most of our knowledge about the functional organization. **24**, 49-65(1999).
18. Buzsáki, G. & Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 1926-9(2004).
19. Neuenschwander, S., Castelo-Branco, M. & Singer, W. Synchronous oscillations in the cat retina. *Vision research* **39**, 2485-97(1999).
20. Abeles, M. Local cortical circuits. An electrophysiological Study. (1982).
21. Ikegaya, Y. et al. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 559-64(2004).
22. Lumer, E.D., Edelman, G.M. & Tononi, G. Neural dynamics in a model of the thalamocortical system. II. The role of neural synchrony tested through perturbations of spike timing. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **7**, 228-36(1997).
23. Pulvermüller, F. A brain perspective on language mechanisms: from discrete neuronal ensembles to serial order. *Progress in neurobiology* **67**, 85-111(2002).
24. Tsytsarev, V. et al. A new planar multielectrode array: recording from a rat auditory cortex. *Journal of neural engineering* **3**, 293-8(2006).
25. Rutten, W.L.C. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annual review of biomedical engineering* **4**, 407-52(2002).
26. Novak, J.L. & Wheeler, B.C. Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array. *Journal of neuroscience methods* **23**, 149-59(1988).
27. Kamioka, H. et al. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience letters* **206**, 109-12(1996).
28. Connor, J. a, Tseng, H.Y. & Hockberger, P.E. Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **7**, 1384-400(1987).
29. Mao, B.Q. et al. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* **32**, 883-98(2001).
30. Tsien, R. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Nature* **11**, 419-424(1988).

31. Göbel, W. & Helmchen, F. In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology (Bethesda, Md.)* **22**, 358-65(2007).
  32. Kang, G. et al. Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing. *Lab on a chip* **9**, 3236-42(2009).
  33. Moriguchi, H. et al. On-chip neural cell cultivation using agarose-microchamber array constructed by a photothermal etching method. *Electrical Engineering in Japan* **146**, 37-42(2004).
  34. Reska, A. et al. Ultrathin Coatings with Change in Reactivity over Time Enable Functional In Vitro Networks Of Insect Neurons. *Advanced Materials* **20**, 2751-2755(2008).
  35. Offenhäusser, A. et al. Microcontact printing of proteins for neuronal cell guidance. *Soft Matter* **3**, 290(2007).
  36. Groll, J. et al. A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion. *Journal of biomedical materials research. Part A* **74**, 607-17(2005).
  37. Groll, J. et al. Comparison of coatings from reactive star shaped PEG-stat-PPG prepolymers and grafted linear PEG for biological and medical applications. *Biomacromolecules* **6**, 956-62(2005).
  38. Groll, J. et al. Ultrathin coatings from isocyanate-terminated star PEG prepolymers: layer formation and characterization. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **21**, 1991-9(2005).
  39. Hoffmann, J. et al. Blood cell and plasma protein repellent properties of star-PEG-modified surfaces. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **17**, 985-96(2006).
  40. Neher, E., Sakmann, B. & Steinbach, J.H. Extracellular Patch-Clamp-Method for Resolving Currents Through individual open Channels in Biological Membranes. *European Journal of Physiology* **228**, 219-228(1978).
  41. Hamill, O.P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *European Journal of Physiology* **391**, 85-100(1981).
  42. Thomas, C. a et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental cell research* **74**, 61-6(1972).
  43. Pine, J. Recording Action Potentials From Cultured Neurons With Extracellular Microcircuit Electrodes. *Neuroscience* **2**, 19-31(1980).
  44. Krause, M. Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings. *Sensors and Actuators B: Chemical* **70**, 101-107(2000).
-



45. Nicolelis, M. a L. et al. Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11041-6(2003).
46. Stegenga, J. et al. The effect of learning on bursting. *IEEE transactions on bio-medical engineering* **56**, 1220-7(2009).
47. Lacour, S.P. et al. Flexible and stretchable micro-electrodes for in vitro and in vivo neural interfaces. *Medical & biological engineering & computing* 945-954(2010).doi:10.1007/s11517-010-0644-8
48. Martinoia, S. et al. In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosensors & bioelectronics* **20**, 2071-8(2005).
49. Hintsche, R. et al. Microelectrode arrays and application to biosensing devices. *Biosensors and Bioelectronics* **9**, 697-705(1994).
50. Göbbels, K. et al. Neuronal cell growth on iridium oxide. *Biomaterials* **31**, 1055-67(2010).
51. Gabay, T. et al. Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **350**, 611-621(2005).
52. Abrams, Z.R. et al. A complete scheme for creating predefined networks of individual carbon nanotubes. *Nano letters* **7**, 2666-71(2007).
53. Thapa, P.S. et al. Directional growth of metallic and polymeric nanowires. *Nanotechnology* **20**, 235307(2009).
54. Richardson-burns, S.M. et al. Polymerization of the conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) around living neural cells. *Biomaterials* **28**, 1539-1552(2007).
55. Hai, A. et al. Changing gears from chemical adhesion of cells to flat substrata toward engulfment of micro-protrusions by active mechanisms. *Journal of neural engineering* **6**, 066009(2009).
56. Hai, A. et al. Spine-shaped gold protrusions improve the adherence and electrical coupling of neurons with the surface of micro-electronic devices. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **6**, 1153-65(2009).
57. Braun, D. & Fromherz, P. Imaging neuronal seal resistance on silicon chip using fluorescent voltage-sensitive dye. *Biophysical journal* **87**, 1351-9(2004).
58. Erickson, J. et al. Caged neuron MEA: a system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of neuroscience methods* **175**, 1-16(2008).
59. Maher, M.P. et al. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal of neuroscience methods* **87**, 45-56(1999).

60. Wolfrum, B. et al. Suspended nanoporous membranes as interfaces for neuronal biohybrid systems. *Nano letters* **6**, 453-7(2006).
  61. Karlsson, M. et al. Initial in vitro interaction of osteoblasts with nano-porous alumina. *Biomaterials* **24**, 3039-3046(2003).
  62. Adiga, S.P. et al. Nanoporous membranes for medical and biological applications. (2009).doi:10.1002/wnan.050
  63. Howorka, S., Cheley, S. & Bayley, H. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nature biotechnology* **19**, 636-9(2001).
  64. Fissell, W.H. et al. Dialysis and nanotechnology: now, 10 years, or never? *Blood purification* **25**, 12-7(2007).
  65. Prasad, S. & Quijano, J. Development of nanostructured biomedical micro-drug testing device based on in situ cellular activity monitoring. *Biosensors & bioelectronics* **21**, 1219-29(2006).
  66. Stett, A. et al. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and bioanalytical chemistry* **377**, 486-95(2003).
  67. Bayley, H. & Cremer, P.S. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* **413**, 226-30(2001).
  68. Joo, S. et al. Integration of a nanoporous platinum thin film into a microfluidic system for non-enzymatic electrochemical glucose sensing. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* **23**, 277-81(2007).
  69. Arya, S.K. et al. Biosensor for total cholesterol estimation using N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayer. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, 2235-42(2007).
  70. Tao, S. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 315-328(2003).
  71. Tsujino, I. et al. Drug delivery via nano-, micro and macroporous coronary stent surfaces. *Expert opinion on drug delivery* **4**, 287-95(2007).
  72. Popat, K.C. et al. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2006).doi:10.1002/jbm.a
  73. Masuda, H. et al. Fabrication of Pt microporous electrodes from anodic porous alumina and immobilization of GOD into their micropores. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **368**, 333-336(1994).
  74. Hoess, A. et al. Co-Cultures of Primary Cells on Self-Supporting Nanoporous Alumina Membranes. *Advanced Engineering Materials* **12**, B269-B275(2010).
-

75. Chen, C.S. et al. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnology progress* **14**, 356-63(1998).
76. Xia, Y. & Whitesides, G.M. Soft Lithography. *Annual Review of Materials Science* **28**, 153-184(1998).
77. Wilbur, J.L. et al. Microfabrication by microcontact printing of self-assembled monolayers. *Advanced Materials* **6**, 600-604(1994).
78. Wilbur, J.L. et al. Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology* **7**, 452-457(1996).
79. Offenhäusser, A. et al. Microcontact printing of proteins for neuronal cell guidance. *Soft Matter* **3**, 290(2007).
80. Fletcher, T.L., De Camilli, P. & Banker, G. Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**, 6695-706(1994).
81. Otto, F. Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods* **128**, 173-181(2003).
82. Chiappalone, M. et al. Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *International journal of neural systems* **17**, 87-103(2007).
83. Kuffler, D.P. Long-term survival and sprouting in culture by motoneurons isolated from the spinal cord of adult frogs. *The Journal of comparative neurology* **302**, 729-38(1990).
84. Yeung, C.K. et al. Modulation of the growth and guidance of rat brain stem neurons using patterned extracellular matrix proteins. *Neuroscience letters* **301**, 147-50(2001).
85. Oliva, A. a et al. Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochemical research* **28**, 1639-48(2003).
86. Esch, T., Lemmon, V. & Banker, G. Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 6417-26(1999).
87. Ranieri, J.P. et al. Selective neuronal cell attachment to a covalently patterned monoamine on fluorinated ethylene propylene films. *Journal of biomedical materials research* **27**, 917-25(1993).
88. Nam, Y., Branch, D.W. & Wheeler, B.C. Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures. *Biosensors & bioelectronics* **22**, 589-97(2006).
89. Bray, D. Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension. *Developmental biology* **102**, 379-89(1984).

- 
90. Kleinfeld, D.H.P.E. Controlled Outgrowth of Dissociated Neurons on Patterned Substrates. *Journal of neuroscience methods* **8(11)**, 4098-4120(1988).
  91. Purdy, J.E. et al. Synthetic strands of cardiac muscle. Formation and ultrastructure. *The Journal of cell biology* **55**, 563-78(1972).
  92. Wrobel, G. et al. Influence of the first amplifier stage in MEA systems on extracellular signal shapes. *Biosensors & bioelectronics* **22**, 1092-6(2007).
  93. Brewer, G.J. et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of neuroscience research* **35**, 567-76(1993).
  94. Berdondini, L. et al. High-density electrode array for imaging in vitro electrophysiological activity. *Biosensors & bioelectronics* **21**, 167-74(2005).
  95. Berdondini, L. et al. A microelectrode array (MEA) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons. *Sensors and Actuators B: Chemical* **114**, 530-541(2006).
  96. Baruchi, I. et al. The emergence and properties of mutual synchronization in in vitro coupled cortical networks. *The European journal of neuroscience* **28**, 1825-35(2008).
  97. Berdondini, L. et al. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. *Journal of neuroscience methods* **177**, 386-96(2009).
  98. Murphy, M., Drago, J. & Bartlett, P.F. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *Journal of neuroscience research* **25**, 463-75(1990).
  99. Hatten, M.E. et al. In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Developmental biology* **125**, 280-9(1988).
  100. Hatten, M.E. Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *The Journal of cell biology* **100**, 384-96(1985).
  101. Jarvis, C.R. et al. Interpretation of intrinsic optical signals and calcein fluorescence during acute excitotoxic insult in the hippocampal slice. *NeuroImage* **10**, 357-72(1999).
  102. Decherchi, P., Cochard, P. & Gauthier, P. Dual staining assessment of Schwann cell viability within whole peripheral nerves using calcein-AM and ethidium homodimer. *Journal of neuroscience methods* **71**, 205-13(1997).
  103. Kaneshiro, E.S. et al. Reliability of calcein acetoxymethyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 1-16(1993).
  104. Brewer, G.J. & Cotman, C.W. Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain research* **494**, 65-74(1989).
-

105. Frampton, J.P. et al. Effects of Glial Cells on Electrode Impedance Recorded from Neural Prosthetic Devices In Vitro. *Annals of Biomedical Engineering* **38**, 1031-1047(2010).
106. Seil, F.J., Leiman, a L. & Woodward, W.R. Cytosine arabinoside effects on developing cerebellum in tissue culture. *Brain research* **186**, 393-408(1980).
107. Blank, N.K., Seil, F.J. & Herndon, R.M. Study Of Cortical Remodeling In Cytosine Arabinoside Induced Cerebellum In Tissue Culture. *Brain* **7**, (1982).
108. Staiger, a, Schüttler, M. & Stieglitz, T. Impedanzsenkung Flexibler Mikroelektroden Durch Galvanische Abscheidung Von „Pt Black“ Und Iridiumoxid. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* **46**, 500-501(2001).
109. Desai, S.A. et al. Improving impedance of implantable microwire multi-electrode arrays by ultrasonic electroplating of durable platinum black. *Frontiers in neuroengineering* **3**, 5(2010).
110. Zheng, Z. et al. Topographically flat, chemically patterned PDMS stamps made by dip-pen nanolithography. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **47**, 9951-4(2008).
111. Xu, H. et al. Porous Multilayer-Coated PDMS Stamps for Protein Printing (dagger). *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **25**, 13972-13977(2009).
112. Csucs, G. et al. Microcontact Printing of Macromolecules with Submicrometer Resolution by Means of Polyolefin Stamps. *Langmuir* **19**, 6104-6109(2003).
113. Heckeke, M. & Schomburg, W.K. Review on micro molding of thermoplastic polymers. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **14**, R1-R14(2004).
114. Na, K. et al. Micropatterning of cell-repellent polymer on a glass substrate for the highly resolved virus microarray. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **22**, 10889-92(2006).
115. Suni, T. et al. Effects of Plasma Activation on Hydrophilic Bonding of Si and SiO<sub>2</sub>. *Journal of The Electrochemical Society* **149**, G348(2002).
116. Zhang, X., Olbrechts, B. & Raskin, J.-P. Oxygen Plasma and Warm Nitric Acid Surface Activation for Low-Temperature Wafer Bonding. *Journal of The Electrochemical Society* **153**, G1099(2006).
117. Hobart, K.D. UV/Ozone Treatment for Wafer Bonding. **2003-19**, 137-143(2003).
118. Ameringer, T. et al. Ultrathin functional star-PEG coatings for DNA microarrays. *Society* **6**, (2005).
119. Singhvi, R. et al. Engineering cell shape and function. *Science (New York, N.Y.)* **264**, 696-8(1994).

- 
120. Stenger, D.A., Pike, C.J. & Cotman, C.W. Surface determinants of neuronal survival and growth on self-assembled monolayers in culture Substrate preparation / T \. *Control* **630**, 136-147(1993).
  121. Branch, D.W. et al. Microstamp patterns of biomolecules for high-resolution neuronal networks. *Medical & biological engineering & computing* **36**, 135-41(1998).
  122. Shriver-Lake, L.C. et al. Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers. *Biosensors and Bioelectronics* **12**, 1101-1106(1997).
  123. Middeldorp, J. et al. Specific human astrocyte subtype revealed by affinity purified GFAP antibody; unpurified serum cross-reacts with neurofilament-L in Alzheimer. *PloS one* **4**, e7663(2009).
  124. Albrechtsen, M. & Bock, E. Quantification of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human body fluids by means of ELISA employing a monoclonal antibody. *Journal of neuroimmunology* **8**, 301-9(1985).
  125. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* **25**, 1439-51(2000).
  126. Eng, L.F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology* **8**, 203-14(1985).
  127. Garcia, a D.R. et al. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature neuroscience* **7**, 1233-41(2004).
  128. Izant, J.G. & McIntosh, J.R. Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 4741-5(1980).
  129. Myers, D.E. et al. The effects of aromatic and aliphatic maleimide crosslinkers on anti-CD5 ricin immunotoxins. *Journal of immunological methods* **121**, 129-42(1989).
  130. Bailey, J.L. et al. In vitro CNS tissue analogues formed by self-organisation of reaggregated post-natal brain tissue. *Journal of neurochemistry* **117**, 1020-32(2011).
  131. Fawcett, J.W. & Asher, R. a The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin* **49**, 377-91(1999).
  132. Herndon, R.M. et al Effects In Mouse Cerebellar Cultures In The Presence Of Astrocytes. *Neuroscience* **51**, 149-158(1992).
  133. Martin, D.P., Wallace, L. & Johnson, M. Cytosine Arabinoside Kills Postmitotic Neurons in a Fashion Resembling Trophic Factor Deprivation: Evidence That a Deoxycytidine-Dependent Process May Be Required for Nerve Growth Factor Signal Transduction. *Journal of Neuroscience* (1990).
  134. Hofmann, B. et al. Nanocavity electrode array for recording from electrogenic cells. *Lab on a chip* **11**, 1054-8(2011).
-

135. Law, J.K.Y. et al. The use of microelectrode array (MEA) to study the protective effects of potassium channel openers on metabolically compromised HL-1 cardiomyocytes. *Physiological measurement* **30**, 155-67(2009).
136. Knauth, P. Electrical conductivity of model composites of an ionic conductor (CuBr) and an insulator (TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): experiments and percolation-type model. *Solid State Ionics* **121**, 101-106(1999).
137. Sengupta, K. et al. Large-scale ordered plastic nanopillars for quantitative live-cell imaging. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **5**, 449-53(2009).
138. Hui, C.Y. et al. Constraints on Microcontact Printing Imposed by Stamp Deformation. *Langmuir* **18**, 1394-1407(2002).
139. Huang, Y.Y. et al. Stamp collapse in soft lithography. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **21**, 8058-68(2005).
140. Zhou, W. et al. Mechanism for stamp collapse in soft lithography. *Applied Physics Letters* **87**, 251925(2005).
141. Diliberto, P. a, Wang, X.F. & Herman, B. Confocal imaging of Ca<sup>2+</sup> in cells. *Methods in cell biology* **40**, 243-62(1994).
142. Roe, M.W., Lemasters, J.J. & Herman, B. Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell calcium* **11**, 63-73
143. Becker, P.L. & Fay, F.S. Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *The American journal of physiology* **253**, C613-8(1987).
144. Cornell-bell, A.H. et al. Glutamate induces Calcium waves in cultured Astrocytes: Long-range Glial Signaling. *Science* **247**, 2-5(1988).
145. Araque, a, Carmignoto, G. & Haydon, P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual review of physiology* **63**, 795-813(2001).





## **Ausbildung**

---

1992 – 1998	Gymnasium Thusneldastraße (Köln)
1998 – 1999	Besuch der Sidcot-School in Großbritannien
1999 – 2001	Johann – Gottfried – Herder – Gymnasium (Köln)
06/2001	<b>Abitur (Note 1,3)</b>
02/2001	Beginn eines Biologiestudiums
03/2002	Beginn eines Studiums der Humanmedizin in Köln
02 – 07/2006	Studienaufenthalt in Grenoble im Rahmen eines Erasmusprogramms
04/2007	Wahlseminar: „Erkrankungen des Rückenmarks“ in Sankt Gallen
05/2009	<b>Medizinisches Staatsexamen (Note 2,0)</b>
08 - 10/2009	Auslandsaufenthalte in Südafrika und Brasilien
11/2009 – 11/2011	Durchführung einer medizinischen Promotion im Bereich der Bioelektronik (eingereicht)
11/2011 – 11/2012	Einstellung als neurochirurgischer Assistenzarzt der Universitätsklinik Würzburg
05/2012 – 11/2012	Tätigkeit auf neurochirurgischer Intensivstation
11/2012 – 01/2013 (geplant)	Auslandsaufenthalt in Equador, Praktikum im Amazonasregenwald über Tropenmedizin und die Erlernung pflanzenheilkundlicher Therapien der Ureinwohner

## **Praktika und Studienbegleitende Tätigkeiten**

---

05/2005	Anästhesiologiepraktikum (freiwillig)
---------	---------------------------------------



08/2006	Radiologiepraktikum (freiwillig)
07/2009	Rechtsmedizinpraktikum (freiwillig)
10/05 – 01/08	Tischhilfsassistent im anatomischen Präparierkurs
04/07	Teilnahme an einem Studienaustausch zwischen Köln und Bangkok

---

#### **Wehr-, Zivil-, Ersatzdienst**

08/01 – 08/07	Ersatzdienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisbereitschaft Köln
---------------	--

---

#### **Zusätzliche Kenntnisse**

Software	MS Powerpoint (sehr gut) MS Word (sehr gut)
Seit 11/09	Zusatzqualifikation in Elektrotechnik
08/ 2001	Ausbildung zum Sanitätshelfer beim Deutschen Roten Kreuz
2002	Studienbegleitende Ausbildung zum Stadtführer der Stadt Köln
2000 – 2009	Musik- und Klavierunterricht bei Roland Vossebrecker

---

#### **Sprachkenntnisse**

Deutsch	muttersprachlich
Französisch	verhandlungssicher (Zertifikat: DELF-Examen, siehe Anhang)
Englisch	sicher in Sprache und Schrift (Zertifikat: Cambridge First Certificate in English)
Portugiesisch	sicher in Sprache und Schrift



Spanisch

Grundkenntnisse

Polnisch

Grundkenntnisse

---

### **Persönliche Fähigkeiten und soziale Kompetenz**

---

- Begeisterungsfähig auf verschiedenen Gebieten
- Sehr aufgeschlossen im Umgang mit Menschen
- Belastbar mit hoher Einsatzbereitschaft, Kreativität und Durchsetzungsvermögen
- Starke kommunikative Fähigkeiten in Wort und Schrift

2001 – 2010

ehrenamtliche Tätigkeit als Sanitätshelfer,  
verantwortlich für die Fortbildung von  
Sanitätshelfern

2005 – 2008

ehrenamtliche Tätigkeit beim World Wildlife Fund  
for Nature (WWF) , Ortsgruppe Köln

Juli 2009

Organisation des Medizinerabschlussballs

