

„Bionische Rekonstruktion definierter neuronaler Netze aus Insekten und Vertebraten unter Verwendung elektromagnetischer Felder“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Nico Lautemann

aus Neunkirchen / Saar

Berichter: Prof. Dr. P. Bräunig
Prof. Dr. A. Offenhäusser

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Matter at equilibrium is dull.

(I. Prigogine)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Aufgabenstellung	3
1.1.1 Identifikation und Isolation	5
1.1.2 Positionierung.....	7
1.1.3 Steuerung des Axonwachstums	10
1.2 Rekonstruktion neuronaler Netze auf MEAs unter Verwendung elektrischer Felder – Bionik?.....	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Biologische Substrate	13
2.1.2 Technische Substrate.....	17
2.2 Methoden	23
2.2.1 Elektrophysiologie Primärzellkultur	23
2.2.2 Retrograde Färbung	23
2.2.3 Herstellung der Saugkapillaren.....	23
2.2.4 Entnahme retrograd gefärbter Neurone mittels Saugkapillare.....	24
2.2.5 Positionierung mittels Saugkapillare	25
2.2.6 Doppelfärbungen	26
2.2.7 Dielektrophorese	26
2.2.8 Biofunktionalisierung der MEA-Oberfläche durch Elektrophorese	43
2.2.9 Galvanotropismus zur Steuerung des Neuriten-/Axonwachstums.....	46
3. Ergebnisse.....	53
3.1 Zellkultur	53
3.1.1 Primärzellkultur von Metathorakalganglienneuronen	53
3.1.2 Primärzellkultur von Pilzkörperneuronen	56
3.1.3 Primärzellkultur nach mechanischer Positionierung auf Coverslips, topologischen Strukturen und MEAs.....	57
3.1.4 Primärzellkulturen auf MEAs	59
3.1.5 Viabilität gefärbter Neurone	62
3.2 Biofunktionalisierung mittels Elektrophorese.....	63

3.3 Positionierung durch positive Dielektrophorese	65
3.4 Räumliche Separation durch Dielektrophorese	73
3.5 Wanderwellendiektrophorese.....	77
3.6 Galvanotropismus	79
3.6.1 Galvanotropismus in der galvanischen Kammer	79
3.6.2 Galvanotropismus auf MEAs nach mechanischer Positionierung.....	81
3.6.3 Galvanotropismus nach Positionierung durch Dielektrophorese	82
4. Zusammenfassung und Diskussion	87
4.1 Primärzellkultur	88
4.1.1 Thorakalganglien	88
4.1.2 Hirnneurone/Kenyonzellen	88
4.1.3 Kulturen auf MEAs.....	89
4.2 Positionierung	90
4.2.1 Mechanische Positionierung mit Saugkapillare	91
4.2.2 Dielektrophorese	92
4.3 Räumliche Separation von Gliazellen und Neuronen mit DEP.....	95
4.4 Wanderwellendiektrophorese	98
4.5 Axonguiding	101
4.5.1 Biofunktionalisierung durch Gleichfelder	102
4.5.2 Galvanotropismus.....	103
Literaturverzeichnis	110
Anhang	126
Danksagung	132
Lebenslauf.....	135

1. Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Biologische Systeme und Strukturen sind extrem komplex und haben sich über Jahrmillionen entwickelt. Den hohen Komplexitätsgrad verdanken sie unter anderem Selbstorganisationsprinzipien (Prigogine, 1981 & 1982), die fernab des thermodynamischen Gleichgewichts auftreten und zu neuen Überstrukturen und neuen Funktionen führen, die die Einzelteile zuvor nicht hatten.

Neuronale Systeme stellen einen Teil dieser ineinander verwobenen Systeme dar. Da sie unter anderem alle sensorischen Eindrücke verarbeiten, stellen sie eine zentrale Schnittstelle zwischen dem biologischen System und seiner Umwelt dar. Es ist daher von Interesse, zu erforschen, welche Bestandteile essentiell für ihre Genese und Funktion sind und welche nur modulatorisch daran beteiligt sind. Neuronale Systeme im Tier können nicht oder kaum gegenüber äußeren Potentialinflüssen isoliert werden. Daher ist es wünschenswert, unter kontrollierbaren Bedingungen definierte neuronale Netze zu rekonstruieren und deren Interaktion zu untersuchen. Eine Plattform hierfür stellen Multielektrodenarrays oder FETs (Feld-effekt-Transistoren) dar.

Multi- oder Mikroelektrodenarrays (MEA) haben sich in den letzten 10 Jahren in der neurobiologischen Forschung etabliert. Sie bieten gegenüber klassischen Methoden der Neurobiologie, wie intrazellulärem Ableiten der elektrischen Aktivität mittels sogenannter scharfer Elektroden oder Patch-Clamp-Verfahren, in erster Linie den Vorteil, nicht-invasiv zu sein, da hier extrazellulär abgeleitet wird. Das bedeutet, die elektrische Aktivität der Zellen kann über einen sehr langen Zeitraum abgeleitet und/oder stimuliert werden, ohne dass die Zellen dabei zerstört bzw. penetriert werden.

Darüber hinaus können sehr viele Zellen gleichzeitig monitoriert werden. Verwendet werden MEAs zur Untersuchung elektrogener Zellen, welche entweder in Form primärer Zellkulturen, organotypischer Kulturen oder als Schnittpräparate auf die MEAs aufgebracht werden.

MEAs bieten bei der Arbeit mit primären Zellkulturen den Vorteil, dass man die elektrische Aktivität während der Entwicklung von Netzwerken monitorieren kann, wobei die Randbedingungen (pH-Wert, Temperatur, pCO₂, Nährstoffangebot, Neurotrophine etc.) auf dem Chip besser kontrolliert (z. B. integrierte Sensoren für pH und Temperatur) und definiert werden können als *in vivo*.

Das System hat natürlich seine Grenzen und Nachteile. So ist es nicht einfach, neuronale Netze so aufzubauen, dass sich nur eine Zelle auf jeder Elektrode befindet und zwischen den Elektroden keine Zellen zu finden sind (Single-Cell-Recording). Im Gegenteil, für stabile Langzeit-Zellkulturen, insbesondere bei Vertebraten, werden recht hohe Zelldichten benötigt, zumeist sogar Mischkulturen aus Gliazellen und Neuronen, die dies erschweren. Damit werden häufig von einer Elektrode die elektrischen Aktivitäten mehrerer Neurone monitoriert, die anschließend wieder voneinander getrennt werden müssen, will man die Aktivität der einzelnen Neurone herausfiltern.

In dieser Arbeit soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob sich neuronale Netze unter Kulturbedingungen definiert rekonstruieren lassen. Diese Rekonstrukte sollen hinsichtlich ihrer Genese und Aktivität untersucht werden und mit ihren Pendants *in vivo* verglichen werden.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, ist es sinnvoll, zunächst mit einfachen und weniger komplexen neuronalen Systemen zu arbeiten. Ein biologisches Substrat, das dies gewährleistet und das außerdem wenig stör anfällig (Temperatur-, pH- und Osmolaritätsschwankungen) ist, stellen neuronale Netze aus Insekten dar. Hier sind an der Informationsverarbeitung weniger Neurone beteiligt bzw. sie findet auf Einzelzellebene (natürlich unter Einbeziehung mehrerer Neurone) statt und nicht innerhalb ganzer Nervenzellgruppen (Vertebraten). Ein weiterer Vorteil dieser Neurone ist ihre Größe. So finden sich im zentralen Nervensystem (ZNS) der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) Neurone mit Durchmessern von 10 (entspricht etwa der durchschnittlichen Größe von Vertebratenneuronen) bis ca. 130 µm (Burrows, 1996). Dies ist zum einen für die Identifikation, zum anderen für die Signalgröße bzw. das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis beim extrazellulären Monitorieren auf den Elektroden von Vorteil.

Die Rekonstruktion definierter neuronaler Netze kann in vier Teilaufgaben gegliedert werden:

- 1) Identifikation definierter Neurone
- 2) Isolation dieser Neurone
- 3) Positionierung auf den Elektroden
- 4) Steuerung des Wachstums der Axone/Neuriten zwecks definierter Verschaltung.

In dieser Arbeit wurden zur Lösung dieser Aufgaben neben klassischen Methoden verschiedene neuere methodische Ansätze untersucht, deren gemeinsamer Nenner die Nutzung elektrischer Felder darstellt.

Im Folgenden werden die Methoden kurz miteinander verglichen.

1.1.1 Identifikation und Isolation

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Identifikation von Neuronen, die einzeln oder in Kombination verwendet werden. Grob lassen sie sich in farbstoffbasierte und elektrophysiologische Methoden einteilen.

Vereinfacht werden bei den elektrophysiologischen Methoden entweder die sensorischen Zellen unter Verwendung adäquater Reize stimuliert, oder es wird innerhalb des reizleitenden Systems bzw. direkt im neuronalen Netz elektrisch gereizt. Anschließend wird elektrophysiologisch überprüft, welche Neurone bzw. Neuronenpopulationen Antworten zeigen. Damit lässt sich eine mehr oder minder feine Lokalisation innerhalb des Nervensystems realisieren.

Bei den farbstoffbasierten Methoden können Diffusionsmechanismen genutzt werden, bei denen ein Farbstoff durch die Axone/Neuriten aus dem Projektionsgebiet in die Somata transportiert wird. Diese Methode ermöglicht zusätzlich eine präzise Lokalisation der Informationswege.

Da viele Neuronenpopulationen/-typen durch die Expression spezifischer Proteine charakterisiert sind, können darüber hinaus auch Färbemethoden verwendet werden, die sich Antigen-Antikörper-Reaktionen zunutze machen.

Neben der Lokalisierung kann die Markierung über Antikörper auch zur Isolation einzelner Zelltypen verwendet werden.

So stellen FACS (fluorescence activated cell sorting) und MACS (magnetic field activated cell sorting) etablierte Methoden zur Aufreinigung von Zellen dar. Die Markierungen erfolgen über Antikörper (Primärantikörper), die an zellspezifische Oberflächenproteine/-zucker binden. Dabei besteht allerdings die Möglichkeit unspezifischer Bindungen, und somit gibt es meist markierte Zellen, die falsch-positiv sind. Darüber hinaus können diese Bindungen Signalwege aktivieren. Dies ist unerwünscht, möchte man die Zellen möglichst unverändert in Kultur bringen. Über die konstante Domäne des Primärantikörpers wird ein Zweitantikörper (Sekundärantikörper) gebunden, an den ein Fluoreszenzfarbstoff oder ein magnetisches Metallkugeln gebunden ist. Anschließend werden dann die markierten Populationen über Magnetfelder oder fluoreszenzgesteuerte Methoden herausgefiltert.

In dieser Arbeit wurden zur Identifikation einiger Neurone des Metathorakalganglions retrograde Färbungen vorgenommen. Nach der Färbung konnten die Neurone auf Grund ihrer Lage identifiziert und mechanisch entnommen werden.

Daneben wurden Neurone aus den Pilzkörpern entnommen, da hier auf Färbungen und mechanischen Stress bei der Entnahme verzichtet werden konnte.

Eine neuere, sehr elegante Methode zur Zelltrennung, deren Vorteil vor allem darin liegt, dass die Zellen nicht markiert werden müssen, stellt die Wanderwellen-dielektrophorese (DACS, dielectrophoretically activated cell sorting) dar. Hierbei werden für die Zelltrennung elektrische Wanderfelder benutzt. Dafür wurde im Rahmen der Arbeit ein spezieller Mikrofluidik-Separationschip gebaut. Vereinfacht wird innerhalb einer Mikrofluidik-Kammer durch die elektrischen Wechselwirkungen zwischen dem elektrischen Feld und den Zellen eine unterschiedliche Transportgeschwindigkeit erzielt, wodurch verschiedene Zelltypen voneinander getrennt werden können (Wang *et al*, 2000).

1.1.2 Positionierung

Für eine Positionierung müssen ganz allgemein Kräfte auf die Zellen wirken, die eine Translation zum Zielort bewirken. Dafür kommen verschiedene Kräfte in Betracht (Fuhr und Shirley, 1995b). Um die Vor- und Nachteile bei deren Verwendung zu verdeutlichen, sollen sie hier kurz und vereinfacht vorgestellt werden.

Die einfachste Möglichkeit ist die Verwendung einer Saugkapillare, mit der die gefärbte Zelle aus dem Ganglion entnommen und anschließend positioniert wird. Diese Methode wurde in dieser Arbeit zunächst getestet, zeigte sich aber aus verschiedenen Gründen als unzureichend.

Sie kann nicht als Methode der Wahl angesehen werden, da Zellen sehr sensibel auf Oberflächenkontakte reagieren. Es kann zu Immunreaktionen kommen, die die Zellen verändern und bis zum Zelltod führen können (Fuhr *et al*, 1995a; Fuhr und Reichle, 2000).

Eine weitere Methode zur Zellpositionierung stellt die Verwendung von Laserpinzetten dar (Chu, 1991). Laserpinzetten sind für die Manipulation einzelner Zellen gut geeignet, benötigen aber ein aufwendiges experimentelles Setup und lassen sich nicht einfach integrieren (Ozkan *et al*, 2003). Darüber hinaus ist die Positionierung relativ zeitaufwendig.

Eine weitere Möglichkeit der Positionierung besteht in der Verwendung von Ultraschall (Moroney *et al*, 1991). Hierbei können beispielsweise stehende akustische Wellen im Medium angeregt werden. Durch die Geometrie der Anordnung der Piezowandler und Frequenz können geometrische Schwingungsmuster und damit definierte Potentiallandschaften aufgebaut werden (Oberti *et al*, 2006).

So werden die Zellen aus den Regionen, in denen die Schwingungsamplituden hoch sind, durch die über das Wasser wirkenden mechanischen Kräfte verdrängt. An den Stellen, an denen Schwingungsminima/-knoten auftreten, sind die mechanischen Kräfte am geringsten. Sie stellen Potentialminima dar. Daher ordnen sich Teilchen (also auch die Zellen) an diesen Stellen an, analog zu Partikeln (z. B. Sandkörner), die sich auf einer schwingenden Membran (bspw. Membran einer Trommel) an diesen energetisch günstigen Orten ansammeln.

Problematische Parameter können die auftretenden Scherkräfte sein, die die Zellen zerstören können. Weiterhin wird durch die auftretende innere Reibung auf Grund der Bewegung der Wassermoleküle Wärme produziert, die ebenfalls Probleme verursachen kann. Daneben ist es technisch recht aufwendig, die Piezowandler in den Chip zu integrieren.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Oberflächenfunktionalisierung.

Dabei werden adhäsive Proteinmuster (Polylysin, Concanavalin, Laminin etc.) auf einen zellaversiven Untergrund (meist Polyethylenglykol, PEG) aufgebracht (Micro-contact-Printing (Hammarback *et al*, 1985; Kleinfeld *et al*, 1988; Torimitsu & Kawana, 1990)). Nach Zugabe der Zellsuspension und einer gewissen Zeitspanne, innerhalb derer die Neurone adhäreren, können dann die Zellen, die auf den zellaversiven Regionen liegen, abgewaschen werden (Gray *et al*, 2004).

Damit die auftretenden Kräfte beim Waschvorgang kontrolliert werden können, müssen die Chips in ein Mikrofluidiksystem integriert werden, sonst droht die Gefahr, auch viele der adhärenen Zellen mit abzuwaschen. Ein weiterer Nachteil ist darin zu sehen, dass die Schichtdicke der Proteinstrukturen nur schwer zu definieren ist und verschiedene Beschichtungssubstrate unterschiedliche bioelektronische Kopplungen bewirken, was zusammengenommen die Verlässlichkeit extrazellulärer Ableitungen reduziert (Prasad *et al*, 2003).

Zum anderen können Topologien, beispielsweise aus Parylen oder SU-8 (Photolack) auf die MEAs aufgebracht werden, so dass Öffnungen über und zwischen den Elektroden vorgegeben werden (Jimbo *et al*, 1993; Maher *et al*, 1999). Werden anschließend Zellen zugegeben, so müssen auf diese jedoch meist zusätzliche Kräfte ausgeübt werden, um sie effizient in den Strukturen zu positionieren. Daher ist es nötig, beispielsweise eine Laserpinzette (Chow und Pine, 2005; Erickson *et al*, 2006), mikrofluidische Strukturen, die in den Öffnungen einen Unterdruck erzeugen oder, wie im Folgenden dargestellt, elektrische Kräfte zu benutzen.

Diese Methode beruht darauf, dass die elektrisch neutralen Zellen mittels elektrischer Felder polarisiert werden (Pohl, 1978). Legt man an den Elektroden Spannungen an, so können über das induzierte Dipolmoment und die Inhomogenität der Felder Kräfte auf die Zellen ausgeübt werden.

Mit dieser Methode können Zellen oder andere dielektrische Partikel entweder an den Orten der höchsten oder der niedrigsten Feldintensität platziert werden, ohne dass sie dafür berührt werden müssen.

Da Zellen sehr empfindlich auf mechanische Belastungen reagieren, ist es sinnvoll, eine solche berührungsfreie Methode zu verwenden, um die Zellen zu manipulieren. Außerdem handelt es sich hierbei um eine sehr schnelle Methode, da innerhalb von Sekunden oder wenigen Minuten beliebig viele Zellen positioniert werden können. Der Literatur zufolge ist diese Methode für die Zellen unschädlich (Wang *et al*, 1997), sofern die Gradienten nicht zu groß sind, die über die induzierten mechanischen Kräfte zur Lyse der Zellen oder zu großen Transmembranspannungen (> 10 mV) führen können (Fuhr *et al*, 1994).

In anderen Anwendungen, beispielsweise Mikrototalanalyse-Systemen, in denen die Zellen über dielektrische Kräfte zunächst fixiert und anschließend zerstört werden, um Zellkomponenten (DNA, Proteine, zelluläre Substrukturen) zur weiteren Analyse zugänglich zu machen (PCR usw.), ist gerade diese Möglichkeit erwünscht (Kopp *et al*, 1998; Müller *et al*, 1999; Gascoyne und Vykoukal, 2004).

Um Schädigungen durch zu große Potentialgradienten an den Membranen zu vermeiden, spielt die Wahl geeigneter Frequenzen eine wichtige Rolle (Fuhr *et al* 1994; Müller *et al*, 1999).

Ein Vorteil gegenüber der Verwendung von Ultraschall, bei der mechanische Kräfte auf alle Partikel/Zellen gleich wirken, liegt darin, dass verschiedene Zelltypen über zelltypische Membraneigenschaften verfügen und die Wechselwirkung mit dem Feld auf den einen Zelltyp eine anziehende, auf den anderen eine abstoßende Kraft bewirken kann, so dass sie auf dem Chip durch die Wahl der Frequenz und des Mediums räumlich voneinander getrennt werden können (Thrombo-/Erythrozyten: Gascoyne *et al*, 1992; Blutzellen/Bakterien: Wang *et al*, 1992; Krebszellen aus Blut: Gascoyne *et al*, 1997).

Diese Methode lässt sich auch mit anderen Techniken kombinieren. Eine solche Kombination wurde von Gray *et al* (2004) für das Mikrokontakt-Printing (μ CP)

beschrieben, durch die eine Effizienzsteigerung von 20 auf 70% bei der Positionierung von Zellen erreicht wurde.

Bei der Rekonstruktion neuronaler Netze sollten Neurone auf den Elektroden positioniert werden, die Gliazellen sollten dazwischen liegen. Eben dies kann, zumindest theoretisch, von der Dielektrophorese in einem einzigen Schritt geleistet werden (Prasad *et al*, 2004).

Die Dielektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, neuronale Zellen auf den Elektroden zu positionieren. Daneben wurde versucht, mit Hilfe der Dielektrophorese eine räumliche Separation auf den MEAs zu erzielen.

1.1.3 Steuerung des Axonwachstums

Das Mikrokontakt-Printing ist eine Standardmethode, um das Axonwachstum zu kontrollieren. Diese Methode wird auch vom Kooperationspartner IBN-2 im FZ Jülich verwendet und beruht darauf, dass zelladhäsive Proteinmuster (meist Proteine aus der extrazellulären Matrix) auf ein zellabweisendes Substrat (im Falle von Insektenneuronen SternPEG (Reska 2005)) gestempelt werden. Dort konnte an Vertebratenneuronen gezeigt werden, dass deren elektrophysiologische Eigenschaften durch das μ CP nicht beeinflusst werden (Lauer *et al*, 2002; Vogt *et al*, 2005).

Die Methode hat aber auch Nachteile. So benötigt man neben Zeit zum Stempeln genau definierte Anpresskräfte, damit die Silikonstruktur nicht zusammengedrückt wird und das Muster „verschwimmt“. Ein weiterer Nachteil ist der, dass man mit den meisten Stempeln die Richtung des Auswachsens nicht definieren kann.

Dazu benötigt man Stempel, die so strukturiert sind, dass sie einen Konzentrationsgradienten erzeugen (Scharnweber *et al*, 2005 und 2006; Dertinger *et al*, 2002).

Eine andere Methode zur Biofunktionalisierung/Oberflächenbeschichtung besteht in der Verwendung von elektrischen Feldern (Elektrophorese) zur Positionierung von Proteinen oder Peptiden.

Da das elektrische Feld näherungsweise mit dem Quadrat der Entfernung von den Elektroden abfällt, sollte man auch vergleichsweise einfach Gradienten aufbauen können. Daneben sollten sich auf Grund von Energieminimierungseffekten geladene

Moleküle zwischen den Elektroden aneinanderreihen und entlang der Feldlinien anordnen, so dass auch die Verbindungslinien zwischen den Elektroden bzw. Neuronen aufgebaut werden können. Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit qualitativ untersucht. Diese Methode ist im Grunde methodisch sehr einfach und zeitsparend.

Eine weitere Methode, das Neuritenwachstum zu steuern, ist der Galvanotropismus, bei dem die Wirkung elektrischer Gleichfelder genutzt wird. Die Wirksamkeit von elektrischen Feldern bei der Entwicklung und Regeneration von Nervensystemen wurde für verschiedene Spezies beschrieben (Review: McCaig *et al*, 2005).

Bei Insekten ist hierüber nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bzw. unter welchen Randbedingungen der Galvanotropismus *in vitro* auch bei Neuronen aus *Locusta* auftritt, um danach gegebenenfalls die Synaptogenese innerhalb des neuronalen Netzes zu definieren.

1.2 Rekonstruktion neuronaler Netze auf MEAs unter Verwendung elektrischer Felder – Bionik?

Die hier gestellten Aufgaben haben alle mit Musterbildungs- bzw. Ordnungsprozessen zu tun:

Die ungeordnet in der Protein- bzw. Zellsuspension vorliegenden Partikel sollen definiert angeordnet werden. Für die Biofunktionalisierung soll ein Muster aus zellaversiven und zelladhäsiven Stoffen auf dem MEA aufgebracht werden und es soll eine definierte Verteilung von Zellen auf der Elektrodenfläche erzeugt werden.

In der Natur werden auf makroskopischer Ebene alle Muster (z. B. Atome, Moleküle, Gestalt von Schneeflocken) und die meisten ihrer Eigenschaften durch elektromagnetische Wechselwirkungen bestimmt (Feynman *et al*, 2001; Tipler, 1994). Damit in thermodynamisch stabilen, ungeordneten Systemen Ordnung entsteht und um diese aufrechtzuerhalten, muss Energie zugeführt werden.

Bei der Verwendung von MEAs bietet sich die Möglichkeit, über die Elektroden elektrische Potentialverteilungen vorzugeben. Diese Potentiale bauen dann in ihrer Gesamtheit eine Potentiallandschaft, ein Muster, auf. Wie und wo sich Teilchen in

dieser Landschaft anordnen, hängt von ihren physikalischen Eigenschaften (z. B. Ladung) ab.

Auf diese Weise kann man die MEA-Oberflächen im Prinzip sehr einfach und schnell mit geladenen Teilchen beschichten. Möchte man verschiedene Proteine mit Nettoladungen unterschiedlicher Vorzeichen auf verschiedenen Elektroden aufbringen, so kann auch dies sehr einfach realisiert werden.

Man kann die Elektroden näherungsweise als Punktladungen betrachten, bei denen die elektrische Feldstärke quadratisch mit dem Abstand abfällt und damit auch die Kraft, die auf die im Medium gelösten Teilchen wirkt. Daher fällt auch die Konzentration von Teilchen, die sich um die Elektroden herum ablagern, mit dem Abstand ab. Damit bietet sich die Möglichkeit zur Erzeugung von Stoffgradienten, die später für die Steuerung des Neuriten-/Axonwachstums erwünscht sind.

Darüber hinaus ist es mit Hilfe dieser Methode auch möglich, die Verbindungslinien zwischen den Elektroden zu erzeugen.

Wie bereits geschildert, lassen sich unter Verwendung elektrischer Wechselfelder auch Zellen positionieren. Auf Grund der unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften verschiedener Zelltypen können diese auch räumlich voneinander getrennt werden.

Letztlich kann in vielen Fällen auch die gezielte Verschaltung der einzelnen Nervenzellen durch elektrische Felder realisiert werden.

Damit ist die Rekonstruktion definierter neuronaler Netze durch elektrische Felder eine einfache, multifunktionale, integrierte, kostengünstige und von der Natur inspirierte Lösung einer komplexen Fragestellung. Da dies nach Nachtigall (Nachtigall, 1997) Kriterien für bionische Lösungen sind, kann man von einem bionischen Lösungsansatz sprechen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Substrate

Um den einzelnen Aufgabenstellungen (mechanische Positionierung definierter Neurone, Positionierung von Neuronen bzw. Erzeugung definierter Zellverteilungen über Dielektrophorese) gerecht zu werden, wurden unterschiedliche Neuronenpopulationen verwendet. Die wichtigsten Kriterien zur Auswahl waren Größe, Homogenität hinsichtlich Größe und/oder Neuronentyp und Identifizierbarkeit.

Um möglichst viele große Neurone, in der Mehrzahl Motoneurone, zu erhalten, wurden Primärzellkulturen aus dem Meso- und Metathorakalganglion aus *Locusta migratoria* erstellt. Motoneurone generieren große Ionenströme (bis 20 nA) und besitzen Somadurchmesser bis über 100 μm (Burrows, 1996). Sie sollten somit ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis gewährleisten, wenn sie auf den Elektroden liegen, da der Ladungstransport über eine große Fläche stattfindet und sie auch große Elektroden (20-30 μm Kantenlänge) vollständig bedecken. Darüber hinaus sind diese Neurone gut durch Färbemethoden lokalisierbar, über ihre Lage im Ganglion identifizierbar und gut zugänglich, wodurch sie für die mechanische Isolation prädestiniert sind.

Da die Neuronenzusammensetzung der Primärzellkulturen aus den Meso- und Metathorakalganglien hinsichtlich ihrer Größe stark inhomogen ist (Größen zwischen 10 und 120 μm) und die Zellsuspension darüber hinaus verhältnismäßig viel Debris (Neuropil- und Konnektiv-Fragmente) aufweist, wurden auch andere Populationen verwendet, in denen diese Nachteile vermieden werden konnten. So finden sich in den Pilzkörpern, die sensorische Integrationszentren darstellen (Dettner und Peters, 2003) und denen eine zentrale Rolle bei Lern- und Erinnerungsprozessen zugeschrieben wird (Review: Davis, 1993), nur wenig neuronale Subtypen (Dettner und Peters, 2003), und diese Neuronen sind hinsichtlich ihrer Größe sehr homogen. Von Nachteil ist allerdings, dass diese Zellen sehr klein (teilweise unter 10 μm) sind.

Mit der gleichen Motivation wurden Kulturen aus embryonalen Ratten- und Huhn-Hirnen verwendet. Die Herstellung der Primärzellkulturen dieser Neurone wurden von Fr. Decker (IBN-2, FZ Jülich, Ratte), Hr. Mönig und Hr. Künzel (Biologie 2, RWTH Aachen, Huhn) durchgeführt, daher wird hier auf die Darstellung der Präparationen verzichtet.

2.1.1.1 Primärzellkultur Meso- und Metathorakalganglion *Locusta migratoria*

Das Primärzellkulturprotokoll (Präparation, Dissoziation) für die Metathorakalganglienneurone wurde von Weigel (2006) übernommen. In dieser Arbeit wurden auch verschiedene Additive (z. B. 20-Hydroxy-Ecdyson, Insulin) und Beschichtungen (Poly-D-Lysin, ConcanavalinA, Laminin) getestet und die elektrophysiologischen Eigenschaften *in vitro* sowie die Kopplung zwischen Neuronen und zwischen Neuronen und technischen Substraten (Feldeffekttransistoren und Metallelektroden) untersucht.

Dort findet sich auch eine Übersicht der zellulären Zusammensetzung (neuronale Subtypen, Gliazelltypen), ihrer Funktionen und der Morphologie der Thorakalganglien sowie Untersuchungen hinsichtlich der elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone unter Kulturbedingungen.

Präparation

Zur Ruhigstellung wurden die poikilothermen Tiere für etwa 1 h in den Kühlschrank überführt oder auf Eis mehrere Minuten kontrolliert gekühlt.

Sobald die Bewegungsstarre eintrat, wurden die Tiere an den Flügeln festgehalten und zur Oberflächendesinfektion mit 70% Ethanol (EtOH) eingesprüht.

Anschließend wurde nach Abtrennen der Gliedmaßen, des Kopfes und des Abdomens der Darm von frontal entnommen.

Dann wurde die Ventralseite mittels einer feinen Schere herausgetrennt und mit Minutien in einer Präparationsschale fixiert. Anschließend wurde das Präparat mit Kulturmedium überspült, um ein Austrocknen zu verhindern und um durch die im Medium vorhandenen Antibiotika und Antimykotika die Gefahr einer Kontaminierung zu reduzieren.

Im nächsten Schritt wurde das Strickleiternnervensystem (vom Prothorakalganglion (T1) bis zum ersten freien Abdominalganglion (A4)) freigelegt. Nachdem dieses drei

Mal in Kulturmedium gewaschen wurde, folgte die Überführung in eine frische, mit Kulturmedium gefüllte Präparationsschale.

Die im Folgenden genannten Schritte wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Fixierung (Dorsalseite nach unten) des Präparates mit Minutien wurden noch vorhandene Tracheenreste und Nerven mit einer feinen Schere und Pinzetten entfernt. Anschließend wurde das Präparat gewendet, so dass die Ventralseite nach oben zeigte. Dann wurden die Neurolemmata von Meso- und Metathorakalganglion mit feinen Pinzetten entfernt.

Anschließend wurden die Ganglien drei Mal in Kulturmedium gewaschen und in silikonisierte Eppendorfgefäße (Biozym Scientific GmbH, Germany) überführt, die mit 500 µl frischem Medium gefüllt waren.

Dissoziation

Nach der Präparation wurde pro Ganglion 500 µl Dispase-Lösung (2 mg/ml in HBSS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) zugegeben und für 30 min bei 30 °C inkubiert, um die extrazelluläre Matrix anzudauen und eine Vereinzelung der Zellen zu ermöglichen.

Die Vereinzelung wurde durch zehnmaliges Triturieren mit silikonisierten Pipettenspitzen (200 µl; Biozym Scientific GmbH, Germany) erreicht.

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 400 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert (Restvolumen 250 µl), um die Menge an Zellschrott zu reduzieren bzw. die Zellkonzentration zu erhöhen.

2.1.1.2 Primärzellkultur Pilzkörper *Locusta migratoria*

Nach Ruhigstellung (Kälteanästhesierung) und Desinfektion mit 70% EtOH wurde die Frontalseite des Kopfes vor den Augen mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde dekapitiert, der Kopf in einer Präparationsschale mit Minutien fixiert und mit Kulturmedium überspült. Nach Entfernen des Tracheengewebes wurde das Hirn freigelegt und alle Nerven, Konnektive und die optischen Loben lateral mit einer feinen Schere abgeschnitten. Nach dreimaligem Waschen in Kulturmedium und Überführen in eine frische Präparationsschale wurde das Hirn mit Minutien fixiert. Anschließend wurde das Neurolemma mit 2 feinen Pinzetten entfernt, und die Pilzkörper wurden an der Basis mit einem Skalpell abgetrennt.

Diese wurden mit einer silikonisierten Pipettenspitze (200 µl) aufgenommen und in silikonisierte, mit 500 µl frischem Medium und 500 µl Dispase-Lösung (2 mg/ml) gefüllte Eppendorfgläser überführt.

Die Dissoziation erfolgte wie in 2.1.1.1 geschildert.

2.1.1.3 Primärzellkulturmedium für *Locusta migratoria*

Das für die Primärzellkulturen und die Präparation von Thorakal- und Pilzkörperneuronen verwendete Medium wurde von Weigel (2006) übernommen.

Es besteht aus Leibovitz L-15 Zellkulturmedium, dem

- 200 mg/l Glucose, 80 mg/l Fructose, 35 mg/l L-Prolin und 6 mg/l Imidazol als 10x Stocklösung in Leibovitz L-15 (Mix I),
- 1% (v/v) Glutamax I (L-Alanyl-L-Glutamin) Lösung (200 mM)
- Penizillin und Streptomycin (je 100 units/ml) und Fungizone (0,25 µg/ml)
- 10 mM Glucose, 10 mM Fructose und 25 mM HEPES

zugegeben wurden.

Anschließend wurde der pH unter Verwendung von 1 M NaOH auf 7.0 eingestellt. Die Osmolarität des Mediums lag danach bei etwa 380 mOsm. Da die Modifikationen unsteril durchgeführt wurden, folgte die Sterilfiltration (0,22 µm Porengröße) unter sterilen Bedingungen.

2.1.1.4 Mediumwechsel für Dielektrophorese

Für die Positionierungen mittels Dielektrophorese wurden die Neurone dissoziiert (s. 2.1.1.1). Nach der Trituration wurde das Medium auf ca. 100 µl dekantiert und mit 1 ml Dielektrophoresemedium (340 mM Mannose-Lösung in Aq. dest., 25 mM HEPES, pH mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt, Sterilfiltration (0,22 µm Porengröße) versetzt, um die Leitfähigkeit herunterzusetzen ($420 \mu\text{S/cm} < \sigma_{\text{Medium}} < 430 \mu\text{S/cm}$). Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, erneut zentrifugiert (400g, 4 min), wiederum mit 1 ml DEP-Lösung versetzt und ein letztes Mal zentrifugiert (400g, 3 min). Nach dem Dekantieren auf 200 µl wurden die Zellen vor der Positionierung mit einer silikonisierten Pipettenspitze resuspendiert.

Die Lösungen für die Positionierung der Neurone von Ratte und Huhn wurden in Osmolarität und pH-Wert entsprechend angepasst (ca. 280-290 mOsm). Dabei

wurde anstelle von Mannose Saccharose (220 mM) verwendet. Als Puffer diene wiederum HEPES (25 mM). Auf Grund der größeren Menge an NaOH zum Einstellen des pH-Wertes (pH=7,32) liegt die Leitfähigkeit entsprechend höher (Leitfähigkeit=1,55 mS/cm).

2.1.2 Technische Substrate

2.1.2.1 Multielektrodenarrays

Multielektrodenarrays (MEAs) ermöglichen die Langzeitbeobachtung neuronaler Netze unter definierten Bedingungen und damit Einsichten in deren Signalverarbeitung und Entwicklung unter Kulturbedingungen (Gross *et al*, 1977, 1979 & 1995; Stoppini *et al.*, 1997; Jimbo *et al.*, 2000).

Da sie eine bidirektionale Schnittstelle (Stimulation/Ableitung) darstellen, kann zum einen die Verarbeitung von externen elektrischen Stimuli innerhalb des neuronalen Netzes analysiert werden. Zum anderen kann die Spontanaktivität über lange Zeiträume hinweg untersucht werden (Cortexneurone: van Pelt *et al*, 2004; Jimbo *et al*, 1998; Shahaf und Marom, 2001). Sie ermöglichen damit fundamentale Einsichten in Elementarprozesse des Lernens. Vor dem Hintergrund medizinischer Fragestellungen können sie als Plattform für Untersuchungen zur Genese verschiedener Erkrankungen wie Demenzerkrankungen, Parkinson, Schizophrenie, Psychosen und für pharmakologische Studien (Gross *et al*, 1997; Keefer *et al*, 2001; Gramowski *et al*, 2000 & 2004) genutzt werden.

Die hier verwendeten MEAs wurden vom IBN-2 des FZ Jülich zur Verfügung gestellt. Ein MEA-Typ besteht aus Goldelektroden und -leiterbahnen (300 nm Schichtdicke, s. Abb. 1), ein weiterer ist mit einer zusätzlichen Beschichtung aus Titan (300 nm) versehen. In beiden Fällen bestehen die Waver aus Glas. Die Isolation wurde durch ONO-Stapel ($\text{SiO}_2\text{--Si}_3\text{N}_4\text{--SiO}_2$) realisiert. Die Arrays bestehen aus 8x8 Elektroden mit unterschiedlichen Durchmessern (10, 20 und 30 μm) und Elektrodenabständen (100 bzw. 200 μm).

Vor dem Einsatz wurden die MEAs zunächst mit 70% EtOH und einem Wattestäbchen gereinigt. Anschließend wurden sie für jeweils 5 min in 5%iger

NeodisherGK-Lösung (zum Entfernen etwaiger Proteinreste) und danach in Aq. dest. im Ultraschallbad behandelt. Es folgte die Hydrophilisierung in 20% H_2SO_4 (Au-MEAs) bzw. 1 M NaOH (Ti-MEAs) bei 80 °C (Trockenschrank). Anschließend wurde noch einmal mit 70% EtOH und Aq. dest. gereinigt.

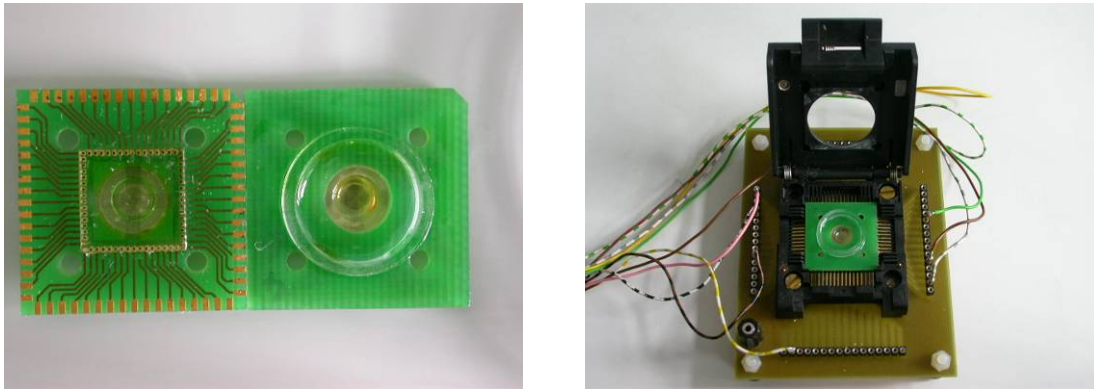


Abb. 1 Auf der linken Seite sind Vorder- und Rückseite der verwendeten Chips gezeigt. Das Elektrodenarray befindet sich zentral auf dem Carrier (grün). Der leitende Kontakt zwischen dem Array und dem Carrier wird durch Silberkleber an den Bondpads sichergestellt. Auf der rechten Seite ist ein Chip in einem Testsockel mit geöffnetem Deckel zu sehen.

2.1.2.2 Topologische Strukturen

Um definierte neuronale Netze auf MEAs aufzubauen, muss dafür gesorgt werden, dass jeweils nur ein Neuron pro Elektrode aufliegt und dort fixiert bleibt. Letzteres ist notwendig, da sich die Axone von sich vernetzenden Neuronen häufig verkürzen, wobei die Zellen von den Elektroden gezogen werden können. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um beiden Anforderungen gerecht zu werden.

So kann man beispielsweise stäbchenförmige Strukturen um die Elektroden anordnen (Zeck und Fromherz, 2001; Rutten *et al*, 2001).

Zur Herstellung komplexerer Topologien kann man MEAs auch mit Photolack (SU-8) beschichten und photolithografisch bearbeiten. Über diese Topologien kann man die Struktur des gewünschten neuronalen Netzes definieren (Merz, 2004; Merz und Fromherz, 2005; Jimbo *et al*, 1993; Maher *et al*, 1999). Löcher über den Elektroden dienen dem Fixieren und der genauen Positionierung der Somata, die für ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis wichtig sind. Die Gräben zwischen den Elektroden sollen das Neuriten- bzw. Axonwachstum räumlich definieren.

Für Vorversuche wurden vom IBN-2 Siliziumwaver mit aus SU-8 gefertigten Mikrostrukturen zur Verfügung gestellt (Abb. 2, A), die für die Positionierungsversuche mit den Saugkapillaren verwendet wurden. Die Topologien bestehen aus Löchern (Durchmessern von 80 bis 150 μm), die sternförmig über Gräben (von 10 oder 20 μm Breite) verbunden sind. Der Abstand der einzelnen Löcher beträgt 200 μm , und die Tiefe der Struktur liegt zwischen 25 und 45 μm .

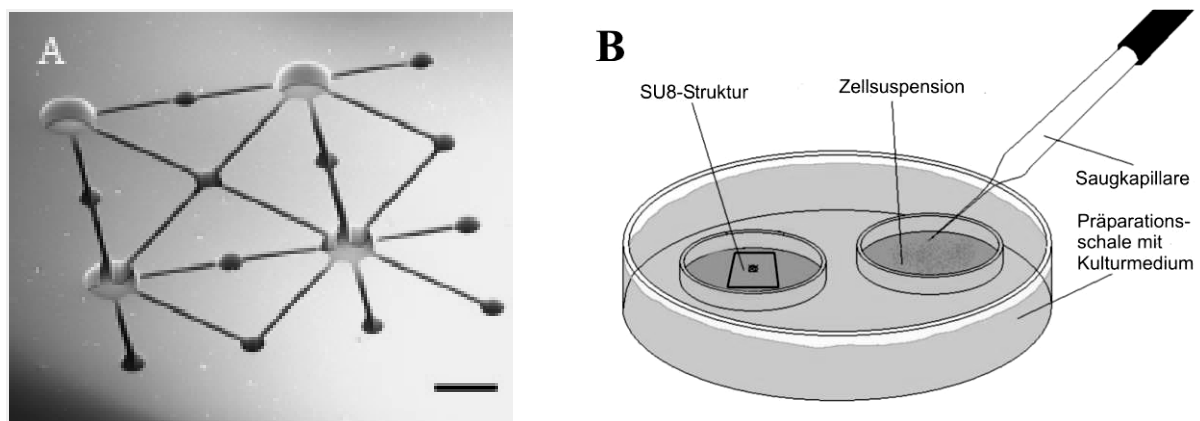


Abb. 2 (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer photolithografisch erzeugten SU-8 Struktur (Maßbalken: 200 μm ; Abb. aus Weigel, 2006). **(B)** Schematische Darstellung der Positionierung von Neuronen (hier aus Zellsuspension) mit einer Saugkapillare, die auf einen Mikromanipulator montiert ist.

2.1.2.3 Separationschip und Mikrofluidikkammer

Um verschiedene Zelltypen, wie Neurone und Gliazellen, Neurone unterschiedlicher Größe und neuronale Subtypen, voneinander zu trennen, wurde ein so genannter Separationschip entworfen.

Der Chip besteht aus einem Array von linearen Au-Elektroden (Länge: 6 mm, Breite d: 10 bzw. 20 μm , Abstände d: 10 bzw. 20 μm , Gesamtlänge des Arrays: 28 mm) auf Glaswavern (s. Abb. 3), wobei jede vierte bzw. jede zweite Elektrode dem gleichen Bondpad zugeordnet ist. Die Passivierungsschicht (ONO-Stapel) wurde bei einem Teil der Chips wieder geöffnet, bei anderen blieb er geschlossen, um etwaige elektrochemische Reaktionen an den Elektrodenoberflächen zu verhindern.

Die Elektroden werden jeweils 90° phasenverschoben mit einem Rechtecksignal angesteuert, so dass eine elektrische Wanderwelle entsteht. Zusätzlich können die Elektroden optional über 2 weitere Bondpads so angesteuert werden, dass alter-

nierend 2 verschiedene Phasen (0 und 180°) eines Signals appliziert werden können, wodurch sich eine Stehwelle aufbauen lässt (s. Abb. 3). Durch die Kombination von Steh- und Wanderwelle lässt sich die Effizienz der Wanderwellendielektrophorese nochmals verbessern (Pethig *et al*, 2003).

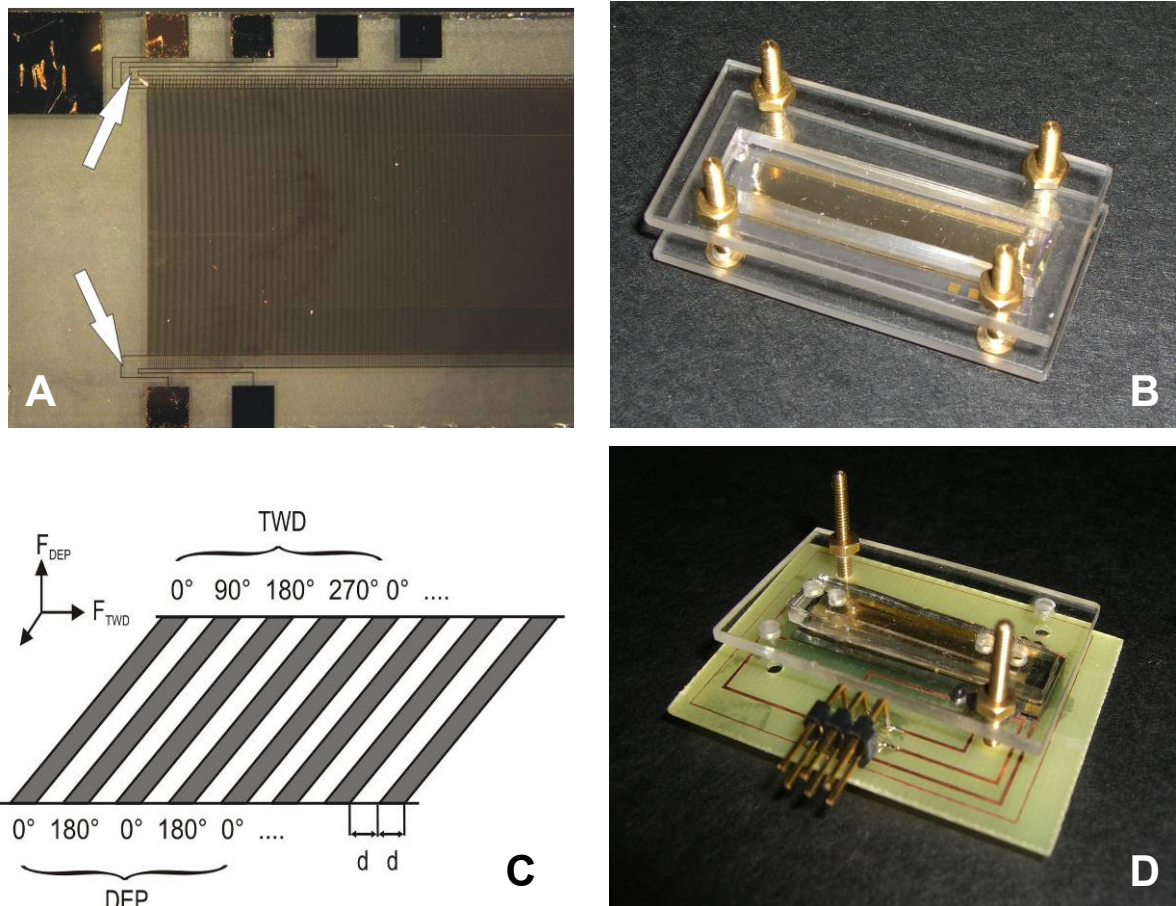


Abb. 3 Separationschip (A) zur Auftrennung von Zellen nach Größe und dielektrischen Eigenschaften. Oben und unten sieht man die Bondpads, die oberen vier werden für die Wanderwellendielektrophorese verwendet, die unteren beiden dienen der Erzeugung einer zusätzlichen Stehwelle (siehe auch (C)). Über die horizontalen Zuleitungen (Pfeile) werden die Signale den Elektroden zugeführt. In (B) ist die Messkammer mit Plexiglaseinfassung und dem PDMS-Block mit der Mikrofluidikkammer gezeigt. Abschließend wurden die Chips auf Platinen geklebt, die zwecks Kontaktierung mit einem Stecker versehen sind (D).

Diese Chips wurden im FZ Jülich (M. Banzet, S. Ingebrandt) in einem 4-Masken-Prozess hergestellt.

Die verwendeten Waver bestanden aus Silizium (p-dotiert) oder Glas. Die Silizium-Waver wurden zunächst thermisch bei 1000 °C oxidiert (bei Glas entfiel dieser Schritt). Auf das entstandene SiO₂ (~1 µm) wurde AZ-Lack (AZ5214) aufgetragen und photolithografisch das Negativ der Leiterbahnen und Bondpads erstellt.

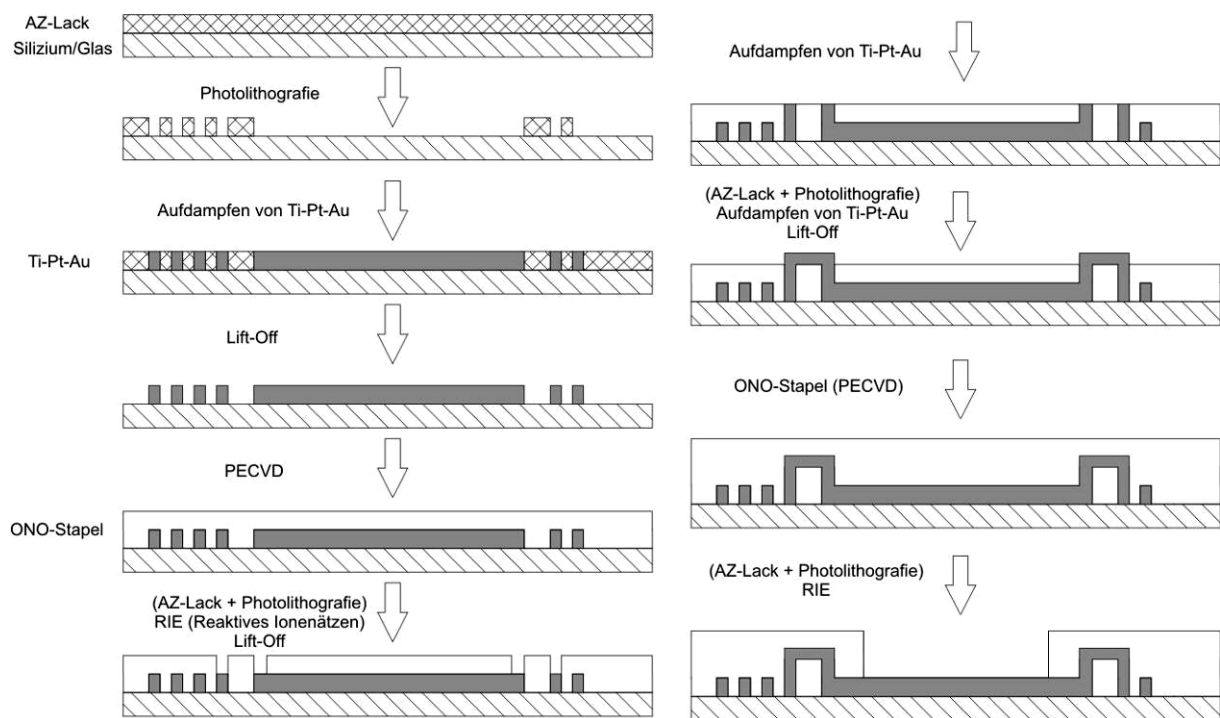


Abb. 4 Schematische Darstellung der Separationschip-Prozessierung (Erläuterung im Text). Die Ti-Pt-Au-Layer sind grau, das Wavermaterial schraffiert, die ONO-Stapel weiß und der Photoresist kreuzschraffiert dargestellt. Hier ist der Übersichtlichkeit halber nur die Prozessierung der Zuleitungen, die vertikal durch die ONO-Stapel gehen, dargestellt.

Anschließend wurde Ti-Pt-Au (10/10/200 nm) aufgedampft. In diesem Schritt wurde bereits die Kontaktierung der Bondpads, die mit den 0° phasenverschobenen Signalen (s. Abb. 3, C) angesteuert werden, realisiert. Nach dem Lift-Off (Entfernen des AZ-Lacks mit Aceton) wurde der ONO-Stapel (100/150/100 nm) bei 300 °C mittels PECVD (plasma enhanced chemical vapour deposition) aufgebracht.

Danach wurde zur Kontaktierung der darunter liegenden Goldschicht nochmals AZ-Lack aufgetragen und photolithografisch Löcher in den Lack eingebracht. Mittels RIE (reactive ion etching – reaktives Ionenätzen) mit CHF_3/CF_4 wurde anschließend der ONO-Stapel geöffnet. Danach wurde der restliche Lack mit Aceton entfernt.

Anschließend wurde das dritte Layer, das die Leiterbahnen zur Kontaktierung der Elektroden darstellt, analog zum ersten Layer erzeugt (AZ-Lack – Photolithografie – Ti-Pt-Au-Schicht – Lift-Off).

Abschließend wurde AZ-Lack zur Isolation aufgebracht. Bei einem Teil der Arrays wurden die Elektroden anschließend wieder photolithografisch geöffnet.

Die Mikrofluidikkammer wurde aus PDMS (Poly-Dimethyl-Siloxan) hergestellt und besitzt eine Kammer mit einer Höhe von 200 bzw. 400 μm (L x B: 3,1 cm x 1,0 cm). Für erste Versuche wurden die Zu- und Ableitungen der Zellsuspension mit Injektionskanülen, die in die Enden des Fluidkanals eingeführt wurden, realisiert.

Die Herstellung der Mikrofluidikkammern und der Platinen (s. Abb. 3), auf die die Chips anschließend geklebt wurden, wurde von Hr. Buchenauer (IWE-1, RWTH Aachen) durchgeführt.

Um über einen weiten Frequenzbereich die Phasenbezüge konstant halten zu können, wurde ein Johnson-Zähler gebaut (Entwurf Hr. Tetzl, Biologie 2, RWTH Aachen, Aufbau: Hr. Otto, Elektronik-Werkstatt, IBN-2, FZ Jülich). Die Amplituden (0-10 V) können über Potentiometer für jeden Kanal (Phase) einzeln eingestellt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Elektrophysiologie Primärzellkultur

Nach zwei Tagen in Kultur wurden die Neurone intrazellulär mit scharfen Elektroden abgeleitet. Die Elektroden wurden unter Verwendung eines Horizontalpullers (Sutter-Instruments Co., P-87) aus Glaskapillaren (Science Products, GB120F-8P) gezogen (Widerstand: 80-150 MΩ). Als Elektrolyt-Lösung wurde 2 M Kaliumacetat verwendet. Zur Visualisierung der Elektrodenpositionierung am Zellsoma wurde ein Binokular (Stemi2000, Zeiss) verwendet.

Gereizt wurde stufenweise mit Depolarisationen zwischen 30 und 80 mV oder mit Hyperpolarisationen bis 100 mV, gefolgt von Repolarisation.

Das Elektrodenpotential wurde direkt hinter der Elektrode 10x verstärkt.

Zur direkten Monitorierung des Potentialverlaufs wurde ein Oszilloskop (Tektronix 5111A) verwendet. Zur Digitalisierung wurde ein AD-Wandler (CED 1401), zur rechnergestützten Aufzeichnung das Programm Spike2, verwendet.

2.2.2 Retrograde Färbung

Um gezielt Nervenzellen identifizieren zu können, wurden retrograde Färbungen durchgeführt.

Zunächst wurde das Nervensystem, wie unter 2.1.1.1 geschildert, entnommen.

Nach der Fixierung des Metathorakalganglions wurde an der Basis von Nerv 5 (Nv5) ein Vaselinetrog gebaut und der Nerv distal so durchtrennt, dass das Endstück in dem Trog zu liegen kam. Nach Zugabe von destilliertem Wasser (1 min), um den Nerv aufzuquellen und so die Farstoffaufnahme zu verbessern, wurde der Trog mit Texasrot-Dextran in Phosphatpuffer (1:100) befüllt. Die Inkubation wurde für 12 h bei 4 °C vorgenommen, wobei der Farbstoff per Diffusion durch die Axone in die Somata transportiert wird.

2.2.3 Herstellung der Saugkapillaren

Die Mikrokapillaren (Science Products, GB120F-8P) wurden mit einem Horizontal-Puller (Sutter-Instruments Co., P-87) auf Patchelektrodendurchmesser (ca. 1-5 µm) ausgezogen. Dann wurde unter dem Binokular unter Verwendung einer geeichten

Mikrometer-Skala die Spitze beim gewünschten Durchmesser mit einem Skalpell abgebrochen.

Anschließend wurden die Kapillaren unter Verwendung des Pullers feuerpoliert. Dadurch wurden die Bruchkanten geglättet und so die Gefahr reduziert, die Zellen bei der Entnahme zu beschädigen. Zur Reduktion der Adhäsion an der Kapillarenspitze wurden sie abschließend silanisiert. Dazu wurde eine 5%-ige Dimethyl-Silanlösung verwendet, die in die Kapillaren gesaugt wurde. Nach Verdunsten der Lösung blieb eine Silikon-Restschicht auf der Kapillarenoberfläche. Um Rückstände zu beseitigen und sie zu desinfizieren, wurden die Kapillaren anschließend mit Aq. dest. und 70% EtOH gereinigt.

2.2.4 Entnahme retrograd gefärbter Neurone mittels Saugkapillare

Um Verluste bei der Dissoziation zu vermeiden, wurden der FETi (fast extensor tibiae) und andere gefärbte Neurone mit Hilfe einer Saugkapillare direkt aus dem Ganglion entnommen.

Um die Entnahme zu erleichtern, wurde das Bindegewebe bzw. die extrazelluläre Matrix enzymatisch angedaut, indem dem Kulturmedium (2 ml) nach dem Abziehen der Ganglienhaut für 30 min 1 ml Dispase-Lösung ($c=2$ mg/ml) zugesetzt wurde. Während der enzymatischen Behandlung wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette die Medium-Dispase-Lösung immer wieder auf die Region um den FETi gespült, wodurch sich die Neurone voneinander lösten.

Anschließend wurde die Saugkapillare (Herstellung s. 2.2.3) unter dem Fluoreszenzbinokular mit Hilfe des Mikromanipulators in geringem Abstand zur gewünschten Zelle ($< 5 \mu\text{m}$) positioniert.

Die Saugkapillare ist über einen Silikonschlauch mit einem Mundstück verbunden. So läßt sich durch Saugen ein Unterdruck erzeugen, der das Neuron über den Fluidstrom an die Saugkapillarenspitze zieht und dort fixiert.

Über den Mikromanipulator wurde das Neuron so weit aus dem Ganglion gezogen, dass der Primärneurit mit einem feinen Glas- oder Metallhäkchen durchtrennt werden konnte (s. Abb. 5).

Es wurden verschiedene Kapillarendurchmesser ($1/10 - 2/3$ des Zelldurchmessers) getestet.

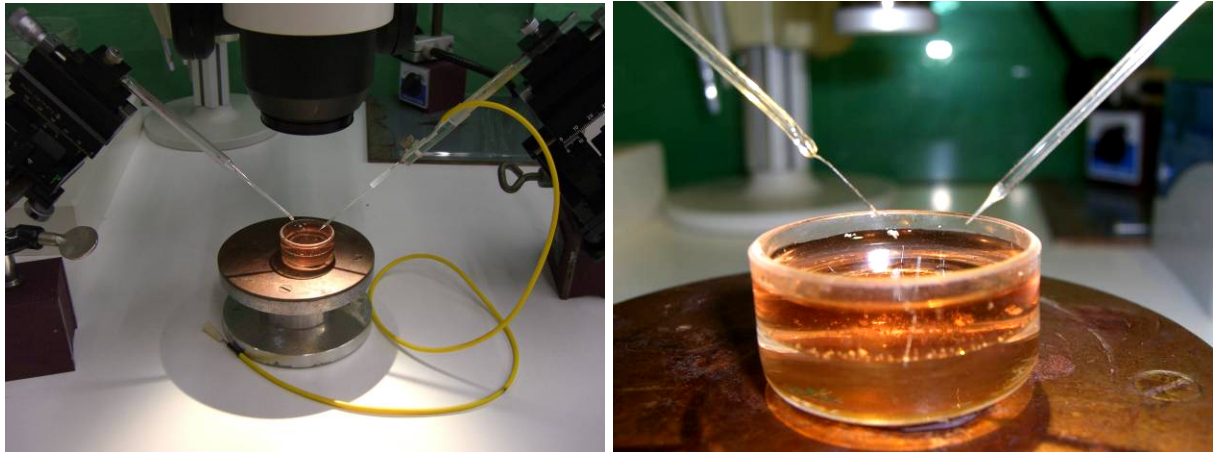


Abb. 5 Apparatur zur Entnahme und Positionierung von Neuronen. Die Kulturschale mit den gefärbten Neuronen ist unter dem Fluoreszenzbinokular platziert. Die Saugkapillare wird mit dem rechten Mikromanipulator gesteuert. Durch Saugen am Silikonschlauch (gelb) werden die gewünschten Neurone angezogen, fixiert und aus dem Ganglion gezogen. Mit dem Glas- oder Metallhaken, der über den linken Mikromanipulator gesteuert wird, kann der Primärneurit durchtrennt werden. Durch leichtes Blasen in den Silikonschlauch kann das Neuron auf einem beliebigen Substrat platziert werden. Links: Übersicht, rechts: Vergrößerung

2.2.5 Positionierung mittels Saugkapillare

Nach der Entnahme des gewünschten Neurons (entweder direkt aus dem Ganglion oder nach der Dissoziation aus der Zellsuspension, s. Abb. 2, B) wurde unterschiedlich vorgegangen:

- a) Zum Überführen in eine andere Kulturschale wurde eine „Mantel“-Kapillare, die über der Saugkapillare teleskopartig beweglich ist (Zwischenraum mit Vaseline abgedichtet), über das Neuron geschoben. Zum einen fallen die Zellen durch die Füllung des Kapillarlumens mit Medium nicht trocken. Zum anderen konnte damit das Problem gelöst werden, dass die Oberflächenspannung einen so großen Widerstand darstellt, dass die Zellen beim Eintauchen in das Medium der anderen Kulturschale zerstört werden oder sich zumindest von der Saugkapillare lösen.
- b) Wurde die Positionierung in der gleichen Schale vorgenommen, so konnte auf die Mantel-Kapillare verzichtet werden. Dabei wurde dann die Unterlage entweder mit Hilfe eines Kreutztisches oder manuell verschoben, bis sich die Zelle über der Zielposition befand.

Die Feinjustage geschah dann unter Verwendung des Mikromanipulators und das Ablegen durch Applikation von Überdruck durch Blasen in den Silikonschlauch.

2.2.6 Doppelfärbungen

Um nach den Positionierungen Neurone und Gliazellen voneinander unterscheiden zu können, wurden Doppelfärbungen durchgeführt.

Dabei wurden die Neurone mit einem Antikörper gegen HRP gefärbt (Jan und Jan, 1982). Dieses bindet spezifisch an Nervana, einem neuronenspezifischen Oberflächen-Glykoprotein der Zellmembran, dessen Struktur dem Pflanzenprotein Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) ähnelt (Sun und Salvaterra, 1995). Zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung wurde ein Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzmarker CY3 verwendet (Loesel *et al*, 2006). Um die DNS aller Zellkerne zu markieren, wurde DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) eingesetzt. Damit zeigen Neurone ein rotes und blaues Fluoreszenzsignal, Gliazellen nur ein blaues. Zur Differenzierung wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in dem Programm „The Gimp“ überlagert.

2.2.7 Dielektrophorese

2.2.7.1 Einleitung

Der Begriff Dielektrophorese wurde von Pohl (1951) eingeführt und definiert als Translationsbewegung neutraler Stoffe, die durch Polarisierungseffekte in inhomogenen elektrischen Feldern (AC oder DC) verursacht werden (Pohl, 1978). Je nach Polarisierbarkeit des Stoffes relativ zu seiner Umgebung resultiert daraus dessen Bewegung in Richtung Feldmaximum (positive Dielektrophorese, pDEP) oder Feldminimum (negative Dielektrophorese, nDEP).

Sie besitzt ein breites Spektrum an biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten beispielsweise bei der Zellisolation und Zelltrennung (Wang und Huang, 1993; Markx *et al*, 1994; Fuhr *et al*, 1994; Gonzales und Remcho, 2005) und beim Zellhandling für Analysezwecke (Fuhr, 1985; Müller *et al*, 1999). Sie ist auch für die Analyse von Teilchen und biologischen Proben (z. B. DNS und andere Makromoleküle, subzelluläre Strukturen) einsetzbar (Gonzales und Remcho, 2005).

Die Methode ist berührungsfrei und bietet daher den Vorteil, keine Schädigung der Zellen zu verursachen oder Aktivierungen von Signalwegen zu induzieren (Wang *et al*, 1997; Fuhr *et al*, 1994; Müller *et al*, 1999).

In frühen Studien konnte von Pohl bereits gezeigt werden, dass sich durch die Verwendung der Dielektrophorese lebende von toten Zellen trennen lassen (Pohl, 1978). In der Folge konnte dies auch für Thrombo-/Erythrozyten (Gascoyne *et al*, 1992) und Bakterien/Blutzellen (Wang *et al*, 1992) nachgewiesen werden.

Andere Arbeiten zeigten Trennung unterschiedlicher Zelltypen, wie beispielsweise verschiedener Tumorzellen von Blutzellen (Gonzales und Remcho 2005; Gascoyne *et al*, 1997).

Zwei Hauptprobleme bei der Erzeugung definierter neuronaler Netze auf MEAs sind die Trennung von Neuronen und Gliazellen und die präzise Positionierung der Neurone auf den Elektroden (Prasad *et al*, 2004). Gliazellen zeigen in Kultur die Tendenz, die Neurone zu umhüllen oder zu unterwandern (Maher *et al*, 1999) und verhindern damit den extrazellulären Zugang (Bear *et al*, 1999). Zum anderen ist es für eine gute Kopplung (hohes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis) wichtig, dass die Neurone möglichst genau auf den Elektroden liegen und diese möglichst vollständig abdichten (Pine und Gilbert, 1982; Gross, 1979; Grattarola und Martinoia, 1993).

Die Anwendung der Dielektrophorese ermöglicht die Lösung beider Probleme. So konnten Prasad *et al*. (2003 & 2004) zeigen, dass man durch sie Neurone und Gliazellen durch die Wahl geeigneter Medien räumlich voneinander separieren und beide Zelltypen auf bzw. zwischen den Elektroden positionieren kann. Bei niedrigeren Frequenzen tritt bei beiden negative Dielektrophorese auf. Allerdings wurden zur Bestimmung der Übergangsfrequenzen unterschiedliche Medien verwendet, so dass diese nicht direkt vergleichbar sind. Es konnte zwar gezeigt werden, dass sich die Zellen so positionieren lassen, dass die Neurone zwischen und die Gliazellen auf den Elektroden liegen, der umgekehrte Fall konnte bisher nicht erreicht werden.

Die Positionierung von Neuronen (aus Vertebraten) auf Elektroden durch positive und negative DEP wurde auch von anderen Autoren gezeigt (Rutten *et al*, 2001; Heida *et al*, 2001; Yu *et al*, 2004). Die Dielektrophorese ist für die Zellen unschädlich (Wang *et al*, 1997), sofern zum einen die Gradienten nicht zu groß sind, da dies über die induzierten mechanischen Kräfte zur Lyse der Zellen oder zu großen Transmem-

branspannungen ($> 10 \text{ mV}$) führen kann (Fuhr *et al*, 1994). Beim Einsatz der negativen DEP kann mit sehr geringen Spannungen ($\sim 2 \text{ V}$) gearbeitet werden, was die Belastung für die Zellen erheblich reduziert (Heida, 2003). Überdies kann dabei die Positionierung im Kulturmedium vorgenommen werden, und daher wird meist diese Methode verwendet.

2.2.7.2 Grundlagen

Elektrische Felder üben Kräfte auf geladene Teilchen aus. Bei Teilchen mit einer Nettoladung führt dies zur Bewegung entlang der Feldlinien hin zur Elektrode mit der entgegengesetzten Ladung. Dabei ist es gleichgültig, ob das Feld homogen oder inhomogen ist (Abb. 6).

Die Gesamtkraft, die auf ein Teilchen in einem elektrischen Feld ausgeübt wird, berechnet sich nach Gascoyne und Vykoukal (2002) zu

$$\vec{F}_{el} = q\vec{E} + (\vec{m} \cdot \nabla)\vec{E} + \frac{1}{6}\nabla(\vec{Q} : \nabla\vec{E}) + \dots \quad (1.1)$$

Dabei ist $q\vec{E}$ die Coulomb-Kraft F_C , die ein Teilchen der Ladung q in einem elektrischen Feld E erfährt. Sie ist Null, wenn die Nettoladung Null ist oder in Wechselfeldern, wenn $\vec{E}$ im zeitlichen Mittel 0 ist. Die anderen Terme resultieren aus der Wechselwirkung der induzierten Polarisierung des Teilchens mit der räumlichen Inhomogenität des Feldes. Hierbei ist $\vec{m}$ das Dipolmoment, $\vec{Q}$ der Quadrupol-Tensor und $\nabla\vec{E}$ der Gradient des elektrischen Feldes. Die dielektrische Kraftkomponente verschwindet nur, wenn das Feld homogen ($\nabla\vec{E}=0$) ist.

Auf dielektrische Teilchen in homogenen Feldern wirken also auf die entgegengesetzten Ladungen die gleichen Kräfte, die eine Rotations- (bei anisotroper Polarisierbarkeit oder Elongation), nicht aber eine Translation bewirken können (Pohl, 1978; Jones, 1995; Abb. 6, links). In inhomogenen Feldern sind die wirkenden Kräfte unterschiedlich groß, wodurch ein Dipolmoment entsteht, dessen Wechselwirkung mit dem äußeren Feld zur Translation führen kann (Abb. 6, rechts), sofern sich die dielektrischen Eigenschaften unterscheiden (s. u. Clausius-Mosotti-Faktor, Gl. (1.3)).

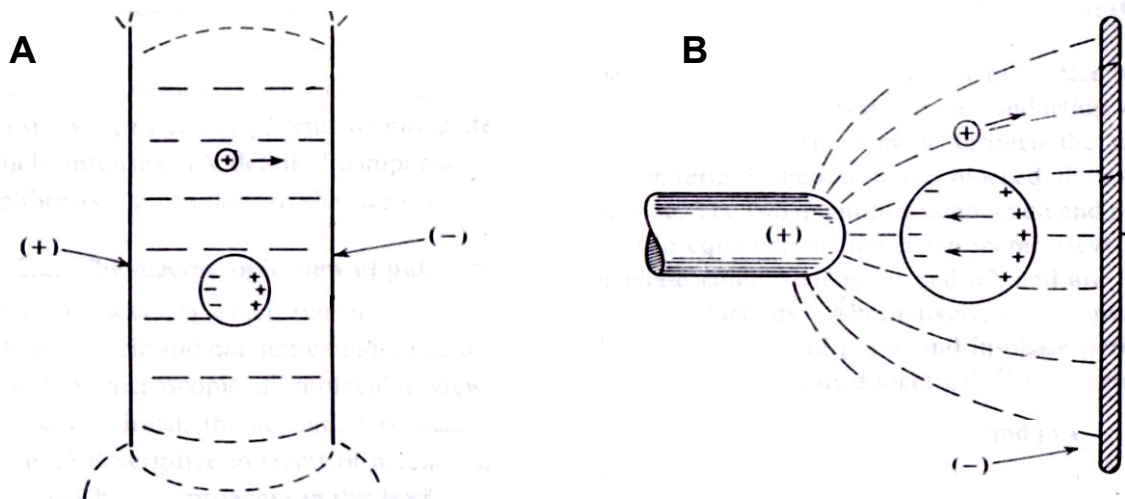


Abb. 6 Einfluss eines homogenen (A) und inhomogenen (B) elektrischen Feldes auf Teilchen mit einer Nettoladung und dielektrische Teilchen (aus Pohl, 1978).

Ganz allgemein unterscheidet man Orientierungs- und Verschiebungspolarisation (Meschede, 2002) und vier Polarisationsgrundmechanismen (Abb. 7; Meschede, 2002; Pohl, 1978):

- elektronische Polarisation
- Ionenpolarisation
- Orientierungspolarisation
- Maxwell-Wagner-, Raumladungs- oder Grenzflächenpolarisation.

Bei der elektronischen Polarisation kommt es durch das elektrische Feld zur Deformation und Verschiebung der Elektronenhülle und damit zur Verschiebung des negativen Ladungsschwerpunkts und des positiv geladenen Atomkerns. Bei der Ionenpolarisation verschieben sich Kationen und Anionen gegeneinander.

Da die Verschiebung einer Ladung von ihrer Masse (Trägheit) und den intramolekularen Wechselwirkungen abhängig ist, folgt, dass sie Wechselfeldern nur bis zu bestimmten Frequenzen folgen kann. Daraus ergeben sich auch unterschiedliche Relaxationszeiten (Zeit, die benötigt wird, um nach Abschalten des Feldes wieder in die ursprüngliche Ruhelage zurückzukehren).

Bei der Orientierungspolarisation richten sich permanente Dipole (z. B. Wassermoleküle) im Feld aus.

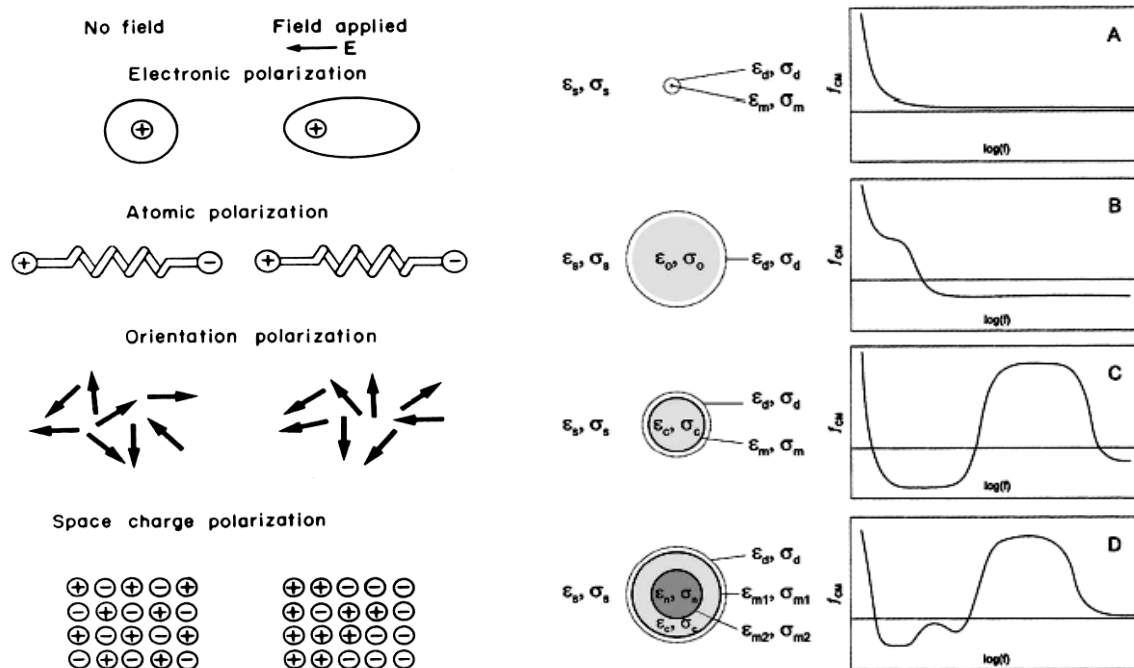


Abb. 7 Links dargestellt die vier Grundmechanismen der Polarisation (aus Stuchly, 1983). Rechts: Frequenzspektrum des Clausius-Mosotti-Faktors bei unterschiedlichen Zell-Modellen (aus Gascoyne und Vykoukal, 2004).

Bei der Grenzflächen- oder Maxwell-Wagner-Polarisation kommt es zum makroskopischen Transport von Ladungen (z. B. gelöste Ionen im Zytoplasma oder Elektronen in Metallen), bis diese auf ein Hindernis (Zellmembran bzw. Korngrenzen) treffen, wo sie akkumulieren. Auf Grund der Proportionalität des elektrischen Dipolmoments zum Abstand der entgegengesetzt geladenen Ladungsschwerpunkte können in den Zellen wegen ihrer Größe sehr große Dipolmomente erzeugt werden, selbst wenn nur sehr wenige Ionen im Zytoplasma wären (Pohl, 1978).

Dieser Polarisationsmechanismus dominiert die dielektrischen Eigenschaften von Zellen in Feldern mit Frequenzen bis zu 200 MHz, elektronische und Orientierungspolarisation liefern nur kleinere Beiträge (Gascoyne und Vykoukal, 2004). Daher hängen die dielektrischen Eigenschaften der Zelle vor allem von der Morphologie, den inneren Leitfähigkeiten und den Konduktivitäten der Membran ab (Alder *et al*, 1991; Wang *et al*, 1994; Huang *et al*, 1995 & 1996).

Man kann das Frequenzspektrum der Polarisierbarkeit mit verschiedenen Modellen simulieren und berechnen (Kaler and Jones, 1990; Kaler *et al*, 1992, Docoslis *et al*, 1997; s. Abb. 7). Dabei besteht die Zelle vereinfacht und je nach Modell aus einer

Kugel mit bis zu 3 isolierenden Membranen (maximal: Zellwand, Zellmembran, Kernmembran), die jeweils eine spezifische Kapazität und Leitfähigkeit besitzen (physikalisches Korrelat für die verschiedenen Kanäle und die Lipiddoppelschicht; genauer sind es natürlich verschiedene, teils sogar vernetzte, parallele und serielle Kapazitäten und Leitfähigkeiten der einzelnen Kanäle). Das bzw. die Lumen ist/sind mit einem Elektrolyten gefüllt, der über die gelösten Ionen eine definierte Leitfähigkeit besitzt und im Übrigen aus dielektrischen Teilchen besteht.

Da es an der Innen- und Außenseite der Membran zur Grenzflächenpolarisation kommt, die Leitfähigkeiten und Permittivitäten von Außenmedium und Zytoplasma aber differieren, benötigen die beiden Medien zur Polarisation unterschiedlich lang und die auf die Einzelladungen wirkenden Kräfte sind unterschiedlich groß. Somit sind die Frequenzspektren abhängig von den elektrischen Eigenschaften des Außenmediums, und man kann über die Änderung der Leitfähigkeit des Mediums die Kraftwirkung auf die Zellen (in Grenzen) vorgeben (Gascoyne und Vykoukal, 2004).

Für die Charakterisierung und Beschreibung des Translationsverhaltens von Zellen in elektrischen Feldern ist das so genannte Single-Shell-Modell (s. Abb. 7 rechts, C) ausreichend (Jones, 1995; Gonzales und Remcho, 2005; Gascoyne und Vykoukal, 2004).

Für die zeitlich gemittelte dielektrophoretische Kraft $\langle \vec{F}_{DEP} \rangle$, die ein sphärischer Körper mit dem Radius r in einem inhomogenen Wechselfeld der Frequenz ω erfährt, gilt (Gonzales und Remcho, 2005; Gascoyne und Vykoukal, 2004)

$$\begin{aligned} \langle \vec{F}_{DEP} \rangle = & 2\pi r^3 \varepsilon_{Medium} \operatorname{Re}[f_{CM}(\omega)] \nabla \vec{E}_{rms}^2 \\ & + \operatorname{Im}[f_{CM}(\omega)] (\vec{E}_{x0}^2 \nabla \varphi_x + \vec{E}_{y0}^2 \nabla \varphi_y + \vec{E}_{z0}^2 \nabla \varphi_z) \end{aligned} \quad (1.2)$$

mit ε_{medium} : Permittivität des Mediums; Re bzw. $\operatorname{Im}[f_{CM}(\omega)]$: Real- bzw. Imaginärteil des frequenzabhängigen Clausius-Mosotti-Faktors CM; $\nabla \vec{E}_{rms}^2$: Gradient des elektrischen Feldes (partieller Differentialoperator (Nabla-Operator) $\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$), d. h. die Ableitung des elektrischen Feldes nach den 3 Raumdimensionen; $\vec{E}_{x0/y0/z0}^2$: Feldamplituden in den 3 Dimensionen und $\varphi_{x/y/z}$ die jeweiligen Phasen.

In dieser Näherung werden Quadrupol- und höhere Terme aus (1.1) vernachlässigt, was meist für leicht bis moderat inhomogene Felder zulässig ist (Gascoyne und Vykoukal, 2004).

Es gibt also zwei unabhängige Terme, die zur dielektrophoretischen Gesamtkraft beitragen:

1. Der erste Term beschreibt die real-, in-Phase- oder kapazitative-Kraftkomponente. Sie ist proportional der Grenzfläche (und damit dem Volumen) und der elektrischen Polarisierung, die in dem Teilchen auf Grund der Inhomogenität des elektrischen Feldes induziert wird und damit proportional zu $\text{Re}[f_{CM}(\omega)]$ und $\nabla \vec{E}_{rms}^2$. Diese Kraft führt dazu, dass das Teilchen in Richtung des Feldminimums bzw. -maximums bewegt wird.

Die Richtung hängt davon ab, ob $\text{Re}[f_{CM}(\omega)]$ positiv oder negativ ist, d. h. ob das Teilchen stärker oder weniger stark polarisierbar ist als das umgebende Medium. Ist der Term positiv, so spricht man von positiver Dielektrophorese (pDEP), ist er negativ von negativer Dielektrophorese (nDEP).

Der komplexe und frequenzabhängige Clausius-Mosotti-Faktor f_{CM}^* berechnet sich nach Gascoyne und Vykoukal (2004) über

$$f_{CM}^*(\varepsilon_{Zelle}^*, \varepsilon_{Medium}^*, \omega) = \frac{\varepsilon_{Zelle}^*(\omega) - \varepsilon_{Medium}^*(\omega)}{\varepsilon_{Zelle}^*(\omega) + 2\varepsilon_{Medium}^*(\omega)}; \quad (1.3)$$

mit

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j \frac{\sigma}{\omega}. \quad (1.4)$$

Dabei sind $\varepsilon_{Zelle}^*(\omega)$ bzw. $\varepsilon_{Medium}^*(\omega)$ die frequenzabhängigen, komplexen Permittivitäten der Zelle bzw. des Mediums, $j = \sqrt{-1}$ und σ die jeweilige elektrische Leitfähigkeit.

Dadurch wird das Teilchen entweder von den Elektrodenkanten angezogen oder abgestoßen. Die Bewegungsrichtung ist unabhängig von der Richtung des Feldvektors.

2. Die zweite Kraftkomponente ist proportional $\text{Im}[f_{CM}(\omega)]$, d. h. dem imaginär-, außer-Phase- oder Verlust-Anteil der Polarisierung und der Geschwindigkeit

mit der die elektrische Feldverteilung wandert (Phasengradienten $\nabla\varphi_x$, $\nabla\varphi_y$ und $\nabla\varphi_z$).

Durch diese Kraft wird das Teilchen entweder in oder entgegengesetzt der Richtung des Feldes bewegt ($\text{Im}[f_{CM}(\omega)]$ größer oder kleiner 0), abhängig davon, ob es mehr oder weniger verlustbehaftet ist als das umgebende Medium. Dadurch kann das Teilchen parallel und quer zu den Elektroden bewegt werden, wozu jedoch mindestens drei verschiedene Potentialzustände über die Elektroden vorgegeben werden müssen (Gascoyne und Vykoukal, 2004; Fuhr, 1985; Fuhr *et al*, 1995a).

Für Positionierungszwecke über negative bzw. positive Dielektrophorese kann in der Regel der Imaginärteil der Gleichung vernachlässigt werden. Er ist insbesondere für Feldkäfige und die Zellcharakterisierung über Rotationsspektren (Fuhr, 1985; Fuhr *et al*, 1995a; Müller *et al*, 1999) und für verschiedene Trennverfahren (Dielektrophoretische Zellsortierung) von Bedeutung.

2.2.7.3 Zellseparation – Wanderwellendielektrophorese

Seit Mitte der 90er Jahre werden dielektrische Systeme zur schonenden Beeinflussung und Separation von Zellen und Partikeln in Mikrofluidiksystemen eingesetzt (Schnelle, 1999; Schnelle, 2000; Yang, 1999; Wang, 1998).

Der Vorteil dieser Methode ist darin zu sehen, dass mit Hilfe von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern dielektrische Partikel wie Zellen, Viren und auch künstliche Latexpartikel berührungslos und ohne bewegliche Elemente in einer Flüssigkeit gehandhabt, gruppiert und an vorher bestimmte Zielorte geführt werden können. Dazu können die hochfrequenten dielektrischen Kräfte allein oder in Kombination mit hydrodynamischen Kräften verwendet werden. Die dielektrische Beeinflussung von Partikeln kann durch unterschiedliche Anordnungen der Elektroden im Flusskanal erreicht werden. Man unterscheidet zwischen zweidimensionalen und dreidimensionalen Anordnungen.

In den frühen Arbeiten wurde meist eine zweidimensionale Anordnung verwendet, bei der die Teilchenbeeinflussung in Flusskanälen durch einseitig am Kanalboden

angebrachte Elektroden in Kombination mit laminarer Strömung im Kanal durchgeführt wird (Markx und Pethig, 1995; Schnelle *et al*, 1996 & 2000).

In Kombination mit dem parabolischen Flussprofil können zweidimensionale Elektrodenarrays auch zur Separation von Partikeln unterschiedlicher Größe verwendet werden (Huang *et al*, 1997; Markx *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998 & 2000; Yang *et al*, 1999 & 2000; Cui *et al*, 2001]. Bei dieser dielektrophoretischen Feld-Fluss-Fraktionierung (DEP-FFF) werden die Partikel unter dem Einfluss der dielektrischen Kräfte auf unterschiedliche Höhen im Flusskanal angehoben, wodurch auf Grund des parabolischen Flussprofils in der Flusskammer der Partikeltransport mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten erfolgt. Die Separation der Partikel ist abhängig von der Frequenz und Spannung des angelegten elektrischen Feldes und der Flussgeschwindigkeit.

Bei einer anderen Separationsmethode erfolgt die Auftrennung der Partikel auf Grund ihrer unterschiedlichen dielektrischen Eigenschaften (Pethig *et al*, 1992; Wang und Huang, 1993; Markx *et al*, 1994; Morgan *et al*, 1999). Partikel, die bei einer bestimmten angelegten Frequenz positive Dielektrophorese zeigen, werden zu den Elektroden gezogen und dort festgehalten, während Partikel, die negative Dielektrophorese aufweisen, von den Elektroden abgestoßen und mit der Flüssigkeitsströmung weggetragen werden. Anschließend wird das elektrische Feld ausgeschaltet, und die Partikel lösen sich wieder von den Elektroden und werden durch den Fluidstrom transportiert.

Die hier verwendete Methode zur Trennung, die TWD (TWD, travelling-wave dielectrophoresis, Wanderwellen-Dielektrophorese), beruht auf Unterschieden in den elektrischen Polarisierbarkeiten zwischen Partikeln und umgebender Flüssigkeit. Benachbarte Elektroden eines planaren Elektrodenarrays werden mit einem hochfrequenten elektrischen Wechselfeld mit unterschiedlicher Phasenbeziehung angesteuert. Daraus resultiert eine lineare Bewegung der Partikel in Richtung des Phasengradienten.

Der Vorteil ist darin zu sehen, dass eine Flüssigkeitsströmung nicht benötigt wird. Zum Transport von Partikeln in Zellgröße und von Zellen wurde diese Technik bereits von mehreren Autoren eingesetzt (Hagedorn *et al*, 1992; Fuhr *et al*, 1995a; Wang *et*

al, 1997; Green *et al*, 1997; Pethig *et al*, 1998; Cui und Morgan, 2000; Morgan *et al*, 2001). Die Dimension der Elektrodenarrays muss dabei derjenigen der Partikel angepasst sein. Typischerweise werden hier 10-50 µm breite Elektroden und Elektrodenzwischenräume verwendet.

Die Kräfte, die auf Partikel wirken, die sich in einem 4-Phasen-Feld eines interdigitierenden Elektrodenarrays befinden, sind in Abb. 8 schematisch dargestellt.

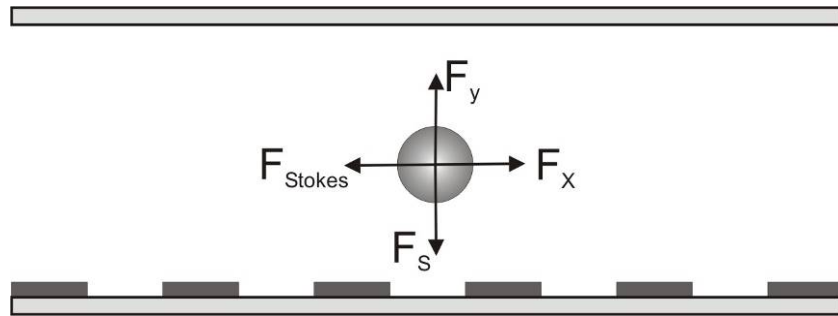


Abb. 8 Schematische Darstellung der Kräfte, die bei der TWD in einer Mikrofluidikkammer auf einen sphärischen Körper unter der Wirkung eines elektrischen Wanderfeldes wirken. F_y ist die normal und F_x die parallel zum Array wirkende dielektrophoretische Kraftkomponente (Richtung von F_x und F_y hängen von der Polarisierbarkeit des Körpers relativ zum umgebenden Medium ab), F_{Stokes} ist der hydrodynamische Widerstand, der F_x entgegenwirkt und F_s die Sedimentationskraft.

Normal zu den Elektroden mit der Breite und dem Abstand d wirkt nach Cui *et al* (2001) die dielektrophoretische Kraft F_y

$$F_y = A_{\text{DEP}} 4\pi r^3 \varepsilon_{\text{Medium}} \varepsilon_0 \frac{V_0^2}{d^3} \text{Re}[f_{\text{CM}}] e^{-\frac{\pi}{2d}h} \quad (1.5)$$

mit A_{DEP} einem numerischen Faktor (aus Simulationen etwa 0,30; Morgan *et al*, 2001), V_0 der Spannungsamplitude und h der Höhe, in die das Teilchen gehoben wird.

Dieser Kraft entgegen wirkt die Sedimentationskraft F_s , die für einen sphärischen Körper mit dem Radius r

$$F_s = \frac{3}{4} \pi r^3 \Delta \rho g \quad (1.6)$$

beträgt. Dabei ist $\Delta \rho$ die Differenz zwischen der Dichte des Teilchens und der des umgebenden Mediums und g die Erdbeschleunigung.

Dann ergibt sich unter Gleichgewichtsbedingungen ($F_y + F_s = 0$) die Levitationshöhe des Teilchens zu

$$h = \frac{2d}{\pi} \ln \left(\frac{-3A_{DEP} \varepsilon_{Medium} \varepsilon_0 \operatorname{Re}[f_{CM}] V_0^2}{\Delta \rho g d^3} \right) \quad (1.7)$$

In einem elektrischen Wanderfeld wird das Teilchen zusätzlich horizontal entlang des Elektrodenarrays bewegt, wobei seine Geschwindigkeit von der Viskosität und Leitfähigkeit des Mediums und von der Polarisierbarkeit und dem Radius des Teilchens abhängt, da der dielektrischen Kraft die Stoke'sche Reibung F_{Stoke} entgegenwirkt.

Da sich die dielektrophoretische Kraft, die auf das Teilchen in x-Richtung wirkt, nach Morgan *et al* (2001) zu

$$F_x = A_{DEP} 4\pi r^3 \varepsilon_{Medium} \varepsilon_0 \frac{V_0^2}{d^3} \operatorname{Im}[f_{CM}] e^{-\frac{\pi}{2d}h} \quad (1.8)$$

berechnet, ergibt sich mit

$$F_{Stoke} = 6\pi\eta r v \quad (1.9)$$

(η Viskosität des Mediums, r Teilchenradius, v Geschwindigkeit) unter Gleichgewichtsbedingungen ($F_x + F_{Stokes} = 0$) für die Wanderungsgeschwindigkeit v des Teilchens

$$v = -\frac{A_{DEP} 2\pi r^2 \varepsilon_{Medium} \varepsilon_0 \operatorname{Im}[f_{CM}] V_0^2}{3\eta d^3} e^{-\frac{\pi}{2d}h} \quad (1.10)$$

Nach Cui *et al* (2001) lässt sich durch Substitution von (1.7) in (1.10) zeigen, dass die Geschwindigkeit v unabhängig von der Spannung und nur von den Eigenschaften des Teilchens (Radius, Dichte und Polarisierbarkeit) und des Mediums (Viskosität, Dichte, Polarisierbarkeit) abhängt:

$$v = \frac{2}{9} \frac{r^2 \Delta \rho g}{\eta} \frac{\operatorname{Im}[f_{CM}]}{\operatorname{Re}[f_{CM}]} \quad (1.11)$$

Durchführung

Die ersten Prototypen des Separationschips wurden erst kurz vor Ende der Arbeit fertig gestellt. Daher wurden lediglich Untersuchungen durchgeführt, die die Funktionstüchtigkeit der Chips prüfen sollten.

Dazu wurden Zellsuspensionen aus humanen Blutzellen verwendet. Diese wurden aus Eigenblut (50 μ l) gewonnen, das nach der Zentrifugation entweder in 5 ml 10% PBS und 90% Mannitol oder in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) gegeben wurde. Beiden Medien wurde 0,5% EDTA zugegeben. Die Leitfähigkeiten der Medien lagen im ersten Fall bei 1,5 mS/cm und im zweiten bei 15 mS/cm. Die Osmolaritäten lagen in beiden Fällen bei 280-290 mOsm.

Die Zellsuspension wurde über eine Kanüle in den PDMS-Fluidkanal über dem Chip injiziert. Anschließend wurde das Wanderfeld aktiviert. Um herauszufinden, bei welchen Frequenzen negative DEP auftritt und die Zellen mit dem Feld wandern, wurden Frequenzen zwischen 500 Hz und 20 MHz mit Amplituden von 2 bis 10 V_{pp} untersucht.

2.2.7.4 Zellpositionierung auf Au-Elektroden durch positive DEP

Um Neurone bzw. Zellen auf den Elektroden des MEAs zu positionieren, ist es nötig, die Leitfähigkeit des sie umgebenden Mediums zu reduzieren. So wird gewährleistet, dass der Clausius-Mosotti-Faktor und damit die wirkende Kraft (für Frequenzen ab ca. 1 kHz) nach (1.3) und (1.4) positiv sind, womit die Richtung der resultierenden Kraft in Richtung der Feldmaxima zeigt.

Nach Docoslis *et al* (1997) wird der Realteil des Clausius-Mosotti-Faktors mit sinkender Leitfähigkeit des Mediums größer. Da damit auch der Betrag der dielektrophoretischen Gesamtkraft steigt, wurden Medien mit sehr geringer Leitfähigkeit verwendet (im Falle von *Locusta* 430 μ S/cm, Leitfähigkeit des Kulturmediums ca. 15 mS/cm).

Auf die Zelle wirken darüber hinaus zusätzlich die Sedimentationskraft und hydrodynamische Kräfte, die durch die Konvektionsströmung verursacht werden (s.

Abb. 9). Die Konvektionsströmungen entstehen bei der Erwärmung des Mediums, welche durch die innere Reibung verursacht wird, die bei Orientierungspolarisation der Wassermoleküle im Wechselfeld auftritt.

Daneben treten auch, insbesondere in Medien mit höheren Leitfähigkeiten, elektrophoretische bzw. elektroosmotische Prozesse auf, die zu Fluidströmungen führen. Allen Kräften wirkt eine hydrodynamische Stoke'sche Reibungskraft entgegen.

Die Konvektionsströmung ist unter dem Mikroskop deutlich erkennbar (z. B. nach Zugabe von kleinen Silikonkugeln oder der Zellsuspension). Obwohl sie teilweise der dielektrischen Kraft entgegenwirkt, so hat sie auf der anderen Seite den Vorteil, dass sie zu einer Zellakkumulation in der mittig liegenden Elektroden-Region führt.

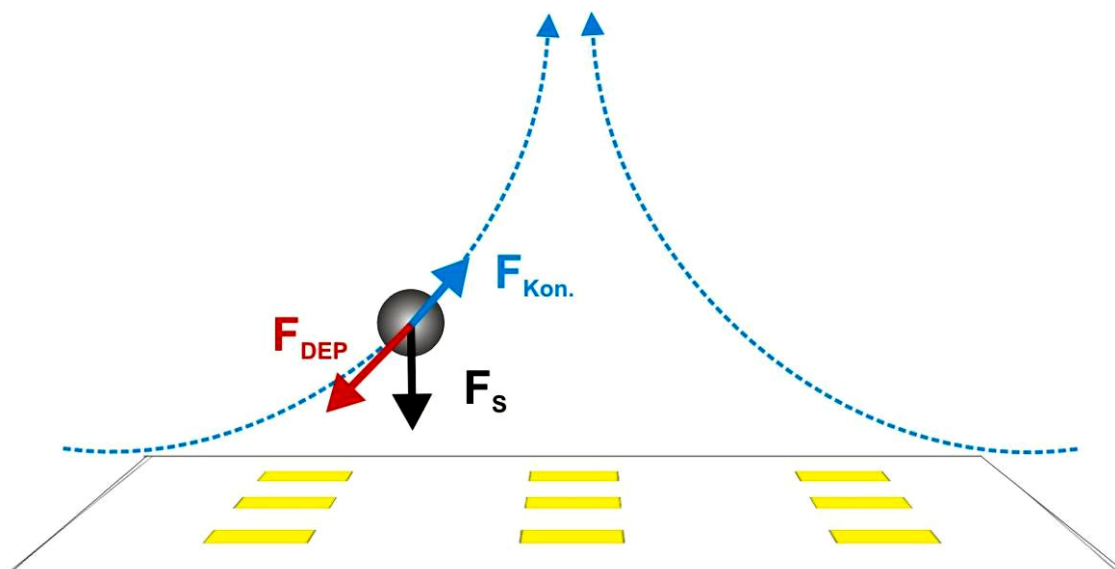


Abb. 9 Schematische und vereinfachte Darstellung der wirkenden Kräfte bei der Positionierung mittels positiver Dielektrophorese (F_s : Sedimentationskraft, $F_{Kon.}$: durch die Konvektionsströmung verursachte hydrodynamische Kräfte, F_{DEP} : dielektrophoretische Kraft). Vernachlässigt wurden die Stoke'schen Reibungskräfte und die Auftriebskraft.

Durchführung

Zunächst wurden die Zellen in die entsprechenden Medien mit reduzierter Leitfähigkeit (DEP-Medien, s. 2.1.1.4) eingebracht, resuspendiert und 40 μ l der Zellsuspension auf die Chips (hydrophilisiert und unbeschichtet) aufgetragen. Anschließend wurde das Feld für 20-30 min angelegt.

Für die Positionierungsexperimente wurde ein Frequenzgenerator (Tecstar, FGE1202) verwendet. Die Belegung der Elektroden konnte über eine Schaltbox ein-

gestellt werden (s. Abb. 10). Es wurden Sinuswechselspannungen zwischen 8 und 15 V und Frequenzen von 5 bis 20 MHz verwendet.

Da die Konvektionsströmung (und damit auch der thermische Eintrag (nicht quantifiziert)) bei höheren Frequenzen stärker wurde und andere Autoren gezeigt haben, dass Spannungen bis etwa 10 V zur pDEP genutzt werden können, ohne Gefahr zu laufen, die Zellen zu schädigen, wurden meist 5 MHz und 8-10 V_{pp} verwendet.

Zur Adhäsion wurden die Zellen dann für 30 min stehengelassen und anschließend entweder fixiert und gefärbt oder mit 500 µl Zellkulturmedium versetzt. Zur Kontrolle wurde ein Chip ohne Befeldung verwendet.

Die Positionierung wurde im Auflichtmikroskop (Zeiss, Axiophot2) fotografisch und per Videoaufzeichnung dokumentiert.

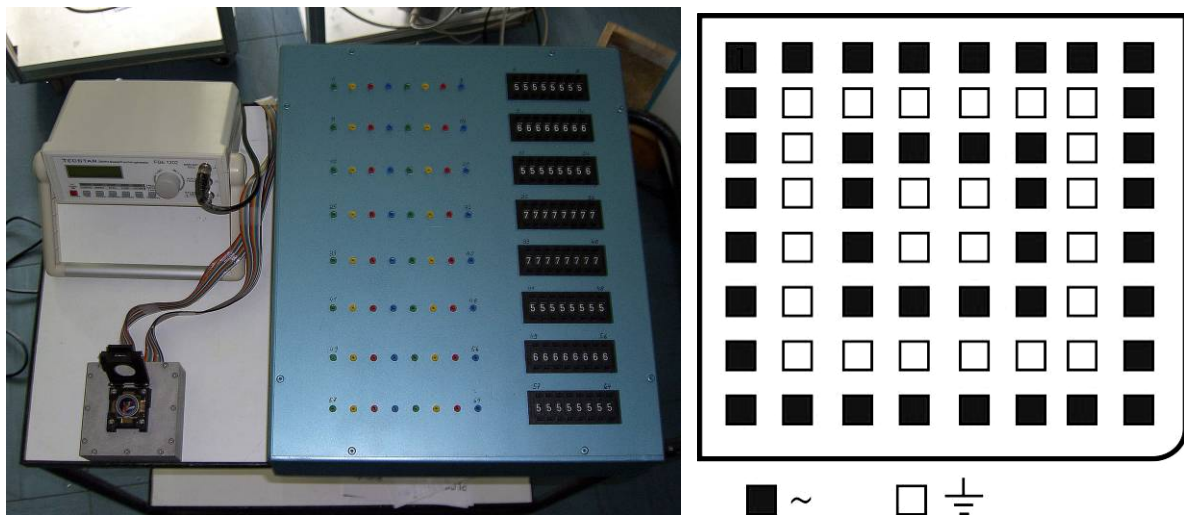


Abb. 10 Links: Versuchsaufbau, bestehend aus MEA-Sockel, Frequenzgenerator und Schaltbox. Die Belegung der Elektroden ist über die Dezimalschalter (Schaltbox rechts) frei konfigurierbar. Die entsprechenden Eingänge befinden sich rückseitig. Rechts: Belegung des Arrays zur Positionierung mit positiver Dielektrophorese.

2.2.7.5 Räumliche Separation verschiedener Zelltypen

Wie bereits erwähnt (s. 2.2.7.1), zeigen verschiedene Zelltypen spezifische Frequenzspektren hinsichtlich ihrer Polarisierbarkeit und lassen sich somit räumlich voneinander trennen.

Für die Strukturierung neuronaler Netze auf Multielektrodenarrays ist es wünschenswert, Neurone und Gliazellen an unterschiedlichen Stellen des Arrays zu positionieren. So sollten Neurone auf den Elektroden liegen, die Gliazellen dazwischen.

Wenn beides in einem Schritt geleistet werden soll, müssen die Neurone positive (in Richtung Feldmaximum = Elektroden), die Gliazellen negative Dielektrophoresekräfte (Feldminima = Elektrodenzwischenräume) erfahren. Dafür gibt es verschiedene Ansätze.

Welcher davon geeignet ist, hängt von den Übergangsfrequenzen der beiden Zelltypen ab. Da die Gesamtkraft Null ist und unter Vernachlässigung des Imaginärteils in (1.2) berechnet sie sich nach Prasad (2003) zu

$$f_{\text{Übergang}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{(2\sigma_{\text{Medium}} + \sigma_{\text{Zelle}})(\sigma_{\text{Medium}} - \sigma_{\text{Zelle}})}{(2\varepsilon_{\text{Medium}} + \varepsilon_{\text{Zelle}})(\varepsilon_{\text{Medium}} - \varepsilon_{\text{Zelle}})}} \quad (1.12)$$

Die beste Methode wäre, für beide Zelltypen die Frequenzspektren zu erfassen. Dann könnten, in Abhängigkeit der Spektren, unterschiedliche Wege beschritten werden.

- 1) Sollten beide Zelltypen deutlich unterschiedliche Übergangsfrequenzen zeigen und ist $f_{\text{Übergang}(\text{Glia})} > f_{\text{Übergang}(\text{Neurone})}$, könnte man prinzipiell eine Frequenz wählen, die zwischen beiden Übergangsfrequenzen liegt. Dann wäre $F_{\text{DEP}(\text{Neurone})} > 0$ und $F_{\text{DEP}(\text{Glia})} < 0$. Damit würden die Neurone von den Feldmaxima (Elektrodenkanten) angezogen, die Gliazellen von den Elektroden abgestoßen (s. Abb. 11).
- 2) Bei gleichen Übergangsfrequenzen oder bei Übergangsfrequenzen, die sehr dicht beieinander liegen, so dass die Polarisationen sich im Betrag nur geringfügig unterscheiden und die wirkenden Kräfte zu klein sind, um die Zellen zu trennen, müsste das gesamte Spektrum bekannt sein. Dann könnten 2 Frequenzen überlagert werden, bei denen die Bedingungen

$$F_{\text{DEP}(\text{Neurone}, \omega_1)} + F_{\text{DEP}(\text{Neurone}, \omega_2)} > 0$$

und $F_{\text{DEP}(\text{Glia}, \omega_1)} + F_{\text{DEP}(\text{Glia}, \omega_2)} < 0$

erfüllt sein müssten.

Sollten beide Spektren einander so ähnlich sein, dass mit der zweiten Strategie auch keine deutlichen Kraftunterschiede auftreten, so müssen die Zellen vor der Positionierung voneinander getrennt und anschließend sequentiell positioniert werden.

Dann könnte man in einem ersten Schritt zuerst die Gliazellen auf den Chip geben und anschließend über negative Dielektrophorese zwischen den Elektroden positionieren. Dies kann relativ einfach durch Wahl eines Mediums mit hoher Leitfähigkeit (z. B. Zellkulturmedium) realisiert werden.

Nachdem die Gliazellen adhärirt sind, können dann die Neuronen zugegeben werden und durch positive DEP auf den Elektroden positioniert werden.

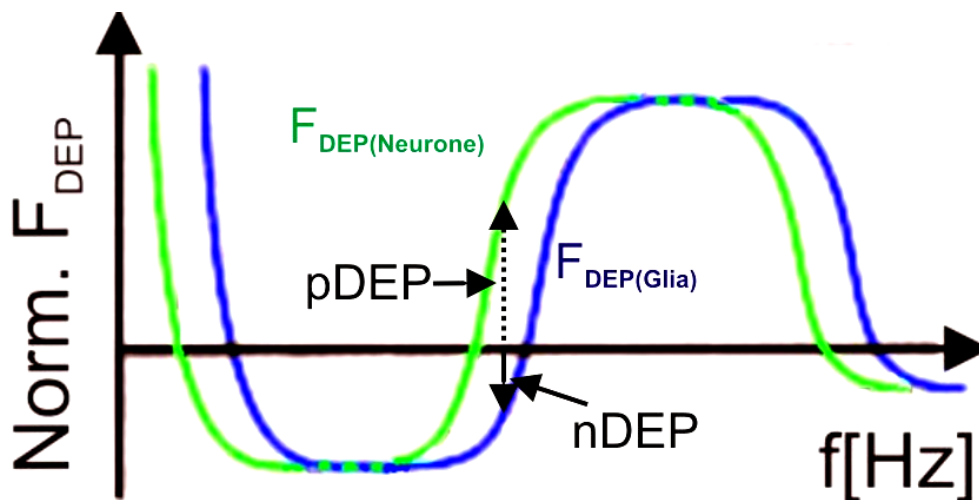


Abb. 11 Schematische Darstellung zur simultanen räumlichen Separation von Gliazellen und Neuronen. Wird zur Befeldung eine Wechselfeldfrequenz gewählt, die zwischen den Übergangsfrequenzen der beiden Zelltypen liegt, so wandern im dargestellten Fall die Gliazellen auf Grund von negativer DEP in die Elektrodenzwischenräume, die Neuronen werden über positive DEP zu den Elektroden transportiert. Im unteren und oberen Frequenzbereich ließe sich die umgekehrte Zellverteilung erzielen.

In dieser Arbeit wurde zur Separation von Neuronen und Gliazellen ein empirisch-iterativer Ansatz unternommen, da die Methoden zur Ermittlung der Rotationsspektren (entsprechende Chips mit Feldkäfig, Ansteuerung, Messaufbau) am Institut nicht etabliert sind. Außerdem erfordert die Umrechnung des ermittelten Frequenzgangs des Imaginärteils in den des Realteils einen hohen mathematischen Aufwand, da diese nicht trivial miteinander zusammenhängen (z. B. Kaler und Jones, 1990).

So wurde bei verschiedenen Frequenzen befördert (0,1 kHz - 10 MHz), wobei die Spannungsamplituden den Frequenzen angepasst wurden, um Elektrolyse zu vermeiden (s. Tab. 1). Aus der Literatur sind die Übergangsfrequenzen für die beiden Zelltypen bekannt (Prasad *et al*, 2003 & 2004). Die dort dargestellten Übergangsfrequenzen wurden jedoch für Neurone und Gliazellen aus dem Hippocampus von Ratten ermittelt, und es wurden für Gliazellen und Neurone unterschiedliche Medien mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten verwendet. Für die Separation (pDEP für Neurone, nDEP für Gliazellen) wurde dort, bei einer Mediumleitfähigkeit von 1,2 mS/cm und Spannungsamplituden von 8 V_{pp}, als geeigneter Frequenzbereich 3-5 MHz angegeben. Leider wird der Frequenzgang der Zellen nicht dargestellt. Unter Verwendung des gleichen Mediums gelingt dort die räumliche Trennung der Zellen insofern, als dass die Gliazellen positive und die Neurone negative DEP erfahren und damit erstere auf, letztere zwischen den Elektroden positioniert werden.

Tab. 1 Übersicht der Frequenzen [kHz] mit den zugehörigen Spannungsamplituden [V], die zur Separation von Gliazellen und Neuronen aus *Locusta migratoria* verwendet wurden. Die Beförderung fand jeweils für 30 min statt.

Frequenz [kHz]	Spannungsamplitude V _{pp} [V]
0,1	4
0,5	4
1	5
10	6/8
20	7
50	8
100	9
200	10
400	10
600	10
800	10
1000	10
1500	10
2500	10
5000	10/15/20
6000	10
10000	10

Die dort verwendeten Frequenzen wurden für die Frequenzauswahl als Richtwerte verwendet.

Für die Separationsversuche wurde immer das Standard-DEP-Medium (Mannose-Lösung, $\sigma = 430 \mu\text{S/cm}$) verwendet.

Auf Grund der geringeren Leitfähigkeit des hier verwendeten Mediums verschieben sich die Übergangsfrequenzen nach (1.12) bzw. nach Kaler *et al* (1992) mit

$$f_{\text{Übergang}} = \frac{\sqrt{2}\sigma_{\text{Medium}}}{2\pi r C_{\text{Zellmembran}}} \quad (1.13)$$

(r Zellradius, $C_{\text{Zellmembran}}$ Kapazität der Zellmembran, σ_{Medium} Leitfähigkeit des Mediums) hin zu kleineren Werten. Daher wurden Frequenzen ab 100 Hz untersucht.

Bei den niedrigen Frequenzen (zwischen 100 Hz und 10 kHz) sollten beide Zelltypen negative DEP zeigen, bei hohen Frequenzen (ab ca. 200 kHz) sollte bei beiden positive DEP auftreten. So sollten iterativ die Übergangsfrequenzen für beide Zelltypen gefunden werden. Die Kontrolle wurde immer mit einer Frequenz befördert, bei welcher positive DEP auftritt (5 MHz).

Nach 30 min zur Adhäsion wurden die Zellen fixiert und eine Doppelfärbung (s. 2.2.6) vorgenommen, um zwischen Gliazellen und Neuronen unterscheiden zu können.

Da sich zeigte, dass bei dem verwendeten Medium und den gewählten Frequenzen bei keinem Zelltyp eine negative dielektrische Kraft auftritt, wurden Kontrollexperimente mit humanen Blutzellen und Zellen des Metathorakalganglions von *Locusta* in Kulturmedien durchgeführt. Bei diesen lagen die Leitfähigkeiten um 15 mS/cm.

2.2.8 Biofunktionalisierung der MEA-Oberfläche durch Elektrophorese

2.2.8.1 Grundlagen

Unter Elektrophorese versteht man die Bewegung (Wanderung/Transport) von geladenen Teilchen in einem flüssigen Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Ladung des Teilchens, seiner Form und seiner Umgebung sowie von der Größe des elektrischen Feldes ab.

Da die Biofunktionalisierung nur einen kleinen Teil der Arbeit darstellt, soll hier nur eine kurze Einführung geben werden, um die wesentlichen Parameter für eine Biofunktionalisierung von Substratoberflächen darzustellen. Die realen Verhältnisse sind natürlich im Detail komplizierter.

Auf ein geladenes Teilchen der Ladung q wirkt in einem elektrischen Feld der Feldstärke E (V/cm) die Kraft Coulomb-Kraft F_c :

$$\vec{F}_c = q \cdot \vec{E} = z \cdot e \cdot \vec{E} \quad (1.14)$$

mit z der Anzahl der effektiven Ladungen des Stoffes und e der Elementarladung.

Nach Stokes erfährt ein kugelförmiges Teilchen mit dem Radius r und Geschwindigkeit v in einem Medium der Viskosität η eine Gegenkraft (1.9).

Im stationären Zustand ist die Summe aller Kräfte gleich Null. Damit ergibt sich für die elektrophoretische Geschwindigkeit v der Ausdruck

$$v = \frac{q \cdot \vec{E}}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{z \cdot e \cdot \vec{E}}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (1.15)$$

und für die elektrophoretische Mobilität μ_{ep}

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} . \quad (1.16)$$

Da hier untersucht wurde, ob hydrophilisierte MEAs (Säurebehandlung mit 20% H_2SO_4 bei 80 °C für 30 min) elektrophoretisch mit Peptiden bzw. Proteinen beschichtet werden können und es sich dabei um Ampholyte handelt, sind neben den oben genannten Parametern der pH-Wert der Lösung und der isoelektrische Punkt der Proteine/Peptide von Bedeutung.

Daneben ändert sich bei konstanter Spannung die Stärke des elektrischen Feldes, wenn sich die Proteine/Peptide auf den Elektroden abscheiden.

Über die Änderung der Rahmenbedingungen, wie Feldrichtung und -amplitude, lassen sich unterschiedliche Feldverteilungen erzielen und damit relativ definierte Potentiallandschaften erzeugen.

Diese können dazu genutzt werden,

- (1) um zwei Peptide/Proteine (beispielsweise zellspezifische Antikörper) mit entgegengesetzter Nettoladung an unterschiedlichen Elektroden abzuscheiden,
- (2) um über die näherungsweise quadratische Abnahme der Feldintensität einen Protein-/Peptidgradienten um die Elektroden herum aufzubauen und
- (3) Verbindungslinien aus Proteinen/Peptiden zwischen den Elektroden aufzubauen, da die Aneinanderlagerung der einzelnen Moleküle die energetisch günstigste Anordnung darstellt.

Die abgeschiedenen Proteine/Peptide können drei Funktionen erfüllen:

- (1) Im Falle einfacher zelltypenspezifischer Proteine/Peptide können sie als räumlich definierte Adhäsionspunkte auf den Elektroden dienen. Im Falle zelltypspezifischer Antikörper können räumliche Verteilungen bestimmter Neuronen-/Zelltypen damit realisiert werden.
- (2) Gradienten aus Proteinen/Peptiden können dazu dienen, das Auswachsen der Neurite bzw. Axone zu guiden. Dass solche Gradienten zum gerichteten Wachstum führen, konnte von Scharnweber *et al* (2005 & 2006) und Dertinger *et al* (2002) gezeigt werden. Dabei wachsen die Neurone in der Regel in Richtung der steigenden Protein-/Peptidkonzentration.
- (3) Als Verbindungslinien zwischen den Elektroden können sie dafür sorgen, dass das Wachstum der Neurite/Axone auf räumlich definierten Wegen verläuft.

Da die hydrophilisierte Oberfläche ebenfalls eine gute Adhäsion für die Zellausläufer darstellt, bietet es sich an, die Oberfläche vor der elektrolytischen Beschichtung mit einem zellaversiven Substrat wie PEG (bzw. starPEG) zu beschichten. Dieses kann entweder auf die ganze Oberfläche aufgebracht und anschließend elektrophoretisch (Vörös *et al*, 2006) an den Elektroden wieder entfernt werden (um die Schichtdicken bzw. den Abstand zwischen Neuron und Elektrode möglichst gering zu halten) oder dielektrophoretisch über negative DEP zwischen den Elektroden aufgebracht werden, wodurch die Elektroden dann ebenfalls frei bleiben.

Über die Parameter Spannung, Zeit, Temperatur, Viskosität des Mediums und pH-Wert lassen sich die Menge des Substrates (Schichtdicke) und der räumliche Verlauf der Beschichtung modifizieren.

2.2.8.2 Durchführung

Zur Beschichtung der MEA-Oberflächen wurden Protein-/Peptidsuspensionen (PDL bzw. PLL: 2 mg/ml, ConA: 0,2 mg/ml; ConA-Rhodamin: 0,5 mg/ml in Aq. dest.) auf die Chips gegeben und für 30 bis 90 Minuten zwischen verschiedenen Elektroden Spannungen (+/- 2 - 2,7 V gegenüber Erde) angelegt.

Anschließend wurde die restliche Protein-/Peptidsuspension abgesaugt und mit destilliertem Wasser gespült und die Proteine/Peptide mit PoinceauS angefärbt.

Im Falle von FITC-PLL, einem fluoreszenzmarkierten Poly-L-Lysin, wurde nur ein Mal mit Aq. dest. gespült und die Chips anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Bei ConA-Rhodamin wurde nach der Befeldung (30 min) mit Ringerlösung gespült und anschließend auflicht- und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Da hier nur gezeigt werden sollte, dass ein solches Vorgehen prinzipiell möglich ist, wurde lediglich qualitativ ausgewertet.

2.2.9 Galvanotropismus zur Steuerung des Neuriten-/Axonwachstums

2.2.9.1 Grundlagen

Elektrische Gleichfelder spielen für eine Reihe von biologischen Prozessen eine bedeutende Rolle. So sind sie bei der Morpho- und Ontogenese von großer Bedeutung. Wird die Ausbildung solcher elektrischer Gradienten unterdrückt, kommt es zu Fehlbildungen und Funktionsstörungen. Daneben sind sie auch für Regenerationsprozesse von Bedeutung. Eine ausführliche und übersichtliche Darstellung findet sich bei McCaig *et al* (2005).

Hier sollen nur die Aspekte kurz dargestellt werden, die für die definierte Verschaltung von Neuronen unter Kulturbedingungen relevant sind.

Der Effekt, dass elektrische Gleichfelder das Wachstum von Neuriten beeinflussen, wurde bereits in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben (Ingvar, 1920). In dieser Arbeit wurde mit Hirnschnitten aus dem Huhn

gearbeitet. In den folgenden Jahrzehnten wurde der Effekt bei verschiedenen anderen neuronalen Geweben (Huhn: Medulla; Frosch (*Xenopus laevis*): Neurone aus dem Neuralrohr, sensorische und andere Neurone; Ratte: Hippocampus) und mit größerer Genauigkeit untersucht.

Dabei zeigte sich in der Regel, dass die Neurite/Axone bevorzugt und stärker in Richtung der Kathode auswachsen. Durch Zugabe von Neurotrophinen konnte dieser Effekt verstärkt werden. Eine zusätzliche Beschichtung der Oberflächen, auf denen die Zellen ausplattiert wurden, konnte den Effekt reduzieren oder gar umkehren. Dabei reagierten hinsichtlich der Richtungspräferenz allerdings nicht alle Neurone gleich, und bei manchen konnte gar kein Effekt gefunden werden. Auch zeigten Axone und Neurite teilweise unterschiedliche Antworten auf die Applikation des elektrischen Feldes.

In neueren Arbeiten wurde untersucht, welche molekularen Mechanismen diesem Effekt zugrunde liegen. Zwar ist er noch nicht vollständig verstanden, doch die Ergebnisse aus diesen Arbeiten deuten darauf hin, dass es durch den Einfluss des Feldes zu asymmetrischen Verteilungen von Molekülen kommt, die entweder zu einer besseren Anhaftung oder zu einer erhöhten Aktivierung von Signalwegen auf einer Seite des Wachstumskegels führen. So konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass es durch das elektrische Gleichfeld zur elektrophoretischen Verschiebung von Membranproteinen (Rezeptorproteine, z. B. ConA- und Acetylcholin-Rezeptoren) im Wachstumskegel kommt (laterale Elektrophorese). Weitere wichtige Faktoren sind Ca^{2+} -Ströme, Tyrosinkinase-Rezeptoren, PhospholipaseC und andere Proteinkinasen. Eine genauere und ausführliche Darstellung findet sich anderenorts (McCaig *et al*, 2005).

Bei der Rekonstruktion definierter Netzwerke ist es möglich, mittels elektrischer Gleichfelder die Richtung des Neuriten- bzw. Axonwachstums vorzugeben. Darin besteht ein großer Vorteil gegenüber anderen Methoden wie der Vorgabe von Topologien oder Substratstrukturierung mittels μCP .

Die Nutzung des Galvanotropismus nach der Positionierung von Neuronen mittels Dielektrophorese wurde erstmals von Prasad *et al* (2003) unternommen. Dort konnte

auch gezeigt werden, dass die Kombination beider Methoden keine dauerhafte Beeinflussung der Zellen zur Folge hat.

Da sich in der Literatur keine Angaben finden, ob sich das Wachstum von Neuriten bei Insektenneuronen mittels elektrischer Felder steuern lässt, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde der klassische Aufbau mit einer galvanischen Kammer verwendet (McCaig *et al*, 2005; s. Abb. 12).

Daneben wurden Neurone mit der Saugkapillare zwischen den Stimulations-elektroden auf den MEAs positioniert, und anschließend wurde das Gleichfeld über Stimulationselektroden appliziert.

Nachdem die Positionierung der Neurone mittels DEP etabliert war, wurden die Neurone zunächst durch pDEP positioniert, anschließend wurde das DC-Feld über die Mikroelektroden appliziert.

2.2.9.2 Durchführung

Klassischer Versuchsaufbau

Zunächst wurde ein Coverslip-Sandwich (2 Coverslips (22 x 32 mm, IDL) mit Glas-Abstandshaltern (1 mm hoch), die mit Silikon (Sylgaard 184, Dow Corning) fixiert wurden) mit Zellsuspension befüllt. Nach einer 10minütigen Adhäsionsphase wurde dieses dann in die Messkammer eingebracht, die dann mit Zellkulturmedium befüllt wurde.

Anschließend wurde der Deckel mit den Salzbrücken (Länge: 250 mm, Innendurchmesser: 6 mm, Brücke aus Steinberg-Lösung mit 1% Agar) aufgesetzt. Der Widerstand der Salzbrücken wurde vor und nach der Befeldungsperiode mit einem Multimeter gemessen. Der pH-Wert des Mediums in den Mediumreservoirs wurde nach der Befeldungsperiode mit pH-Streifen (Machery, Nagel & Co, Germany) gemessen.

Der pH-Wert und die Osmolarität der Steinberg-Lösung (58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.44 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.3 mM MgSO_4 , 75 mM HEPES) wurden dem Kulturmedium angepasst (pH 7.0, 380-400 mOsm), wobei die Pufferkonzentration in der Steinberg-

Lösung sehr viel höher war (Faktor 3). Dies war nötig, da zur Erzeugung der nötigen Feldstärken (50-150 mV/mm) in der Zellsuspension sehr hohe Spannungen angelegt werden mussten, die teilweise zur Hydrolyse in der Steinberg-Lösung führten.

Der anliegende Strom I wurde mit einem Multimeter (DMM M-3890DT, Voltcraft) gemessen (s. Abb. 13). Daraus wurde nach Lionel *et al* (1979) über

$$E = \frac{I \cdot \rho_{\text{Medium}}}{A} \quad (1.17)$$

(ρ_{Medium} : spezifischer Widerstand des Mediums, A : Querschnittsfläche des Coverslip-Sandwichs (10 mm x 24 mm = 240 mm²)) die Feldstärke berechnet bzw. die Spannung und Stromintensität an der Gleichspannungsquelle (Consort E865) so eingestellt, dass die Feldstärke zwischen 50 und 150 mV/mm lag.

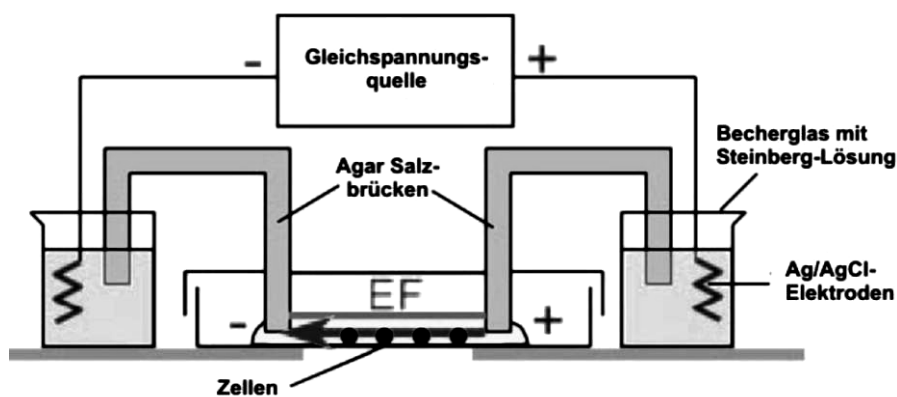


Abb. 12 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Vorversuche zum Galvanotropismus (verändert nach McCaig, 2005). Anstelle der abgebildeten Kulturschale wurde eine Befeldungskammer (s. Abb. 13) gebaut.

Der Leitwert κ des Kulturmediums wurde mit einem Konduktometer (Knick Portamess) bestimmt und betrug 15,65 mS/cm.

Mit

$$\rho_{\text{Medium}} = \frac{1}{\kappa} \quad (1.18)$$

ergibt sich für den spezifischen Widerstand des Mediums $\rho_{\text{Medium}} = 64 \Omega\text{cm}$.

Die Befeldung fand dann für 6 bis 12 Stunden bei Raumtemperatur statt. Danach wurde der pH-Wert in der Zellsuspension an den Mediumreservoirs gemessen, in welche die Salzbrücken ragen. Das Coverslip-Sandwich wurde, um das Auslaufen

des Mediums zu verhindern, vorsichtig entnommen, mikroskopisch (Phasenkontrast) und teilweise durch Fluoreszenzfärbungen ausgewertet.

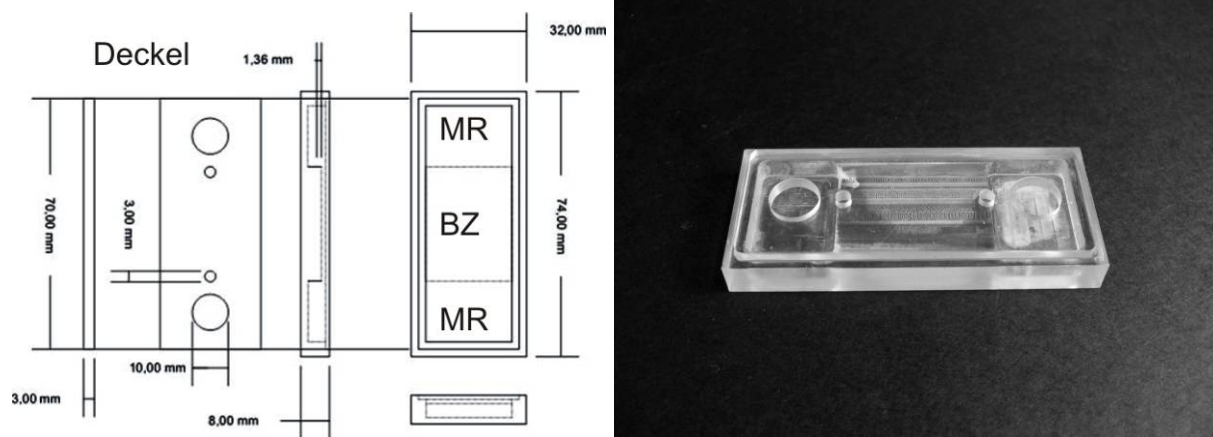


Abb. 13 Befeldungskammer (links: Dimensionierung, rechts: Foto). Beiderseits der eigentlichen Befeldungszone (BZ) finden sich Mediumreservoirs (MR), in die die Salzbrücken eingebracht wurden. Im Mittelteil liegt die Befeldungszone, in die das Coverslip-Sandwich eingesetzt wurde. Neben den großen Bohrungen für die Salzbrücken wurde der Deckel mit zwei weiteren kleineren Öffnungen versehen, die der Messung der Spannung und des Stroms dienen.

Befeldung der mechanisch auf MEAs positionierten Neurone

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.4 dargestellt, mit einer feuerpolierten und silanisierten Saugkapillare aufgenommen und auf den MEAs zwischen den Stimulationselektroden positioniert (s. Abb. 2, B).

Anschließend wurden sie, nach einer Adhäsionsphase von 30 min, im Inkubator für 1-4 Stunden befeldet. Dazu wurde eine Spannung von 1-2 V (Tektronix FGE1202) angelegt. Mit einem Elektrodenabstand von 0,7 mm ergibt sich für ein reines Dielektrikum unter Vernachlässigung von Grenzflächeneffekten mit

$$E_0 = \frac{U}{d} \quad (1.19)$$

und

$$E = \frac{E_0}{\epsilon_{\text{Medium}}} \quad (1.20)$$

und $\epsilon_{\text{Medium}} = 80$ eine Feldstärke E von 18-36 mV/mm.

Auf Grund von Grenzflächeneffekten und der Leitfähigkeit des Mediums sollte die reale Feldstärke unter diesem Wert liegen. Der Grenzwert, für den in der Literatur deutliche Effekte gefunden wurden, liegt bei etwa 50 mV/mm. Diese Feldstärken konnten jedoch auf Grund der auftretenden Elektrolyse nicht erreicht werden.

Nach der Befeldung wurden die Chips unter dem Mikroskop ausgewertet. Da die Positionierung sehr aufwendig ist, die Neurone oft zerstört wurden oder danach schlechter adhärten und überdies die nötigen Feldstärken nicht erzielt werden konnten, wurden nur wenige Versuche durchgeführt (3 Chips mit je 8 Neuronen).

Galvanotropismus nach dielektrophoretischer Positionierung

Auf Grund der oben genannten Schwierigkeiten wurde die Mehrzahl der Galvanotropismus-Experimente durchgeführt, nachdem die Zellen durch Dielektrophorese auf den Chips positioniert wurden.

Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Neurone nicht durch die mechanische Positionierung geschädigt werden. Überdies konnten die Neurone auf den Elektroden so positioniert werden, dass nahe beieinander liegende Elektroden (400 µm) verwendet und damit höhere Feldstärken erreicht werden konnten. Um ein mehr oder weniger homogenes Feld zu erzeugen, wurden Spannungen von 1,5 - 2 V zwischen 2 Elektrodenreihen angelegt (s. Abb. 14).

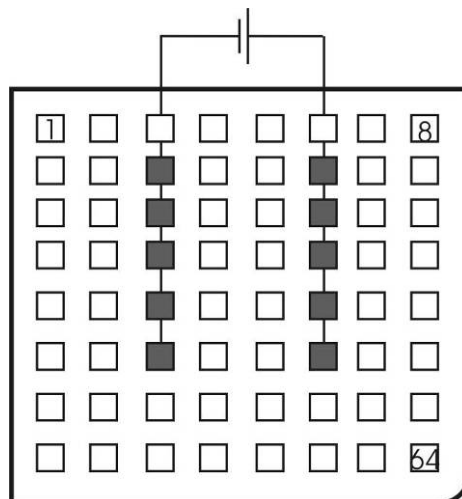


Abb. 14 Schematische Darstellung der Elektrodenansteuerung in den Galvanotropismus-Experimenten (die Elektroden, zwischen denen die Spannung angelegt wurde, sind dunkel hervorgehoben). Die gleiche Belegung wurde zuvor für die dielektrophoretische Positionierung verwendet, wobei hier an der einen Seite das Signal angelegt wurde und die andere als Masse diente.

Nach der Positionierung und einer Adhäsionsphase von 30 min wurde das Dielektrophoresemedium durch Kulturmedium ersetzt. Zur Positionierung wurden die gleichen Elektroden verwendet, zwischen denen auch die Gleichspannung angelegt wurde.

Die Befeldung wurde entweder direkt nach der Positionierung unter dem Mikroskop für 30 - 60 min vorgenommen oder unter Kulturbedingungen (Inkubator, Kulturmedium) für 12 bis 24 Stunden. Nach der Befeldung wurden die Chips mikroskopisch (Olympus, CK X41) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Primärzellkultur von Metathorakalganglienneuronen

Da die Präparation und das Primärzellkultur-Medium von Weigel (2006) übernommen wurden, wurden die Basisparameter (Morphologie, Differenzierung, elektrophysiologische Parameter (Ruhepotential, Klassifizierung nach Reizantwort)) weitgehend rein qualitativ ausgewertet.

Es fanden sich Zellen mit Somagrößen zwischen 10 und 120 μm und Ausläufern, die Längen bis zu 1,5 cm aufwiesen (DIV3). Diese langen Ausläufer wurden meist in Kulturen mit sehr geringer Zelldichte (< 20 Neuronen pro Kulturschale) bei unipolaren Neuronen gefunden. In der Regel waren die Ausläufer zwischen 20 und 200 μm lang.

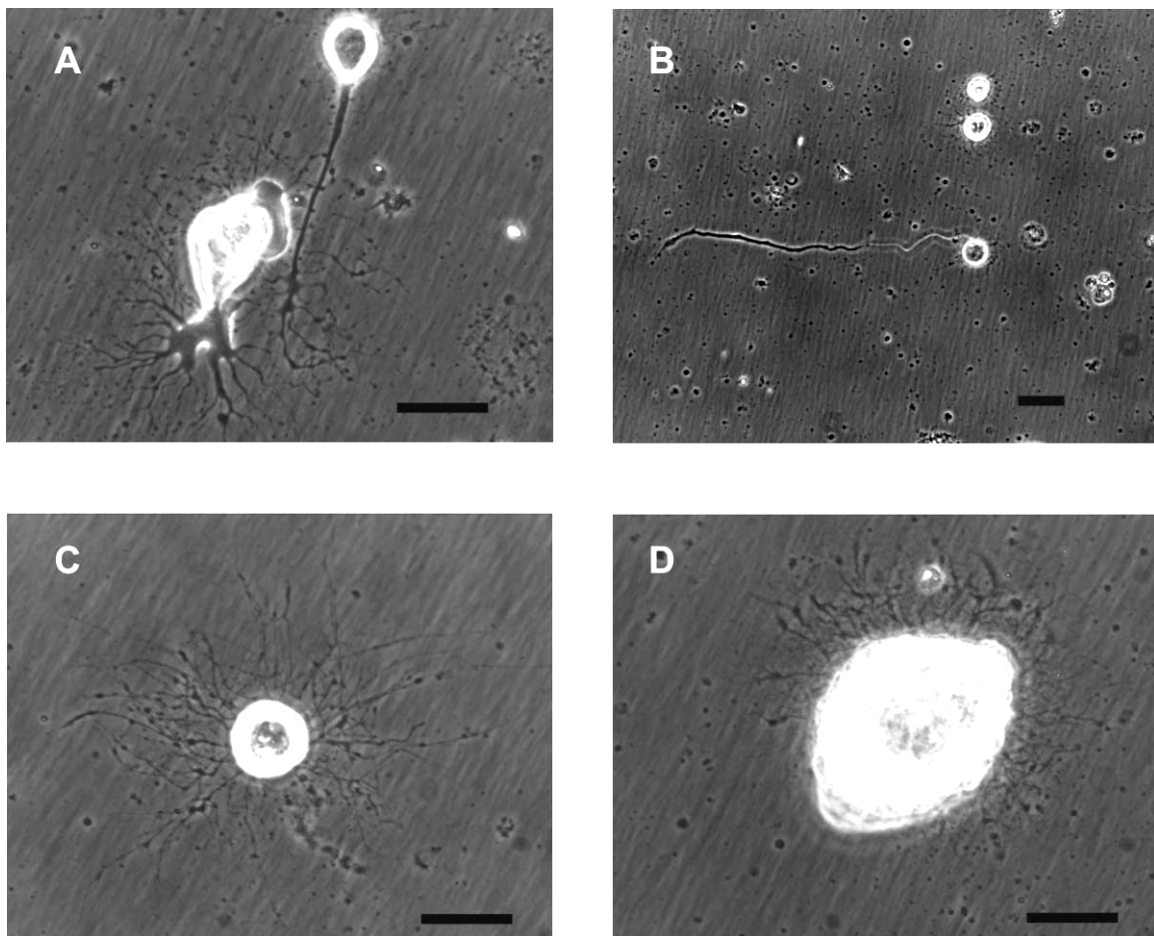


Abb. 15 Unipolare (A+B) und multipolare (C+D) Neurone aus dem Meta- und Mesothorakalganglion an DIV 3 auf unbeschichteten Kulturschalen. Große Neurone mit mehr als 80 μm Somadurchmesser besaßen meist multipolare Ausläufer (D), unter den Zellen mittlerer Größe waren einige Neurone unipolar. (Maßbalken: 50 μm)

Die Differenzierung war nach 3-4 Tagen in Kultur abgeschlossen, danach wuchsen die Neurite nur selten weiter aus. Lediglich weitere Verzweigung der bestehenden Neurite wurde beobachtet. Morphologisch wurden uni-, bi- und multipolare Neurone gefunden (s. Abb. 15).

Uni- und bipolare Neurone waren, verglichen mit multipolaren Neuronen, seltener. Große Neurone ($> 80 \mu\text{m}$) wiesen meist multipolare Ausläufer auf, die zudem in der Regel sehr kurz ($< 30 \mu\text{m}$) waren. Während bei Weigel häufig Netzwerke gefunden werden konnten, fiel auf, dass die Neurite zwar zunächst auf ein anderes Soma zuwuchsen, dann aber in dessen Nähe (ca. $20\text{-}30 \mu\text{m}$) die Wachstumsrichtung änderten. Allerdings wurden in Kulturen mit höheren Zelldichten auch häufiger Netzwerke gefunden.

Um die Zellen auf ihre Viabilität und hinsichtlich ihrer Reizantworten in verschiedene Klassen einzuteilen, wurden die Zellen nach 2 Tagen in Kultur intrazellulär am Soma mit scharfen Elektroden abgeleitet.

Zunächst wurde das Ruhepotential bestimmt. Dann wurde entweder direkt durch Depolarisation gereizt oder durch Repolarisation nach vorheriger Hyperpolarisation. Dabei feuerten die meisten Zellen lediglich nach vorhergehender Hyperpolarisation (postinhibitorischer Rebound).

Die Ruhepotentiale lagen zwischen -20 und -70 mV . Kleinere Zellen wiesen fast immer ein geringeres Ruhepotential auf. Mit steigendem Somadurchmesser nahm auch der Betrag des Ruhepotentials zu (s. Tab. 2).

Tab. 2 Ruhepotential [mV] in Abhängigkeit von der Zellgröße. Die Zellsomata wurden in 4 Größenklassen eingeteilt (n=80).

Somadurchmesser [μm]	10 - 25	25-50	51-75	76-120
Mittleres Ruhepotential [mV]	-35	-42,11	-48	-56,46
Standardabweichung [mV]	11,45	9,87	1,33	10,45

Hinsichtlich der Zellantwort wurde in non-Spiker (keine Antwort), Spiker (Antwort mit einem einzigen Spike, teilweise gefolgt von gedämpften Oszillationen) und Burster (Serie von Spikes, oft auch spontanaktiv) unterteilt.

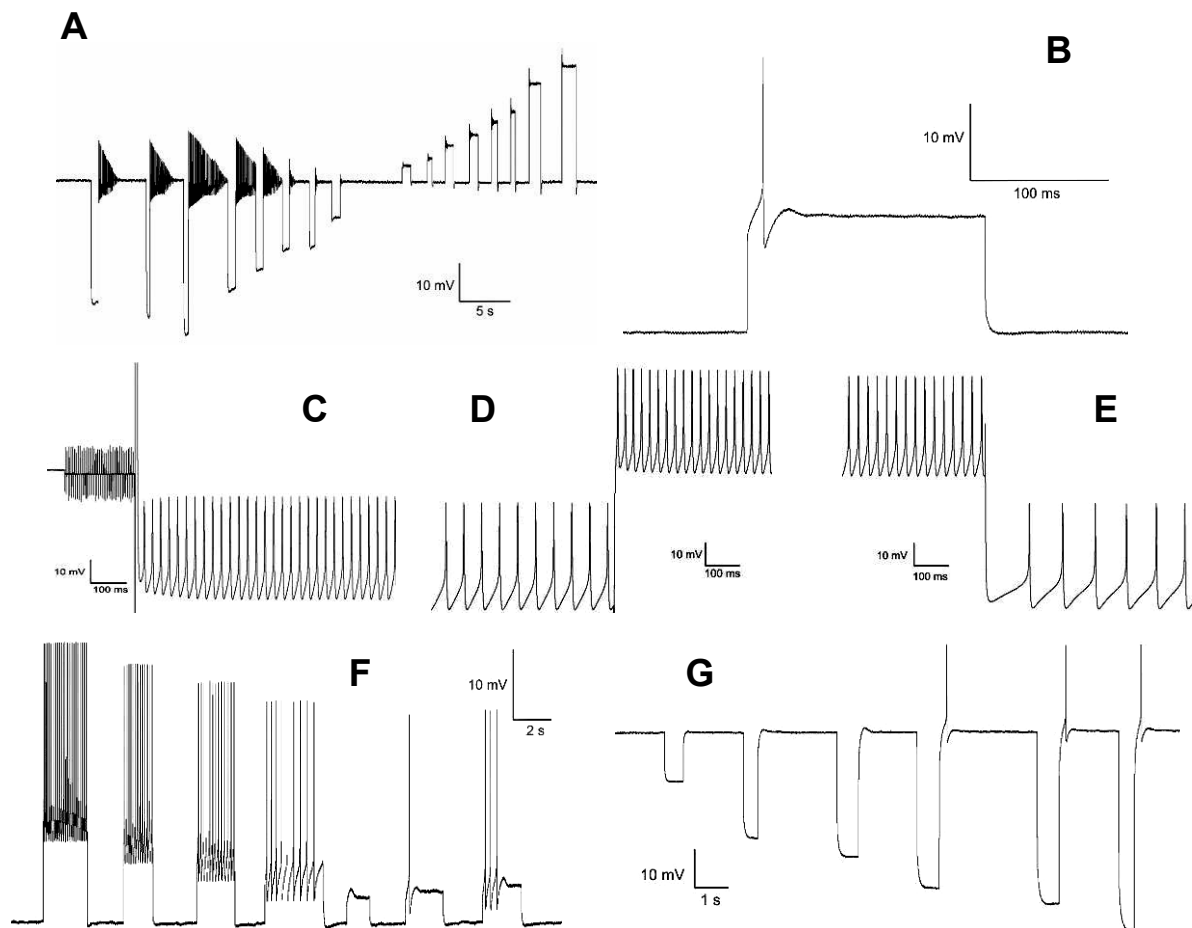


Abb. 16 Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung wurde stufenweise zunächst hyper- und anschließend depolarisiert (A). Es wurden neben Zellen, die kein Aktionspotential generierten (nicht dargestellt), Spiker (B & G) und Burster (F; spontanaktiv: C-E (tonisches Verhalten)) gefunden. Viele Zellen antworteten nur postinhibitorisch (B & F).

So waren von allen untersuchten Zellen ($n=202$) fast die Hälfte (97) der Zellen non-Spiker. Diese Zellen waren meist kleiner ($< 25 \mu\text{m}$) als die spikenden Neurone. Etwa 20% waren spontanaktive Burster, deren Feuerfrequenz sich mit der Reizintensität erhöhte. Diese Neurone waren fast immer Zellen mit Somadurchmessern von mehr als $75 \mu\text{m}$. Die restlichen Neurone antworteten mit einem einzelnen Spike auf die Reizung.

3.1.2 Primärzellkultur von Pilzkörperneuronen

Um höhere Zelldichten mit weniger Debris zu erzielen und damit zu testen, ob die DEP-Positionierung funktioniert, sind die Kenyonzellen aus den Pilzkörpern geeignet. Unter Verwendung des gleichen Zellkulturmediums und vergleichbarer Präparation wie bei den Thorakalganglien fanden sich in den Zellkulturen der Pilzkörper Neurone, die hinsichtlich ihrer Größe weniger stark streuten (s. Abb. 17), und nur wenig Debris. Die Zellsomata hatten Durchmesser zwischen 8 und 15 μm . Die Ausläufer waren meist sehr fein, und es fanden sich mehrheitlich multipolare, in wenigen Fällen auch unipolare und bipolare (je $\sim 10\%$) Neurone. Die Neurite waren meist sehr dünn und hatten nach einem Tag in Kultur eine Länge von etwa 10-180 μm . An DIV6 waren viele Ausläufer jedoch wieder verschwunden, und es blieben meist ($\sim 70\%$) nur sehr kurze (10-30 μm) Ausläufer übrig.

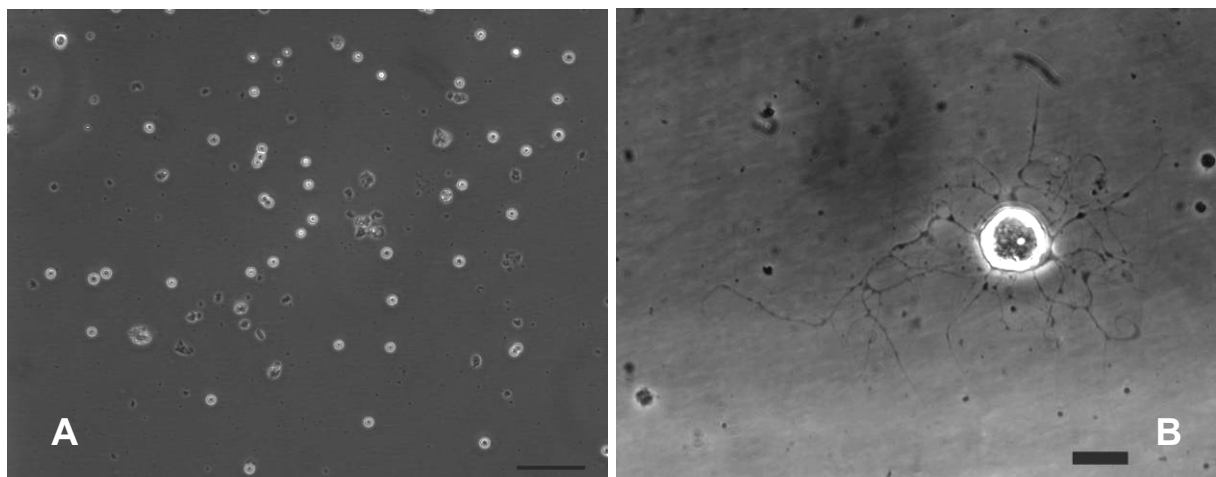


Abb. 17 Phasenkontrastaufnahme von Kenyonzellen nach einem Tag in Kultur. Die Zellsomata haben relative homogene Durchmesser im Bereich von 8-15 μm , es finden sich relativ wenige Zellcluster und nur wenig Debris in den Kulturen (A). Die mehrheitlich multipolaren Neurone sind durch sehr dünne Neurite gekennzeichnet (B). Maßbalken: links 100 μm , rechts 20 μm .

Nach der Kultivierung wurden etwa 5-6000 Neurone gefunden (DIV1, $n=3$). Da in jedem Pilzkörper *in vivo* zwischen 30 und 50 000 Zellen zu finden sind (Cayre *et al*, 1998), ist die Ausbeute also relativ gering.

Nach einem Tag in Kultur hatten $18,1 \pm 3,4\%$ der Zellen Ausläufer, an DIV2 $15,7 \pm 2,8\%$. Die Zellzahl verringerte sich in dieser Zeit um $21,6 \pm 1,5\%$. Nach 6 Tagen in Kultur lebten noch etwa die Hälfte der Zellen ($55,7 \pm 1,3\%$), und davon besaßen $14,2 \pm 2,3\%$ Ausläufer (s. Abb. 18).

Die elektrophysiologische Charakterisierung erwies sich auf Grund der geringen Größe der Somata als recht schwierig. Es konnten keine spikenden Neurone gefunden werden, die Ruhepotentiale lagen im Mittel höher als bei den Thorakalganglienneuronen ($-28,7 \pm 6,5$ mV, $n=10$).

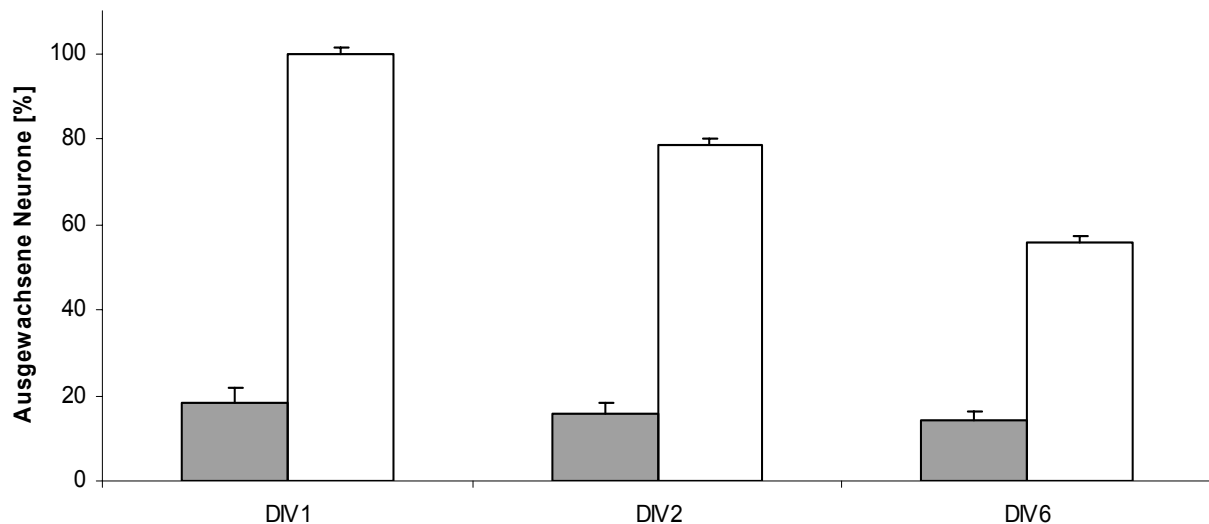


Abb. 18 Viabilität (weißer Balken) der Kenyonzellen [%] und prozentualer Anteil der ausgewachsenen Zellen (grau). Die an DIV1 gefundene Zellzahl wurde zu 100% gesetzt.

3.1.3 Primärzellkultur nach mechanischer Positionierung auf Coverslips, topologischen Strukturen und MEAs

Bei der Entnahme von Neuronen direkt aus dem Ganglion mit unbehandelten (nicht feuerpolierten) Saugkapillaren wurden durch Ruption der Zellmembran mehr als 80% der Neurone beschädigt. Durch Feuerpolieren konnten die Verluste auf 60-70% reduziert werden. Durch die Adhäsion an der Kapillarenspitze konnten die Zellen allerdings oft nur schwer wieder von der Spitze gelöst werden, und es kam zu sehr ungenauen Positionierungen (s. Abb. 19, A).

Durch eine zusätzliche Silanisierung konnte dieses Problem weitgehend behoben werden (s. Abb. 19, B).

Wie sich zeigte, liegt der günstigste Kapillarendurchmesser im Bereich von $1/3$ bis $1/2$ des Zelldurchmessers. Bei diesen Durchmessern wurden die Zellen weder eingesaugt (zu groß), noch war die Öffnung zu klein, um ausreichende Kräfte zu erzeugen, um sie aus dem Ganglion zu isolieren.

Eine weitere Verbesserung wurde erreicht, indem bei der Extraktion der Zellen zusätzlich ein feines Glas- oder Metallhäkchen verwendet wurde, um damit den Primärneuriten proximal zu durchtrennen. So konnten größere Zugspannungen vermieden werden.

Zur Entnahme und anschließenden Positionierung wurden letztlich etwa 5-10 Minuten pro Zelle benötigt. Die Genauigkeit war groß genug, um die Zellen in die größeren Löcher ($d=150\text{ }\mu\text{m}$) in den SU-8-Strukturen einzuführen.

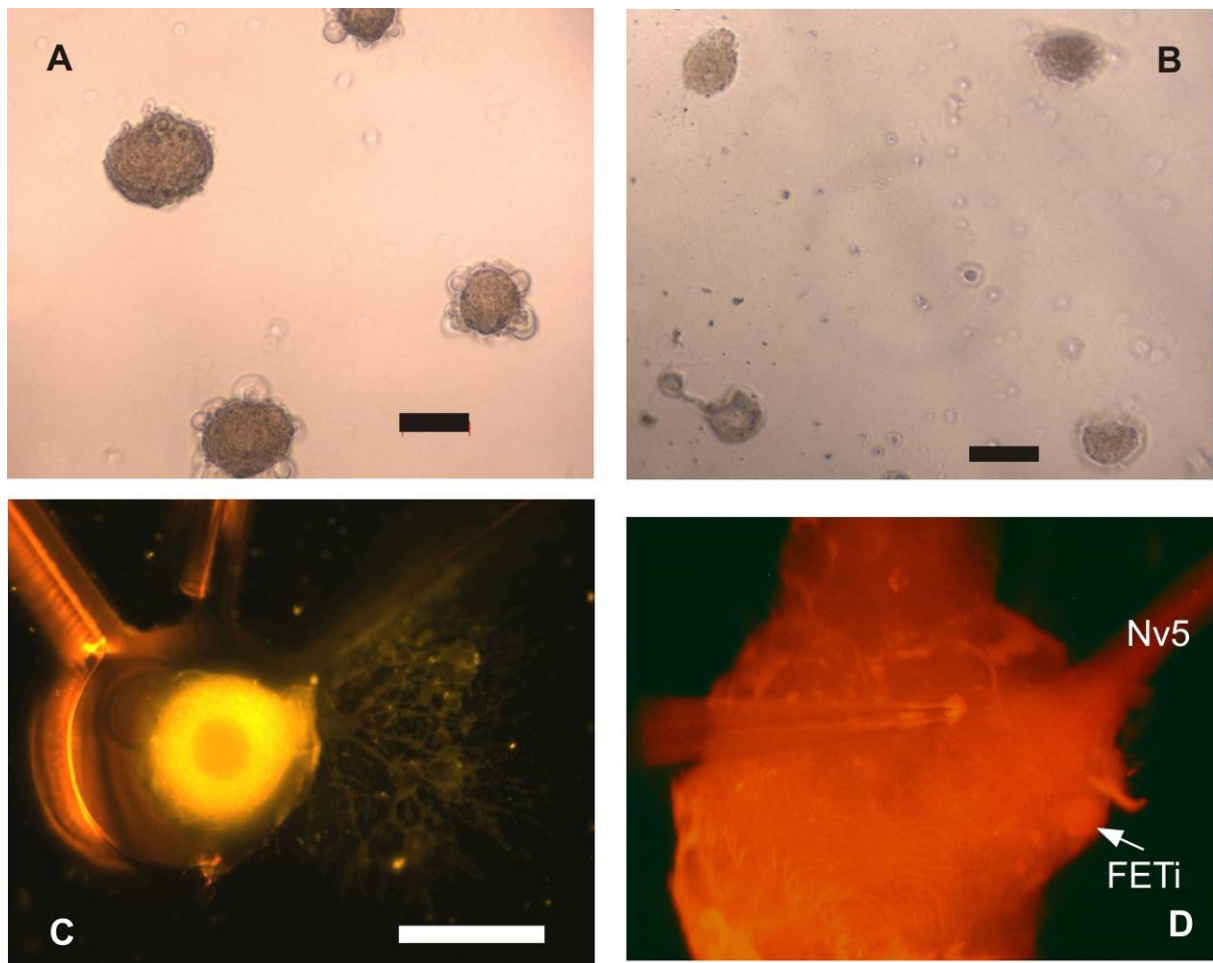


Abb. 19 (A) zeigt Neurone, die mittels un behandelter Saugkapillaren positioniert wurden. Die Zellmembranen sind beschädigt, und die Positionierung ist ungenau. **(B)** und **(C)** zeigen Neurone, die mit silanisierten und feuerpolierten Saugkapillaren positioniert wurden. Die Ausbeute an unbeschädigten Neuronen ist hier größer und die Positionierung präziser. Bei **(B)** wurde auf der Kulturschale, bei **(C)** in SU-8-Strukturen positioniert. In **(D)** sieht man das Metathorakalganglion durch das Fluoreszenzbinokular und die Entnahme eines mit Texasrot-Dextran gebackfillten Neurons mit der Saugkapillare (Die Aufnahme ist überbelichtet, da sonst die Kapillare nicht erkennbar wird.) Maßbalken: $100\text{ }\mu\text{m}$

War der Durchmesser der Zellen nur geringfügig kleiner als der Lochdurchmesser, wurde das Einbringen schwieriger. Um die Zelladhäsion an den Rändern der Struktur

zu vermeiden und das Einführen zu erleichtern, wurde mit einer weiteren Saugkapillare über eine benachbarte Öffnung ein Unterdruck und damit ein einwärts gerichteter Fluidstrom erzeugt.

Von 50 positionierten, ungefärbten Neuronen aus Zellsuspensionen, die in ein silanisiertes Töpfchen (Coverslip mit Plexiglasring) gefüllt wurden, waren nach einem Tag in Kultur noch 28 (56%) vital. Dabei wurde oft (13 von 26 Zellen) beobachtet, dass die Zellen schlechter adhärieren (Bewegung bei leichten Fluidströmungen) und/oder sich auf der Membran Blasen bildeten (s. Abb. 19, A). Bei 27,5% konnten nach einem Tag Ausläufer gefunden werden. Nach 5 Tagen in Kultur waren noch 20% der Zellen intakt.

Wurden zuvor zusätzlich die Färbung und die Entnahme direkt aus dem Ganglion durchgeführt, so verringerte sich die Anzahl der vitalen Neurone (DIV1) auf ca. 40% (n=40). Von diesen Neuronen bildeten dann etwa die Hälfte Ausläufer. Auch hier zeigten sich oft Blasen an der Membran.

Diese Experimente wurden zum Teil von Hr. Stibany (Forschungspraktikant) durchgeführt.

3.1.4 Primärzellkulturen auf MEAs

Von Weigel (2006) wurde unter anderem gezeigt, dass Neurone aus den Thorakalganglien auf hydrophilisierten Glasoberflächen auswachsen.

Darauf aufbauend wurde hier nun untersucht, ob die Kultivierung auf den MEAs, die ebenfalls aus Glas bestehen und zuvor (ebenfalls durch Säurebehandlung) hydrophilisiert wurden, zu den gleichen Resultaten führt.

Anschließend wurde untersucht, ob die für die Dielektrophorese verwendeten Medien, welche eine stark verminderte Ionenkonzentration aufweisen und darüber hinaus nur Na⁺-Ionen enthalten, die Zellen schädigen.

Da sich das Medium mit zunehmender Frequenz der angelegten Wechselspannung erwärmt, wurde anschließend untersucht, ob diese Erwärmung einen negativen Einfluss auf die Viabilität bzw. das Zellwachstum hat. Zum anderen werden über die

elektrischen Wechselfelder mechanische Kräfte auf die Zellen ausgeübt und Ladungsverschiebungen induziert, die möglicherweise für die Zellen schädlich sind.

Dies ist insbesondere deshalb von Interesse, weil die Insektenneurone größere Durchmesser als die Vertebratenneurone haben und damit die wirkende Kraft entsprechend größer ist ($\sim r^3$).

Primärzellkultur ohne DEP-Positionierung und Medienwechsel

Zwei größere Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Thorakalganglienneuronen auf MEAs lagen darin, dass es zum einen schwierig war, die gewünschten Zellkonzentrationen einzustellen (zwischen 30 und 150 an DIV0). Zum anderen lagert sich die Mehrzahl der Zellen ($> 80\%$) in der Randzone des Chips und nicht in der Elektrodenregion ab. Dies liegt zum einen daran, dass die MEA-Region nur einen geringen Teil der Oberfläche ausmacht, zum anderen vermutlich an den beim Befüllen auftretenden Fluidströmungen.

Ein Problem, das vor allem bei den Insektenneuronen auftrat, war die stark reduzierte Viabilität der Neurone. Nach einem Tag in Kultur waren etwa $27 \pm 24\%$ ($n=29$) der Neurone intakt. Nach 5 Tagen in Kultur waren nur noch $8,5 \pm 5\%$ ($n=29$) der Neurone vorhanden. Da es offenbar keine Rolle spielte, ob das Kulturmedium erneuert wurde (jeweils $n=6$; mit täglichem Wechsel: $10 \pm 6\%$, ohne: $10 \pm 5\%$), wurde bei den Kultivierungen darauf verzichtet.

Auch die Ausbildung von Neuriten war deutlich reduziert ($21 \pm 10\%$). Auf Grund der geringeren Zellzahlen bedeutete dies, dass es recht unwahrscheinlich war, intakte Neurone direkt auf den Elektroden zu finden. Wurden Zellsuspensionen mit deutlich höheren Zelldichten erstellt, wurde der Zellschrott (Neuropil-/Nervenreste) zum Problem. Zum anderen wurde die Viabilität dadurch wiederum geringer ($18 \pm 16\%$, $n=8$).

Primärzellkultur im DEP-Medium ohne DEP-Positionierung

Wurden die Insektenzellen nach der Dissoziation in DEP-Medium eingebracht und in diesem anschließend auf die Chips aufgetragen, ließ sich keine deutliche Verminderung der Viabilität feststellen ($27 \pm 23\%$, $n=20$). Die Verweildauer in dem

DEP-Medium betrug dabei zwischen 40 und 160 Minuten. Nach einer 30-minütigen Adhäsionsphase wurden 500 µl Kulturmedium zugegeben.

Nach einem Tag in Kultur waren $22 \pm 13\%$ ($n=20$) der Neurone ausgewachsen.

Primärzellkultur mit DEP-Positionierung

Im Zusammenhang mit der dielektrophoretischen Positionierung gab es zwei Hauptfragestellungen. Zum einen, ob die durch den Feldgradienten induzierten mechanischen Kräfte und Potentialgradienten an den Membranen zur Schädigung der Zellen führen, zum anderen, ob der thermische Eintrag ein Problem für die Zellen darstellt.

Um diese zu klären, wurden die Viabilitäten der gesamten Neurone und die der auf den Elektroden liegenden Neurone getrennt untersucht. Es wurden Sinuswechselspannungen mit Frequenzen von 5/10/20 MHz und Amplituden von 8/10/15/20 V verwendet, und die Dauer der Befeldung betrug 30-45 Minuten.

Tab. 3 Anzahl der vital erscheinenden Zellen und Anteil der ausgewachsenen Neurone nach einem Tag in Kultur auf den MEAs (jeweils $n=4$).

Frequenz [MHz]/ Amplitude [V_{pp}]	Viabilität (DIV1) [%]	Zellen mit Neuriten [%]
5,0/8	33 ± 17	26 ± 17
5,0/10	31 ± 17	24 ± 18
10/8	33 ± 20	24 ± 17
10/10	32 ± 18	28 ± 14
15/10	33 ± 16	23 ± 15
20/10	32 ± 7	25 ± 18
20/20	31 ± 14	22 ± 11

Insgesamt war die Viabilität der befeldeten Neurone nicht nennenswert reduziert und befand sich in den gleichen Bereichen, wie ohne Feld (DIV1: $32 \pm 15\%$, $n=28$).

Es konnte im Gegenteil sogar beobachtet werden, dass die Neurone eine etwas erhöhte Tendenz zeigten, auszuwachsen ($25 \pm 14\%$ der Neurone in Elektrodenregion, $n=28$).

Die Viabilitäten und der Anteil der ausgewachsenen Zellen waren nicht abhängig von der Befeldungsfrequenz und -amplitude (s. Tab. 3).

3.1.5 Viabilität gefärbter Neurone

Da der Farbstoff (Texasrot-Dextran) durch Diffusion retrograd durch die Axone in die Somata transportiert wird, ist die Intensität der Färbung von der Inkubationszeit, der Temperatur, der Dicke und Länge des Axons und der Konzentration des Farbstoffs abhängig.

Daher wurden zunächst große Somata mit entsprechend dicken Axonen gefärbt. Um auch kleinere Neurone mit genügend Farbstoff zu füllen, wurden letztlich Konzentrationen von 1-3% (w/v) in PBS verwendet. Die Inkubationszeit betrug dabei 12 h, die Temperatur 4 °C.

Anschließend wurde untersucht, ob die Färbung die Vitalität beeinflusst, wozu die gefärbten Zellen direkt nach dem Ausplattieren und am darauf folgenden Tag ausgezählt wurden. Daneben wurde ermittelt, ob das Auswachsen der Neurone beeinflusst wird.

Als Kontrolle wurden in 4 der 8 Kulturen die nicht gefärbten Neurone und die ausgewachsenen Zellen gezählt. Von den 50 Neuronen, die bei einem bilateralen Backfill gefärbt sein sollten, konnten direkt nach dem Ausplattieren zwischen 30 und 45 in Kultur wieder gefunden werden ($37,5 \pm 5$, $n=8$; Kontrolle: 1292 ± 100).

Nach einem Tag in Kultur verringerte sich ihre Anzahl auf $31,7 \pm 4,7$ (~ 85%) (Kontrolle: 1095 ± 94 (~ 84%)) und nur sehr wenige der gefärbten Neurone wiesen Ausläufer auf ($17,7 \pm 3,2\%$; Kontrolle: $28,6 \pm 1,8\%$).

Demnach hat die Färbung zwar keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, wohl aber auf das Auswachsen von Neuriten.

3.2 Biofunktionalisierung mittels Elektrophorese

Da die Biofunktionalisierung nur ein kleines Nebenprojekt darstellte, wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet, und es wurden nur wenige Parameter variiert.

So wurden sehr hohe Spannungen ($\pm 2,4$ - $2,7$ V) zur Positionierung verwendet, um den maximalen Effekt zu sehen. Diese Spannungen lagen kurz unterhalb der Spannung, bei der in destilliertem Wasser Hydrolyse auftrat. Getestet wurden ConA, Poly-L-Lysin, Poly-D-Lysin, FITC-gekoppeltes Poly-L-Lysin und ConA-Rhodamin.

Bei allen verwendeten Spannungen, Chiptypen und Protein-/Polypeptid-Suspensionen konnte anschließend die Abscheidung von Proteinen bzw. Peptiden gezeigt werden (s. Abb. 20).

Die Färbungen mit PonceauS vermitteln den Eindruck, dass der erwünschte Proteingradient bei einigen Abscheidungen vorhanden ist. Es ist aber nicht leicht zu entscheiden, ob nicht die unterschiedlichen Reflexionen des Untergrunds (Goldelektrode bzw. Glas) diesen Eindruck hervorrufen. Bei der Verwendung von Poly-Lysin konnten darüber hinaus auch Verbindungslinien entlang der (vermutlichen) Feldlinien gefunden werden (s. Abb. 20, oben), die später verwendet werden können, um das Auswachsen der Neurite zu steuern. Dabei wurden Verbindungslinien sowohl zwischen Elektroden mit gleicher Spannung als auch zwischen Elektroden, die mit Spannung beaufschlagt wurden, und Masse-Elektroden gefunden.

Bei der elektrophoretischen Beschichtung mit FITC-gekoppeltem Poly-Lysin wurden weder Höfe um die Elektroden herum, noch Verbindungslinien zwischen den Elektroden gefunden. Hier scheint sich die Ablagerung auf die Elektroden selbst zu begrenzen.

Bei der Abscheidung von Rhodamin-gelabeltem ConA zeigten sich Höfe um die Elektroden, und bei langen Belichtungszeiten wurde auch eine erhöhte Protein-Konzentration zwischen den Elektroden erkennbar.

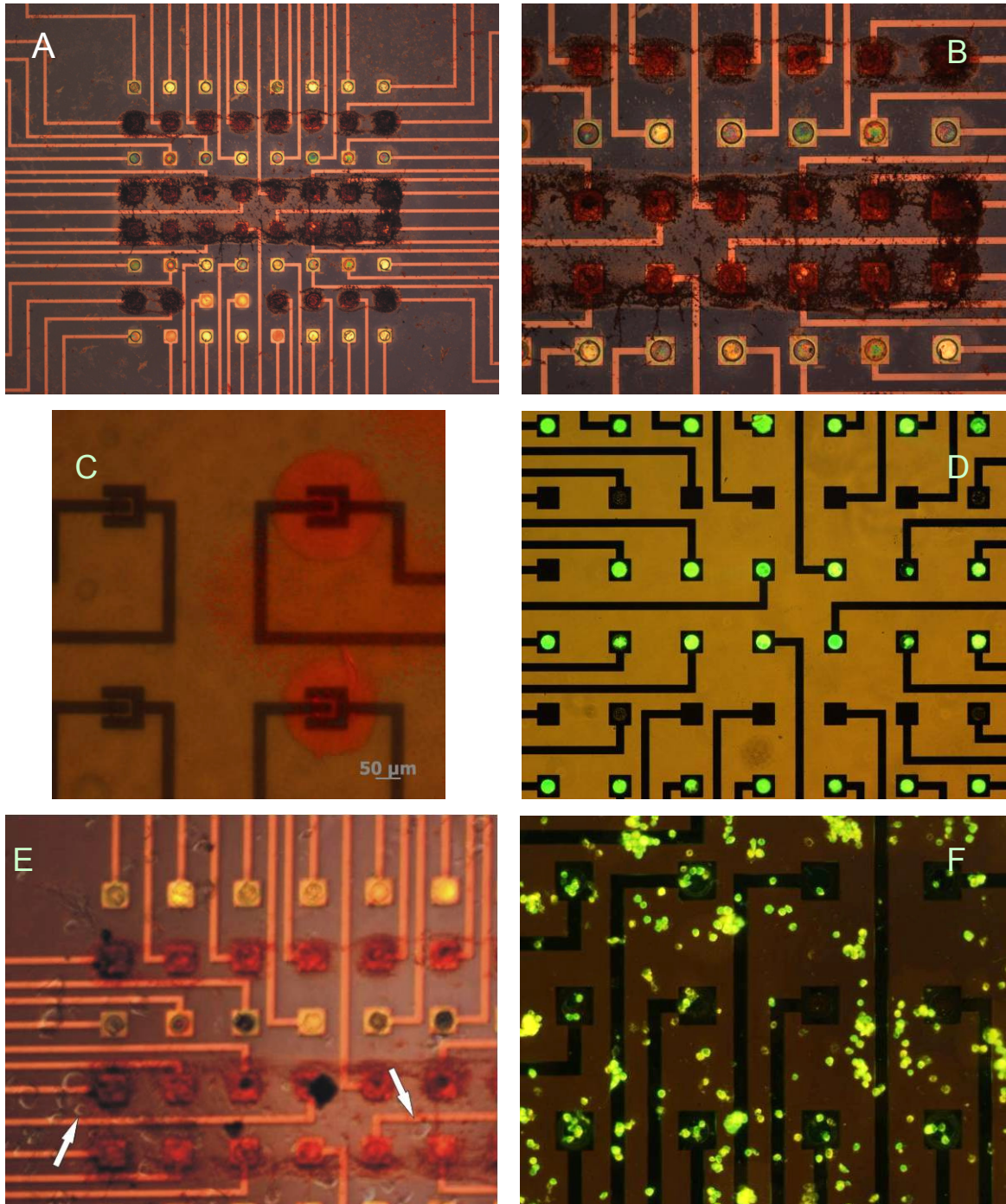


Abb. 20 Bei einer Spannung von + 2,7 V (60 min) an den Elektrodenreihen 2, 4, 5 & 7 erkennt man bei (A) deutliche Peptidabscheidungen (Poly-D-Lysin, gefärbt mit PonceauS). In der Vergrößerung (B) erkennt man die Verbindungslinien zwischen den Elektroden gleichen Potentials und Masse-Elektroden (Auflicht). Bei (C) ist ein anderer Chiptyp gezeigt, bei dem an den Elektroden auf der rechten Seite Spannungen anliegen. Man erkennt eine erhöhte ConA-Rhodamin-Konzentration an und zwischen den Elektrodenpaaren (2 V/30 min, Überlagerung von Auflicht- und Fluoreszenzbild). (D) Nach Befeldung (30 min, 5 MHz, 10 V_{pp}, AC-Signal auf den gleichen Elektroden, wie zuvor die Gleichspannung) erscheint die Fluoreszenz (qualitativ) unverändert. (E) Die PonceauS-Färbung erscheint auch direkt nach der Positionierung von Metathorakalganglienneuronen qualitativ unverändert. Hier wurde der in (A) und (B) dargestellte Chip verwendet. Auf der Aufnahme sind die Zellen nur undeutlich zu erkennen, weshalb exemplarisch zwei Zellen markiert wurden (Pfeile). (F) DEP-positionierte Neurone aus dem Tectum (Huhn, DIV4) auf zuvor elektrophoretisch beschichteten Elektroden (untere und obere Reihe, die Beschichtung war schon vor der Befeldung nicht gut zu erkennen). In allen Bildern ohne Maßbalken beträgt der Elektrodenabstand (100 µm).

Es wurden einige wenige Experimente durchgeführt, um zu testen, ob die Beschichtung auch nach der dielektrophoretischen Positionierung und dem Einsatz von Gleichspannung zur galvanotropischen Wachstumssteuerung noch vorhanden ist.

Dabei zeigte sich, dass die Dielektrophorese keinen großen Einfluss zu haben scheint, da mikroskopisch nach der Befeldung (5 MHz, 10 V_{pp}, 30 min, DEP-Medium) kaum Änderungen in der Proteinverteilung und -menge auf den Elektroden gefunden werden konnten (s. Abb. 20, unten).

Im Gegensatz zu den Wechselfeldern wurde unter Verwendung von Gleichfeldern ($\pm 2,4$ V; 36 °C; 12 h; Kulturmedium) ein deutlicher Einfluss gefunden. Bei vergleichbarer Spannung, die zu Biofunktionalisierung verwendet wurde, kam es zum vollständigen „Absprengen“ der Beschichtung, die dann um die Elektroden herum gefunden wurde.

3.3 Positionierung durch positive Dielektrophorese

Bei Befeldung mit Sinuswechselfeldern mit Frequenzen im MHz-Bereich (1-20) und Amplituden zwischen (8 – 20 V_{pp}) konnte meist deutlich ein Konvektionsstrom beobachtet werden.

Der Konvektionsstrom hat Vor- und Nachteile. So ist es positiv, dass die Zellen durch den Konvektionsstrom in Richtung des Chip-Zentrums (Elektrodenarray) transportiert werden, wodurch es hier zur Zellakkumulation kommt.

Auf der anderen Seite entsteht durch ihn eine Kraftkomponente, die der dielektrischen Kraft entgegenwirken kann. In vielen Fällen konnte jedoch beobachtet werden, dass Zellen, die sich relativ dicht über den Elektroden (ca. 10-20 µm) befanden und somit einem entsprechend hohen Feldgradienten ausgesetzt waren, durch die dielektrischen Kräfte ihre Bewegungsrichtung änderten. Sie wurden vom Feld, entgegengesetzt zur Richtung des Fluidstroms, zu den Elektroden transportiert.

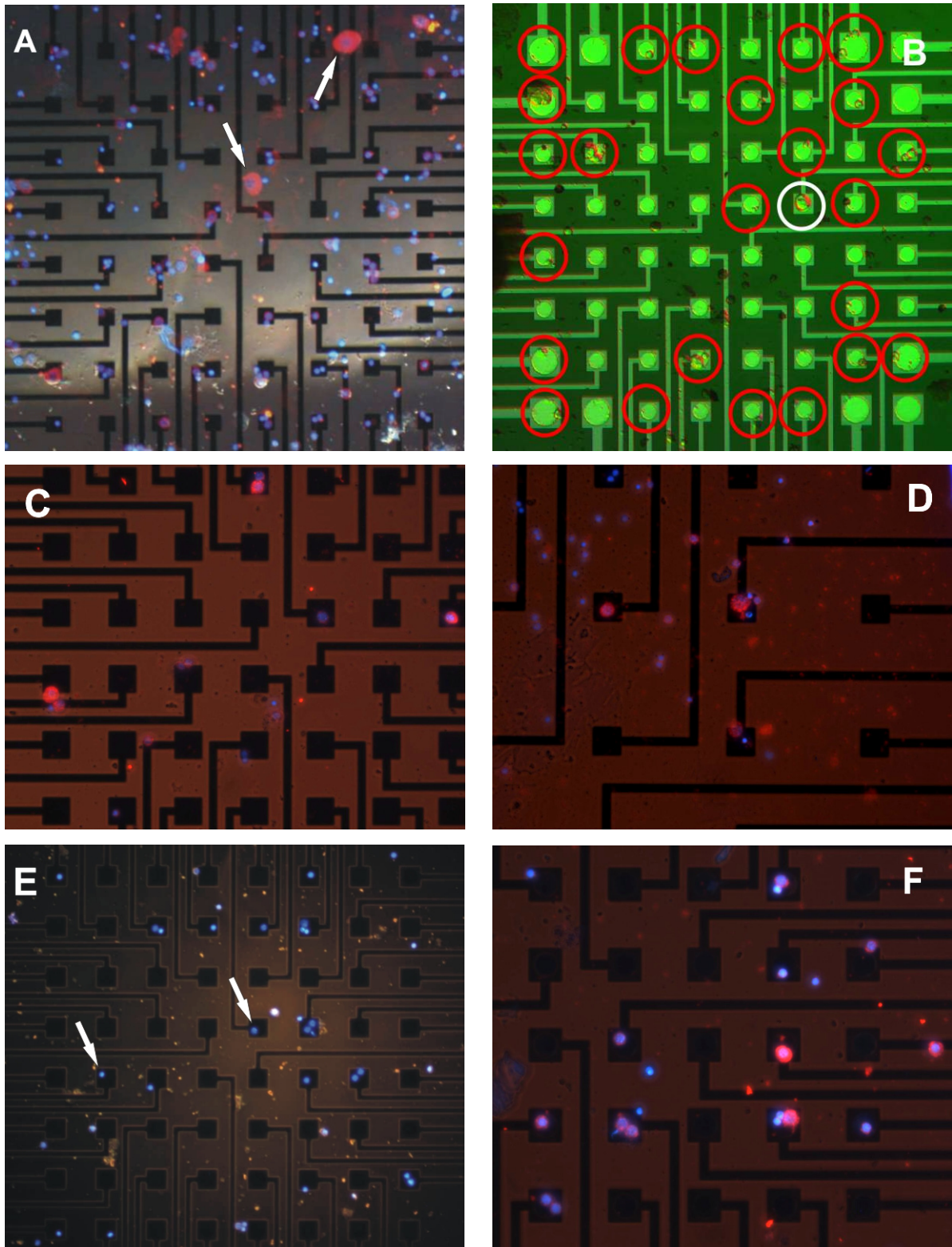


Abb. 21 Positionierung von Zellen aus dem Hirn von *Locusta* (ohne Pilzkörper). Befeldungen mit Frequenzen ab 1 MHz führen dazu, dass die meisten Zellen auf Elektroden und Leiterbahnen zu finden sind. Meist sind sowohl Neurone und Gliazellen auf den Elektroden zu finden (A). Die Zahl der Zellen direkt nach der Positionierung (B, Kreise kennzeichnen positionierte Zellen, Aufsicht) ist meist höher als nach der Doppelfärbung (α HRP-CY3/DAPI; A, C-F). Nach der Färbung finden sich oft nur noch Membranreste in den Elektrodenzwischenräumen (D & F, rote Flecken). Kleine Zellen liegen bevorzugt an den Elektrodenkanten (z.B. C, Pfeile), mittelgroße ($d_{\text{Zelle}} \approx d_{\text{Elektrode}}$) liegen mittig auf den Elektroden (B, weißer Kreis), große Zellen (A, Pfeile) konnten oft gar nicht positioniert werden. (A) 5 MHz bei 15 V_{pp}; (B) 11 MHz bei 10 V_{pp}; (C&D) 1 MHz bei 10 V_{pp}; (E&F) 2,5 MHz bei 10 V_{pp}, Dauer der Befeldung 30 min.

Bei der Positionierung durch Dielektrophorese stellten die Reste des Neuropils und der Konnektive bzw. Nerven in den Insektenzellsuspensionen ein Problem dar. Diese wurden durch den Fluidstrom in Richtung Array transportiert und kamen dann (auf Grund der höheren Masse) meist genau auf dem Array zu liegen und bedeckten die Elektroden. Unter anderem, um diesem Problem zu begegnen, wurden die Positionierungen dann auch mit Zellen aus anderen Geweben (Gehirn von *Locusta*, Rattenkortex, Huhntektum-/telencephalon) durchgeführt.

Positionierung von Neuronen aus *Locusta*

Um zu überprüfen, ob eine dielektrische Positionierung der Insektenneurone auf den Elektroden der Chips möglich ist, wurde mit Frequenzen zwischen 1 und 15 MHz und Spannungsamplituden von 8 bis 15 V_{pp} befeldet.

Sofern die Konvektionsströmung erkennbar war, konnte während der Befeldung unter dem Mikroskop, sowohl bei den Gehirn- als auch bei den Thorakalganglienneuronen, immer ein deutlicher Effekt in Form einer Translation in Richtung der Elektroden bzw. Leiterbahnen gesehen werden.

Dieser Effekt nahm mit dem Abstand zu den Elektroden ab. Daher zeigte sich später auch bei den (Doppel-)Färbungen, dass meist in den Elektrodenzwischenräumen noch Zellen zu finden waren, während in der Nähe der Elektroden meist nur sehr wenige Zellen lagen. Deshalb konnten auch oft große Zellen (> 80 µm) nicht positioniert werden, wenn sie zwischen den Elektroden absanken. Dies ist wohl auch darauf zurückzuführen, dass sie Kräften mehrerer Elektroden ausgesetzt sind. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass manche Zellen, die durch den Fluidstrom in die Mitte von zwei oder vier Elektroden transportiert wurden, über dem Array schwebten und anfangen zu rotieren. Hier kompensierten sich die aufwärts gerichtete Fluidströmung und die anziehenden Kräfte durch die Elektroden. Wurde die Spannung erhöht, nahm die Rotationsgeschwindigkeit zu.

Eine Kraftwirkung, wenn auch von geringerer Intensität, konnte manchmal auch an Elektroden beobachtet werden, die gar nicht mit Wechselspannung beaufschlagt wurden.

Bei den Färbungen zeigte sich, dass große Zellen auf Grund ihrer größeren Stirnfläche während der Färbungen öfter abgewaschen werden. Es fanden sich dann nur noch Membranreste (s. Abb. 21, D und 22, C & E), der Zellkern war nicht mehr vorhanden.

Die deutlichsten und besten Positionierungen wurden bei Zellen beobachtet, deren Durchmesser etwa dem der Elektroden entsprach. Diese kamen oft genau auf den Elektroden und nicht an den Elektrodenkanten zu liegen (s. Abb. 20, A). Man kann vermuten, dass die dielektrischen Kräfte die Zellmembranen dieser Zellen an das Substrat ziehen und eine stärkere Adhäsion verursachen. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass im Zuge der Färbung (insbesondere während der Spülschritte) viele Zellen abgewaschen wurden und meist nur die Zellen, deren Durchmesser dem der Elektroden entsprach, übrig blieben (vergleiche Abb 21, B & E).

Die Doppelfärbungen zeigen deutlich, dass sowohl Neurone als auch Gliazellen durch diese hohen Frequenzen eine positive dielektrophoretische Kraft erfahren. Bei kleineren Zellen (aus Ganglien und Gehirn) wurden meist mehrere Neurone pro Elektrode gefunden, die bevorzugt auf den Elektrodenkanten lagen (s. Abb. 21). Insgesamt zeigte sich, dass Zellen, die zwischen den Elektroden in Kontakt mit dem Substrat kamen, durch die Feldwirkung zwar etwas deformiert, aber nicht mehr bewegt werden konnten. Da die Konvektionsströmung mit zunehmender Frequenz und Spannungsamplitude zunahm, wurden für weitergehende Experimente 5 MHz und 8-10 V_{pp} verwendet.

Da die Zellzahl stark schwankte und die Zellen auf den MEAs schnell abstarben, konnte die Viabilität nach der Positionierung auf diesem Weg kaum überprüft werden. Qualitativ zeigte sich jedoch die Tendenz, dass die Neurone, die zwischen oder auf den Elektroden lagen, eher auszuwachsen schienen, als Neurone, die sich im Randgebiet des Chips befanden.

Es erwies sich auf Grund der beengten Chipdimensionen, Beleuchtungsproblemen, geringer Viabilität der Zellen usw. als schwierig, die Zellen elektrophysiologisch zu charakterisieren. Bei einigen Neuronen (n=8) wurde nach der Positionierung (5 MHz,

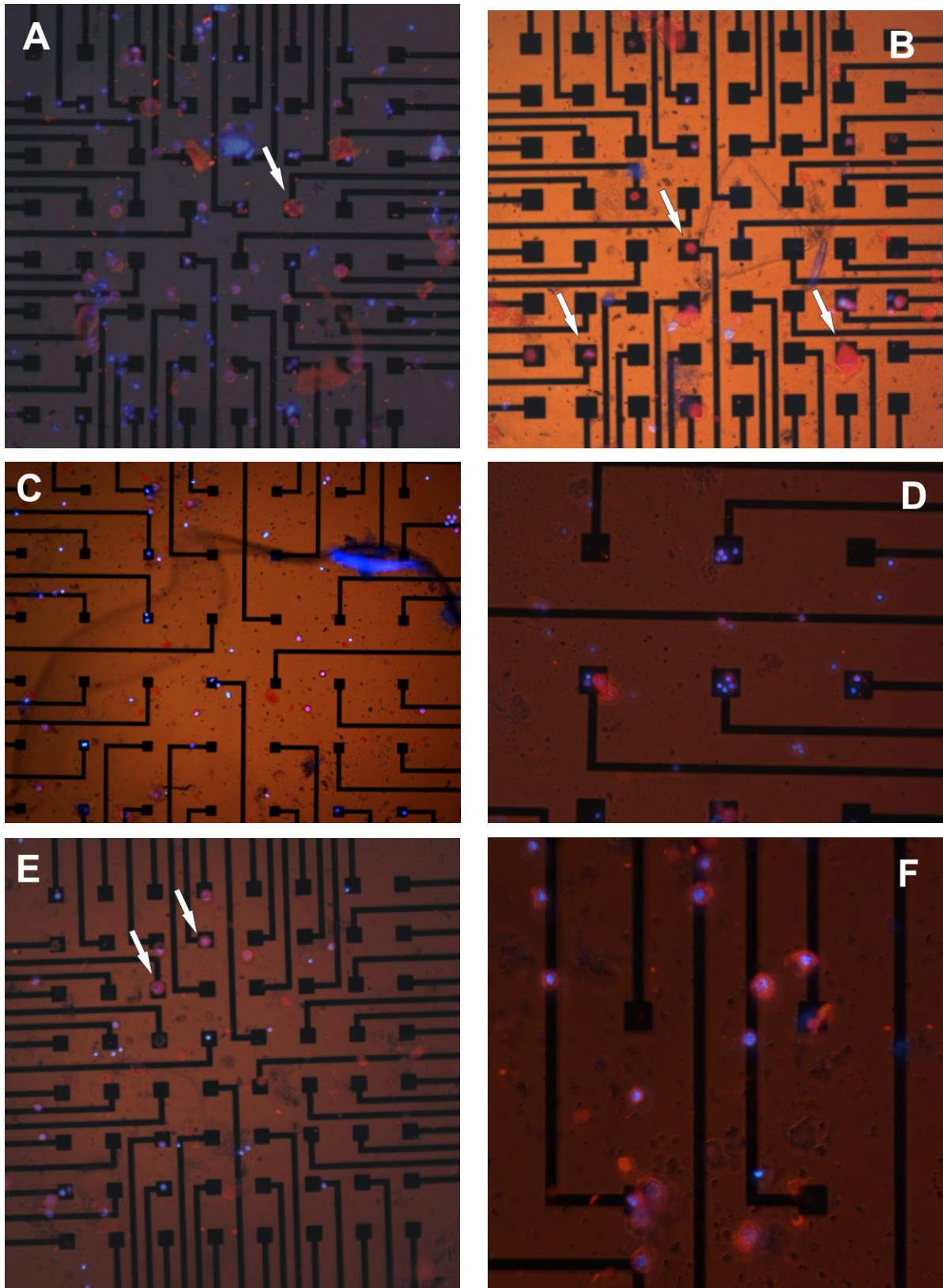


Abb. 22 Doppelfärbungen (α HRP-CY3/DAPI) der dielektrophoretisch positionierten Neurone aus dem Meso- und Metathorakalganglion von *Locusta*. Außer bei (A) (10 MHz, 10 V_{pp}) wurden alle Positionierungen mit einer Frequenz von 5 MHz und 10 V_{pp} durchgeführt. Sowohl Neurone als auch Gliazellen befinden sich auf den Elektroden/-kanten oder auf bzw. an Leiterbahnen (A & F). Die Zwischenräume, d. h. die Stellen, an denen die Feldinhomogenitäten zu gering sind, um ein ausreichendes Dipolmoment zu erzeugen, sind nahezu zellfrei. Stimmen Zell- und Elektrodendurchmesser überein, findet sich oft nur ein Neuron pro Elektrode (A, B & E, Pfeile). Ist dies nicht der Fall, findet man oft mehrere Zellen pro Elektrode (A, C & D).

10 V_{pp}) mit scharfen Elektroden abgeleitet. Dabei zeigten sich bei den wenigen Zellen, die nach einem Tag in Kultur noch lebten, die Ruhepotentiale unverändert (zwischen -30 und -60 mV). Auch spikende Neurone konnten gefunden werden (n=2). Die Registrierung von Signalen über die MEA-Elektroden mit konventionellen extrazellulären Messverstärkern konnte nicht realisiert werden.

Eine quantitative Auswertung (Anzahl und Typ der Zellen) der Positionierung erscheint ohne Durchflusssystem wenig sinnvoll, da z. B. während der nachfolgenden Adhäsionsphase weitere Zellen absinken, die das Ergebnis verfälschen. Da beim Mediumwechsel im Zuge der Waschschrte nicht immer gleich pipettiert werden konnte, d. h. unterschiedliche hydrodynamische Kräfte wirkten, wurde eine quantitative Auswertung erschwert. Auch war es nicht möglich, zuvor zu bestimmen, welche der Elektroden überhaupt funktionstüchtig sind und welche Potentiale während der Befeldung an den einzelnen Elektroden anliegen (hier wäre es beispielsweise interessant zu wissen, in welchem Ausmaß Potentiale an nicht angesteuerten Elektroden anliegen).

Positionierung von Neuronen aus unterschiedlichen Hirnregionen von Ratten- und Hühnerembryonen

Die ersten Versuche zur dielektrischen Positionierung (hier pDEP) wurden mit Zellen aus dem Cortex embryonaler Ratten durchgeführt. Für diese Zellen konnte die dielektrische Positionierung schon von anderen Gruppen gezeigt werden und der Nachweis für die „Unschädlichkeit“ der Methode erbracht werden (Hippocampus: Prasad *et al*, 2003 & 2004). Da dort jedoch andere Elektroden (Pt, 100x120 µm, Abstand 200 µm, leicht gegeneinander versetzt) verwendet wurden, woraus sich eine andere Feldverteilung ergibt, wurden zunächst die vorhandenen Au-Elektroden-MEAs getestet.

Nach 5 Minuten konnten auflichtmikroskopisch schon deutliche Ansammlungen von Zellen auf den Elektroden beobachtet werden. Nach 20 min Befeldung waren fast alle Elektroden mit Zellen besetzt, das direkte Umfeld fast zellfrei. Viele Zellen sammelten sich auch auf den Leiterbahnen (s. Abb. 23, A).

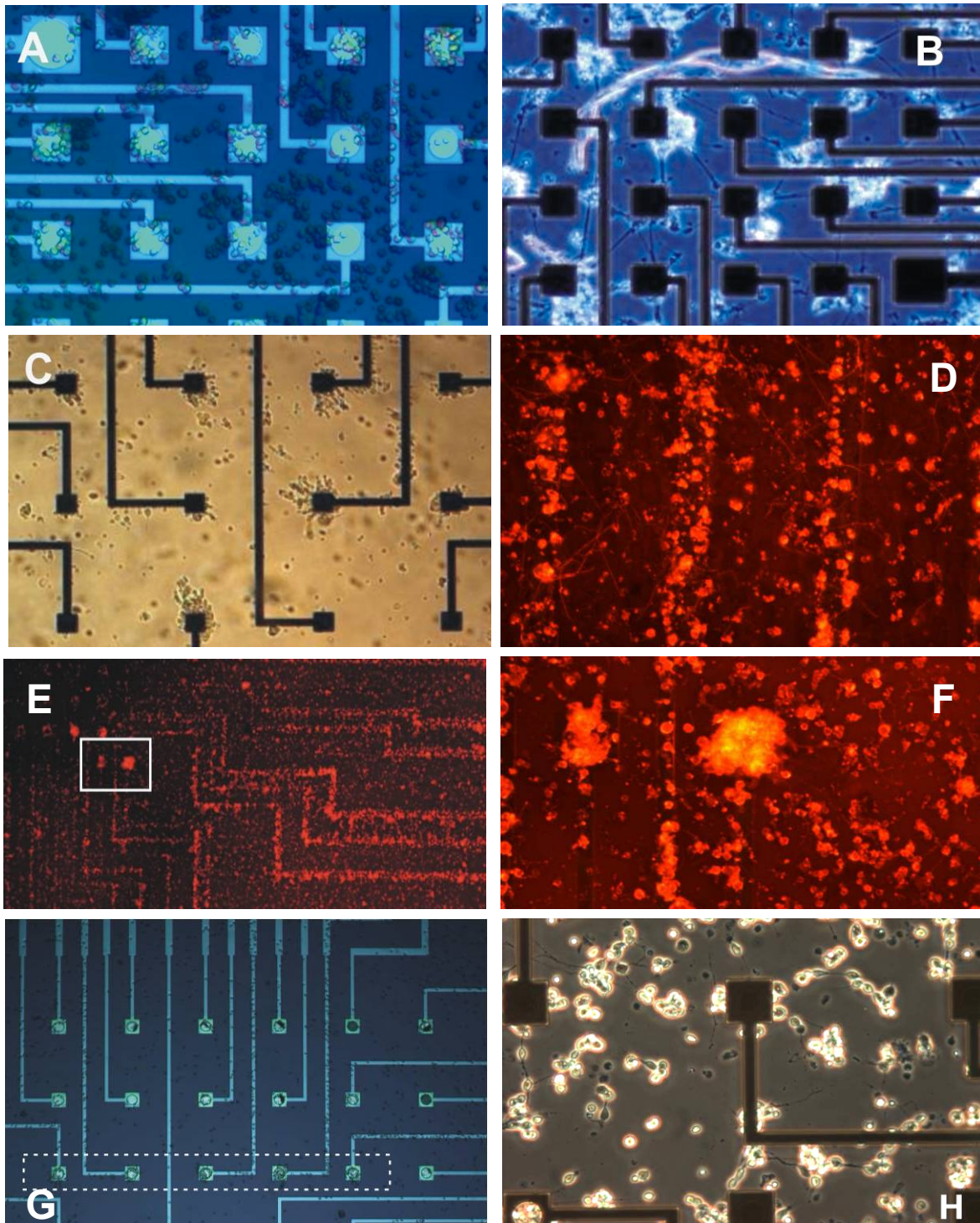


Abb. 23 Zehn Minuten nach Beginn der DEP-Positionierung von Ratten-Cortexneuronen (E8) mit 11 MHz/10 V_{pp} (A, Auflicht) erkennt man bereits deutliche Zellansammlungen an den Elektrodenkanten. (B, Phasenkontrast) zeigt Zellcluster und neuronale Netze an DIV5. Durch Verkürzung der Axone wurde ein Teil der positionierten Zellen von den Elektroden gezogen. Positive DEP (5 MHz, 15 V_{pp}) bei Neuronen aus dem Huhn (E8, Tectum, DIV1, DiI, Fluoreszenz) mit hoher Zelldichte (D - F). Viele Neurone auf und zwischen den Leiterbahnen sind ausgewachsen (D). In der Übersicht (E) erkennt man erhöhte Zellkonzentrationen auf den Leiterbahnen und Zellcluster auf den Elektroden (links oben). Der markierte Bereich ist in (F) vergrößert dargestellt. C, G & H : Telencephalonneurone (E6) in geringer Zelldichte. Die Zellen lagern sich um die Elektroden perlschnurartig aneinander (C, Durchlicht). Bei (G, Auflicht) wurden nur die markierten Elektroden zur Positionierung verwendet. Auf diesen Elektroden und den zugehörigen Leiterbahnen finden sich deutlich mehr Zellen. An DIV1 (H, Phasenkontrast) erkennt man bereits erste Zellausläufer.

Bereits nach einem Tag in Kultur kam es zu deutlichen Cluster- und Netzwerkausbildungen. Durch die Vernetzung wurden im Laufe der Kultivierung einige Cluster trotz der adhäsiven Beschichtung mit ECM-Gel von den Elektroden gezogen (DIV5, s. Abb. 23, B).

Die Positionierung der Hühnerneurone (Tectum und Telencephalon) bei verschiedenen Frequenzen im MHz-Bereich verlief ebenfalls erfolgreich. Hier fiel bei manchen Experimenten auf, dass sich die Zellen perlschnurartig aneinanderlagerten (s. Abb. 23, C), ein Effekt, der auch von Pohl (1987) und Pethig (Pethig *et al*, 1992) schon gefunden und beschrieben wurde.

Die Verwendung hoher Zellkonzentrationen (~ 2000 Zellen/ μl) erwies sich als probates Mittel, um herauszufinden, an welchen Elektroden und Leiterbahnen Potentialänderungen auftraten. So konnte im Nachhinein herausgefunden werden, welche Elektroden und/oder Leiterbahnen defekt waren, je nachdem, an welchen Stellen und in welcher Menge die Neurone sich anhäuferten (s. Abb. 23, D-F). Da diese hohen Zellkonzentrationen vor dem Hintergrund der Erzeugung von Einzelzell-Netzwerken unerwünscht sind, wurden auch geringere Konzentrationen eingesetzt (~ 200 Zellen/ μl , s. Abb. 23, C, G & H). Während bei den Insektenneuronen, wie bereits geschildert, nur wenige Zellen überlebten und auswuchsen, so erwies sich dies bei Hühnerneuronen als unproblematisch.

Dort konnten, wie bei den Cortexneuronen der Ratte, bereits nach einem Tag in Kultur Ausläufer und Netzwerke gefunden werden (s. Abb. 23, D, F & H).

Während es bei den Kulturen mit hohen Zelldichten zu einer starken Clusterbildung kam, blieben diese bei niedrigen Zellkonzentrationen aus (s. Abb. 23, H). Dadurch wurden auch die Zellverschiebungen nach der Synaptogenese kleiner bzw. verschwanden ganz.

3.4 Räumliche Separation durch Dielektrophorese

Unterscheiden sich die Übergangsfrequenzen von Neuronen und Gliazellen, so können sie unter Umständen durch die Wahl einer dazwischen liegenden Frequenz auf dem Chip räumlich voneinander getrennt werden.

Die Übergangsfrequenzen werden nach (1.12) und (1.13) im Wesentlichen durch die Leitfähigkeit des Mediums, den Zellradius und die Kapazität der Membran bestimmt. Da die Leitfähigkeit konstant gehalten wurde und der Zellradius nur einen Einfluss auf den Betrag, nicht aber auf die Richtung der Kraft hat, ist die Richtung der Bewegung damit nur noch abhängig von der zellspezifischen Kapazität der Membran.

Zusätzlich zu den nach der Befeldung durchgeführten Doppelfärbungen wurden Video-Aufzeichnungen durchgeführt. Diese sollten im Anschluss an die Doppelfärbung dazu dienen, mit (1.11) eine näherungsweise Bestimmung F_{DEP} von Neuronen und Gliazellen über die Geschwindigkeit der beiden Zelltypen zu ermöglichen.

Da die Geschwindigkeit proportional zur dielektrophoretischen Kraft ist, sollten dann anschließend über die Auftragung der Geschwindigkeiten über die Frequenz die Übergangsfrequenzen der beiden Zelltypen näherungsweise bestimmt und in diesem Bereich weitere Experimente durchgeführt werden.

Bei 100 und 500 Hz und 4 V_{pp} fiel in der Zeitraffer-Aufnahme ein deutlicher Konvektionsstrom auf. Die Zellen und auch Zelltrümmer wurden von den Elektroden angezogen. Die Geschwindigkeiten der Zellen waren geringer als die Geschwindigkeiten während der Befeldungen im MHz-Bereich. Außerdem wurde ein geringerer Einzugsbereich beobachtet. Der Effekt war bei 500 Hz etwas schwächer als bei 100 Hz. Die Doppelfärbung zeigte für beide Zelltypen positive Dielektrophorese (s. Abb. 24 & 25).

Bei beiden Frequenzen bedeckten weniger Zellen die Elektroden vollständig. Die meisten Zellen lagen eher an den Elektrodenkanten.

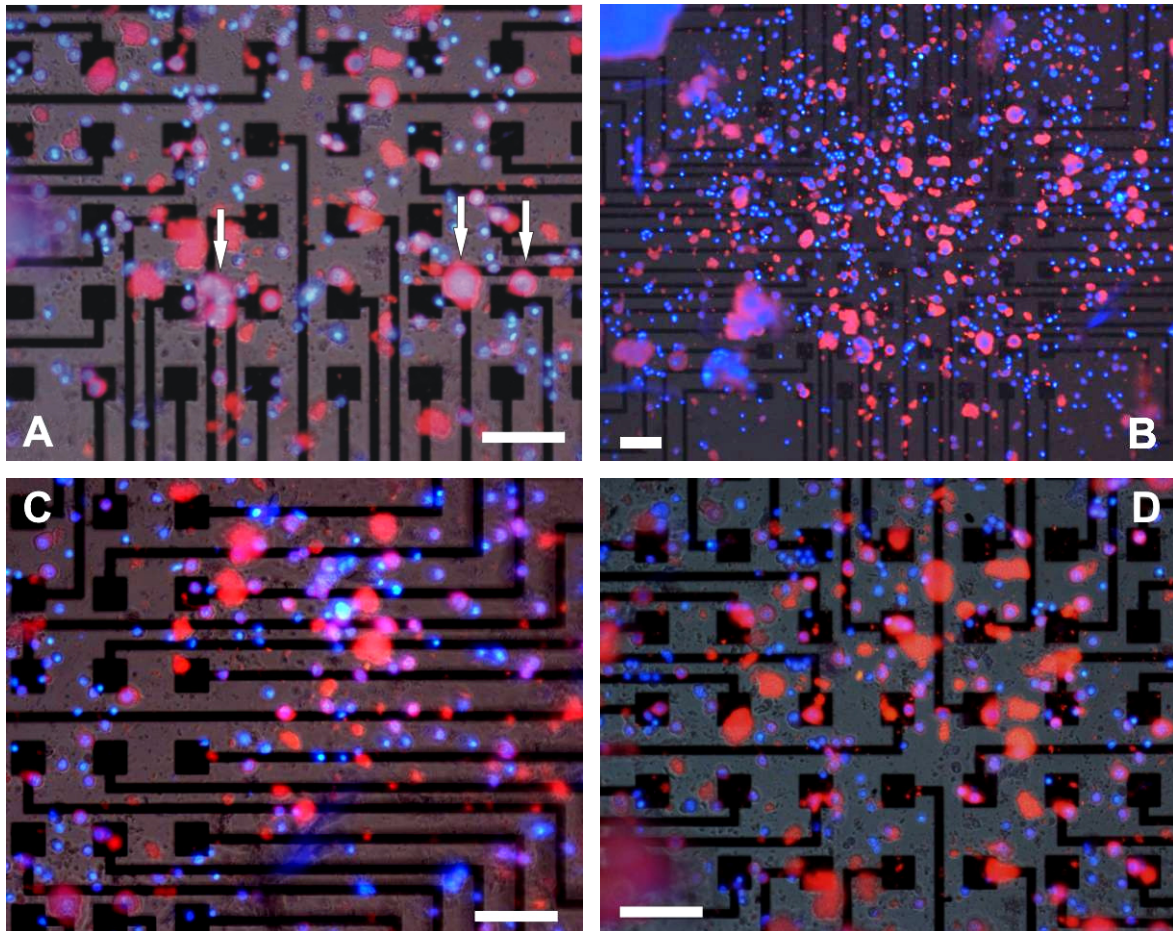


Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Überlagerung) der Doppelfärbung (α HRP-CY3/DAPI) nach Befeldung mit 100 Hz, 4 V_{pp} (t=30 min). Die Mehrzahl der intakten Zellen sind an den Feldmaxima. Zellen, deren Durchmesser größer als der Abstand zweier Feldmaxima ist, erfahren eine Kraft in beide Richtungen und liegen dementsprechend zwischen den Maxima (A, Pfeile). Elektrodenarray (A) und Leiterbahnen (C) des selben Chips nach der Befeldung. In (B) ist eine Übersicht gezeigt, in (D) der MEA-Ausschnitt eines anderen Chips nach der Befeldung. (Maßbalken: 100 μ m)

Bei Frequenzen von 1 bis 20 kHz konnte ebenfalls pDEP gefunden werden. Bei der Auswertung der Videos fand sich bei keiner Frequenz ein Hinweis darauf, dass Zellen, egal welchen Typs, von den Elektroden abgestoßen werden. Bei der Betrachtung der Doppelfärbungen konnte dieser Eindruck bestätigt werden (s. Abb. 26-28).

Bei manchen Neuronen konnte eine Verschiebung des Zellkerns in Richtung der Feldmaxima beobachtet werden (s. Abb. 27, C).

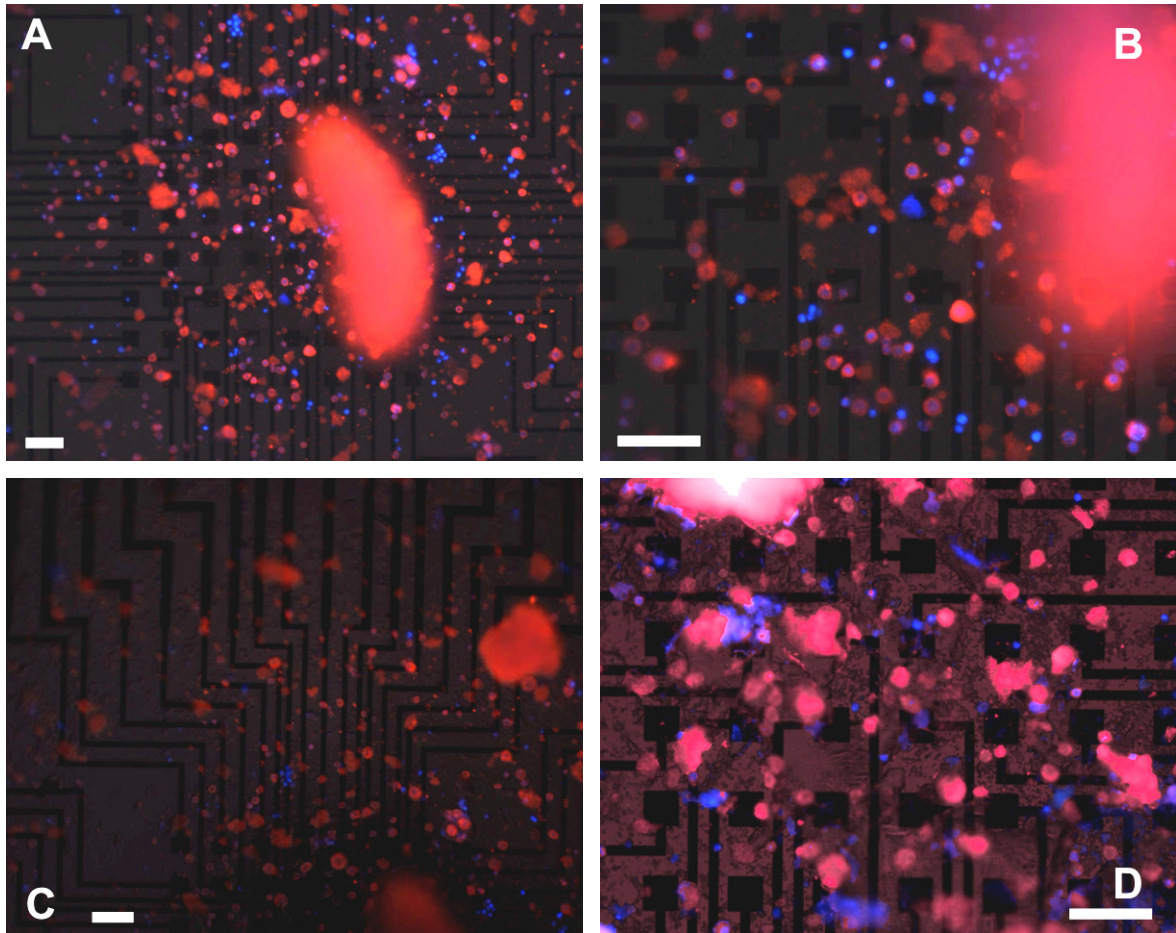


Abb. 25 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Überlagerung) der Doppelfärbung (α HRP-CY3/DAPI) nach Befeldung mit 500 Hz/4 V_{pp}. In (A) ist die durch den Konvektionsstrom hervorgerufene Zellanhäufung im Chipzentrum zu erkennen. Der Array-Bereich ist in (B) vergrößert dargestellt. Die roten Klumpen sind Neuropilreste, die sich ebenfalls im Chipzentrum ansammeln. In (C) erkennt man, dass die Zellen sich auch an den Kanten bzw. direkt auf den Leiterbahnen ansammeln. In (D) wird deutlich, dass die Stellen, an denen sich die Feldminima befinden bzw. der Einfluss mehrerer Feldmaxima auszuschließen ist, zellfrei sind. (Maßbalken: 100 μ m)

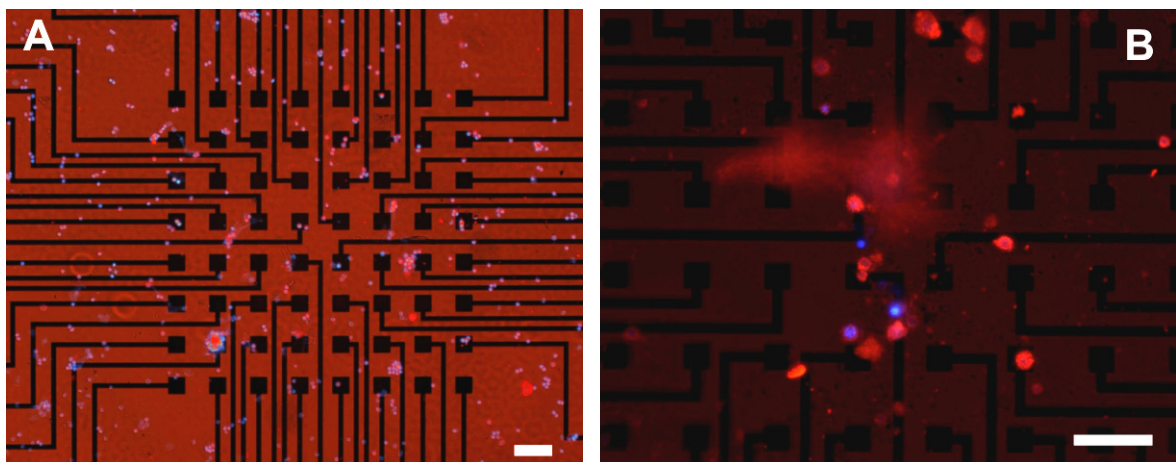


Abb. 26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Überlagerung) der Doppelfärbungen (α HRP-CY3/DAPI) nach Befeldung mit 10 kHz und 6V_{pp}. Auf beiden Bildern ist zu erkennen, dass sich die Zellen und Zellcluster (A) vermehrt an den Elektrodenkanten und Leiterbahnen ablagern. (Maßbalken: 100 μ m)

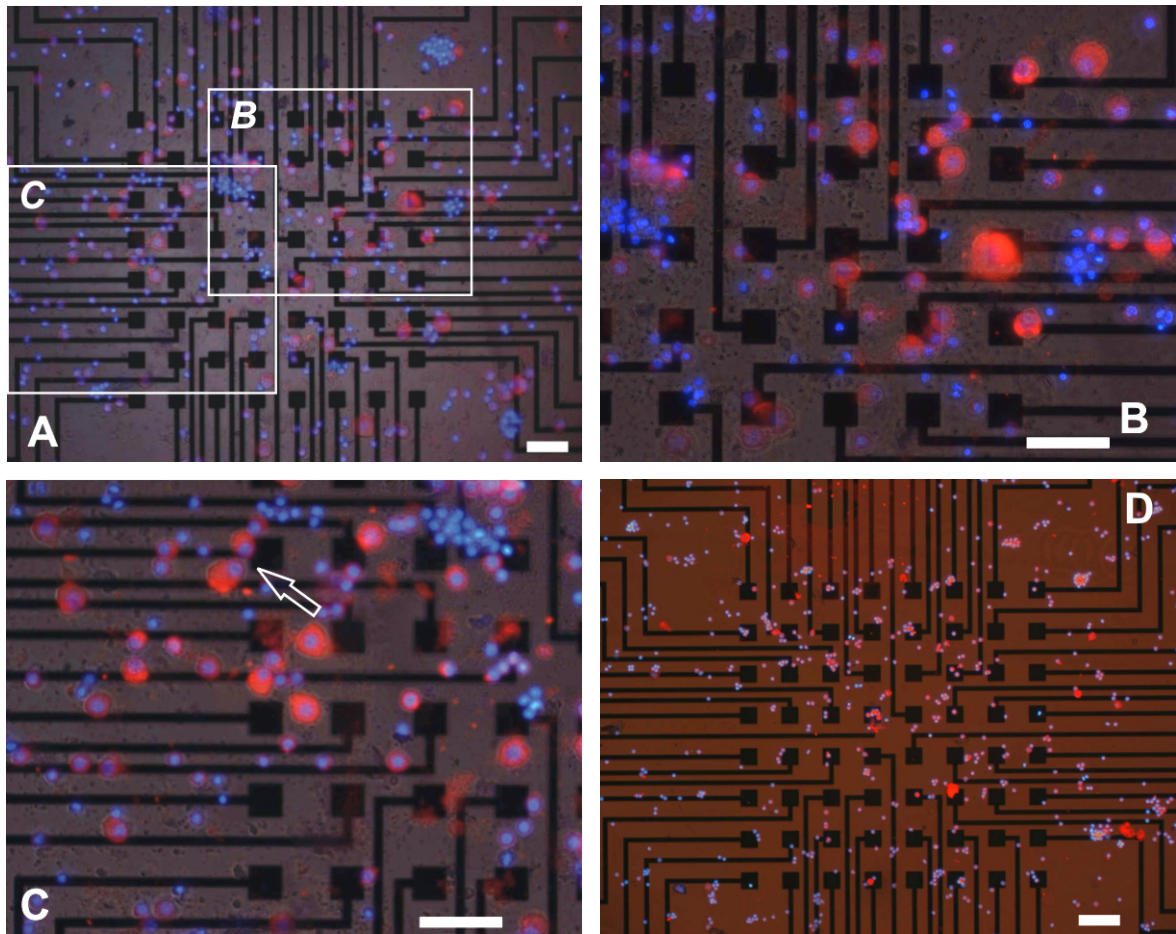


Abb. 27 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Überlagerung) von Doppelfärbungen (α HRP-CY3/DAPI) nach Befeldung mit 1kHz $5V_{pp}$ von Zellen aus *Locusta* ((A-C): Meso- und Metathorax; (D): Pilzkörper). (A) zeigt eine Übersicht, die markierten Bereiche sind in (B) und (C) vergrößert dargestellt. In (C) sieht man mehrere Neurone, deren Zellkern in Richtung des Feldmaximums verschoben ist. Auf allen Bildern ist eine deutliche Positionierung an den Feldmaxima zu erkennen. (Maßbalken: 100 μ m)

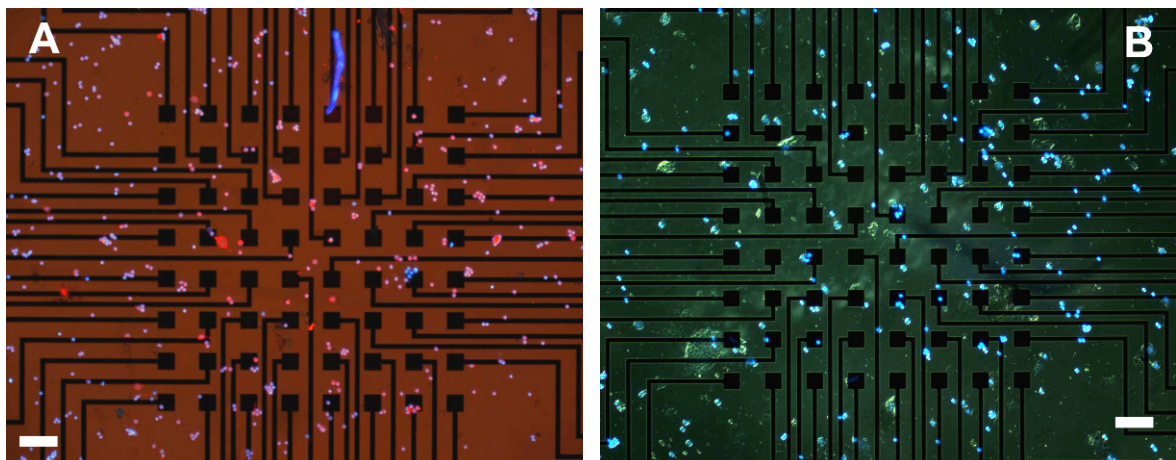


Abb. 28 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von (A) Doppelfärbung (α HRP-CY3/DAPI, Überlagerung) und DAPI-Färbung (B) nach Befeldung mit 20 kHz $7V_{pp}$. Es finden sich mehr Zellen an den Elektroden und Leiterbahnen (positive Dielektrophorese). (Maßbalken: 100 μ m)

Auch für die übrigen getesteten Frequenzen konnte keine negative Dielektrophorese gezeigt werden.

Da damit auch keine Übergangsfrequenz gefunden werden kann, wurde auf die Bestimmung der Positionierungsgeschwindigkeiten verzichtet.

3.5 Wanderwellendiektrophorese

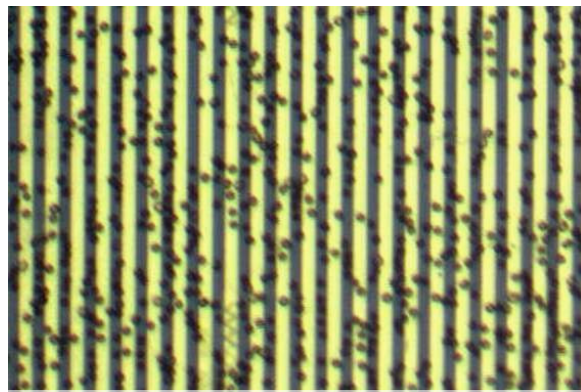
Da die ersten Prototypen der Dielektrophorese-Kammern erst gegen Ende der Arbeit fertiggestellt werden konnten, wurden zunächst Experimente mit humanen Blutzellen durchgeführt, um zu testen, ob die Chips funktionieren und die Kammer geeignet ist.

Bei keiner der gewählten Frequenzen und Medienleitfähigkeiten konnte ein dauerhafter Transport von Zellen beobachtet werden. Wurde zunächst das Feld angelegt und die Zellsuspension anschließend injiziert, konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen dicht über den Elektroden (ca. 15-30 μm) kurzfristig und abhängig von der Frequenz des Feldes in oder entgegen der Richtung des Wanderfeldes bewegten und über den Elektrodenkanten horizontal beschleunigt bzw. abgebremst wurden. Die Wanderungsgeschwindigkeiten lagen dabei zwischen 1 und 20 $\mu\text{m/s}$. Die Geschwindigkeiten wurden im Laufe weniger Minuten kleiner, und es konnten keine erkennbaren Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen gefunden werden. Nach maximal 5 Minuten waren alle Zellen auf die Chipoberfläche abgesunken.

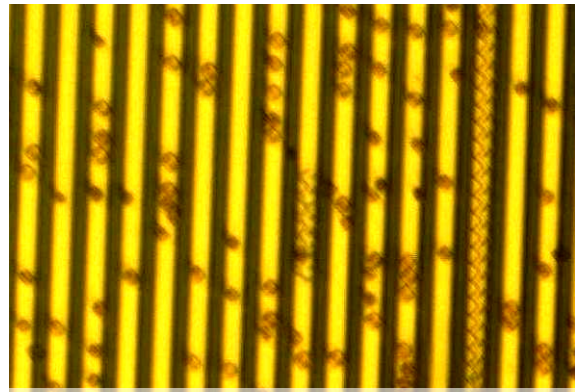
In der direkten Nähe der Elektrodenkanten ($d < 10 \mu\text{m}$) konnte bei keiner der verwendeten Frequenzen unter dem Mikroskop eine deutliche vertikale Beschleunigung der Zellen beobachtet werden. Demzufolge konnte auch keine Levitation der Zellen gefunden werden.

Wurden die Zellen dann über einen längeren Zeitraum (10 - 30 min) dem Feld ausgesetzt, konnte eine klare räumliche Verteilung gefunden werden (s. Abb. 29):

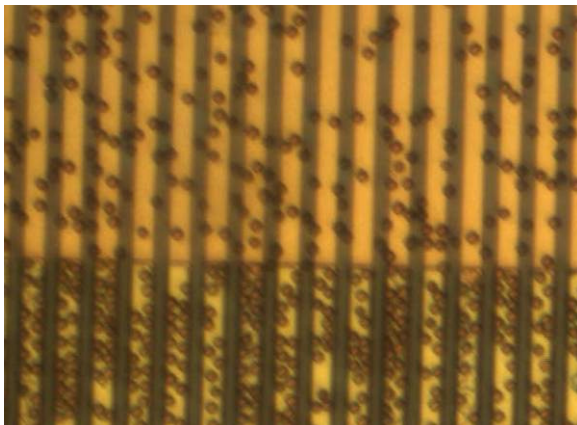
Bei geringer Leitfähigkeit des Mediums (1,5 mS/cm) lagen, unabhängig vom Waversubstrat (Glas bzw. Silizium) und der gewählten Frequenz, mehr als 90% der Zellen auf den Elektroden (s. Abb. 29, rechte Seite), was ein Hinweis auf positive Dielektrophorese ist.



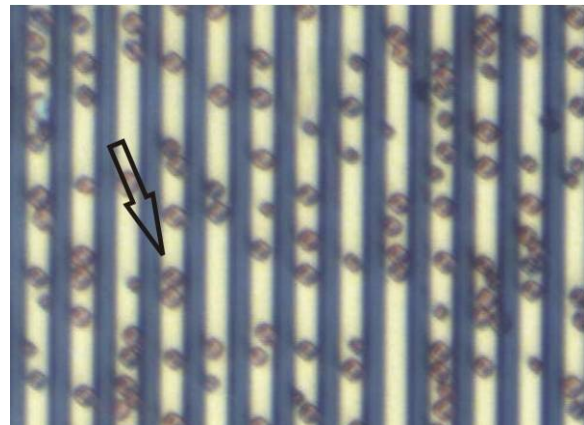
(A) 500 Hz / 2 V_{pp} / 15 mS/cm / 30 min



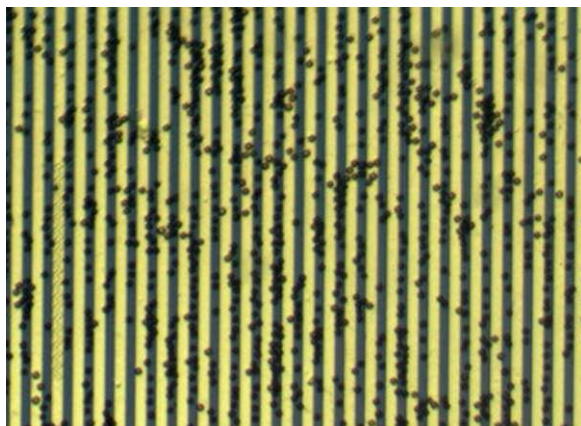
(B) 5 kHz / 2 V_{pp} / 1,5 mS/cm / 30 min



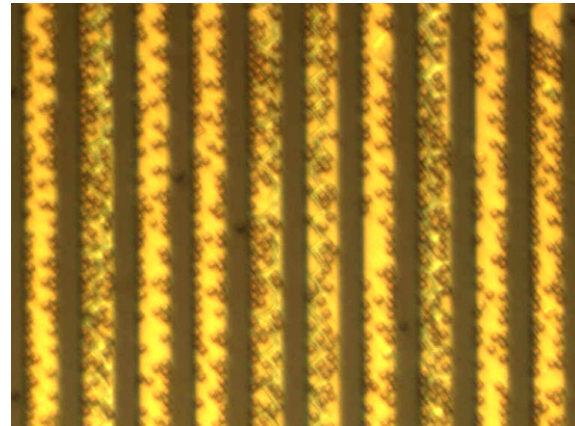
(C) 500 kHz / 2 V_{pp} / 15 mS/cm / 60 min



(D) 3 MHz / 10 V_{pp} / 1,5 mS/cm / 60 min



(E) 5 MHz / 10 V_{pp} / 15 mS/cm / 90 min



(F) 20 MHz / 10 V_{pp} / 1,5 mS/cm / 2 h

Abb. 29 Räumliche Verteilungen humaner Blutzellen auf verschiedenen Chiptypen nach der Applikation elektrischer Wanderfelder mit unterschiedlicher Frequenz, Amplitude und Dauer. Unter Verwendung eines Mediums mit hoher Leitfähigkeit (links) zeigte sich im unteren Frequenzbereich (500 Hz) negative, im mittleren (500 kHz) positive und im oberen (5 MHz) wiederum negative DEP. Im Randbereich des Chips, bei dem der ONO-Stapel nicht geöffnet wurde (C, oben), erkennt man, verglichen mit den freigelegten Elektroden, eine unregelmäßigere Zellverteilung. Bei einem Medium mit geringer Leitfähigkeit (rechts) fand sich bei keiner der getesteten Frequenzen eine Zellverteilung, die auf negative DEP hindeutet. Während die Erythrozyten (Pfeil) bei den Chips mit 10 µm Breite bei positiver DEP mittig auf den Elektroden liegen (z.B. bei B & C), finden sich andere, kleinere Blutzellen meist an bzw. auf den Elektrodenkanten. Sind die Elektroden breiter als die Zellen (F), ordnen sich die Erythrozyten deutlicher an den Kanten an. (Auflichtmikroskop, die Kontrastunterschiede sind auf die unterschiedlichen Waversubstrate zurückzuführen (A, D & E: Silizium, Rest: Glas).)

Wurde die Leitfähigkeit des Mediums um den Faktor 10 auf 15 mS/cm erhöht, so wurde bei niedrigen Frequenzen bis etwa 10 kHz und oberhalb etwa 1 MHz negative Dielektrophorese beobachtet (s. Abb. 29, A, C & E). Bei Frequenzen im dazwischen liegenden Bereich zeigte sich positive DEP.

3.6 Galvanotropismus

3.6.1 Galvanotropismus in der galvanischen Kammer

Um geeignete Parameter (Spannung/Stromstärke/Dauer) für die Befeldung zu ermitteln, wurden diese Parameter zu Beginn der Untersuchungen variiert (in Zusammenarbeit mit Hr. Buck im Rahmen eines Forschungspraktikums).

Bei der Verwendung hoher Spannungen (> 150 V) und/oder Ströme (> 5 mA) traten verschiedene Probleme auf. Es kam während der Befeldung zu einer starken Hydro- bzw. Elektrolyse an den Ag/AgCl-Elektroden. Die entstehenden Protonen und Hydroxyd-Ionen wanderten durch das Feld und, auf Grund des Konzentrationsgradienten, durch die Salzbrücken in die Befeldungskammer. Dort konnten z. B. nach der Befeldung mit 250 V und 11,8 mA pH-Werte von 4-5 (Anoden-Seite) bzw. 11 (Kathoden-Seite) gemessen werden. Daher wurde die Pufferkonzentration verdreifacht, wodurch sich die pH-Verschiebungen reduzieren ließen.

Da sich beim Einsatz solch hoher Spannungen/Ströme der Widerstand der Salzbrücken auf der Kathodenseite extrem änderte (vor der Befeldung meist um 17,5 k Ω , nach 6 h Befeldung mit 284 V und 15 mA auf 102 k Ω), wurde daraus geschlossen, dass Ionen aus den Salzbrücken elektrophoretisch entfernt wurden. Die Widerstände auf der Anodenseite änderten sich um 5-8 k Ω .

Da dies neben der Erwärmung der Salzbrücken und des Mediums auch Konzentrations- und Osmolaritätsgradienten zwischen den einzelnen Medienbecken der Befeldungskammer bedeutete, wurden die entsprechenden Spannungen und Ströme so weit wie möglich reduziert (80 V/5 mA). Nach 3 h Befeldung war dann zwar immer noch eine Erhöhung des Widerstandes um den Faktor 2 auf der Kathodenseite zu messen, aber der pH blieb konstant und die Erwärmung der

Salzbrücken war nicht mehr fühlbar. Eine weitere Reduktion konnte nicht erreicht werden, ohne die entsprechenden Feldstärken für die Befeldung zu unterschreiten.

Die Viabilität der Zellen war sehr gering. Nach der Befeldung mit den hohen Spannungen und Feldstärken waren viele Zellen verschwunden oder zerstört.

Mit den reduzierten Parametern zeigten die Ausläufer einiger Zellen in Richtung der Kathode (s. Abb. 30, unten), aber es wurde keine eindeutige Tendenz gefunden. Nicht selten wurden „Ringelschwänzchenausläufer“ gefunden, die unter Kulturbedingungen nicht vorkommen (s. Abb. 30, oben).

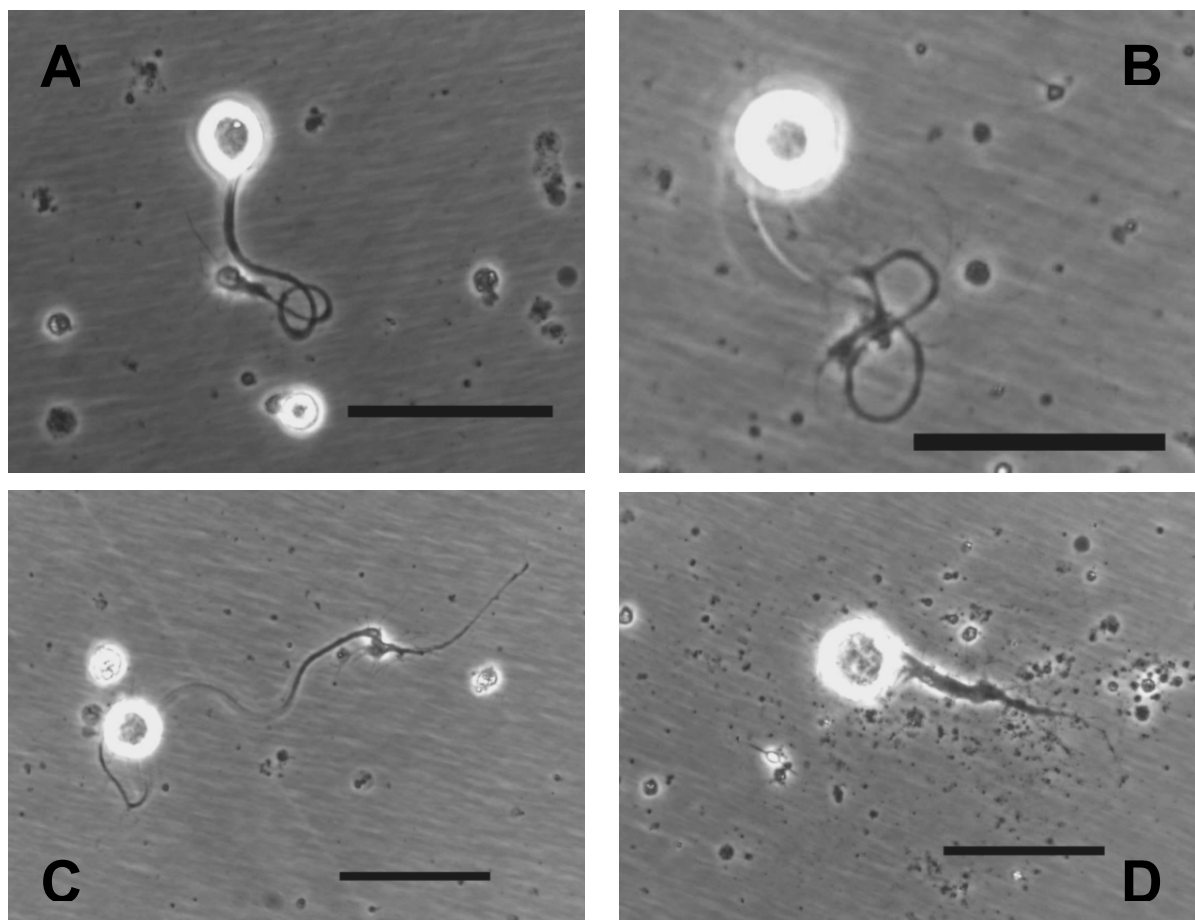


Abb. 30 Phasenkontrastaufnahmen von ausgewachsenen Neuronen, die im Coverslip-Sandwich für 6 h mit 80 V und 5 mA befeldet wurden. Die Kathode befand sich auf der rechten Seite. In (A) und (B) sind Neurone mit „Ringelschwänzchenausläufern“ gezeigt. Die Axone in (C) und (D) weisen in Richtung der Kathode. (Maßbalken: 50 µm)

3.6.2 Galvanotropismus auf MEAs nach mechanischer Positionierung

Auf Grund der genannten Probleme hinsichtlich der Viabilität und Adhäsion der mit der Saugkapillare positionierten Neurone (s. 3.1.3) wurden nur bei wenigen Experimenten ausgewachsene Neurone nach der Befeldung gefunden. Es wurden auf 5 Chips jeweils 8 Neurone zwischen den Stimulationselektroden positioniert. Einige Experimente wurden von Hr. Stibany (Forschungspraktikant) durchgeführt.

Sofern die Neurone Ausläufer bildeten und einen Tag in Kultur überlebten, wurden relativ häufig (4 von 6 ausgewachsenen Neuronen) Neurone gefunden, deren Ausläufer in Richtung der Kathode wuchsen (s. Abb. 31) oder deren Ausläufer entlang oder in Richtung von Leiterbahnen wuchsen.

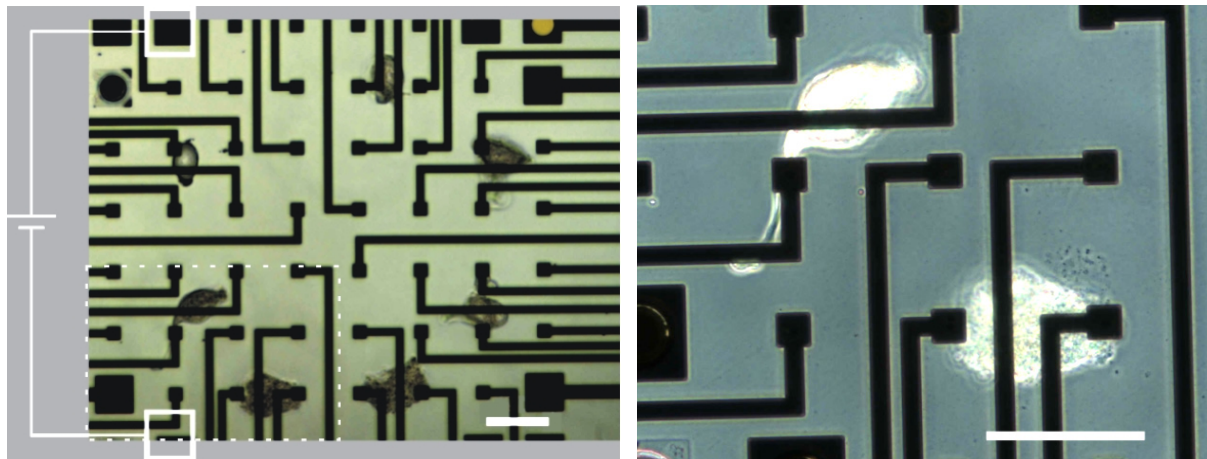


Abb. 31 Galvanotropismus nach Positionierung mit Saugkapillare (Maßbalken: 100 μm). Links: Übersicht über den gesamten MEA (auf der rechten MEA-Seite wurde mit der gleichen Polarität über die Stimulationselektroden befeldet). Die Mehrzahl der Zellen ist nach einem Tag in Kultur nicht mehr intakt. Der markierte Bereich ist rechts vergrößert dargestellt. Man erkennt ein in Richtung der Kathode auswachsendendes Neuron und eine tote Zelle.

Erschwerend kam hinzu, dass viele Kulturen durch die lange Zeit in unsteriler Umgebung während der Positionierung kontaminiert wurden.

Für eine statistische Auswertung sind diese Zahlen zu gering und der Aufwand, insbesondere vor dem Hintergrund der geringen Ausbeute an vitalen Neuronen, zu groß, weshalb die weiteren Untersuchungen nach der Positionierung durch Dielektrophorese durchgeführt wurden.

3.6.3 Galvanotropismus nach Positionierung durch Dielektrophorese

Da die Viabilität der Zellen auf den MEAs stark reduziert war, wurde zunächst versucht, das Auswachsen der Neurite direkt nach der dielektrophoretischen Positionierung über das Gleichfeld zu steuern. Dazu wurde zwischen den Elektroden (s. Abb. 14, Abstand 400 μm) eine Spannung von ± 1 oder 2 V angelegt.

Es erwies sich als schwierig, die Zellkonzentration der Zellsuspension vor der DEP-Positionierung so einzustellen, dass zwar alle Elektroden mit Zellen belegt wurden, aber nicht so viele Zellen vorhanden sind, die Zwischenräume aber möglichst zellfrei blieben. Dazu mussten so hohe Konzentrationen verwendet werden, dass meist auch viel Debris in der Suspension vorhanden war, der nach der Positionierung zwischen den Elektroden lag, was die Auswertung und die Erzeugung eines näherungsweise homogenen Feldes zwischen den Elektroden erschwerte. Wurden die Konzentrationen heruntergesetzt, so waren meist nur wenige (2 bis 4 von 10) Elektroden mit Zellen besetzt.

Wurde dann unter dem Mikroskop (also bei Raumtemperatur) befeldet, konnte direkt während der Befeldung kein Auswachsen der Neurone beobachtet werden. Auf den Kontroll-MEAs ohne Gleichspannung (mit oder ohne vorherige DEP) wuchsen ebenfalls keine Neurone direkt nach der Positionierung aus. Primärneurite und Zellen, die noch nicht adhärirt waren, wurden durch das Gleichfeld in Richtung der Elektroden gezogen.

Daher wurde am folgenden Tag (oder an DIV2) ausgewertet. Hier fanden sich hin und wieder Neurone mit Ausläufern, die in Richtung der Elektroden zeigten. Aber auch hier gab es weder hinsichtlich der Polarität noch der Richtungspräferenz eindeutige Befunde (s. Abb. 32).

Längere Befeldungszeiten konnten wegen der Verdunstung des Mediums und der damit einhergehenden Osmolaritätsveränderungen nicht untersucht werden.

Bei den anschließend durchgeführten Befeldungen im Inkubator zeigte sich ein ähnliches Bild. Zwar wuchsen die Zellen scheinbar etwas besser aus, eindeutige Belege für den Galvanotropismus bei den Insektenneuronen konnten allerdings nicht gefunden werden (s. Abb. 33).

Da von anderen Autoren, die mit Vertebratenzellen und Neuronen aus *Xenopus* gearbeitet hatten, gezeigt wurde, dass Neurotrophine den galvanotropischen Effekt verstärken (Review: McCaig *et al*, 2005), wurden verschiedene Additive getestet (z. B. Dotterproteine aus *Locusta*-Eiern, 20-Hydroxy-Ecdyson, NT-3, NGF). Die Zugabe dieser Additive bewirkte jedoch keinen erkennbaren Effekt.

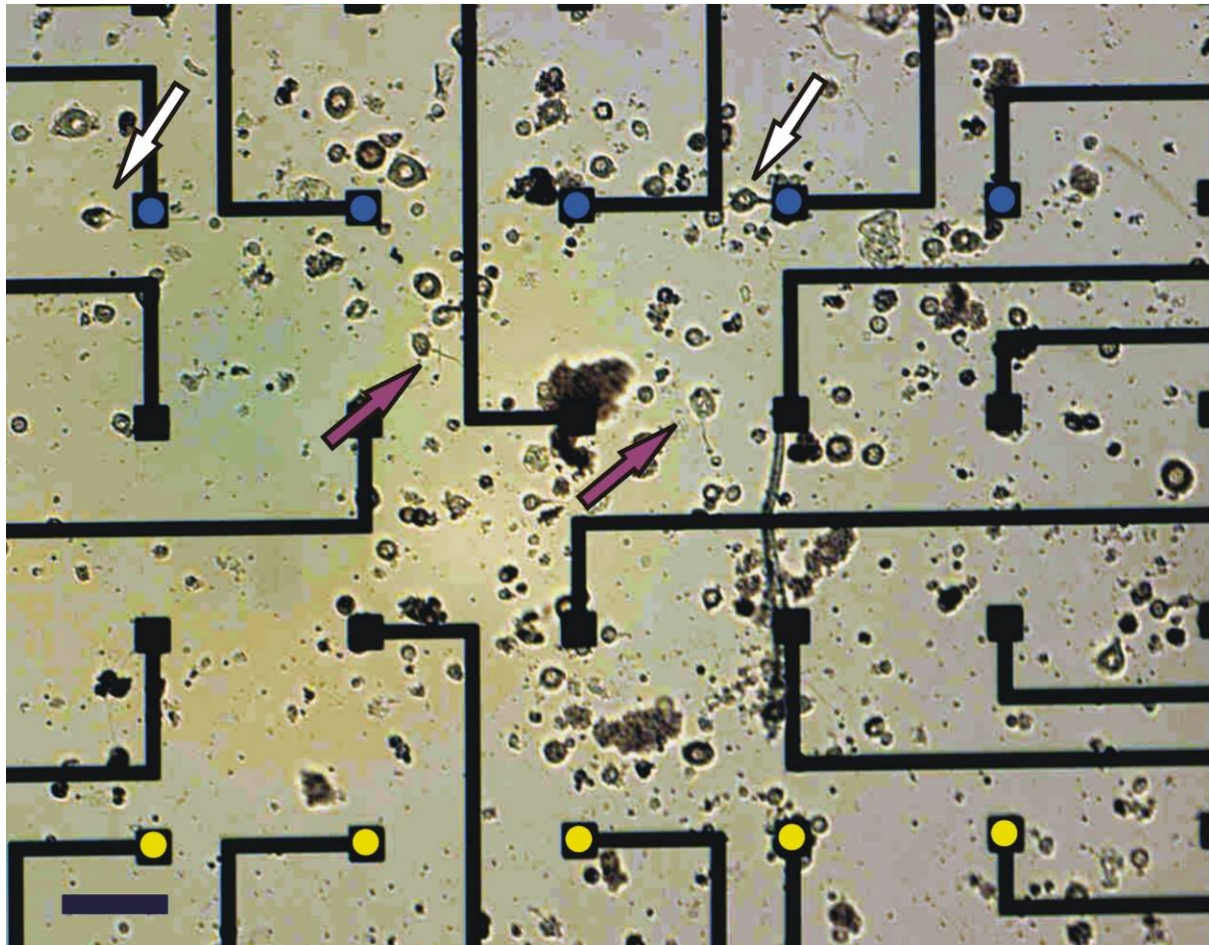


Abb. 32 Mit DEP positionierte Zellen aus dem Metathorakalganglion (*Locusta*), die für 2 Stunden einem Gleichfeld (blau markierte Elektroden: -1 V, gelb: Masse) ausgesetzt wurden an DIV2. Wenige Neurone sind ausgewachsen, viele Zellen sind nicht mehr intakt. Die ausgewachsenen Neurone wachsen teilweise auf die Kathodenelektroden zu (weiße Pfeile), andere Neurone wachsen in entgegengesetzter oder feldunabhängiger Richtung (violette Pfeile). (Maßbalken 100 µm)

Um herauszufinden, ob ein systematischer Fehler (z. B. zu kleine Feldstärken) vorliegt, wurden ergänzend Versuche mit embryonalen Hühnerneuronen aus dem Telencephalon durchgeführt.

Da Jaffe und Poo (1979) gezeigt haben, dass Neurone aus dem Dorsalwurzelganglion des Huhns verstärkt in Richtung der Kathode auswachsen, wurde vermutet,

dass vielleicht auch Neurone aus dem Telencephalon eine galvanotropische Reaktion zeigen.

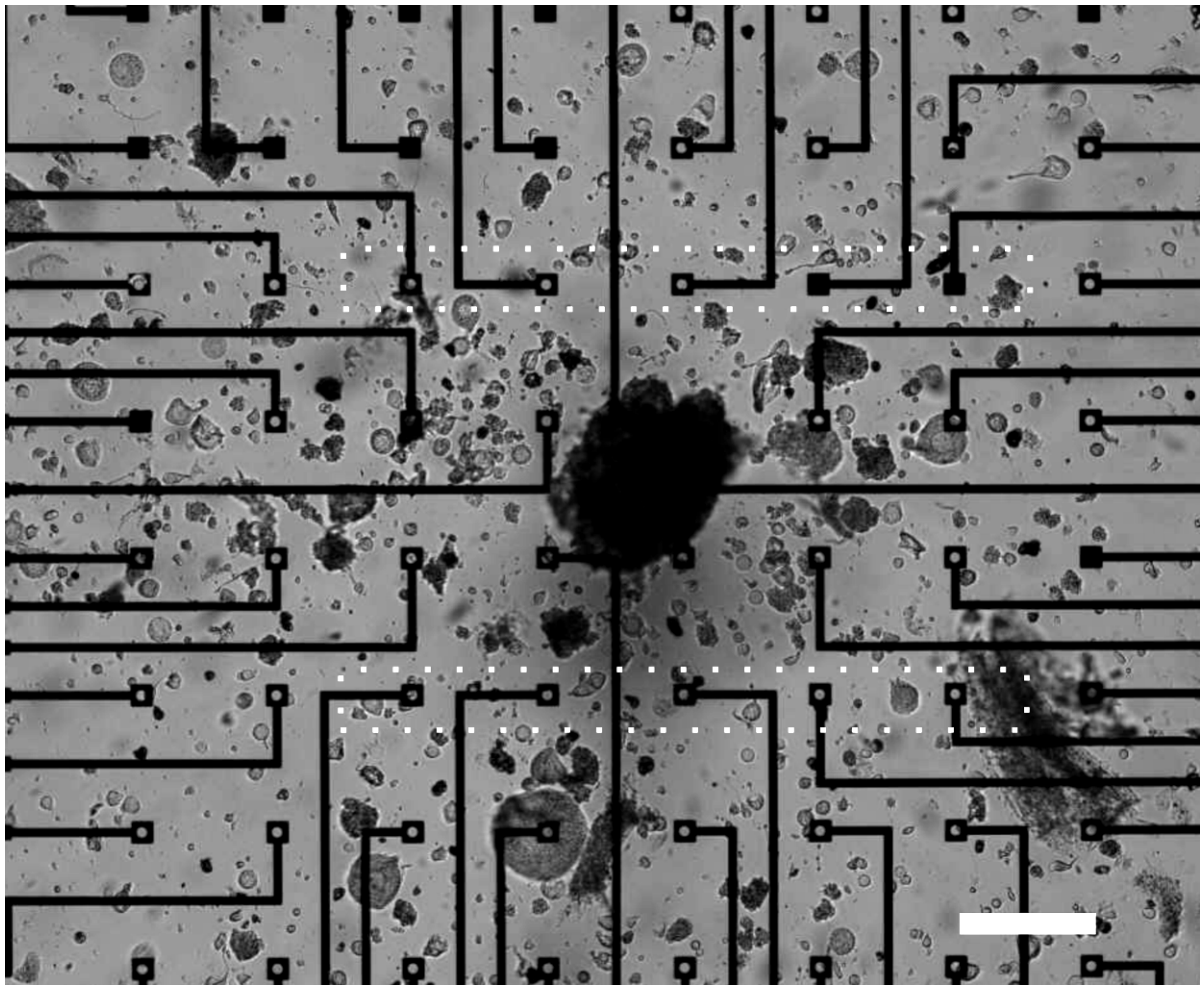


Abb. 33 Mit DEP positionierte Zellen aus dem Metathorakalganglion (*Locusta*), die im Inkubator einem Gleichfeld ausgesetzt wurden (Dauer: 2 h; markierte Elektroden: oben -1 V, unten Masse, Aufnahme an DIV 2). Hier wurden zuvor alle Elektroden zur Positionierung eingesetzt. Man sieht, dass die Positionierung trotz der schadhaften Elektroden (bei den Elektroden mit den Löchern fehlt die Elektroden-Goldschicht) funktioniert hat, da sich dort gehäuft Zellen finden. Durch den Konvektionsstrom ist in der Mitte des Arrays viel Debris zu finden. Scheinbar wachsen mehr Neurone in der Region aus, in der die Elektroden mit dem negativen Potential beaufschlagt wurden. Eine eindeutige Tendenz des Auswachsens in Richtung der Elektroden wird aber nicht ersichtlich. (Maßbalken 200 μm)

Da die Zellen auf den MEAs bei zu hoher Zelldichte zur Clusterbildung neigen (s. Abb. 34), wurden für die Experimente geringe Zellkonzentrationen verwendet (~ 200 Zellen/ μl , s. Abb. 35). Da sich die Cluster während ihrer Bildung und Verschaltung bewegen und das Axonwachstum im Inkubator nicht beobachtet werden konnte, war es nicht möglich, klare Aussagen hinsichtlich der Richtung des Axonwachstums zu machen, auch wenn einige Axone in Richtung der aktiven Elektroden auswuchsen.

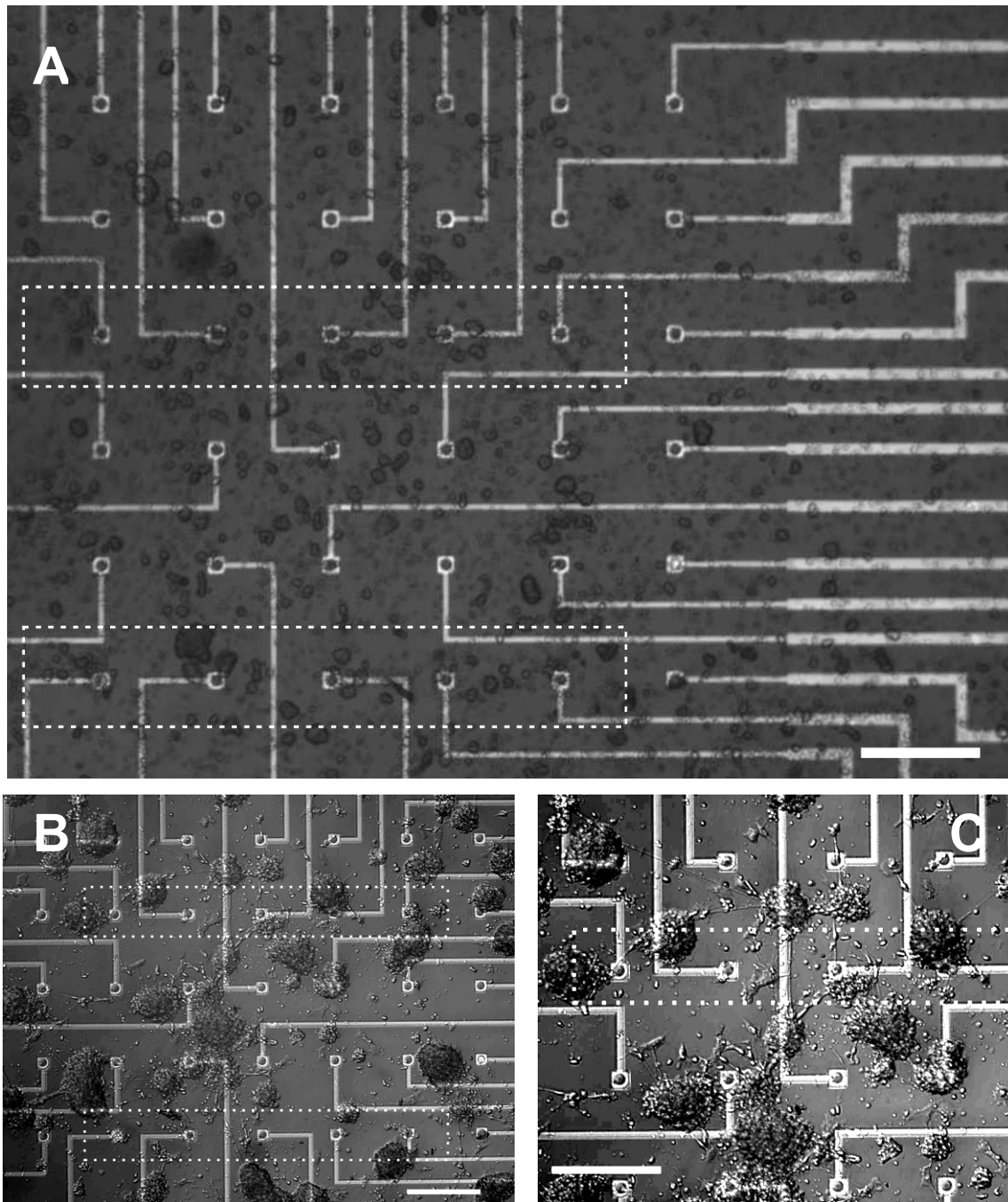


Abb. 34 Mit 5 MHz (10 V_{pp}, 15 min) in Saccharose-Lösung mit pDEP positionierte Zellen aus dem Telencephalon von Hühnerembryonen (E8, 5000 Zellen/μl). (A): Direkt nach der Positionierung ist erkennbar, dass auf den aktiven Elektroden (gepunktete Linie) und den zugehörigen Leiterbahnen mehr Zellen liegen (erscheinen dunkler). Nach einem Tag in Kultur wurde erneut für 90 min mit 1 V DC befördert. Einen Tag nach der DC-Befeldung (DIV2) ist erkennbar, dass die Neurone Cluster gebildet haben, die nicht mehr auf den Elektroden liegen (B). In der Ausschnittsvergrößerung (C) sind Axone erkennbar, die von bzw. zu den Elektroden laufen, zwischen denen das Gleichfeld anlag. (Maßbalken: 200 μm)

Bei den wenigen Experimenten (n=5), die unter diesen Bedingungen durchgeführt wurden, konnte allerdings trotz Zugabe von NGF und NT-3 kein deutlich bevorzugtes Wachstum in Richtung der Kathode gefunden werden.

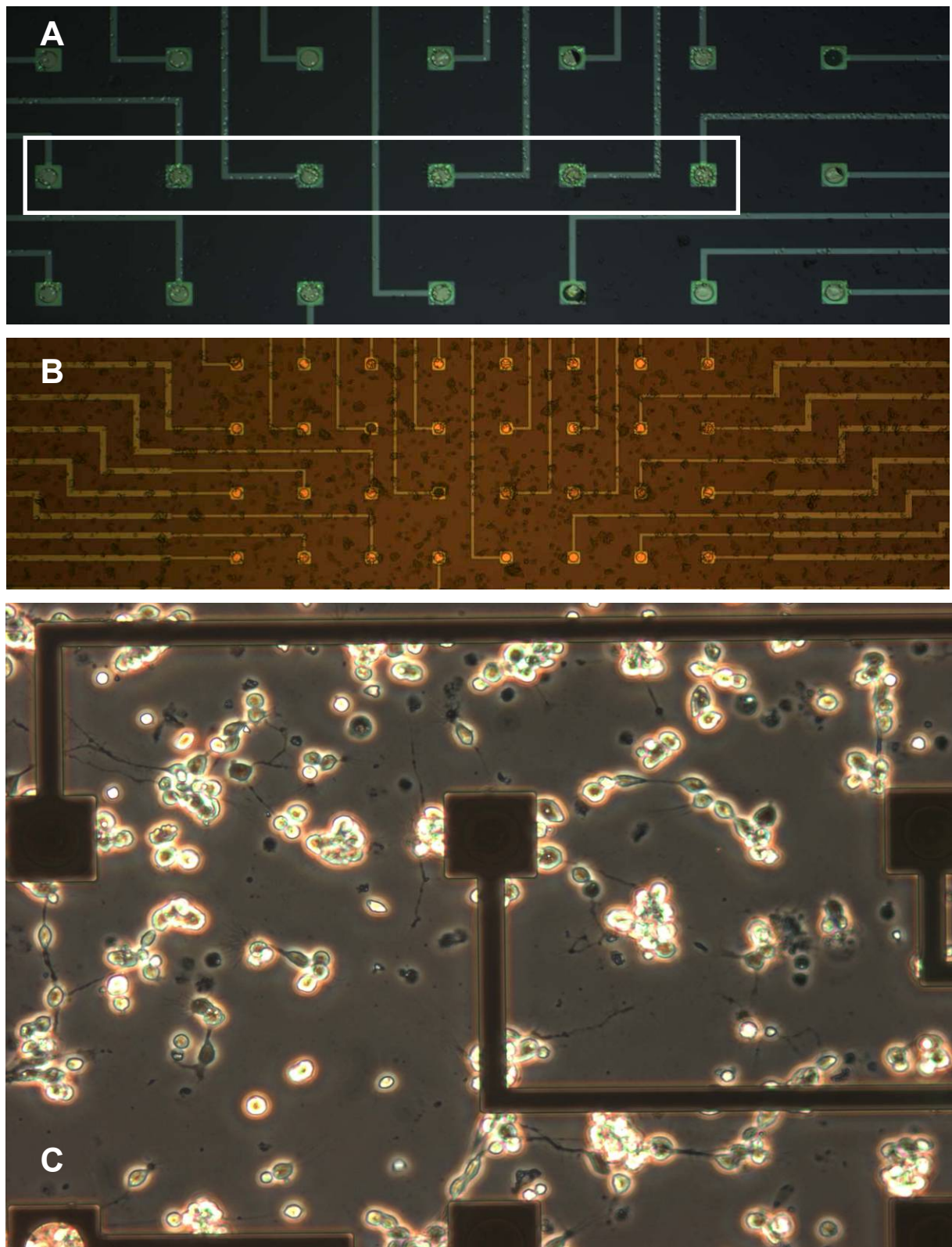


Abb. 35 Mit 5 MHz (10 V_{pp} , 15 min) in Saccharose-Lösung mit pDEP positionierte Zellen aus dem Telencephalon von Hühnerembryonen (E6, $\sim 200\text{ Zellen}/\mu\text{l}$). Direkt nach der Positionierung (A) ist erkennbar, dass auf den aktiven Elektroden (weißer Rahmen) und den zugehörigen Leiterbahnen mehr Zellen liegen. Nach einem Tag in Kultur (B) ist erkennbar, dass die Clusterbildung bei geringer Zelldichte in geringerem Ausmaß eintritt. Nach erneuter Befeldung für 90 min mit 1 V DC im Inkubator sieht man nach einem Tag (DIV2) Ausläufer, die von bzw. zu den Elektroden laufen, zwischen denen das Gleichfeld anlag (C). Eine deutliche Vorzugsrichtung ist allerdings nicht erkennbar. (Elektrodenabstand: $200\text{ }\mu\text{m}$)

4. Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass elementare Basisschritte zum Aufbau definierter neuronaler Netzwerke, wie die Biofunktionalisierung der MEA-Oberflächen zur gezielten Adhäsion von Zellen und zur Beschichtung zwecks Axonguiding und die Positionierung von Neuronen auf den Elektroden, durch den Einsatz von elektrischen Feldern gelöst werden können.

In der Natur werden alle Strukturen durch elektromagnetische Wechselwirkungen aufgebaut, und da die Übertragung dieses Prinzips auf die Musterbildung auf MEAs eine prinzipiell einfache, multifunktionale, kostengünstige und integrale Lösung darstellt, kann sie als bionischer Lösungsansatz angesehen werden.

Die Biofunktionalisierung von MEAs durch Elektrophorese konnte für verschiedene Proteine oder Polypeptide gezeigt werden. Es konnte zumindest qualitativ gezeigt werden, dass diese auch nach der Applikation von Wechselfeldern noch vorhanden sind. Dieser methodische Ansatz wurde bisher noch nicht beschrieben und stellt prinzipiell eine schnelle und einfache Alternative zum μ CP dar.

Es konnte für eine Vielzahl von Zellen (Ratten: Cortex, Huhn: Tectum und Telencephalon, *Locusta*: Pilzkörper und Meso- und Metathorakalganglion, Grille: Terminalganglion) gezeigt werden, dass sich diese durch Dielektrophorese gezielt auf Elektroden positionieren lassen. Diese Methode wurde von anderen Autoren für Zellen anderer Gewebe bereits beschrieben. Insbesondere die Positionierung von Insektenneuronen konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die räumliche Separation von Gliazellen und Neuronen auf den MEAs konnte nicht geleistet werden.

Es konnten zwar qualitative Hinweise auf eine galvanotropische Reaktion der Insektenneurone gefunden werden, aber ein fundierter Beweis konnte nicht erbracht werden. Doch wurden teilweise die Voraussetzungen dafür geschaffen, durch die Positionierung von Nervenzellen auf MEAs gezielte, reproduzierbare und standardisierte Untersuchungen hierzu durchzuführen.

4.1 Primärzellkultur

4.1.1 Thorakalganglien

Das Primärzellkulturprotokoll für die Meso- und Metathorakalganglienzellen wurde von Weigel (2006) übernommen. Eine Diskussion der verwendeten Parameter findet sich dort. Bei der morphologischen und elektrophysiologischen Basis-Charakterisierung konnten dessen Ergebnisse bestätigt werden.

4.1.2 Hirnneurone/Kenyonzellen

Für die Kenyon-Zellen und die nach der Entnahme der Kenyon-Zellen verbleibenden restlichen Hirn-Zellen erwies sich dieses Protokoll ebenfalls als brauchbar, da ein Großteil der Zellen die ersten Tage in Kultur überlebte und viele Zellen Ausläufer bildeten.

Während die Kenyon-Zellen *in situ* morphologisch ausschließlich pseudounipolar sind, konnten unipolare Zellen in Kultur nur selten gefunden werden. Dieser Befund ist aber vergleichbar mit den Primärzellkulturen aus *Acheta domesticus* (Cayre *et al*, 1998).

Dass von den 60000-100000 Neuronen der Pilzkörper in Kultur nur etwa 5000-6000 zu finden waren, könnte an einer zu kurzen enzymatischen Behandlung liegen. Die Neurone sind in den Pilzkörpern sehr dicht gepackt, und so bedarf es vielleicht einer längeren Einwirkzeit, um die extrazelluläre Matrix im Inneren der Präparate anzudauen. Die verbleibenden Zellcluster sind vermutlich während der Trituration, der Resuspendierung oder beim Ausplattieren in der Pipette hängengelieben oder sie wurden gar nicht erst aufgenommen.

Vergleicht man die Ausbeute jedoch mit der enzymfreien Dissoziations-Methode von Cayre *et al* (1998 & 1999), bei der die Pilzkörper aus 20 Hirnen von *Acheta domesticus* gepoolt wurden, so ist die Ausbeute unter Verwendung von Dispase größer. Von den etwa 2×10^7 Neuronen verblieben dort lediglich 8000 in der Zellsuspension. Die Ausbeute bei enzymatischer Dissoziation ist um den Faktor 20 besser. In dieser Arbeit wird auch darauf hingewiesen, dass eine Enzymbehandlung (Collagenase und Trypsin) die Viabilität der Zellen stark reduziert. Vergleicht man die

Viabilitäten der Thorakalganglienneurone (Weigel, 2006) und der Kenyonzellen nach der Dispase-Behandlung, wurden bei letzteren etwas geringere Viabilitäten und Auswachsrate gefunden (je etwa 10%). Allerdings liegen die Werte immer noch innerhalb der von Weigel angegebenen Standardabweichungen. Ein Vergleich der Daten mit denen von Cayre *et al* (1998) zeigt, dass die Viabilitäten nicht nennenswert negativ beeinflusst werden. Daneben scheint die hier verwendete Dissoziationsmethode eine effizientere Methode zur Zellvereinzelung darzustellen, da in Kultur weniger Zellcluster auftreten.

Auf Grund der kleinen Zellsomata waren die elektrophysiologischen Ableitungen unter Verwendung intrazellulärer Arbeitstechniken unter dem Binokular schwierig durchzuführen und beschränkten sich auf relativ wenige Zellen. Wegen dieser geringen Probenanzahl ergibt sich daher nicht zwangsläufig der Schluss, dass in Kultur keine Soma-Spiker vorkommen. Da sich in der Literatur keine Angaben zu absoluten Ruhepotentialen, weder *in situ* noch *in vitro*, finden, ist es schwierig, nur mittels dieses Parameters die Daten zu bewerten. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ging es aber im Wesentlichen nicht um eine elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen, sondern nur um eine Möglichkeit, an höhere Zelldichten zu gelangen, wofür diese „Minimal“-Charakterisierung ausreichend erschien.

4.1.3 Kulturen auf MEAs

Als großes Problem bei der Kultivierung von Neuronen aus Insekten (Thorakalganglion, Pilzkörper, Hirn von *Locusta*) auf MEAs erwies sich die geringe Viabilität. Dies wurde auch schon von Weigel (2006) bei der Kultivierung auf FETs und MEAs berichtet. Aber bei Neuronen aus dem Terminalganglion der Grille (*Gryllus bimaculatus*) scheint dieses Problem aufzutreten (P. Schulte, FZ Jülich, persönliche Mitteilung). Bisher gibt es nur Hypothesen, worauf dies zurückzuführen ist. So wird von Weigel vermutet, dass die Anreicherung metabolischer Produkte die Viabilität der Zellen negativ beeinflussen könnte. Diese Vermutung lässt sich durch eigene Beobachtungen insofern stützen, als eine Erhöhung der Zellkonzentration oftmals zu größeren Zellverlusten führte. Auf der anderen Seite brachte der tägliche Medienwechsel keine nennenswerten Verbesserungen. Da dabei die Gefahr besteht, dass die Zellen abgespült werden, wurde darauf verzichtet und lediglich alle 3 Tage vorgenommen. Weiterhin wird vermutet, dass nach der Vorbehandlung der Chips in

den Löchern schadhafter Silikonverkapselungen Reste der Stoffe (z. B. Neodisher-GK, H_2SO_4 oder Alkohol) zurückbleiben, die die Viabilität negativ beeinflussen. Dies würde erklären, warum die Zellzahlen von Chip zu Chip so stark schwankten (sehr hohe Standardabweichung, die zum Teil aber auch auf die großen Schwankungen in der Zellzahl zurückzuführen ist), aber auch warum die Viabilitäten mit der Nutzungszeit der MEAs scheinbar schlechter wurden.

Aus diesen Gründen ist es auch schwierig, den Einfluss des DEP-Mediums auf die Viabilitäten zu bewerten. Nach Prasad *et al* (2003) zeigen Hippocampus-Neurone (*Rattus norvegicus*) im Kulturmedium keine elektrische Aktivität. Wird dieses Medium gegen Positionierungsmedium mit geringer Leitfähigkeit (1,2 mS/cm, bestehend aus 250 mM Saccharose/1640 RPMI), d. h. mit geringer Ionenkonzentration, ausgetauscht, und die Zellen anschließend positioniert, so beginnen sie periodisch zu spiken. Die Spikerate stieg mit abnehmender Ionenkonzentration im Medium.

Möglicherweise vertragen Neurone anderen Ursprungs die Zellkultur auf MEAs insgesamt besser, ein Eindruck, der auch in den hier durchgeführten Experimenten (Rattencortex, Huhntektum/-Telencephalon) entstand. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten ist jedoch fragwürdig, da dort meist andere MEAs mit anderen Medienvolumina, anderen Vorbehandlungen usw. eingesetzt wurden und nicht klar ist, welche Parameter für die Güte der Kultur verantwortlich sind.

Auf der anderen Seite war dieses Resultat nicht zu erwarten, da sich die Insektenneurone hinsichtlich der Zellkultur als ziemlich robust erwiesen. So wachsen und adhären sie auf fast allen Substraten, vertragen Osmolaritäts-, Temperatur-, pCO_2 - und pH-Schwankungen in der Regel besser als Neurone von höheren Tieren. Diese Aussagen wurden nicht quantifiziert, sich stützen sich auf eigene Beobachtungen und mündliche Mitteilungen von Weigel (FZ Jülich).

4.2 Positionierung

In dieser Arbeit wurden zunächst mechanische Methoden zur Positionierung von Neuronen auf MEAs und SU-8-Strukturen getestet. Obwohl die Methode verbessert werden konnte, bleibt sie dennoch unzureichend und die Ausbeute zu gering. Daher

wurde eine berührungsfreie Methode, die Dielektrophorese, verwendet. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Insektenneurone durch diese Methode positioniert werden können und dass, bei entsprechendem Somadurchmesser, in manchen Fällen die ganze Elektrodenfläche von einem einzigen Neuron bedeckt werden kann.

Die Positionierung von Neuronen aus dem Telencephalon und Tectum von embryonalen Hühnerneuronen wurde ebenfalls zum ersten Mal demonstriert. Die Daten weisen darauf hin, dass die Viabilitäten und das Vermögen, Neurite zu bilden, durch die DEP nicht bzw. kaum beeinträchtigt werden. Daneben zeigten sich Hinweise, dass die mit pDEP-positionierten Zellen auf den Elektroden besser adhären.

4.2.1 Mechanische Positionierung mit Saugkapillare

Durch die Silanisierung und das Feuerpolieren der Kapillarenspitzen ließ sich die Zellausbeute bei der Entnahme von Zellen aus dem Ganglion und aus Zellsuspensionen von 20 auf etwa 50% und die Positionierungsgenauigkeit bedeutend erhöhen.

Allerdings war es nicht möglich, reproduzierbar die gleichen Kapillaren herzustellen. Da die Bruchkanten unterschiedlich aussahen, musste unterschiedlich lange und ohne mikroskopische Kontrolle feuerpoliert werden, wodurch sich die Innendurchmesser stark unterschieden. Um die Kapillarenspitzen zu verbessern (geringere Rauigkeit, Reproduzierbarkeit), sollte eine Microforge verwendet werden.

Überdies zeigen die Neurone nach dieser Behandlung eine geringe Auswachsrate und adhären schlecht. Auch wenn die Positionierung auf SU-8-Strukturen fast immer gelang, lohnt sich der Zeitaufwand nicht, da die Ausbeute an lebenden und auswachsenden Zellen zu gering ist und die Neurite sich nur selten an der Topologie orientieren. Möchte man dennoch topologisch guiden, sind vielleicht andere, geschlossenere, Topologien besser geeignet (z. B. Erickson *et al*, 2006, und Maher *et al*, 1999).

Alles in allem kann diese Methode zur Positionierung neuronaler Zellen als weniger geeignet bewertet werden. Eine Einschätzung, die von Weigel (2006) und anderen (P. Schulte, FZ Jülich, persönliche Mitteilung) geteilt wird.

4.2.2 Dielektrophorese

4.2.2.1 Positionierung mit positiver DEP

Die genaue Positionierung der Neurone auf den Elektroden leistet einen wesentlichen Beitrag zur Güte (Signal-Rauschen-Verhältnis) der bioelektronischen Kopplung (Gross, 1979; Grattarola und Martinoia, 1993; Prasad *et al*, 2004).

Bei der dielektrophorese-gestützten Positionierung neuronaler Zellen auf MEAs wird meistens negative Dielektrophorese eingesetzt, da hier mit geringeren Spannungen gearbeitet werden kann, woraus sich geringere Belastungen für die Zellen ergeben (Rutten *et al*, 2001; Heida, 2003; Yu *et al*, 2004). Diese Arbeiten belegen weitgehend, dass diese Positionierungsmethode für die Zellen hinsichtlich der Viabilität und des Auswachsens unschädlich ist.

Die bisher einzige Gruppe, die mit positiver Dielektrophorese arbeitet, ist die Okzan-Gruppe (Prasad *et al*, 2003 & 2004). Von den anderen Autoren wird behauptet, die positive Dielektrophorese sei schädlich für die Zellen, wofür sich aber in der Literatur bisher keine Belege finden und die Arbeiten von Prasad zeigen, dass die mit pDEP positionierten Zellen vital sind und auswachsen.

Da alle Gruppen mit Vertebratenneuronen arbeiten, ist diese Arbeit die erste, die zeigt, dass sich auch Insekten-Neurone (*Locusta* & *Gryllus*) positionieren lassen. Da es sich bei der Dielektrophorese um die Nutzung physikalischer Gesetzmäßigkeiten handelt, ist dies an sich nicht verwunderlich. Der große Vorteil gegenüber den neuronalen Vertebratenzellkulturen ist darin zu sehen, dass hier die Rekonstruktion von Netzwerken auf Einzelzellebene - zumindest theoretisch - möglich ist. So ist allgemein bekannt, dass für die Langzeitkultur von Vertebratenzellen meist relativ hohe Zelldichten benötigt werden (James *et al*, 2004). Dies bedeutet jedoch auf der anderen Seite, auch und insbesondere beim Einsatz von negativer DEP, dass sich bei der Feldapplikation Zellcluster bilden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich unter geeigneten Bedingungen jeweils nur ein Neuron auf einer Elektrode befindet (siehe z. B. Abb. 22, A, B & E). Daneben zeigten sich Hinweise, dass die mit pDEP positionierten Zellen besser adhärieren, da diese Zellen (auf Leiterbahnen und Elektroden) nach den mechanisch belastenden Waschvorgängen häufiger vorhanden waren, als Zellen, die in den Zwischenräumen adhärirten.

Physikalisch erscheint dies prinzipiell einsichtig, auch wenn hier keine Finite-Elemente-Methode zur Berechnung der wirkenden Kräfte durchgeführt wurde. Diese wäre sicher auch sinnvoll, um neben der Feldverteilung eine genauere Vorstellung von den wirkenden hydrodynamischen Kräften zu bekommen. Mit Hilfe solcher Modelle ließen sich auch die dielektrophoretischen Kräfte berechnen, die unter verschiedenen experimentellen Rahmenbedingungen (Leitfähigkeiten des Mediums, Frequenzen) auf die einzelnen Zellen einwirken (Prasad *et al*, 2003 & 2004). Solange allerdings die genauen dielektrischen Eigenschaften der Zelltypen unklar sind, bleiben diese Simulationen zu ungenau, um die Spektren berechnen zu können.

Bei einer verbesserten Adhäsion, insbesondere bei Zellen, deren Durchmesser dem der Elektroden entspricht, kann auf Grund der Feldverteilung davon ausgegangen werden, dass die Zellmembran auf die Elektrodenkanten gezogen wird und damit gegenüber dem umgebenden Medium besser abdichtet (Sealing, s. Abb. 36).

Dadurch fließen bei der Ausbildung von Aktionspotentialen weniger Ionen in das Medium ab, weshalb sich die Kopplung verbessern sollte. Eine deutliche Verbesserung (Verdoppelung) des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses wurde nach Positionierung (pDEP) von Cortexneuronen aus der Maus auch von Köster (Universität Rostock, mündliche Mitteilung) beobachtet.

Da die Viabilitäten der Zellen auf den MEAs auch ohne Feldapplikation stark schwankten und nur wenige Neurone auswuchsen, ist es schwierig, klare Aussagen zu treffen, inwieweit das elektrische Feld die Viabilität und Auswachsrate beeinflusst. Die Daten deuten aber darauf hin, dass kein oder nur ein geringer negativer Effekt auftrat. Hier müssten noch mehr Daten erhoben werden, um sichere Aussagen machen zu können.

Ein weiterer Mangel in dieser Hinsicht ist darin zu sehen, dass keine Ableitungen der Zellen auf den MEAs durchgeführt werden konnten. Es wurden zwar ein paar Versuche unternommen, eine standardmäßige Ableitung nach der Positionierung konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da die Ableitvorrichtung im FZ Jülich steht, die meisten Experimente aber in Aachen durchgeführt wurden und der Transport der Chips vermutlich einen negativen Einfluss auf die bioelektronische Kopplung hat.

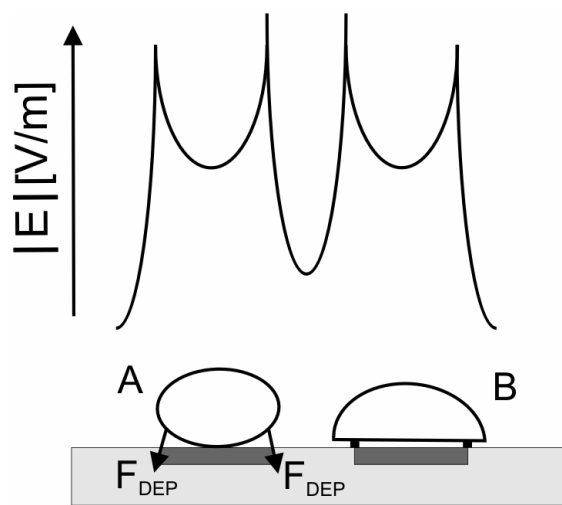


Abb. 36 Hypothese zur Verbesserung des Sealings bzw. zur Erklärung der Beobachtung, dass mit pDEP positionierte Zellen auf den Elektroden besser haften. Oben ist schematisch die Feldverteilung direkt über den Elektroden dargestellt (verändert nach Frénée *et al*, 2003). Die Feldmaxima befinden sich an den Elektrodenkanten, von wo sie relativ schnell abfallen. Darunter eine schematische Darstellung der Zelle direkt nach der Positionierung mit den dielektrischen Kräften, die die Membran, dem Feldgradienten entsprechend, in Richtung der Elektrodenkanten ziehen. Danach kann man vermuten, dass der Zell-Elektroden-Komplex gegenüber dem Medium besser abgedichtet ist (B), was eine bessere Kopplung und Adhäsion der Zellen nach sich zieht.

Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang auch ein Vergleich der Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse von DEP-positionierten und unpositionierten (oder nDEP positionierten) Neuronen.

Sollte sich zeigen, dass die pDEP doch einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat, so könnte die Positionierung unter Verwendung eines Mediums mit einer höheren Leitfähigkeit (z. B. Kulturmedium) durch negative DEP durchgeführt werden. Dabei können dann auch geringere Spannungsamplituden (~ 2 V) und Frequenzen eingesetzt werden, die nach Rutten *et al* (2001) und Heida (2003) eine geringere Belastung für die Zellen bedeuten.

Immer wieder wurden Zellen auch auf Elektroden gefunden, die gar nicht angesteuert wurden, bzw. man konnte während der Positionierung beobachten, dass Zellen auch von diesen Elektroden angezogen wurden. Es wurde vermutet, dass hier Induktionseffekte (zwischen Sockelkontakten, Bondpads, Leiterbahnen oder direkt zwischen den Elektroden) eine Rolle spielen. Messungen an den Sockelkontakten zeigten, dass zumindest dort keine Induktionseffekte auftreten. Messungen direkt an den Elektroden wären hilfreich gewesen, konnten jedoch nicht durchgeführt werden. Später zeigte sich dann, dass manche Bondpads über den zur Kontaktierung verwendeten Silberkleber miteinander verbunden waren, und so könnte auch dies die Ursache für diese Beobachtung sein.

Die Positionierung von Neuronen aus dem embryonalen Rattenkortex und verschiedenen Hirnbereichen aus dem Hirn von Hühnerembryonen ließ sich ebenfalls problemlos realisieren. Hier erwiesen sich die höheren Zelldichten als hilfreich, um im Nachhinein die Funktionstüchtigkeit der Elektroden und die Feldverteilung zu ermitteln. Qualitativ schien die Anwendung von pDEP nur einen geringen Einfluss auf die Auswachsrate und Viabilität der Neurone zu besitzen. Es zeigte sich auch ganz klar, dass die Leiterbahnen ebenfalls zur Positionierung geeignet sind.

Hilfreich bzw. von Interesse kann dies für das biohybride Tissue-Engineering sein, also die Rekonstruktion von Geweben aus Zellsuspensionen. In einer neueren Arbeit wurde bereits versucht, unter Einsatz der Dielektrophorese Leber-Gewebe zu rekonstruieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich hepatische und Endothelzellen über eine Ringelektrodenstruktur so positionieren lassen, dass ihr Aufbau dem von Lebergewebe stark ähnelt (Ho *et al*, 2006).

Da auch eine Vielzahl anderer Gewebe und insbesondere auch neuronale Gewebe in Schichten strukturiert sind, eröffnet diese berührungsfreie und, nach Meinung vieler Autoren, unschädliche Technologie ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten zur *in-vitro*-Rekonstruktion solcher Strukturen (Ozkan *et al*, 2001; Alp *et al*, 2003; Albrecht *et al*, 2004 & 2005), was die Forschung auf diesem Gebiet sehr interessant macht. Neben der Grundlagenforschung kann insbesondere auch die klinische/pharmakologische Forschung (z. B. Demenzerkrankungen) von der Möglichkeit profitieren, definierte neuronale Gewebe zu erzeugen.

4.3 Räumliche Separation von Gliazellen und Neuronen mit DEP

Es ist bisher keine Methode bekannt, mit der sich Neurone und Gliazellen voneinander trennen lassen, ohne zuvor Markierungen durchzuführen, die die Zellen möglicherweise verändern (Prasad *et al*, 2003). Zudem sind neuronale Langzeitkulturen von der Anwesenheit von Gliazellen abhängig (Wagenaar *et al*, 2005; Stenger *et al*, 2001). Vor diesem Hintergrund und insbesondere im Rahmen der Rekonstruktion definierter neuronaler Strukturen ist die räumliche Trennung beider Zelltypen von großer Bedeutung.

Während die Ozkan-Gruppe, die zur Zeit die einzige Gruppe ist, die sich mit der dielektrophoretischen Separation beider Zelltypen auf MEAs auseinandersetzt, die Möglichkeit von FEM-Simulationen zunutze machen konnte, musste in der vorliegenden Arbeit auf dieses Hilfsmittel verzichtet werden. Sie ermöglichen eine Abschätzung der benötigten Medienleitfähigkeiten und der damit einhergehenden Übergangsfrequenzen (Prasad *et al*, 2003 & 2004).

Ein wesentlicher methodischer Mangel war darüber hinaus darin zu sehen, dass jeweils immer nur 1 Chip befeldet werden konnte, da nur ein Sockel vorhanden war. Obwohl Kontrollen zeigten, dass die Zellen auch nach 5 h im Dielektrophoresemedium noch vital sind und auswachsen (insbesondere in Kulturschalen), so ist eine negative Beeinflussung (bspw. durch die von Prasad *et al* gezeigte Induzierung von Aktionspotentialen in ionenarmen Medien) nicht ganz auszuschließen. Für Untersuchungen der noch empfindlicheren Vertebraten- bzw. Vogelneurone sollten bspw. Platinen mit mehreren Sockeln verwendet werden, womit sich zum einen Zeit sparen lässt und zum anderen auch im Inkubator befeldet werden kann. Der Einsatz einer solchen Platine wird zurzeit von Köster (Biophysik, Universität Rostock) getestet.

In der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht geleistet werden. Trotz der Vielzahl untersuchter Frequenzen konnte kein Frequenzbereich gefunden werden, in dem eine deutliche negative Dielektrophorese auftrat. Unter Zugrundelegung der Frequenzspektren-Simulationen für verschiedene relevante Parameter (Leitfähigkeiten und Permittivitäten von Zelle und Medium, Zellgrößen) von Docoslis *et al* (1997) und der Arbeiten von Prasad *et al* (2003 & 2004) war dies nicht zu erwarten.

Nach (1.12) und (1.13) hängen die Übergangsfrequenzen am stärksten von der Leitfähigkeit des Mediums ab. Bei sehr geringen Frequenzen (< 100 Hz) ist diese Abhängigkeit vermutlich auf elektrophoretische Kräfte zurückzuführen, die auf die negativen Nettoladungen der Zellmembranoberflächen wirken, und auf elektroosmotische Kräfte, die einen Fluidstrom induzieren (Ozkan *et al*, 2001 & 2003). Diese beiden Effekte können vermutlich auch zur Positionierung von Zellen führen. Daneben ist der Clausius-Mosotti-Faktor bei geringen Frequenzen positiv (z. B. Gascoyne und Vykoukal, 2004; s. auch Abb. 7, rechts). Das bedeutet, dass womöglich nur in einem sehr kleinen Frequenzbereich negative Dielektrophorese auftritt.

Kaler *et al* (1992), die die dielektrophoretischen Eigenschaften und Spektren von Protoplasten aus *Canola* bei ebenfalls sehr geringen Leitfähigkeiten (18-210 $\mu\text{S}/\text{cm}$) untersucht haben, kommen zu dem Schluss, dass das Verhalten der Zellen im niederfrequenten Bereich nicht durch das einfache („Single-shell“-) Modell beschrieben werden kann. So treten experimentell beispielsweise Clausius-Mosotti-Faktoren auf, die größer als 1 sind, was per Definition (1.3) nicht möglich ist. Daneben zeigen die gemessenen Spektren der Zellen im nDEP-Bereich relativ geringe Clausius-Mosotti-Faktoren (Minimum: -0,3). Die unteren Übergangsfrequenzen liegen dort zwischen 10 und 300 Hz, die oberen zwischen 1500 und 6000 Hz, und $\text{Re}(f_{\text{CM}})$ ist im nDEP-Bereich maximal. Bei einer Mediumleitfähigkeit von 0,21 mS/cm und einem Zellradius von 20 μm treten sogar 3 Übergangsfrequenzen auf.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Frequenzbereich in der vorliegenden Arbeit vermutlich zwar richtig gewählt wurde, eventuell aber in kleineren Frequenzschritten getestet werden müsste, um den Bereich zu finden, in dem die negative DEP auftritt.

Auch sollten weitere Untersuchungen unter Verwendung von Medien mit größerer Leitfähigkeit durchgeführt werden. Hierzu wurden erste Experimente durchgeführt, die zeigten, dass bei einer hohen Leitfähigkeit (15 mS/cm) in einem breiten Frequenzbereich negative DEP auftritt (nicht dargestellt).

Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang die Verwendung von zellaversiven Beschichtungen auf den MEAs. Anschließend könnte dann das Frequenzspektrum durchfahren und videomikroskopisch dokumentiert werden, in welche Richtung die Zellen sich bewegen, ohne dass die Adhäsionskräfte die Zellbewegung stark beeinträchtigen würden.

Die eleganteste Methode scheint allerdings die Messung der Rotationsspektren in Feldkäfigen zu sein. In Zusammenarbeit mit der Gimsa-Gruppe (Baumann, Biophysik, Universität Rostock) wurde begonnen, die Rotationsspektren von Gliazellen und Neuronen zu ermitteln (Maus und Ratte), woraus sich dann die Realteile des Clausius-Mosotti-Faktors berechnen lassen (Jones und Kaler, 1990; Wang *et al*, 1992 & 1993; Gimsa *et al*, 1991). Mit den gewonnenen Frequenzspektren sollte es

möglich sein, Neurone und Gliazellen räumlich auf den Chips zu trennen, eventuell sogar dann, wenn diese ähnliche Übergangsfrequenzen besitzen (s. 2.2.7.5).

Gerade zu Beginn der Separationsexperimente wurde ein Großteil der Zellen durch die wiederholten Waschschrte nach der Färbung abgewaschen, wodurch die Auswertung erschwert wurde.

Positionierungen, bei denen in der Videoaufzeichnung kein Konvektionsstrom zu beobachten war und die Zellen stochastisch verteilt auf dem Chip lagen, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Hier wurde davon ausgegangen, dass die entsprechenden Chips defekt waren (z. B. durch Kurzschlüsse an den Bondpads) oder dass die Kontaktierung der Elektroden mangelhaft war.

4.4 Wanderwellendielektrophorese

Da die Neurone der Thorakalganglien hinsichtlich ihres Zelldurchmessers stark inhomogen sind und da eine größere Homogenität wünschenswert wäre, um die Zelldurchmesser an die Elektrodengrößen anzupassen, wurde versucht, die Zellen mit Standardmethoden aufzutrennen (nicht dargestellt). Darüber hinaus sollte diese Auftrennung dazu dienen, die Menge an Debris zu reduzieren.

Dazu wurden die Zellen nach der Dissoziation entweder in Sinkrohre (silanisiert, um ein Anhaften zu verhindern) eingebracht oder in Dichtegradienten bzw. im Kulturmedium zentrifugiert.

Bereits in den Sinkrohren wurde, trotz des Einsatzes unterschiedlich dichter Absinkmedien, keine Trennung erzielt. Auch durch die Variation von g-Zahl, Gradient und Zeit bei der Zentrifugation ließ sich keine Trennung erzielen. Dieses Ergebnis legt auf Grund der Proportionalität der Absinkgeschwindigkeit zur Dichtedifferenz und dem Quadrat des Zellradius den Schluss nahe, dass größere Zellen tendenziell gegenüber kleineren Zellen eine sehr viel geringere Dichte haben. Die Gründe dafür sind unklar. Vor diesem Hintergrund stellt die Wanderwellendielektrophorese vielleicht eine Möglichkeit dar, die Zellen doch noch ihrer Größe nach zu sortieren.

Auf Grund der genannten Schwierigkeiten bei der Separation von Gliazellen und Neuronen durch DEP auf den Standard-MEAs und den obengenannten Trennungsansätzen wurde ein Separationschip gebaut, denn die Wanderwellendielektrophorese bietet die Möglichkeit, Zellen nach ihren dielektrischen Eigenschaften zu trennen.

Da die Separationskammer erst gegen Ende der Arbeit fertiggestellt werden konnte, wurden lediglich wenige Vorversuche durchgeführt. Hier wurden dann zwecks Vergleichbarkeit humane Blutzellen verwendet, da von Morgan *et al* (1997) ähnliche Versuche mit Hasenblut durchgeführt wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Frequenzen und Medienleitfähigkeiten zur Trennung von Erythrozyten und Leukozyten wurden als Richtwerte verwendet.

Im Rahmen dieser Vorversuche, die die Funktionstüchtigkeit der Chips zeigen sollten, konnte für kurze Zeiträume ein gerichteter Transport der Zellen beobachtet werden. Die dabei erreichten Geschwindigkeiten waren vergleichbar mit den von Morgan *et al* (1997) gefundenen. Dieser Transport kam jedoch nach wenigen Minuten zum Erliegen. Es wird vermutet, dass er zumindest zu einem gewissen Teil auf der beim Befüllen der Kammer auftretenden Fluidströmung beruht.

Auf der anderen Seite konnte während dieser Transportphase bei Zellen, die sich etwa 15-30 μm über den Elektroden bewegten, eine deutliche horizontale Beschleunigung bzw. Abbremsung über den Elektrodenkanten beobachtet werden. Hier wird davon ausgegangen, dass dies auf die dielektrischen Kräfte (F_x , Gl. 1.8) zurückzuführen ist.

Aus diesen Ergebnissen, ebenso wie aus der Beobachtung, dass in der unmittelbaren Nähe der Elektroden keine makroskopisch sichtbaren Beschleunigungen der Zellen auftraten, es aber nach einer längeren Zeit zu definierten räumlichen Zellverteilungen kam, wurde geschlossen, dass das elektrische Feld zwar vorhanden war, die wirkenden Kräfte aber zu gering, um die Sedimentationskraft zu überwinden.

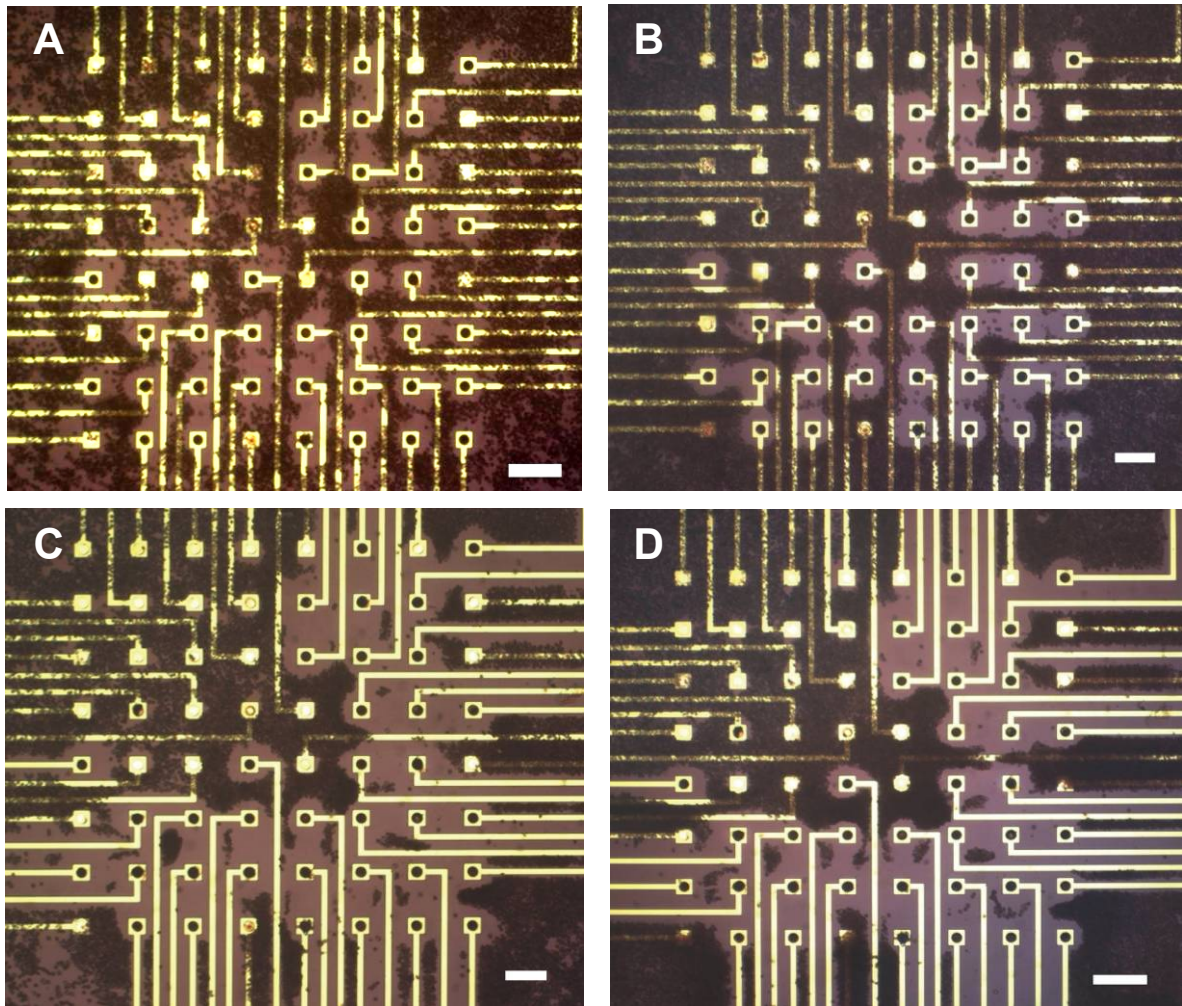


Abbildung 37 Humane Blutzellen auf MEAs nach 90-minütiger Applikation von AC-Feldern mit 100 kHz/6 V_{pp} (A), 500 kHz/6 V_{pp} (B), 5 MHz/10 V_{pp} (C) und 20 MHz/10 V_{pp} (D) (Leitfähigkeit des Mediums: 1,5 mS/cm). Der Mindestabstand der Zellen zu den aktiven Elektroden blieb bei allen Frequenzen nahezu konstant und lag bei ca. 30-40 µm. Bei inaktiven oder defekten Elektroden sieht man keine Höfe um die Elektroden. Bei höheren Frequenzen und Spannungen (C&D) konnte man erkennen, dass auch die Leiterbahnen zunehmend zellfreier wurden.

Um abzuschätzen, ob und inwieweit die Zellen unter Wechselfeldeinfluss bei den verwendeten Medienleitfähigkeiten von den Elektroden abgestoßen werden, wurden Kontrollexperimente auf MEAs durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Zellen außerhalb eines Radius von mindestens 30 µm um die Elektroden zu liegen kommen (s. Abb. 37). Die Zellen lagerten sich direkt in diesem Abstand um die Elektroden ab. Wurde befördert, nachdem sich die Zellen abgelagert hatten, waren Höfe um die Elektroden bereits nach wenigen Minuten deutlich zu erkennen.

Bei höheren Frequenzen und Spannungsamplituden zeigte sich, dass die Kräfte ausreichend groß waren, um die Leiterbahnen ebenfalls zellfrei zu halten (s. Abb. 37, C & D). Das bedeutet, dass die negativen dielektrischen Kräfte trotz des relativ

großen Abstandes zwischen den Leiterbahnen bei diesen Frequenzen und Amplituden ausreichen, um die Sedimentationskraft zu überwinden.

Nachdem bei der Herstellung der Separationschips und MEAs die gleichen Materialien verwendet wurden und die Feldapplikation mit ähnlichen Parametern durchgeführt wurde, kann man vermuten, dass auf Grund des geringen Abstandes der Elektroden die auf die Zellen wirkenden Feldkräfte bei den Separationschips eigentlich ausreichen sollten, um die Sedimentationskraft zu überwinden und einen gerichteten Transport zu induzieren.

Unter der Voraussetzung, dass alle Parameter bis auf die an den Elektroden auftretende Spannung V_0 konstant sind, ergibt sich mit (1.5) und (1.8) der Schluss, dass V_0 bei den Separationschips kleiner ist als bei den MEAs. Die Ursache hierfür ist noch unklar. Sie könnte aber darin liegen, dass die ONO-Stapel bei der Prozessierung nicht vollständig geöffnet wurden.

Diese Vermutung stützt sich auch auf Widerstandsmessungen, die zwischen gegenüberliegenden Bondpads auf den Chips durchgeführt wurden. Eine leitende Verbindung konnte nur dort gefunden werden, wo die Elektrodenzuleitungen nicht durch den ONO-Stapel gehen (0° Phasen, s. Abb. 3, C).

Warum eine, wenn auch geringe Feldwirkung (räumliche Anordnung der Zellen), bei allen Elektroden gefunden werden konnte, ist aus dieser Sicht nicht klar. Im Rahmen der Prozessierung der Chips ist die Erzeugung gleichmäßiger ONO-Stapel ein kritischer Parameter (M. Banzet, S. Ingebrandt, FZ Jülich, mündliche Mitteilung). Somit könnte eine mögliche Erklärung darin liegen, dass nur auf einer Seite des Chips die ONO-Stapel ungeöffnet waren. Um die genauen Ursachen zu bestimmen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.5 Axonguiding

Zur Steuerung des Axon-/Neuritenwachstums wurden Experimente mit zwei unterschiedlichen Strategien durchgeführt. Zum einen wurden unter Verwendung von elektrischen Gleichfeldern Proteine auf den Elektroden positioniert (Biofunk-

tionalisierung). Zum anderen wurde untersucht, ob die Insektenneurone, wie andere Neurone auch, mit gerichtetem Wachstum auf die Anwesenheit eines elektrischen Gleichfeldes reagieren (Galvanotropismus).

In den Versuchen zur Biofunktionalisierung konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Es zeigte sich, dass diese Strategie dazu geeignet sein könnte, die Elektroden zu beschichten und Verbindungslinien zwischen ihnen aufzubauen. Zumindest teilweise entstand der Eindruck, dass auch Gradienten um die Elektroden herum erzeugt werden können.

Der zweite Ansatz, die Steuerung des Neuriten-/Axonwachstums von Insektenneuronen durch Galvanotropismus, blieb dagegen ohne Erfolg.

4.5.1 Biofunktionalisierung durch Gleichfelder

Während die Nachweise der elektrophoretischen Abscheidung von Proteinen oder Peptiden mittels Färbung bzw. unter Verwendung der fluoreszenzmarkierten Proteine relativ eindeutig und einfach durchzuführen war, ist der Nachweis von Gradienten schwieriger zu realisieren. Dies gilt auch für die Bestimmung der Schichtdicken auf den Elektroden, die Art der Bindung an das Substrat (Valenzbindung, elektrostatische Ionenbindungen oder Dipolbindungen) und etwaiger Veränderungen der Proteine. Detaillierte Untersuchungen hierzu sollten noch durchgeführt werden.

Allerdings scheinen die Proteinkonzentrationen auf den Elektroden relativ hoch zu sein, da sich bei Kontrollexperimenten ohne Feld (FITC-gekoppeltes Polylysin) keine Signale zeigten.

Bezüglich der Bindung kann man vermuten, dass es sich um energiereiche Bindungen (Ionen-/Valenzbindungen) handelt, da weder Spülen (mit Aq. dest.) noch die nachfolgenden Wechselfeldapplikationen die Proteinkonzentration merkbar reduzierten.

Ein „Absprengen“ der Proteine trat nur auf, als die Chips nach der Positionierung (danach waren die Proteine noch vorhanden) in den Inkubator (36 °C) überführt

wurden und zwischen den befeldeten Elektroden für 12 h ein Gleichfeld (- 2,4 V) angelegt wurde, um ein galvanotropisches Axonguiding durchzuführen.

Dies kann zum einen daran liegen, dass die Proteine aus elektrochemischen Gründen (gleiche Nettoladung wie das anliegende Potential) nach (1.15) elektrophoretisch wandern. Zum anderen ändert sich, ohne hier auf die elektrochemischen Details einzugehen, das elektrochemische Potential des Mediums mit der Temperatur, so dass die bei RT gerade unterhalb der Schwelle zur Hydrolyse liegende Spannung bei 36 °C ausreichte, um die Hydrolyse hervorzurufen.

Nur bei der Verwendung von PLL wurden Verbindungslinien zwischen den Elektroden ausgebildet. Weshalb andere Proteine/Polypeptide solche Verbindungslinien nicht ausbilden, ist nicht klar. Es wurde zunächst vermutet, dass die dreimal längere Befeldungszeit von 90 min hierfür verantwortlich sein könnte. Kontroll-experimente mit anderen Proteinen/Polypeptiden (PDL, ConA) bestätigten diese Vermutung aber nicht. Die geringen Probenzahlen lassen aber noch keine endgültige Aussage zu.

Außerdem fanden sich Verbindungslinien nur auf Chips mit einem Elektrodenabstand von 100 µm und großen Elektrodendurchmessern (30 µm). Die Ursache hierfür ist noch unklar.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse können nur als Vorarbeiten gelten.

Da aber keine der Gruppen, die mit MEAs arbeiten, bisher versucht hat, auf diese Art die Proteine zu positionieren und Proteinmuster zu erzeugen, erscheint es lohnenswert, diese einfache und schnelle Methode zur Gestaltung definierter Oberflächen weiter zu untersuchen. Unter anderem auch, weil sie sich durch die Verwendung von Antikörpern noch weiter spezifizieren lässt und damit auch als Hilfsmittel zum Tissue-Engineering gesehen werden kann.

4.5.2 Galvanotropismus

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von experimentellen Ansätzen zur Steuerung des Axon-/Neuritenwachstums von Insektenneuronen durch elektrische Gleichfelder untersucht. Neben den dargestellten Untersuchungen wurde in einem Projekt in

Kooperation mit dem IBN-2 (P. Schulte, T. Decker) eine Spule gebaut, mittels derer sich durch Induktion (durch gepulste Magnetfelder) ein Gleichfeld in den Kulturschalen erzeugen ließ. Dass sich das Wachstum *in vivo* und *in vitro* unter Verwendung dieser „nichtinvasiven“ Methode beeinflussen lässt, konnte bei einer Vielzahl von Zellen gezeigt werden (Basset *et al*, 1974; Ottani *et al*, 1988; Yen-Patton *et al*, 1988), darunter auch die Regeneration peripherer Nerven (Ito und Basset, 1983; Orgel *et al*, 1984; Siskin *et al*, 1989 & 1990; Macias *et al*, 2000).

Auch die Arbeiten von Borgens *et al* (1990 & 1993), Patel und Poo (1982 & 1984) und McCaig (1986) zeigen die galvanotropische Beeinflussung des Axonwachstums und die positiven Effekte auf neuroregenerative Prozesse. Mittlerweile werden solche Methoden in der klinischen Anwendung getestet, um Regenerationsprozesse, beispielsweise nach Rückenmarksverletzungen, zu untersuchen (Borgens, 1999; Borgens und Bohnert, 1997; Brushart *et al*, 2000a & 2002; Siskin *et al*, 1993; Song *et al*, 2004).

Galvanotropische Wachstumsbeeinflussung von Neuriten/Axonon tritt bei einer Vielzahl von Organismen (Fröschen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Katzen und Hunden) auf. Die involvierten molekularen Mechanismen (z. B. laterale Elektrophorese von Rezeptorproteinen (ACh und ConA); McLaughlin und Poo, 1981; Patel und Poo, 1982) und intrazelluläre Signalprozesse (Bedlack *et al*, 1992; Brushart *et al*, 2000b; Davenport und Kater, 1992; McCaig *et al*, 1994 & 2005; Morgando-Valle *et al*, 1998; Song *et al*, 1997; Stewart *et al*, 1995; Zheng *et al*, 1994 & 1996) wurden zumindest teilweise aufgeklärt.

In Insektenneuronen kommen alle beteiligten Moleküle (z. B. ConA- und ACh-Rezeptoren) in der Zellmembran vor (ACh: Cayre *et al*, 1999), und Ca^{2+} ist intra- und extrazellulär vorhanden. Daher wurde vermutet, dass der Galvanotropismus auch bei Insektenneuronen auftritt.

Da in Vorversuchen keine deutlichen Effekte gefunden wurden, wurden verschiedene Additive getestet. Diverse Neurotrophine (BDNF, NT-3, NT-4) senken den Schwellenwert (Feldstärke), ab dem galvanotropische Reaktionen gefunden wurden (McCaig und Zhao, 1997) und sie können sie verstärken (McCaig *et al*, 2000;

Review: McCaig *et al*, 2005). Daher wurden zum Teil auch diese getestet (NT-3, NGF).

Da in allen Arbeiten zum Galvanotropismus mit serumhaltigen Medien gearbeitet wurde, wurde dem Kulturmedium ein Dotterextrakt aus den Eiern von *Locusta* zugegeben, da vermutet wurde, dass die dort während der Neurogenese vorhandenen Proteine für den erwünschten Effekt erforderlich sind und diese eventuell in Standardseren (z. B. FCS) fehlen.

Auf Grund von Schwierigkeiten bei der Standardisierung mancher methodischer Ansätze und der Vielzahl variabler Parameter konnten nicht alle möglichen Kombinationen untersucht werden.

Trotz der unterschiedlichen methodischen Ansätze fanden sich nur in wenigen Experimenten Hinweise auf eine galvanotropische Reaktion, aber reproduzierbare Ergebnisse konnten in dieser Hinsicht nicht gefunden werden.

Die Arbeit von Prasad *et al* (2003) ist bisher die einzige, die sich mit der galvanotropischen Wachstumssteuerung von Axonen auf MEAs beschäftigt hat. Dieser Ansatz ist sehr elegant und vergleichsweise einfach und bietet die Möglichkeit, kontrollierbare bzw. definierte Bedingungen zu schaffen.

4.5.2.1 Galvanische Kammer

Der Aufbau der verwendeten Befeldungskammer war vergleichbar mit dem von McCaig *et al* (2000) und dem in anderen Arbeiten verwendeten Aufbau, ebenso wie die meisten anderen Parameter (Befeldungszeiten, Feldintensitäten, Mediensupplemente).

Es erwies sich als schwierig, die Bedingungen in der Befeldungskammer konstant zu halten, da es bei hohen Spannungen und Stromstärken zu starken Osmolaritäts- und pH-Verschiebungen kam. Durch Verdunstungsprozesse änderte sich die Querschnittsfläche, durch die der Strom floss und damit nach (1.17) auch die Feldstärke.

Die Viabilität der Zellen war sehr niedrig. Nach der Befeldung wurden meist nicht viele Zellen gefunden. Die Ursachen dafür könnten zum einen darin liegen, dass das Coverslip-Sandwich den Gasaustausch mit der Luft verhinderte, zum anderen an den durch den Strom- und Elektrolytfluss und damit verbundene Medienerwärmungen. Es können bei hohen Spannungen auch Fluidströmungen aufgetreten sein, die die Zellen abgewaschen haben, da nach der Befeldung viele Zellen in den Medienreservoir zu finden waren.

In diesen qualitativen Voruntersuchungen konnten Veränderungen des Neuritenwachstums gefunden werden. In manchen Fällen trat ein verstärktes Wachstum in Richtung der Kathode auf, in anderen kringelförmige Ausläufer, die unter Standardkulturbedingungen sehr selten sind. Letztere könnten auf unregelmäßige Feldverteilungen zurückzuführen sein, die durch die Medienverdunstung oder durch die Geometrie der Befeldungskammer entstanden sind.

Da qualitativ mehr Neurite in Kathodenrichtung auswuchsen, wurde dies als positiver Befund gewertet. Auf Grund der genannten Schwierigkeiten hinsichtlich der Standardisierung waren die Experimente jedoch nicht miteinander vergleichbar, und daher wurde keine quantitative Auswertung durchgeführt.

Im Rahmen dieser Experimente wurde auf Mediensupplementierung verzichtet.

4.5.2.2 MEAs

Befeldung mechanisch positionierter Neurone über Stimulationselektroden

Die geringe Viabilität und Adhäsion der mechanisch positionierten Neurone sowie der große zeitliche Aufwand und Probleme mit Kontaminationen begründen, dass dieser methodische Ansatz nicht intensiver verfolgt wurde.

Es konnten zwar häufiger Ausläufer gefunden werden, die entlang der Feldlinien wuchsen, es ist aber nicht ganz auszuschließen, dass es sich dabei, zumindest teilweise, um Primärneurite handelte, die durch elektroosmotische Fluidströme oder elektrophoretische Kräfte (Ozkan *et al*, 2001 & 2003; Prasad *et al*, 2003 & 2004)

bewegt wurden. Solche Bewegungen konnten während der DC-Befeldung beobachtet werden.

Eine deutliche galvanotropische Reaktion war auch hinsichtlich der geringen Feldstärken nicht zu erwarten, wobei die Berechnung mit (1.20) als extrem grobe Näherung zu verstehen ist. Auf Grund von Ladungsträgern im Medium und den damit auftretenden Grenzflächeneffekten und Leitfähigkeiten ist die Potentialverteilung weder homogen, noch kann man von einem reinen Dielektrikum sprechen. Prasad *et al* (2003) verwendeten Elektroden (Pt, $r=40\text{ }\mu\text{m}$) mit einem Abstand von $120\text{ }\mu\text{m}$ zwischen den Elektrodenkanten und legten eine Spannung von $0,8\text{ V}$ an. Die ermittelten Feldverteilungen, Feldstärken und die daraus abgeleiteten und dargestellten Wachstumsrichtungen der Neurite konnten allerdings nicht nachvollzogen werden. Trotzdem dürften die Feldstärken unter den hier verwendeten Bedingungen (Elektrodenabstand $700\text{ }\mu\text{m}$, Spannung max. 2 V , Medienleitfähigkeit um 15 mS/cm) beträchtlich unter den bei Prasad *et al* aufgetretenen liegen und genügend große Potentialgradienten nur in unmittelbarer Umgebung der Elektroden auftreten. Dies würde die Beobachtung stützen, dass mehr Neurite in Feldrichtung auswuchsen. Es wäre in diesem Zusammenhang hilfreich, eine FEM-Analyse durchzuführen, um die Feldstärken präziser ermitteln zu können.

Neben der geringen Zellausbeute nach der mechanischen Positionierung war auch nie klar, ob die Elektroden funktionstüchtig waren. Aus diesen Gründen wären statistische Auswertungen nicht aussagekräftig, weshalb auf sie verzichtet wurde.

Befeldung dielektrophoretisch positionierter Neurone

Auf Grund der vielfältigen Probleme, die bei den anderen verwendeten Methoden auftraten, scheint die Befeldung von berührungsfrei durch Dielektrophorese positionierten Neuronen die beste Methode zu sein.

Hier erwies sich allerdings die geringe Viabilität der Neurone auf den MEAs als profundes Problem, da das Neuritenwachstum der Neurone *in vitro* erst nach einigen Stunden beginnt und nur wenige der Neurone überlebten. Die geringe Viabilität hängt nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich nicht mit der Befeldung

zusammen. DC-Befeldung direkt nach der Positionierung bei Raumtemperatur zeigte lediglich, dass durch das Feld elektrophoretische/elektroosmotische Effekte auftraten, nicht aber die Beeinflussung des Neuritenwachstums. Auch Prasad *et al* (2003) berichten, dass die Zellen zwar durch das ionenarme Positionierungsmedium zu spiken beginnen, sie aber nach einer Erholungsphase (2 h) wieder zu ihrer ursprünglichen Aktivität zurückkehren.

Unter Kulturbedingungen und mit längeren Befeldungszeiten wurde qualitativ ein etwas erhöhtes Wachstum gefunden, aber es konnten keine eindeutigen Richtungspräferenzen gefunden werden. Dies kann vielfältige Ursachen haben. So zeigen andere Studien (Review: McCaig *et al*, 2005), dass manche Neuronentypen gar nicht auf Gleichfelder reagieren. Die Reaktion hängt von der Adhäsion, Art und Nettoladung der Beschichtung und von dem Ausläufertyp (Axon, Dendrit) ab. Aus diesem Grund wurde auch auf eine zusätzliche Beschichtung verzichtet. Zum anderen können durch die Fluidströmungen bei der AC- oder DC-Befeldung Primärneurite, die nach der Dissoziation an den Zellen verblieben sind, ausgerichtet werden. Diese verfälschen, insbesondere unter Berücksichtigung der geringen Anzahl von auswachsenden Zellen, das Ergebnis. Da bei einem Teil der Experimente auch nicht darauf geachtet wurde, ob die Chips sauber auf die Carrier geklebt wurden, können unbeabsichtigt auch an anderen Elektroden Spannungen angelegt worden sein. Falls dann Zellen in Richtung dieser Elektroden auswuchsen, so wurden sie vielleicht fälschlicherweise als feldunabhängig bewertet. Ähnliches gilt auch für das Problem, dass die Elektroden vor ihrem Einsatz nicht getestet werden konnten. Mittlerweile besteht diese Möglichkeit, und so kann zumindest dieser Unsicherheitsfaktor in weiteren Experimenten ausgeschlossen werden.

Solange das Problem der geringen Viabilitäten und Auswachsrate der Insektenneurone auf den MEAs nicht gelöst ist, bleibt es schwierig, quantitativ zu arbeiten.

Unter diesen Umständen kann aus den Daten auch nicht geschlossen werden, dass die untersuchten Additive (20-HE, NT-3, NGF, Dotterproteine) keinen Einfluss auf das Wachstum haben.

Um dies zu beurteilen, könnte eine induktive Befeldungskammer in Jülich benutzt werden, da die Neurone dann unter Kulturbedingungen im Inkubator befeldet werden können. Die höheren Viabilitäten unter diesen Bedingungen ermöglichen eine verlässliche Quantifizierung. In dieser Kammer wurden bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt und dementsprechend wenige Parameter untersucht. Die bisherigen Ergebnisse sind nicht eindeutig (P. Schulte, FZ Jülich, mündliche Mitteilung), was daran liegen könnte, dass in diesen Experimenten serumfrei kultiviert wurde.

Die wenigen Untersuchungen, die zusätzlich mit Neuronen aus embryonalen Hühnerhirnen durchgeführt wurden, waren ebenfalls nicht eindeutig. Es müssten hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden, beispielsweise unter Feldapplikation über Elektroden, die näher beieinander liegen. Daneben wäre es vielleicht von Vorteil, die MEAs mit Substraten zu beschichten, die dem Auswachsen von Neuriten/Axonon förderlich sind (z. B. PDL) und die Clusterbildung reduzieren. Auch hier könnten vorab Untersuchungen mit gepulsten Magnetfeldern durchgeführt werden. Empfehlenswert ist in jedem Fall die Verwendung geringer Zelldichten.

Da die Befeldungen weder bei Insekten- noch bei Hühnerneuronen einen eindeutigen Effekt gezeigt haben, obwohl dies, zumindest aus theoretischer Sicht, nicht nachvollziehbar ist, könnte auch ein systematischer Fehler vorliegen. Daher wäre es wünschenswert, Neurone zu testen, für die schon gezeigt wurde, dass ihre Ausläufer in elektrischen Feldern gerichtet wachsen.

Literaturverzeichnis

Albrecht D.R., Sah R.L., Bhatia S.N. (2004). Geometric and material determinants of patterning efficiency by dielectrophoresis. *Biophys J* **87**, 2131-47.

Albrecht D.R., Tsang V.L., Sah R.L., Bhatia S.N. (2005). Photo- and electro-patterning of hydrogel-encapsulated living cell arrays. *Lab Chip* **5**, 111-8.

Alder G.M., Arnold W.M.C., Bashford L., Drake A.F., Pasternak C.A., Zimmermann U. (1991). Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* **1061(1)**, 111-20.

Alp B., Andrews J.S., Mason V.P., Thompson I.P., Wolowacz R., Markx G.H. (2003). Building structured biomaterials using AC electrokinetics. *IEEE Eng Med Biol* **22(6)**, 91-7.

Ashkin A., Dziedzic J.M., Yamane T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* **330**, 769-71.

Basset C.A.L., Pawluk R.J., Pilla A.A. (1974). Augmentation of bone repair by inductively-coupled electromagnetic fields. *Science* **184**, 575-7.

Bear M.F., Barry C.W., Paradiso M.A. (1999). In: Neuroscience: Exploring the brain. (Eds.: Lippincott, Williams und Wilkins), 2nd ed. Baltimore, S. 147f.

Bedlack R.S., Wei M.-D., Loew L.M. (1992). Localized membrane depolarizations and localised calcium influx during electric-field-guided neurite growth. *Neuron* **9**, 393-403.

Borgens R.B., Blight A.R., McGinnis M.E. (1990). Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric fields. *J Comp Neurol* **296**, 634-53.

Borgens R.B., Metcalf M.E.M., Blight A.R. (1993). Delayed application of direct current electric fields in experimental spinal cord injuries. *Restor Neurol Neurosci* **162**, 1-7.

Borgens R.B., Bohnert D.M. (1997). The responses of mammalian spinal axons to applied DC voltage gradients. *Exp Neurol* **145**, 376-89.

Borgens R.B. (1999). Electrically mediated regeneration and guidance of adult mammalian spinal axons into polymeric channels. *Neurosci* **91**, 251-64.

Brushart T.M., Al-Majed A.A., Gordon T., Neumann C.M. (2000a). Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* **20(7)**, 2602-8.

Brushart T.M., Al-Majed A.A., Gordon T., Neumann C.M. (2000b). Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* **12(12)**, 4381-90.

Brushart T.M., Hoffman P.N., Royall R.M., Murinson B.B., Witzel C., Gordon T. (2002). Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* **22(15)**, 6631-8.

Burrows M. (1996). The Neurobiology of an Insect Brain. *Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo*.

Cayre M., Buckingham S.D., Strambi A., Strambi C., Sattelle D.B. (1998). Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. *Cell Tiss Res* **291**, 537-47.

Cayre M., Buckingham S.D., Yagodin S., Sattelle D.B. (1999). Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine. *J Neurophysiol* **81**, 1-14.

Chu S. (1991). Laser manipulation of atoms and particles. *Science* **253**, 861-6.

Chow G. und Pine J. (2005). *Proceedings society for neuroscience, Washington DC.*

Cui L. und Morgan H. (2000). Design and fabrication of travelling wave dielectrophoresis structures. *J Micromech Microeng* **10**, 72-9.

Cui L., Holmes D., Morgan H. (2001). The dielectrophoretic levitation and separation of latex beads in microchips. *Electrophoresis* **22**, 3893-901.

Davenport R.W. und Kater S.B. (1992). Local increases in intracellular calcium elicit local filopodia responses in *Helisoma* neuronal growth cones. *Neuron* **9**, 405-16.

Davis R.L. (1993). Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* **11**, 1-14.

Dertinger S.K., Jiang X., Li Z., Murthy V.N., Whitesides G.M. (2002). Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specifications of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12542-7.

Dettner K. und Peters W. (Hrsg.) (2003). Lehrbuch der Entomologie. 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.*

Docoslis A., Kalogerakis N., Behie L., Kaler K.V.I.S. (1997). A novel dielectrophoretic based device for the selective retention of viable cells in cell culture media. *Biotech Bioeng* **54(3)**, 239-50.

Dürr M. (2003). Mikrofluidikstrukturen mit integrierten Elektrodenarrays zur dielektrophoretischen Manipulation von sub- μm Partikeln. *Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.*

Erickson J., Chow G., Tooker A., Tai Y.-C., Pine J. (2006). Progress on the caged-neuron MEA project. *Poster, 5. MEA-Meeting in Reutlingen, Deutschland.*

Feynman R.P., Leighton R.B., Sands M. (2001). Vorlesungen über Physik. *Oldenbourg-Wissenschaftsverlag, München, Deutschland.*

Frénéa M., Faure S.P., Le Fioufle B., Coquet Ph., Fujita H. (2003). Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Mat Sci Eng C* **23**, 597-603.

Fuhr G. (1985). Über die Rotation dielektrischer Körper in rotierenden Feldern. *Dissertation, Humboldt Universität, Berlin.*

Fuhr G., Müller T., Schnelle T., Hagedorn R., Voigt A., Fiedler S. (1994). Radio-frequency microtools for particle and live cell manipulation. *Naturwissenschaften* **81**, 528-35.

Fuhr G., Schnelle T., Müller T., Glasser H., Lisec T., Wagner B. (1995a). Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and travelling waves. *Sensors and Materials* **7**, 131-46.

Fuhr G. und Shirley S.G. (1995b). Cell handling and characterization using micron and submicron electrode arrays: state of the art and perspectives of semiconductor microtools. *J Micromech Microeng* **5**, 77-85.

Fuhr G. und Reichle C. (2000). Living cells in opto-electrical cages. *Trends in analytical chemistry* **19**, 402-9.

Gascoyne P.R.C., Huang Y., Pethig R., Vykoukal J.V., Becker F.F. (1992). Dielectrophoretic separation of mammalian cells studied by computerized image analysis. *Measurement Science and Technology* **3**, 439-45.

Gascoyne P.R.C., Wang X.-B., Huang Y., Becker F.F. (1997). Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood. *IEEE Trans Ind Appl* **33(3)**, 670-8.

Gascoyne P.R.C. und Vykoukal J.V. (2002). Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 1973-83.

Gascoyne P.R.C. und Vykoukal J.V. (2004). Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments. *Proc IEEE* **92(1)**, 22-42.

Gimsa J., Glaser R., Fuhr G. (1991). Theory and application of the rotation of biological cells in rotation electric fields: In: *Physical characterisation of biological cells.* (Eds.: Schütt W., Klinkmann H., Lamprecht I., Wilson T.) *Gesundheit, Berlin*, 295-323.

Gonzales C.F. und Remcho V.T. (2005). Harnessing dielectric forces for separations of cells, fine particles and macromolecules. *J Chromatogr A* **1079**, 59-68.

Gramowski A., Schiffmann D., Gross G.W. (2000). Quantification of acute neurotoxic effects of trimethyltin using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *NeuroToxicology* **21**, 331-42.

Gramowski A., Jügelt K., Weiss D.G., Gross G.W. (2004). Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *Eur J Neurosci* **19**, 2815-25.

Grattarola M. und Martinoia S. (1993). Modeling the neuron-microtransducer junction: From extracellular to patch recording. *IEEE Trans Biomed Eng* **40**, 35–41.

Gray D.S., Tan J.L., Voldman J., Chen C.S. (2004). Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array. *Biosens Bioelectron* **19**, 1765-74.

Green N.G., Hughes M.P., Monaghan W., Morgan H. (1997). Large area multilayered electrode arrays for dielectrophoretic fractionation. *Microelec Eng* **35**, 421-4.

Gross G.W., Rieske E., Kreutzberg G.W., Meyer A. (1977). A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity *in vitro*. *Neurosci Lett* **6**, 101-6.

Gross G.W. (1979). Simultaneous single unit recording *in vitro* with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Trans Biomed Eng* **26**, 273-8.

Gross G.W., Rhoades B.K., Azzazy H.M.E., Wu M.C. (1995). The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosens Bioelectron* **10**, 553-67.

Gross G.W., Norton S., Gopal K., Schiffmann D., Gramowski A. (1997). Nerve cell network *in vitro*: Applications to neurotoxicology, drug development and biosensors. *Cell Eng* **2**, 138-47.

Hagedorn R., Fuhr G., Müller T., Gimsa J. (1992). Travelling-wave dielectrophoresis of microparticles. *Electrophoresis* **13**, 49-54.

Hammarback J.A., Palm S.L., Furcht L.T., Letourneau P.C. (1985). Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin. *J Neurosci Res* **13**, 213-20.

Heida T., Rutten W.L., Marani E. (2001). Dielectrophoretic trapping of dissociated fetal cortical rat neurons. *IEEE Trans Biomed Eng* **48**, 921-30.

Heida T. (2003). Electric field-induced effects on neuronal cell biology accompanying dielectrophoretic trapping. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **173(III–IX)**, 1-77.

Ho C.-T., Lin R.-Z., Chang W.-Y., Chang H.-Y., Liu C.-H. (2006). Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab Chip* **6**, 724-34.

Huang Y., Wang X.B., Holzel R., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (1995). Electro-rotational studies of the cytoplasmic dielectric properties of friend murine erythroleukaemia cells. *Phys Med Biol* **40(11)**, 1789-1806.

Huang Y., Wang X.B., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (1996). Membrane changes associated with the temperature-sensitive P85gag-mos- dependent transformation of rat kidney cells as determined by dielectrophoresis and electrorotation. *Biochim Biophys Acta* **1282(1)**, 76-84.

Huang Y., Wang X.B., Becker F.F. and Gascoyne P.R.C. (1997). Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation. *Biophys J* **73**, 1118-29.

Ito H., Basset C.A.L. (1983). Effect of weak, pulsing electromagnetic fields on neural regeneration in the rat. *Clin Orthoped Related Res* **181**, 283-90.

Jaffe L.F. und Poo M.-M. (1979). Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady electric field. *J Exp Zool* **209**, 115-28.

James C.D., Spence A.J.H., Dowell-Mesfin N.M., Hussain R.J., Smith K.L., Craighead H.G., Isaacson M.S., Shain W., Turner J.N. (2004). Extracellular recordings from patterned neuronal networks using planar microelectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* **51(9)**, 1640-8.

Jan L.Y. und Jan Y.N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2700-4.

Jimbo Y., Robinson H.P.C., Kawana A. (1993). Simultaneous measurement of intracellular calcium and electrical activity from patterned neural networks in culture. *IEEE Trans Biomed Eng* **40(8)**, 804-10.

Jimbo, Y., Robinson H.P., Kawana A. (1998). Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: Application of planar electrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* **45**, 1297-304.

Jimbo Y., Kawana A., Parodi P., Torre V. (2000). The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. *Biol Cybern* **83**, 1-20.

Jones T.B. und Kaler K.V.I.S. (1990). Relationship of rotational and dielectrophoretic cell spectra. *Ann Int Con IEEE Eng Med Biol Soc* **12(4)**, 1515-6.

Jones T.B. (1995). Electromechanics of particles. *Cambridge University Press, New York*.

Kaler K.V.I.S. und Jones T.B. (1990). Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation. *Biophys J* **57**, 173-82.

Kaler K.V.I.S., Xie J.P., Jones T.B., Paul R. (1992). Dual-frequency dielectrophoretic levitation of *Canola* protoplasts. *Biophys J* **63**, 58-69.

Keefer E.W., Gramowski A., Gross G.W. (2001). NMDA receptor-dependent periodic oscillations in cultured spinal cord networks. *J Neurophys* **86**, 3030-42.

Kleinfeld D., Kalher K.H., Hockberger P.E. (1988). Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *J Neurosci* **8**, 4098–120.

Kopp M., de Mello A.J., Manz A. (1998). Chemical Amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* **280**, 1046–48.

Kumar A., Whitesides G.M. (1993). Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *App Phys Let* **63**, 2002-3.

Lauer L., Vogt A., Yeung C.K., Knoll W., Offenhäusser A. (2002). Electrophysiological recordings of patterned rat brain stem slice neurons. *Biomat* **23**, 3123-30.

Loesel R., Weigel S., Bräunig P. (2006). A simple fluorescent double staining method for distinguishing neuronal and glial cells in the insect central nervous system *in situ* and in culture. *J Neurosci Meth* **155**, 202–206.

Macias M.Y., Battocletti J.H., Sutton C.H., Pintar F.A., Maiman D.J. (2000). Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field simulation. *Bioelectromagnetics* **21**, 272-86.

Maher M.P., Pine J., Wright J., Tai Y.C. (1999). The neurochip: a new multi-electrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *J Neurosci Meth* **87**, 45-56.

Markx G.H., Huang Y., Zhou X.-F. (1994). Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms. *Microbiology* **140**, 585-91.

Markx G.H. und Pethig R. (1995). Dielectrophoretic separation of cells: Continuous separation. *Biotech Bioeng* **45**, 337-43.

Markx G. H., Rousselet J., Pethig R. (1997). DEP-FFF: field-flow fractionation using non-uniform electric fields, *J Liq Chrom Rel Technol* **20**, 2857-72.

McCaig C.D. (1986). Electric fields, contact guidance and the direction of nerve growth. *J Embryol Exp Morph* **94**, 245-55.

McCaig C.D., Allan D.W., Erskine L., Rajnicek A.M., Stewart R. (1994). Growing nerves in an electric field. *Neuroprotocols* **4**, 134-41.

McCaig C.D. und Zhao M. (1997). Physiological electrical fields modify cell behavior. *BioEssays* **19(9)**, 819-26.

McCaig C.D., Sangster L., Stewart R. (2000). Neurotrophines enhance electric field-directed growth cone guidance and directed nerve branching. *Dev Dyn* **217**, 299-308.

McCaig C.D., Rajnicek A.M., Song B., Zhao M. (2005). Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiol Rev* **85**, 943-78.

McLaughlin S. und Poo M.-M. (1981). The role of electro-osmosis in the electric-field-induced movement of charged macromolecules on the surface of cells. *Biophys J* **34**, 85-93.

Merz M. und Fromherz P. (2002). Polyester microstructures for topographical control of outgrowth and synapse formation with snail neurons. *Adv Mater* **14**, 141-4.

Merz M. (2004). Topologically defined neuronal networks controlled by silicon chips. *Dissertation*. Technische Universität, München.

Merz M. und Fromherz P. (2005). Silicon chip interfaced with a geometrically defined net of snail neurons. *Adv Funct Mater* **15**, 739-44.

Meschede D. (2002). Gerthsen Physik. *Springer Verlag*.

Morgan H., Hughes M.P., Green N.G. (1999). Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophys J* **77**, 516-25.

Morgan H., Izquierdo A.G., Bakewell D., Green N.G., Ramos A. (2001). The dielectrophoretic and travelling wave forces generated by interdigitated electrode arrays: analytical solution using Fourier series. *J Phys D: Appl Phys* **34**, 1553-61.

Morgando-Valle C., Verdugo-Díaz L., García D.E., Morales-Orozco C., Drucker-Colín R. (1998). The role of voltage-gated Ca^{2+} channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (EML) magnetic field stimulation. *Cell Tiss Res* **291**, 217-30.

Moroney R.M., White R.M., Howe R.T. (1991). Ultrasonically induced micro-transport. *Proc IEEE MEMS* **91**, 277-82.

Müller T., Gradl G., Howitz S., Shirley S.G., Fuhr G. (1999). A 3D-micro electrode for handling and caging single cells and particles. *Biosens Bioelectron* **14**, 247-56.

Nachtigall W. (1997). Vorbild Natur. *Springer-Verlag*, 1997.

Oberti S., Neild A., Dual J. (2006). Manipulation of single and multiple cells with acoustic forces. *Vortrag, 1st IDEA League Summer School, Ascona, Schweiz*.

Orgel M.G., O'Brian W.J., Murray H.M. (1984). Pulsing electromagnetic field therapy in nerve regeneration: an experimental study in the cat. *Plastic and Reconstructive Surgery* **73**, 173-83.

Ottani V., Depasquale V., Govoni P., Franchi M., Zaniol P., Ruggeri X. (1988). Effect of pulsed extremely-low-frequency magnetic fields on skin wounds in the rat. *Bioelectromagnetics* **9**, 53-62.

Ozkan M., Ozkan C.S., Kibar O., Wang M.M., Bhatia S.N., Esener S.C. (2001). Heterogeneous integration through electrokinetic migration. *IEEE Eng Med Biol* **20(6)**, 881-8.

Ozkan M., Pisanic T., Scheel J., Barlow C., Esener S., Bhatia S.N. (2003). Electro-optical platform for the manipulation of live cells. *Langmuir* **19**, 1532-8.

Patel N. und Poo M.-M. (1982). Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *J Neurosci* **2**, 483-96.

Patel N. und Poo M.-M. (1984). Perturbation of the direction of neurite growth by pulsed and focal electric fields. *J Neurosci* **12(4)**, 2939-47.

Pethig R., Huang Y., Wang X.B., Burt J.P.H. (1992). Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes. *J Phys D: Appl Phys* **24**, 881-8.

Pethig R., Burt J.P.H., Parton A., Rizvi N., Talary M.S., Tame J.A. (1998). Development of biofactory-on-a-chip technology using excimer laser micromachining. *J Micromech Microeng* **8**, 57-63.

Pethig R., Talary M.S., Lee R.S. (2003). Enhancing travelling-wave dielectrophoresis with signal superposition. *IEEE Eng Med Biol* **22**, 43-50.

Pine J., Gilbert J. (1982). Studies of cultured cells in dishes incorporating integral microcircuit electrodes. *Neurosci Abst* **8**, 670-86.

Pohl H.A. (1951). The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *J Appl Phys* **22**, 869-71.

Pohl H.A. (1978). Dielectrophoresis: The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields. *Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York*.

Prasad S., Yang M., Zhang X., Cengiz S., Ozkan C.S. & M. (2003). Electric field assisted patterning of neuronal networks for the study of brain functions. *Biomed Microdev* **5(2)**, 125-37.

Prasad S., Zhang X., Yang M., Ni Y., Parpura V., Ozkan C.S. & M. (2004). Separation of individual neurons using dielectrophoretic alternative current fields. *J Neurosci Meth* **135**, 79-88.

Prigogine I. und Stengers I. (1981). Dialog mit der Natur – neue Wege wissenschaftlichen Denkens. *München und Zürich, Piper Verlag*.

Prigogine I. (1982). Vom Sein zum Werden. *München, Piper Verlag*.

Reska A. (2005). Elektrophysiologische Charakterisierung neuronaler Netzwerke von Insekten *in vitro*. *Diplomarbeit*. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

Rutten W., Mouveroux J.-M., Buitenweg J., Heida C., Ruardij T., Marani E., Lakke E. (2001). Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe. *Proc IEEE* **89(7)**, 1013-29.

Scharnweber R.F., Brewer J.G., Wheeler B.C. (2005). Polarized axon growth of hippocampal neurons cultured on tapered lines of laminin. *Abs Soc Neurosci* **31**, 249.11.

Scharnweber R.F., Brewer J.G., Wheeler B.C. (2006). Polarized axon growth of hippocampal neurons cultured on tapered lines of laminin. *Poster, 5. MEA-Meeting in Reutlingen, Deutschland*.

Schnelle T., Müller T., Voigt A., Reimer K., Wagner B., Fuhr G. (1996). Adhesion-inhibites surfaces. Coated and uncoated interdigitated electrode arrays in the micrometer and submicrometer range. *Langmuir* **12**, 801-9.

Schnelle T., Müller T., Fiedler S., Shirley S.G., Ludwig K., Herrmann A., Fuhr G., Wagner B., Zimmermann U. (1996). Trapping of viruses in high-frequency electric field cages. *Naturwissenschaften* **83**, 172-6.

Schnelle T., Müller T., Gradl G., Fuhr G. (1999). Paired micro electrode system: Dielectrophoretic particle sorting and force calibration. *J Electrostat* **47(3)**, 121-32.

Schnelle T., Müller T., Fuhr G. (2000). Trapping in ac octode field cages. *J Electrostat* **50**, 17-29.

Schnelle T., Müller T., Gradl G., Shirley S.G., Fuhr G. (2000). Dielectrophoretic manipulation of suspended submicron particles. *Electrophoresis* **21**, 66-73.

Shahaf G. und Marom S. (2001). Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci* **21(22)**, 8782-8.

Sisken B.F., Kanje M., Lundborg G., Herbst E., Kurtz W. (1989). Stimulation of rat sciatic nerve regeneration with pulsed electromagnetic fields. *Brain Res* **485**, 309-16.

Sisken B.F., Orgel M., Walker J. (1993). Prospects on clinical applications of electrical stimulation for nerve regeneration. *J Cell Biochem* **51(4)**, 404-9.

Song H.J., Ming G.-I., Poo M.-M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* **388**, 275-9.

Song B., Zhao M., Forrester J., McCaig C. (2004). Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field *in vivo*. *J Cell Sci* **117(20)**, 4681-90.

Stenger D.A., Gross G.W., Keefer E.W., Shaffer K.M., Andreadis J.D., Ma W., Pancarzio J.J. (2001). Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends Biotech* **19(8)**, 304-9.

Stewart R., Erskine L., McCaig C.D. (1995). Calcium channel subtypes and intracellular calcium stores modulate electric field-stimulated and oriented nerve growth. *Dev Biol* **171**, 340-51.

Stoppini L., Duport S., Correges P.L. (1997). A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures. *J Neurosci Meth* **72**, 23-33.

Stuchly M.A. (1983). Fundamentals of the interactions of radio-frequency and microwave energies with matter. In: Grandolfo M., Michaelson S.M. und Rindi A. (Eds.): *Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiaton*.

Sun B. und Salvaterra P.M. (1995). Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. *J Neurochem* **65**, 434-43.

Tipler P.A. (1994). Physik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford*.

Torimitsu K. und Kawana A. (1990). Selective growth of sensory nerve fibers on metal oxide patterns in culture. *Dev Brain Res* **51**, 128–31.

Van Pelt J., Wolters P.S., Corner M.A., Rutten W.L.C., Ramakers G.J.A. (2004). Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE TBME* **51**, 2051-206.

Vogt A.K., Brewer G.J., Decker T., Böcker-Meffert S., Jacobsen V., Kreiter M., Knoll W., Offenhäusser A. (2005). Independence of synaptic specificity from neuritic guidance. *Neurosci* **134**, 783-790.

Vörös J., Tang C.S., Städler B., Halter M., Bally M., Grieshaber D., Gabi M., Keller B. (2006). Electronically switchable surfaces for microelectrode array applications. *Poster, 5. MEA-Meeting in Reutlingen, Deutschland.*

Wagenaar D.A., Madhavan R., Pine J., Potter S.M. (2005). Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci* **25(3)**, 680-8.

Wang X.B., Pethig R., Jones T.B. (1992). Relationship of dielectrophoretic and electrorotational behaviour exhibited by polarized particles. *J Phys D: Appl Phys* **25**, 905-12.

Wang X.B. und Huang Y. (1993). Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells. *J Phys D, Appl Phys* **26**, 1278-85.

Wang X.B., Huang Y., Hölzel R., Burt J.P.H., Pethig R. (1993). Theoretical and experimental investigations of the interdependence of dielectric, dielectrophoretic and electrorotational behaviour of colloidal particles. *J Phys D: Appl Phys* **26**, 312-22.

Wang X.B., Huang Y., Gascoyne P.R.C., Becker F.F., Hölzel R., Pethig R. (1994). Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation. *Biochim Biophys Acta* **1193(2)**, 330-44.

Wang X.B., Huang Y., Gascoyne P.R.C., Becker F.F. (1997). Dielectrophoretic manipulation of cells with spiral electrodes. *IEEE Trans Ind Appl* **33(3)**, 660-8.

Wang X.B., Vykoukal J., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (1998). Separation of polystyrene microbeads using dielectrophoretic / gravitational field-flow-fractionation. *Biophys J* **74**, 2689-701.

Wang X.B., Yang J., Huang Y., Vykoukal J., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (2000). Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Anal Chem* **72**, 832-39.

Weigel S. (2006). Primary neuronal culture of *Locusta migratoria* for construction of networks on microelectronic recording devices. *Dissertation*. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

Yang J., Huang Y., Wang X.B., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (1999). Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field-flow fractionation. *Anal Chem* **71**, 911-8.

Yang J., Huang Y., Wang X.B., Becker F.F., Gascoyne P.R.C. (2000). Differential analysis of human leucocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Biophys J* **78**, 2680-9.

Yen-Patton G.P.A., Patton W.F., Beer D.M., Jacobson B.S. (1988). Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis *in vitro*. *J Cell Physiol* **134**, 37-46.

Yu Z., Xiang G., Pan L., Huang L., Yu Z., Xing W., Cheng J. (2004). Negative dielectrophoretic force assisted construction of ordered neuronal networks on cell positioning bioelectronic chips. *Biomed Microdev* **6(4)**, 311-24.

Zeck G. und Fromherz P. (2001). Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10457-62.

Zheng J.Q., Felder M., Connor J.A., Poo M.-M. (1994). Turning of growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* **368**, 140-4.

Zheng J.Q., Wan J., Poo M.-M. (1996). Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci* **16**, 1140-9.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Fachtermini

20-HE	20-Hydroxy-Ecdyson
μCP	Mikro-Kontakt-Printing (<i>engl.</i> micro contact printing)
AC	Wechselstrom (<i>engl.</i> alternating current)
ACh	Acetylcholin
AD	Analog-Digital
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
αHRP	anti Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> anti horseradish peroxidase)
AP	Aktionspotential
Aq. dest.	destilliertes Wasser (<i>lat.</i> Aqua destillatum)
Au	Gold
BDNF	aus dem Gehirn stammender neurotropher Faktor (<i>engl.</i> brain derived neurotrophic factor)
Ca ²⁺	Kalzium
CHF ₃	Trifluormethan
CF ₄	Tetrafluormethan
Ca(NO ₃) ₂	Kalziumdinitrat
CM	Clausius-Mosotti-Faktor
ConA	Concanavalin A
CY3	Carbocyanin-3
DACS	Dielektrophorese-gestützte Zellsortierung (<i>engl.</i> dielectrophoretically activated cell sorting)
DAPI	4'-6-Diamino-2-Phenylindol
DC	Gleichstrom (<i>engl.</i> direct current)
DEP	Dielektrophorese
DEP-FFF	Dielektrophoretische Feld-Fluss-Fraktionierung
DIV(<i>Zahl</i>)	Tage in Kultur (<i>engl.</i> days <i>in vitro</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure

E(Zahl)	Embryonalstadium (in Tagen)
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzgestützte Zelltrennung (engl. fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FEM	Finite-Elemente-Methode
FETi	Fast-Extensor Tibiae
FITC	Fluoreszeinisothiocynat
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfat-Säure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
<i>in situ</i>	in natürlicher Lage, im Körper (lat. am (Ursprungs-) Ort, am Platz)
<i>in vivo</i>	die im lebenden Organismus (lat. im Lebenden)
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus (lat. im Glas)
KCl	Kaliumchlorid
L-15	Leibowitz L-15 Medium
MACS	Magnetfeldgestützte Zelltrennung (engl. magnetic field activated cell sorting)
MEA	Multi(bzw. Mikro)-Elektroden-Array (engl. multi/micro electrode array)
Mg ²⁺	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nDEP	negative Dielektrophorese
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. nerve growth factor)
NSS	Schweineserum (engl. normal swine serum)
NT-3/NT-4	Neurotrophin-3 bzw. 4
ONO	Oxid-Nitrid-Oxid (SiO ₂ –Si ₃ N ₄ –SiO ₂)
pDEP	positive Dielektrophorese

PECVD	Plasmaunterstützte Gasphasenabscheidung (<i>engl.</i> plasma enhanced chemical vapour deposition)
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphatpuffer
PC12	Pheochromocytoma (12)
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PDL	Poly-D-Lysin
PDMS	Poly-Dimethyl-Siloxan
PLL	Poly-L-Lysin
Pt	Platin
RIE	reaktives Ionenätzen (<i>engl.</i> reactive ion etching)
starPEG	sternförmiges Poly-Ethylen-Glykol
Ti	Titan
TWD	Wanderwellendielektrophorese (<i>engl.</i> travelling wave dielectrophoresis)
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

Formelzeichen, Einheiten (Einheiten in eckigen Klammern)

*	kennzeichnet komplexe Größen
A	Fläche bzw. Querschnittsfläche oder [Ampere]
C	Kapazität oder [Coulomb]
Δ	Differenz
d	Abstand (Elektrodenabstand und Breite) oder Durchmesser
e	Elementarladung
E, $\vec{E}$	elektrisches Feld
$\epsilon_{\text{Medium/Zelle/0}}$	Permittivität des Mediums, der Zelle, des Vakuums
f	Frequenz
F _C	Coulombkraft
F _S	Sedimentationskraft

$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle$	zeitlich gemittelte dielektrophoretische Kraft
F_{Stokes}	Stoke'sche Reibungskraft
g	Erdbeschleunigung
η	Viskosität
h	Höhe
I	elektrischer Strom
Im	Imaginärteil
j	imaginäre Einheit $j = \sqrt{-1}$
κ	Leitwert (Kehrwert des Widerstandes)
m	Masse
$\vec{m}$	Dipolmoment
μ	elektrophoretische Mobilität
∇	Nabla-Operator (partielle Ableitung in 3 Dimensionen)
ω	Kreisfrequenz
φ	Phase
Ψ	elektrisches Potential
$\vec{Q}$	Quadrupol-Tensor
q	(Netto-)Ladung
r	Radius
Re	Realteil
ρ	Dichte oder spezifischer Widerstand
rms	zeitliches Mittel (<i>engl.</i> root-mean-square)
σ	Leitfähigkeit
t	Zeit
U	Spannung
v, ν	Geschwindigkeit
V	Spannung oder [Volt]
V_{pp}	Spannung (Spitze zu Spitze, <i>engl.</i> peak-to-peak) oder [Volt _{pp}]
z	Anzahl der effektiven Ladungen eines Stoffes

Chemikalien – Bezugsquellen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Substanzen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

20-Hydroxyecdysen

ConcanavalinA

FCS VWR International

Fungizone

DAPI

Dimethylsilan

Dispase Gibco, Invitrogene Corporation

Ethanol VWR International

Fructose

Glucose

Glutamax I Invitrogene Corporation

HBSS

HEPES

Imidazol VWR International

Insulin

Laminin VWR International

Leibowitz L-15

L-Glutamin VWR International

L-Prolin VWR International

Mannose VWR International

MgCl₂ VWR International

NeodisherGK VWR International

NGF

NSS Dakocytomation

NT-3 Millipore Corporation

Paraformaldehyd

Penicillin/Streptomycin

Poly-D-Lysin

Poly-L-Lysin

Texasrot-Dextran Invitrogene Corporation

Verwendete Programme

Axiovision	Carl Zeiss, Deutschland
Corel Draw 11	Corel Corporation, USA
Excel 2002	Microsoft Corporation, USA
Origin 6.5	OriginLab Corporation, USA
Spike2 (Version3.18)	Cambridge Electronic Design, UK
The Gimp 2.2	Freeware unter www.gimp.org
Word 2002	Microsoft Corporation, USA

Danksagung

Über Erfolg oder Misserfolg eines Unterfangens entscheidet in vielen Fällen der Kontext. Bioniker sind tendenziell Generalisten und damit auf die Hilfe von Spezialisten angewiesen. Auch ist die Idee einer Sache noch nicht die Sache selbst – und so danke ich allen Praktikern, die zur Realisierung der Ideen beigetragen haben. Wissenschaftliches Arbeiten ist eine emotionale Berg- und Talfahrt, und so gebührt vor allem auch jenen Dank, die sie durch Ermunterungen, Verständnis oder einfach nur ihr Dasein schöner gestaltet haben.

Herrn Prof. Dr. P. Bräunig gilt besonderer Dank für die Überlassung des spannenden Themas und die Unterstützung auf allen Ebenen - fachlich, praktisch und emotional. Seine Ideen und Anregungen sowie sein Vertrauen haben einen wesentlichen Anteil zum Gelingen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. A. Offenhäusser danke ich für die großzügige Unterstützung mit Know-how, Materialien und Technologien aus seinem Institut. Ohne diese Kooperation hätte diese Arbeit nicht realisiert werden können. Darüber hinaus möchte ich mich dafür bedanken, dass er, trotz seiner knapp bemessenen Zeit, die Zweitkorrektur übernommen hat.

Herrn Dr. S. Weigel möchte ich für seine Vorarbeiten und die Einweisung in die Zellkultur danken. Durch sein offenes Ohr, seine Hilfsbereitschaft und sein Wissen war er, ebenso wie Frau Dr. P. Schulte, Frau Dr. S. Böcker-Meffert und Herr Dr. S. Ingebrandt vom FZ Jülich, eine wertvolle und unverzichtbare Hilfe.

Herrn T. Künzel danke ich fachlich für anregende Gespräche und die Bereitstellung von Materialien, privat für die Bereicherung der Klettersessions.

Herrn B. Mönig möchte ich für die fachlichen Diskussionen, aber auch für die philosophischen und menschlichen Diskurse danken, die ich sehr genossen habe.

Julia Krüger, die mich gleich in mehreren End- und Anfangsphasen unterstützt hat und dies noch immer tut, danke ich für ihre Liebe. Schön, dass wir zusammen „brahmsten“.

Sandra Brill möchte ich für die schöne Zeit danken, die wir miteinander verbracht haben. Danke für deinen Mut und deine Klugheit.

Allen technischen Mitarbeitern der Biologie 2 und des ISG-2, insbesondere Hr. A. Steckiewicz, Fr. A. Weth, Hr. Tetzl, Fr. S. Scholz, Fr. R. Helpenstein, Hr. S. Schaal, Hr. M. Banzet, und den Mitarbeitern der Werkstätten, ohne deren Fertigkeiten und Wissen viele Dinge nur Ideen geblieben wären.

Vom Institut der Werkstoffe der Elektrotechnik IWE-1 möchte ich Herrn Prof. Dr. Mokwa und Herrn Dr. Schnakenberg für ihre Unterstützung danken. Als hilfsbereiter Exekutive möchte ich dort besonders Herrn A. Buchenauer danken, der schneller fertig ist, als ich konstruieren kann.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn V. Buck und Herrn F. Stibany, die im Rahmen ihres Studiums einen Forschungsblock bei mir gemacht haben oder als hilfswissenschaftliche Kräfte zur Arbeit beigetragen haben.

Ebenso danke ich allen anderen Mitarbeitern der Biologie 2 der RWTH-Aachen und des Institutes für Schichten und Grenzflächen des Forschungszentrums Jülich, die ich hier namentlich nicht erwähnt habe.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. W. Nachtigall und Herrn Dr. U. Warnke, die, jeder auf seine Weise, Vorbild und Mentor für mich waren. Sie haben mein Denken maßgeblich beeinflusst.

Meinem Kung-Fu-Lehrer Herrn Choi möchte ich für die vielen schönen und anstrengenden Lehrjahre danken, die mich geprägt und geformt haben. Kampfkunst ist Lebenskunst.

Nach dem Kampf kommt der Tanz. Und so möchte ich auch Frau C. Giesen und Herrn T. Müller dafür danken, dass sie einem alten Knochen wie mir Mut gemacht haben und mich fördern und fordern, um die Kunst des Tanzes zu erlernen. Tanzen macht Freude.

Besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern. Ihnen möchte ich vor allem für ihre Unterstützung, ihre Geduld, ihr Vertrauen und die Ermutigung während der Studienzeit und Promotion danken. Sie haben den Wissensdurst geweckt und gefördert, der mich zur Wissenschaft gebracht hat. Meinem Vater möchte ich an dieser Stelle auch für seine kompetente Korrektur der Arbeit danken.

Schlussendlich möchte ich Henriette Zessner danken, die mich fast die Hälfte meines Lebens begleitet hat. Was ich ihr verdanke, lässt sich nicht in Worte fassen.

Diese Arbeit wurde von der Helmholtz-Gemeinschaft im Rahmen des *virtuellen Instituts für Biohybrid-Technologie (vIBHT)* gefördert.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Nico Lautemann
geb. 19.07.1973
in Neunkirchen/Saar

Schulausbildung:

1980-1984 Grundschole in Ottweiler
1984-1989 Gymnasium in Ottweiler
1989-1994 Saarpfalz-Gymnasium in Homburg, Abschluss: Abitur

Zivildienst:

1994-1995 Rettungssanitäter, Rotes Kreuz Ottweiler

Studium:

1995-2003 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes.
Schwerpunkt: Technische Biologie und Bionik.
Abschluss: Diplom-Biologe
seit 01.03.2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der RWTH Aachen
im Fachbereich Biologie (Biologie 2, Morphologie und Entwicklungsbiologie) unter der Betreuung von Prof. Dr. P. Bräunig

Berufstätigkeit:

1997-2002 Hilfwissenschaftliche Tätigkeit an der Universität des Saarlandes (Fachbereich Biologie: Prof. Dr. Nachtigall (Zoologie und Zoophysiologie), Dr. Warnke (Technische Biomedizin und Umweltmedizin))