

Einzelzell-Proteinanalytik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dominik Kunibert Greif

aus Riol

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

September 2012

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den

(Dominik Greif)

Diese Arbeit entstand in der Abteilung für Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften in der Fakultät für Physik an der Universität Bielefeld.

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Thomas Huser

In ewigem Gedenken an meine lieben Großeltern
Agnes Greif und Hans Herbert Greif!

„Παντα ρει!“, (Heraklit, 500 v.Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Motivation.....	6
2	Grundlagen/Theoretischer Hintergrund	8
2.1	Grundlagen und Historie der Mikrofluidik	8
2.2	Mikrochip-Elektrophorese.....	10
2.3	Mikrochip-Zellkultivierung und Langzeitbeobachtung.....	16
2.4	Fluoreszenzdetektion von Proteinen	19
2.5	Zellen	25
2.5.1	Sf9 Insektenzellen.....	26
2.5.2	Das Bodenbakterium <i>Sinorhizobium meliloti</i>	27
3	Experimenteller Aufbau	29
3.1	UV/VIS-LIF Detektion.....	29
3.2	UV/VIS-LIF parallele Detektion.....	32
3.3	Fluoreszenzmikroskop.....	37
4	Material und Methoden	39
4.1	Verwendete Chemikalien	39
4.2	Zellkultivierung	41
4.2.1	Sf9-Zellkultur	41
4.2.2	Anzucht von Bakterien zur Untersuchung der Oberflächenstrukturen	42
4.2.3	Anzucht von Bakterien für das TLF1 zur Bestimmung von zeit- und orts aufgelöster Proteindynamik	43
4.3	Zellpräparation (für Experimente).....	44
4.3.1	Waschen von Sf9 Zellen für Einzelzellexperimente.....	44
4.3.2	CFDA-SE Markierung aller Proteine in Sf9 Zellen	44
4.3.3	Präparation von Bakterien zur Untersuchung der Oberflächenstrukturen	45
4.4	Hochauflösende Mikroskopie.....	48
4.4.1	Rasterelektronenmikroskopie (SEM).....	48
4.4.2	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	49

4.5	Softlithographie.....	50
4.5.1	PDMS-Chips UV-LIF.....	51
4.5.2	PQW-Chips.....	52
4.5.3	Zell-Chips TLFi.....	53
4.6	DRIESO.....	55
4.6.1	QG-Chips.....	55
5	Ergebnisse und Diskussion	58
5.1	Erste Einzelzellektropherogramme in PDMS-Chips.....	58
5.1.1	FLIM	60
5.1.2	Spektren zur Untersuchung der UV-Hintergrundfluoreszenz	61
5.2	pH-Abhängigkeit.....	64
5.3	PQW-Chips.....	65
5.4	QG-Chips.....	70
5.5	Nachweisgrenze	72
5.6	Proteintrennung.....	73
5.7	Parallele Detektion	75
5.8	Oberflächenstrukturen von Bakterien	79
5.9	TLFi zur Bestimmung von Zeit- und Ortsaufgelöster Proteindynamik.....	89
6	Zusammenfassung und Ausblick	100
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Glossar	115
9	Danksagung	118
10	Anhang.....	119
10.1	Publikationen.....	119
10.2	Konferenzbeiträge.....	120

1 EINLEITUNG UND MOTIVATION

Die Untersuchung von einzelnen Zellen und von Proteinen aus einzelnen Zellen, sowie die Erfassung der zeitlichen und räumlichen Proteindynamik in einzelnen lebenden Zellen stellen auch heute noch eine formidable Herausforderung in der Wissenschaft dar. Dies ist insbesondere der Fall, da bei einer typischen Größe einer prokaryotischen Bakterienzelle mit einer Länge von 1 μm bis 2 μm und etwa 500 nm Breite das Volumen nur noch etwa ein Femtoliter ($1 \cdot 10^{-15}$ L) beträgt, so daß gerade bei der Betrachtung der Lokalisierung von Proteinen in der Zelle oder an der Zelloberfläche schnell die Auflösungsgrenze der traditionellen optischen Mikroskopie erreicht wird. Aber auch die Untersuchung des Proteinhaushalts bei eukaryotischen Zellen mit einem Durchmesser zwischen 10 μm und 15 μm ist eine Herausforderung, die bei einem Probenvolumen von gerade mal einem Pikoliter ($1 \cdot 10^{-12}$ L) sehr empfindliche Messmethoden und Manipulationsmöglichkeiten der Zelle erfordern. Denn gerade bei der Proteinanalytik ist es aufgrund des Fehlens einer Möglichkeit zur Vervielfältigung (Amplifikation), wie es z.B. durch die Polymerase-Kettenreaktion bei der Untersuchung von DNS möglich ist, notwendig mit dem vorhandenen Probenmaterial auszukommen. Gleichzeitig ist gerade die Untersuchung einzelner Zellen sinnvoll, da es nicht möglich ist in einem Ensemble von Zellen die Inhomogenität beim Antwortverhalten einzelner Zellen auf eine externe Stimulation oder bei nicht synchronisierten Zellen die Mittelung durch Zellzyklus-abhängige Effekte oder die bei der Zellteilung möglicherweise entstandenen Veränderungen im Genom und Proteom einer Zelle zu messen [1,2].

Die Mikrofluidik eignet sich besonders für die Untersuchung einzelner Zellen, da hier die gezielte Manipulation von kleinen Flüssigkeitsmengen (10^{-9} bis 10^{-18} L) möglich ist und typische Größen der Kanäle und Strukturen meist zwischen 10 μm und 100 μm und somit in der Größenordnung von eukaryotischen Zellen liegen. Insbesondere Polydimethylsiloxan (PDMS) ist wegen seiner hervorragenden optischen Transparenz, geringen Toxizität und hohen Permeabilität für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, wahrscheinlich am besten geeignet als Material für die Herstellung von Mikrokammern für das Wachstum und die Beobachtung von Zellen [3]. Die Mikrofluidik-Zellkulturchips verbinden die Vorteile der Miniaturisierung und der mikroskopischen Echtzeitbeobachtung mit der Möglichkeit die Zellkultursubstrate zu strukturieren, die Zusammensetzung des Kulturmediums räumlich zu variieren und Bedingungen für die Zellkultur zu schaffen, die wegen hoher Austauschraten von Nährstoffen und einstellbaren mechanischen Stimulationen physiologischer sind, als in anderen *in vitro* Systemen [4].

Für die Untersuchung der Zelloberfläche des Bakteriums *S. meliloti* werden mit SEM, XHR SEM und AFM in Trockenheit, wie in Flüssigkeit, verschiedene hochauflösende Mikroskopietechniken verwendet, um die Auflösungsgrenze der traditionellen optischen Mikroskopie zu überschreiten. Daraus resultierend werden die auf der Oberfläche beobachteten Strukturen bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen und mit Rücksicht auf mögliche Einflüsse durch die notwendige Probenpräparation verglichen. So können Veränderungen der natürlich vorkommenden Oberflächenstrukturen durch die verschiedenen Schritte bei der Probenpräparation, angefangen bei den unnatürlichsten Umgebungsbedingungen, die für die

herkömmliche Rasterelektronenmikroskopie (SEM) notwendig sind (Fixierung, Trocknung, Metallbeschichtung und Hochvakuum), bis hin zu physiologischen Konditionen bei der Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeit (Abbildung lebender Bakterien), sukzessive verfolgt werden.

Insbesondere bei der Untersuchung des Proteinhaushalts aus einzelnen eukaryotischen *Spodoptera frugiperda* Zellen sollte berücksichtigt werden, daß für die Detektion, gerade von Proteinen, die nur in einer geringen Kopienzahl vorkommen, also $< 1 \cdot 10^5$ Moleküle pro Zelle bei einem Volumen von etwa 1 pL, das Erreichen einer Detektionsgrenze von < 100 nM notwendig ist [5]. Eine gute Möglichkeit bietet die native, markierungsfreie UV Laser induzierte Fluoreszenz (LIF) Detektion, bei der die intrinsische Fluoreszenz der aromatischen Aminosäure Tryptophan (zu kleinen Anteilen auch der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin) genutzt wird. Diese UV-LIF Detektion ist bereits zuvor mit hoher Detektionsempfindlichkeit in der Kapillarelektrophorese genutzt worden [6] und lässt sich überdies gut mit der Mikrofluidik kombinieren.

2 GRUNDLAGEN/THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 GRUNDLAGEN UND HISTORIE DER MIKROFLUIDIK

Das Gebiet der Mikrofluidik (engl. „micro total analysis systems“ oder „lab on a chip“ oder „miniaturized analysis systems“) wächst heute schnell und viele wissenschaftliche Publikationen zu diesem Thema finden sich regelmäßig in Zeitschriften wie *Analytical Chemistry*, *Sensors & Actuators*, *Electrophoresis* und *Lab on a chip* [7]. Dabei ist es nun schon über 30 Jahre her, daß das erste miniaturisierte Gerät für die Analytik von Terry et al. im Jahr 1979 präsentiert worden ist. Dieser verkleinerte Gaschromatograph ist aus einem Silizium-Wafer hergestellt worden und beinhaltet ein Injektionsventil und eine 1,5 m lange Trennsäule. Dieser Wafer ist mit einem zweiten Wafer mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor verbunden worden, so daß mit diesem Gaschromatograph einfache Stoffgemische in wenigen Sekunden getrennt und detektiert werden konnten [8]. Doch trotz der kurzen Trennzeiten und der geringen Größe blieb ein Umdenken in der wissenschaftlichen Gemeinschaft vorerst aus [7].

Ebenso als später im Jahr 1985 von van der Schoot und Bergveld eine ionensensitiver Feldeffekttransistor mit kleinen Strukturen in Silizium kombiniert worden ist und so zusammen mit einem Säure-Base Titrationssystem die Säure- oder Base-Konzentration in einer Lösung bestimmt werden konnte [9]. So ist dann auch erst drei Jahre später von Verheggen et al. der erste T-Injektor im miniaturisierten Format für die reproduzierbare druckgetriebene Injektion von Proben für die Kapillar-Isotachophorese und Kapillar-Zonenelektrophorese veröffentlicht worden [10]. Seit 1990 hat sich die Entwicklung beschleunigt und so wurde in diesem Jahr auch ein verkleinerter Flüssigkeitschromatograph vorgestellt. Dazu ist ein 5·5 mm² großer Silizium-Chip mit einer runden Trennsäule und einem Leitfähigkeitsdetektor mit konventionellen externen Flüssigkeitschromatographiepumpen und Ventilen für die Durchführung von HPLC („high-pressure liquid chromatography“, engl. für Hochdruckflüssigkeitschromatographie) verbunden worden [11].

Gleichzeitig ist von Manz et al. das Konzept μ TAS („miniaturized total chemical analysis system“) vorgeschlagen worden. Hierzu sollten Analysatoren aus Silizium-Chips neben den Detektoren auch die Probenvorbereitungen und die Trennung dieser beinhalten. Dabei sollte anfangs die Miniaturisierung hauptsächlich dazu dienen die Leistungsfähigkeit der Geräte zu verbessern, wobei aber bereits damals erkannt worden ist, daß durch die geringe Größe auch der Verbrauch an Probenmaterial und Trägerflüssigkeiten deutlich reduziert wird. Es gab dazu auch schon Überlegungen, daß in diesen sehr kleinen, miteinander verbundenen Kanalsystemen der elektroosmotische Flüssigkeitstransport eine attraktive Möglichkeit darstellt, um wässrige Medien innerhalb dieser miniaturisierten Geräte zu bewegen, insbesondere dann, wenn eine Trennung angestrebt wird [12].

Um die Probleme, die die vorhandenen Pumpen mit den hohen Drücken, die notwendig waren für den Transport in den Kanälen mit nur wenigen μ m Durchmesser, zu überwinden, sind ebenfalls schon 1990 von Smits [13] und van de Pol et al. [14] Mikropumpen und zusätzlich von

Shoji et al. [15] und Esashi [16] Kombinationen von Mikropumpen mit Probeninjektionssystemen vorgestellt worden. In den folgenden drei Jahren sind zur Überwindung der Schwierigkeiten bei der Integration von Ventilen Pumpen und Detektionssystemen in der Fließinjektionsanalyse modular aufgebaute Systeme, wobei die einzelnen Module aus Silizium oder Plexiglas gefertigt waren, entstanden [7]. Unter anderen ist 1992 von Verpoorte et al. miniaturisiertes System aus Silizium vorgestellt worden, daß kleiner als 1 cm^3 war und mittels UV/VIS Absorption die über eine optische Faser verbunden worden ist, eine optische Detektionszelle besaß [17].

Im gleichen Jahr ist zum ersten Mal erfolgreich die Durchführung einer Zonenelektrophorese in Anlehnung an die Kapillarelektrophorese in einem Silizium-Chip [18] und einem Glas-Chip [19] gezeigt worden. Dazu ist ein elektroosmotischer Flüssigkeitstransport zur Flusskontrolle ohne Ventile in den miteinander verbundenen kleinen Kanälen mit anschließender elektrophoretischer Trennung von Proben genutzt worden. Gleichzeitig ist damit die Integration von Injektion, Trennung und Detektion in einem miniaturisierten System demonstriert worden. Daraufhin sind Anstrengungen unternommen worden die Trenngeschwindigkeit in diesen kleinen Chips zu erhöhen und so ist im Jahr 1993 mit der Demonstration der elektrophoretischen Trennung und Detektion von Aminosäuren in einem Glas-Chip ein Artikel von Harrison et al. in der renommierten Fachzeitschrift Science publiziert worden [20]. Im gleichen Jahr ist zudem von Seiler et al. die Trennung von Fluorescein und Fluoresceinisothiocyanat markierten Aminosäuren in einem Glas-Chip mit anschließender Laser induzierter Fluoreszenzdetektion (LIF Detektion) vorgestellt worden [21].

Im Jahr 1994 ist dann die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen, die sich mit μ TAS (und damit auch mit der Mikrofluidik) beschäftigen sprunghaft angestiegen, da sich mehr und mehr Forschergruppen daran beteiligen dieses Gebiet weiterzuentwickeln [7]. Dabei beginnen sich die Mikrofluidik-Chip-basierten Analysen auf ein größeres Anwendungsgebiet zu beziehen. So ist z.B. durch die Integration von einer Reaktionskammer mit 1 nL Volumen die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren mit LIF Detektion und einer neuartigen „gated“ (engl. für torgesteuert) Injektion in einem Glas-Chip realisiert worden [22]. Gleichfalls ist die Integration von einer Reaktionskammer für die Nachsäulenderivatisierung zur Fluoreszenzmarkierung von Aminosäuren mit LIF Detektion von Jacobsen et al. gezeigt worden [23]. Auch die Trennzeiten konnten deutlich verkürzt werden, so daß auf einer Trennstrecke von $0,9 \text{ mm}$ in einem Mikrofluidik-Chip sogar eine Trennung in weniger als 150 ms demonstriert werden konnte [24]. Zusätzlich sind bereits Trennungen von Biomolekülen in miniaturisierten Systemen gezeigt worden. So ist von Effenhauser et al. die elektrophoretische Trennung von Oligonukleotiden mit Längen von 10 bis 25 Basen vorgestellt worden [25], während Woolley und Mathies, ebenfalls mit einem Mikrofluidik-Chip aus Glas, die Trennung von DNA-Fragmenten mit Längen zwischen 70 und 1000 Basenpaaren veröffentlicht haben [26]. Fan und Harrison haben im gleichen Jahr erstmals die Trennung von drei Aminosäuren durch Elektrophorese in einem GlasMikrofluidik-Chip publiziert [27] und Fuhr et al. gelang bereits das Festhalten von Leberzellen durch Dielektrophorese mit Mikroelektroden in Kulturmedium, wobei sich die Zellen auch bei Feldstärken von bis zu 100 V/cm noch geteilt haben [28]. Durch die Untersuchung von zwei weiteren Injektionsmethoden in einem Mikrofluidik-Chip aus Glas und der Kanalgeometrie von einem Kreuzinjektor, sind mit der „pinched“ (engl. für eingeeengt) Injektion und der „floating“ (engl. für fließend) Injektion [29] dann auch die drei bis heute in der Mikrofluidik wichtigsten und häufig genutzten Injektionsarten bereits im Jahr 1994 bekannt gewesen.

Gleichfalls ist zum ersten Mal ein Octadecylsilan als chemische Oberflächenbeschichtung des Trennkanals in dem GlasMikrofluidik-Chip eingesetzt worden, um an dieser stationären Phase in Anlehnung an die konventionelle Umkehrphasenchromatographie (engl. „reversed-phase-chromatography“) eine Trennung der Farbstoffe Cumarin 440, Cumarin 450 und Cumarin 460 zu demonstrieren [30].

Viele wesentlichen Grundlagen für die Mikrofluidik waren damit bekannt, aber auch in den darauf folgenden Jahren hat die Zahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die sich mit Miniaturisierung wie der „Lab-on-a-Chip“-Technologie und damit auch mit der Mikrofluidik befassen bis heute stets weiter zugenommen. Die Mikrostrukturierungstechniken sind immer weiter verfeinert worden und immer mehr Funktionen sind in einzelnen Mikrofluidik-Chips integriert worden. Die Empfindlichkeit der Detektionsmethoden ist immer weiter gesteigert worden und mit deutlich leistungsfähigeren Computern die Auswertung wesentlich schneller geworden. Damit hat sich auch das Anwendungsspektrum immer mehr verbreitert und reicht heute von der Medizin bis hin zur Landwirtschaft, so daß viele Firmen heute kommerzielle Mikrofluidik-Chips für die verschiedensten Analysen anbieten. Einen guten Überblick über die Anfänge der Mikrofluidik, die verwendete Technologie und deren Anwendung bieten die Reviews mit dem Titel „Micro Total Analysis Systems“ von Reyes et al. [7] und Aurox et al. [31] aus dem Jahr 2002. Aktuelle Entwicklungen der Technologie, der analytischen Operationen und Anwendungen der Mikrofluidik sind als Reviews unter dem gleichen Titel im Jahr 2004 von Vilkner et al. [32], im Jahr 2006 von Dittrich et al. [33], im Jahr 2008 von West et al. [34] und im Jahr 2010 von Arora et al. [35] publiziert worden.

2.2 MIKROCHIP-ELEKTROPHORESE

Ursprünglich beschreibt die Elektrophorese die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld, wobei Unterschiede in den Ladungen und den Größen der Teilchen eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit bewirken, so daß ein Substanzgemisch dabei in einzelne Zonen aufgetrennt wird. Es werden im wesentlichen drei verschiedene Verfahren angewendet: zum einen die Zonenelektrophorese mit einem homogenen Puffersystem (mit Träger oder trägerfrei), dann die Isotachophorese, welche ein diskontinuierliches Puffersystem ausnutzt und die isoelektrische Fokussierung bei der durch Trägerampholyte (frei oder immobilisiert) ein pH-Gradient entsteht [36].

Die erste Elektrophorese ist in den 30er Jahren von dem schwedischen Wissenschaftler Arne Tiselius entwickelt und 1937 als Analysemethode durch Auftrennung von Albumin, wie der α -, β - und γ -Globuline aus menschlichem Blutserum veröffentlicht worden [37,38]. Im Jahr 1948 ist Tiselius dafür neben seinen Arbeiten zur chromatographischen Adsorptionsanalyse mit dem Nobelpreis ausgezeichnet worden. Dieses erste elektrophoretische Trennverfahren der wandernden Grenzschichten ist später zu Zonenelektrophorese weiterentwickelt worden. Dazu sind Medien wie Papier, Agargele und Kieselgele verwendet worden, auf die die Proben in

schmalen Zonen aufgetragen worden sind. Später sind aufgrund der bis dahin diffusen Banden inerte Matrices mit sehr schwacher Eigenladung und größerer Retardation eingeführt worden [36]. So sind für die Zonenelektrophorese 1955 von Smithies Stärkegele [39], 1957 von Kohn Celluloseacetat-Folien [40], 1959 von Raymond und Weintraub Polyacrylamid-Gele [41] und 1961 von Hjertén erstmals verwendet worden. Dabei werden Stärkegele zum Teil auch heute noch für genetische Untersuchungen verwendet, wie die Celluloseacetat-Folien bei klinischen Routineuntersuchungen. Die Agarosegele werden hauptsächlich für die Trennung von DNA-Fragmenten und zur spezifischen und quantitativen Detektion von Proteinen bei der Immunelektrophorese genutzt. Die Polyacrylamid-Gele sind inert, vollständig transparent und besitzen das höchste Auflösungsvermögen für DNA-Fragmente und Proteine [36].

Als Grundlage moderner hochauflösender Elektrophorese-Methoden in Gelen und Kapillaren ist die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Disk-Elektrophorese) im Jahr 1964 von Ornstein [42] und Davis [43] erstmals vorgestellt worden. 1966 ist zum ersten Mal die isoelektrische Fokussierung realisiert worden, wozu nach der Synthese von Trägerampholyten durch Vesterberg das Konzept des natürlichen pH-Gradienten von Svensson verwirklicht worden ist und somit ein neues, hochauflösendes Trenn- und Messprinzip für Proteine entstanden ist [44]. Dabei wandern die Proteinmoleküle in einem pH-Gradienten bis zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, an dem sie eine Nettoladung von Null haben [36]. Ein Jahr später ist von Shapiro et al. die Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen veröffentlicht worden [45], während von Margolis und Kenrick die Gradienten-Geltechnik im gleichen Jahr entwickelt worden ist [46,47]. Doch nur durch die Kombination der isoelektrischen Fokussierung und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur zweidimensionalen (2D-) Elektrophorese gelang es Klose und O'Farrell im Jahr 1975 erstmalig einen Gewebeaufschluss aus der Maus und ganze Zelllysate in ihre sämtlichen Proteine aufzutrennen [48,49]. Später, im Jahr 1988 etablierten Gorg et al. die zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten [50-53], wie sie auch heute üblicherweise genutzt wird, da sich diese durch ihre hohe Reproduzierbarkeit und Beladekapazität auszeichnet. Zusammen mit hoch empfindlichen Nachweismethoden wie Autoradiographie und Fluorographie kann man heute in solchen Gelen mehrere tausend Proteinspots finden [36].

Die Kapillarelektrophorese ist im Jahr 1981 hinzu gekommen, als Jorgenson und Lukacs als erste, wie heute üblich, eine offene Quarzkapillare mit 75 µm Innendurchmesser und eine Spannung von 30 kV verwendet haben, um derivatisierte Aminosäuren und Peptide zu trennen und mit Fluoreszenzdetektion nachzuweisen [54-56]. Die Kapillarelektrophorese ist vorteilhaft, da die Konvektion in den sehr dünnen Röhren nur minimal ist, weil durch das große Oberfläche/Innendurchmesser-Verhältnis eine gute Wärmeabführung gegeben ist. Dadurch können größere Feldstärken angelegt werden und kürzere Trennzeiten erzielt werden. Neben den kurzen Trennzeiten geht aber auch von den minimalen Probenvolumina, dem geringen Lösungsmittelverbrauch, der hohen Auflösung und der einfachen Methodenentwicklung ein enormer Reiz aus [36].

Die Durchführung einer Zonenelektrophorese ist zum ersten Mal erfolgreich im Jahr 1992 in Anlehnung an die Kapillarelektrophorese in einem Silizium-Chip [18] und einem Glas-Chip [19] gezeigt worden. Dazu ist ein elektroosmotischer Flüssigkeitstransport zur Flusskontrolle ohne

Ventile in den miteinander verbundenen kleinen Kanälen mit anschließender elektrophoretischer Trennung von Proben genutzt worden. Dabei stellt die Mikrochip-Elektrophorese (MCE) einen Meilenstein in der Miniaturisierung dar und kann als weiter verkleinerte Version der Kapillarelektrophorese betrachtet werden [18].

Die Mikrochip-Elektrophorese bietet unübertroffen kurze Trennzeiten und ermöglicht die Analyse von winzigen Probenmengen. Darüber hinaus hat die Mikrochip-Elektrophorese das große Potential für hochgradig parallelisierte Trennungen und für komplexe Lab-on-a-Chip Systeme, in die z.B. auch noch Reaktionsräume für chemische Synthesen und entsprechende Analysen in einem einzelnen Mikrofluidik-Chip integriert werden können, genutzt zu werden [57]. Insbesondere die Detektion in der Proteomik und Metabolomik ist schwieriger als in der Genomik, da Farbstoffe wie Interkalatoren, mit denen Nukleinsäuren leicht Fluoreszenzmarkiert werden können und eine Vervielfältigungstechnik, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fehlen. Besonders um diesen analytischen Herausforderungen in der Proteomik und Metabolomik begegnen zu können besteht eine Notwendigkeit für eine empfindliche und idealerweise markierungsfreie (engl. „label-free“) Detektion in Kombination mit miniaturisierten Trenntechniken, wie der Mikrochip-Elektrophorese [58].

Für die Trennung bei der Elektrophorese ist die substanzspezifische elektrophoretische Mobilität μ_E , die die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens im elektrischen Feld bestimmt, entscheidend. Dabei wirken auf ein geladenes Teilchen im elektrischen Feld verschiedene Kräfte. F_e ist die beschleunigende Kraft, die auf die Ladung q des Teilchens wirkt, während F_r eine Reibungskraft ist, die bremsend wirkt und F_e entgegengesetzt ist. Dabei gilt mit der elektrischen Feldstärke E , der Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens v_E und dem Reibungskoeffizienten f_c :

(1)

$$F_e = q \cdot E \text{ mit } q = z \cdot e$$

(2)

$$F_r = f_c \cdot v_E$$

Der Reibungskoeffizient ist abhängig von der Viskosität des Mediums und ggf. von der Porengröße der Matrix. Durch das Gleichgewicht dieser beiden Kräfte bewegt sich das Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit im elektrischen Feld:

(3)

$$F_e = F_r; f_c \cdot v_E = q \cdot E \Rightarrow v_E = \frac{q \cdot E}{f_c} = \mu_E \cdot E$$

Dabei ist der Proportionalitätsfaktor zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und der Feldstärke μ_E die elektrophoretische Mobilität. Unter der Annahme es handelt sich um kleine kugelförmige Teilchen lässt sich das Stokessche Gesetz anwenden, um die Reibungskraft zu berechnen, und es ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität:

(4)

$$\mu_E = \frac{q}{f_c} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

Hier ist z die Ladungszahl, e die Elementarladung, η die Viskosität der Lösung und r der Stokes-Radius des Teilchens (entsprechend der Radius des hydratisierten Ions). Für Peptide und Proteine, die i.d.R. nicht-kugelförmig sind, lässt sich ein empirischer Zusammenhang zwischen Molekulargewicht (M) und der elektrophoretischen Mobilität angeben:

(5)

$$\mu_E \propto \frac{q}{M^{2/3}}$$

Für den Exponenten des Molekulargewichts finden sich in der Literatur allerdings auch noch andere Werte zwischen $1/3$ und $2/3$ [36].

Zwei weitere Kräfte, die in unendlich verdünnten Lösungen an Bedeutung gewinnen, die Relaxationskraft F_{rel} und die Retardationskraft F_{ret} sind hierbei nicht berücksichtigt worden. Diese Kräfte werden durch die Ionenatmosphäre des Teilchens hervorgerufen. Nach der Debye-Hückel-Theorie ist jedes Teilchen von einer Ionenatmosphäre entgegengesetzter Ladung umgeben, deren Radius von der Ionenstärke abhängt. Die Kraft, die das elektrische Feld auf die Ionen der Ionenatmosphäre ausübt, wird auf die Lösungsmittelmoleküle übertragen, weshalb das Zentral-Ion nicht durch eine stationäre Flüssigkeit wandert, sondern durch eine Lösung, die in die Gegenrichtung fließt. Dieser Retardationseffekt bewirkt eine Verringerung der Geschwindigkeit des Zentralteilchens. Zudem „hinkt“ die Ionenwolke dem Zentral-Ion beim Anlegen eines elektrischen Feldes hinterher und übt so eine elektrische Kraft aus, die das Zentral-Ion abbremst. Dies wird als Relaxationseffekt bezeichnet [36]. F_{rel} und F_{ret} sind wie die Reibungskraft F_r der elektrophoretischen Kraft F_e entgegen gerichtet und bewirken, daß die elektrophoretische Mobilität mit zunehmender Ionenstärke abnimmt. Zudem ist für schwache Säuren und Basen, wie z.B. Peptide und Proteine, nicht die elektrophoretische Mobilität des vollständig dissoziierten Teilchens für die Wanderungsgeschwindigkeit entscheidend, sondern die effektive Mobilität μ_{eff} , die über den Dissoziationsgrad α (das Verhältnis zwischen Kation oder Anion zur Gesamtkonzentration des Elektrolyten) mit der elektrophoretischen Ionenmobilität μ_i verknüpft ist.

(6)

$$\mu_{eff} = \sum_i \alpha_i \cdot \mu_i$$

Das bedeutet aber auch, daß bei schwachen Säuren und Basen (wie Peptide und Proteine) die Wanderungsgeschwindigkeit über den pH-Wert des Elektrolyten optimiert werden kann [36].

Darüber hinaus hat auch der elektroosmotische Fluss in der Elektrophorese einen großen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit und Richtung eines Analyten. Eine Vielzahl von Materialien wie Glas, fused Silica (amorpher Quarz), Teflon, Papier, Agarose und Celluloseacetat-Folien (und PDMS) bilden auf Grund von Oberflächenladungen bei Kontakt mit einer

Elektrolytlösung eine elektrochemische Doppelschicht aus. Der Aufbau dieser Doppelschicht wird nachfolgend am Beispiel von Kapillaren aus fused Silica kurz beschrieben.

Durch die Dissoziation der Silanolgruppen (-SiOH) werden an der Kapillarwand negative Ladungen ausgebildet (gleiches gilt für PDMS). Diese negativen Ladungen werden auf der Seite mit der Elektrolytlösung durch positive Gegenladungen kompensiert. Dabei ergibt sich ein Potentialabfall zur Mitte der Kapillare hin. Die Doppelschicht besteht aus einer starren (Stern-) und einer diffusen (Gouy-Chapman-) Schicht, wobei der Potentialabfall in der starren Schicht linear und in der diffusen Schicht exponentiell verläuft. Die diffuse Schicht reicht umso weiter in das Lösungsinere hinein, je geringer die Ionenstärke der Lösung ist [36]. Die Entfernung von der Wand bei der das Potential auf das 1/e-fache abgefallen ist, wird Debye-Länge λ_D genannt. Für eine wässrige Lösung bei 25 °C kann diese wie folgt angenähert werden:

(7)

$$\lambda_D = \frac{9,61 \cdot 10^{-9}}{(z^2 \cdot c)^{1/2}}$$

Hier ist c die Konzentration des Elektrolyten und z die Ladungszahl aus denen sich die Ionenstärke des Elektrolyten zusammen setzt [59].

Beim Anlegen einer elektrischen Spannung bewirken die positiven Gegenladungen durch Impulsübertragung auf das Lösungsmittel einen Fluss des Lösungsmittels in Richtung Kathode. Dieser Fluss wird elektroosmotischer Fluss (EOF) genannt. Dabei ist die Geschwindigkeit des EOF v_{EOF} abhängig vom sogenannten ζ -Potential, welches das Potential in der Scherebene (meist gleichgesetzt mit der Grenzfläche zwischen starrer und diffuser Doppelschicht), der elektrischen Feldstärke, der Viskosität η des Mediums und der Dielektrizitätskonstante ε in der Doppelschicht. Es gilt:

(8)

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4\pi \cdot \eta}$$

Somit tritt während der Elektrophorese eine Strömung der flüssigen Phase auf. Diesen Fluss nennt man bei der Gelelektrophorese Elektroendosmose und ist dort meist unerwünscht, da dieser bei negativ geladenen Proben (z.B. DNA und Proteine mit SDS) der Migrationsrichtung der zu trennenden Analyten entgegen gerichtet ist. Daher werden in der Gelelektrophorese möglichst ladungsfreie Trennmedien verwendet. Bei der Kapillarelektrophorese werden dagegen viele Trennungen auch bei hohem EOF durchgeführt. Dabei sind das ζ -Potential und damit auch der EOF abhängig von der Dissoziation der Silanolgruppen und damit auch vom pH-Wert der Elektrolytlösung. Bei der Trennung von Ionen ist der EOF bei basischem pH-Wert üblicherweise höher als die Wanderungsgeschwindigkeit und bei saurem pH-Wert geringer, so daß auch Anionen durch den EOF bei basischem pH-Wert zur Kathode transportiert werden. Dann können Kationen, Neutramoleküle und Anionen kathodenseitig detektiert werden. Zudem sind der Potentialabfall in starrer und diffuser Doppelschicht und damit das ζ -Potential abhängig von der Ionenstärke der Lösung. Es gilt hierbei, je höher die Ionenstärke, desto steiler ist der

Potentialabfall und die Dicke der Doppelschicht nimmt ab. Dadurch nimmt die Geschwindigkeit des EOF mit der Ionenstärke des Elektrolyten ab.

Da das elektroosmotische Flussprofil bei der Kapillarelektrophorese (und auch bei der Mikrochip-Elektrophorese) stempelförmig ist, leistet es jedoch keinen nennenswerten Beitrag zur Peakverbreiterung. Bei diesem stempelförmigen Flussprofil ist die Geschwindigkeit der Flüssigkeit über den gesamten Querschnitt der Kapillare, mit Ausnahme des geringen Bereichs der diffusen Doppelschicht, in der die Geschwindigkeit des EOF von Null auf den Maximalwert zunimmt, konstant. Im Gegensatz dazu ist das hydrodynamische Flussprofil parabelförmig. Desweiteren kann die Geschwindigkeit durch die dynamische Beschichtung mit Polymeren (z.B. Polyethylenglykol, Cellulosederivate, Polyvinylalkohol) reduziert werden, da die Viskosität in der Doppelschicht stark zunimmt. Durch die Adsorption positiv geladener Detergenzien (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid) kann eine Richtungsumkehr des EOF erreicht werden. Ist in der Kapillarelektrophorese (oder der Mikrochip-Elektrophorese) ein EOF vorhanden, so muss neben der elektrophoretischen Geschwindigkeit des Analyten auch die Geschwindigkeit des EOF berücksichtigt werden. Die Gesamtgeschwindigkeit des Analyten v_{ges} setzt sich dann aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen und der elektroosmotischen Geschwindigkeit zusammen [36].

(9)

$$\vec{v}_{ges} = \vec{v}_E + \vec{v}_{EOF}$$

Um die Güte einer elektrophoretischen Trennung in einem Mikrofluidik-Chip, wie auch in der Kapillarelektrophorese zu charakterisieren werden Peaks in einem Elektropherogramm, welches sich aus der Auftragung der vom Detektor gemessenen Intensitätswerte gegen die Zeit ergibt, betrachtet und miteinander verglichen. Dabei wird ein Peak durch seine Migrationszeit (Retentionszeit) t_R , der Zeit, die eine Komponente von der Injektion bis zum Detektionspunkt benötigt (gemessen in der Peakmitte), durch seine Peakbreite w (gemessen an der Basislinie) oder seine Halbwertsbreite $w_{1/2}$ (gemessen auf halber Höhe), die Peakhöhe h_p (gemessen ab der Basislinie) und ggf. die Peakfläche A beschrieben. Dabei wird durch optimierte Bedingungen eine schlanke und symmetrische Peakform angestrebt. Die sogenannte Dispersion führt jedoch zu einer Bandenverbreiterung, durch (longitudinale) Diffusion in Längsrichtung der Trennsäule und aufgrund der Wechselwirkung von Probenmolekülen mit den Wänden der Mikrokanäle (Kapillare). Dabei liefert ein aufgezeichneter Peak durch seine Form Informationen über die Qualität der Trennung und der Trennsäule. Peakformen mit Abweichungen auf der ansteigenden (engl. „fronting“) oder der abfallenden Seite (engl. „tailing“) weisen auf Peakinhomogenität oder auf apparative Schwierigkeiten hin; homogene Peaks sind möglichst gleichmäßig und schmal. Um die Qualität einer Trennung zu betrachten wird das Verhältnis der Peakabstände und der Peakbreiten bestimmt und als Auflösung R angegeben. Diese entspricht einer möglichst guten Trennung bei geringer Dispersion. Es gilt:

(10)

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)}$$

Dabei sind zwei Peaks entweder unmittelbar benachbart (bei $R = 1$), klar voneinander getrennt (bei $R > 1$) oder vermischt (bei $R < 1$). Die Auflösung wird außerdem von der sogenannten Bodenzahl beeinflusst. Die Bodenzahl n (engl. „number of theoretical plates“) steht für die Trennqualität der verwendeten Säule. Es gilt:

(11)

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Die Bodenzahl geht auf das klassische Konzept der „theoretischen Böden“ als der Anzahl an Destillationsböden bei einer fraktionierten Destillation zurück. Je höher die Bodenzahl bei einer Säulenlänge L ist, desto besser ist die Qualität einer Säule und die Peakbreite w wird klein. Die Bodenzahl ist eine charakteristische Größe einer Trennsäule. Dabei ist die theoretische Bodenhöhe h (engl. „plate height“) das Verhältnis der Länge der Säule L zur Bodenzahl n . Es gilt:

(12)

$$h = \frac{L}{n}$$

Die theoretische Bodenhöhe sollte deshalb möglichst klein sein [36,60].

Desweiteren wird neben der Auflösung, der Bodenzahl und der theoretischen Bodenhöhe besonders bei sehr niedrigen Konzentrationen noch das Signal-Rausch-Verhältnis S/N für einen Peak bestimmt. Dieses beschreibt als Verhältnis der Peakhöhe h_p und der Standardabweichung des Hintergrundsignals ($\hat{=}$ dem Rauschen) σ_H , ob ein Signal noch eindeutig vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden ist. Es gilt:

(13)

$$S/N = \frac{h_p}{\sigma_H}$$

Für die Bestimmung der theoretischen Nachweisgrenze wird das Signal-Rausch-Verhältnis für einen Peak einer Substanz in bekannter Konzentration bestimmt und unter der Annahme, daß ein Signal-Rausch-Verhältnis von drei hinreichend für die eindeutige Diskriminierung des Signals von dem Rauschen ist, diejenige Konzentration berechnet, die bei ebendiesem Signal-Rausch-Verhältnis theoretisch noch detektierbar ist.

2.3 MIKROCHIP-ZELLKULTIVIERUNG UND LANGZEITBEOBACHTUNG

Ein grundlegendes Ziel der Zellbiologie ist es herauszufinden, wie das Verhalten von Zellen durch verschiedene Stimuli aus der Umgebung gesteuert wird. Die Möglichkeit, das entsprechende Verhalten von einzelnen Zellen als Reaktion auf eingehende Signale in zeitlicher Abhängigkeit vorherzusagen, wirkt sich auch auf unser Verständnis in der höher organisierten Form von

Zellen, den Geweben und den Organismen aus und kann zu therapeutischen Ansätzen zur Korrektur von Fehlern in dieser Organisation führen [61]. Dabei sind Schlüsselprozesse, wie die Stammzelldifferenzierung und deren Selbsterneuerung eng verknüpft mit der zellulären Mikroumgebung [62,63]. Zudem ist das normale morphologische Design von Organismen abhängig von Prozessen, wie der Zellteilung und der Apoptose, die in den meisten Fällen von der zeitlichen und räumlichen Veränderung von extrazellulären Signalen gesteuert werden [64]. Einige dieser Umweltfaktoren sind chemische Signale, wie Cytokine, Wachstumsfaktoren, Nährstoffangebot und Hormone, weitere sind biologische Signale, wie Zell-Zellkontakte und Zellkontakte mit der extrazellulären Matrix. Zudem kommen noch physikalische Signale, die mechanischer, elektrischer und thermischer Natur sein können. Idealerweise wäre es bei der Kenntnis all dieser Umweltfaktoren in der Vergangenheit einer Zelle möglich, deren Verhalten präzise vorherzusagen und somit eine deterministische und quantitative Beschreibung einer biologischen Funktion zu erreichen [61]. Dies wird allerdings kaum möglich sein, da Zellen unter scheinbar identischen Umgebungsbedingungen oft ein heterogenes Verhalten aufweisen [65,66]. Zum Teil beruht diese Heterogenität auf der stochastischen Natur von Entscheidungsprozessen, die wiederum bei einer Zelle auf Signaltransduktionswegen und deren molekularen Interaktionen basieren. Hierbei führen Überschneidungen zwischen Signalwegen, die Lokalisierung von Reaktionen und die zum Teil sehr geringe Zahl der Moleküle einer Spezies, die an der Signalübertragung beteiligt sind, zu dem stochastischen Verhalten der Zellen bei diesen Entscheidungsprozessen [65,67-69]. So haben dann auch Studien und Vorhersagen zu dem kollektiven Verhalten der Signalwege in den vorangegangenen Jahren stetig weiter zugenommen [69].

Aufgrund der Heterogenität innerhalb einer Population, sind vermehrt Bemühungen unternommen worden, eine große Anzahl an Einzelzellen zu untersuchen, um so die Verteilung des heterogenen Antwortverhaltens der Zellen zu bestimmen, anstatt die Zellen im Bulk zu untersuchen [68,70,71]. So ist es z.B. Mettetal et al. gelungen mit einem quasi-deterministischen mathematischen Modell die Verteilung der exprimierten Proteinmenge in *Escherichia coli* Kulturen in Abhängigkeit von der Zeit als Antwort auf die Zugabe von Lactose als externes Signal vorherzusagen, wobei in diesem Modell immer noch auch ein stochastischer Term für das Antwortverhalten einzelner Zellen verwendet worden ist [68]. Neben der des stochastischen Antwortverhaltens durch die Signaltransduktionswege, das zu der Heterogenität in Zellpopulationen beiträgt, hat auch die mangelnde Kontrolle der Mikroumgebung einen großen Anteil an der Verbreiterung der Verteilung des Verhaltens innerhalb einer Population. Dementsprechend gibt es auch viele Bemühungen einheitliche und gut kontrollierbare *in vitro* Umgebungen für Zellkulturen zu erschaffen, in denen verschiedene Umgebungsbedingungen dynamisch und im Hochdurchsatz getestet werden können [62,72,73]. Da viele Umgebungsbedingungen in Multiwellplatten und Petrischalen, die oftmals zur Kultivierung von Zellen genutzt werden, nur schlecht oder gar nicht kontrolliert werden können und zudem die dynamische Kontrolle der Umgebung zur Untersuchung einiger zellulärer Prozesse ebenfalls wichtig ist, sind viele Mikrofluidik-Chips und auf Mikrostrukturierungstechnik basierende Kammern für Zellen entwickelt worden, die nun eine wesentlich verbesserte dynamische Kontrolle der Umgebungsbedingungen für die Einzelzellanalytik auch im Hochdurchsatz erlauben [61,64]. Gleichzeitig verspricht die mögliche Automatisierung eine höhere Reproduzierbarkeit,

einen höheren Durchsatz, robustere Systeme und den Zugang zu kürzeren Zeitskalen, die ansonsten meist durch den Experimentator begrenzt werden [1,74].

Die Mikrofluidik eignet sich besonders, da hier die gezielte Manipulation von kleinen Flüssigkeitsmengen (10^{-9} bis 10^{-18} L) möglich ist und typische Größen der Kanäle und Strukturen meist zwischen 10 μm und 100 μm und somit in der Größenordnung von eukaryotischen Zellen liegen. Insbesondere PDMS ist wegen seiner hervorragenden optischen Transparenz, geringen Toxizität und hohen Permeabilität für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, wahrscheinlich am besten geeignet als Material für die Herstellung von Mikroammern für das Wachstum und die Beobachtung von Zellen [3].

Die Mikrofluidik-Zellkulturchips verbinden die Vorteile der Miniaturisierung und der mikroskopischen Echtzeitbeobachtung mit der Möglichkeit die Zellkultursubstrate zu strukturieren, die Zusammensetzung des Kulturmediums räumlich zu variieren und Bedingungen für die Zellkultur zu schaffen, die wegen hoher Austauschraten von Nährstoffen und einstellbaren mechanischen Stimulationen physiologischer sind, als in anderen *in vitro* Systemen. Dementsprechend sind Mikrofluidik-Chips erfolgreich für die Langzeitkultivierung (bis zu 4 Wochen) für eine Vielzahl von Zellen, darunter Primärzellen wie Endothelzellen aus dem Rind, Hepatozyten aus der Ratte, Neuronen aus Rattenembryonen, neuronale Stammzellen und embryonale Stammzellen aus dem Menschen, eingesetzt worden [4]. So hat beispielsweise Gomez-Sjöberg et al. das erste vollautomatisierte, mikrofluidische Zellkultursystem vorgestellt und damit Stammzellen aus dem Menschen kultiviert [4]. In einem anderen Mikrofluidik-Chip konnte Kane et al. die Kultivierung von Primärzellen, in diesem Fall Hepatozyten aus der Ratte, über Zeiträume bis zu vier Wochen demonstrieren [75].

Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie hat Sigal et al. die Lokalisierung von Proteinen in humanen Lungenkarzinomzellen beobachtet und für die Zellzyklus-abhängige Auswertung die sogenannte *in silico* Synchronisation etabliert [76]. Bei einer *E. coli* Kultur konnte Balaban et al. über die Beobachtung in einem Mikrofluidik-Chip zeigen, daß die natürlicherweise vorhandene Heterogenität innerhalb der Population dazu geführt hat, daß einige Zellen, welche sich später wieder vermehrt haben, eine Behandlung mit Antibiotika überdauert haben, während der größte Teil der Population dabei wie erwartet verstorben ist [77]. Mit einem anderen Mikrofluidik-Chip und unter Ausnutzung der Perfusion für die Nährstoffversorgung ist es Tourovskaia et al. gelungen die erste Differenzierung von Muskelzellen aus der Maus in einem Chip zu verfolgen und die Zellen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen in dem Mikrofluidik-Chip zu kultivieren [78]. Cookson et al. hat zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie genutzt, um die Genexpression bei Hefezellen auf Einzelzellniveau innerhalb einer Population von *S. cerevisiae*, die über mehrere Generationen in einem Mikrofluidik-Chip kultiviert worden ist, zu untersuchen [79], während Megerle et al. mit der gleichen Technik, aber unter Verwendung der von Ibidi kommerziell erhältlichen μ -Slides den Arabinosestoffwechsel in dem Bakterium *E. coli* zeitaufgelöst verfolgt [80].

Dem entsprechend können Zellen in Mikrofluidik-Chips im Einzell- oder Vielzellstadium bei gleichzeitiger Auflösung einzelner Zellen und lokaler Kontrolle der Flüssigkeitsumgebung untersucht werden. Mit Beschränkung der Zellen durch die Höhe der Kanäle oder Kammern kann ein Stapeln der Zellen übereinander, wie es typischerweise nach mehreren Zellteilungen

auftritt, vermieden werden. Dadurch können Zellen in Mikrofluidik-Chips viel länger einzeln voneinander unterschieden werden als bei traditioneller zeitaufgelöster Mikroskopie ohne räumlicher Beschränkung der Zellen [81].

Für die Langzeitbeobachtung lebender Zellen gibt es inzwischen auch kommerzielle Mikrofluidik-Chips, z.B. von Ibidi (System aus Kunststoff mit teilweise gaspermeablem Boden) oder von Cellasic (System mit Glasboden und Oberseite aus gaspermeabler PDMS-Membran). Diese Systeme beinhalten hybride Glas-Kunststoff-Chips für die Zellkultivierung, die Immobilisierung und die Beobachtung. Allerdings, ist eine Anpassung der Geometrie und die Veränderung von Oberflächeneigenschaften in den Kanälen deutlich schwieriger, als dies bei der Verwendung von Softlithographie und Polydimethylsiloxan (PDMS) als Chipmaterial der Fall ist [82,83]. Hierbei können die Oberflächen des hochtransparenten, biokompatiblen, chemisch inerten und gaspermeablen PDMS mit ihren Silanolgruppen (Si-OH) nach fast den gleichen Protokollen, wie für Glasoberflächen, funktionalisiert werden [83,84].

Natürlich sollte besonders bei der mikroskopischen Beobachtung von lebenden Zellen mit Nachdruck auf die Gesundheit der Zellen auf dem Mikroskop geachtet werden. Dazu sollte die Umgebung besonders bei Langzeitbeobachtungen so physiologisch und konstant wie möglich sein. Dazu gehört die Kontrolle der Luftfeuchtigkeit, der Temperatur, des Gasaustausches und der Nährstoffversorgung. Da zudem jede Beobachtung zu einer möglichen Lichtschädigung der Zellen führen kann, sollte die Menge der eingetragenen Energie durch Licht so gering wie möglich gehalten werden [85].

Hier sind nur einige ausgewählte Publikationen zu der Zellkultivierung und der Langzeitbeobachtung von Zellen in Mikrofluidik-Chips erwähnt worden, durch welche die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse besser eingeordnet werden können. Da aber das Themengebiet sehr weit ist und eine immense Anzahl weiterer Publikationen und weiterführender Literatur existieren, bieten die Reviews mit dem Titel „Micro Total Analysis Systems“ von Reyes et al. [7] und Aurox et al. [31] und einer eigenen Sektion zu der Zellkultivierung und Handhabung von Zellen in Mikrofluidik-Chips dem interessierten Leser einen guten Überblick. Aktuelle Entwicklungen, wie z.B. die später aufgekommene Verwendung von Droplets für die Handhabung von Zellen in Mikrofluidik-Chips, sind in den Reviews, die unter dem gleichen Titel im Jahr 2004 von Vilkner et al. [32], im Jahr 2006 von Dittrich et al. [33], im Jahr 2008 von West et al. [34] und im Jahr 2010 von Arora et al. [35] übersichtlich dargestellt worden. Zudem beschäftigen sich die Reviews von Breslauer et al. [1] und El-Ali et al. [74] speziell nur mit der Handhabung und der Untersuchung von Zellen in Mikrofluidik-Chips.

2.4 FLUORESZENZDETEKTION VON PROTEINEN

Für die Detektion von Proteinen wird in dieser Arbeit die Fluoreszenz genutzt. Die wichtigsten Grundlagen dazu werden nachfolgend kurz erläutert. Zur Veranschaulichung ist das Termschema eines Moleküls mit möglichen Übergängen in der Abbildung 1 gezeigt.

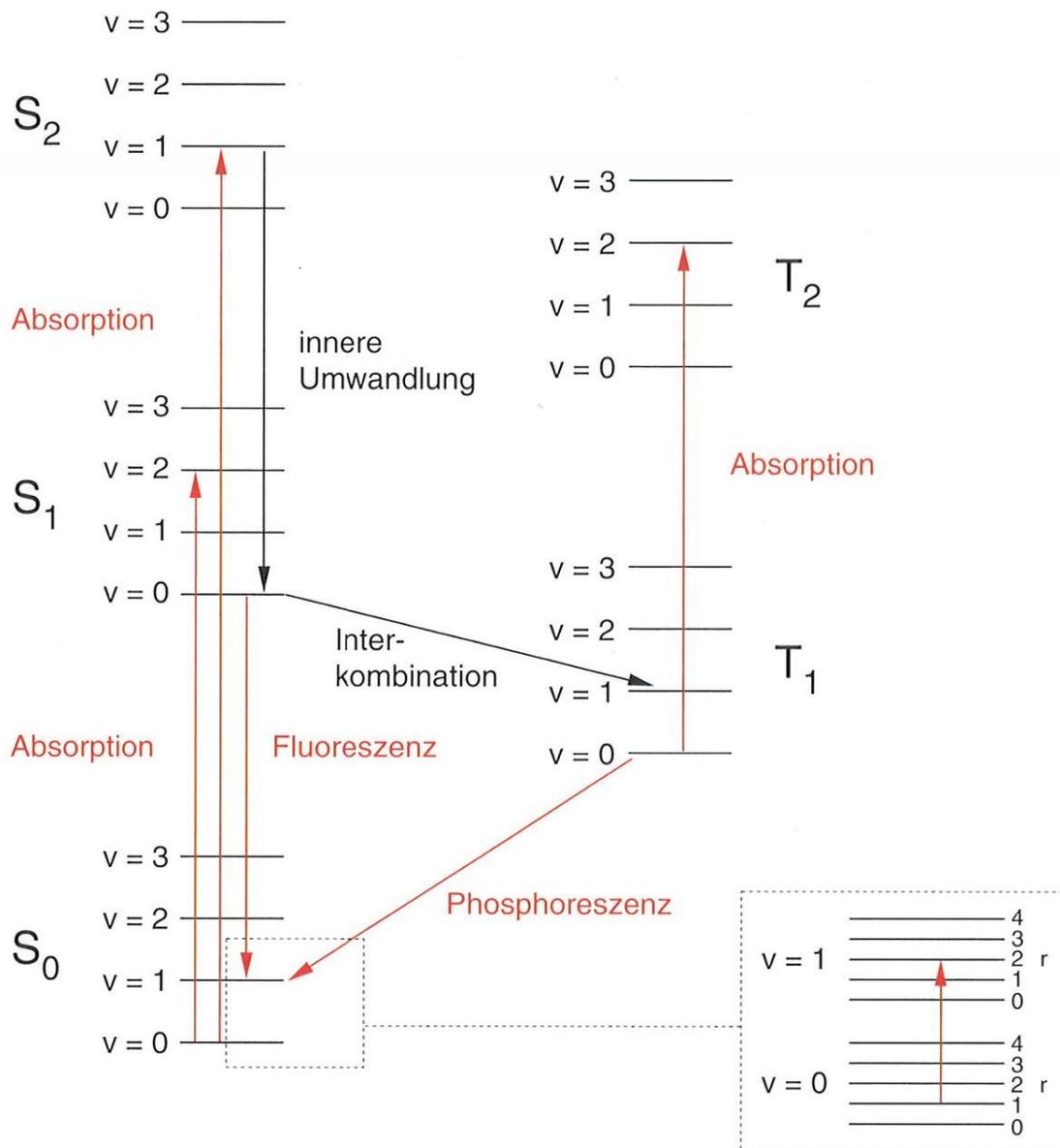


Abbildung 1: Termschema eines Moleküls mit möglichen Übergängen. Dabei sind die strahlungslosen Übergänge in schwarz, solche die unter Absorption oder Emission von elektromagnetischer Strahlung verlaufen dagegen in rot eingezeichnet. In der Ausschnittvergrößerung, wo die Schwingungsniveaus (v) noch weiter in Rotationsniveaus (r) unterteilt sind, ist zudem ein Übergang der Infrarotabsorption gezeigt [36]. Die Energie nimmt von oben nach unten ab.

Elektronen haben einen Eigendrehimpuls und daher ein magnetisches Moment, welches als Spin bezeichnet wird. Dabei kann jedes Orbital nur mit maximal zwei Elektronen besetzt werden, wobei das Pauli-Prinzip einen antiparallelen Spin fordert. Eine typische Spinkonfiguration ist daher: $\{-1/2; +1/2\}$ oder $\{+1/2; -1/2\}$. Die Multiplizität M wird dabei wie folgt berechnet:

(14)

$$M = 2 \cdot |S| + 1$$

Wobei $|S|$ der Betrag der Summe der magnetischen Momente ist. Also ergibt sich für eine Spinkonfiguration von $\{-1/2; +1/2\}$ oder $\{+1/2; -1/2\}$ $S = 0$ und entsprechend $M = 1$. Man bezeichnet diese Spinkonfiguration daher als Singulettzustand. Es kommt jedoch auch vor, daß z.B. durch einen photochemischen Prozess ein Spin umgekehrt wird und entsprechend die Spinkonfiguration $\{+1/2; +1/2\}$ oder $\{-1/2; -1/2\}$ ist und damit $S = 1$ und $M = 3$. Diese Spinkonfiguration wird dann als Triplettzustand bezeichnet.

In der Regel halten sich in den Molekülorbitalen bei einem stabilen Molekül je zwei Elektronen mit antiparallelen Spins auf. Durch die Absorption eines Photons kann ein Elektron aus einem besetzten Molekülorbital in ein leeres Molekülorbital gehoben werden. In der Photochemie wird dies durch die Angabe der Molekülorbitale deklariert. So liegt ein $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang genau dann vor, wenn ein Elektron aus einem π -Orbital in ein π^* -Molekülorbital gehoben wird. Dabei kann der Übergang aus einem besetzten Orbital in ein leeres Orbital unter Beibehaltung, oder unter Spinumkehr stattfinden.

Der elektronische Grundzustand eines Moleküls wird als S_0 bezeichnet. Typischerweise beträgt die Energielücke zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand S_1 mindestens 1 eV, was etwa der Energie eines Photons mit einer Wellenlänge von 1200 nm entspricht. Dagegen beträgt die Energielücke zwischen dem niedrigsten Schwingungsniveau ($v = 0$) und dem nächsthöheren Schwingungsniveau ($v = 1$) typischerweise mindestens 0,1 bis 0,5 eV, entsprechend der Energie eines Photons im mittleren Infrarot-Bereich. Da bei Raumtemperatur die thermische Energie jedoch nur etwa 0,05 eV beträgt, befinden sich alle Moleküle im thermischen Gleichgewicht im elektronischen Grundzustand und fast immer auch im Schwingungsgrundzustand, so daß nur Rotationszustände signifikant besetzt sind. Von diesem Zustand aus können durch die Absorption eines Photons geeigneter Energie Übergänge zwischen verschiedenen Niveaus stattfinden. Dabei regen Photonen im Infrarot-Bereich in der Regel Rotations- und Schwingungsübergänge innerhalb von S_0 an, während die Absorption von Photonen im UV, sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich zu elektronischen Übergängen zwischen S_0 und S_1 (oder höher angeregten Zuständen) führt. Dazu muss allerdings die Energiedifferenz zwischen dem Ausgangs- und dem Endzustand der Energie des eingestrahnten Photons entsprechen.

Es sind jedoch nicht alle Übergänge gleich wahrscheinlich und dementsprechend entweder mit starker Absorption oder schwacher Absorption verknüpft. Eine Auswahlregel für die Wahrscheinlichkeit von Übergängen wird Franck-Condon-Prinzip genannt. So kann z.B. nach dem Franck-Condon-Prinzip der Gleichgewichtsabstand zweier Atomkerne im angeregten Zustand entweder gleich, kleiner, oder größer sein als im Grundzustand. Da zudem der elektronische Übergang von S_0 nach S_1 mit etwa 10^{-15} s sehr schnell erfolgt, während eine Kernschwingungsperiode mit etwa 10^{-13} s länger dauert und somit die Schwingungen der Kerne relativ zueinander langsamer sind, bleibt entsprechend der Kernabstand während eines elektronischen Übergangs nahezu konstant. Dies führt bei einer Auftragung der Energie gegen den Kernabstand dazu, daß der elektronische Übergang senkrecht stattfindet und entsprechend zu einem angeregten Schwingungszustand führt, wenn der Gleichgewichtsabstand im

angeregten Zustand von dem im Grundzustand abweicht. In der Quantenmechanik werden die Überlappungen der Wellenfunktionen, die ein Maß für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit sind, im Grundzustand und in den angeregten Zuständen betrachtet. Dabei sind diejenigen Übergänge am wahrscheinlichsten, bei denen die Schwingungszustände und damit die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten im Grundzustand und im angeregten Zustand am ähnlichsten sind.

In der Regel erfolgt ein elektronischer Übergang unter Beibehaltung des Spins und da diese im elektronischen Grundzustand, dem Anfangszustand antiparallel ausgerichtet sind, ist dies im Endzustand ebenso der Fall. Entsprechend dieser Spinkonfiguration ist die Multiplizität in beiden Fällen also $M = 1$, so daß man von Singulettzuständen, bzw. von einem Singulettübergang spricht. Es kann jedoch unter bestimmten Bedingungen auch eine Spinumkehr erfolgen, also ein Übergang von einer Spinkonfiguration mit $\{-1/2; +1/2\}$ zu einer Spinkonfiguration $\{+1/2; +1/2\}$ oder $\{-1/2; -1/2\}$, was dann auch ein Übergang von einem Singulettzustand zu einem Triplettzustand ist. Entsprechend wird die Auswahlregel für den Übergang von einem Singulettzustand zu einem Triplettzustand, was als Intersystem-Crossing bezeichnet wird, Interkombinationsverbot von Singulett- und Triplettzuständen genannt. Danach sind die Übergänge mit Spinumkehr verboten und dementsprechend sehr unwahrscheinlich und in der Absorption sehr schwach.

Ein angeregtes Molekül kann auf unterschiedliche Weise wieder in den energetischen Grundzustand gelangen. Bei der strahlungslosen Relaxation wird die Energiedifferenz in Form von Schwingungsenergie (sogenannte vibronische Relaxation), letztlich als Wärme abgegeben. Die Emission elektromagnetischer Strahlung in Form eines Photons wird dagegen als Lumineszenz bezeichnet. Dabei wird unterschieden aus welchem Zustand in einem Termschema, bestehend aus einem Singulett-Grundzustand S_0 , einem Singulettzustand S_1 , einem höher angeregten Singulettzustand S_2 , sowie den dazugehörigen Triplettzuständen T_1 und T_2 , die Emission erfolgt. Während die Messung der Phosphoreszenz (Relaxation von T_1 nach S_0) für die Bioanalytik nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist die Messung der Fluoreszenz bei vielen Arbeiten eine angewandte Routinemethode. Die Anregung erfolgt aus dem niedrigst liegenden Singulettzustand S_0 in einen der Schwingungszustände des ersten oder zweiten angeregten Singulettzustands. Aus dem zweiten oder höher angeregten Singulettzustand S_2 (bzw. S_n) erfolgt in der Regel sehr schnell (ca. 10^{-13} s) und strahlungslos ein Übergang in den am niedrigsten liegenden Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustands. Die Emission eines Photons aus S_2 wird dagegen nur in Ausnahmefällen beobachtet. Dagegen kann die Relaxation aus dem ersten angeregten Singulettzustand S_1 über unterschiedliche Prozesse erfolgen. Einer davon ist die innere Konversion (innere Umwandlung; engl. „internal conversion“) bei der eine strahlungslose Desaktivierung stattfindet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass höher angeregte Schwingungszustände von S_0 durchaus Energiewerte in der Nähe von S_1 erreichen können. Viel wichtiger allerdings ist der Prozess der Desaktivierung von S_1 nach S_0 unter Emission von einem Lichtquant, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Dabei erfolgt die Absorption aus dem Grundzustand ausgehend von einer Besetzung der Schwingungsniveaus, die durch die Temperatur gegeben ist. Bei Raumtemperatur erfolgt sie fast ausschließlich von $v = 0$ aus. Entsprechend dem Franck-Condon-Prinzip führt der Absorptionsprozess zum gleichen ($v = 0$) oder höher angeregten ($v = 1, 2, \dots$) Schwingungsniveau in S_1 . Im angeregten Zustand kommt es dann zunächst zu einer thermischen Äquilibrierung zum Besetzungsgleichgewicht (bei

Raumtemperatur also zum tiefst liegenden Schwingungszustand in S_1), bevor Relaxation nach S_0 möglich ist. Als Folge dieses Verhaltens, das in einem Termschema anschaulich dargestellt werden kann (s. Abbildung 1), ergeben sich für die Fluoreszenz folgende Eigenschaften [36].

Erstens ist das Spektrum der Fluoreszenzemission gegenüber dem Spektrum der Absorption in der Regel zu kleineren Energien, also zu größeren Wellenlängen, verschoben. Zweitens ist das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge und drittens bestimmt die Struktur der Schwingungsniveaus die Struktur des Absorptions- bzw. des Emissionsspektrums. Dabei ist für die Absorption die Schwingungsunterstruktur von S_1 und für die Emission die Schwingungsunterstruktur von S_0 maßgeblich. Da die Relaxation von S_1 nach S_0 über Strahlungsemission von einem Zustand aus erfolgt, der eine vergleichsweise lange Lebensdauer hat, sind Fluoreszenzuntersuchungen für biologische Moleküle besonders attraktiv. Die Lebensdauer, die der mittleren Verweildauer eines Moleküls in S_1 entspricht, lässt sich nur dann exakt aus der Rate der Fluoreszenzemission bestimmen, wenn die Fluoreszenz der einzige Desaktivierungsprozess ist und strahlungslose Desaktivierung oder Intersystem-Crossing, d.h. der Übergang vom Singulett- zum Triplettzustand, vernachlässigt werden können. Typische Lebensdauern für die Fluoreszenz liegen in der Größenordnung von 10^{-9} s bis 10^{-7} s. Aufgrund der Tatsache, daß diese Lebensdauern in derselben Größenordnung liegen oder gar länger sind als die Zeiten für Diffusion, Rotation oder Konformationsänderungen von biologischen Makromolekülen, bietet sich eine Messung von solchen Prozessen durch Fluoreszenzmessungen an. Für Fluoreszenzuntersuchungen an Biomolekülen wird unterschieden, ob die Fluoreszenz von Gruppen, die direkt am Molekül vorhanden sind, genutzt werden kann, oder ob zusätzlich erst Fluorophore an das Molekül gebunden werden müssen. Trifft ersteres zu, bezeichnet man dies als intrinsische Fluoreszenz, während im zweiten Fall von extrinsischer Fluoreszenz gesprochen wird. Die dabei verwendeten Fluorophore werden dann Fluoreszenz-Sonden genannt. Für die Fluoreszenzspektroskopie von Proteinen ohne weitere Farbstoffe kann im Wesentlichen nur die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan genutzt werden. Da die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Absorptionsbanden bei ca. 280 nm (Tryptophan) besitzen kann die Fluoreszenz dieses elektronischen Übergangs bei Wellenlängen oberhalb 300 nm gemessen werden. Grundsätzlich hängt die beobachtete Intensität der Fluoreszenzemission I_{obs} von der Konzentration des untersuchten Moleküls ab. Es gilt:

(15)

$$I_{obs} = I_0 \cdot \Phi \cdot (2,303 \cdot \epsilon_A \cdot c \cdot d)$$

Dabei ist I_0 die Intensität des eingestrahlt Lichts, Φ die Quantenausbeute, also dem Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen, ϵ_A der molare Absorptionskoeffizient (substanz- und wellenlängenspezifisch), c die Konzentration des untersuchten Moleküls und d die Schichtdicke der Lösung [36].

Bei der nativen Fluoreszenzdetektion ist das intrinsische Fluorophor (die Aminosäure) Tryptophan, bzw. der Indolring in dessen Seitenkette dominant. Hier tritt, wie bereits zuvor erwähnt, die Fluoreszenzemission im Vergleich zur Absorption bei größeren Wellenlängen auf. Diese sogenannte Stokes-Verschiebung (engl. „Stokes shift“), der für polare Fluorophore in polaren Lösungsmitteln am größten ist, wird durch Interaktionen des Fluorophors mit Molekülen in seiner direkten Umgebung verursacht. Der Indolring des Tryptophans ist ein solches

lösungsmittelempfindliches Fluorophor und das Emissionsspektrum von der Seitenkette eines Tryptophans, welches sich exponiert an der Oberfläche eines Proteins befindet ist gegenüber einer solchen im Inneren eines Proteins zu größeren Wellenlängen verschoben. Neben dem Tryptophan, das ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und eine Quantenausbeute von $\Phi = 0,13 \pm 0,01$ (gemessen in Wasser) besitzt, zeigen auch zwei weitere aromatische Aminosäuren, das Tyrosin und das Phenylalanin eine Fluoreszenzemission bei der Anregung mit UV-Licht. Während das Absorptionsmaximum für das Tyrosin bei 275 nm und die Quantenausbeute einen Wert von $\Phi = 0,14 \pm 0,01$ (gemessen in Wasser) erreicht, liegt die Ausbeute mit $\Phi = 0,024$ (gemessen in Wasser) für das Phenylalanin (Absorptionsmaximum bei 260 nm) deutlich niedriger [86].

In nativen Proteinen wird die Fluoreszenzemission von Tyrosin häufig durch Quenching aufgrund von Interaktionen mit der Peptidkette und Wasserstoffbrückenbindungen oder durch Energietransfer zum Tryptophan unterdrückt. Die Emission ausgehend vom Phenylalanin in Proteinen kann dagegen nur beobachtet werden, wenn dieses weder Tyrosine noch Tryptophane enthält, was allerdings nur sehr selten vorkommt [86]. Gleichzeitig besitzt das Tryptophan mit $\epsilon_A = 6000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ gegenüber dem Tyrosin mit $\epsilon_A = 1500 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ und dem Phenylalanin mit $\epsilon_A = 200 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ den größten Absorptionskoeffizienten [36]. Da das Tryptophan von den drei aromatischen Aminosäuren bei den größten Wellenlängen absorbiert und die Emissionsspektren des Phenylalanins (Emissionsmaximum in Wasser bei 282 nm) und des Tyrosins (Emissionsmaximum in Wasser bei 303 nm) mit dem Absorptionsspektrum des Tryptophans überlappen, kommt es neben dem Energietransfer vom Tyrosin auch häufig zu einem solchen vom Phenylalanin zum Tryptophan oder aber vom Tyrosin zum Phenylalanin zum Tryptophan [86]. Grundsätzlich sind, aufgrund des breiten Absorptionsspektrums des Tryptophans, Anregungswellenlängen zwischen 210 nm und 325 nm gut geeignet für die native induzierte Fluoreszenzdetektion von Proteinen [58].

Für die Fluoreszenzdetektion von Proteinen und besonders für Untersuchungen in der Molekulargenetik ist ein Protein, das grün fluoreszierendes Protein (GFP, engl. „green fluorescent protein“) genannt wird, von herausragender Bedeutung. Das GFP, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt, ist zuerst von Shimomura et al. im Jahr 1961 beschrieben worden [87]. Dieses Protein zeigt bei der Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht eine grüne Fluoreszenzemission [88]. Für seine Entdeckung ist Osamu Shimomura im Jahr 2008 zusammen mit Martin Chalfie und Roger Y. Tsien mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet worden. Martin Chalfie ist es im 1994 zum ersten Mal gelungen das GFP außerhalb der Qualle *Aequorea victoria* zu exprimieren, wodurch das Protein dann auch als genetischer Marker eingesetzt werden konnte. Roger Y. Tsien hat später durch Modifikationen des ursprünglichen GFP Varianten mit anderen Fluoreszenzspektren entwickelt, die eine bläuliche (CFP, cyan fluoreszierendes Protein) oder gelbliche (YFP, gelb fluoreszierendes Protein) Fluoreszenzemission zeigen, so daß unterschiedliche Zellbestandteile getrennt beobachtet werden können [89]. Das GFP ist ein kleines Protein, das aus 238 Aminosäuren (Masse = 26,9 kDa) besteht. Die chromophore Gruppe wird nach korrekter Faltung des Proteins aus den Seitenketten von drei benachbarten Aminosäuren (Serin 65, Tyrosin 66, Glycin 67) gebildet. Dieser Rest, ein p-Hydroxybenzyliden-Imidazolinon, besitzt zwei intensive Absorptionsbanden mit Maxima bei 396 nm und 475 nm. Die Anregung der Banden wird dabei vom Protonierungsgleichgewicht bestimmt. Während die Bande bei 396 nm von der protonierten

Form stammt, stammt die Bande bei 475 nm von der deprotonierten Form. Untersuchungen über die Photophysik dieses Proteins haben ergeben, daß nach der Anregung bei 396 nm die Emission eigentlich bei 459 nm sichtbar sein sollte. Dagegen wird die Emission jedoch bei 508 nm, unabhängig von der Anregung, beobachtet. Dies begründet sich darin, dass die photochemische Anregung des Chromophors bei der kurzwelligeren Absorptionsbande zur Deprotonierung und damit zur Verschiebung des Gleichgewichts zu dieser Form führt, so daß es ausschließlich bei der deprotonierten Form zur Emission kommt. Die recht hohe Ausbeute der Fluoreszenz ($\Phi = 0,75$ bis $0,85$) und die Möglichkeit über Mutationen die Wechselwirkungen der chromophoren Gruppe mit einzelnen Aminosäuren zu betrachten, haben dazu geführt, daß das GFP ein beliebtes Untersuchungsobjekt für Photophysiker und Photochemiker geworden ist. Zudem kann dieses autofluoreszierende Protein auch leicht in Zellen und Organellen nachgewiesen werden, so daß es vielfach als Sonde zur Studie von komplexen Expressions- und Assemblierungsprozessen in der Biologie eingesetzt wird. Insbesondere, da sich der Einsatz von Reporter genen auf der Basis von GFP auch für die *in vivo* Analyse eignet [36].

Neben der Möglichkeit Proteine über die intrinsische Fluoreszenz zu detektieren, können diese auch mit Fluorophoren markiert und somit eine extrinsische Fluoreszenz genutzt werden. Für den Einbau von fluoreszierenden Gruppen in Proteine gibt es je nach Zweck chemische Modifikationen, die unterschiedlichen Anforderungen genügen. Am beliebtesten ist die Nutzung von Amino- oder SH-Gruppen. Dabei werden häufig Succinimidylester oder Isothiocyanate verwendet, um eine fluoreszierende Gruppe an Aminogruppen zu heften. Die Mehrheit der Fluoreszenzmarkierungen führt zu Derivaten des Fluoresceins und des Rhodamins. Für die Herstellung von fluoreszierenden Antikörpern werden z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodaminisothiocyanat am häufigsten verwendet [36]. Das Fluorescein gehört zu der Gruppe der Xanthenfarbstoffe und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 485 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 514 nm und ähnelt damit dem des GFP, so daß in der Praxis oft die gleichen optischen Filter verwendet werden können. Zudem besitzt das Fluorescein mit $\epsilon_A = 93000$ L/mol·cm einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten. Die Quantenausbeute ist mit $\Phi = 0,95 \pm 0,03$ (gemessen in 100 mM NaOH) sogar noch größer als beim GFP [86,90].

2.5 ZELLEN

Es wird geschätzt, daß es heute mehr als 10^7 , möglicherweise 10^8 , verschiedene Arten auf der Erde gibt. Jede Art ist unterschiedlich und jede Art vermehrt sich, um Nachkommen zu erzeugen, die zu der gleichen Art gehören. Dabei geben die Vorgänger Informationen weiter, die außergewöhnlich detailliert beschreiben, welche Eigenschaften die Nachkommen haben sollen. Diese Vererbung ist ein wesentlicher Teil der Definition des Lebens. Diese Vererbung unterscheidet Lebewesen von anderen Prozessen, wie dem Kristallwachstum, dem Abbrennen einer Kerze oder der Bildung von Wellen auf dem Wasser. Wie die Flamme einer Kerze muss ein lebender Organismus freie Energie verbrauchen, um seine Organisation zu erschaffen und zu

erhalten. Jedoch wird mit der freien Energie ein sehr komplexes System von chemischen Prozessen unterhalten, die von der vererbten Information bestimmt sind. Die meisten lebenden Organismen bestehen aus nur einer Zelle. Andere, wie auch wir Menschen, bestehen aus sehr vielen Zellen, unter welchen Gruppen von Zellen ihre spezialisierte Funktion ausführen und über aufwendige Kommunikationswege verbunden sind. Aber in jedem Fall, egal ob wir ein einzelnes Bakterium betrachten oder das Aggregat aus mehr als 10^{13} Zellen, das den menschlichen Körper bildet, der ganze Organismus ist durch Zellteilungen aus einer einzelnen Zelle entstanden. Daher ist diese einzelne Zelle der Träger der Erbinformation, die die Art definiert. Und bestimmt durch diese Erbinformation beinhaltet die Zelle alles was nötig ist, um Rohstoffe aus der Umgebung zu sammeln und damit eine neue Zelle mit einer Kopie dieser Erbinformation zu bilden [91].

2.5.1 SF9 INSEKTENZELLEN

Bei den Sf9 Zellen handelt es sich um eine eukaryotische Zelllinie mit runden, adhärent wachsenden Zellen mit einer Verdopplungszeit von etwa 26 h bis 30 h, die ehemals von Vaughn et al. als IPLB-Sf-21 aus dem Ovargewebe des Puppenstadiums des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* (engl. Trivialname „fall armyworm“), der unter den Insekten (Insecta) innerhalb der Überordnung der Neuflügler (Neoptera) zu der Ordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera) und zu der Familie der Eulenfalter (Noctuidae) gehört, isoliert worden sind [92]. Aus einem Klon von der Zelllinie IPLB-Sf-21 ist von Summers später die Sf9-Zelllinie erstellt und für die Expression von rekombinanten Proteinen mit einem Baculovirus Vektor verwendet worden [93]. Dabei bieten die robusten und scherstressunempfindlichen Sf9 Zellen gegenüber den in der Kultivierung deutlich teureren Säugetierzellkulturen unter anderem die Vorteile, daß diese mit Baculovirus Vektoren relativ leicht transfiziert und für die Expression von funktionalen eukaryotischen Proteinen auch in größerem Maßstab genutzt werden können [94]. Auch aufgrund der fast identischen posttranslationalen Modifikationen wie bei Säugetierzellen sind die Sf9 Insektenzellen anderen üblichen Produzenten für rekombinante Proteine, wie Hefen und Bakterien, überlegen und werden dementsprechend auch für die Expression von rekombinanten Glycoproteinen eingesetzt [95]. Darüber hinaus ist von Hollister et al. gezeigt worden, daß durch genetische Manipulationen der Sf9 Insektenzellen und einhergehender Anpassung des Glycosylierungsapparates die Produktion von Proteinen mit komplexen Glycosylierungsmustern, die denen von Säugetierzellen entsprechen, möglich ist [96].

Die Sf9 PKC γ -GFP Zelllinie, die in dieser Arbeit für die parallele UV/VIS-LIF Detektion verwendet wird, ist von Herrn Dr. Nickels Jensen im Rahmen seiner Dissertation erstellt worden [97]. Dazu ist ein Genkonstrukt, welches für eine C-terminale Fusion der Proteinkinase C (Subspezies γ aus der Ratte *Rattus norvegicus*) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP aus der Qualle *Aequorea victoria*) kodiert von Sakai et al. [98] verwendet worden. Das entsprechende Gen ist aus dem Vektor pTB701-PKC γ -GFP über die Restriktionsschnittstellen *EcoR1* und *Mun1* in den Insektenzellexpressionsvektor pIExA kloniert worden. Mit diesem sind dann die Sf9 Zellen durch Lipofektion transfiziert worden. Für die Erstellung einer Zelllinie, die stabil und möglichst homogen das Protein PKC γ -GFP exprimiert, sind die Zellen mit dem Selektionsvektor pIE1-neo

kotransfiziert worden. Anschließend ist eine zweiwöchige Selektion mit dem Antibiotikum G418 erfolgt, die nach weiterer vierwöchiger Kultivierung in einer Zelllinie resultierte, bei der 80 % der Zellen eine deutliche und nahezu uniforme GFP Fluoreszenz im Zytoplasma ohne Fehllokalisierungsmuster aufgrund von Überexpression oder einer unvollständigen Faltung des Fusionsproteins aufwiesen [97]. Je ein Foto der Sf9 PKC γ -GFP Zelllinie, bei der eine Zelle mit einem Argon-Ionen Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488$) zur Fluoreszenz angeregt wird (a) und einer Sf9 Zellkultur, die sich in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befindet (b), ist in der nachfolgenden Abbildung 2 gezeigt.

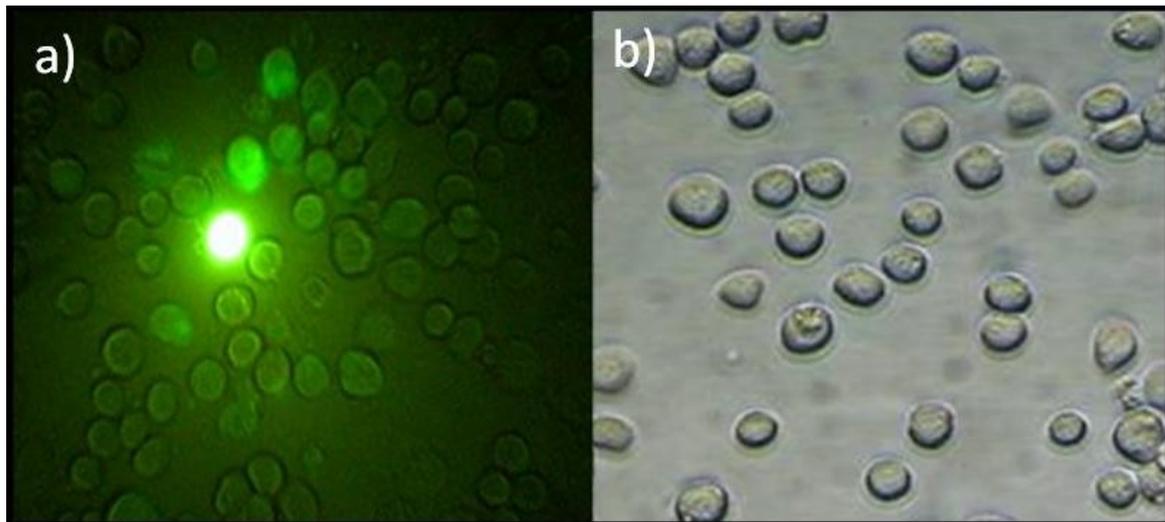


Abbildung 2 a & b: (a) Foto einer Sf9 PKC γ -GFP Zellkultur, bei der eine Zelle mit einem Argon-Ionen Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488$, Laserleistung 2 mW, Vergrößerung: 20-fach) zur GFP Fluoreszenz angeregt wird. (b) Foto einer Sf9 Zellkultur in früher exponentieller Wachstumsphase (Vergrößerung: 20-fach).

2.5.2 DAS BODENBAKTERIUM *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Taxonomisch befindet sich das *Sinorhizobium meliloti* in der Familie der *Rhizobiaceae* und der Unterabteilung der α -Proteobakterien. In der Gruppe der Rhizobien werden die Bakterien zusammengefasst, die in der Lage sind eine Symbiose mit Leguminosen einzugehen und molekularen Stickstoff zu fixieren. Dazu gehören die Genera *Asorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium*.

Es handelt sich dabei um streng aerobe, Gram-negative Stäbchen, die im Boden leben und sich chemoorganotroph ernähren. Sie sind im Allgemeinen subpolar oder peritrich begeißelt. Außer der Fähigkeit zur endosymbiotischen Stickstofffixierung weisen die Rhizobien allerdings keine großen Verwandtschaftsgrade untereinander auf [99,100].

Innerhalb der Gruppe der Rhizobien variieren die Wirtsbereiche stark. Jedoch besitzt jede Rhizobien-Spezies ein spezifisches Wirtsspektrum. *Sinorhizobium meliloti* geht mit den drei

Leguminosen-Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* Symbiosen ein [101] und besitzt eine typische Länge, die etwa von 0,5 µm bis 3 µm variieren kann.

In einer Symbiose wandeln die Bakterien in einer komplexen Reaktion atmosphärischen Stickstoff (N_2) zu Ammonium (NH_4^+) um, welches für die Pflanze als verwertbare Stickstoffquelle zur Verfügung steht. Die Pflanze wiederum versorgt die Bakterien mit Kohlenstoffverbindungen, meist in Form von Dicarboxylaten, wie z.B. Succinat, Malat und Fumarat, die in den bakteriellen Stoffwechsel einfließen [102-104].

Bei Stickstoffmangel besitzen die Leguminosen somit einen entscheidenden Wachstumsvorteil gegenüber Pflanzen, die nicht zur endosymbiotischen Stickstofffixierung in der Lage sind. Die entscheidende ökologische und ökonomische Bedeutung dieser Symbiose wird deutlich, wenn man bedenkt, dass eine Leguminose aufgrund der symbiotischen Stickstofffixierung in der Lage ist, pro Jahr und Hektar 250 kg Stickstoff fixieren [105]. Nach einer spezifischen Erkennung von Seiten des Bakteriums und der pflanzlichen Wirtszelle, wandert *S. meliloti* in die eigens für die Symbiose gebildeten Wurzelknöllchen, wo es endosymbiotisch in einem organellenähnlichen Stadium als Bakteroid zu der Stickstofffixierung in der Lage ist [106].

Zudem ist das nichtpathogene *Sinorhizobium meliloti* eng mit wichtigen pathogenen Bakterien für Pflanzen, Tiere und Menschen der Gattungen *Brucella*, *Burkholderia* und *Ralstonia* verwandt [107]. Somit wird ein Transfer von Erkenntnissen zu diesen medizinisch relevanten Bakterien möglich.

Letztlich ist das *Sinorhizobium meliloti* eines der am meisten untersuchten Rhizobien, dessen Genom bereits früh sequenziert und im Jahr 2001 veröffentlicht worden ist [108]. Daher sind viele Laborroutinen im Umgang mit diesem Bakterium etabliert worden und es existiert eine Vielzahl von Mutanten, die der Forschung zur Verfügung stehen.

3 EXPERIMENTELLER AUFBAU

3.1 UV/VIS-LIF DETEKTION

Der Aufbau für die Laser induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF Detektion) ist schematisch in der nachfolgenden Abbildung 3 dargestellt und basiert auf dem invertierten Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland).

Für die empfindliche UV-LIF Detektion wird für die Anregung ein frequenzvervierfacher Nd:YAG Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, 5 mW, Nanolase, Grenoble, Frankreich) verwendet, der über zwei Spiegel (New Focus, Jan Jose, Kalifornien, USA) in den rückwärtigen Port des Mikroskops eingestrahlt wird. Optional werden Graufilter (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) als Anregungsfilter im Filterwürfel verwendet, die mit 3 % oder 10 % Transmission die eingestrahelte Laserleistung entsprechend reduzieren. Anschließend wird der Laserstrahl an einem dichroitischen Spiegel (HR266 HT300, Laseroptik, Garbsen, Deutschland) reflektiert und durch ein UV-Objektiv (40-fach, Optics for Research, Verona, New Jersey, USA) für die Fluoreszenzanregung in den Mikrofluidikkanal fokussiert. Dabei wird der Mikrofluidik-Chip mit einer motorisierten XY-Stage (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf, Deutschland), die auf dem Mikroskop montiert worden ist, so positioniert, daß die Anregung und die Detektion am gewünschten Punkt im Trennkanal des Mikrofluidik-Chips (i.d.R. einige mm hinter dem Kreuz) stattfindet. Die Höhe des Fokuspunktes in Z-Richtung wird dabei durch den Trieb am Mikroskop eingestellt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird von dem UV-Objektiv eingesammelt und kann nun, insoweit die Wellenlängen $> 300 \text{ nm}$ sind, den Dichroit passieren um anschließend durch den Emissionsfilter (360/50, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) nochmals spektral gefiltert zu werden. Anschließend wird das Licht durch eine Tubuslinse aus Quarzglas (Zeiss, Jena, Deutschland) auf den Detektor fokussiert. Als Detektor wird ein kommerzieller, auch für den UV-Bereich geeigneter, Photomultiplier (H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) verwendet, der von einer externen Spannungsquelle mit 5 V versorgt wird. Dabei befindet sich vor dem Detektor noch ein Pinhole mit dem zusammen er über einen Adapter, der mit Mikrometerstellschrauben eine Feinjustierung in XY-Richtung erlaubt, an dem unteren Port des Mikroskops befestigt ist [109-111].

Für die VIS-LIF Detektion wird entsprechend ein anderer Anregungsfilter (BP450-490, Zeiss, Jena, Deutschland), Dichroit (FT510, Zeiss, Jena, Deutschland) und Emissionsfilter (LP520, Zeiss, Jena, Deutschland) in dem Filterwürfel des Mikroskops, wie auch ein LD Achroplan Korr. Objektiv (20-fach, Zeiss, Jena, Deutschland) statt des UV-Objektivs verwendet. Außerdem wird anstelle des frequenzvervierfachen Nd:YAG Lasers ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) ein Argon-Ionen (Ar^+) Laser (161C-010, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 25 mW (Leistung frei einstellbar), Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) für die Anregung verwendet, indem dessen emittiertes Licht über einen weiteren Spiegel (New Focus, Jan Jose, Kalifornien, USA) in den rückwärtigen Port des Mikroskops gelenkt wird.

Alternativ kann der Aufbau auch modifiziert werden, indem der PMT (H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) als Detektor an einem UV/VIS Spektrometer (Triax 190, Horiba Jobin Yvon, Edison, New Jersey, USA) befestigt und das Fluoreszenzlicht mit einem Spiegel (New Focus, San Jose, Kalifornien, USA) unter dem Mikroskop umgelenkt wird. Somit verläuft der Strahlengang für das emittierte Fluoreszenzlicht durch das UV/VIS Spektrometer, wo es durch Beugungsgitter spektral aufgelöst wird und zeitlich versetzt auf den Detektor trifft. Für die Aufnahme breiterer Spektren wird dazu der, für LIF Detektion, verwendete Emissionsfilter entfernt. Der gesamte Aufbau befindet sich auf einem passiv gedämpften Tisch (Newport Research Corporation, Fountain Valley, Kalifornien, USA), der diesen bis hin zu der Halterung für die Mikrofluidik-Chips in der Waagerechten hält.

Für die Auswertung wird das vom PMT erzeugte TTL-Signal mit einem PC und dem Programm LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA) in einem einstellbaren Zeitfenster aufgezeichnet (i.d.R. ein Intervall von 100 ms, außer unter 5.5 Nachweisgrenze, wird ein Intervall von 200 ms verwendet) und in einer Textdatei gespeichert. Die Textdateien werden nach den Messungen mit dem Programm Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA), mit dem dann auch die Elektropherogramme erstellt werden, geöffnet.

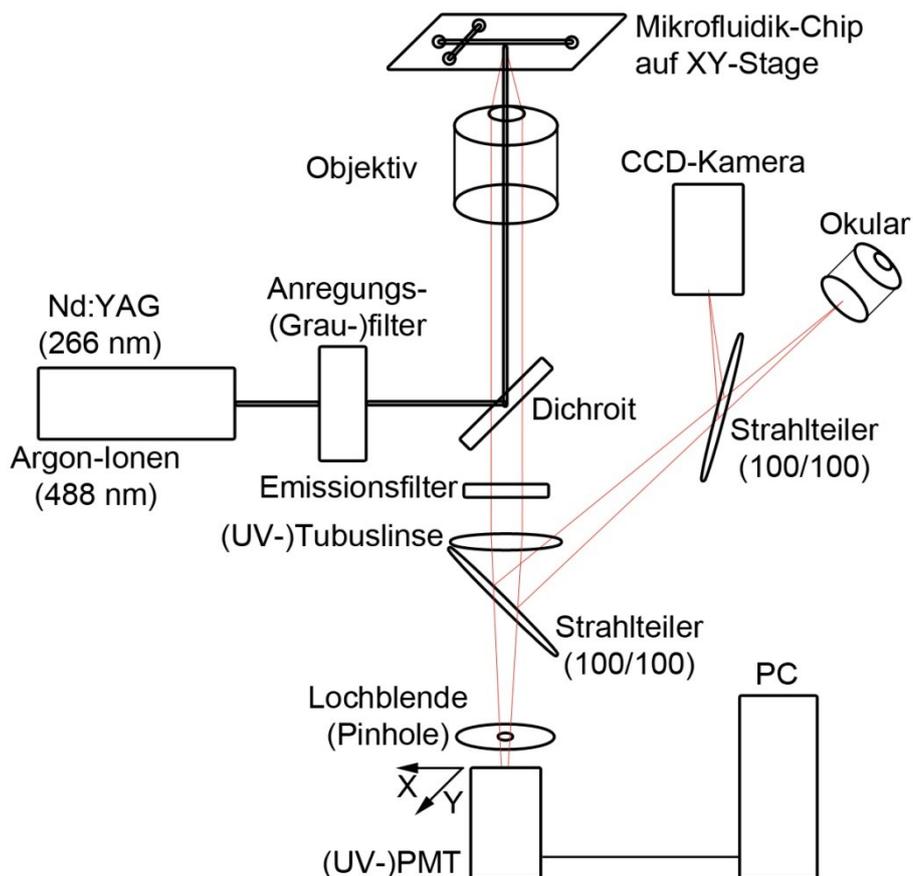


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus für die Laser induzierte Fluoreszenz- (LIF) Detektion in Mikrofluidikkanalsystemen realisiert auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Anregung und Detektion im UV- oder VIS-Bereich werden entsprechend verschiedene Anregungs- und Emissionsfilter, wie ein anderer Dichroit verwendet.

Das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Mikrofluidik-Chip wird mit einem Photomultiplier (H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) detektiert.

Für die elektrophoretische Trennung und den Transport von Biomolekülen (in dieser Arbeit meist Proteine oder die Aminosäure Tryptophan) entweder aufgrund ihrer Ladung oder unter Ausnutzung des Elektroosmotischen Flusses (EOF) in den Mikrofluidikkanälen werden bis zu 4 Reservoirs der Mikrofluidik-Chips durch das Einhängen von Platinelektroden elektrisch kontaktiert. Die notwendige Potentialdifferenz wird durch vier Hochspannungsnetzgeräte, ein HCN 14 (0 – 12500 V, 0 – 1 mA, F.u.G., Rosenheim, Deutschland) und drei HCN 7E (0 – 12500 V, 0 – 500 μ A, F.u.G., Rosenheim, Deutschland), erzeugt. Die Netzgeräte werden mit einer von der Elektronikwerkstatt der Fakultät für Physik (Universität Bielefeld, Deutschland) angefertigten Schaltung mit den Relais 3392 5282 6 (Switch Technology GÜNTHER, Nürnberg, Deutschland) geschaltet, welche neben der Spannungsversorgung auch die Erdung und das Freistellen (d.h. keine elektronische Kontaktierung) der Elektroden erlaubt. Die Regelung der Spannungsversorgung erfolgt mit dem gleichen LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA) Programm, mit dem auch die Daten aus der UV-LIF Detektion aufgezeichnet werden. Die verwendeten Trennspannungen sind jeweils bei den in dieser Arbeit gezeigten Elektropherogrammen angegeben. In der nachfolgenden Abbildung 4 sind Photos von der rechten und von der linken Seite des Aufbaus für die UV/VIS-LIF Detektion gezeigt.

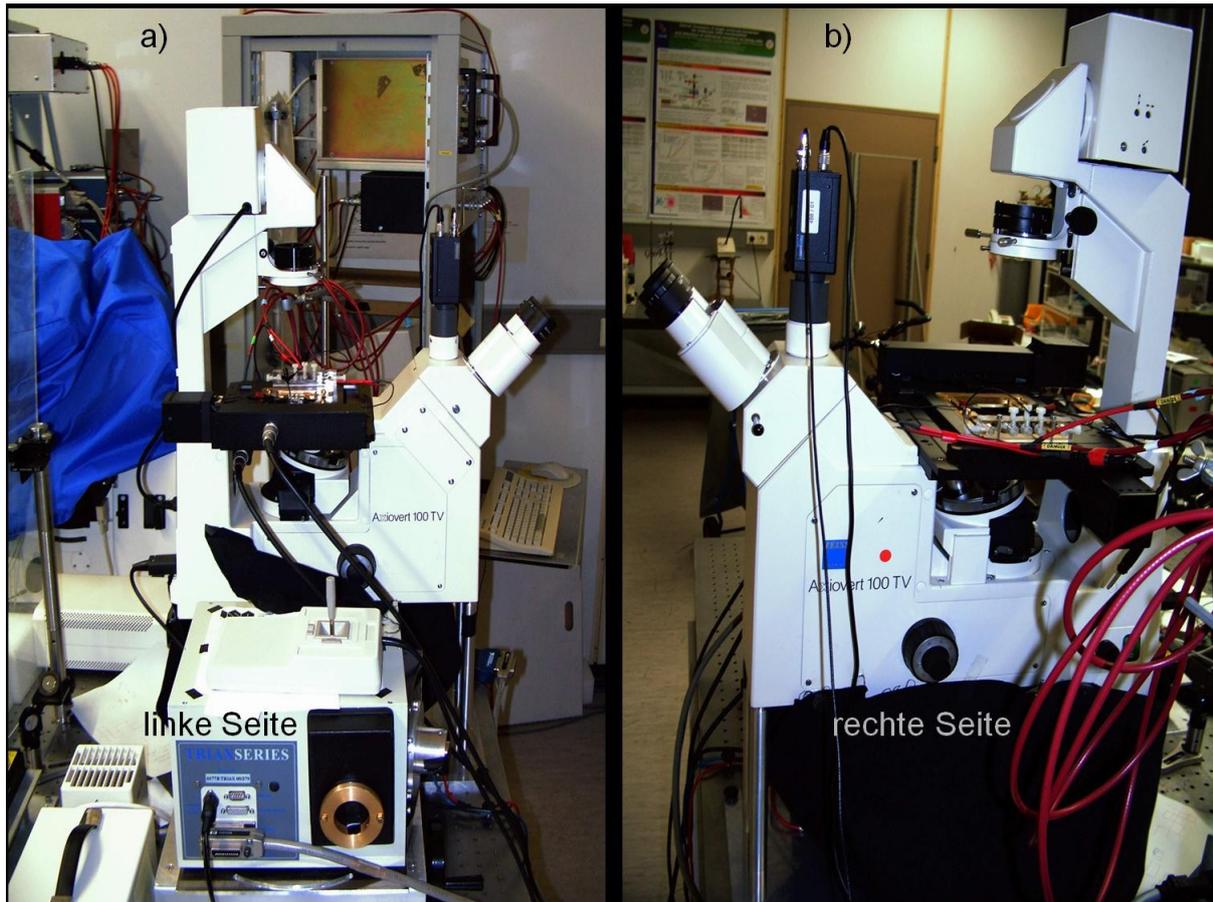


Abbildung 4 a & b: Photos der linken und der rechten Seite des Aufbaus für die UV/VIS-LIF Detektion, der schematisch in der Abbildung 3 dargestellt ist (detaillierte Beschreibung s. 3.1 Text). Auf dem invertierten Mikroskop (Axiovert 100) befindet sich eine XY-Stage, worauf ein Mikrofluidik-Chip, welcher dann mit Platinelektroden kontaktiert wird, befestigt werden kann. (a) Am linken Bildrand ist der frequenzvervierfachte Nd:YAG Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) mit den Spiegeln für die Einkopplung über den rückwärtigen Port sichtbar. Vorne in der Mitte steht das UV/VIS Spektrometer (ohne PMT). Im Hintergrund sind die Hochspannungsnetzgeräte und der Computer für die Steuerung und Datenerfassung zu sehen. (b) Der PMT ist am unteren Port des Mikroskops befestigt und hier nicht sichtbar, da der Strahlengang für Messungen mit dem UV/VIS Spektrometer zum Schutz vor Streulicht aus der Umgebung mit schwarzem Samt verkleidet ist.

3.2 UV/VIS-LIF PARALLELE DETEKTION

Der Aufbau für die UV/VIS-LIF Detektion (s. 3.1) ist modifiziert worden um die gleichzeitige Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen (266 nm und 488 nm) mit gleichzeitiger Detektion im UV- und VIS-Bereich zu ermöglichen, um somit bei der Trennung von Proteinen aus einzelnen Zellen die Peaks bei der nativen UV-LIF Detektion einzelnen mit Fluoreszenzproteinen gekoppelten Proteinen, die mit VIS-LIF detektiert werden, zuordnen zu können. Der Aufbau für

die parallele Laser induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF Detektion) ist schematisch in der nachfolgenden Abbildung 5 dargestellt und basiert wie zuvor auf dem invertierten Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland).

Für die empfindliche UV-LIF Detektion wird für die Anregung ein frequenzvervierfacher Nd:YAG Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, 5 mW, Nanolase, Grenoble, Frankreich) verwendet, der über zwei Spiegel (New Focus, Jan Jose, Kalifornien, USA) in den rückwärtigen Port des Mikroskops eingestrahlt wird. Für die stufenlose Reduktion der Laserleistung sind die Graufilter (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) durch den runden Gradientengraufilter LCVRQ-75 ($n_D = 0$ bis 3, Laser Components, Olching, Deutschland) aus Quarzglas ersetzt worden. Dieser befindet sich nicht mehr im Filterwürfel des Mikroskops, sondern ist direkt in den Strahlengang des Lasers auf dem passiv gedämpften Tisch (Newport Research Corporation, Fountain Valley, Kalifornien, USA), auf dem sich der Aufbau befindet, montiert worden und kann sowohl manuell, als auch mit einem Schrittmotor (Pd1-110-42-232, TRINAMIC, Hamburg, Deutschland) betrieben werden. Anschließend wird der Laserstrahl an einem dichroitischen Spiegel (HR266 HT300, Laseroptik, Garbsen, Deutschland) reflektiert und durch das UV-Objektiv (40-fach, Optics for Research, Verona, New Jersey, USA) für die Fluoreszenzanregung in den Mikrofluidikkanal fokussiert. Dabei wird der Mikrofluidik-Chip mit der motorisierten XY-Stage (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf, Deutschland), die auf dem Mikroskop montiert worden ist, so positioniert, daß die Anregung und die Detektion am gewünschten Punkt im Trennkanal des Mikrofluidik-Chips (i.d.R. einige mm hinter dem Kreuz) stattfindet. Die Höhe des Fokuspunktes in Z-Richtung wird dabei durch den Trieb am Mikroskop eingestellt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird von dem UV-Objektiv eingesammelt und kann nun, insoweit die Wellenlängen $> 300 \text{ nm}$ sind, den Dichroit passieren, um dann nach Verlassen des Mikroskops durch den unteren Port von einem weiteren Spiegel (New Focus, Jan Jose, Kalifornien, USA) umgelenkt zu werden. Zuvor wird der Strahl, der durch die Tubuslinse aus Quarzglas (Zeiss, Jena, Deutschland) fokussiert worden ist durch eine weitere Quarzglaslinse (Zeiss, Jena, Deutschland) wieder parallel ausgerichtet. Außerhalb des Mikroskops trifft das Licht dann auf einen zweiten Dichroit (475 DCX RUV, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) und die Wellenlängen $< 475 \text{ nm}$ werden in Richtung des UV-Detektors reflektiert während Wellenlängen $> 475 \text{ nm}$ transmittiert werden. Nachdem die kleineren Wellenlängen durch eine weitere Linse aus Quarzglas (G063342000, Linos, Göttingen, Deutschland) auf den Detektor (Photomultiplier H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) fokussiert werden, werden diese nochmals durch den Emissionsfilter (360/50, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) spektral gefiltert und das Detektionsvolumen durch ein Pinhole ($1000 \mu\text{m}$) in XYZ-Richtung für die Anpassung die Mikrofluidikkanalgeometrie eingegrenzt, bevor das Licht auf den Detektor trifft.

Für die gleichzeitige VIS-LIF Detektion wird ein Argon-Ionen (Ar^+) Laser (161C-010, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 25 mW (Leistung frei einstellbar), Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) für die Anregung verwendet. Dieser wird über drei Spiegel (New Focus, Jan Jose, Kalifornien, USA) und einen dritten Dichroit (HC Strahlenteiler BS 510, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) in den Strahlengang eingekoppelt auf dem das emittierte Fluoreszenzlicht in entgegengesetzter Richtung verläuft (s. Abbildung 5). Der Strahl wird durch den zweiten Dichroit (475 DCX RUV, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) transmittiert, tritt durch den unteren Port in das Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland), passiert auch den ersten Dichroit (HR266

HT300, Laseroptik, Garbsen, Deutschland) und wird vom gleichen Objektiv (40-fach, Optics for Research, Verona, New Jersey, USA) wie der UV-Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, 5 mW, Nanolase, Grenoble, Frankreich) in den Mikrofluidikkanal auf dem Mikroskop fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht nimmt den zuvor beschriebenen Verlauf, nur daß für die VIS-LIF Detektion die Wellenlängen $> 475 \text{ nm}$ durch dem zweiten Dichroit treten und davon der Anteil mit Wellenlängen $> 510 \text{ nm}$ auch durch den dritten Dichroit transmittiert werden. Anschließend wird das Licht durch eine Linse (G063144000, Linos, Göttingen, Deutschland), hinter der es durch einen Emissionsfilter (LP520, Zeiss, Jena, Deutschland) nochmals gefiltert wird. auf die Detektionsfläche einer Avalanche-Photodiode (APD; SPCM-AQRH, Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, USA) fokussiert. Beide Detektoren, der PMT für den UV-Bereich und die APD für den VIS-Bereich, sind jeweils über einen Adapter, der mit Mikrometerstellschrauben eine Feinjustierung in XY-Richtung erlaubt, befestigt.

Für die Auswertung werden die von den Detektoren erzeugten TTL-Signale von einem digitalen Signalprozessor (DSP, Adwin Gold II, Jäger, Lorsch, Deutschland) verarbeitet, der diese je für ein Zeitintervall von 1 ms sammelt und in einem eigenen Speicher ablegt, der dann in größeren Datenpaketen an einen PC und an das Programm LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas, USA) übergeben wird. Im Anschluss an die Messungen werden die Daten dann in einer Textdatei gespeichert und später mit dem Programm Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) verarbeitet mit dem auch die Elektropherogramme erstellt werden. Dazu werden die gemessenen Intensitäten mit der Zeitauflösung von 1 ms soweit nicht anders angegeben jeweils zu Intervallen von 100 ms aufaddiert. Zuvor ist anstelle der APD noch ein weniger empfindlicher Photomultiplier (PMT; H5784-04, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) für die VIS-LIF Detektion und zudem kein DSP für die parallele Detektion verwendet worden. Die Signale sind dabei in einem Zeitraum von 100 ms für jeden Detektor von dem Programm LabVIEW erfasst worden, was sich aufgrund der sequentiellen Verarbeitung negativ auswirkte und zusammen mit der Programmlaufzeit zu einer gesamten zeitlichen Auflösung von nur $\approx 350 \text{ ms}$ geführt hat.

Für die Eliminierung von Streulicht aus der Umgebung ist der gesamte Aufbau für die LIF Detektion ohne den Computer und die Spannungsversorgung durch einen Verdunklungskasten aus schwarzen Leichtschaumstoffplatten mit Oberflächen aus Zellstoffkarton und Polyurethanschaumkern (KAPA graph, Dicke = 5 mm, 3A Composites, Singen, Deutschland; ehemals Alcan Composites) mit der gleichen Grundfläche wie der passiv gedämpfte Tisch (Newport Research Corporation, Fountain Valley, Kalifornien, USA) und einer Höhe von 1,2 m von der Umgebung im Labor abgetrennt worden. (Der dazu notwendige Stahlrohrrahmen, wie Scharniere und Riegel für die zwei Türen in dem Verdunklungskasten sind in der mechanischen Werkstatt der Fakultät für Physik (Universität Bielefeld, Deutschland) angefertigt worden.) Zusätzlich sind die Detektoren und der Strahlengang für emittiertes Fluoreszenzlicht außerhalb des Mikroskops so weit wie möglich durch einen kleineren Verdunklungskasten aus den gleichen Leichtschaumstoffplatten von dem restlichen Aufbau abgetrennt worden, um Streulicht der Laser zu eliminieren. Für den Argon-Ionen (Ar^+) Laser (161C-010, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 25 mW (Leistung frei einstellbar), Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) ist zudem mit den schwarzen Leichtschaumstoffplatten und einem Kunststoffrohr ein optisch abgeschirmter Kanal für externe Zu- und Abluft zur Kühlung geschaffen worden, so daß die Temperatur innerhalb des großen Verdunklungskastens konstant bleibt.

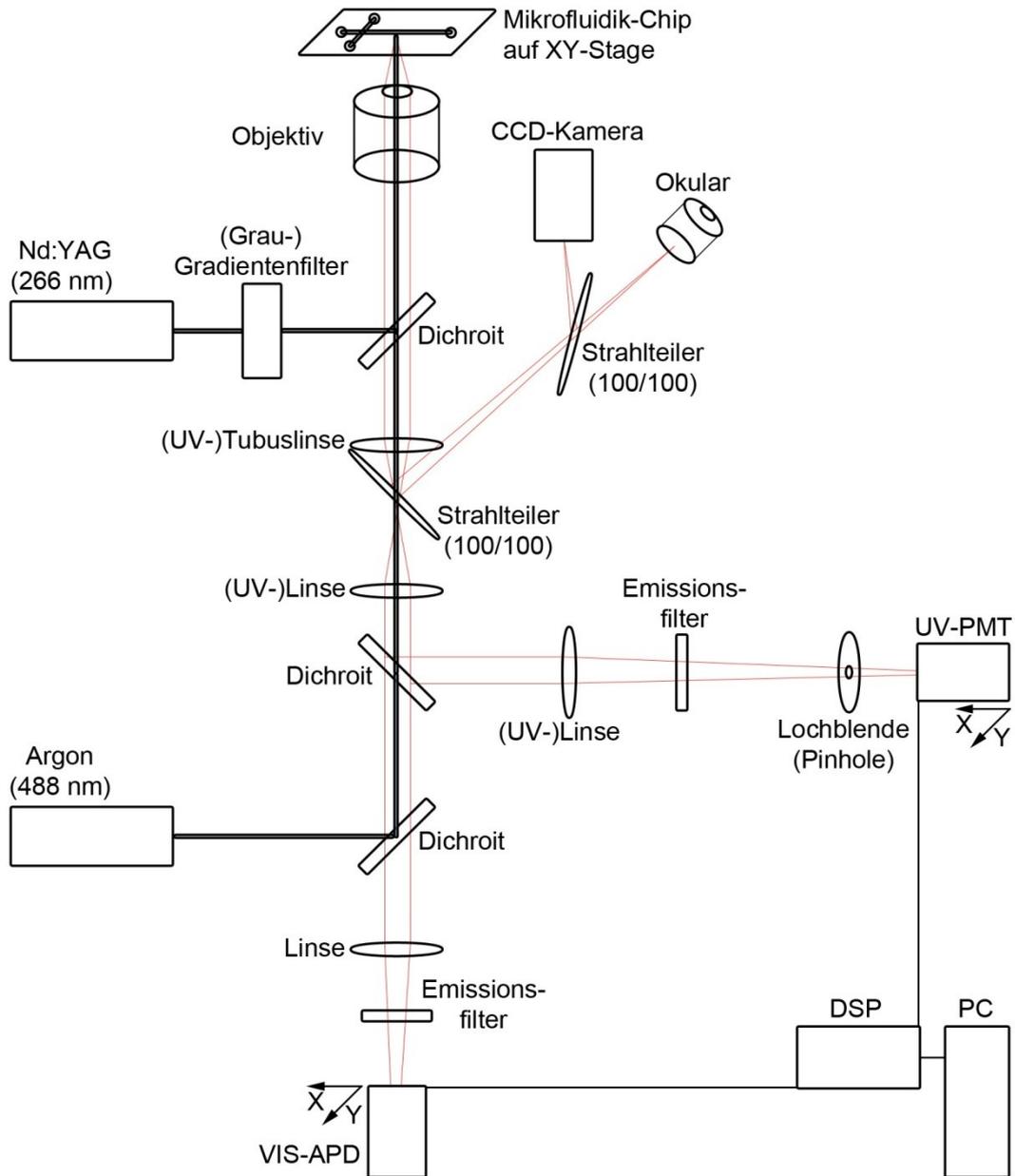


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus für die parallele Laser induzierte Fluoreszenz- (LIF) Detektion in Mikrofluidikkanalsystemen realisiert auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die gleichzeitige Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen (266 nm und 488 nm), wie gleichzeitiger Detektion im UV- und VIS-Bereich werden entsprechend verschiedene Anregungs- und Emissionsfilter, wie drei verschiedene Dichroite verwendet. Das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Mikrofluidik-Chip wird mit einem Photomultiplier (UV-Bereich) und einer Avalanche-Photodiode (APD, VIS-Bereich) detektiert.

Die Regelung und Spannungsversorgung, wie die elektrische Kontaktierung der Reservoirs der Mikrofluidik-Chips für die elektrophoretische Trennung und den Transport von Biomolekülen in den Mikrofluidikkanälen erfolgt weiterhin, wie unter 3.1 (UV/VIS-LIF Detektion) beschrieben. In der nachfolgenden Abbildung 6 sind Photos von der Vorder- (a & c) und von der Rückseite (b & d) des Aufbaus für die parallele UV/VIS-LIF Detektion, der sich zum Teil in einer großen Verdunklungsbox befindet, gezeigt.

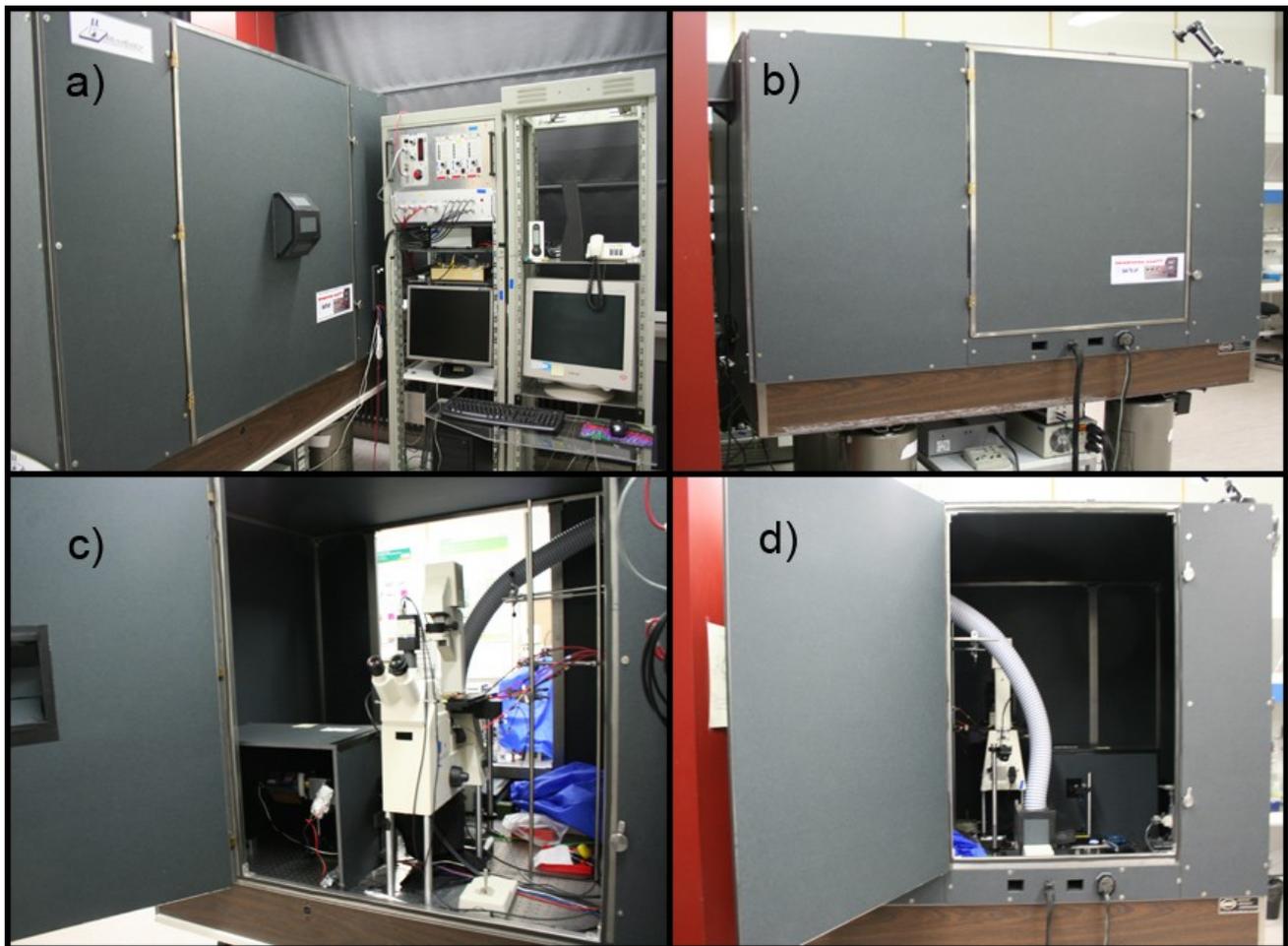


Abbildung 6 a-d: Photos der Vorder- (a & c) und der Rückseite (b & d) des Aufbaus für die parallele UV/VIS-LIF Detektion, der schematisch in der Abbildung 5 dargestellt ist (detaillierte Beschreibung s. 3.2 Text). Auf dem invertierten Mikroskop (Axiovert 100) befindet sich eine XY-Stage, worauf ein Mikrofluidik-Chip, welcher dann mit Platinelektroden kontaktiert wird, befestigt werden kann. Das Mikroskop, die Laser für die Anregung und die Detektoren befinden sich zum Schutz vor Licht aus der Umgebung in einem großen, 1,2 m hohen Verdunklungskasten aus Leichtschaumstoffplatten. Ein weiterer kleinerer Verdunklungskasten aus den gleichen Leichtschaumstoffplatten schützt die Detektoren vor Streulicht von den Lasern. Der Argon-Ionen (Ar^+) Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488$) ist zur Kühlung zusätzlich mit einem lichtgeschützten Kanal für externe Zu- und Abluft ausgestattet und wird über Spiegel und einen Dichroit in den Strahlengang neben dem Mikroskop eingekoppelt, während der frequenzvervierfachte Nd:YAG Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) über den rückwärtigen Port eingestrahlt wird. Die Spannungsversorgung, der digitale

Signalprozessor und ein Computer für die Datenerfassung und Steuerung befinden sich außerhalb von dem Verdunklungskasten.

3.3 FLUORESZENZMIKROSKOP

Für die zeitaufgelöste Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie ist ein handelsübliches invertiertes Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet worden. Dieses ist neben dem Auflicht zusätzlich mit einer motorisierten Stage (Ludl), einer Quecksilberdampfampe (HBO 100 Zeiss, Jena, Deutschland), einem 100x Ölimmersionsobjektiv (Plan Neofluar, NA 1,3, Zeiss, Jena, Deutschland) und einer empfindlichen CCD Kamera (Imager 3LS, LaVision, Göttingen, Deutschland; identisch mit der Sensicam von PCO) mit entsprechender Grabber Karte ausgerüstet (s. Abbildung 7). Für die Aufnahmen sind ein Graufilter (30 % Transmission) im Anregungslichtweg und zwei verschiedene Fluoreszenzfiltersätze (Fs 44, Fs 20, Zeiss, Jena, Deutschland), für die Beobachtung von eGFP- und mCherry- Fusionsproteinen, verwendet worden. Für die Bilderfassung ist das Programm DaVis 6.2, bei maximaler Auflösung des CCD-Chips (1280 x 1024 Pixel mit einer Belichtungszeit von 500 ms für die Observation des DivK-eGFP Fusionsproteins und 250 ms für das GcrA-eGFP Fusionsprotein, verwendet worden. Zudem ist das Labor bereits vor Beginn der Beobachtungen, als auch während dessen auf eine Temperatur von 28 °C geheizt worden, um einerseits den thermischen Drift zu minimieren und auf der anderen Seite um eine optimale Wachstumstemperatur für die Bakterien (*S. meliloti*) zu gewährleisten. Aufnahmen mit einer Infrarotkamera (ThermaCAM E320, FLIR Systems Wilsonville, Oregon, USA) bestätigten überdies, daß die Temperatur von dem Mikrofluidik-Chip, in welchem die Bakterienzellen beim wachsen beobachtet worden sind, auch der Raumtemperatur entspricht [82].

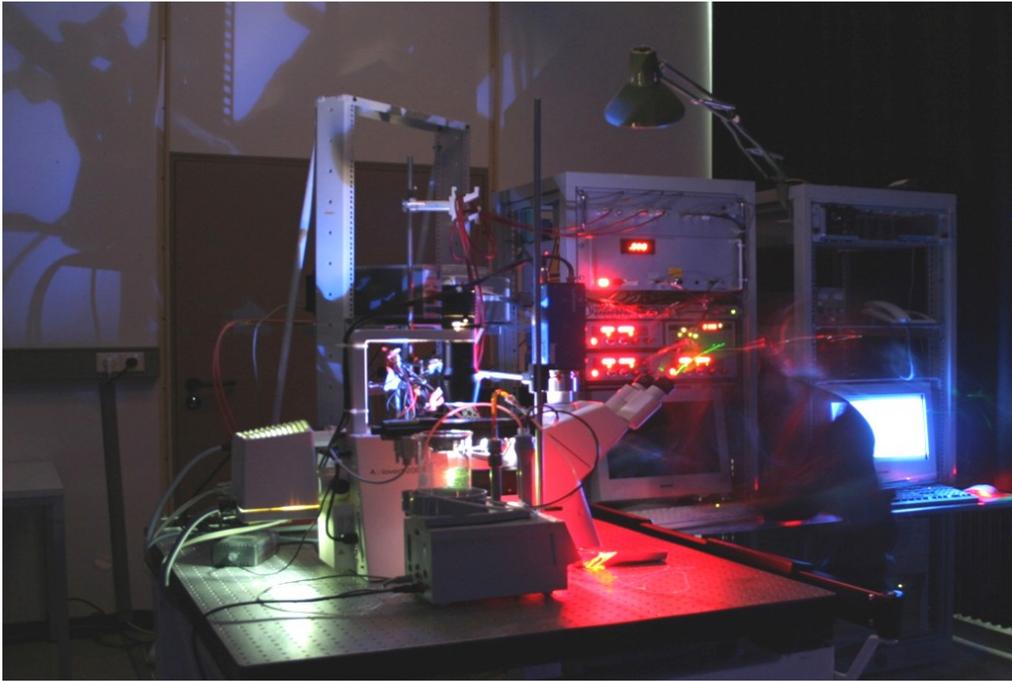


Abbildung 7: Photographie des invertierten Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200, Zeiss) ausgerüstet mit einer Quecksilberdampfampe (HBO 100, Zeiss) und einer motorisierten Stage (Ludl).

Für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (TLFI) ist von den im Wachstum befindlichen Zellen etwa alle 30 min ein Hellfeld- und ein Fluoreszenzbild aufgenommen worden. Dabei ist stets darauf geachtet worden, daß die lebenden Bakterienzellen dem Auflicht und dem Fluoreszenzangeregungslicht nicht länger als nötig ausgesetzt sind. Zudem ist jede Stunde die Füllhöhe der Flüssigkeit in den Reservoirien überprüft worden. Bei Bedarf sind die Reservoirien mit MilliQ-H₂O wieder aufgefüllt worden, um die Salzkonzentration und den damit einhergehenden osmotischen Druck näherungsweise konstant zu halten. Für die Nachbearbeitung der Bilder und die Datenanalyse ist das frei verfügbare Programm ImageJ (1.41o) verwendet worden. Dazu ist die Fluoreszenzintensität des exprimierten Fusionsproteins von jeder Zelle, die sich mindestens zweimal geteilt hat und somit einen vollständigen Zellzyklus durchlaufen haben muss, ausgewertet worden. Für das GcrA-eGFP ist jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle bestimmt worden. Diese ist auch bei den DivK-eGFP exprimierenden Zellen bestimmt worden. Zudem ist bei dieser Mutante jede Zelle in vier gleichgroße Sektionen (s. Abbildung 38) eingeteilt worden und aus jeder Sektion die Intensität des hellsten Pixels ermittelt worden. Die Zellsynchronisierung erfolgte daraufhin *a posteriori* [76]. Dabei wird der Zeitpunkt der ersten Zellteilung (bzw. des ersten Bildes nach der Zellteilung) als Zeitpunkt null gesetzt und die Fluoreszenzintensitäten werden für mehrere Zellen zu jedem Zeitpunkt jeweils gemittelt. Für die Mutante mit dem GcrA-eGFP sind die gemessenen Intensitäten zu dem Zeitpunkt null auf eins normiert worden. Bei der Mutante mit dem DivK-eGFP ist für jede der vier Sektionen die Intensität des hellsten Pixels dividiert durch die mittlere Fluoreszenzintensität von der gesamten Zelle bestimmt worden. Die Auftragung dieser Daten (s. 5.9 TLFI) erlaubt die Unterscheidung, ob die Erhöhung der Fluoreszenzintensität und die damit einhergehende erhöhte Konzentration des untersuchten Proteins, lokalisiert innerhalb oder in der ganzen Bakterienzelle während eines vollständigen Zellzyklus vorhanden ist.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Für alle Experimente mit UV/VIS-LIF Detektion sind die Lösungen mit deionisiertem und durch Ultrafiltration pyrogenfreiem Wasser aus einer Milli-Q biocel-Anlage (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) angesetzt worden. Dieses ist für Lösungen, die in Kontakt mit einer der Zellkulturen kommen zusätzlich autoklaviert und ggf. steril filtriert (Filter mit Porengröße = 0,2 µm) worden. Die verwendeten Chemikalien (Feststoffe, Lösungen, Labormaterialien) sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Name	Hersteller	Bemerkung
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	p.a.
Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Antibiotikum
Antibiotikum: G418	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	50mg/mL
BacVector Insect Cell Medium	Novagen (Darmstadt, Deutschland)	
5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE)	Life Technologies, (Darmstadt, Deutschland)	(ehemals Invitrogen)
Catalase	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (CHES)	Fluka (Dreieichenhofen, Deutschland)	
α-Chymotrypsinogen A	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Deckgläser und Objektträger	Menzel (Braunschweig, Deutschland)	
n-Dodecyl-β-maltosid (DDM)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	p.a.
Fluorescein	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Geneticindsulfat (G418)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Antibiotikum
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	

Name	Hersteller	Bemerkung
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	p.a.
Methylcellulose (MC)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Mikroklemmen	Conrad (Hirschau, Deutschland)	
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Fluka (Dreisenhofen, Deutschland)	
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Ovalbumin (aus Hühnerei)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	bestellt bei VWR (Langenfeld, Deutschland)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“, PBS)	Fluka (Dreisenhofen, Deutschland)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 10 mM Phosphat, pH = 7,4 @ 25 °C
Phospholipase A2	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Platindraht	VWR (Langenfeld, Deutschland)	Durchmesser: 0,4mm
Pluronic F108	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)	großzügigerweise kostenlos gestellt
Polydimethylsiloxane (PDMS)	Dow Corning (Midland, Michigan, USA)	Sylgard 184
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	50% (w/v) in H ₂ O (M _n ≈ 60000, M _w = 750000)
Pullulan	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Silizium-Wafer	CrysTec (Berlin, Deutschland)	5 Zoll
Streptomycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Antibiotikum
SU-8 (25) Photolack	MicroChem	bestellt bei Micro Resist Technology (Berlin, Deutschland)
SU-8 Entwickler: mr-Dev 600	Micro Resist Technology (Berlin, Deutschland)	
SU-8 GBL Verdünner	MicroChem	bestellt bei Micro Resist Technology (Berlin, Deutschland)
Tridecafluor-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-trichlorsilan (TDTS)	ABCR (Karlsruhe, Deutschland)	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Fluka (Dreisenhofen, Deutschland)	

Name	Hersteller	Bemerkung
Tryptophan	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	30 % in H ₂ O

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien (Feststoffe, Lösungen, Labormaterialien).

Für die Fixierlösung zur Präparation von Zellen für die Rasterelektronenmikroskopie und zur Untersuchung der Oberflächenstrukturen bei Bakterien wird zuerst das Paraformaldehyd in einem Wasserbad bei 60 °C für ca. 15 min zur Depolymerisation erhitzt, bevor es in PBS verdünnt wird. Anschließend wird das Glutaraldehyd zugegeben und die Lösung durch vortexen gemischt.

4.2 ZELLKULTIVIERUNG

4.2.1 SF9-ZELLKULTUR

Für die Kultivierung der Sf9 Zellen (Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland) und der Sf9 PKC γ -GFP Zellen ([97]) werden T-25-Gewebekulturflaschen (50 mL, 25 cm², mit Filter im Deckel, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Kulturvolumen von 5 mL mit einem serumfreien BacVector Insect Cell Medium (Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Zellen werden in einem Brutschrank (Heracell 240, Heraeus/Thermo Scientific, Deutschland) bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 27 °C ca. 3 bis 4 Tage bis zu einer nahezu konfluenten ersten Lage ($\approx 2 \cdot 10^6$ Zellen/mL) inkubiert. Anschließend werden die Zellen entweder mit einem neuen oder mit einem in 70 % Ethanol sterilisierten Zellschaber (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) vorsichtig vom Boden der Gewebekulturflaschen abgelöst und $\frac{3}{4}$ des Kulturmediums mit sterilen Einwegpipetten (2 mL, 5 mL und 10 mL, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) durch frisches, vorgewärmtes Medium ausgetauscht. Die entnommenen $\frac{3}{4}$ ($\approx 3,5$ mL) des Kulturmediums werden entweder für Experimente in kleinere Reaktionsgefäße (1,5 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aliquotiert, oder verworfen. Um Kontaminationen zu verhindern, sind alle Arbeiten mit den Zellkulturen in einer Sicherheitswerkbank (M18, Schulz Lufttechnik, Sprockhövel, Deutschland), die zusätzlich vorher und nachher mit 70 % Ethanol desinfiziert worden ist, durchgeführt worden. Alle zusätzlichen Materialien, wie z.B. Pipettenspitzen, Pipetten, Deckgläser und Objektträger sind gleichfalls vor Gebrauch durch Autoklavieren oder mit 70 % Ethanol sterilisiert worden. Außerdem sind die Insektenzellkulturen in regelmäßigen Intervallen präventiv mit Antibiotika behandelt worden (Ampicillin und Streptomycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) je 10 mg/mL 1:100 verdünnt => Endkonzentration = je 100 μ g/mL für die Sf9 Zellen und Geneticindsulfat (G418, Carl Roth,

Karlsruhe, Deutschland) 50 mg/mL 1:500 verdünnt => Endkonzentration = 100 µg/mL für die Sf9 PKC γ -GFP Zellen.

4.2.2 ANZUCHT VON BAKTERIEN ZUR UNTERSUCHUNG DER OBERFLÄCHENSTRUKTUREN

Zur Untersuchung der Oberflächenstrukturen von Bakterien werden sowohl der Wildtyp-Stamm von *S. meliloti*, wie auch zwei Mutanten, die eine abweichende Topographie der Oberfläche erwarten lassen, verwendet. Die drei Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

<i>Sinorhizobium meliloti</i> Stamm	Beschreibung	Referenz oder Ursprung
Rm2011	Wildtyp-Stamm	[112]
Rm0540	exoY	[113]
Rm6963	LPS Defekt => verkürztes LPS	[114]

Tabelle 2: Bezeichnung, wichtige Eigenschaften und Ursprung der verwendeten Bakterienstämme.

Für die Anzucht der Bakterien werden jeweils einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher oder Pipettenspitze von einer Festagarplatte gepickt und damit je 10 mL Kulturmedium in 15 mL Kunststoffröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) oder Reagenzgläsern mit Aluminiumdeckel inokuliert. Die Kulturen werden über Nacht (ü.N.) in einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR, Ika-Labortechnik, Deutschland) in einem Brutschrank (Heraeus/Kendro B12, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur von 28 °C bis zu einer optischen Dichte von o.D.₅₈₀ \approx 0,6 bis 0,8, wo sich die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden, herangezogen. Als Kulturmedium wird Vincent Minimalmedium (VMM) [115] verwendet (1 mM MgSO₄, 18,7 mM NH₄Cl, 10 mM Na₂Succinat, 456 µM CaCl₂, 35 µM FeCl₃, 4 µM Biotin, 48,5 µM H₃BO₃, 10 µM MnSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0,5 µM CuSO₄, 0,27 µM CoCl₂, 0,5 µM NaMoO₄). Das Medium ist freundlicherweise aus der Gruppe von Frau Prof. Anke Becker in Freiburg zur Verfügung gestellt worden.

4.2.3 ANZUCHT VON BAKTERIEN FÜR DAS TLFİ ZUR BESTIMMUNG VON ZEIT- UND ORTSAUFGEÖSTER PROTEINDYNAMIK

Zur Untersuchung der zeitlichen und örtlichen Proteindynamik im Zellzyklus von *S. meliloti* mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie (TLFI) sind von Frau Dr. Nataliya Pobigaylo in der Gruppe von Frau Prof. Anke Becker in Freiburg mittels homologer Rekombination Mutanten basierend auf dem Wildtyp-Stamm (Rm2011) erstellt worden. Bei diesen Stämmen sind die Gene der wichtigen Zellzyklusregulierenden Proteine DivK und GcrA durch 3'translationale Fusionen mit den Genen für die fluoreszierenden Proteine eGFP oder mCherry in einer einzigen Kopie an ihrem nativen Ort im Chromosom ersetzt worden [82]. Die Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

<i>Sinorhizobium meliloti</i> Stamm	Beschreibung	Referenz oder Ursprung
Rm2011 GcrA-eGFP	GcrA-Fusionsmutante	[82]
Rm2011 DivK-eGFP	DivK-Fusionsmutante	[82]
Rm2011 DivK-eGFP GcrA-mCherry	DivK- und GcrA-Doppelfusionsmutante	[82]

Tabelle 3: Bezeichnung, Beschreibung und Ursprung der für das TLFİ verwendeten Bakterienstämme.

Für die Anzucht der Bakterien werden jeweils einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher oder Pipettenspitze von einer Festagarplatte gepickt und damit je 10 mL Kulturmedium in 15 mL Reagenzgläsern mit Aluminiumdeckel inokuliert. Die Kulturen werden über Nacht (ü.N.) in einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR, Ika-Labortechnik, Deutschland) in einem Brutschrank (Heraeus/Kendro B12, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur von 28 °C bis zu einer optischen Dichte von o.D.₅₈₀ ≈ 0,6 bis 0,8, wo sich die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden, herangezogen. Als Kulturmedium wird Vincent Minimalmedium (VMM) [115] verwendet (1 mM MgSO₄, 18,7 mM NH₄Cl, 10 mM Na₂Succinat, 456 µM CaCl₂, 35 µM FeCl₃, 4 µM Biotin, 48,5 µM H₃BO₃, 10 µM MnSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0,5 µM CuSO₄, 0,27 µM CoCl₂, 0,5 µM NaMoO₄), welches freundlicherweise aus der Gruppe von Frau Prof. Anke Becker in Freiburg zur Verfügung gestellt worden ist. Anschließend sind die Bakterienzellen, wie unter 4.5.3.1 beschrieben für die Messungen präpariert worden.

4.3 ZELLPRÄPARATION (FÜR EXPERIMENTE)

4.3.1 WASCHEN VON SF9 ZELLEN FÜR EINZELZELLEXP

Die aliquotierten Sf9-Zellen (s. 4.2.1 Sf9-Zellkultur) werden vor den Experimenten gewaschen, um etwaige Zellreste von zerstörten Zellen, sezernierte Proteine usw. zu entfernen und um die Zellen in das gleiche Medium (Trennpuffer) zu überführen, in dem auch die Trennungen stattfinden. Dazu wird 1 mL der Kultur in einem Reaktionsgefäß (1,5 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit der Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 7 min bei 1000 UpM abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Die Zellen, die sich jetzt in einem Pellet in dem Reaktionsgefäß befinden werden durch vorsichtiges vortexen in 0,5 mL PBS (pH = 7,4, Fluka, Dreisenhofen, Deutschland) resuspendiert. Anschließend werden die Zellen erneut abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 0,5 mL Trennpuffer (genaue Angabe in dem jeweiligen Abschnitt unter 5 Ergebnisse und Diskussion) wie zuvor durch vorsichtiges vortexen resuspendiert und können nun für die Experimente verwendet werden.

4.3.2 CFDA-SE MARKIERUNG ALLER PROTEINE IN SF9 ZELLEN

Für die unspezifische Markierung aller Proteine in Zellen wird 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dieses nicht fluoreszierende, lipophile Molekül ist membrangängig, d.h. es ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren. Bei lebenden Zellen werden durch Esterasen die Acetylgruppen abgespalten und das stark fluoreszierende Carboxyfluorescein-Succinimidylester bindet an primäre Aminogruppen [116], d.h. an frei zugängliche Seitenketten der Aminosäure Lysin und N-Termini von Proteinen und Peptiden. Dazu wird 1 mL der in der ersten Lage konfluent gewachsenen Sf9-Zellen nach dem Ablösen von der Oberfläche mit einem Zellschaber (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zweimal bei 3000 UpM für 3 min mit der Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert und das Pellet anschließend jeweils in 1 mL PBS (pH = 7,4, Fluka, Dreisenhofen, Deutschland) resuspendiert. Das CFDA-SE wird in einer Konzentration von 10 mM in DMSO (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gelöst, bevor 4 µL dieser Lösung zu der Zellsuspension pipettiert werden. Die Zellsuspension wird vorsichtig auf dem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) mit dem Farbstoff vermischt und anschließend für 30 min bei 27 °C inkubiert. Zum Waschen der Zellen und damit zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff werden die Zellen erneut zweimal bei 3000 UpM für 3 min abzentrifugiert und das Pellet anschließend jeweils in 1 mL PBS resuspendiert. Direkt vor Beginn der Messung werden die Zellen ein letztes Mal bei 3000 UpM für 3 min abzentrifugiert

und das Pellet in 1 mL Trennpuffer (100 mM TRIS, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 8,9) resuspendiert.

4.3.3 PRÄPARATION VON BAKTERIEN ZUR UNTERSUCHUNG DER OBERFLÄCHENSTRUKTUREN

Für die Untersuchung der Oberflächen von *S. meliloti* mit (XHR) SEM und AFM (s. 4.4 Hochauflösende Mikroskopie) werden die Zellen entsprechend der jeweiligen Umgebungsbedingungen, die bei den verschiedenen Mikroskopie-Techniken vorherrschen schonend präpariert. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Behandlung der Bakterien werden im Folgenden dargestellt.

Für alle Untersuchungen, unabhängig davon, ob diese im Vakuum, bei Atmosphärendruck, in Trockenheit oder in Flüssigkeit stattfinden, ist es notwendig, daß die Zellen auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Dafür werden konventionelle Glassubstrate, d.h. Objektträger oder Deckgläser (Menzel, Deutschland) verwendet. Damit diese frei von Verschmutzungen sind werden sie in einem Ultraschallbad (Elma T 490DH, Elma, Deutschland) nacheinander, zuerst in Aceton, dann in Ethanol und zuletzt in MilliQ-H₂O, für jeweils 20 s gereinigt. Anschließend werden die Gläser mit Stickstoff (Linde, Deutschland) getrocknet.

4.3.3.1 PRÄPARATION FÜR DIE RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (SEM)

Beim SEM befindet sich die Probe in einem Vakuum. Daher werden die *S. meliloti*-Zellen erst fixiert, anschließend wird das darin enthaltene Wasser langsam gegen Ethanol ausgetauscht. Dann wird der Ethanol wegen der niedrigeren Oberflächenspannung durch Isopropanol ersetzt, um so beim anschließenden Austrocknen der Probe den Stress an der Oberfläche und die damit einhergehende Beschädigung so gering wie möglich zu halten. Vor der Abbildung der Probe wird diese dann noch mit Gold beschichtet, um so eine leitende Oberfläche zu erhalten.

Es werden für jede Probe je 1 mL der *S. meliloti*-Bakterienkulturen, die über Nacht bis zu einer Dichte von o.D.₅₈₀ ≈ 0,6 bis 0,8 herangezogen worden sind, zweimal mit PBS gewaschen um mögliche Verunreinigungen (z.B. durch Zellbruchstücke) aus dem Kulturmedium (VMM) zu entfernen. Dazu werden die Kulturen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Deutschland) für jeweils 5 min bei 1500 UpM in einer Zentrifuge (S417C, Eppendorf, Deutschland) abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Pellets, die die Bakterien an den Böden gebildet haben, werden in je 500 µL PBS durch vorsichtiges vortexen oder langsames auf- und abpipettieren resuspendiert. Nach dem Waschen werden die Zellen ein drittes Mal abzentrifugiert und für die Fixierung in PBS mit 1,5 % (v/v) Glutaraldehyd und 1,5 % (v/v) Paraformaldehyd resuspendiert und für 60 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen.

Dadurch werden zugängliche Amine, im Wesentlichen in den Resten von Aminosäuren, quervernetzt und abgesättigt, was die natürlich vorkommenden Strukturen der Oberflächen stabilisiert.

Anschließend werden die Bakterien erneut gewaschen, jedoch diesmal nicht in PBS, sondern in 500 μL MilliQ-H₂O resuspendiert. Somit wird verhindert, daß sich beim späteren Eintrocknen Salzkristalle bilden, die einerseits bei ihrer Entstehung die Zellen schädigen können und andererseits in den Abbildungen als Artefakte aus der Präparation die Interpretation beobachteter Strukturen erschweren. Im nächsten Schritt wird das Wasser gegen Ethanol ausgetauscht. Da der Alkohol längere Zeit benötigt, um sich in der ganzen Zelle gleichmäßig zu verteilen ist es sinnvoll, die Konzentration nur langsam zu erhöhen, um somit größere Konzentrationsgradienten, die durch resultierenden Stress zur Schädigung der Probe führen können, nur langsam zu erhöhen. Dies geschieht, indem die Zellen in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf, Deutschland), mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 8 mm, schwimmend in einer größeren mit Alufolie verschlossenen Glasschale, mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 30 cm, gefüllt mit ca. 1,5 L Ethanol, für mindestens 2 Tage bei RT stehen gelassen werden. Somit stellt sich nach und nach zwischen den beiden, nur durch die Gasphase verbundenen Flüssigkeiten, in einer, wegen der großen Oberfläche der Glasschale, mit Ethanol gesättigten Atmosphäre ein Gleichgewicht ein. Dieses Gleichgewicht liegt aufgrund des Volumenverhältnis (1:3000 (H₂O:Ethanol) bei 500 μL Probe und immer noch 1:500 (H₂O:Ethanol) bei 6 Proben mit je 500 μL) der beiden Flüssigkeiten klar auf der Seite des Ethanols und führt nach 2 Tagen zu einem Anteil von > 90 % (v/v) Ethanol in der Flüssigkeit, in welcher sich die Zellen befinden.

Die Zellen werden erneut abzentrifugiert (5 min bei 1500 UpM), der Überstand mit dem Ethanol entfernt und durch 500 μL Isopropanol ersetzt. Nach dem Resuspendieren werden jeweils 10 μL und 20 μL von jeder Probe auf 8x8 mm² Deckgläser pipettiert. Zum schonenden Austrocknen werden die Deckgläser mit den Proben dann auf einen Schaumstoffschwimmer (Eppendorf, Deutschland) in einer Glaspetrischale (Durchmesser 9 cm) gelegt. Der Boden der Glaspetrischale ist zuvor mit ca. 10 mL Isopropanol befüllt worden. Damit eine mit Isopropanol gesättigte Atmosphäre entsteht, die verhindert, daß die Proben nicht schon innerhalb von etwa 1 min vollständig ausgetrocknet sind, wird die Petrischale mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen. Nach etwas mehr als 2 Tagen bei Raumtemperatur gelagert ist das Isopropanol verdunstet und die Zellen sind nun dehydriert und liegen in Trockenheit vor. Um eine Rehydrierung zu vermeiden werden die Proben in mit Parafilm vollständig verschlossenen Kunststoffpetrischalen (Grainer, Deutschland; Durchmesser 9 cm) über Silica Orange (Carl Roth, Deutschland) bei 0 % Luftfeuchtigkeit gelagert.

Vor der Abbildung der Bakterien mit dem Rasterelektronenmikroskop (SEM) werden diese durch Sputtern mit einer leitenden Schicht aus Gold versehen. Dazu werden die Proben auf den Deckgläsern in die Kammer des Bal-Tec MED 020 Sputter Coater (Bal-Tec, Lichtenstein) transferiert. Dort wird durch Sputtern, nach der Evakuierung bis auf $2 \cdot 10^{-5}$ mbar, in einer Argon-Atmosphäre bei $4 \cdot 10^{-3}$ mbar eine ca. 12 nm dicke Schicht aus Gold aufgebracht. Anschließend werden je 2 der Deckgläser mit Leitsilber (Conrad, Hirschau, Deutschland) auf einem Probenträger aus Kupfer befestigt und kontaktiert.

4.3.3.2 PRÄPARATION FÜR DAS XHR SEM

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen sind für die Abbildung mit einem Magellan XHR SEM (FEI, Eindhoven, Die Niederlande) ebenso präpariert worden, wie für die Abbildung mit einem konventionellen Rasterelektronenmikroskop (s. 4.3.3.1). Allerdings ist dabei auf die Auftragung einer leitenden Metallschicht verzichtet worden und es sind ca. 10 µL der Probe mit den Bakterien in Isopropanol direkt auf den Probenträger des XHR SEM getropft worden, wo das Isopropanol innerhalb von etwa 1 min verdunstet ist.

4.3.3.3 PRÄPARATION FÜR DAS AFM IN TROCKENHEIT

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen sind für die Abbildung mit einem Multimode IIIa AFM (Veeco, USA) in Trockenheit ebenso präpariert worden, wie für die Abbildung mit einem konventionellen SEM (s. 4.3.3.1). Allerdings ist auch hier auf das Sputtern mit Gold verzichtet worden und die Deckgläser mit den langsam ausgetrockneten Bakterien ohne Metallbeschichtung sind für das Scannen auf dafür vorgesehene Nickelplättchen geklebt worden.

4.3.3.4 PRÄPARATION FÜR DAS AFM IN FLÜSSIGKEIT

Während die Bakterien durch Trocknung ausreichend fest auf den Deckgläsern haften, ist es für die Abbildung mit einem AFM in Flüssigkeit notwendig, daß die *S. meliloti*-Bakterienzellen auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Dazu werden gereinigte Objektträger (s. 4.3.3) mit Polyethylenimin (PEI), einem positiv geladenen Polymer, in seiner Struktur ähnlich dem Polylysin, beschichtet.

Dazu wird zu Beginn mit einem Skalpell ein rechteckiger Ausschnitt von ca. 3·2 cm² aus einem Stück Parafilm in der Größe des Objektträgers (7,2·2,6 cm²) ausgeschnitten. Der Parafilm wird auf den Objektträger gelegt und auf einer Heizplatte bei 50 °C für wenige Sekunden erhitzt. Sobald der Parafilm durchsichtig wird, klebt dieser selbstständig auf dem Glas und bildet durch seine Hydrophobizität eine Barriere, die es erlaubt größere Volumina an hydrophilen Flüssigkeiten (> 3 mL) in dem Ausschnitt in der Mitte zu halten, ohne daß diese von dem Objektträger herunterlaufen. Dies ist wichtig, damit später auch bei längerer Messdauer nicht zu viel Flüssigkeit verdunstet und durch Aufkonzentrierung die Osmolarität des Mediums, in dem sich die Bakterien befinden, steigt oder die Probe gar vollständig austrocknet. Für die Beschichtung wird in den Ausschnitt auf dem Objektträger 1 mL einer 0,1 %igen Lösung aus Polyethylenimin (PEI) in MilliQ-H₂O pipettiert und diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird überschüssiges PEI, welches sich nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativen Silanolgruppen des Glases angelagert hat, durch spülen mit

MilliQ-H₂O entfernt. Die Oberfläche wird mit Stickstoff getrocknet und der so vorbereitete Objektträger mit einer positiven Oberflächenladung im Ausschnitt kann nun auch für längere Zeit (> 1 Monat) in Trockenheit gelagert werden.

Für die Immobilisierung der *S. meliloti*-Bakterienzellen werden je 1 mL der Kulturen, die über Nacht bis zu einer Dichte von o.D.₅₈₀ ≈ 0,6 bis 0,8 herangezogen worden sind, entweder lebend, direkt nach dem Waschen oder nach Waschen und chemischer Fixierung mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd, wie bei der Präparation für das SEM beschrieben (s. 4.3.3.1), in dem Ausschnitt der vorbereiteten Objektträger auf die mit PEI beschichtete Oberfläche pipettiert. Dort werden die Zellen bei hoher Luftfeuchtigkeit für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Untersuchung des Einflusses des osmotischen Drucks auf die Oberflächenstrukturen sind die Bakterien nach dem waschen für die Immobilisierung entweder in PBS, Kulturmedium (VMM) oder MilliQ-H₂O resuspendiert worden. Nach der Inkubation ist ein großer Teil der Zellen durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der überwiegend negativ geladenen äußeren Membran und der durch PEI-Beschichtung positiven Oberfläche immobilisiert. Der Überstand mit noch frei schwimmenden und nicht ausreichend immobilisierte Bakterien werden durch gründliches spülen mit MilliQ-H₂O entfernt. Anschließend werden die Zellen auf der Oberfläche bis zur Abbildung mit dem AFM bei hoher Luftfeuchtigkeit in 400 µL PBS, VMM oder MilliQ-H₂O feucht gehalten.

4.4 HOCHAUFLÖSENDE MIKROSKOPIE

4.4.1 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (SEM)

4.4.1.1 ABBILDUNG VON BAKTERIEN MIT DEM SEM

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen, die wie unter 4.3.3.1 beschrieben fixiert, schonend dehydriert und durch Sputtern mit Gold beschichtet worden sind, werden mit dem Rasterelektronenmikroskop JSM-880 der Firma Jeol (Tokyo, Japan) abgebildet. Dazu werden die Zellen auf den Probenträgern aus Kupfer über eine Schleuse in das Vakuum überführt. Dort werden die Bakterien von einem Elektronenstrahl mit einem Strom von $5 \cdot 10^{-11}$ A bis $2 \cdot 10^{-10}$ A und einer Beschleunigungsspannung von 12 kV oder 20 kV gescannt.

4.4.1.2 ABBILDUNG VON BAKTERIEN MIT DEM XHR SEM

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen, die wie unter 4.3.3.2 beschrieben präpariert worden sind, werden mit dem Magellan XHR SEM der Firma FEI (Eindhoven, Die Niederlande) abgebildet. Dabei erlaubt dieses moderne Rasterelektronenmikroskop Scannen der Zellen auch ohne eine zusätzliche leitende Metallbeschichtung an der Oberfläche. Die Bakterien sind mit einer niedrigen Beschleunigungsspannung von 2 kV abgebildet worden, da die Eindringtiefe mit der Energie der Elektronen, gerade bei Proben die hauptsächlich aus Atomen mit niedrigen Ordnungszahlen bestehen, stark zunimmt.

4.4.2 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE (AFM)

4.4.2.1 ABBILDUNG VON BAKTERIEN MIT DEM AFM IN TROCKENHEIT

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen, die wie unter 4.3.3.3 beschrieben fixiert und schonend dehydriert worden sind, werden mit dem AFM Nanoscope IIIa Multimode (Veeco, Santa Barbara, Kalifornien, USA) mit einem J-Scanner im Tapping-Mode bei Raumtemperatur und Normaldruck in Trockenheit gescannt. Dazu werden die Deckgläser mit den Zellen auf runde Nickelplättchen geklebt mit welchen die Probe auf dem Scanner magnetisch fixiert wird. So kann die Probe in X-, Y- und Z-Richtung unter der vorgegebenen Position der Cantileverspitze bewegt werden. Bei Scangeschwindigkeiten von 1,8 $\mu\text{m/s}$ bis 10 $\mu\text{m/s}$ werden die Bakterien mit den BSTap300-Al Silizium-Cantilevern (Budget Sensors, Sofia, Bulgarien) abgebildet. Diese besitzen laut Hersteller eine Federkonstante von 40 N/m, eine Resonanzfrequenz von ca. 300 kHz und einen Krümmungsradius der Spitze von < 10 nm.

4.4.2.2 ABBILDUNG VON BAKTERIEN MIT DEM AFM IN FLÜSSIGKEIT

Die *S. meliloti*-Bakterienzellen, die wie unter 4.3.3.4 beschrieben präpariert worden sind, werden mit dem AFM MFP-3D (Asylum Research, Santa Barbara, Kalifornien, USA), welches sich auf einem inversen optischen Mikroskop, dem IX71 (Olympus, Tokyo, Japan), befindet, im Tapping-Mode bei Raumtemperatur in Flüssigkeit gescannt. Dazu werden die präparierten Objektträger mit den immobilisierten Bakterien, die mit jeweils 400 μL MilliQ- H_2O , Kulturmedium (VMM) oder PBS bedeckt sind, durch Magnete auf dem XY-Scanner, welcher auf dem Mikroskop-Tisch befestigt ist, fixiert. Der Cantilever wird am Messkopf, der auch den Z-Hub beinhaltet, befestigt und dieser dann anschließend von oben auf die Probe abgesenkt. Bei Scangeschwindigkeiten von 2 $\mu\text{m/s}$ bis 4,5 $\mu\text{m/s}$ werden die Bakterien mit den Microbiolever AC40TS-Cantilevern (Olympus, Tokyo, Japan) abgebildet. Diese besitzen laut Hersteller eine Federkonstante von 0,1 N/m, eine Resonanzfrequenz von ca. 30 kHz in MilliQ- H_2O und einen Krümmungsradius der Silizium-Spitze von 10 nm.

4.5 SOFTLITHOGRAPHIE

Die Mikrofluidik-Chips aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) sind mittels Softlithographie hergestellt worden. Diese Methode ist bereits im Jahr 1998 von Xia und Whitesides ausführlich beschrieben worden [83]. Die dazu notwendigen Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) erworben worden. Zuerst wird der Photolack Su8-25 (Micro Resist Technology) auf einem Masterwafer lithographisch strukturiert (s. [110,117,118]). Dazu sind die gewünschten Strukturen mit dem CAD-Programm Clewin (PhoeniX, Enschede, Die Niederlande) gezeichnet worden bevor diese auf eine Chromphotomaske (Delta Mask, Enschede, Die Niederlande) übertragen werden. Durch die Chromphotomaske wird der Photolack, der durch Spin Coating (engl. für Rotationsbeschichtung oder Aufschleudern) in gewünschter Dicke auf einen Silizium-Wafer (CrysTec, Berlin, Deutschland) aufgebracht worden ist, mit der i-Linie einer Quecksilberdampfampe belichtet. Anschließend ist der Lack nach Herstellerangaben entwickelt worden (s. Abbildung 8).

Damit später das PDMS leicht von dem Masterwafer abgelöst werden kann und nicht an dem Photolack haften bleibt, wird dieser mittels chemischer Gasphasenabscheidung in einem Exsikkator mit dem Silan Tridecafluor-1,1,2,2-tetra-hydrooctyl-trichlorsilan (TDTS; ABCR, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet, bevor die Strukturen mit PDMS abgeformt werden können. Das PDMS ist von Dow Corning in den USA (Midland, Michigan) erworben worden. Das Polymer und der Quervernetzer sind in einem Verhältnis von 10:1 gründlich vermischt worden bevor das noch flüssige PDMS vorsichtig über den Masterwafer gegossen worden ist. Das Polymer wird bei einer Temperatur von 85 °C ausgehärtet und vom Wafer abgezogen, bevor es mit einem Skalpell zurechtgeschnitten worden ist.

Um einen Zugang für Flüssigkeiten zu den Kanälen zu gewährleisten und um diese elektrisch kontaktieren zu können, werden nun Reservoirlöcher mit einem Durchmesser von 3 mm in das PDMS gestochen. In einem Ultraschallbad (Elma T 490 DH) wird das PDMS nacheinander erst in Aceton, dann in Ethanol und zum Schluss in MilliQ-H₂O gereinigt bevor es mit Stickstoff (Linde, München, Deutschland) getrocknet wird. Die Deckgläser (Suprasil I, Heraeus für die UV-LIF Detektion, bzw. Menzel für alle anderen Experimente) werden auf die gleiche Weise gereinigt und getrocknet.

Anschließend werden das PDMS auf der Kanalseite und die Deckgläser für 30 s einem Sauerstoffplasma (Plasmakammer, Eigenbau; Teslaspule mit 50 kV, 500 kHz und einem Elektrodenabstand von 6,1 cm bei einem Druck von 10⁻¹ mbar) ausgesetzt, um die Oberflächen zu aktivieren. Direkt nach der Plasmabehandlung wird das PDMS mit einem Deckglas zum fertigen Mikrofluidik-Chip zusammengesetzt. Dabei bilden sich nach kurzer Zeit kovalente Bindungen zwischen dem Polymer und der Glasoberfläche aus, so daß diese nicht wieder zerstörungsfrei getrennt werden können (s. Abbildung 8). Letztlich werden noch kleine, mit Reservoirlöchern versehene PDMS-Stücke zur Vergrößerung des Volumens der Reservoirs des Mikrofluidik-Chips auf diesen gelegt. Daraus resultiert ein Volumen von ca. 30 µL je Reservoir (s. z.B. Abbildung 12).

4.5.1 PDMS-CHIPS UV-LIF

Die PDMS-Chips für die UV-LIF Detektion (Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) werden mittels Softlithographie, wie unter 4.5 beschrieben, hergestellt. Allerdings werden wegen der benötigten hohen UV-Transparenz Deckgläser (60 mm · 24 mm · 0,2 mm) aus sehr hochwertigem Quarzglas (Suprasil I, Aachener Quarzglas Technologie Heinrich, Aachen, Deutschland) zum Verschließen der Kanäle verwendet. Für die Trennung des Proteinhaushalts aus einzelnen Sf9-Zellen mit anschließender LIF Detektion sind PDMS-Chips mit einer Kanalbreite von 30 μm und einer Kanaltiefe von 30 μm , sowie mit Pfosten im Kreuzungsbereich, welche beim einspülen der Zellen verhindern, daß diese in den Trennkanal gelangen hergestellt worden. Die einzelnen Schritte der Herstellung sind in der nachfolgenden Grafik (s. Abbildung 8) schematisch dargestellt.

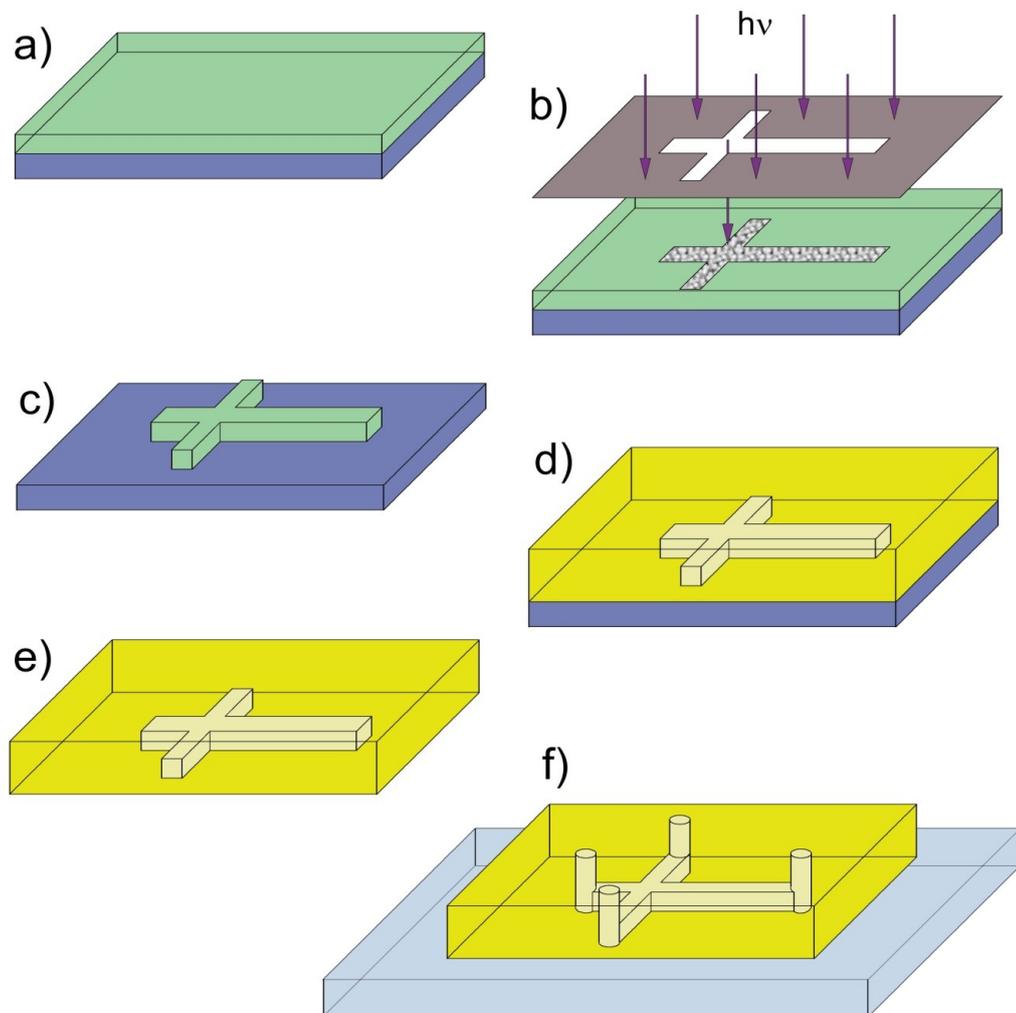


Abbildung 8: Schematische Darstellung der PDMS-Chip-Produktion: (a-c) Die negativen Mikrokanalstrukturen werden mittels Softlithographie auf einem Masterwafer hergestellt. (a) Der Photolack SU-8 wird mittels Spin Coating (engl. für Rotationsbeschichtung oder

Aufschleudern) in gewünschter Dicke (z.B. 30 μm) auf einen Silizium-Wafer aufgetragen. (b) Der Photolack wird mit der i-Linie ($\lambda = 365 \text{ nm}$) einer Quecksilberdampfampe durch eine mit Chrom beschichtete Photomaske quervernetzt. (c) Der Photolack wird entwickelt und ausgehärtet, so daß die negativen Strukturen auf dem Wafer verbleiben. (d) Das PDMS wird auf den Wafer gegossen und ausgehärtet (4 h @ 85 °C). (e) Das PDMS mit den abgeformten Strukturen wird vom Wafer abgezogen und die Form der Chips mit einem Skalpell ausgeschnitten. (f) Die Reservoirlöcher werden als Zugänge zu den Mikrokanälen in das PDMS gestanzt, bevor der Chip nach O_2 -Plasmaoxidation mit einem Quarzdeckglas (Suprasil I, 60 mm x 24 mm x 0,2 mm) verschlossen wird.

4.5.2 PQW-CHIPS

Die PDMS-Quartz-Window-chips (PQW-Chips, engl. für PDMS-Quarzglas-Chips) für die UV-LIF Detektion (Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) werden mittels Softlithographie, wie unter 4.5 beschrieben, hergestellt. Allerdings werden wegen der benötigten hohen UV-Transparenz Deckgläser (60 mm · 24 mm · 0,2 mm) aus sehr hochwertigem Quarzglas (Suprasil I, Aachener Quarzglas Technologie Heinrich, Aachen, Deutschland) zum Verschließen der Kanäle verwendet. Zudem wird ein 5 mm · 5 mm Quarzfenster (Suprasil I Aachener Quarzglas Technologie Heinrich, Aachen, Deutschland) durch ein rundes Kupfergewicht ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) am Detektionspunkt auf der Kanalstruktur gehalten, während PDMS auf den Wafer gegossen und ausgehärtet (4 h @ 85 °C) wird. Danach wird das Kupfergewicht aus dem PDMS gezogen, bevor dieses mit den abgeformten Strukturen und dem Quarzfenster vorsichtig mit einem Skalpell vom Wafer abgelöst wird. Für die Trennung des Proteinhaushalts aus einzelnen Sf9-Zellen mit anschließender LIF Detektion sind PQW-Chips mit einer Kanalbreite von 30 μm und einer Kanaltiefe von 30 μm , sowie mit Pfosten im Kreuzungsbereich, welche beim einspülen der Zellen verhindern, daß diese in den Trennkanal gelangen hergestellt worden. Die einzelnen Schritte der Herstellung sind in der nachfolgenden Grafik (s. Abbildung 9) schematisch dargestellt.

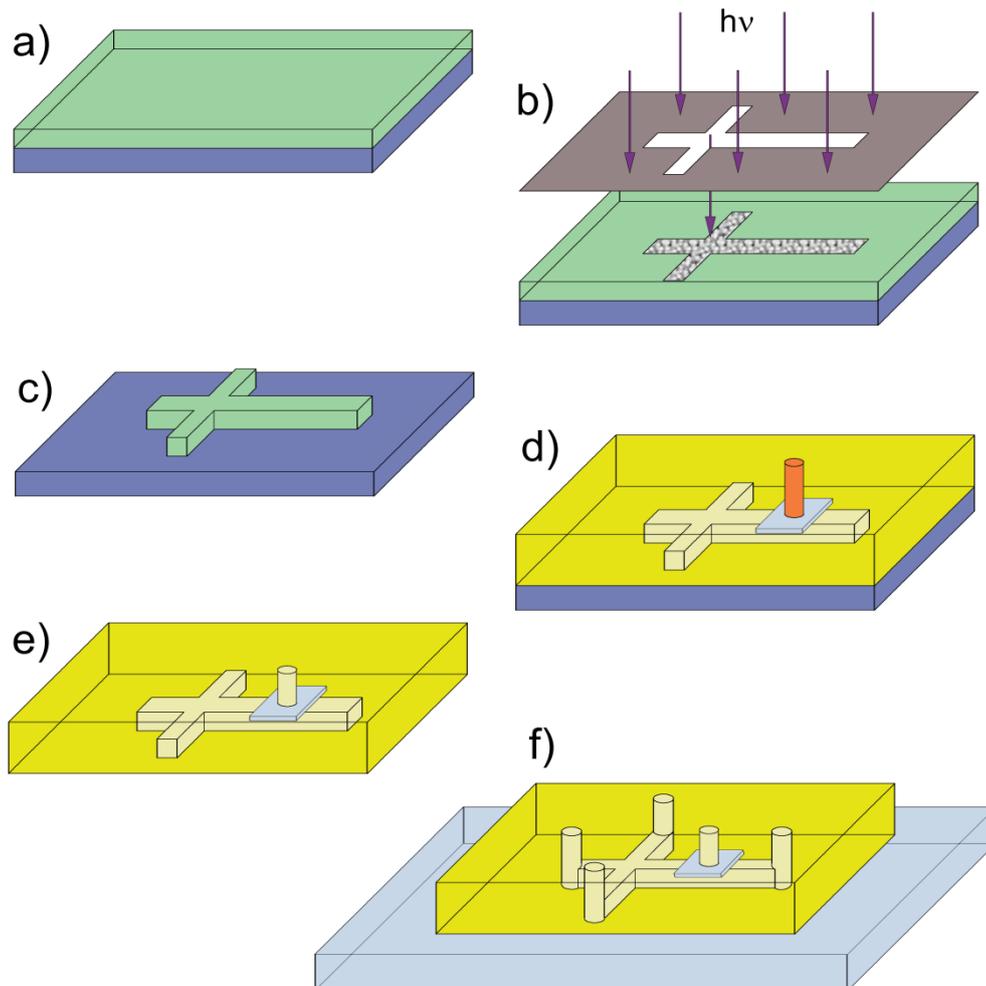


Abbildung 9: Schematische Darstellung der PQQW-Chip-Produktion: (a-c) Die negativen Mikrokanalstrukturen werden mittels Softlithographie wie bei der PDMS-Chip-Produktion auf einem Masterwafer hergestellt. (d) Während das 5 mm · 5 mm Quarzfenster (Suprasil I) durch ein rundes Kupfergewicht ($\varnothing = 3$ mm) am Detektionspunkt auf der Kanalstruktur gehalten wird, wird das PDMS auf den Wafer gegossen und ausgehärtet (4 h @ 85 °C). (e) Das Kupfergewicht wird aus dem PDMS gezogen, bevor dieses mit den abgeformten Strukturen vom Wafer abgelöst wird. (f) Die Reservoirlöcher werden in das PDMS gestanzt, bevor der Chip nach O_2 -Plasmaoxidation mit einem Quarzdeckglas (Suprasil I) verschlossen wird.

4.5.3 ZELL-CHIPS TLF I

Die TLF I-Chips für die Langzeitbeobachtung von Zellen werden analog zu der PDMS-Chip-Produktion mittels Softlithographie (s. 4.5 und 4.5.1) hergestellt. Lediglich wird aufgrund der Fluoreszenzdetektion im sichtbaren Bereich anstatt von dem kostspieligen Quarzglas Suprasil I ein Standard Deckglas (60 mm x 24 mm x 0,2 mm, Menzel, Braunschweig, Deutschland) zum Verschließen der Kanäle verwendet.

4.5.3.1 ZELIMMOBILISIERUNG

Für die Langzeitbeobachtung von Bakterienzellen und deren Zellteilung mit einem Fluoreszenzmikroskop ist es notwendig, diese unter möglichst physiologischen Bedingungen, d.h. bei guter Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und optimaler Temperatur zu immobilisieren. Das Vorgehen für die Immobilisierung von *S. meliloti* Zellen mit einer Beschichtung in den TLF-Chips ist in nachfolgender Abbildung 10 schematisch gezeigt.

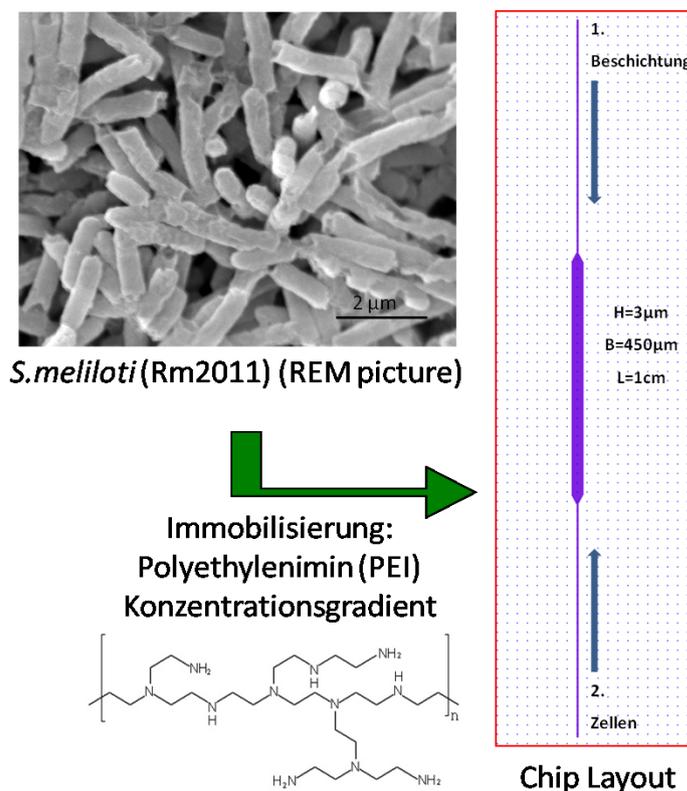


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Zellimmobilisierung und des Layouts der TLF-Chips: (1.) Das Polyethylenimin (PEI) wird zuerst für 5 min von einer Seite aus in den linearen Kanal (Höhe = 3 µm, Breite = 450 µm und Länge = 1 cm) gefüllt, um einen zur anderen Seite hin abnehmenden Konzentrationsgradienten zu erzeugen. (2.) Anschließend werden die Zellen, nachdem sie gewaschen worden sind, in Medium von der gegenüberliegenden Seite in den Kanal einfließen gelassen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativen Bakterienmembran und dem positiv geladenen PEI werden die Zellen dauerhaft im Kanal immobilisiert.

Zur Zellimmobilisierung werden die TLF-Chips mindestens eine Stunde nach dem Zusammensetzen mit Polyethylenimin (PEI, $M_n \sim 60,000$, $M_w 750,000$) in MilliQ-H₂O (Millipore) (Konzentration: 0,1 % (v/v)) beschichtet. Dazu wird zuerst eines der Reservoirs am Ende des linearen Kanals (Länge: 1 cm, Höhe: 3 µm, Breite: 450 µm) mit 14 µL MilliQ-H₂O befüllt, bevor 15 µL der PEI-Beschichtung in das gegenüberliegende Reservoir pipettiert werden. Nach 5 min wird

die PEI-Beschichtungslösung entfernt und die Reservoirs und die Kanäle werden mit MilliQ-H₂O gespült. Anschließend werden die Kanäle für die Langzeitbeobachtungen der Bakterien mit Vincent Minimalmedium (VMM, [115]) befüllt. Somit ist im Kanal ein PEI-Konzentrationsgradient entstanden, wobei die Konzentration auf der Seite, aus der später die Bakterienzellen in den Kanal gespült werden, am niedrigsten ist (s. Abbildung 10). Dieser Konzentrationsgradient verhindert, daß bereits am Anfang des Kanals ein Großteil der eingespülten Zellen fixiert werden und dadurch den Kanal verstopfen [82].

Mit den Bakterienzellen (*S. meliloti*) von einer Festagarplatte sind 10 mL Flüssigkulturen mit Vincent Minimalmedium angeimpft worden. Bei einer Temperatur von 28 °C sind die Bakterien dann über Nacht bis zu einer Dichte von $O.D._{580} \approx 0,6-0,8$ in einem Schüttler herangezogen worden. Anschließend werden die Zellen vor dem Einspülen in die Kanäle noch mit frischem VMM gewaschen. Das Einspülen in den linearen Kanal erfolgt mit hydrodynamischem Druck von der Seite mit der niedrigeren PEI Konzentration (s. Abbildung 10). Dies führt dazu, daß mit steigender PEI Konzentration mehr Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen fester an die Oberfläche im Kanal gebunden werden und dadurch für die späteren Messungen ein Ausschnitt im Kanal mit einer optimalen Zellzahl für die Langzeitbeobachtungen ausgewählt werden kann.

Die TLF-Chips mit den immobilisierten Bakterien werden zusätzlich mit vier Magneten auf der Stage des Mikroskops (s. 3.3) befestigt, um ein verrutschen der Probe während den Langzeitbeobachtungen zu verhindern.

4.6 DRIESO

4.6.1 QG-CHIPS

Zur Herstellung von Quarzglas-Chips werden Strukturen durch reaktives Ionentiefätzen von Siliziumdioxid (DRIESO, engl. „deep reactive ion etching of silicon dioxide“) in einem Quarzglaswafer erzeugt (s. Abbildung 11).

Dieses anisotrope Verfahren bietet den Vorteil, daß Strukturen mit senkrechten Seitenwänden entstehen, die es gerade bei einer konfokalen Detektion, wie in dieser Arbeit bei der UV-LIF Detektion verwendet, erlauben, die Kanalgeometrie besser als bei Naßätzverfahren an den Detektionsfokus anzupassen. Beim isotropen Naßätzen würden Kanäle entstehen, die immer die doppelte Breite der Höhe des Kanals besitzen. Dazu sind zuerst die gewünschten Strukturen, wie auch für alle anderen Mikrofluidikstrukturen, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, mit dem CAD Programm Clewin (PhoeniX, Enschede, Die Niederlande) gezeichnet worden. Die Strukturen werden dann mittels DRIE ICP (engl. „inductively coupled plasma“) mit einer Adixen AMS100SE (Annexy, Frankreich) in einem Polysilizium-Wafer erzeugt, der dann als Maske für den

eigentlichen DRIESO-Prozess dient. Dazu werden die Strukturen mit einer Tiefe von 30 μm mit einer Adixen AMS100DE (Annecy, Frankreich) durch DRIESO ICP mit einem Fluorgas (C_4F_8) in einen Quarzglaswafer (Durchmesser 100 mm, Dicke 0,5 mm, Schott, Jena, Deutschland) geätzt.

Anschließend werden die Reservoirlöcher mit einem Sandstrahl durch eine weitere Maske in dem gleichen Wafer erzeugt. Die Strukturen werden durch thermisches Bonding (engl.: thermal bonding) ($\approx 1100\text{ }^\circ\text{C} - 1200\text{ }^\circ\text{C}$) mit einem weiteren Wafer aus Quarzglas (Durchmesser 100 mm, Dicke 0,2 mm, Aachener Quarzglas Technologie Heinrich, Aachen, Deutschland) verschlossen. Letztlich werden die rechteckigen Mikrofluidik-Chips mit einem Sandstrahl aus den beiden fest verbundenen Wafern ausgeschnitten. Die Positionen der Reservoirlöcher und der Außengrenzen der Chips sind ebenfalls mit dem CAD Programm Clewin (PhoeniX, Enschede, Die Niederlande) gezeichnet worden. Dabei sind der DRIESO-Prozess, das thermische Bonden und das Sandstrahlen in enger Kooperation von der Firma Capilix (Enschede, Die Niederlande) ausgeführt worden [111]. Für die Trennung des Proteinhaushalts aus einzelnen Sf9-Zellen mit anschließender LIF Detektion sind QG-Chips mit einer Kanalbreite von 30 μm (Tiefe = 30 μm), sowie mit Pfosten im Kreuzungsbereich, welche beim einspülen der Zellen verhindern, daß diese in den Trennkanal gelangen verwendet worden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze und der Trennung von einzelnen Proteinen sind QG-Chips gleicher Geometrie allerdings ohne Pfosten im Kreuzungsbereich eingesetzt worden. Die einzelnen Schritte der Herstellung sind in der nachfolgenden Grafik (s. Abbildung 11) schematisch dargestellt.

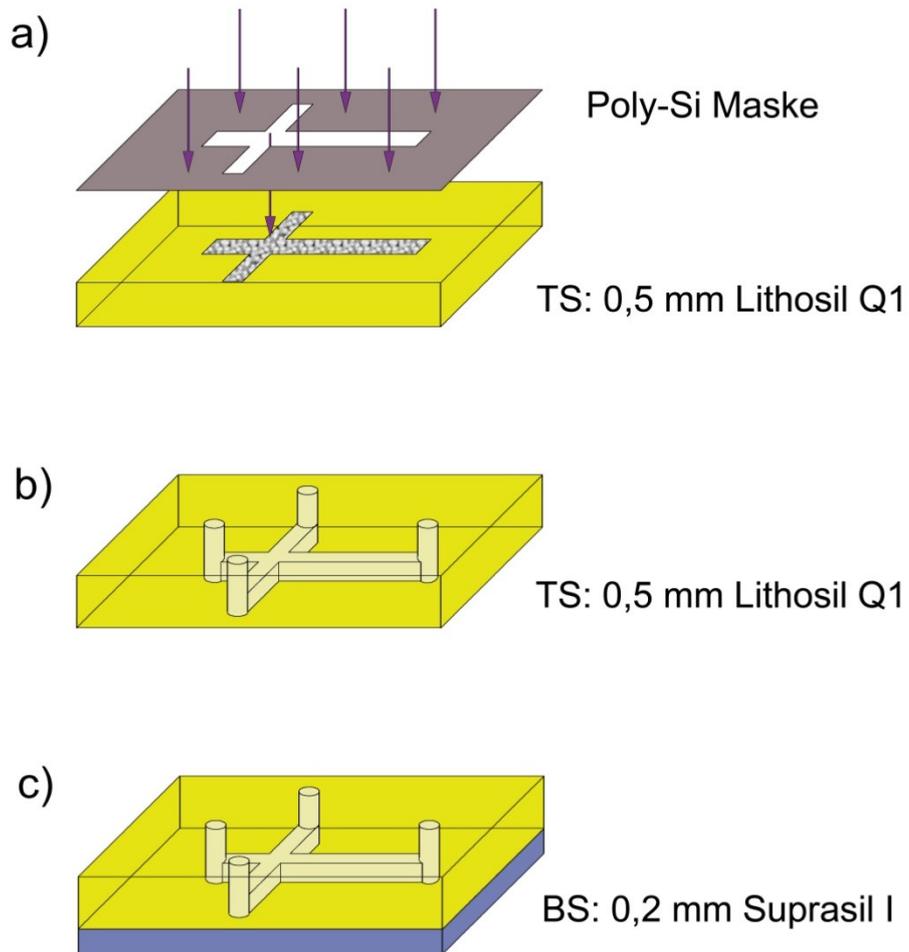


Abbildung 11: QG-Chip Herstellung mittels DRIESO (engl.: deep reactive ion etching of silicon dioxide). (a) Die Strukturen werden via DRIESO mit einer Tiefe von $30\ \mu\text{m}$ in das obere Substrat (TS, engl.: top substrate) aus dem hochwertigen Quarzglas Lithosil Q1 von Schott geätzt. (b) Mittels Sandstrahlen durch eine Polysilizium-Maske werden die Reservoirlöcher in dem oberen Substrat (TS) erzeugt. (c) Anschließend werden das obere (TS) und das untere Substrat (BS, engl.: bottom substrate) durch thermisches Bonding (engl.: thermal bonding) ($\approx 1100\ \text{°C} - 1200\ \text{°C}$) fest miteinander verbunden [111].

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 ERSTE EINZELZELLELEKTROPHEROGRAMME IN PDMS-CHIPS

Für die Aufnahme von Einzelzellelektropherogrammen werden PDMS-Chips auf hochwertigen Quarzdeckgläsern verwendet, damit sowohl das Anregungslicht (266 nm) in den Mikrofluidikkanal gelangen kann, als auch das emittierte Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (s. Abbildung 12).

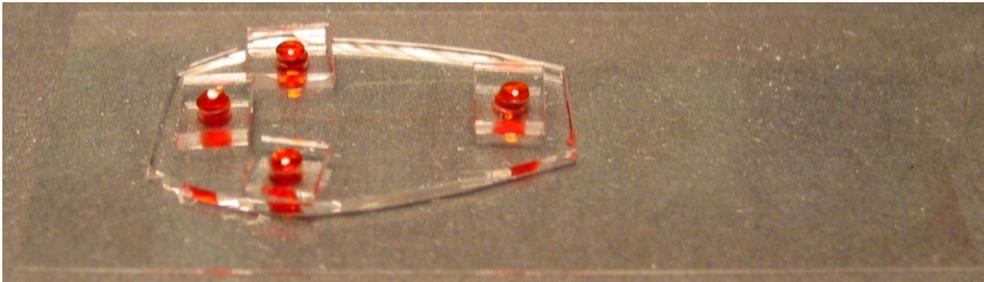


Abbildung 12: Photographie von einem PDMS-Chip auf einem hochwertigen Quarzdeckglas (Suprasil I, 60 mm x 24 mm x 0,2 mm). Alle vier Reservoirs des Chips sind mit zusätzlichen in PDMS gestanzten Löchern vergrößert worden. Der Chip ist zur besseren Sichtbarkeit der Reservoirs und der Mikrofluidikkanäle mit dem Farbstoff Eosin befüllt.

Die Kanalwände werden mit 500 μM F108 für 20 Stunden beschichtet um unspezifische Proteinadsorption, wie auch die Geschwindigkeit des EOF's zu vermindern. Anschließend werden die Kanäle mit dem Trennpuffer (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 8,4) unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe befüllt. Einzelne, der im Trennpuffer resuspendierten Sf9 Zellen werden mit einer optischen Pinzette im Reservoir des PDMS-Chips eingefangen und durch einen Seitenkanal zu der Kreuzung im Chip geführt, wo diese von Pfosten aufgehalten wird. Die Lyse der Zelle erfolgt mit einem kurzen elektrischen Hochspannungspuls (1900 V/cm für 50 ms). Danach werden die Proteine aus der Zelle elektrophoretisch in dem längsten der Kanäle getrennt, bevor diese mittels UV-LIF in einer Entfernung von 2,5 mm bis zur Kreuzung detektiert werden.

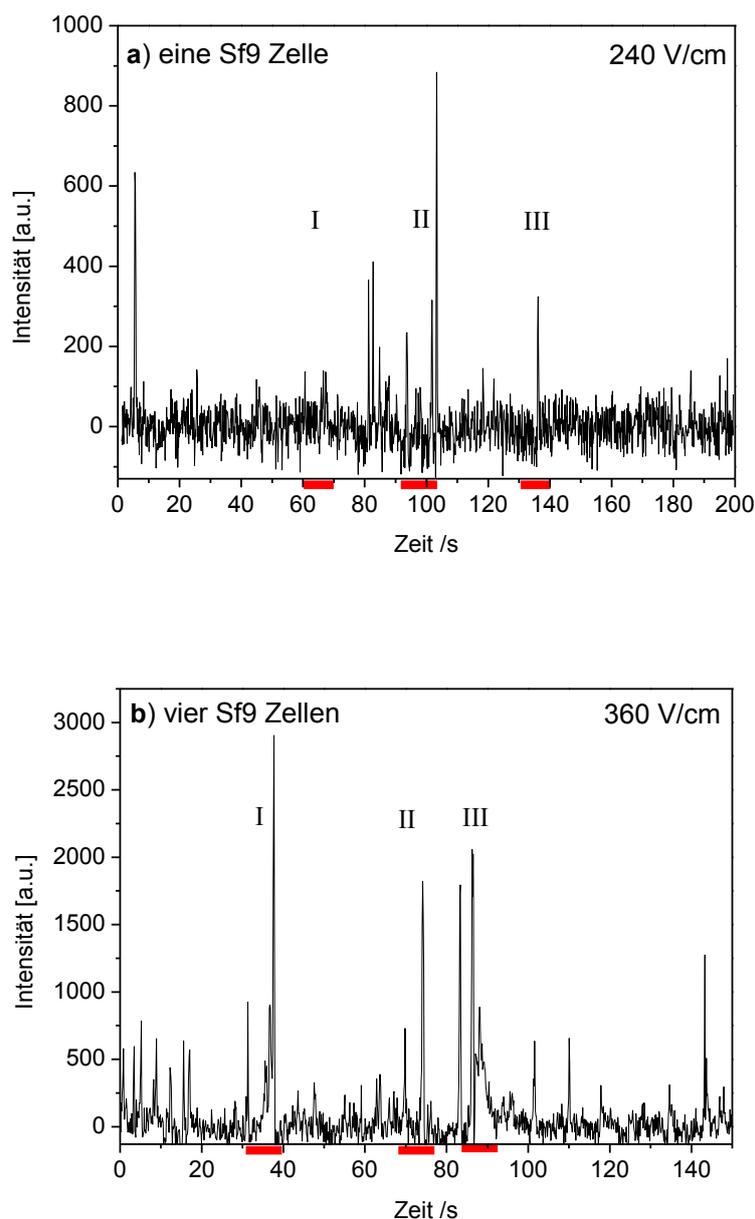


Abbildung 13: (a) Basislinien korrigiertes Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 Zelle mit nativer UV-LIF Detektion in PDMS-Chips. Die Kanäle in dem PDMS sind mit F108 beschichtet und die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 500 μW und einem 400 μm Pinhole bei einer Trennungsspannung von 240 V/cm in Trennpuffer (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 8,4) durchgeführt. Die Zellen sind mit einem elektrischen Puls von 1900 V/cm für 50 ms lysiert worden. Die mit roten Balken markierten Peakgruppen I, II und III liegen bei 65 s, 95 s und 135 s. Das genaue Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.5 und 4.5.1) dieser Arbeit beschrieben. (b) Elektropherogramm von vier Sf9 Zellen mit gleichen Einstellungen wie in (a), außer einer Trennungsspannung von 360 V/cm. Die mit roten Balken markierten Peakgruppen I, II und III liegen bei 37 s, 74 s und 87 s [110].

In dem Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 Zelle in Abbildung 13a sind ≈ 10 deutlich voneinander getrennte Peaks zu erkennen. Im Vergleich dazu sind in dem Elektropherogramm von vier Sf9 Zellen in Abbildung 13b ≈ 20 Peaks mit einer zum Teil deutlich erhöhten Intensität detektiert worden. Dies entspricht den Erwartungen aufgrund der höheren Proteinmenge von vier Zellen im Vergleich zu einer Einzelzelle. Dennoch erschwert der aufgrund von Einzelzellheterogenität unterschiedliche Proteingehalt einzelner Zellen die Interpretation von diesen Elektropherogrammen. Bei den zwei Elektropherogrammen in Abbildung 13a & b sind drei korrespondierende Peakgruppen mit I-III markiert. Bei dieser Gruppierung sind die Peakpositionen aufgrund ihrer Migrationszeit mit einem Faktor von 1,5 rekaliert worden, um die in diesen Experimenten unterschiedliche Trennungsspannung von 240 V/cm zu 360 V/cm zu berücksichtigen. Peaks, die in dem Elektropherogramm von vier Zellen in Abbildung 13b nach mehr als 100 Sekunden detektiert worden sind konnten dabei keinen Peaks in dem Einzelzellelektropherogramm in Abbildung 13a zugeordnet werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringe Proteinkonzentration, welche unter dem Detektionslimit liegt, zurückzuführen [110].

5.1.1 FLIM

Um die Signale in den Einzelzellelektropherogrammen nach UV-LIF Detektion hinsichtlich ihres Signal-Rausch-Verhältnisses zu optimieren sind die beteiligten, bei Anregung im UV ($\lambda < 300$ nm) fluoreszierenden Stoffe hinsichtlich einer möglichen Diskriminierung aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenz-Lebenszeiten untersucht worden. Dazu sind an dem verwendeten Trennpuffer (4 % Pullulan, 100 mM Tris, 100 mM CHES, pH = 8,1), dem als Chipobermaterial verwendeten Elastomer PDMS und dem für das Fluoreszenzsignal aus Proteinen wesentlich verantwortlichen PDMS UV Fluoreszenz-Lebenszeit-Messungen (UV-FLIM) mit dem von Schüttpelz et al. publizierten Aufbau [119] durchgeführt worden. In der nachfolgenden Abbildung 14 sind die gemessenen mittleren Fluoreszenz-Lebenszeiten in einem Falschfarbenbild dargestellt, wobei die Farben für die mittleren Fluoreszenz-Lebenszeiten an der jeweiligen Stelle stehen. Es werden hier die mittleren Fluoreszenz-Lebenszeiten verwendet, da zumindest für das PDMS und den Trennpuffer nicht bekannt ist, wie die Fluoreszenzabklingkurve angefüttet werden müsste. Der Farbbalken auf der rechten Seite in der Abbildung ist von 1,5 bis 4,5 skaliert und gibt die Lebenszeit in ns an.

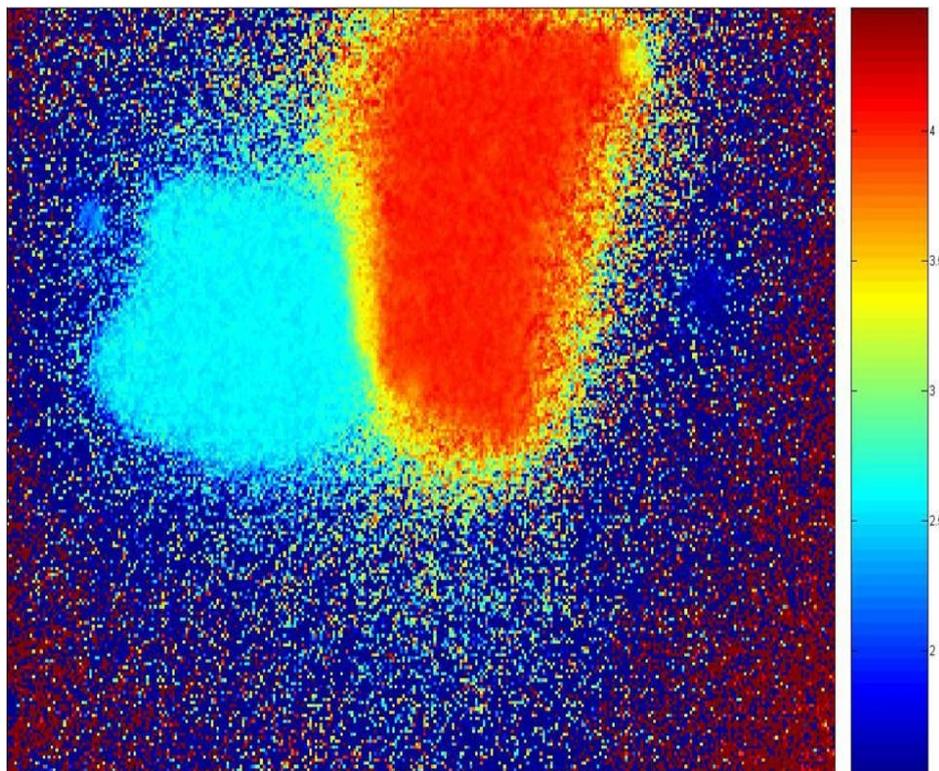


Abbildung 14: UV-FLIM; oben links: 1 mM Tryptophan-Lösung (pH = 8,1); oben rechts: PDMS (Mischungsverhältnis 10:1); unten: Pullulan-Trennpuffer (4 % Pullulan, 100 mM Tris, 100 mM CHES, pH = 8,1). Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit für den Pullulan-Trennpuffer liegt nur wenig unter 2 ns, bei 2,6 ns für die Tryptophan-Lösung und wenig über 4 ns für das PDMS.

Da die mittlere Fluoreszenz-Lebenszeit für das Tryptophan mit 2,6 ns nur wenig über der mittleren Lebenszeit von 2 ns für den ohnehin nur schwach fluoreszierenden Trennpuffer liegt, ist bei einer Lebenszeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion auch aufgrund der daraus resultierenden niedrigeren Signalintensität für das Tryptophan nicht von einer signifikanten Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses für die UV-LIF Detektion von Proteinen auszugehen. Bei dem stärker fluoreszierenden Elastomer PDMS mit einer mittleren Fluoreszenz-Lebenszeit von etwas mehr als 4 ns wäre eine Diskriminierung von dem Fluoreszenzsignal vom Tryptophan aufgrund der deutlich größeren Fluoreszenz-Lebenszeit durch eine Lebenszeitaufgelöste UV-LIF Detektion gar nicht erst möglich.

5.1.2 SPEKTREN ZUR UNTERSUCHUNG DER UV-HINTERGRUNDFLUORESZENZ

Ein weiterer kritischer Aspekt in der UV-LIF Detektion ist die Hintergrundfluoreszenz, da aufgrund der hohen Energie der Photonen im UV-Bereich viele Moleküle zur Fluoreszenz angeregt werden, die im klassischen Sinn nicht als Fluorophore gelten. Insbesondere bei der Detektion von Proteinen, deren Fluoreszenz im Wesentlichen auf der Aminosäure Tryptophan

beruht, gilt es Moleküle innerhalb des Detektionsvolumens zu vermeiden, die bei einer Anregung im UV-Bereich (hier $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) eine Fluoreszenzemission in einem Wellenlängenbereich um $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$ aufweisen, da Tryptophan hier sein Emissionsmaximum besitzt. Gleichzeitig sollte der Lichtweg vor dem Detektionsvolumen möglichst wenige Moleküle (Materialien) besitzen, die zu einer signifikanten Absorption des Anregungslichts führen. Beispielsweise wird das emittierte Licht des in dieser Arbeit für die UV-LIF Detektion verwendeten Nd:YAG Lasers ($\lambda = 266 \text{ nm}$, Nanolase, Grenoble, Frankreich) auch bei maximaler Leistung von 5 mW bereits von einem Standarddeckglas für die Mikroskopie (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aus Kalk-Natron-Glas mit einer Dicke von 0,13 mm bis 0,16 mm (Herstellerangabe) so stark absorbiert, daß auch mit dem hier zur UV-LIF Detektion verwendeten PMT (H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) die Intensität dahinter nicht mehr messbar ist.

Zur Untersuchung der Hintergrundfluoreszenz der verschiedenen Mikrofluidik-Chips (PDMS-Chips, s. 4.5.1; PQW-Chips, s. 4.5.2; QG-Chips, s. 4.6.1), die in dieser Arbeit für die UV-LIF Detektion verwendet worden sind, ist der Aufbau (s. 3.1 UV/VIS-LIF Detektion) modifiziert worden, indem der PMT (H6240, Hamamatsu, Shimokanzo, Japan) als Detektor an einem UV/VIS Spektrometer (Triax 190, Horiba Jobin Yvon, Edison, New Jersey, USA) befestigt worden ist. Somit verläuft der Strahlengang für das emittierte Fluoreszenzlicht durch das UV/VIS Spektrometer, wo es durch Beugungsgitter spektral aufgelöst wird und zeitlich versetzt auf den Detektor trifft. Zudem ist der für die UV-LIF Detektion verwendete Emissionsfilter (360/50, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) entfernt worden, damit die Aufnahme eines breiteren Spektrums ermöglicht wird. Dieser Filter ist bei der Erstellung von Einzelzellektropherogrammen, bei der Proteintrennung und der Bestimmung der Detektionsgrenze mit UV-LIF Detektion in dieser Arbeit verwendet worden. Optional ist die Laserleistung mit einem für den UV-Bereich geeigneten Graufilter (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) mit 10 % Transmission, der als Anregungsfilter verwendet worden ist reduziert worden. Da bei den verschiedenen Mikrofluidik-Chips die Unterseite jeweils aus dem gleichen hochwertigen Quarzglas in der gleichen Dicke (0,2 mm) besteht, sind zum Vergleich auch Spektren von einem gereinigten Deckglas aus gleichem Glas, dem Suprasil I (Aachener Quarzglas Technologie Heinrich, Aachen, Deutschland), in gleicher Materialstärke (0,2 mm), aufgenommen worden. Dabei ist wie bei den Einzelzellexperimenten mit UV-LIF Detektion der Objektivfokus in den Kanälen jeweils in die Kanalmitte gelegt worden. Zudem sind die Mikrofluidikkanäle jeweils mit einem 10 mM Tris-Puffer (pH = 8,2) befüllt worden. Bei den Spektren, die neben den Kanälen aufgenommen worden sind, bzw. auch bei dem Deckglas, ist der Fokus jeweils auf die Oberseite der 0,2 mm dicken Gläser, d.h. bei den Mikrofluidik-Chips in die Schicht zwischen die verschiedenen Materialien aus denen deren Ober- und Unterseite bestehen, eingestellt worden. Dabei ist auf die Aufnahme von Spektren neben den Mikrokanälen bei den PQW-Chips verzichtet worden, da diese neben dem kleinen Quarzfenster am Detektionspunkt auf dem Kanal wie die PDMS-Chips das gleiche Obermaterial (PDMS) besitzen und somit mit diesen im Aufbau an diesen Stellen identisch sind.

In der Abbildung 15 sind die Fluoreszenzemissionsspektren der verschiedenen Mikrofluidik-Chips und des Deckglases aus Suprasil I bei einer Anregung ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) mit einer Laserleistung von 500 μW dargestellt. Dabei ist der interessante Wellenlängenbereich um 360 nm, wo auch das Emissionsmaximum von Tryptophan liegt, der auch durch den Emissionsfilter (360/50) gelangt,

mit senkrecht gepunkteten Linien markiert. In diesem Bereich der Spektren ist sehr gut zu erkennen, daß die Hintergrundfluoreszenz der PDMS-Chips deutlich höher ist als bei den PQW-Chips. Interessanterweise liegt die Fluoreszenzintensität bei den PDMS-Chips mit dem Fokus direkt unter dem PDMS noch über der Intensität mit dem Fokus im Kanal. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß aufgrund der höheren Laserintensität im Mittelpunkt des Fokus hier weniger PDMS zur Fluoreszenzemission angeregt wird, aus welchem im Detektionsvolumen noch Licht auf den Detektor trifft. Dies zeigt aber auch, daß das an sich im sichtbaren Bereich hoch transparente und fluoreszenzarme PDMS bei Anregung mit geeigneter Wellenlänge (hier 266 nm) eine unerwünschte Fluoreszenzemission in dem Bereich aufweist, in dem Tryptophan sinnvoll detektiert werden kann. Gleichzeitig ist gut zu erkennen, daß die Hintergrundfluoreszenz der PQW-Chips in diesem Bereich nur wenig über der Emissionsintensität der QG-Chips und des Deckglases aus Suprasil I liegt. Bei den letzten Beiden ist in den Spektren, bei einer Anregung mit dieser Laserleistung (500 μW), die gemessene Intensität sogar nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Dies liegt natürlich auch an der reduzierten Emissionsintensität, die noch auf den PMT trifft nach der Monochromatisierung aufgrund des Spektrometers.

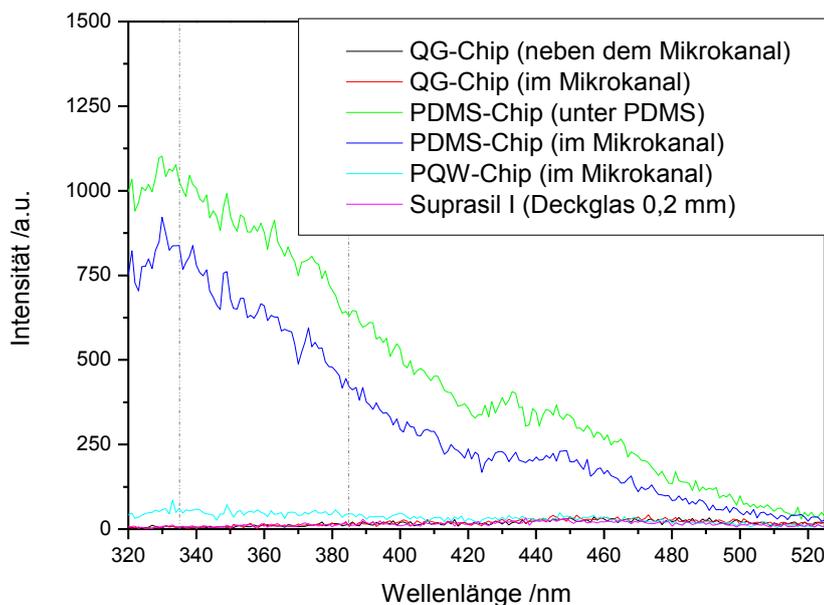


Abbildung 15: Fluoreszenzmissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) von einem PDMS-Chip, einem PQW-Chip, einem QG-Chip und einem hochwertigen Quarzglasdeckglas (Suprasil I, 60 mm x 24 mm x 0,2 mm). Die Mikrokanäle sind befüllt mit einem Tris-Puffer (10 mM, pH = 8,2) und die Anregung ist mit einer Laserleistung von 500 μW durchgeführt worden [111].

In der Abbildung 16 sind die Fluoreszenzmissionsspektren der QG-Chips, der PQW-Chips und des Deckglases aus Suprasil I bei einer Anregung ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) mit einer Laserleistung von 5 mW dargestellt. Erneut ist der interessante Wellenlängenbereich um 360 nm, der auch durch den Emissionsfilter (360/50) gelangt, mit senkrecht gepunkteten Linien markiert. Dabei ist es

leider nicht möglich bei dieser Laserleistung reproduzierbare Spektren von den PDMS-Chips oder von Bereichen außerhalb des Trennkanals unter dem kleinen Quarzglasfenster bei den PQW-Chips zu erhalten, da das PDMS durch den hohen Energieeintrag zerstört wird. Dennoch ist hier besser zu erkennen, daß die Intensität der Hintergrundfluoreszenz bei den QG-Chips im relevanten Bereich für die UV-LIF Detektion von Tryptophan noch etwas niedriger ist, als bei den PQW-Chips. Dabei ist die Fluoreszenzintensität der QG-Chips sogar so gering, unabhängig davon ob der Fokus im Mikrokanal oder daneben liegt, daß sich diese hier nicht mehr von der Intensität bei dem Deckglas aus hochwertigem Quarzglas (Suprasil I) unterscheiden lässt. Dies ist vorteilhaft in der UV-LIF Detektion, da sich aufgrund der sehr geringen Hintergrundfluoreszenz eine höhere Signalintensität für das Tryptophan und damit eine niedrigere Detektionsgrenze erreichen lässt [111] (s. auch 5.5 Nachweisgrenze).

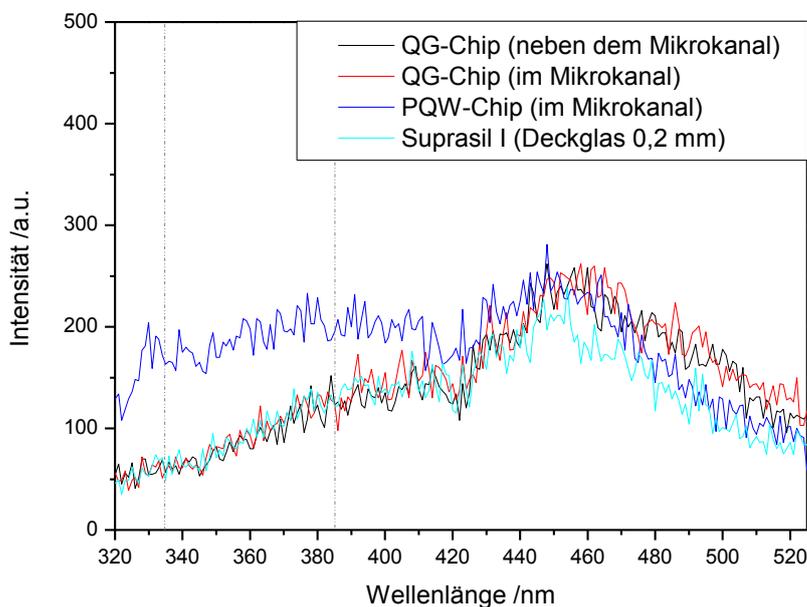


Abbildung 16: Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) von einem PQW-Chip, einem QG-Chip und einem hochwertigen Quarzglasdeckglas (Suprasil I, 60 mm x 24 mm x 0,2 mm). Die Mikrokanäle sind befüllt mit einem Tris-Puffer (10 mM, pH = 8,2) und die Anregung ist mit einer Laserleistung von 5 mW durchgeführt worden.

5.2 PH-ABHÄNGIGKEIT

Besonders bei der UV-LIF Detektion lässt sich eine erhöhte Fluoreszenzintensität bei basischen (höheren) pH-Werten für die aromatische Aminosäure Tryptophan feststellen, die auf eine erhöhte Fluoreszenz-Lebenszeit zurückzuführen ist [120]. Zur genaueren Untersuchung sind mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 45 luminescence spectrometer, PerkinElmer, Waltham,

Massachusetts, USA) Fluoreszenzemissionsspektren von Tryptophan-Lösungen gleicher Konzentration (10 mM) mit unterschiedlichen pH-Werten (von 1,6 bis 13,0) aufgenommen worden. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 17 dargestellt.

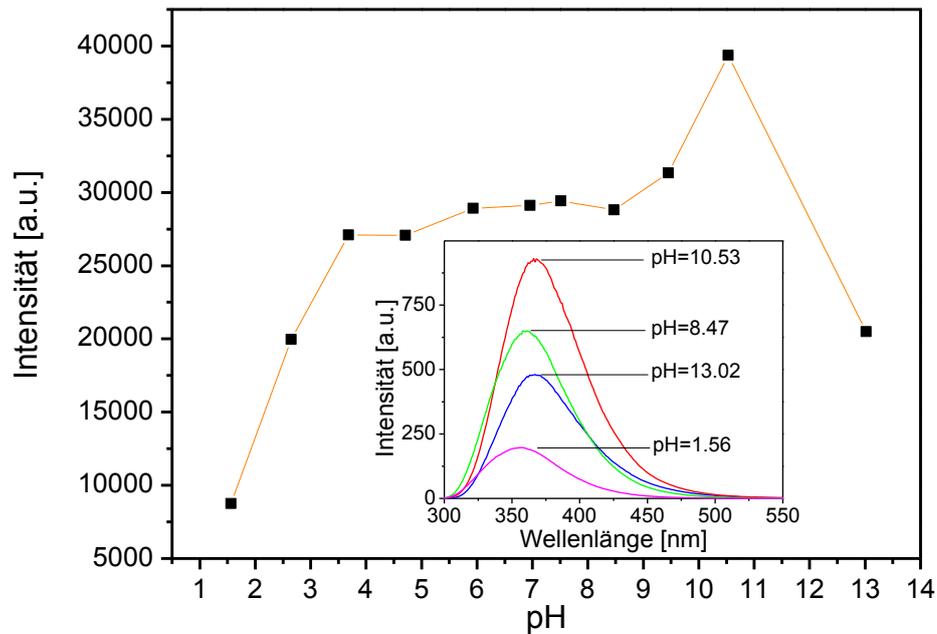


Abbildung 17: Intensitäten der Fluoreszenzemission von 10 mM Tryptophan-Lösungen (in PBS) in Abhängigkeit vom pH-Wert ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 335\text{-}385 \text{ nm}$. Inset: Ausgewählte Emissionsspektren derselben Tryptophan-Lösungen mit pH-Werten von 1,6 bis 13,0 ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) [118].

Bei der in Abbildung 17 dargestellten Kurve sind für die einzelnen Datenpunkte aus gemessenen Fluoreszenzemissionsspektren die Intensitäten jeweils in dem Intervall zwischen 335 nm und 385 nm aufsummiert worden. Dieses Intervall entspricht dem hochtransparenten Bereich des in allen UV-LIF Messungen verwendeten Emissionsfilters (360/50). Dabei wird auch die bei den ausgewählten Spektren sichtbare Rotverschiebung bei basischen pH-Werten in ihrer Auswirkung auf die messbare Fluoreszenzintensität in den UV-LIF Messungen berücksichtigt.

Die Untersuchung der Fluoreszenzintensität von der aromatischen Aminosäure Tryptophan in Abhängigkeit vom pH-Wert des Trennpuffers ergibt für eine maximale Fluoreszenzintensität einen optimalen pH-Wert von ≈ 11 [118].

Zur Verbesserung des Detektionslimits und des Signal-Rausch-Verhältnis, welches hauptsächlich durch die Hintergrundfluoreszenz des PDMS bei den PDMS-Chips negativ beeinflusst worden ist, sind PQW-Chips mit einem Quarzfenster oberhalb des Trennkanaals am Detektionspunkt hergestellt worden [118].



Abbildung 18: Photographie von zwei PDMS-Quartz-Window-Chips (PQW-Chips) auf einem hochwertigen Quarzdeckglas (Suprasil I, 60 mm x 24 mm x 0,2 mm). Über dem Trennkanal befinden sich am Detektionspunkt 5x5 mm² Quarzfenster. Alle acht Reservoirs der Chips sind mit zusätzlichen in PDMS gestanzten Löchern vergrößert worden. Der linke Chip ist zur besseren Sichtbarkeit der Reservoirs und der Mikrofluidikkanäle mit dem Farbstoff Eosin befüllt.

Die Verwendung von PQW-Chips (s. Abbildung 18) erlaubt aufgrund der deutlich niedrigeren Hintergrundfluoreszenz des Quarzglases im Vergleich zum PDMS auch die Verwendung eines größeren Pinholes (1000 μm anstatt 400 μm) für die UV-LIF Detektion (vergleiche Abbildung 13 und Abbildung 20).

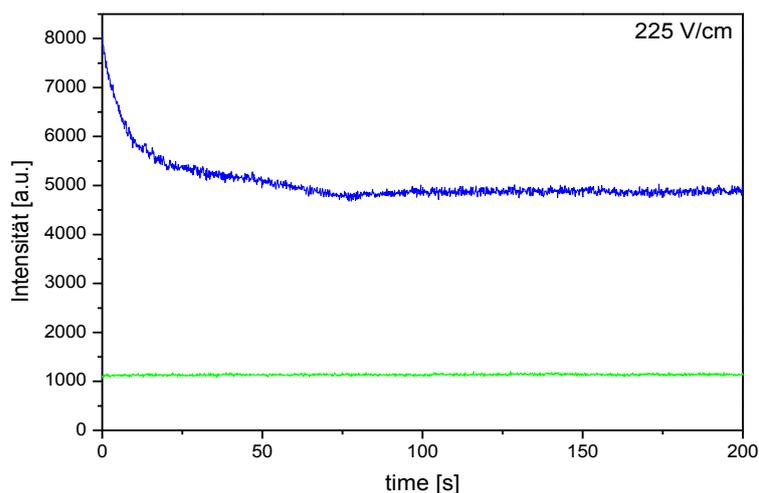


Abbildung 19: Vergleich des Fluoreszenzhintergrunds im Mikrofluidikkanal von herkömmlichen PDMS-Chips (blaue Kurve) mit dem in den neuartigen PQW-Chips (grüne Kurve). Die Kanäle der Chips sind befüllt mit Trennpuffer (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 11,0). Die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 500 μW und einem 1000 μm Pinhole bei einer Trennungsspannung von 225 V/cm durchgeführt ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 360/50 \text{ nm}$) [118].

Beim direkten Vergleich der Intensitäten des Fluoreszenzsignals in den, mit Trennpuffer befüllten neuartigen PQW-Chips und den herkömmlichen PDMS-Chips (s. Abbildung 19), werden die Vorteile der Quarzglasfenster über dem Trennkanal am Detektionspunkt der Mikrofluidik-Chips gegenüber dem PDMS für die UV-LIF Detektion mit einer Anregungswellenlänge von 266 nm besonders deutlich. Hierdurch ist eine Reduzierung des Fluoreszenzhintergrunds um mehr als 75 % erzielt worden [118], ohne dabei die optische Transparenz des Chips im sichtbaren Wellenlängenbereich zu beeinflussen. Dies ist insbesondere für die Einzelzelleexperimente von großem Interesse, damit der Transport der einzelnen Zellen durch die Mikrofluidikkanäle, wie auch die Positionierung des Laserfokus für die Detektion optisch kontrolliert werden kann.

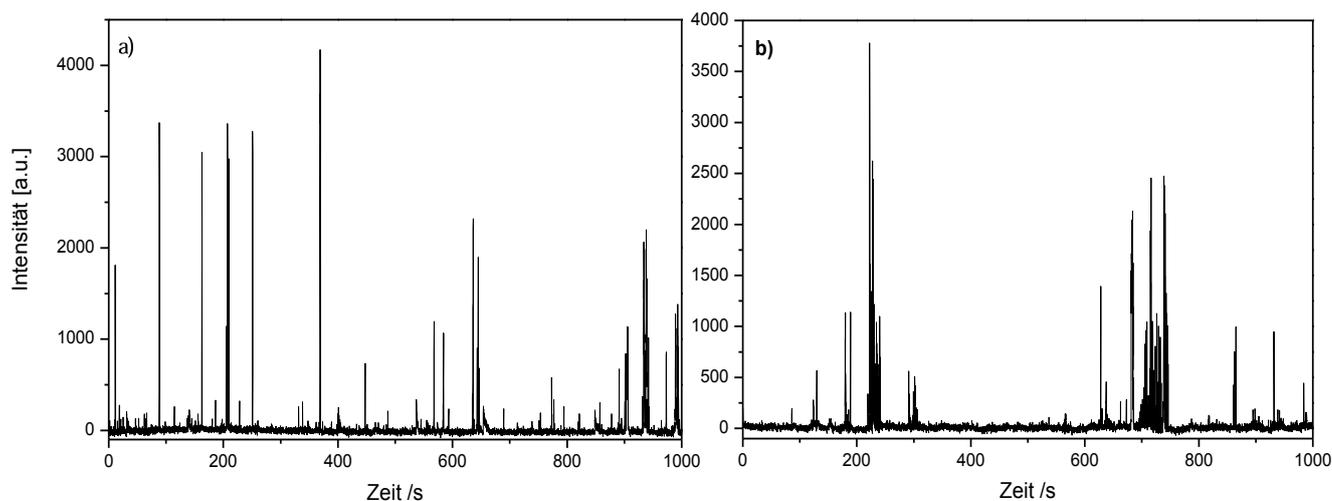


Abbildung 20 a & b: Basislinien korrigierte Elektropherogramme jeweils einer einzelnen Sf9 Zelle mit nativer UV-LIF Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) in PQW-Chips. Die Zellen sind mit einem elektrischen Puls von 1800 V/cm für 50 ms lysiert worden. Die Kanäle in dem PDMS sind mit F108 beschichtet und die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 500 μW und einem 1000 μm Pinhole bei einer Trennspannung von 225 V/cm in Trennpuffer (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 11,0) durchgeführt [118]. Das Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.5 und 4.5.2) dieser Arbeit beschrieben.

Bei den Einzelzellelektropherogrammen in den Abbildung 20a & b sind jeweils ≈ 50 -55 Peaks pro einzelner Sf9 Zelle in den neuartigen PQW-Chips gemessen worden. Im Vergleich zu den ersten Einzelzellelektropherogrammen [110] (s. Abbildung 13a & b) sind dies fünfmal mehr Peaks mit einer durchschnittlich viermal so hohen Intensität. Damit vereinen die PQW-Chips mit dem, in das PDMS integrierten Quarzfenster, die Vorteile von herkömmlichen PDMS-Chips mit der für die UV-LIF Detektion nützlichen, da deutlich höheren Transparenz im UV-Bereich von künstlichen Quarzgläsern höchster Güte. So bleibt die, besonders für Experimente mit lebenden Zellen oft notwendige hohe Gaspermeabilität des PDMS bei den PQW-Chips erhalten, während die Produktionskosten vergleichbar niedrig sind, wie für die zuvor in Versuchen mit UV-LIF Detektion eingesetzten PDMS-Chips [118].

Für die Trennung von Proteinen aus Einzelzellen mit anschließender VIS-LIF Detektion (s. 3.1 UV/VIS-LIF Detektion) sind gleichfalls PQW-Chips verwendet worden. Dazu sind zuerst die Sf9-

Zellen für die unspezifische Markierung aller Proteine in den Zellen mit 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA-SE, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) behandelt worden (s. 4.3.2). Dieser anfangs nicht fluoreszierende, lipophile, membrangängige Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran und bindet, nachdem in lebenden Zellen Esterasen die Acetylgruppen abgespalten haben und somit der eigentliche Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidylester entstanden ist, an primäre Aminogruppen [116], d.h. an frei zugängliche Seitenketten der Aminosäure Lysin und N-Termini von Proteinen und Peptiden. Für die Erstellung des Einzelzellelektropherogramms in der Abbildung 21 ist ein Trennpuffer mit einem pH-Wert von 8,9 (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan) verwendet worden, da das Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff im sichtbaren Wellenlängenbereich anders als das Tryptophan eine Quantenausbeute von bis zu 0,93 erreicht, während das Tryptophan gelöst in Wasser sogar nur eine solche von 0,14 besitzt [121]. Die Wände der Mikrokanäle sind für 20 h mit einer 500 μM Lösung aus Pluronic F108 und Wasser beschichtet worden, bevor der PQW-Chip nach dem Spülen mit Wasser mit dem Trennpuffer befüllt worden ist. Anschließend ist eine einzelne, der im Trennpuffer resuspendierten Sf9 Zellen mit hydrodynamischem Fluss durch einen Seitenkanal zu der Kreuzung im Chip geführt worden, wo diese von Pfosten aufgehalten wird. Die Lyse der Zelle erfolgt mit einem kurzen elektrischen Hochspannungspuls (1500 V/cm für 50 ms). Danach werden die Proteine aus der Zelle elektrophoretisch (Spannung = 300 V/cm) in einem der Kanäle getrennt, bevor diese mittels VIS-LIF in einer Entfernung von 10 mm bis zur Kreuzung detektiert werden.

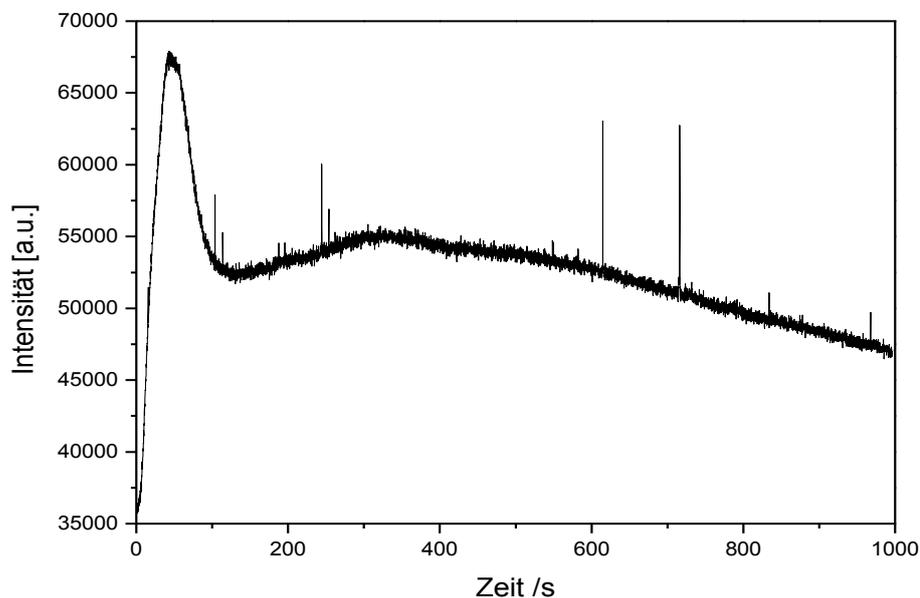


Abbildung 21: Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 Zelle mit VIS-LIF Detektion (Anregung mit Argon-Ionen Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) nach unspezifischer Fluoreszenzmarkierung aller Proteine mit CFDA-SE in einem PQW-Chip. Die Zelle ist mit einem elektrischen Puls von 1500 V/cm für 50 ms lysiert worden. Die Kanäle in dem PDMS sind mit F108 beschichtet und die VIS-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 10 mW und einem 1000 μm Pinhole bei einer Trennungsspannung von 300 V/cm in Trennpuffer (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 8,9) durchgeführt. Das Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.3.2, 4.5 und 4.5.2) dieser Arbeit beschrieben.

In dem Einzelzelektropherogramm der Abbildung 21, das nach der Lyse einer einzelnen Sf9 Insektenzelle entstanden ist, sind ≈ 15 sehr schmale Peaks und ein sehr großer Peak zu Beginn der Messung zu sehen. Der große Peak zu Beginn stammt vermutlich von freiem Farbstoff, der beim Einspülen der Zelle aus dem Reservoir in dem sich auch noch weitere Zellen befinden, z.B. aus mechanisch zerstörten oder apoptotisch lysierten Zellen, in den Kreuzungsbereich des PQW-Chips gelangt ist. Insgesamt ist aber auch die Intensität des Basissignals im Verlauf der Messung mit VIS-LIF Detektion sehr hoch (vergl. Abbildung 19 mit UV-LIF Detektion) und ungleichmäßig mit einem Maximum bei etwa 300 s. Dies wäre möglicherweise durch eine nicht vollständig lysierte Zelle, aus der im Verlauf der Messung noch freie Fluoreszenzfarbstoffmoleküle auslaufen zu erklären, konnte aber nicht durch eine abschließende optische Kontrolle bestätigt werden. Dennoch ist eine hohe Intensität des Fluoreszenzsignals des Carboxyfluorescein-Succinimidylesters ein starkes Indiz dafür, daß die Zelle zumindest zum Zeitpunkt der Behandlung mit CFDA-SE, wahrscheinlich aber auch bis zur Zellyse lebendig gewesen ist [122]. Dies kann auch in dem Photo einer Sf9-Zelle nach Behandlung mit CFDA-SE bei der direkten Anregung mit dem Argon-Ionen Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) beobachtet werden (s. Abbildung 22). Außerdem stellt die unspezifische Fluoreszenzmarkierung aller Proteine mit VIS-LIF Detektion eine interessante Ergänzung zur nativen UV-LIF Detektion dar, wenngleich durch die Derivatisierung auch die Löslichkeit und Ladung und daher auch das Migrationsverhalten der Proteine verändert wird. Dafür kann bei der VIS-LIF Detektion auf die kostspieligeren optischen Komponenten und Chipmaterialien aus Quarzglas verzichtet werden.



Abbildung 22: Photo einer Sf9-Zelle, die direkt mit dem Argon-Ionen Laser ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, Laserleistung 2 mW) zur Fluoreszenz des Carboxyfluorescein-Succinimidylesters angeregt wird.

Dazu ist ein Tropfen (20 μL) der Zellsuspension nach Behandlung mit CFDA-SE (s. 4.3.2) auf ein Deckglas auf dem Aufbau für die UV/VIS-LIF Detektion (s. 3.1) pipettiert worden. Die hohe Intensität der Fluoreszenzemission ist ein Zeichen für eine lebende Zelle mit einer für die Spaltung des nicht fluoreszierenden CFDA-SE notwendigen cytosolischen Esteraseaktivität.

5.4 QG-CHIPS

Für die Aufnahme von Einzelzellektropherogrammen werden QG-Chips aus hochwertigen Quarzgläsern verwendet (s. 4.6.1 QG-Chips). Diese weisen eine hohe Transparenz bei der Wellenlänge ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) des bei der UV-LIF Detektion verwendeten Lasers auf. Gleichzeitig ist die Intensität der Hintergrundfluoreszenz wesentlich niedriger als bei den anfangs verwendeten PDMS-Chips und liegt sogar noch unter der gemessenen Intensität bei den anschließend durch ein kleines Quarzfenster am Detektionspunkt oberhalb des Trennkanals verbesserten PQW-Chips (s. 5.1.2 Spektren zur Untersuchung der UV-Hintergrundfluoreszenz). Ein Photo eines QG-Chips mit vergrößerten Reservoirien durch die Auflage von kleinen PDMS-Stücken mit Löchern ist in der nachfolgenden Abbildung 23 gezeigt.

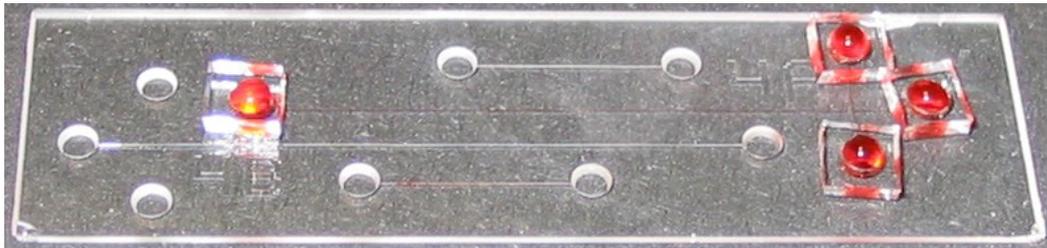


Abbildung 23: Photographie von einem Quarzglas-Chip (QG-Chip) mit zwei linearen Kanälen und zwei gegenüberliegenden Mikrofluidikstrukturen für die Aufnahme von Einzelzellektropherogrammen mit 3 cm langen Trennkanälen. Die vier Reservoirie der rechten Struktur sind mit zusätzlichen in PDMS gestanzten Löchern vergrößert worden. Zur besseren Sichtbarkeit der Reservoirie und der Mikrofluidikkanäle sind diese zusätzlich mit dem Farbstoff Eosin befüllt. Der QG-Chip besteht aus den zwei hochwertigen Quarzgläsern Suprasil I (Unterseite, 0,2 mm) und Lithosil Q1 (Oberseite, 0,5 mm).

Für die Aufnahme von Einzelzellektropherogrammen erlauben die QG-Chips, vor allem aufgrund der geringen Hintergrundfluoreszenz im Bereich um das Emissionsmaximum der Aminosäure Tryptophan (360 nm), wie bereits zuvor auch die PQW-Chips die Verwendung eines größeren Pinholes (1000 μm anstatt 400 μm) als beim Einsatz von PDMS-Chips für die UV-LIF Detektion (vergleiche Abbildung 13 und Abbildung 24). Gleichzeitig ist zur Verminderung der Geschwindigkeit des EOF's, wie auch der unspezifischen Proteinadsorption anstelle der zuvor verwendeten statischen Beschichtung mit Pluronic F108 (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) eine

dynamische Beschichtung der Kanalwände mit n-Dodecyl- β -maltosid (DDM) und Methylcellulose (MC) (beide von Sigma-Aldrich, München, Deutschland), die sich auch während der Messung im Trennpuffer befindet, benutzt worden. Die Reduktion des EOF, wie auch die Erhöhung der Viskosität des Puffers ist bereits zuvor von Dang et al. untersucht worden [123]. Zudem ist nach Optimierung, aufgrund der Untersuchung der pH-Abhängigkeit (s. 5.2) der Intensität der Fluoreszenzemission des Tryptophan, ein Trennpuffer mit einem pH-Wert von 11,0 (0,25% DDM, 0,03 % MC, 100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan) anstelle des zuvor eingesetzten Trennpuffers mit einem pH-Wert von 8,4 (100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, s. Abbildung 13) verwendet worden. Die Kanäle in dem QG-Chip werden wie zuvor unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe mit dem Trennpuffer befüllt. Anschließend wird eine einzelne, der im Trennpuffer resuspendierten Sf9 Zellen mittels hydrodynamischen Flusses durch einen Seitenkanal zu der Kreuzung im Chip geführt, wo diese von Pfosten festgehalten wird. Die Lyse der Zelle erfolgt mit einem kurzen elektrischen Hochspannungspuls (2000 V/cm für 50 ms). Danach werden die Proteine aus der Zelle elektrophoretisch (Spannung = 200 V/cm) in einem der Kanäle getrennt, bevor diese mittels UV-LIF in einer Entfernung von 5 mm von der Kreuzung detektiert werden (s. Abbildung 24).

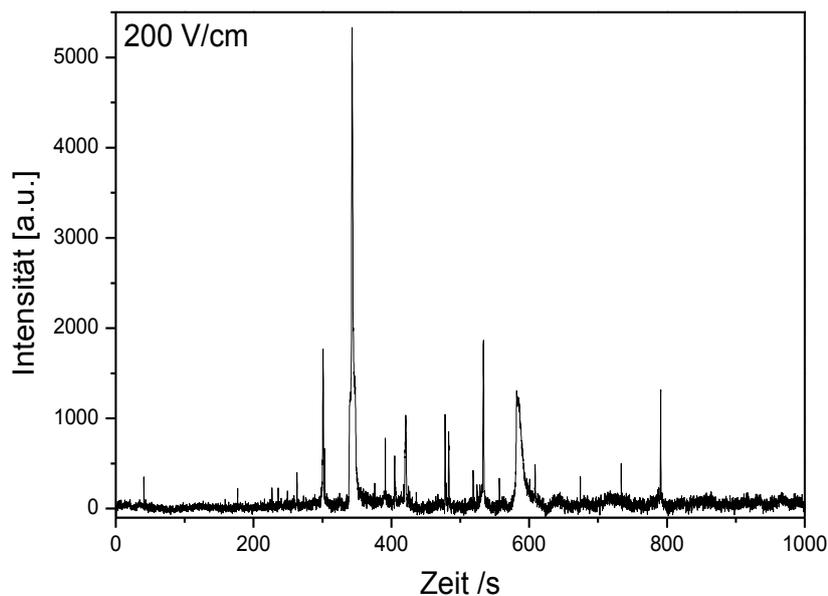


Abbildung 24: Basislinien korrigiertes Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 Zelle mit nativer UV-LIF Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) in einem QG-Chip. Die Kanäle sind dynamisch beschichtet mit DDM und MC (Trennpuffer: 0,25% DDM, 0,03 % MC, 100 mM Tris, 100 mM CHES, 4 % Pullulan, pH = 11,0). Die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 150 μW und einem 1000 μm Pinhole bei einer Trennungsspannung von 200 V/cm durchgeführt. Die Zellen sind mit einem elektrischen Puls von 2000 V/cm für 50 ms lysiert worden. Das genaue Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1 und 4.6.1) dieser Arbeit beschrieben.

In dem Elektropherogramm in der Abbildung 24 sind ≈ 20 deutlich voneinander getrennte Peaks nach der Lyse von einer einzelnen Sf9-Zelle detektiert worden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität der Peaks aufgrund der geringen Hintergrundfluoreszenz der QG-Chips, der Verwendung eines größeren Pinholes für die UV-LIF Detektion und des erhöhten pH-Werts des Trennpuffers deutlich höher als bei Einzelzellektropherogrammen, die bei Messungen mit PDMS-Chips erhalten worden sind (vergl. Abbildung 13a). Die hier mit einem QG-Chip erhaltenen Peaks sind sogar in der Höhe der Intensität vergleichbar mit denen aus Einzelzellektropherogrammen, die aus Messungen mit PQW-Chips (s. Abbildung 20) mit demselben Pinhole und dem gleichen pH-Wert des Trennpuffers stammen, obwohl dabei mit $500 \mu\text{W}$ im Vergleich zu $150 \mu\text{W}$ eine höhere Laserleistung für die Fluoreszenzanregung verwendet worden ist [111].

5.5 NACHWEISGRENZE

Da die native Fluoreszenz von Proteinen bei einer Anregung im UV-Bereich hauptsächlich auf der aromatischen Aminosäure Tryptophan beruht, ist diese auch zur Bestimmung der Nachweisgrenze des im Material und Methodenteil dieser Arbeit (s. 3.2) beschriebenen Aufbaus verwendet worden. Das Elektropherogramm in der Abbildung 25 stellt dazu das Ergebnis aus einer Messung mit nativer UV-LIF Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$), von der niedrigsten Konzentration bei der das Signal noch vom Rauschen des Hintergrunds unterschieden werden kann. Dazu ist in einem QG-Chip (s. 4.6.1), der zuvor statisch mit Pluronic F108 (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) beschichtet worden ist, eine Tryptophan-Lösung in einer Konzentration von 10 nM (in 10 mM Tris-Puffer, $\text{pH} = 8,2$) nach der Injektion („pinched injection“) mit einer Trennungsspannung von 228 V/cm elektrophoretisch zu dem Laserfokus, der sich 5 mm hinter dem Kreuz mitten im Kanal befindet und als Detektionspunkt dient, bewegt worden.

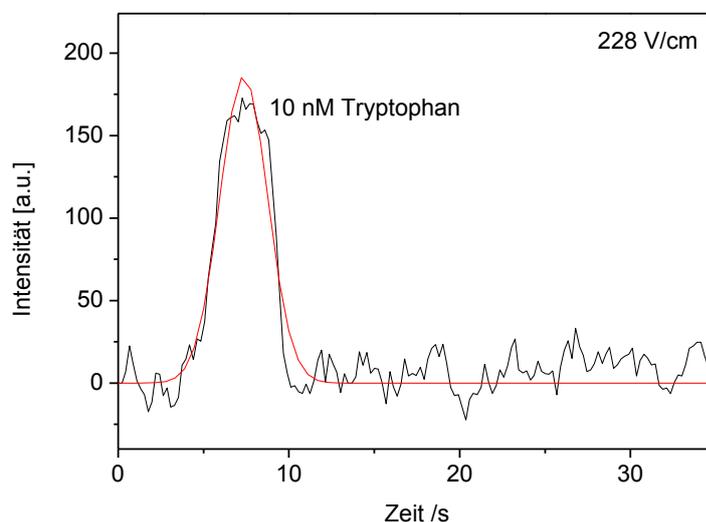


Abbildung 25: Basislinien korrigiertes Elektropherogramm der UV-LIF Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) einer 10 nM Tryptophan-Lösung, die mit einer Feldstärke von 228 V/cm injiziert worden ist (engl.: pinched injection, Detektion 5 mm hinter dem Kreuz). Die Kanäle in dem QG-Chip sind mit dem Triblockcopolymer F108 statisch beschichtet (Trennpuffer: 10 mM Tris, pH = 8,2) und die UV-LIF Detektion ist mit einer Laserleistung von 500 μW und einem 1000 μm Pinhole durchgeführt worden. Die Daten sind mit einem 5 Punkte Binning geglättet worden [111].

Der Peak in der Abbildung 25, der von der 10 nM Tryptophan-Lösung stammt, ist mit dem Programm Origin (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) mit einer Gauß-Fit-Funktion gefittet worden (s. rote Linie). Dabei beträgt das Signal-Rausch-Verhältnis für diesen Peak 11,9, woraus sich eine theoretische Nachweisgrenze von 2,5 nM für das Tryptophan ergibt (unter der Annahme eines hinreichenden Signal-Rausch-Verhältnis von 3). Damit liegt die theoretische Nachweisgrenze durch die Verwendung eines QG-Chips, mit gleichem Pinhole (Durchmesser = 1000 μm) und gleicher Laserleistung (500 μW), die für die Anregung verwendet worden ist, sogar um eine ganze Größenordnung niedriger, als zuvor, wo Hellmich et al. mit demselben Aufbau für die UV-LIF Detektion und der Verwendung von PDMS-Chips, bei denen zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz das PDMS mit Carbon Black-Nanopartikeln gemischt und eine theoretische Detektionsgrenze von 25 nM für Tryptophan berechnet worden ist [110]. Damit ist nach Feinjustierung des Detektors und des Strahlengangs für den UV-Laser, wie der Verwendung von einem QG-Chip mit extrem niedriger Hintergrundfluoreszenz (s. 5.1.2 Spektren zur Untersuchung der UV-Hintergrundfluoreszenz) eine Steigerung der Detektionsempfindlichkeit für diesen Aufbau (s. 3.2) um einen Faktor von 14,2 erreicht worden (bezogen auf die Signalintensität mit 170 counts für eine 10 nM Tryptophan-Lösung gemessen mit einem QG-Chip im Vergleich zu 120 counts für eine 100 nM Tryptophan-Lösung gemessen von Hellmich et al. [110] mit einem black-PDMS-Chip). Gleichzeitig liegt die hier mit einem durch ein anisotropes Ätzverfahren strukturierten QG-Chip (s. 4.6 DRIESO und 4.6.1 QG-Chips) erreichte Nachweisgrenze in einem Mikrofluidik-Chip für Tryptophan wesentlich niedriger als diejenige, die zuvor von Schulze et al. unter Verwendung von einem mit einem Naßätzverfahren strukturierten Quarzglas-Chip mit der UV-LIF Detektion von einer 2 μM Tryptophan-Lösung bestimmt worden ist [124]. Überdies ist die hier erreichte Nachweisgrenze die bisher niedrigste für Tryptophan, die mit nativer UV-LIF Detektion in einem Mikrofluidik-Chip erreicht worden ist [111].

5.6 PROTEINTRENNUNG

Zur Charakterisierung der Trenneffizienz der QG-Chips ist eine Mischung aus Standardproteinen in diesen getrennt worden. Wie bei der Erstellung des Einzelzellektropherogramms mit einem QG-Chip (s. Abbildung 24) ist auch in den nachfolgend dargestellten Proteintrennung mit UV-LIF Detektion eine dynamische Beschichtung der Mikrokanäle verwendet worden. Diese bietet

gegenüber einer statischen Beschichtung den Vorteil, daß die Konzentration der Beschichtung während der Dauer einer Messung nicht verändert, was wiederum z.B. durch einen variierenden EOF einen Einfluss auf die Messung haben könnte. Die hier bei der nachfolgenden Proteintrennung verwendete dynamische Beschichtung mit 0,1 % (w/w) n-Dodecyl- β -maltosid (DDM), welches sich im Trennpuffer befindet, ist bereits zuvor von Huang et al. untersucht worden und führt zu einer sehr starken Reduktion des EOF, wie auch der unspezifischen Proteinadsorption [125]. Für die Trennung von drei Standardproteinen ist ein Trennpuffer (10 mM Tris, pH = 8,2) mit 0,1 % (w/w) DDM und eine Trennungsspannung von 286 V/cm verwendet worden. Dabei sind die Proteine α -Chymotrypsinogen A, Catalase und Ovalbumin, die je in einer Konzentration von 100 μ g/mL (entsprechend 4 μ M, 0,4 μ M und 2,2 μ M) im Trennpuffer gelöst, gemeinsam injiziert („pinched injection“) worden. Die UV-LIF Detektion ist mit dem Laserfokus in einem Abstand von 19,5 mm hinter dem Kreuz durchgeführt worden und die Proteine sind mit einer Trennungsspannung von 286 V/cm innerhalb einer Zeit von 2 min in einem QG-Chip getrennt worden (s. Abbildung 26).

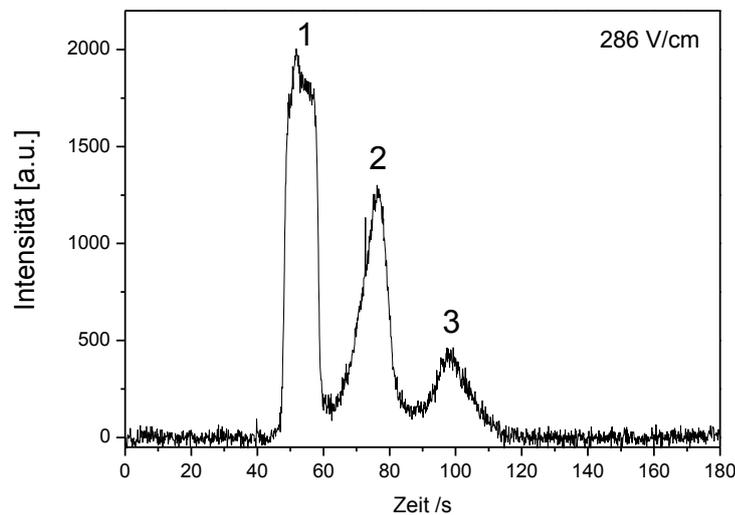


Abbildung 26: Basislinien korrigiertes Elektropherogramm der Trennung von nativen Proteinen mit UV-LIF Detektion ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm). Die drei Proteine α -Chymotrypsinogen A (1), Catalase (2) und Ovalbumin (3) mit jeweils einer Konzentration von 100 μ g/mL (entsprechend 4 μ M, 0,4 μ M und 2,2 μ M) sind in einer Mischung injiziert und mit einer Feldstärke von 286 V/cm getrennt worden (engl.: pinched injection, Detektion 19,5 mm hinter dem Kreuz). Die Kanäle in dem QG-Chip sind dynamisch mit 0,1 % DDM im Trennpuffer (10 mM Tris, pH = 8,2), in dem auch die Proteine gelöst worden sind, beschichtet. Die UV-LIF Detektion ist mit einer Laserleistung von 500 μ W und einem 1000 μ m Pinhole durchgeführt worden [111].

In dem Elektropherogramm der Abbildung 26 beträgt die Bodenhöhe für den ersten Peak, der vom α -Chymotrypsinogen A stammt 98 μ m, für den zweiten Peak, der von der Catalase stammt 68 μ m und für den dritten Peak, der vom Ovalbumin stammt 74 μ m. Dabei ergibt sich eine Auflösung (R), für den zweiten und den ersten Peak von 1,36, wie für den dritten und den zweiten Peak von 1,12 und ist damit >1 , so daß die drei Proteine nach Kriterien, die auch in der

klassischen Säulenchromatographie angewendet werden, als klar voneinander getrennt. Dabei erreicht der erste Peak sogar ein Signal-Rausch-Verhältnis von 82,5, woraus sich eine theoretische Detektionsgrenze von 3,6 µg/mL für das α -Chymotrypsinogen A (entsprechend 145 nM) ergibt (unter der Annahme eines hinreichenden Signal-Rausch-Verhältnis von 3). Im Vergleich dazu sind zuvor von Schulze et al. für das gleiche Protein mit einem Quarzglas-Chip, der allerdings mit einem Naßätzverfahren strukturiert worden ist, nur 12,5 µg/mL (entsprechend 500 nM) erreicht worden [124].

5.7 PARALLELE DETEKTION

Für die Zuordnung von Peaks zu einem bestimmten Protein in Einzelzellektropherogrammen, die mit nativer UV-LIF Detektion erstellt worden sind ist der Aufbau (s. 3.1 UV/VIS-LIF Detektion) modifiziert worden, so daß durch die gleichzeitige Anregung im UV ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) und im VIS ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) und Detektion des entsprechend emittierten Fluoreszenzlichts eine parallele UV/VIS-LIF Detektion (s. 3.2) möglich wird. Insofern in einer Zelle nur ein Protein fluoreszenzmarkiert ist, können dann zeitgleich auftretende Peaks im sichtbaren und ultravioletten Bereich diesem Protein zugeordnet werden. Im Folgenden werden dazu Sf9 PKC γ -GFP Zellen verwendet, bei denen das Protein PKC γ mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP fusioniert worden ist [97,98]. Da sich die QG-Chips (s. 4.6.1) gegenüber den anderen bisher verwendeten Mikrofluidik-Chips bei der nativen UV-LIF Detektion besonders aufgrund der niedrigen Hintergrundfluoreszenz als eindeutig überlegen herausgestellt haben (s. 5.1.2, 5.4 und 5.5), sind diese auch für die Messungen mit paralleler UV/VIS LIF Detektion, die in den folgenden Einzelzellektropherogrammen dargestellt sind (s. Abbildung 27 und Abbildung 28), verwendet worden.

Dabei ist zur Verminderung der Geschwindigkeit des EOF's, wie auch der unspezifischen Proteinadsorption anstelle der zuvor verwendeten dynamischen Beschichtung mit Dodecyl- β -maltosid (DDM) und Methylcellulose (MC) (s. 5.4) eine dynamische Beschichtung der Kanalwände nur mit Dodecyl- β -maltosid (DDM), die zuvor von Huang et al. untersucht worden ist [125] und sich auch während der Messung in einer Konzentration von 0,1 % (w/w) direkt im Trennpuffer befindet, eingesetzt worden. Gleichzeitig ist die Viskosität im Trennpuffer durch die Verwendung von 8 % (w/w) im Vergleich zu den zuvor verwendeten 4 % (w/w) erhöht, was wiederum den EOF reduziert und bei der hybrid dynamischen Beschichtung mit DDM und MC durch die Methylcellulose erreicht worden ist [123]. Das Pullulan im Trennpuffer (0,1 % DDM (w/w), 100 mM Tris, 100 mM CHES, 8 % Pullulan, pH = 9,0), als langkettiges Zuckerpolymer, bildet eine freischwimmende Trennmatrix, die bei einer erhöhten Konzentration, ähnlich wie bei Agarosegelen, kleinere Maschen (Poren) im Netzwerk und damit auch eine erhöhte Trennkapazität aufweist.

Für die Messungen werden die Kanäle in dem QG-Chip wie zuvor unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe mit dem Trennpuffer befüllt. Anschließend wird eine einzelne, der im Trennpuffer resuspendierten Sf9 Zellen mittels hydrodynamischen Flusses durch einen

Seitenkanal zu der Kreuzung im Chip geführt, wo diese von Pfosten festgehalten wird. Die Lyse der Zelle erfolgt mit einem kurzen elektrischen Hochspannungspuls (2500 V/cm für 100 ms). Danach werden die Proteine aus der Zelle elektrophoretisch (Spannung = 220 V/cm) in einem der Kanäle getrennt, bevor diese mittels UV-LIF in einer Entfernung von 10 mm bis zur Kreuzung detektiert werden (s. Abbildung 27 und Abbildung 28).

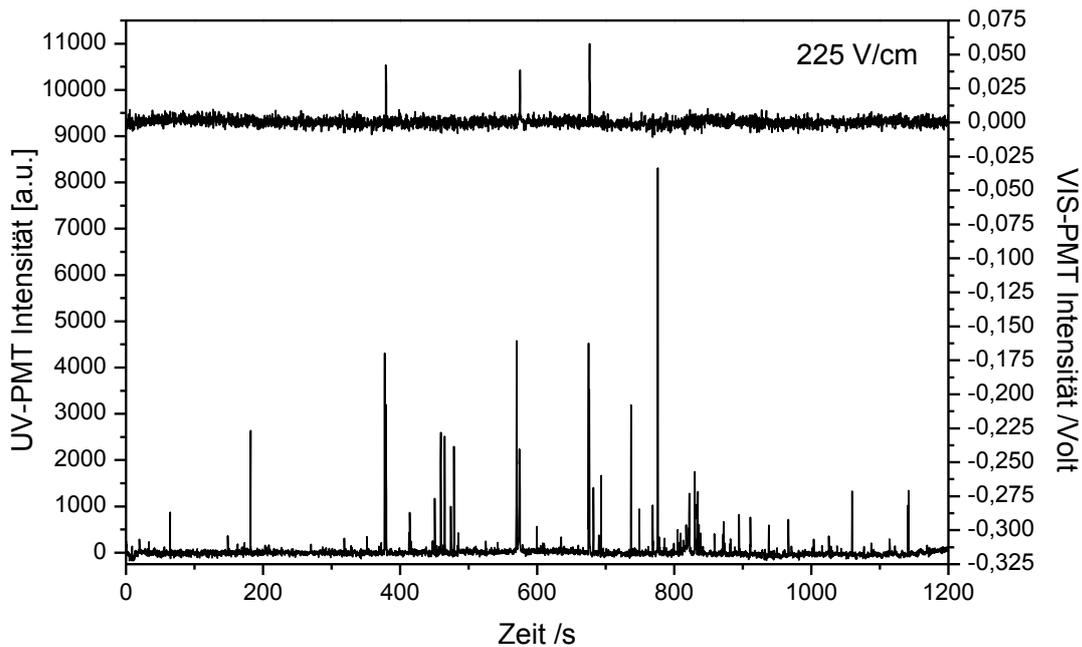


Abbildung 27: Basislinien korrigiertes Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 PKC γ -GFP Zelle mit paralleler nativer UV-LIF ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) und VIS-LIF ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) Detektion in einem QG-Chip. Die Kanäle sind dynamisch beschichtet mit DDM (Trennpuffer: 0,1 % DDM (w/w), 100 mM Tris, 100 mM CHES, 8 % Pullulan, pH = 9,0). Die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 300 μW mit einem 1000 μm Pinhole und die VIS-LIF Detektion mit einer Laserleistung von 2 mW 10 mm hinter dem Kreuz bei einer Trennungsspannung von 225 V/cm durchgeführt. Die Zellen sind mit einem elektrischen Puls von 2500 V/cm für 100 ms lysiert worden. Das genaue Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.5 und 4.6.1) dieser Arbeit beschrieben.

In dem Elektropherogramm in der Abbildung 27 sind ≈ 50 deutlich voneinander getrennte Peaks nach der Lyse von einer einzelnen Sf9 PKC γ -GFP Zelle mit UV-LIF detektiert worden. Dabei ist die Fluoreszenzintensität der Peaks aufgrund der geringen Hintergrundfluoreszenz der QG-Chips und der Verwendung eines großen Pinholes (1000 μm) deutlich höher als bei Einzelzellektropherogrammen, die bei Messungen mit PDMS-Chips erhalten worden sind (vergl. Abbildung 13a). Gleichzeitig sind dies mehr als doppelt so viele und auch schmalere Peaks, als zuvor mit einem QG-Chip nach der Lyse einer Sf9 Zelle gemessen worden sind (s. Abbildung 24). Dies liegt vermutlich an der hier erhöhten Trennkapazität durch die Verwendung einer höheren Pullulan-Konzentration im Trennpuffer. Überdies sind hier bei 379 s, 575 s und

676 s drei eindeutige Peaks mit VIS-LIF detektiert worden, zu denen entsprechend bei der gleichen Zeit jeweils Peaks im UV-Signal vorhanden sind. Diese Peaks stammen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von dem GFP-markierten Protein PKC γ . Dabei gibt es dafür, daß dies nicht nur ein Peak ist mehrere mögliche Ursachen (s. Diskussion zu Abbildung 28). Es ist allerdings auch schon von Galla et al. gezeigt worden, daß bei paralleler UV/VIS-LIF Detektion mit demselben Aufbau und der Verwendung von Carbon Black Nanopartikeln, die am Detektionspunkt mit dem PDMS von PDMS-Mikrofluidik-Chips gemischt worden sind, nach der Lyse einer Zelle aus der gleichen Zelllinie nur ein Peak im sichtbaren mit einem entsprechenden im UV-Signal gemessen worden ist [126].

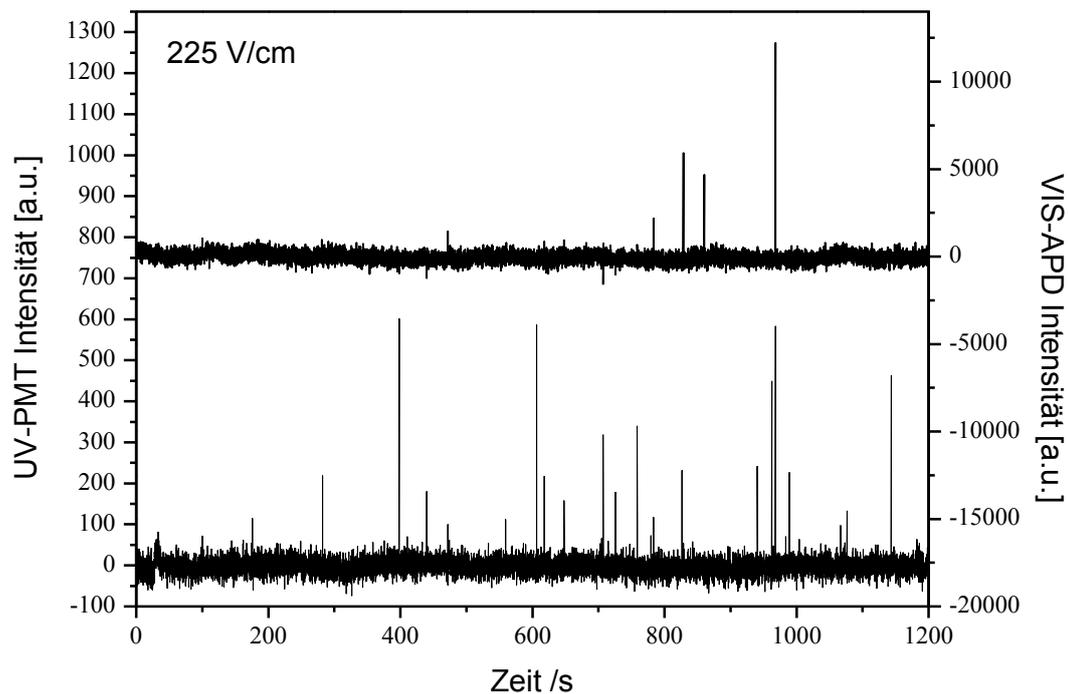


Abbildung 28: Basislinien korrigiertes Elektropherogramm einer einzelnen Sf9 PKC γ -GFP Zelle mit paralleler nativer UV-LIF ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) und VIS-LIF ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) Detektion in einem QG-Chip. Die Kanäle sind dynamisch beschichtet mit DDM (Trennpuffer: 0,1 % DDM (w/w), 100 mM Tris, 100 mM CHES, 8 % Pullulan, pH = 9,0). Die UV-LIF Detektion wurde mit einer Laserleistung von 300 μW mit einem 1000 μm Pinhole und die VIS-LIF Detektion mit einer Laserleistung von 2 mW 10 mm hinter dem Kreuz bei einer Trennungsspannung von 225 V/cm durchgeführt. Die Zellen sind mit einem elektrischen Puls von 2500 V/cm für 100 ms lysiert worden. Das genaue Chiplayout und die Durchführung sind im Material und Methodenteil (s. 4.2.1, 4.3.1, 4.5 und 4.6.1) dieser Arbeit beschrieben.

In dem Elektropherogramm in der Abbildung 28 sind ≈ 25 deutlich voneinander getrennte Peaks nach der Lyse von einer einzelnen Sf9 PKC γ -GFP Zelle mit UV-LIF detektiert worden. Dabei sind hier parallel dazu fünf Peaks (bei 472 s, 784 s, 829 s, 860 s und 968 s) mit VIS-LIF detektiert worden. Interessanterweise stimmen davon vier Peaks mit Peaks im UV-Signal überein, die zur

gleichen Zeit aufgetreten sind und daher sehr wahrscheinlich auch hier von dem PKC γ -GFP Protein stammen. Allerdings fehlt diese Übereinstimmung bei dem Peak, der bei 860 s im VIS-Signal zu sehen ist und zu dem es keinen entsprechenden Peak im UV-Signal gibt. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, daß die Isoenzyme der PKC in verschiedensten Zelltypen wichtige Schlüsselpositionen in der Regulation verschiedenster Signaltransduktionen besitzen. Dabei ist die PKC unter anderem an der Regulation von Apoptose, Proliferation, Zelldifferenzierung und Migration beteiligt. Allgemein werden konventionelle Proteinkinasen, wie die hier fluoreszenzmarkierte PKC γ , durch die Bindung von sekundären Botenstoffen, wie Diacylglycerin und Calciumionen aktiviert. Typischerweise erfolgt die Freisetzung dieser Botenstoffe der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Als Reaktion auf die Bindung der sekundären Botenstoffe wandert die PKC vom Zytoplasma an die Membran [97]. Zusätzlich erfolgt die Aktivierung der Proteinkinase PKC γ durch die Bindung von Phospholipiden an ihre Proteindomäne C1 und die Ca²⁺-abhängige Bindung von Phospholipiden an ihre Proteindomäne C2. Gleichzeitig geht die Aktivierung mit einer Konformationsänderung einher, der die PKC γ aus ihrer selbstinhibierenden Form im Zytoplasma in eine Form überführt, in der die katalytische Domäne mit der Substratbindetasche an der Membran frei zugänglich ist [127]. Letztlich kann auch eine Überexpression der PKC γ , die in dieser nicht monoklonalen Sf9-Zelllinie in einzelnen Zellen und eine mögliche Missfaltung, da es sich um ein heterologes Protein handelt, zu der Bildung von Proteinaggregaten führen, die sich zudem auch noch in den verschiedensten Zellkompartimenten befinden können [97,128]. Die Bildung sogenannter Aggresomen, die oftmals von der Zelle nicht degradiert werden können, ist insbesondere bei der Überexpression von Membranproteinen beobachtet worden [129]. All dies sind mögliche Ursachen, die dazu geführt haben können, daß in dem VIS-Signal der Einzelzellektropherogramme, die in der Abbildung 27 und der Abbildung 28 dargestellt sind drei bzw. vier Peaks mit einem entsprechenden Peak im UV-Signal detektiert worden sind. Eine Überexpression der PKC γ und eine damit einhergehende Fehllokalisierung oder die Bildung von Aggresomen kann aufgrund der Heterogenität einzelner Zellen kann gerade bei dieser polyklonalen Zelllinie (Sf9 PKC γ -GFP), bei der das Fusionskonstrukt in verschiedenen Zellen in unterschiedlicher Zahl und an verschiedenen Orten in das Genom inseriert sein kann, nicht vollständig ausgeschlossen werden [97]. Dabei ist es jedoch wahrscheinlicher, daß es sich um das Protein PKC γ in unterschiedlichen Konformationen (aktive und inaktive Form) und zusätzlich das gleiche Protein mit einem und jeweils mehreren der potentiellen Bindungspartner (Ca²⁺, Diacylglycerin und/oder Phospholipide an den entsprechenden Proteindomänen C1 und/oder C2), wodurch entsprechend das Migrationsverhalten verändert worden ist, handelt, da gerade diese Zelllinie erstellt und entsprechend selektioniert worden ist, um eine Überexpression zu vermeiden. Dies und die zumindest in den meisten Zellen dieser Zelllinie korrekte Faltung des Proteins PKC γ konnte durch Aktivitätsstudien der Proteinkinase mittels automatisierter Mikroskopie gezeigt werden [97]. Auch der Peak bei 860 s im VIS-Signal des Einzelzellektropherogramms der Abbildung 28 ohne entsprechende Übereinstimmung im UV-Signal, der vermutlich durch freies GFP verursacht worden ist, ist ein Indiz dafür, daß die PKC γ in den Zellen korrekt gefaltet ist und auch degradiert werden kann. Da bei der lysosomalen Degradation von Fusionsproteinen das GFP meist langsamer abgebaut wird, kann dieses später bei eukaryotischen Zellen als freies GFP nachgewiesen werden [130].

5.8 OBERFLÄCHENSTRUKTUREN VON BAKTERIEN

Die Zelloberflächen von Bakterien sind charakteristisch aufgebaut und unterscheiden sich von Membranen und Zellwänden eukaryotischer Zellen. Aufgrund dieser Oberflächen werden Bakterien in Gram-negative und Gram-positive eingeteilt. Das hier untersuchte *S. meliloti* gehört zu den Gram-negativen Bakterien. Die Oberflächen der Gram-negativen Bakterien bestehen aus drei Lagen, einer inneren und einer äußeren Membran zwischen denen sich der periplasmatische Raum mit einer Lage Peptidoglycan befindet [131]. Die äußere Membran ist dicht mit Exopolysacchariden und Lipopolysacchariden (LPS) besetzt, die als wichtige Endotoxine gelten. Dabei besteht das LPS aus dem Lipid A, womit das Molekül in der Membran verankert ist, gefolgt von einer Kernregion (engl. core) an die sich das O-Antigen anschließt. Die Kernregion und das O-Antigen sind aus Zuckern aufgebaut [132]. Das O-Antigen ist z.B. bei der Erkennung für die symbiotische Interaktion von einiger *Rhizobium*-Stämme mit Leguminosen beteiligt [133,134].

Für die Untersuchung der Zelloberfläche von *S. meliloti* werden mit SEM, XHR SEM und AFM in Trockenheit, wie in Flüssigkeit, verschiedene hochauflösende Mikroskopie-Techniken verwendet. Daraus resultierend werden die auf der Oberfläche beobachteten Strukturen bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen und mit Rücksicht auf mögliche Einflüsse durch die notwendige Probenpräparation verglichen. So können Veränderungen der natürlich vorkommenden Oberflächenstrukturen durch die verschiedenen Schritte bei der Probenpräparation, angefangen bei den unnatürlichsten Umgebungsbedingungen, die für die herkömmliche Rasterelektronenmikroskopie (SEM) notwendig sind (Fixierung, Trocknung, Metallbeschichtung und Hochvakuum), bis hin zu physiologischen Konditionen bei der Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeit (Abbildung lebender Bakterien), sukzessive verfolgt werden. Überdies werden mögliche Ursprünge der beobachteten Strukturen auf der Zelloberfläche durch die Osmolarität des Mediums, wie aufgrund der dominierenden Moleküle an der Zelloberfläche mittels AFM-Abbildungen in Flüssigkeit (Abbildung lebender Bakterien), adressiert. Dazu werden zwei Mutanten, wovon die eine keine Exopolysaccharide produziert [113] und die andere verkürzte LPS-Moleküle an der Oberfläche trägt [135], mit dem Wildtyp-Stamm [112] verglichen. Dabei sind unter natürlichen Umgebungsbedingungen auch sehr kleine Erhebungen an der Oberfläche abgebildet worden, die wahrscheinlich einzelne Proteine der äußeren Membran (Omp) darstellen.

Bei der Betrachtung von herkömmlichen SEM-Bildern des Wildtyp-Stamms von *S. meliloti* (Rm2011), nach Fixierung, schonender Dehydrierung, Beschichtung der Probe mit Gold (Dicke der Goldschicht = 12 nm) und Abbildung im Vakuum, ist anfangs die sichtbar raue Oberfläche der Bakterien aufgefallen (s. Abbildung 29 A). Die länglichen, faltenartig, hervorstehenden Strukturen besitzen durchschnittlich (Anzahl der Messungen (N) = 50) eine Breite von 29 ± 12 nm und eine Länge von 92 ± 31 nm (Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD)).

Da die Oberflächenstrukturen möglicherweise durch die aufgebraute Goldschicht beeinflusst oder verändert worden sein können, sind Bakterien des Wildtyp-Stamms nach Fixierung und

Dehydrierung mit einem XHR SEM abgebildet worden. Obwohl sich die Probe immer noch im Vakuum befinden muss, kann dabei auf das Auftragen einer leitenden Metallschicht verzichtet werden. Ein solches XHR SEM-Bild ist in Abbildung 29 B gezeigt. Immer noch ist die raue Oberfläche zu erkennen. Die länglich hervorstehenden Strukturen haben eine Breite von 18 ± 5 (M \pm SD, N = 50) und sind 80 ± 27 nm (M \pm SD, N = 15) lang. Zusätzlich sind kleinere, runde Strukturen mit einem Durchmesser von 21 ± 4 nm (M \pm SD, N = 7) deutlich zu erkennen (s. Abbildung 29 B, markiert mit roten Pfeilen). Dabei ist zu berücksichtigen, daß aufgrund der nicht vorhandenen leitenden Goldschicht die Elektronen bei XHR SEM-Abbildungen auch einige Nanometer tief in die Probe eindringen und dort auch Strukturen unterhalb der Oberfläche abgebildet werden können. Dabei wird der Kontrast an der eigentlichen Oberfläche der Probe etwas schwächer.

Auch bei der Abbildung des Wildtyp-Stamms von *S. meliloti* mit dem AFM in Trockenheit nach Fixierung und schonender Dehydrierung der Bakterien, ist die raue Oberfläche mit ähnlichen, hervorstehenden Strukturen gut sichtbar (s. Abbildung 29 C). Dabei ist die Probe ohne Metallbeschichtung bei Umgebungsbedingungen ohne Vakuum abgebildet worden, da auch dadurch das Erscheinungsbild von Zellen verändert werden kann [136]. Auf dem AFM Bild in der Abbildung 29 C ist zu sehen, daß die gesamte Zelloberfläche dicht mit länglich, faltig hervorstehenden Strukturen besetzt ist. Diese Strukturen besitzen eine axiale Höhe von $12,1 \pm 4,9$ nm (M \pm SD, N = 47), einen lateralen Durchmesser von 26 ± 6 nm (M \pm SD, N = 30) und eine Länge von 72 ± 28 nm. Dabei sind zwischen den Erhebungen keine flachen Regionen der Zellmembran sichtbar, da sich die faltigen Strukturen so nah beieinander befinden (s. Abbildung 29 C und Abbildung 31). Überdies entsprechen die Maße der länglich, faltig hervorstehenden Strukturen bei den AFM-Abbildungen, unter Berücksichtigung der Faltung aufgrund der Spitzengeometrie (engl. „tip-convolution“), in guter Übereinstimmung denen, die bei der Abbildung mit dem XHR SEM beobachtet worden sind (s. Abbildung 29 B). Daraus lässt sich schließen, daß sich diese Strukturen in dem XHR SEM-Bild auch wirklich an der Oberfläche des Bakteriums befinden und nicht etwa aufgrund der Penetrationstiefe darunter liegen [137].

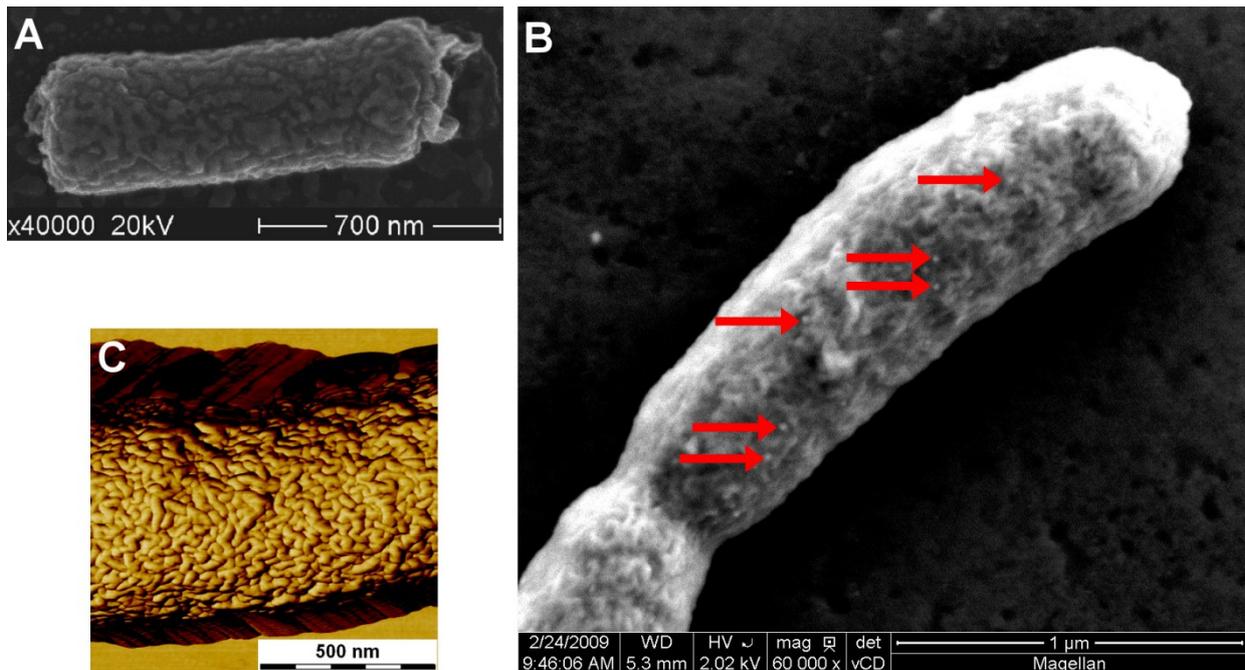


Abbildung 29: Vergleich verschiedener Mikroskopie-Techniken bei der Abbildung des *S. meliloti* Wildtypstamms Rm2011: (A) SEM: fixiert, schonend dehydriert und abgebildet im Vakuum. Die Oberfläche ist bedeckt mit faltigen, hervorstehenden Strukturen. (B) XHR SEM: fixiert, schonend dehydriert und abgebildet im Vakuum. Auf der Oberfläche sind verschiedene Strukturen erkennbar: längere Falten bedecken den größten Teil des Bakteriums, während mehrere kleine Punkte auf der Oberfläche verteilt sind (ein paar davon sind mit roten Pfeilen markiert). (C) AFM Phasenbild: fixiert, schonend dehydriert und abgebildet bei Normaldruck in Luft. Die gesamte Oberfläche ist dicht bedeckt mit länglichen, faltigen Strukturen [137].

Die raue Oberfläche des *S. meliloti* Wildtyp-Stamms (Rm2011) ist auch bei AFM-Abbildungen in Flüssigkeit gut sichtbar (s. Abbildung 30 A und Abbildung 32). Dabei sind die Zellen wie zuvor mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert worden. Um jedoch ausschließen zu können, daß die bisher beobachteten Strukturen lediglich Artefakte aufgrund der Dehydrierung darstellen sind die Zellen in PBS (engl. „phosphate buffered saline“) abgebildet worden. Die hervorstehenden Strukturen an der Oberfläche erscheinen in der Flüssigkeit überwiegend rundlich und besitzen neben einer axialen Höhe von $4,7 \pm 2,7\text{ nm}$ ($M \pm SD$, $N = 30$) einen durchschnittlichen lateralen Durchmesser von $33 \pm 8\text{ nm}$ ($M \pm SD$, $N = 40$).

Da auch eine Veränderung der natürlichen Strukturen an der Oberfläche aufgrund der Fixierung denkbar ist, ist in einem weiteren Schritt darauf verzichtet worden. Dazu sind die Bakterien des Wildtyp-Stamms (Rm2011), um möglichst physiologische Bedingungen herzustellen, mit dem AFM, in dem auch für die Anzucht verwendeten Kulturmedium (VMM mit einer niedrigeren Osmolarität von 153 mosmol/L im Vergleich zu PBS mit 300 mosmol/L), lebendig abgebildet worden. Die auch ohne Fixierung immer noch raue Oberfläche ist in der Abbildung 30 B und der Abbildung 33 A gezeigt, wobei die rundlich hervorstehenden Strukturen eine axiale Höhe von $4,0 \pm 1,9\text{ nm}$ ($M \pm SD$, $N = 46$) und einen lateralen Durchmesser von $28 \pm 6\text{ nm}$ ($M \pm SD$, $N = 40$) besitzen und bis auf die geringere Höhe denen nach Fixierung und Abbildung in PBS sehr ähnlich sind. Um

gleichzeitig den Einfluss der Osmolarität auf die Art der Oberflächenstrukturen genauer untersuchen und die AFM-Aufnahmen besser vergleichen zu können, sind lebende Bakterien des Wildtyp-Stamms (Rm2011) von *S. meliloti* ohne Fixierung auch in reinem MilliQ-H₂O abgebildet worden (s. Abbildung 30 C). Dabei sind ähnliche, rundlich hervorstehende Strukturen auf der Oberfläche vorhanden, die mit einer Höhe von $2,0 \pm 0,7$ nm ($M \pm SD$, $N = 14$) und einer Breite von 29 ± 10 nm ($M \pm SD$, $N = 14$) zwar etwas niedriger sind, als unter natürlichen Bedingungen in VMM-Kulturmedium oder nach Fixierung in PBS, aber immer noch eine fast identische Breite und das gleiche Erscheinungsbild besitzen (vergl. Abbildung 30). Daher muss es sich bei den beschriebenen hervorstehenden Erhebungen um natürliche Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien handeln, die nicht durch die Fixierung oder die Umgebungsbedingungen verursacht worden sind. Dabei ist es wahrscheinlich, daß es durch die höhere Salzkonzentration und die damit einhergehende erhöhte Osmolarität in PBS zu einer leichten Schrumpfung der Membran gekommen ist, da hier die Strukturen deutlicher hervortreten als unter physiologischen Bedingungen im Kulturmedium (VMM) oder in reinem MilliQ-H₂O, wo die sehr niedrige Osmolarität zu einem Anschwellen der Bakterienhülle geführt hat, was sich auch in der Höhe der Strukturen widerspiegelt [137].

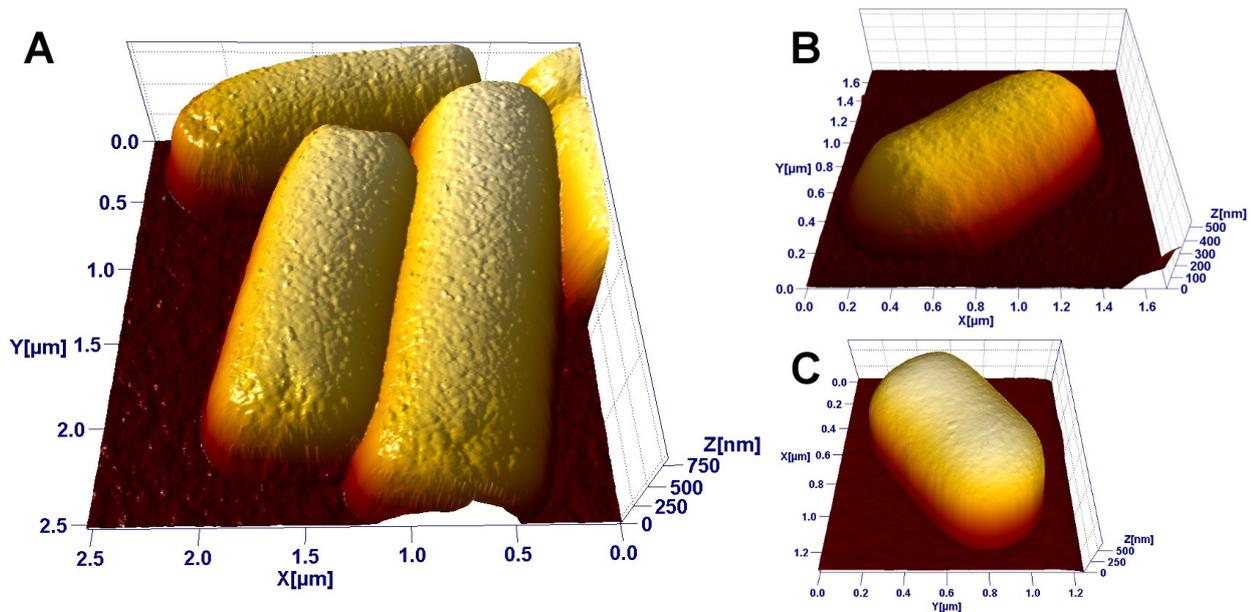


Abbildung 30: 3D-Darstellung von AFM-Höhenbildern des Wildtypstamms Rm2011 unter verschiedenen Bedingungen in Flüssigkeit. (A) Fixiert und abgebildet in PBS Puffer. Auf der gesamten Bakterienoberfläche sind rundliche Erhebungen zu sehen. (B) Lebendes Bakterium in Kulturmedium (VMM) abgebildet. Eng beieinander liegende Erhebungen sind auf Oberfläche des Bakteriums noch deutlich zu erkennen. (C) Lebendes Bakterium abgebildet in Wasser (MilliQ). Die Erhebungen sind auf der Oberfläche vorhanden, allerdings weniger stark ausgeprägt als in PBS Puffer oder im Minimalmedium (VMM), die eine höhere Osmolarität besitzen [137].

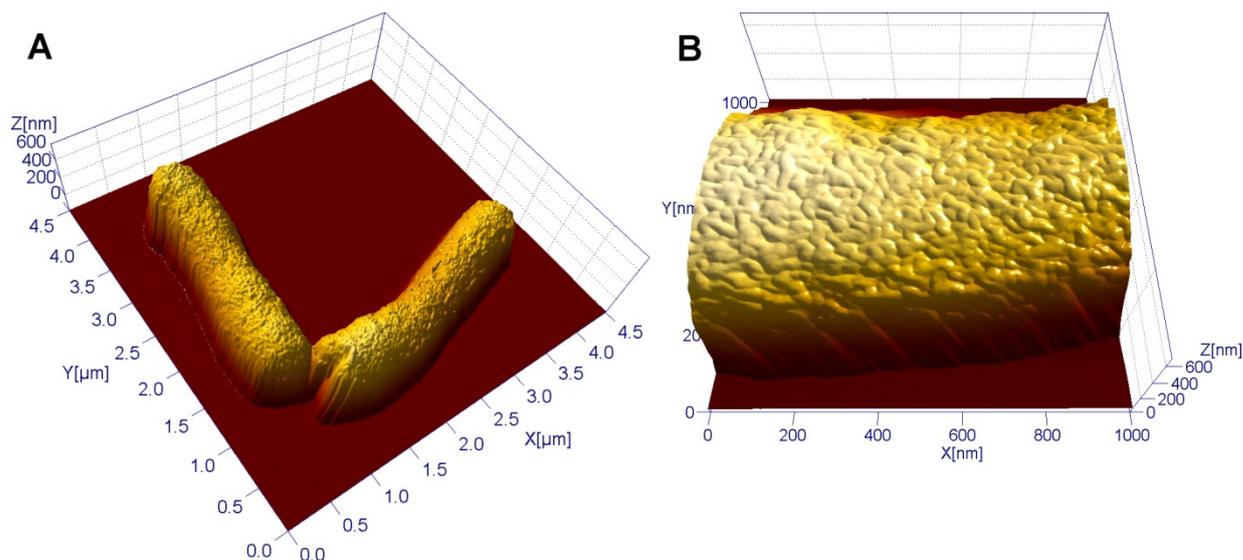


Abbildung 31: AFM Bilder des Wildtypstamms Rm2011, fixiert, schonend getrocknet und abgebildet bei Normaldruck in Luft. Die 3D-Darstellung der AFM-Höhenbilder zeigt die länglichen und faltigen Erhebungen auf der ganzen Oberfläche (A) ohne Zwischenräume eng beieinander (B, vergrößerte Abbildung der in A gezeigten Probe) [137].

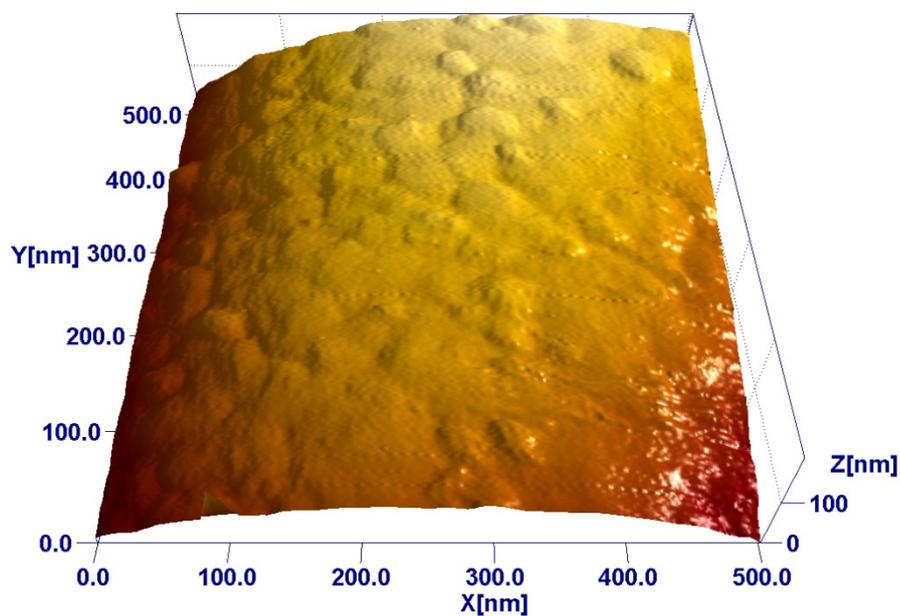


Abbildung 32: 3D-Darstellung von AFM-Höhenbildern des Wildtypstamms Rm2011 unter in Flüssigkeit. Fixiert und abgebildet in PBS Puffer. Auf der gesamten Bakterienoberfläche sind runde Erhebungen zu sehen (hochauflösende Abbildung) [137].

Um mögliche Ursachen auf molekularer Ebene für die natürlicherweise auf der Oberfläche von *S. meliloti* vorkommenden, hervorstehenden Strukturen zu finden, sind neben dem Wildtyp-Stamm auch zwei Mutanten mit Defiziten bei den am häufigsten vorkommenden Molekülen an der Oberfläche mit dem AFM ohne Fixierung in Flüssigkeit abgebildet worden. Dabei ist der eine Stamm (Rm0540, *exoY*, [113]) nicht mehr fähig langkettige Exopolysaccharide (Eps-I) zu produzieren, die beim Wildtyp-Stamm wahrscheinlich die Membran bedecken. In der Abbildung 34 ist ein 3D-Höhenbild (links) und ein Amplitudenbild (rechts) nach dem Scannen der lebenden Mutanten (Rm0540) in PBS gezeigt. Die rundlich hervortretenden Erhebungen auf der Oberfläche sind noch deutlicher ausgeprägt, als dies bereits beim Wildtyp-Stamm (Rm2011) in PBS der Fall war (vergl. Abbildung 32). Dies zeigt sich trotz des sehr ähnlichen Erscheinungsbildes der Strukturen mit einer axialen Höhe von $9,0 \pm 6,5$ nm ($M \pm SD$, $N = 54$) und einem lateralen Durchmesser von 45 ± 8 nm ($M \pm SD$, $N = 20$) in den Abmessungen der Erhebungen, die etwas größer ausfallen, als beim Wildtyp-Stamm.

Währenddessen ist der Einfluss der in der Membran verankerten Lipopolysaccharide (LPS) auf die bisher beschriebenen hervorstehenden Erhebungen auf der Oberfläche anhand der Mutante Rm6963 untersucht worden. Dieser *S. meliloti*-Stamm ist aufgrund einer Mutation nur noch in der Lage eine verkürzte Form des LPS-Moleküls zu bilden. Dabei ist das für die Verankerung in der Membran notwendige Lipid A intakt, wird aber gefolgt von einer verkürzten Kernregion des LPS-Moleküls, während das endständige für die Wirt-Gast-Interaktion bei der Symbiose wichtige O-Antigen wieder unverändert ist [135]. In der Abbildung 33 B ist ein 3D-Höhenbild nach dem Scannen der lebenden Mutanten (Rm6963) mit dem AFM in Kulturmedium (VMM) dargestellt. Dabei besitzen die rundlich hervortretenden Strukturen an der Oberfläche, die mit dem bloßen Auge kaum noch zu erkennen sind, nur noch eine Höhe von $1,6 \pm 0,6$ nm ($M \pm SD$, $N = 19$) und sind damit deutlich schwächer als beim Wildtyp-Stamm (Rm2011) unter gleichen Bedingungen ausgeprägt [137] (vergl. Abbildung 33 A und Abbildung 30 B).

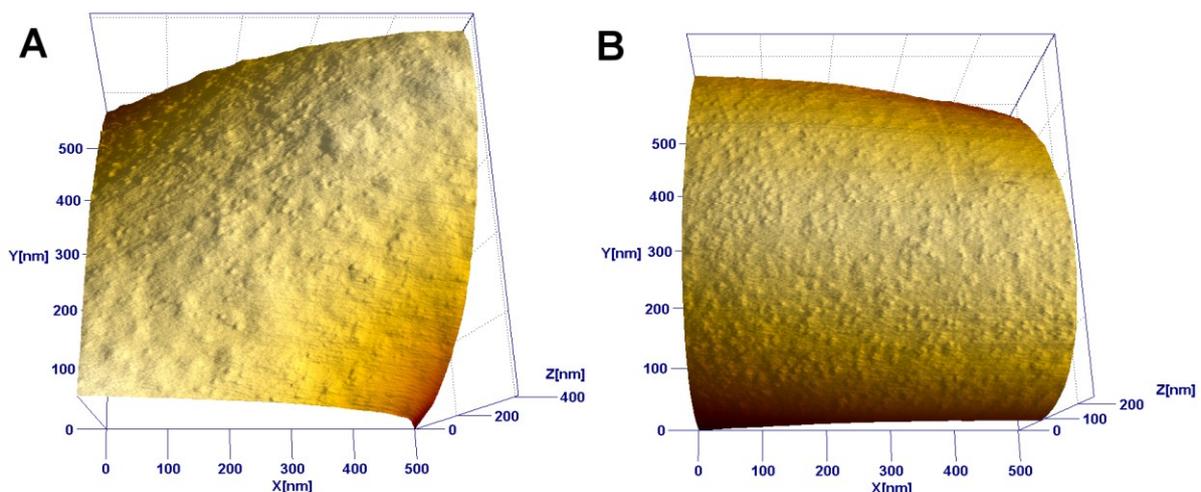


Abbildung 33: Hochaufgelöste AFM Abbildungen des Wildtypstamms Rm2011 (A, 3D-Höhenbild) und einer Mutante (Rm6963) mit fehlerhaften, verkürzten LPS (B, 3D-Höhenbild). Die lebenden Bakterien sind in Kulturmedium (VMM) abgebildet worden. Die sehr kleinen Erhebungen auf der

Oberfläche stellen vermutlich den extrazellulären Teil von einzelnen Proteinen (z.B. äußere Membranproteine, Omp) dar [137].

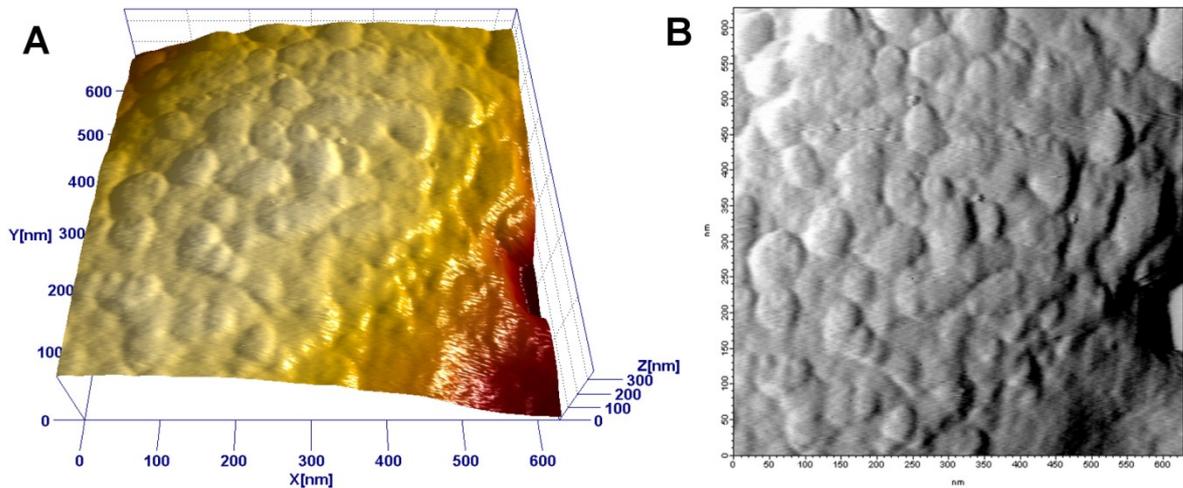


Abbildung 34: AFM 3D-Höhenbild (A) und Amplitudenbild (B) von einem hochaufgelösten Scan der lebenden *exoY* Mutante (Rm0540) in PBS Puffer. Da die rundlichen Erhebungen auf der Oberfläche stärker ausgeprägt sind als bei einem der anderen Bakterienstämme, ist es wahrscheinlich, daß diese Strukturen normalerweise von Exopolysacchariden bedeckt sind [137].

Bei der Interpretation, welchen Einfluss die Probenpräparation auf die Strukturen an der Oberfläche von *S. meliloti* hat, ist es zunächst einmal nennenswert, daß aus den Abbildungen des Wildtyp-Stamms mit dem AFM in Flüssigkeit und den daraus ermittelten Abmessungen der Erhebungen, die Fixierung der Bakterien mit Glutaraldehyd und Paraformaldehyd nicht zu einer deutlichen Veränderung der Strukturen führt (vergl. Abbildung 30 A und B). Während die Strukturen in Flüssigkeit eine rundliche Form besitzen, erscheinen die Erhebungen bei den dehydrierten Bakterien eher länglich. Dies ist bei allen hier eingesetzten Mikroskopie-Techniken der Fall (AFM in Trockenheit: s. Abbildung 29 C, Abbildung 31 A und B; XHR SEM: s. Abbildung 29 B; SEM: s. Abbildung 29 A). Dabei sind mehrere Ursachen für die Ausbildung dieser faltigen Strukturen möglich. Eine davon wäre die Faltung der etwa 20 nm dicken Bakterienhülle (für *E. coli* sind von Schwarz und Koch 19 bis 24 nm gemessen worden [138]) während der Trocknung. Da aber der geringste hier gemessene Durchmesser der faltigen Strukturen bei der Abbildung mit dem XHR SEM nur $18,4 \pm 4,3$ nm beträgt, kann somit eine Faltung der gesamten Bakterienhülle (innere Membran + periplasmatischer Raum mit einer Lage Peptidoglycan + äußere Membran) ausgeschlossen werden. Daher ist eine Faltung der äußeren Membran wahrscheinlich und würde auch zu den hier gemessenen Durchmessern der länglich hervortretenden Strukturen passen. So ist ebenfalls bei *E. coli* von Bayer und Remsen bereits zuvor eine Trennung der äußeren Membran von den anderen Lagen der Bakterienhülle nach Trocknung beschrieben worden [139]. Ebenso ist eine Trennung der verschiedenen Lagen als Reaktion auf osmotischen Stress möglich, um somit einen Raum für die Plasmolyse zu schaffen ohne die Bakterienhülle zu beschädigen [138]. Eine weitere mögliche Ursache wäre die

Ausbildung der länglich hervortretenden Strukturen in Trockenheit durch das Verschmelzen der hier in Flüssigkeit beobachteten rundlich hervortretenden Erhebungen. So könnte der mechanische Stress auf die Verbindungen zwischen den einzelnen Lagen der Bakterienhülle während des Austrocknungsprozesses so groß geworden sein, daß die ehemals rundlichen Strukturen zu den länglich, faltigen Erhebungen fusioniert sind. Diese Vermutung wird durch die Ähnlichkeit der gemessenen Durchmesser der runden Erhebungen (28 ± 6 nm ($M \pm SD$, $N = 40$), s. Abbildung 30 B und Abbildung 33 A) zu der Breite der länglichen Strukturen (26 ± 6 nm ($M \pm SD$, $N = 30$), s. Abbildung 29 C und Abbildung 31) unterstützt.

Beim Vergleich des SEM-Bildes in der Abbildung 29 A und dem XHR SEM-Bild in der Abbildung 29 B fällt auf, daß bei dem XHR SEM feinere Strukturen abgebildet worden sind. Hier ist die Breite der länglichen Strukturen etwa 11 nm kleiner, als dies in den SEM-Bildern der Fall ist. Dieser Unterschied ist sehr wahrscheinlich auf die Metallschicht zurückzuführen, die vor der Messung mit dem konventionellen Rasterelektronenmikroskop auf die Probe aufgebracht worden ist. Dabei können kleinere Strukturen von der Goldschicht verdeckt sein, die dann in den SEM-Bildern als breitere Erhebungen zu sehen sind. Insbesondere, wenn kleinere Strukturen sehr nahe beieinander liegen können diese in den Bildern dann nur als eine einzelne Erhebung erscheinen. Durch die Verwendung von Metallen, mit denen auch dünnere Schichten gleichmäßig aufgetragen werden können, z.B. Tantal oder Iridium, sollten aber auch mit einem konventionellen SEM feinere Strukturen aufgelöst werden können [137].

Da die Abbildung mit dem AFM in Kulturmedium (VMM) unter physiologischen Bedingungen an lebenden, nichtfixierten *S. meliloti*-Zellen durchgeführt worden sind, ist davon auszugehen, daß die beobachteten rundlich hervortretenden Strukturen natürlicherweise auf der Oberfläche der Bakterien vorhanden sind. Die möglichen Ursachen hierfür sollen im Folgenden diskutiert werden. Schon seit längerem ist bekannt, daß sich bei Gram-negativen Bakterien eine Vielzahl von Proteinen und Proteinkomplexen mit einem Durchmesser von 6 nm bis 10 nm zwischen der inneren und der äußeren Membran befinden [139]. Daher ist ein möglicher Ursprung für die rundlich, hervortretenden Strukturen, daß einige dieser Proteine von Innen gegen die elastische äußere Membran gedrückt werden. Dies würde auch die im Vergleich zu den runden Erhebungen größere Höhe der Strukturen bei den Bakterien in Trockenheit erklären, wo dann diese Partikel während der Austrocknung zum Teil von der schrumpfenden Membran weiter umschlossen werden könnten.

Allerdings ist auch die Entstehung von Vesikeln, die sich von der äußeren Membran abschnüren, bzw. Vorläufer davon, ein zuvor u.a. von Beveridge und Deatherage et al. untersuchter zellulärer Prozess [140,141], der die Entstehung der rundlichen Erhebungen verursacht haben könnte. Für das Bakterium *S. meliloti* ist die Ausbildung von Vesikeln ein aktuelles Thema in der Forschung, wobei besonders deren Induktion auf molekularer Ebene und die Rolle für die Symbiose und in der Kommunikation bisher nur in Ansätzen verstanden werden. Da aber vollständig ausgebildete Membranvesikel in der Regel einen Durchmesser zwischen 50 nm und 250 nm besitzen, könnte es sich bei den hier beschriebenen rundlichen Strukturen nur um Vorläufer davon handeln. Dabei kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, ob bei den hier abgebildeten Bakterien aufgrund mangelnder Stimulation keine vollständigen Vesikel gebildet worden sind, oder diese einfach nicht abgebildet worden sind, weil sie von der AFM-Spitze zur Seite geschoben worden sind. Nach der Untersuchung von Mutanten Gram-negativer Bakterien mit Defiziten bei

Proteinen im periplasmatischen Raum, die an der Entstehung von Vesikeln beteiligt sind, gehen Deatherage et al. davon aus, daß sich diese in Bereichen ausbilden, wo die Verbindung zwischen der äußeren Membran und dem Peptidoglycan aufgrund von Veränderungen, z.B. beim Wachstum der Zellen, geschwächt sind [141]. Sollte die Verbindung nur in sehr kleinen Bereichen geschwächt oder zerstört sein, ist es daher möglich, daß sich als Vorläufer hervorstehende Erhebungen an der Oberfläche bilden ohne daß daraus sich abschnürende Vesikel formieren. Dies würde auch die These stützen, daß die länglich, hervorstehenden Strukturen, die hier bei den getrockneten Zellen beobachtet worden sind, durch die Fusion der runden Erhebungen in Flüssigkeit entstanden sind, nachdem weitere Verbindungen zwischen äußerer Membran und Peptidoglycan durch den erhöhten Stress beim Austrocknen zerstört worden sind (s. Abbildung 29 und Abbildung 31). Dabei ist zu berücksichtigen, daß Vesikel hauptsächlich aus Lipiden der äußeren Membran bestehen, welche nicht durch Glutaraldehyd oder Paraformaldehyd quervernetzt und somit fixiert werden und daher in den AFM- und (XHR) SEM-Bildern in Trockenheit auch nicht als solche abgebildet werden würden. Eine Fixierung von Lipiden könnte z.B. mit Osmiumtetroxid (OsO_4) erreicht werden. Die bisher vorgeschlagenen möglichen Ursachen für die beobachteten Strukturen werden auch durch das Anschwellen, bzw. Schrumpfen der Membran in Abhängigkeit der Osmolarität mit einhergehend schwächer, bzw. stärker ausgeprägten rundlichen Erhebungen, wie es in der Abbildung 30 gut zu sehen ist, unterstützt.

Der Einfluss von langkettigen Exopolysacchariden (Eps-I) auf die hervorstehenden Strukturen auf der Oberfläche von *S. meliloti* ist mit einer Mutante (Rm0540, *exoY*) untersucht worden, die ebensolche nicht mehr produziert (s. Abbildung 34). Dabei gleichen die rundlichen Erhebungen auf der Oberfläche denen des Wildtyp-Stamms (Rm2011, vergl. Abbildung 32), besitzen ohne die langkettigen Exopolysaccharide jedoch etwa die doppelte Höhe ($9,0 \pm 6,5$ nm ($M \pm SD$, $N = 54$) zu $4,7 \pm 2,7$ nm ($M \pm SD$, $N = 30$)). Daher können die langkettigen Exopolysaccharide nicht die Ursache für die Oberflächenstrukturen sein, ihr Fehlen jedoch übt einen ähnlichen Einfluss auf die Höhe der Erhebungen aus, wie die Dehydrierung (Höhe der Strukturen in Trockenheit: $12,1 \pm 4,9$ nm ($M \pm SD$, $N = 47$), s. Abbildung 29 C und Abbildung 31). Sehr wahrscheinlich ist die Schicht aus den Exopolysacchariden an der Oberfläche des Wildtyp-Stamms bei der Abbildung in Trockenheit deutlich kompakter durch den Wasserverlust [137], während die Schicht in Flüssigkeit aufquillt und Wasser speichert, um im natürlichen Habitat von *S. meliloti*, dem Erdboden, die Bakterien vor Austrocknung zu schützen.

Mit einer weiteren Mutante (Rm6963), die im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Rm2011) von *S. meliloti* ein in der Kernregion (engl. „core“) verkürztes LPS produziert [135], ist der Einfluss der Lipopolysaccharide auf die Oberflächenstrukturen untersucht worden (s. Abbildung 33). Bei der Mutante sind die rundlichen Erhebungen, nach der Abbildung mit dem AFM in Kulturmedium (VMM), mit einer axialen Höhe von $1,6 \pm 0,6$ nm ($M \pm SD$, $N = 19$) weniger stark ausgeprägt, als bei dem Wildtyp-Stamm, wo die Strukturen eine Höhe von $4,0 \pm 1,9$ nm ($M \pm SD$, $N = 46$) besitzen. Dennoch ist die Höhe bei beiden Stämmen niedriger, als die Länge von 6 bis 45 nm, die in der Literatur für ganze LPS-Moleküle angegeben wird [140,142]. Dies ist nicht ungewöhnlich, da die sehr beweglichen äußeren Oligosaccharidketten des LPS in Flüssigkeit leicht von der AFM-Spitze zur Seite geschoben werden können, so daß bei der Abbildung mit dem AFM nur das Lipid A und die Kernregion (engl. „core“) des LPS detektiert werden können [140]. Die hier gemessene Höhe der Strukturen beim Wildtyp-Stamm (Rm2011) entspricht dabei der Länge des Lipid A

zusammen mit der Kernregion in einer intakten LPS-Schicht (isoliert aus *Pseudomonas aeruginosa*: 5 bis 6 nm [140]; auf der Oberfläche von *E. coli*: 4 nm [142]). Die um etwa 2 nm verringerte Höhe der rundlich hervorstehenden Erhebungen bei der Mutante Rm6963 mit einer gegenüber dem Wildtyp-Stamm (Rm2011) von *S. meliloti* verkürzten Kernregion des LPS [135] deutet darauf hin, daß es sich bei diesen Strukturen sehr wahrscheinlich um LPS-Flecken (engl. „LPS-patches“) handelt [137]. Solche LPS-Flecken, die jeweils aus mehreren hundert bis zu ein paar tausend LPS-Molekülen bestehen, bilden auch bei *E. coli* Erhebungen, die dicht gepackt auf der ganzen Zelloberfläche zu finden sind [142].

Neben den rundlichen Strukturen auf den *S. meliloti*-Zellen in Flüssigkeit, die zuletzt diskutiert worden sind, sind in der Abbildung 29 B auch bei dehydrierten Zellen des Wildtyp-Stamms (Rm2011) runde Strukturen zu sehen (einige mit roten Pfeilen markiert). Diese haben einen Durchmesser von 21 ± 4 nm ($M \pm SD$, $N = 7$). Da es sich um eine XHR SEM-Aufnahme handelt, bei der die Probe nicht mit Metall beschichtet worden ist, kann aufgrund der erhöhten Penetrationstiefe der Elektronen nicht eindeutig unterschieden werden, ob diese Strukturen auf oder direkt unter der Oberfläche liegen. Sollten sie unter der Oberfläche liegen, könnte es sich dabei um Ribosomen handeln, die sich mit einem Durchmesser von etwa 20 nm gehäuft direkt unter der inneren Membran befinden [143,144]. Dafür spricht auch, daß bei den AFM-Aufnahmen des Wildtyp-Stamms (Rm2011) in Trockenheit keine solchen Strukturen auf der Oberfläche beobachtet worden sind (s. Abbildung 29 C und Abbildung 31).

Letztlich fallen beim Betrachten der hochaufgelösten AFM-Scans der lebenden *S. meliloti*-Bakterien in Kulturmedium (VMM) in der Abbildung 33 noch weitere, bisher nicht diskutierte Strukturen auf der Oberfläche auf. Diese kleineren rundlichen Erhebungen besitzen für den Wildtyp-Stamm (Rm2011, s. Abbildung 33 A) eine Höhe von $2,0 \pm 0,6$ nm und einen Durchmesser von 12 ± 3 nm ($M \pm SD$, $N = 20$). Bei der Mutante Rm6963 (s. Abbildung 33 B) sind diese kleinen Strukturen bei einem Durchmesser von 14 ± 4 nm $1,3 \pm 0,5$ nm ($M \pm SD$, $N = 40$) hoch. Unter Berücksichtigung der Faltung der Oberflächenstruktur mit der Geometrie der AFM-Spitze, die hier die Breite der Strukturen beeinflusst, handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um Proteine, die an und in der äußeren Membran gebunden sind und diese zum Teil überragen [137]. Viele dieser äußeren Membranproteine bei Gram-negativen Bakterien (Omp, engl. „outer membrane protein“), die oft auch Poren für den Transport durch die Membran bilden, basieren auf der Struktur des β -Fass (engl. „ β -barrel“) mit einem Durchmesser von 1,4 bis 4 nm [145]. So ragt z.B. der extrazelluläre Teil von OmpF $1,1 \pm 0,2$ nm über die äußere Membran hinaus [146]. Dies entspricht in guter Näherung den hier beobachteten kleinen rundlichen Erhebungen auf der Membran von *S. meliloti* (s. Abbildung 33).

Neben der Diskussion der Oberflächenstrukturen sollten auch noch zwei methodische Aspekte erwähnt werden, die diese Untersuchung und insbesondere den Vergleich der AFM-Abbildungen mit hoher Auflösung in Flüssigkeit mit den (XHR) SEM und AFM-Scans in Trockenheit erst ermöglicht haben. Zum einen sind früher in Flüssigkeit wegen der niedrigeren Federkonstante vor allem Cantilever aus Siliziumnitrid verwendet worden. Bei diesen sind das Aspektverhältnis und der Spitzenradius allerdings nicht so günstig, wie für Cantilever mit einer Silizium-Spitze, welche in der Regel für die Abbildung in Trockenheit eingesetzt werden. Daher sind hier bei den

Messungen in Flüssigkeit, zur besseren Vergleichbarkeit und zum Erreichen einer höheren Auflösung, Hybrid-Cantilever genutzt worden. Bei diesen ist der Hebelarm aus Siliziumnitrid, während sich daran eine Spitze aus Silizium befindet, welche ein hohes Aspektverhältnis besitzt und deren Spitzengeometrie und Spitzenradius überdies den Cantilevern ähnelt, die für die Abbildungen in Luft verwendet worden sind. Daher kommt es gerade bei Messungen der Bakterien, die mit einer Höhe von 400 bis 500 nm hohe und steile Flanken aufweisen zu weniger Kontakten mit den Seiten der Spitze und damit auch zu weniger Abbildungsartefakten [147].

Desweiteren stellt die einfach durchzuführende Beschichtung mit Polyethylenimin (PEI) eine kostengünstige Alternative zu der Funktionalisierung der Deckgläser mit Polylysin dar. Beide positiv geladenen Polymere führen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der überwiegend negativ geladenen Bakterienoberfläche zu einer optimalen Immobilisierung der Zellen. Dadurch wird das Abbilden mit dem AFM in Flüssigkeit mit hoher Auflösung ohne ein Verrutschen der Probe ermöglicht. Darüber hinaus belegen die durchgeführten Langzeitbeobachtungen von *S. meliloti*-Zellen, die mit PEI in einem Mikrofluidikkanal immobilisiert worden sind, und im nächsten Kapitel dargestellt und diskutiert werden (s. 5.9 TLFi), daß dabei eine hohe Viabilität der Zellen, mit Verdopplungszeiten ähnlich zu denen in konventionellen Schüttelkulturen, erhalten bleibt [82,148].

5.9 TLFi ZUR BESTIMMUNG VON ZEIT- UND ORTSAUFGELÖSTER PROTEINDYNAMIK

Für die Langzeitbeobachtung von Zellen in einem Mikrofluidik-Chip ist es eine Grundvoraussetzung, daß die Viabilität der Zellen auf dem Chip erhalten bleibt. Dies gilt insbesondere, wenn wie hier geschehen Proteine in Abhängigkeit vom jeweiligen Zeitpunkt im Zellzyklus untersucht werden sollen. Die Viabilität der Zellen ist von vielen Faktoren abhängig. Besonders stark wirken sich hier die Temperatur, das Nährstoffangebot im Medium und bei aeroben Bakterien, die Sauerstoffversorgung aus. Eine optimale Sauerstoffversorgung der Bakterien in dem Mikrofluidik-Chip wird durch die hohe Gaspermeabilität des verwendeten Polymers PDMS, die geringe Zahl der Zellen im Kanal und das große Oberflächen- zu Flüssigkeitsvolumen-Verhältnis gewährleistet. Durch einen geringen Füllhöhenunterschied in den beiden Reservoirs des linearen Kanals ($\Delta V \approx 1 \mu\text{L}$) entsteht zudem ein langsamer Fluss des Kulturmediums, so daß die Bakterien ständig mit frischem Medium umspült werden und somit auch das Nährstoffangebot für das Wachstum der Zellen mehr als ausreichend ist. Da für die Langzeitbeobachtungen das ganze Labor bis zu einer Raumtemperatur von $\approx 28^\circ\text{C}$ aufgeheizt worden ist, ist zudem mit einer Infrarotkamera (ThermaCAM E320, FLIR Systems) überprüft worden, daß die Temperatur von dem Mikrofluidik-Chip, in welchem die Bakterienzellen beim wachen beobachtet worden sind, auch der Raumtemperatur entspricht [82]. Daß die Umgebungsbedingungen während der Messungen nahezu optimal für ein reguläres Wachstum der *S. meliloti* Zellen sind, zeigt sich in besonderem Maße durch die Verdopplungszeit der Bakterien, die für die beobachteten Teilungen bei etwa drei Stunden liegt und damit der Verdopplungszeit des Wildtyps in Flüssigkulturen bei optimaler Temperatur entsprechen [149].

Auch die Morphologie der im Mikrofluidik-Chip kultivierten Zellen entspricht der des Wildtyps bei Kultivierung in konventionellen Flüssigkulturen.

Für die ersten Langzeitbeobachtungen von immobilisierten *S. meliloti*-Zellen in einem Mikrofluidik-Chip (s. 4.5.3) sind die Proteine GcrA und DivK ausgewählt worden. Zu diesen Proteinen sind homologe Proteine in dem eng verwandten Bakterium *Caulobacter crescentus* bereits untersucht und ihre Beteiligung an der Regulierung des Zellzyklus gezeigt worden [150,151]. *C. crescentus* gilt als Modelorganismus für die Untersuchung der Zellzyklusregulierung in gramnegativen Bakterien. Zur Erstellung der *S. meliloti*-Mutanten sind die Wildtyp-Gene durch C-terminale Fusionsproteine von eGFP an GcrA oder an DivK (und von mCherry an GcrA) ersetzt worden. Daraus resultieren Mutanten mit jeweils nur einer einzelnen Kopie von *gcrA-eGFP* (oder *gcrA-mCherry*) und *divK-eGFP* an dem nativen Ursprungsort im Genom. Somit erfolgt die Expression dieser Gene unter der Regulation durch ihre natürlichen Promotoren. Für GcrA ist bereits gezeigt worden, daß dieses Protein ein wichtiger Masterregulator für den Verlauf des Zellzyklus in *C. crescentus* ist [150]. Dies lässt für das orthologe Gen in *S. meliloti* eine ähnlich wichtige Rolle vermuten. Für das *divK*-Gen in *S. meliloti* ist der Zeitpunkt im Zellzyklus, wie die Stärke der Expression kritisch für den Verlauf des Zellzyklus, da zumindest die Überexpression dieses Gens zu einer Inhibition der Zellteilung führt [152]. Die Funktionsfähigkeit der fluoreszierenden Fusionsproteine in den hier untersuchten *S. meliloti*-Mutanten zeigt sich somit in deren Lebensfähigkeit, wie der Verdopplungszeit und der Morphologie, die dem Wildtyp entsprechen [82].

Für die Auswertung der aufgenommenen Bildserien stellt das Signal-Rausch-Verhältnis, gerade bei niedrigen Fluoreszenzintensitäten, einen kritischen Wert dar. Bei den hier beobachteten fluoreszierenden Proteinen verändert sich die Konzentration und somit auch die Intensität mit der Zeit, so daß sich für das GcrA-eGFP ein maximaler Wert von $S/N = 27,8$ und ein minimaler Wert von $S/N = 9,6$ ergibt, während für das DivK-eGFP das Signal-Rausch-Verhältnis zwischen $S/N = 36,8$ und $S/N = 22,1$ liegt. Damit ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen Fluoreszenzsignal und Hintergrundrauschen auch bei niedrigen Intensitäten erreicht, wobei von einem hinreichenden Wert von $S/N = 3$ ausgegangen wird.

Für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (TLFI) sind die Hellfeld- und Fluoreszenzbilder über einen Zeitraum aufgenommen worden, in dem sich bei den beobachteten Bakterien mindestens zweimal geteilt haben. Für den Bakterienstamm, der das Fusionsprotein GcrA-eGFP exprimiert, ist ein typischer Satz dieser Bilder von einer Zelle, die zwei Teilungen durchläuft, über einen Zeitraum von 290 min in Abbildung 35 gezeigt. Dabei wird schon bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder deutlich, daß die Fluoreszenzintensität und damit auch die Konzentration des GcrA-eGFP gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt ist und in Abhängigkeit vom Zellzyklus oszilliert.

Die quantitative Auswertung dieser oszillierenden GcrA-eGFP Proteinkonzentration über die Fluoreszenzintensität ist in Abbildung 36 für einen Zellzyklus von *S. meliloti* dargestellt. Dabei erreicht die Fluoreszenzintensität etwa 50 min nach der Zellteilung mit dem 0,7 fachen der Intensität zum Zeitpunkt Null ein Minimum. Anschließend steigt die GcrA-eGFP Konzentration bis auf das 1,4 fache bei etwa 100 min und erreicht damit ein Maximum, bevor die Konzentration etwa 50 min später wieder langsam absinkt.

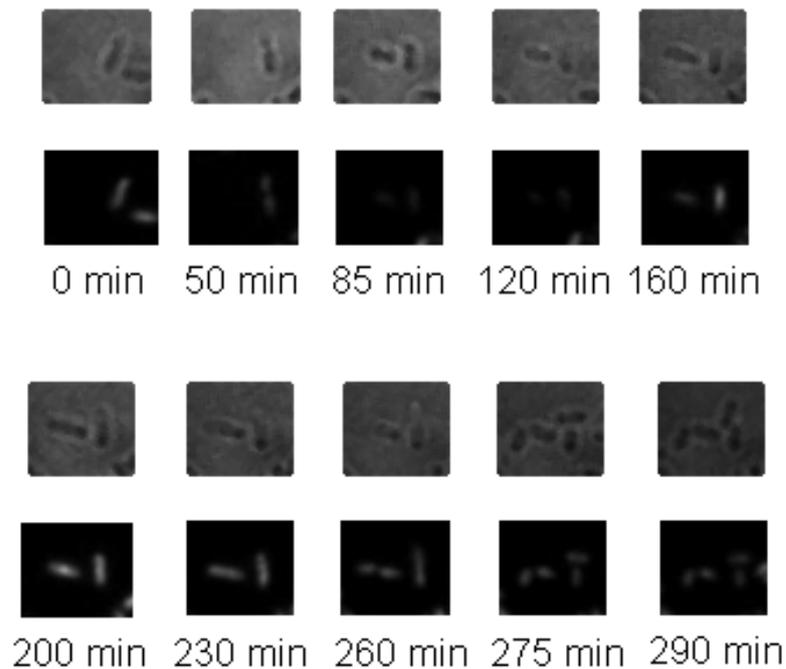


Abbildung 35: Zeitreihe mit zusammengehörigen Hellfeld- (obere Reihe) und Fluoreszenzaufnahmen (untere Reihe) von *S. meliloti* Bakterienzellen mit dem Fusionsprotein GcrA-eGFP (RT = $27,6 \pm 0,4$ °C). In dem Beobachtungszeitraum teilt sich die Zelle zweimal und eine Oszillation der Fluoreszenzintensität ist deutlich sichtbar.

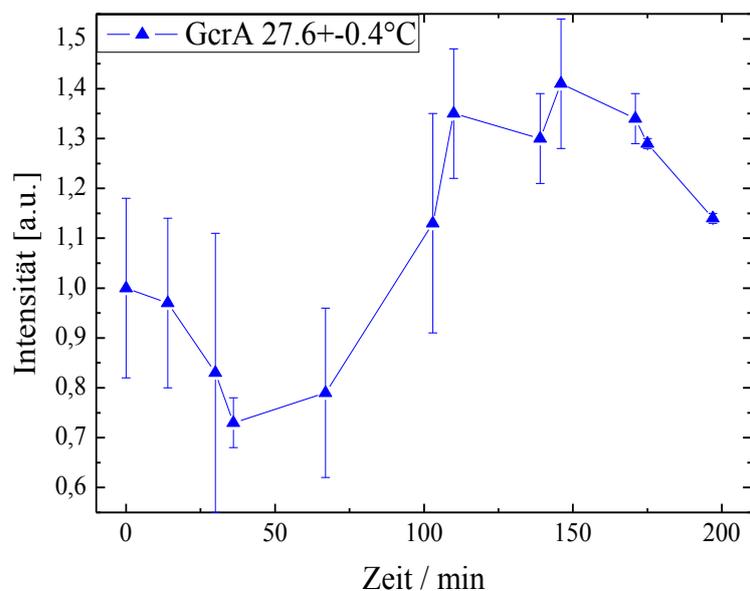


Abbildung 36: Zeitaufgelöste Proteindynamik von GcrA-eGFP innerhalb eines Zellzyklus von *S. meliloti* (Rm2011) ($n = 4$ vollständige Zellzyklen). Normalisierte Fluoreszenzintensität (der jeweils mittleren Fluoreszenzintensität von einer ganzen Zelle) von einem *in silico* synchronisierten

Ensemble von *S. meliloti* Zellen. Der Zeitpunkt null entspricht dem ersten, jeweils nach einer Zellteilung aufgenommenen Mikroskopie-Bild. Zur besseren Vergleichbarkeit sind alle Intensitäten zum Zeitpunkt null auf eins normiert worden [82].

Im Gegensatz zu dem GcrA-eGFP ist die Konzentration von dem DivK-eGFP bei *S. meliloti* nicht gleichmäßig verteilt, sondern tritt abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt innerhalb des Zellzyklus vermehrt in bestimmten Regionen innerhalb der Bakterienzelle auf. Diese Lokalisierung und besonders deren Veränderung mit der Zeit sind aufgrund der geringen Größe der Zellen grundsätzlich nur schwer zu detektieren und zu charakterisieren. Daher sind auch von dem DivK-eGFP exprimierenden Bakterienstamm TLF1 Hellfeld- und Fluoreszenzbilder über einen Zeitraum aufgenommen worden, in dem sich bei den beobachteten Bakterien zweimal geteilt haben sollten. Ein typischer Satz dieser Bilder von einer Zelle, die zwei Teilungen durchläuft, über einen Zeitraum von 350 min ist in Abbildung 37 gezeigt. Beim Betrachten der Fluoreszenzbilder fällt auf, daß zu bestimmten Zeitpunkten innerhalb des Zellzyklus hellere Punkte an einer der Polregionen der Bakterien sichtbar sind. Für eine genauere Charakterisierung dieser lokal erhöhten Konzentration des Proteins DivK-eGFP innerhalb der Zellen, sind diese jeweils in vier gleichgroße Sektionen unterteilt worden (s. Abbildung 38 links). Dabei entspricht die Sektion 1 der alten, bereits vorhandenen und die Sektion 4 der neuen, nach der Teilung entstandenen Polregion.

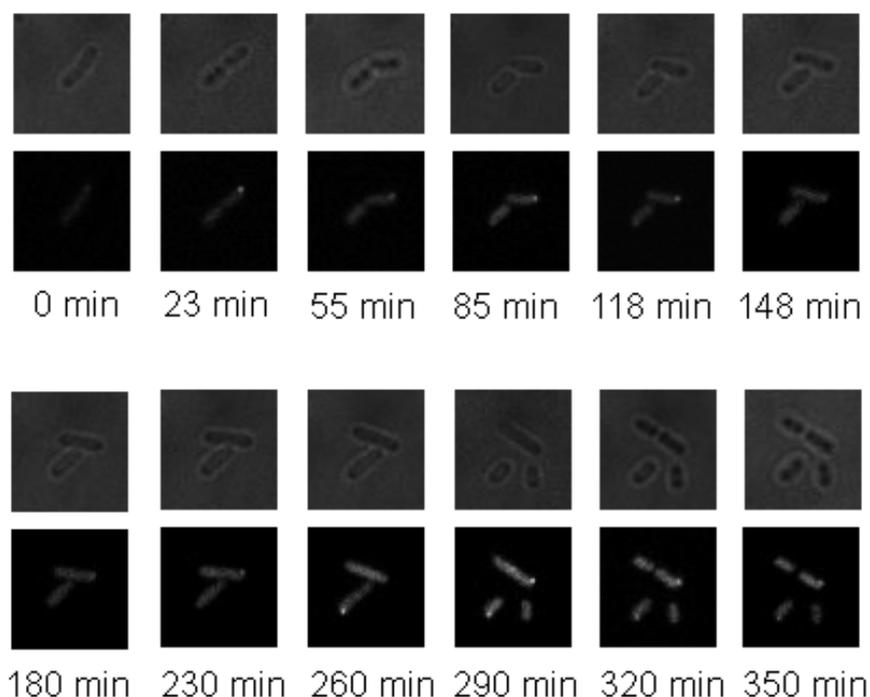


Abbildung 37: Zeitreihe mit zusammengehörigen Hellfeld- (obere Reihe) und Fluoreszenzaufnahmen (untere Reihe) von *S. meliloti* Bakterienzellen mit dem Fusionsprotein DivK-EGFP (RT = $28,2 \pm 0,3$ °C). In dem Beobachtungszeitraum teilt sich die Zelle zweimal und die asymmetrische Lokalisierung von DivK ist z.B. bei 23 und bei 290 min deutlich sichtbar.

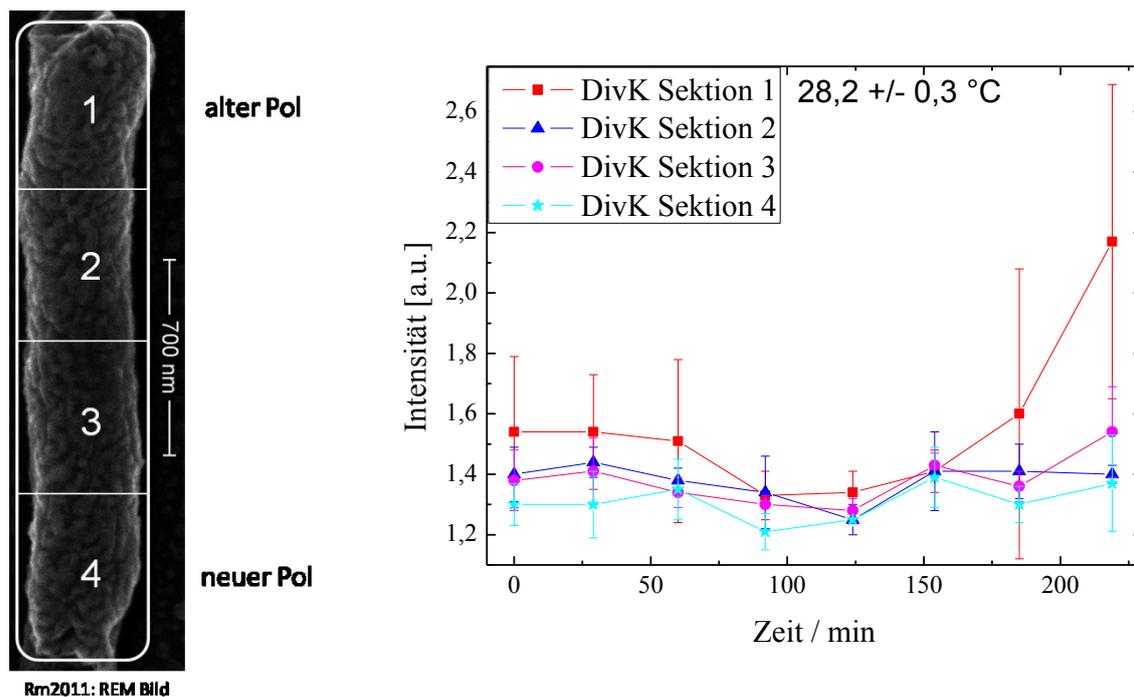


Abbildung 38: Proteinlokalisierungs-Analyse durch Zellsektionierung. Links: Auf dem REM-Bild einer *S. meliloti* Zelle sind schematisch die vier Sektionen gezeigt, in die alle beobachteten Zellen, die mindestens zwei Zellteilungen durchlaufen haben (= vollständiger Zyklus), eingeteilt worden sind. Rechts: Zeit- und Ortsaufgelöste Proteindynamik von DivK-eGFP innerhalb des Zellzyklus von *S. meliloti* (Rm2011) ($n = 2$ vollständige Zellzyklen mit jeweils den Bildern vor und nach einem Zellzyklus sind durchschnittlich vier Bilder pro Datenpunkt verwendet worden). Für jede Sektion ist jeweils die höchste gemessene Intensität in dieser Sektion dividiert durch mittlere Fluoreszenzintensität aus der gesamten Zelle aufgetragen. Der Zeitpunkt null entspricht dem ersten, jeweils nach einer Zellteilung aufgenommenen Mikroskopie-Bild [82].

In der Abbildung 39 ist die Proteindynamik von DivK und GcrA während des Zellzyklus von *S. meliloti* zusammengefasst. Dabei sind die bereits in der Abbildung 36 und der Abbildung 38 zugrundeliegenden Messdaten zur Veranschaulichung des oszillierenden, antizyklischen Verhaltens der beiden Proteine auf drei Zellzyklen extrapoliert worden. Für das DivK ist dabei nur die Sektion 1 (alter Pol, vergl. Abbildung 38) gezeigt, da auch nur in dieser Polregion eine eindeutige Lokalisierung beobachtet werden konnte. Für eine bessere Vergleichbarkeit des Verhaltens der beiden Proteine sind zudem die Intensitäten zum Zeitpunkt null auf eins normiert worden. In dieser Darstellung ist das nahezu identische Verhalten dieser, für die Zellzyklusregulation wichtigen Proteine, beim Bakterium *S. meliloti*, wie beim eng verwandten Bakterium *Caulobacter crescentus* sehr gut zu erkennen. Für *C. crescentus* bei dem homologe Proteine existieren, konnten Li et al. [153] durch Simulationen das antizyklische und oszillierende Verhalten dieser beiden Proteine basierend auf den experimentellen Daten von Biondi et al. [154] theoretisch vorhersagen.

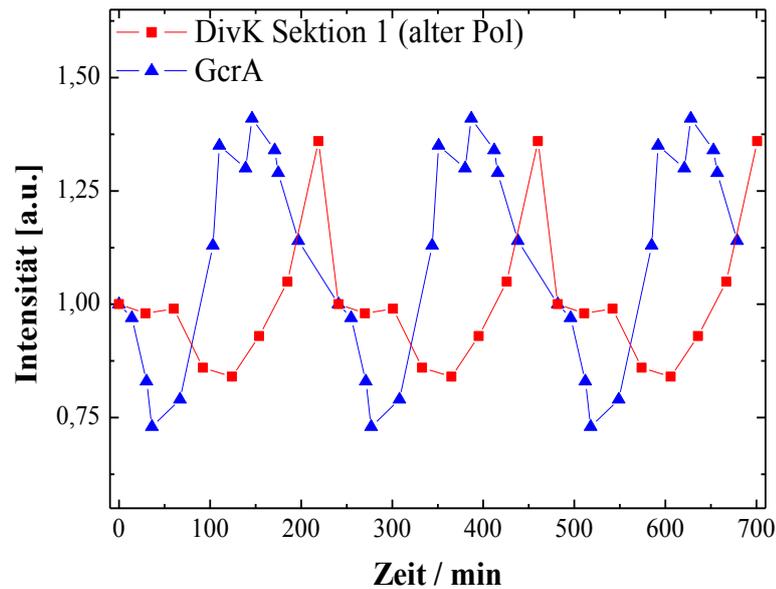


Abbildung 39: Zeitaufgelöste Proteindynamik von GcrA-eGFP (s. Abbildung 36) und Proteinlokalisierung von DivK-eGFP an der alten Polregion (s. Abbildung 38) innerhalb von drei extrapolierten Zellzyklen von *S. meliloti* (Rm2011). Die Einteilung der Zellen in Sektionen ist in Abbildung 38 gezeigt. Normalisierte Fluoreszenzintensität von einem *in silico* synchronisierten Ensemble von *S. meliloti* Zellen. Der Zeitpunkt null entspricht dem ersten, jeweils nach einer Zellteilung aufgenommenen Mikroskopie-Bild. Zur besseren Vergleichbarkeit sind alle Intensitäten zum Zeitpunkt null auf eins normiert worden. Das oszillierende, antizyklische Verhalten der beiden Proteine in *S. meliloti* verhält sich nahezu identisch zu der simulierten, theoretischen Vorhersage von Li et al. [153] für das nahe verwandte Bakterium *Caulobacter crescentus* basierend auf den experimentellen Daten von Biondi et al. [154].

Bereits in Abbildung 37 ist sichtbar, daß die lokalisierte Fluoreszenzintensität und damit die Konzentration des DivK-Proteins nach der Teilung einer Zelle asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt worden ist. Daher ist für eine detailliertere Analyse die Entwicklung der Fluoreszenzintensität des DivK-eGFP über die Zeit in Abbildung 40 für jede der vier Sektionen (s. Abbildung 38) von einzelnen Tochterzellen aufgetragen, welche von der gleichen Mutterzelle abstammen.

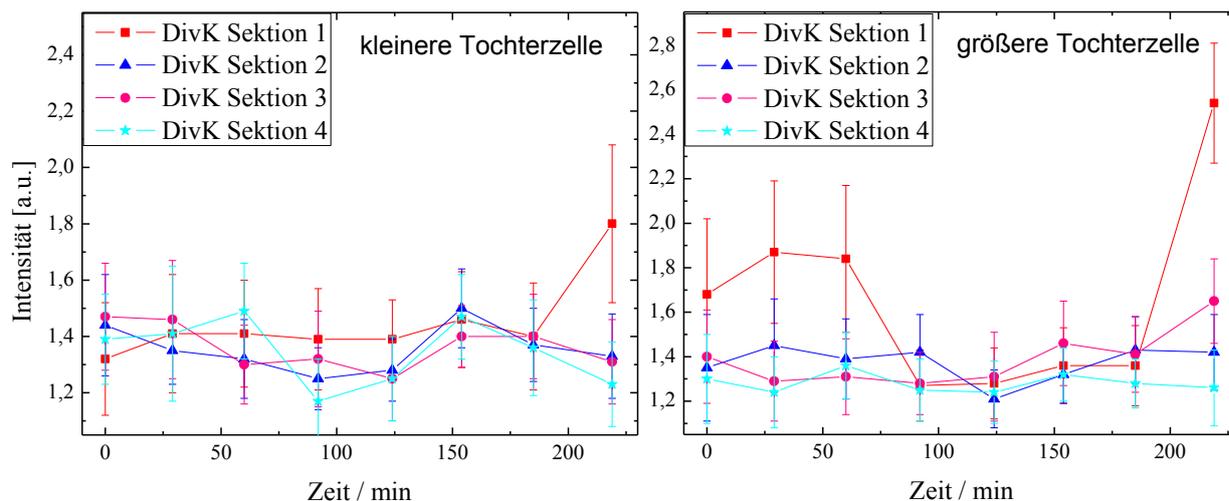


Abbildung 40: Asymmetrische Zeit- und Ortsaufgelöste Proteindynamik von DivK-eGFP innerhalb des Zellzyklus einzelner Tochterzellen, die von der gleichen *S. meliloti*-Mutterzelle (Rm2011) abstammen. Die Einteilung der Zellen in Sektionen ist in Abbildung 38 gezeigt. Für jede Sektion ist jeweils die höchste gemessene Intensität in dieser Sektion dividiert durch mittlere Fluoreszenzintensität aus der gesamten Zelle aufgetragen. Der Zeitpunkt null entspricht dem ersten, jeweils nach einer Zellteilung aufgenommenen Mikroskopie-Bild (Fehlerbalken = Standardabweichung der Fluoreszenzintensität) [82].

Aus der Auftragung in Abbildung 40 ist deutlich zu erkennen, daß das DivK-Protein direkt nach der Zellteilung asymmetrisch in die daraus entstandenen Tochterzellen verteilt worden ist. Anhand der Fluoreszenzintensität lässt sich die unterschiedliche Verteilung und Lokalisierung des DivK in der kleineren und der größeren Tochterzelle beschreiben. Dabei behält anfangs die größere Tochterzelle eine höhere Konzentration an DivK-eGFP lokalisiert an dem Pol gegenüber dem nach der vorherigen Zellteilung neu entstandenen Pol. In dieser Zelle wird mit fortschreitendem Zellwachstum die Lokalisierung des DivK an dem Pol wieder aufgelöst bis die Verteilung in der Zelle gleichmäßig ist. Dies ist sowohl in der Abbildung 37 anhand der gleichmäßig verteilten Fluoreszenzintensität, wie auch in der Abbildung 40 anhand der fast identischen maximalen Fluoreszenzintensität in jeder der vier Sektionen nach etwa 100 min zu beobachten. Anschließend akkumuliert sich das DivK-Protein in dieser Zelle kurz vor der nächsten Zellteilung wieder an dem gleichen Pol (Sektion 1 = alter Pol, s. Abbildung 40 rechts). Im Gegensatz dazu ist das DivK in der kleineren Tochterzelle über fast den ganzen Zellzyklus gleichmäßig in der Zelle verteilt, bis sich dessen Konzentration kurz vor der folgenden Zellteilung an der alten Polregion (Sektion 1, s. Abbildung 40 links) ebenfalls deutlich auf etwa das Doppelte erhöht. In der Abbildung 37 lässt sich überdies beobachten, daß sich die kleinere Tochterzelle etwas schneller erneut teilt als die größere. Dies hätte man bei dem Bakterium *S. meliloti* eher umgekehrt erwartet [152]. Die nach der zweiten Zellteilung entstandenen Tochterzellen zeigen dann aber wieder eine vergleichbare asymmetrische Verteilung des DivK-Proteins, mit der Lokalisierung an der alten Polregion in der größeren und einer gleichmäßigen Verteilung innerhalb der kleineren Tochterzelle.

Die TLF-Chips mit dem Obermaterial aus PDMS, die zur Zellimmobilisierung verwendet worden sind (s. 4.5.3.1), bieten einige Vorteile, gerade für die Langzeitbeobachtung von Bakterienzellen. Zum einen ergibt sich aus dem einfachen Aufbau unter Verwendung eines linearen Kanals eine gut kontrollierbare Flüssigkeitsumgebung, die es erlaubt, die Zellen kontinuierlich mit Kulturmedium zu umströmen, wodurch sich eine sehr gute Nährstoffversorgung sichergestellt wird, die sich in der Viabilität der Bakterien zeigt. Zudem wird durch die geringe Kanalhöhe (3 μm) ein mögliches Übereinanderliegen der Zellen verhindert und gleichzeitig ein möglichst vollständiges Umspülen mit Medium sichergestellt. Außerdem führt dies zu einem reduzierten Fluoreszenzhintergrund im sichtbaren Bereich, da nur ein äußerst geringes Volumen an Kulturmedium mit Eigenfluoreszenz zur Signalintensität beiträgt. Daß die Viabilität der Zellen nicht negativ beeinflusst wird, zeigt sich eindeutig in der Verdopplungszeit der Zellen und begründet sich nicht zuletzt auch in der hohen Biokompatibilität und Gaspermeabilität des verwendeten Polymers PDMS. Somit wird auch eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen sichergestellt. Die Gaspermeabilität ist bereits von Singh et al. untersucht worden und beträgt $245 \times 10^{-10} \text{ cm}^3(\text{STP}) \text{ cm}/\text{cm}^2 \text{ s cmHg}$ [155]. Ein weiterer Vorteil dieser TLF-Chips und grundsätzlich dieser Form der Miniaturisierung unter Verwendung der Softlithographie ist die sehr gute Flusskontrolle innerhalb des Mikrokanals, durch welche das gezielte und reproduzierbare Auftragen des PEI Konzentrationsgradienten (s. 4.5.3.1) als Beschichtung für die Zellimmobilisierung überhaupt erst möglich wird. Dies ist für die Langzeitbeobachtungen eine wichtige Voraussetzung, da sich somit auch ein Gradient der immobilisierten Zellen ergibt, sich also die Zelldichte ortsabhängig im Kanal unterscheidet. Dadurch kann im Kanal für die TLF-Bilder eine Region ausgewählt werden, in der sich zum einen nur so viele Zellen befinden, daß diese auch nach mindestens zwei Zellteilungen noch eindeutig voneinander unterscheidbar sind, und andererseits genügend Zellen vorhanden sind, um an mehreren Einzelzellen mindestens zwei Zellteilungen beobachtet werden können. Dies wird in Einzelfällen erschwert, bzw. unmöglich wenn z.B. eine Tochterzelle nach der Teilung nicht durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Bakterienmembran und der Polyethylenimin-Beschichtung der Oberfläche immobilisiert wird.

In der Abbildung 38 in dem REM-Bild auf der linken Seite sind die vier Sektionen, in die jede Zelle für die Proteinlokalisierungsanalyse eingeteilt worden ist, gezeigt. Dabei fällt auch auf, daß der Durchmesser einer *S. meliloti*-Zelle etwa 400 nm beträgt, während die typische Länge in etwa von 1,5 – 3 μm variiert. Eine Unterteilung dieser kleinen Bakterienzellen in mehr und damit gleichzeitig kleinere Sektionen ergibt dabei nur wenig Sinn, da nach dem Rayleigh-Kriterium die mögliche Auflösung bei der klassischen optischen Mikroskopie bei etwa der Hälfte der detektierten Emissionswellenlänge limitiert ist. Für die Detektion des Fluoreszenzproteins eGFP liegt diese Emissionswellenlänge um 530 nm [156]. Damit ergibt sich unter Berücksichtigung der numerischen Apertur von 1,3 des verwendeten Objektivs ein minimaler Abstand von 200 nm, der für zwei Objekte notwendig ist, damit diese theoretisch noch voneinander unterschieden werden können. Die Anzahl der Zellsektionen (vier) ist entsprechend gewählt worden, so daß diese eine minimale Kantenlänge von 300 nm direkt im Anschluss an eine, und bis zu 800 nm kurz vor einer Zellteilung, besitzen. Trotz der limitierten Auflösung ist mit einem Pixel der verwendeten CCD-Kamera entsprechend einer Kantenlänge von 67 nm eine überhöhte Abtastung (engl. oversampling) bei der Detektion verwendet worden, um die Bildauswertung durch eine größere Variationsmöglichkeit bei der Einteilung in die Sektionen zu erleichtern.

Die doch recht großen Fehlerbalken in der Abbildung 36 und der Abbildung 38 lassen sich nicht auf das mehr als ausreichende Signal-Rausch-Verhältnis (s. Anfang von Kapitel 5.9) der TLFI-Aufnahmen zurückführen. Viel wahrscheinlicher sind die Fehlerbalken durch Unterschiede von Zelle zu Zelle so groß geworden. Diese bekannte Einzelzellheterogenität [157,158] entsteht selbst bei genetisch identischen Zellen aufgrund unterschiedlicher Expressionsniveaus von Proteinen, die z.B. durch schon geringfügige Variationen in der Nährstoffversorgung von Zelle zu Zelle, was wiederum zu unterschiedlichem Zellwachstum und veränderter Genexpression führt, verursacht werden kann. Zudem ist gerade bei der Untersuchung von alpha-Proteobakterien, zu denen auch das *S. meliloti* gehört, aufgrund der asymmetrischen Zellteilung, die auch in Abbildung 40 anhand zweier Einzelzellen adressiert worden ist, eine erhöhte Heterogenität zu erwarten. Für eine detailliertere Auswertung der Proteinlokalisierung wäre demnach auch bei den der Abbildung 36 und der Abbildung 38 zugrundeliegenden Zellen eine Unterteilung in zwei verschiedene Arten von Tochterzellen vorzuziehen. Dies ergibt aber erst bei einer größeren Anzahl an beobachteten Zellen Sinn. Letztlich kann auch eine Steigerung der Heterogenität aufgrund der Schädigung von Zellen durch das für die Anregung des eGFP verwendeten eingestrahlten Lichts (ca. 475 nm) nicht ausgeschlossen werden. Allerdings sind vor den Langzeitbeobachtungen der Zellen die Belichtungszeit und die Lichtintensität optimiert worden, so daß diese anschließend zwar konstant, aber dennoch so kurz und niedrig wie möglich verwendet worden sind, um gerade eine solche Schädigung zu vermeiden. Auch, die Verdopplungszeiten der Zellen in den TLF-Chips, die denen in einer konventionellen Zellkultur (Anzucht im Brutschrank in Schüttelkolben) entsprechen, sind ein Beleg dafür, daß keine Schädigung der Zellen durch das Anregungslicht stattgefunden hat.

Die hier untersuchte Dynamik und Lokalisierung der Proteine GcrA und DivK, die an der Zellzykluskontrolle von *S. meliloti* beteiligt sind, kann mit der von homologen Proteinen in dem Bakterium *C. crescentus* verglichen werden. *C. crescentus*, in dem diese Proteine bereits sehr ausführlich untersucht worden sind, gehört ebenfalls zu den alpha-Proteobakterien und gilt als Modellorganismus für Studien des bakteriellen Zellzyklus [159,160]. Die alpha-Proteobakterien teilen sich grundsätzlich asymmetrisch, wobei zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen, die sich jedoch in ihrer Morphologie unterscheiden. In dem Bakterium *C. crescentus* ist die größere Zelle, die sogenannte „stalked“ (engl. für gestielt) Zelle, befähigt, direkt in die prokaryotische S-Phase einzutreten und damit die Chromosomenreplikation und die Cytokinese (Zellteilung) erneut zu initiieren, während die kleinere Zelle, die sogenannte „swarmer“ Zelle, für etwa 30 min in der G1-Phase verbleibt, bevor diese sich auch zu einer „stalked“ Zelle entwickelt. Diese asymmetrische Regulation bei den beiden Tochterzellen wird durch die zeitliche und örtliche Lokalisierung des phosphorylierten DivK-Proteins bestimmt [161]. In den „swarmer“ Zellen ist das DivK gleichmäßig verteilt und durch die zugehörige Phosphatase PleC inaktiviert. Dabei blockiert das durch Phosphorylierung aktivierte Protein CtrA den Replikationsursprung (engl. origin of replication, ORI) und verhindert somit die DNS-Replikation. In den „stalked“ Zellen befindet sich das DivK lokalisiert an dem Pol, wo es durch die zugehörige membranassoziierte Histidinkinase DivJ aktiviert wird. Das aktivierte DivK-P inaktiviert dann das CtrA durch die Blockierung des CckA-Phosphorelay-Systems, wodurch dann die Chromosomenreplikation beginnt.

Bereits zuvor ist das homologe DivK-Protein in dem Bakterium *S. meliloti* von Lam et al. untersucht worden [152]. Dabei konnte eine DivK defiziente Mutante von *C. crescentus* mit

smDivK komplementiert werden, wodurch eindeutig belegt worden ist, daß das DivK-Protein aus *S. meliloti* auch im *C. crescentus* funktionstüchtig ist. Die oben gezeigten TLF-Untersuchungen des eGFP-markierten DivK in *S. meliloti* bestätigen die Ergebnisse von Lam et al. [152], indem hier für das DivK ein anderes Lokalisierungsmuster als im *C. crescentus* beobachtet worden ist. Während die Lokalisierung in *C. crescentus* an beiden Polen der Zelle auftritt (bipolar), ist an der steigenden Fluoreszenzintensität sichtbar, daß gegen Ende des Zellzyklus die Lokalisierung in beiden Tochterzellen bei *S. meliloti* nur an einem der beiden Pole stattfindet. Dabei ist nach Lam et al. das DivK-Protein nur in seinem phosphorylierten Zustand aktiv, wobei dessen Phosphorylierung an die Lokalisierung an einem der Pole gebunden ist [152]. Im *C. crescentus* bewirkt das aktive DivK-P die Auflösung des CtrA an der alten Polregion der Zelle [162]. Dieser Abbau des CtrA-Proteins ist notwendig für die Initiierung der DNS-Replikation und bewirkt gleichzeitig, anders als bei anderen Bakterien (z.B. *E. coli*), daß in jedem Zellzyklus auch nur eine Replikation stattfindet [163]. Auch im Bakterium *S. meliloti* findet die Chromosomenreplikation nur einmal in jedem Zellzyklus statt. Aufgrund der Lokalisierung von smDivK an nur einem der Pole (unipolar am alten Pol) ist jedoch von Unterschieden in der CtrA-Phosphorelay-Kaskade auszugehen. McAdams et al. gehen trotz dieser Unterschiede in der polaren Morphologie aufgrund von der gemeinsamen asymmetrischen Zellteilung bei den beiden Organismen von einem konservierten Hauptmechanismus in der Kontrolle des Zellzyklus mit Anpassungen an die verschiedenen Lebensbedingungen in alpha-Proteobakterien aus [164].

In der Abbildung 39 ist sehr deutlich zu sehen, daß die Konzentration des Fusionsproteins aus dem Hauptregulator des Zellzyklus GcrA und dem Fluoreszenzprotein eGFP innerhalb des Zellzyklus oszilliert, wie es sich aus TLF-Untersuchungen des *S. meliloti* ergibt. Da die Zellen anfangs nicht synchronisiert worden sind, ist eine *in silico* Synchronisierung bei der Auswertung der Bilder nach Sigal et al. [76] durchgeführt worden. Dabei ist zu bemerken, daß sich die Akquisition von Zellzyklusabhängigem Expressionsverhalten unter Verwendung von GFP-markierten Proteinen sich von herkömmlichen Methoden, wie z.B. Western-Blots von synchronisierten Zellkulturen, unterscheidet. So können bei dem Fusionsprotein beispielsweise die Aktivierung (z.B. durch Phosphorylierung), die biologische Halbwertszeit und auch die benötigte Zeit für den Abbau eines solchen Proteins von dem Zielprotein abweichen. Bei dem hier untersuchten GcrA aus *S. meliloti* zeigt sich jedoch ein ähnliches Verhalten zu dem orthologen GcrA in *C. crescentus*. Im Vergleich des GcrA-eGFP-Expressionsprofils in *S. meliloti* mit der GcrA-Konzentration in synchronisierten Zellen von *C. crescentus* scheint lediglich die erneute Akkumulation des Proteins in *S. meliloti* später im Zellzyklus zu beginnen als beim *C. crescentus*. Außerdem unterscheidet sich das Vorhandensein des Proteins zu Beginn des Zellzyklus in beiden Arten der Tochterzellen in *S. meliloti*, wo die Konzentration dann innerhalb der ersten 40 min deutlich abnimmt, während in den „swarmer“ Zellen von *C. crescentus* das aktivierte Protein CtrA die DNA-Replikation blockiert und gleichzeitig die Transkription des GcrA hemmt [165]. Da das smGcrA im Gegensatz dazu zu Beginn des Zellzyklus auch in den kleineren Tochterzellen von *S. meliloti* vorhanden ist, sind leicht unterschiedliche Funktionen der konservierten Hauptregulatoren des Zellzyklus GcrA und CtrA wahrscheinlich.

Somit sind die TLF-Chips mit dem Obermaterial aus PDMS (s. 4.5.3.1) für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie einzelner Bakterienzellen verwendet worden, indem diese in den TLF-Chips auf einer Oberflächenbeschichtung aus Polyethylenimin (PEI) immobilisiert worden sind. Dabei ermöglichen diese Mikrofluidik-Chips die gezielte und reproduzierbare Erstellung eines

Konzentrationsgradienten des PEI, während die Viabilität der Zellen erhalten bleibt. Durch den Gradienten wird das Immobilisieren lebender Zellen in gewünschter Anzahl (Dichte) erreicht, während gleichzeitig durch das Design der Chips ein Übereinanderliegen der Zellen verhindert wird. Resultierend wird die Beobachtung auch von sehr kleinen Bakterienzellen über viele Stunden in den TLF-Chips möglich. Dies konnte trotz der geringen Größen von *S. meliloti* Zellen anhand der Beobachtung von zeit- und orts aufgelöster Proteindynamik von zwei Proteinen, die bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, in einzelnen Zellen demonstriert werden. Dabei ist die Lokalisierung des einen Proteins durch die Unterteilung der Zellen in vier Sektionen, die nur ein wenig über der Auflösungsgrenze in der (klassischen) optischen Mikroskopie liegen, adressiert worden. Aus den so ermittelten Informationen konnten neue Erkenntnisse über die Dynamik, von an der Zellzykluskontrolle in *S. meliloti* beteiligten Proteinen, sowie interessante Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum verwandten Bakterium *C. crescentus*, gewonnen werden [82].

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Gleich zu Beginn dieser Arbeit ist es gelungen unter Verwendung einer statischen Beschichtung bestehend aus F108 bei der Trennung des Proteinhaushalts einer einzelnen Sf9-Insektenzelle, nachdem die Zelle mit einem kurzen Hochspannungspuls lysiert worden ist, in einem PDMS-Chip das erste Einzelzellelektropherogramm aus einer solchen Zelle mit nativer UV-LIF Detektion zu präsentieren. Dieses ist mit einem Elektropherogramm, das nach gleicher Methode von vier Sf9-Zellen erstellt worden ist, verglichen worden.

Eine weitere Verbesserung für die native UV-LIF Detektion von Proteinen konnte durch die Herstellung von PQW-Chips erreicht werden. Diese Mikrofluidik-Chips besitzen, wie die zuvor eingesetzten PDMS-Chips ein Obermaterial aus PDMS mit einer Unterseite aus einem hochwertigen Deckglas aus Quarzglas, zusätzlich ist jedoch am Punkt der Detektion ein kleines Fenster aus Quarzglas oberhalb des Trennkanals integriert worden. Somit ist es gelungen, die Hintergrundfluoreszenz in der UV-LIF Detektion gegenüber den PDMS-Chips um 75 % zu reduzieren. Gleichzeitig war es möglich durch die Verwendung eines größeren Pinholes und durch die Optimierung des pH-Werts des Trennpuffers für die Detektion der aromatischen Aminosäure Tryptophan, bei den Trennungen des Proteinhaushalts aus einzelnen Sf9-Insektenzellen in einem PQW-Chip mit nativer UV-LIF Detektion viermal höhere Signalintensitäten im Vergleich zu den ersten Messungen in PDMS-Chips zu erzielen.

Desweiteren war es im Rahmen dieser Arbeit möglich durch die Erstellung einzigartiger neuer Mikrofluidik-Chips, die vollständig aus sehr hochwertigem Quarzglas mit einer Bodendicke von nur 200 μm bestehen und die durch DRISO eine anisotrope Kanalgeometrie mit einer Tiefe von 30 μm besitzen, so daß diese eine außergewöhnliche Transparenz für UV-Licht ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) und verschwindend geringe Hintergrundfluoreszenz in der UV-LIF Detektion aufweisen, neue Maßstäbe zu setzen. So war es möglich mit nativer UV-LIF Detektion in diesen QG-Chips eine 10 nM Tryptophan-Lösung mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 11,9 zu detektieren, woraus sich eine theoretische Detektionsgrenze von 2,5 nM Tryptophan ergibt. Dies ist die bislang niedrigste Konzentration an Tryptophan, die mit nativer UV-LIF Detektion in einem Mikrofluidik-Chip gemessen worden ist. Eine hohe Trenneffizienz konnte anhand der Trennung der drei Proteine α -Chymotrypsinogen A, Catalase und Ovalbumin in diesen QG-Chips unter Verwendung einer dynamischen Beschichtung mit n-Dodecyl- β -maltosid (DDM) innerhalb von 2 min demonstriert werden. Durch die Kombination von einem höheren pH-Wert des Trennpuffers mit der Verwendung einer dynamischen Beschichtung bestehend aus DDM und Methylcellulose (MC) konnten bei der Trennung des Proteinhaushalts einer einzelnen Sf9-Insektenzelle in einem QG-Chip mit nativer UV-LIF Detektion eine verbesserte Trenneffizienz und höhere Signalintensitäten im Vergleich zu anfangs verwendeten PDMS-Chips erzielt werden. Durch die Modifikation des Aufbaus für die UV/VIS-LIF Detektion hin zu einem Aufbau mit dem die parallele UV/VIS-LIF Detektion, also die gleichzeitige Anregung mit einem Laser im UV ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) und im VIS ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) und die Detektion der entsprechend emittierten Fluoreszenzsignale, möglich ist, konnten bei den Trennungen des Proteinhaushalts aus einzelnen Sf9 PKC γ -GFP-Insektenzellen, bei denen das Protein PKC γ mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert exprimiert

wird, in einem QG-Chip einzelne Peaks im sichtbaren Spektralbereich, die von diesem Protein stammen, entsprechenden Signalen im UV-Bereich zugeordnet werden.

Eine interessante Möglichkeit der Nutzung des hochempfindlichen Aufbaus für die parallele UV/VIS-LIF Detektion in Kombination mit der Mikrofluidik ist auch weiterhin sicherlich die Untersuchung einzelner Zellen. So ist die Adressierung der Heterogenität auf Einzelzellebene bei Produktionsstämmen für therapeutisch oder wirtschaftlich relevante Proteine bezogen auf ebendiese Proteine ein spannendes Themenfeld. Durch die Untersuchung an monoklonalen Zelllinien, die zudem auch noch synchronisiert werden, könnte die Reproduzierbarkeit erhöht werden, so daß es in Zukunft vielleicht doch noch möglich ist übereinstimmende Muster in den Einzelzellelektropherogrammen zu finden. Überdies könnte der Aufbau genutzt werden, um bei einer Trennung des Proteoms einzelner Zellen in zwei Dimensionen (beispielsweise eine Trennung nach Ladung (trägerfreie Elektrophorese) oder nach isoelektrischem Punkt (isoelektrische Fokussierung mit freien Trägerampholyten) in der ersten Dimension mit anschließender Trennung nach Größe (Gelelektrophorese)) zu überprüfen wann der Proteingehalt in der ersten Dimension weit genug migriert ist, um in der zweiten Dimension weiter aufgetrennt zu werden. Nach der Immobilisierung der Proteine in dem Mikrofluidik-Chip, könnte dieser geöffnet werden und eine Vielzahl der Proteine z.B. mittels MALDI-MSI (engl. „MALDI mass spectrometry imaging“) identifiziert werden. Somit wäre die Untersuchung von Unterschieden im Proteom aufgrund der Variabilität einzelner Zellen oder Veränderungen im Proteom einzelner Zellen aufgrund von externen Stimuli (z.B. der Infektion einer Zelle) möglich.

Zur Abbildung der Zelloberfläche des gram-negativen Bakteriums *S. meliloti* sind mit SEM, XHR SEM und AFM in Trockenheit, wie in Flüssigkeit, verschiedene hochauflösende Mikroskopietechniken verwendet worden, um die anfangs in konventionellen SEM-Bildern beobachteten Strukturen zu untersuchen. Somit konnte gezeigt werden, daß diese Oberflächenstrukturen natürlicherweise auch bei lebenden Bakterien vorhanden sind und deren Veränderungen durch die verschiedenen Schritte bei der Probenpräparation, angefangen bei den unnatürlichsten Umgebungsbedingungen, die für die herkömmliche Rasterelektronenmikroskopie (SEM) notwendig sind (Fixierung, Trocknung, Metallbeschichtung und Hochvakuum), bis hin zu physiologischen Konditionen bei der Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeit (Abbildung lebender Bakterien), sukzessive nachvollzogen werden. Es ist gezeigt worden, daß die bei der Abbildung mit dem AFM in Flüssigkeit rundlichen Erhebungen in ihrer Höhe von der Osmolarität des umgebenden Mediums abhängig sind. Anhand von Mutanten sind die Einflüsse auf die Strukturen durch die häufigsten Oberflächenmoleküle, den Exopolysacchariden und den Lipopolysacchariden, untersucht und diskutiert worden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Austrocknung zu der Ausbildung von länglichen Erhebungen führt, die sich sehr wahrscheinlich aus den runden Erhebungen bei lebenden Bakterienzellen gebildet haben. Zudem sind bei der Abbildung mit dem AFM in Flüssigkeit sehr kleine runde Strukturen mit einer Höhe von nur etwa 2 nm beobachtet worden, die als äußere Membranproteine an der Oberfläche der lebenden Bakterien gedeutet worden sind. Desweiteren stellt die einfach durchzuführende Beschichtung für die Immobilisierung der lebenden Zellen mit Polyethylenimin (PEI) eine kostengünstige Alternative zu der Funktionalisierung der Deckgläser mit Polylysin dar. Dieses positiv geladene Polymer führt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der überwiegend negativ geladenen Bakterienoberfläche zu einer optimalen Immobilisierung der

Zellen. Dadurch wird das Abbilden mit dem AFM in Flüssigkeit mit hoher Auflösung ohne ein Verrutschen der Probe ermöglicht.

In der Zukunft könnte die Studie der Oberflächenstrukturen beim Bakterium *S. meliloti* noch erweitert werden und beispielsweise durch ergänzende Abbildungen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nach Immunogoldfärbung die Verteilung der LPS-Moleküle beim Wildtyp-Stamm und der untersuchten Mutante, wie auch äußerer Membranproteine mit den bisherigen Ergebnissen verglichen werden. Gleichzeitig ist die verwendete Methode für die Immobilisierung der Bakterien mit PEI und der zusätzlichen hydrophoben Barriere aus Parafilm für die Messungen mit dem AFM in Flüssigkeit universell für Untersuchungen an lebenden, wie auch an fixierten Zellen, die nicht adhären wachsen einsetzbar.

Zur Verfolgung der zeit- und orts aufgelösten Proteindynamik in einzelnen Bakterienzellen sind TLF-Chips mit dem Obermaterial aus PDMS für die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie verwendet worden. Dazu sind *S. meliloti* Zellen in den TLF-Chips auf einer Oberflächenbeschichtung aus Polyethylenimin (PEI) immobilisiert worden, wobei die Viabilität der Zellen aufgrund der physiologischen Umgebungsbedingungen erhalten geblieben ist. Mit diesen Mikrofluidik-Chips war es möglich, das PEI gezielt und reproduzierbar in einem Konzentrationsgradienten als Beschichtung aufzutragen, so daß die lebenden Zellen in einer gewünschten Anzahl (Dichte) für eine längere Beobachtungsdauer immobilisiert werden konnten. Gleichzeitig konnte durch die bewusst gewählte geringe Höhe der Mikrofluidikkanäle ein Übereinanderstapeln der Zellen, auch nach mehrfacher Teilung, erfolgreich vermieden werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie der zeit- und orts aufgelöster Proteindynamik von zwei Proteinen, die bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind konnte trotz der geringen Größen der *S. meliloti* Zellen die Eignung der TLF-Chips mit dem PEI-Konzentrationsgradienten für die Beobachtung dieser sehr kleinen Bakterienzellen über viele Stunden demonstriert werden, wobei durch eine *in silico* Synchronisierung eine attraktive Alternative zu der konventionellen Zell-Synchronisation (z.B. durch FACS, engl. „fluorescence activated cell sorting“) angewendet worden ist. Dazu sind *S. meliloti*-Stämme verwendet worden, bei denen die Gene für die zu untersuchenden Proteine an ihrem natürlichen Ort im Genom durch Fusionen dieser Gene mit der Sequenz, die für ein fluoreszierendes Protein kodiert, ersetzt worden sind. Für die Analyse der Lokalisierung innerhalb der Zelle über den Zellzyklus von *S. meliloti* des einen Proteins sind die Zellen in vier Sektionen, die nur ein wenig über der Auflösungsgrenze in der (klassischen) optischen Mikroskopie liegen, unterteilt worden. Aus den gewonnenen Informationen konnten neue Erkenntnisse über die Dynamik, von an der Zellzykluskontrolle in *S. meliloti* beteiligten Proteinen, sowie interessante Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum verwandten Bakterium *C. crescentus*, gewonnen werden.

Neben den beiden hier untersuchten Proteinen (DivK und GcrA) gibt es eine Reihe weiterer Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus in *S. meliloti* beteiligt sind und die in Zukunft mit der gleichen Methode untersucht werden könnten. Darüber hinaus ist durch die Softlithographie eine einfache Anpassung der Kanalgeometrie von den TLF-Chips möglich, so daß mit der Immobilisierung durch den PEI-Konzentrationsgradienten Langzeitbeobachtungen von sehr vielen verschiedenen, auch eukaryotischen Zellen durchgeführt werden können. Durch kleinere Modifikationen an dem Aufbau ist auch eine Automatisierung der Bildakquise und somit auch

eine Beobachtung über mehrere Tage möglich. Dazu könnte eine Inkubationskammer mit Temperatur- und Luftfeuchtigkeitskontrolle verhindern, daß in kürzeren Abständen Flüssigkeit nachgefüllt werden muss und was besonders bei der Beobachtung von Säugetierzellen, die oftmals ein Temperaturoptimum bei 38 °C besitzen, interessant ist, daß der gesamte Laborraum auf diese Temperatur erhitzt werden muss. Durch die Verwendung des frei verfügbaren Programms Micromanager (basierend auf dem Programm ImageJ) könnte die automatisierte Aufnahme von Fluoreszenz- und Hellfeldbildern auch an verschiedenen Punkten des Kanals in dem TLF-Chip über einen längeren Zeitraum realisiert werden. Durch die Nutzung eines Chips mit mehreren parallelen Kanälen ist sogar die Beobachtung verschiedener Zellen oder Mutanten in dem gleichen Zeitraum denkbar.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Breslauer, D. N., Lee, P. J. & Lee, L. P. Microfluidics-based systems biology. *Molecular Biosystems* **2**, 97-112 (2006).
- [2] Di Carlo, D. & Lee, L. P. Dynamic single-cell analysis for quantitative biology. *Analytical Chemistry* **78**, 7918-7925 (2006).
- [3] Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373 (2006).
- [4] Gomez-Sjoberg, R., Leyrat, A. A., Pirone, D. M., Chen, C. S. & Quake, S. R. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Analytical Chemistry* **79**, 8557-8563 (2007).
- [5] Hellmich, W., Pelargus, C., Leffhalm, K., Ros, A. & Anselmetti, D. Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology. *Electrophoresis* **26**, 3689-3696 (2005).
- [6] Lee, T. T. & Yeung, E. S. High-Sensitivity Laser-Induced Fluorescence Detection of Native Proteins in Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **595**, 319-325 (1992).
- [7] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A. & Manz, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry* **74**, 2623-2636 (2002).
- [8] Terry, S. C., Jerman, J. H. & Angell, J. B. Gas-Chromatographic Air Analyzer Fabricated on A Silicon-Wafer. *Ieee Transactions on Electron Devices* **26**, 1880-1886 (1979).
- [9] Vanderschoot, B. & Bergveld, P. An Isfet-Based Microliter Titrator - Integration of A Chemical Sensor Actuator System. *Sensors and Actuators* **8**, 11-22 (1985).
- [10] Verheggen, T. P. E. M., Beckers, J. L. & Everaerts, F. M. Simple Sampling Device for Capillary Isotachophoresis and Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **452**, 615-622 (1988).
- [11] Manz, A. *et al.* Design of An Open-Tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1**, 249-255 (1990).
- [12] Manz, A., Graber, N. & Widmer, H. M. Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - A Novel Concept for Chemical Sensing. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1**, 244-248 (1990).
- [13] Smits, J. G. Piezoelectric Micropump with 3 Valves Working Peristaltically. *Sensors and Actuators A-Physical* **21**, 203-206 (1990).
- [14] Vandepol, F. C. M., Vanlintel, H. T. G., Elwenspoek, M. & Fluitman, J. H. J. A Thermopneumatic Micropump Based on Micro-Engineering Techniques. *Sensors and Actuators A-Physical* **21**, 198-202 (1990).
- [15] Shoji, S., Nakagawa, S. & Esashi, M. Micropump and Sample-Injector for Integrated Chemical Analyzing Systems. *Sensors and Actuators A-Physical* **21**, 189-192 (1990).

- [16] Esashi, M. Integrated Micro Flow-Control Systems. *Sensors and Actuators A-Physical* **21**, 161-167 (1990).
- [17] Verpoorte, E. *et al.* A Silicon Flow Cell for Optical-Detection in Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems. *Sensors and Actuators B-Chemical* **6**, 66-70 (1992).
- [18] Manz, A. *et al.* Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques Into Monitoring Systems - Capillary Electrophoresis on A Chip. *Journal of Chromatography* **593**, 253-258 (1992).
- [19] Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z. H., Ludi, H. & Widmer, H. M. Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on A Planar Glass Chip. *Analytical Chemistry* **64**, 1926-1932 (1992).
- [20] Harrison, D. J. *et al.* Micromachining A Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on A Chip. *Science* **261**, 895-897 (1993).
- [21] Seiler, K., Harrison, D. J. & Manz, A. Planar Glass Chips for Capillary Electrophoresis - Repetitive Sample Injection, Quantitation, and Separation Efficiency. *Analytical Chemistry* **65**, 1481-1488 (1993).
- [22] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Moore, A. W. & Ramsey, J. M. Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on A Microchip. *Analytical Chemistry* **66**, 4127-4132 (1994).
- [23] Jacobson, S. C., Koutny, L. B., Hergenroder, R., Moore, A. W. & Ramsey, J. M. Microchip Capillary Electrophoresis with An Integrated Postcolumn Reactor. *Analytical Chemistry* **66**, 3472-3476 (1994).
- [24] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B. & Ramsey, J. M. High-Speed Separations on A Microchip. *Analytical Chemistry* **66**, 1114-1118 (1994).
- [25] Effenhauser, C. S., Paulus, A., Manz, A. & Widmer, H. M. High-Speed Separation of Antisense Oligonucleotides on A Micromachined Capillary Electrophoresis Device. *Analytical Chemistry* **66**, 2949-2953 (1994).
- [26] Woolley, A. T. & Mathies, R. A. Ultra-High-Speed Dna Fragment Separations Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11348-11352 (1994).
- [27] Fan, Z. H. & Harrison, D. J. Micromachining of Capillary Electrophoresis Injectors and Separators on Glass Chips and Evaluation of Flow at Capillary Intersections. *Analytical Chemistry* **66**, 177-184 (1994).
- [28] Fuhr, G. *et al.* Radio-frequency microtools for particle and liver cell manipulation. *Naturwissenschaften* **81**, 528-535 (1994).
- [29] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Warmack, R. J. & Ramsey, J. M. Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices. *Analytical Chemistry* **66**, 1107-1113 (1994).
- [30] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B. & Ramsey, J. M. Open-Channel Electrochromatography on A Microchip. *Analytical Chemistry* **66**, 2369-2373 (1994).

- [31] Auroux, P. A., Iossifidis, D., Reyes, D. R. & Manz, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry* **74**, 2637-2652 (2002).
- [32] Vilkner, T., Janasek, D. & Manz, A. Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical Chemistry* **76**, 3373-3385 (2004).
- [33] Dittrich, P. S., Tachikawa, K. & Manz, A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry* **78**, 3887-3907 (2006).
- [34] West, J., Becker, M., Tombrink, S. & Manz, A. Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry* **80**, 4403-4419 (2008).
- [35] Arora, A., Simone, G., Salieb-Beugelaar, G. B., Kim, J. T. & Manz, A. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Analytical Chemistry* **82**, 4830-4847 (2010).
- [36] Lottspeich, F. & Zorbas, H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1998).
- [37] Tiselius, A. Electrophoresis of serum globulin. I. *Biochemical Journal* **31**, 313-317 (1937).
- [38] Tiselius, A. Electrophoresis of serum globulin II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal* **31**, 1464-1477 (1937).
- [39] Smithies, O. Zone Electrophoresis in Starch Gels - Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults. *Biochemical Journal* **61**, 629-641 (1955).
- [40] Kohn, J. A Cellulose Acetate Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Clinica Chimica Acta* **2**, 297-303 (1957).
- [41] Raymond, S. & Weintraub, L. Acrylamide Gel As A Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
- [42] Ornstein, L. Disc Electrophoresis .I. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 321-& (1964).
- [43] Davis, B. J. Disc Electrophoresis .2. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 404-& (1964).
- [44] Vesterberg, O & Svensson, H. Isoelectric Fractionation Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural Ph Gradients .4. Further Studies on Resolving Power in Connection with Separation of Myoglobins. *Acta Chemica Scandinavica* **20**, 820-& (1966).
- [45] Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V. Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in Sds-Polyacrylamide Gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **28**, 815-& (1967).
- [46] Margolis, J. & Kenrick, K. G. Electrophoresis in Polyacrylamide Concentration Gradient. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**, 68-& (1967).
- [47] Margolis, J. & Kenrick, K. G. Polyacrylamide Gel-Electrophoresis Across A Molecular Sieve Gradient. *Nature* **214**, 1334-& (1967).

- [48] Klose, J. Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues - Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243 (1975).
- [49] Ofarrell, P. H. High-Resolution 2-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007-4021 (1975).
- [50] Gorg, A., Postel, W., Domscheit, A. & Gunther, S. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized Ph Gradients of Leaf Proteins from Barley (*Hordeum-Vulgare*) - Method, Reproducibility and Genetic-Aspects. *Electrophoresis* **9**, 681-692 (1988).
- [51] Gorg, A., Postel, W. & Gunther, S. The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized Ph Gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-546 (1988).
- [52] Gorg, A. *et al.* Approach to Stationary Two-Dimensional Pattern - Influence of Focusing Time and Immobiline Carrier Ampholytes Concentrations. *Electrophoresis* **9**, 37-46 (1988).
- [53] Gorg, A., Postel, W., Gunther, S. & Friedrich, C. Horizontal Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized Ph Gradients Using Phastsystem. *Electrophoresis* **9**, 57-59 (1988).
- [54] Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis. *Journal of Chromatography* **218**, 209-216 (1981).
- [55] Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. *Analytical Chemistry* **53**, 1298-1302 (1981).
- [56] Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. Free-Zone Electrophoresis in Glass-Capillaries. *Clinical Chemistry* **27**, 1551-1553 (1981).
- [57] Belder, D., Ludwig, M., Wang, L. W. & Reetz, M. T. Enantioselective catalysis and analysis on a chip. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **45**, 2463-2466 (2006).
- [58] Schulze, P. & Belder, D. Label-free fluorescence detection in capillary and microchip electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 515-525 (2009).
- [59] Probstein, R. F. *Physicochemical hydrodynamics : an introduction*. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. (2003).
- [60] Grossman, P. D. *Capillary electrophoresis : theory and practice*. Academic Press, San Diego u.a. (1992).
- [61] Anselmetti, D. *Single cell analysis : technologies and applications*. Wiley-VCH, Weinheim (2009).
- [62] Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J. & Vacanti, J. P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 2480-2487 (2006).
- [63] Moore, K. A. & Lemischka, I. R. Stem cells and their niches. *Science* **311**, 1880-1885 (2006).
- [64] Hogan, B. L. M. Morphogenesis. *Cell* **96**, 225-233 (1999).

- [65] Rao, C. V., Wolf, D. M. & Arkin, A. P. Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature* **420**, 231-237 (2002).
- [66] Lidstrom, M. E. & Meldrum, D. R. Life-on-a-chip. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 158-164 (2003).
- [67] Raser, J. M. & O'Shea, E. K. Noise in gene expression: Origins, consequences, and control. *Science* **309**, 2010-2013 (2005).
- [68] Mettetal, J. T., Muzzey, D., Pedraza, J. M., Ozbudak, E. M. & van Oudenaarden, A. Predicting stochastic gene expression dynamics in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7304-7309 (2006).
- [69] Kholodenko, B. N. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 165-176 (2006).
- [70] Yu, J., Xiao, J., Ren, X. J., Lao, K. Q. & Xie, X. S. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science* **311**, 1600-1603 (2006).
- [71] Cai, L., Friedman, N. & Xie, X. S. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* **440**, 358-362 (2006).
- [72] Griffith, L. G. & Swartz, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 211-224 (2006).
- [73] Yasuda, K. J. On-chip single-cell-based microcultivation method for analysis of genetic information and epigenetic correlation of cells. *Journal of Molecular Recognition* **17**, 186-193 (2004).
- [74] El-Ali, J., Sorger, P. K. & Jensen, K. F. Cells on chips. *Nature* **442**, 403-411 (2006).
- [75] Kane, B. J., Zinner, M. J., Yarmush, M. L. & Toner, M. Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes. *Analytical Chemistry* **78**, 4291-4298 (2006).
- [76] Sigal, A. *et al.* Dynamic proteomics in individual human cells uncovers widespread cell-cycle dependence of nuclear proteins. *Nature Methods* **3**, 525-531 (2006).
- [77] Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**, 1622-1625 (2004).
- [78] Tourovskaia, A., Figueroa-Masot, X. & Folch, A. Differentiation-on-a-chip: A microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab on A Chip* **5**, 14-19 (2005).
- [79] Cookson, S., Ostroff, N., Pang, W. L., Volfson, D. & Hasty, J. Monitoring dynamics of single-cell gene expression over multiple cell cycles. *Molecular Systems Biology* **1**, (2005).
- [80] Megerle, J. A., Fritz, G., Gerland, U., Jung, K. & Radler, J. O. Timing and dynamics of single cell gene expression in the arabinose utilization system. *Biophysical Journal* **95**, 2103-2115 (2008).
- [81] Longo, D. & Hasty, J. Dynamics of single-cell gene expression. *Molecular Systems Biology* **2**, (2006).

- [82] Greif, D. *et al.* Space- and time-resolved protein dynamics in single bacterial cells observed on a chip. *Journal of Biotechnology* **149**, 280-288 (2010).
- [83] Xia, Y. N. & Whitesides, G. M. Soft lithography. *Angewandte Chemie-International Edition* **37**, 551-575 (1998).
- [84] Merkel, T. C., Bondar, V. I., Nagai, K., Freeman, B. D. & Pinnau, I. Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane). *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **38**, 415-434 (2000).
- [85] Stephens, D. J. & Allan, V. J. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* **300**, 82-86 (2003).
- [86] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Boston (MA) (2006).
- [87] Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, A Bioluminescent Protein from Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-& (1962).
- [88] Shimomura, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy-Oxford* **217**, 3-15 (2005).
- [89] Shimomura, O. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **48**, 5590-5602 (2009).
- [90] Brannon, J. H. & Magde, D. Absolute Quantum Yield Determination by Thermal Blooming - Fluorescein. *Journal of Physical Chemistry* **82**, 705-709 (1978).
- [91] Bruce, A. & Alberts, B. *Molecular biology of the cell*. Garland Science ; Taylor & Francis, distributor], New York; London (2008).
- [92] Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & Mccawley, P. Establishment of 2 Cell Lines from Insect Spodoptera-Frugiperda (Lepidoptera-Noctuidae). *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* **13**, 213-217 (1977).
- [93] Summers, M. D. The Abundant Expression of Recombinant Proteins in Insect Sf9-Cells Using the Baculovirus Vector. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **194**, 97-MBTD (1987).
- [94] McCarroll, L. & King, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 590-594 (1997).
- [95] Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H. & Marz, L. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **16**, 109-123 (1999).
- [96] Hollister, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H. & Jarvis, D. L. Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary, complex N-glycans. *Biochemistry* **41**, 15093-15104 (2002).
- [97] Jensen, N. Entwicklung und Implementierung lebendzellbasierter Analysemethoden auf Basis automatisierter Mikroskopie zur Quantifizierung zellulärer Eigenschaften von Sf9 Insektenzellen. Dissertation. 2010. Universität Bielefeld.

- [98] Sakai, N. *et al.* Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *Journal of Cell Biology* **139**, 1465-1476 (1997).
- [99] Jordan, D. C. Family III. Rhicobiaceae CONN 1983. Krieg, N. R. , Holt, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore*, 234-254 (1984).
- [100] Van Berkum, P. & E. B. D. Molecular evolutionary systematic of the rhizobiaceae. *The rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H. D. , Kondorsi, A. , Hooykaas, P. J. J. (Eds.). Kluwer academic press, Netherlands.* (1998).
- [101] van, R. P. & Vanderleyden, J. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev* **59**, 124-142 (1995).
- [102] Brewin, N. J. Development of the legume root nodule
7. Annu Rev Cell Biol **7**, 191-226 (1991).
- [103] Lerouge, P. *et al.* Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal
1. Nature **344**, 781-784 (1990).
- [104] Peters, N. K., Frost, J. W. & Long, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes
1. Science **233**, 977-980 (1986).
- [105] Werner, D. Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart* (1987).
- [106] Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 619-633 (2007).
- [107] Mergaert, P. *et al.* Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5230-5235 (2006).
- [108] Galibert, F. *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672 (2001).
- [109] Hellmich, W., Pelargus, C., Leffhalm, K., Ros, A. & Anselmetti, D. Single cell manipulation, analytics and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology. *Electrophoresis* **26**, 3689-3696 (2005).
- [110] Hellmich, W., Greif, D., Pelargus, C., Anselmetti, D. & Ros, A. Improved native UV laser induced fluorescence detection for single cell analysis in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. *Journal of Chromatography A* **1130**, 195-200 (2006).
- [111] Greif, D., Galla, L., Ros, A. & Anselmetti, D. Single cell analysis in full body quartz glass chips with native UV laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **1206**, 83-88 (2008).
- [112] Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. & Denarie, J. Identification and Characterization of Large Plasmids in *Rhizobium-Meliloti* Using Agarose-Gel Electrophoresis. *Journal of General Microbiology* **113**, 229-242 (1979).

- [113] Niehaus, K., Kapp, D. & Puhler, A. Plant Defense and Delayed Infection of Alfalfa Pseudonodules Induced by An Exopolysaccharide (Eps-I)-Deficient Rhizobium-Meliloti Mutant. *Planta* **190**, 415-425 (1993).
- [114] Lagares, A. *et al.* A Rhizobium-Meliloti Lipopolysaccharide Mutant Altered in Competitiveness for Nodulation of Alfalfa. *Journal of Bacteriology* **174**, 5941-5952 (1992).
- [115] Vincent, J. M. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publ., Oxford-Edinburgh 1970 (1970).
- [116] Wang, X. Q., Duan, X. M., Liu, L. H., Fang, Y. Q. & Tan, Y. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell Labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **37**, 379-385 (2005).
- [117] Regtmeier, J., Duong, T. T., Eichhorn, R., Anselmetti, D. & Ros, A. Dielectrophoretic manipulation of DNA: Separation and polarizability. *Analytical Chemistry* **79**, 3925-3932 (2007).
- [118] Greif, D., Anselmetti, D. & Ros, A. Single cell analysis by native UV laser induced fluorescence detection in a PDMS microfluidic chip. Proceedings of the 11th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences (μ TAS2007) Paris, 176-178. 2007. μ TAS proceedings.
- [119] Schuttpelz, M., Muller, C., Neuweiler, H. & Sauer, M. UV fluorescence lifetime imaging microscopy: A label-free method for detection and quantification of protein interactions. *Analytical Chemistry* **78**, 663-669 (2006).
- [120] Robbins, R. J. *et al.* Photophysics of Aqueous Tryptophan - Ph and Temperature Effects. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 6271-6279 (1980).
- [121] Eaton, D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement. *Pure and Applied Chemistry* **60**, 1107-1114 (1988).
- [122] Fazekas de St Groth, B. *et al.* Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and the virgin lymphocyte: A marriage made in heaven. *Immunology and Cell Biology* **77**, 530-538 (1999).
- [123] Dang, F. Q. *et al.* Hybrid dynamic coating with n-dodecyl beta-D-maltoside and methyl cellulose for high-performance carbohydrate analysis on poly(methyl methacrylate) chips. *Analytical Chemistry* **78**, 1452-1458 (2006).
- [124] Schulze, P., Ludwig, M., Kohler, F. & Belder, D. Deep UV laser-induced fluorescence detection of unlabeled drugs and proteins in microchip electrophoresis. *Analytical Chemistry* **77**, 1325-1329 (2005).
- [125] Huang, B., Wu, H. K., Kim, S. & Zare, R. N. Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-beta-D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. *Lab on A Chip* **5**, 1005-1007 (2005).
- [126] Galla, L., Greif, D., Regtmeier, J. & Anselmetti, D. Microfluidic carbon-blackened polydimethylsiloxane device with reduced ultra violet background fluorescence for

- simultaneous two-color ultra violet/visible-laser induced fluorescence detection in single cell analysis. *Biomicrofluidics* **6**, (2012).
- [127] Rosse, C. *et al.* PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 103-112 (2010).
- [128] Kubota, H. Quality Control Against Misfolded Proteins in the Cytosol: A Network for Cell Survival. *Journal of Biochemistry* **146**, 609-616 (2009).
- [129] Kopito, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* **10**, 524-530 (2000).
- [130] Ni, H. M. *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **7**, 188-204 (2011).
- [131] Costerton, J. W., Ingram, J. M. & Cheng, K. J. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 87-110 (1974).
- [132] Raetz, C. R. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 129-170 (1990).
- [133] Cava, J. R., Elias, P. M., Turowski, D. A. & Noel, K. D. Rhizobium leguminosarum CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* **171**, 8-15 (1989).
- [134] Lagares, A. *et al.* A Rhizobium meliloti lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **174**, 5941-5952 (1992).
- [135] Niehaus, K., Lagares, A. & Puhler, A. A Sinorhizobium meliloti lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant Medicago sativa (Alfalfa) but fails to establish a symbiosis with Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 906-914 (1998).
- [136] Coetzee, S. H., Jordaan, A. & Mpuchane, S. F. Low pressure mode combined with OsO₄ vapor fixation and sputter-coating for the preservation of delicate aerial hyphae and conidia in the ESEM. *Microsc. Res Tech.* **67**, 265-270 (2005).
- [137] Greif, D., Wesner, D., Regtmeier, J. & Anselmetti, D. High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy* **110**, 1290-1296 (2010).
- [138] Schwarz, H. & Koch, A. L. Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. *Microbiology* **141**, 3161-3170 (1995).
- [139] Bayer, M. E. & Remsen, C. C. Structure of Escherichia coli after freeze-etching. *J. Bacteriol.* **101**, 304-313 (1970).
- [140] Beveridge, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733 (1999).
- [141] Deatherage, B. L. *et al.* Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* **72**, 1395-1407 (2009).

- [142] Amro, N. A. *et al.* High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the Escherichia coli Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* **16**, 2789-2796 (2000).
- [143] Randall, L. L. & Hardy, S. J. Synthesis of exported proteins by membrane-bound polysomes from Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* **75**, 43-53 (1977).
- [144] Herskovits, A. A. & Bibi, E. Association of Escherichia coli ribosomes with the inner membrane requires the signal recognition particle receptor but is independent of the signal recognition particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4621-4626 (2000).
- [145] Schulz, G. E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1565**, 308-317 (2002).
- [146] Schabert, F. A., Henn, C. & Engel, A. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science* **268**, 92-94 (1995).
- [147] Velegol, S. B., Pardi, S., Li, X., Velegol, D. & Logan, B. E. AFM Imaging Artifacts due to Bacterial Cell Height and AFM Tip Geometry. *Langmuir* **19**, 851-857 (2003).
- [148] Greif, D., Pobigaylo, N., Becker, A., Regtmeier, J. & Anselmetti, D. On Chip Protein Dynamics in Single Bacteria Cells with Spatio-Temporal Resolution. Proceedings of the 13th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences (μ TAS2009) Jeju, 412-414. 2009. μ TAS proceedings.
- [149] Adt, I., Courtois, B. & Courtois, J. Increase of the ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in Sinorhizobium meliloti (Rhizobium meliloti) during hypothermic environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 69-72 (2000).
- [150] Holtzendorff, J. *et al.* Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* **304**, 983-987 (2004).
- [151] Sommer, J. M. & Newton, A. Pseudoreversion Analysis Indicates A Direct Role of Cell-Division Genes in Polar Morphogenesis and Differentiation in Caulobacter-Crescentus. *Genetics* **129**, 623-630 (1991).
- [152] Lam, H., Matroule, J. Y. & Jacobs-Wagner, C. The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Developmental Cell* **5**, 149-159 (2003).
- [153] Li, S., Brazhnik, P., Sobral, B. & Tyson, J. J. A quantitative study of the division cycle of Caulobacter crescentus stalked cells. *PLoS. Comput. Biol.* **4**, e9 (2008).
- [154] Biondi, E. G. *et al.* Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature* **444**, 899-904 (2006).
- [155] Singh, A., Freeman, B. D. & Pinnau, I. Pure and mixed gas acetone/nitrogen permeation properties of polydimethylsiloxane [PDMS]. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **36**, 289-301 (1998).
- [156] Hecht, E. & Zajac, A. *Optics*. International ed. Addison-Wesley Longman, Amsterdam (2003).

- [157] Cai, L., Friedman, N. & Xie, X. S. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* **440**, 358-362 (2006).
- [158] Newman, J. R. S. *et al.* Single-cell proteomic analysis of *S-cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **441**, 840-846 (2006).
- [159] Holtzendorff, J., Reinhardt, J. & Viollier, P. H. Cell cycle control by oscillating regulatory proteins in *Caulobacter crescentus*. *Bioessays* **28**, 355-361 (2006).
- [160] Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4095-4100 (2001).
- [161] Paul, R. *et al.* Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell* **133**, 452-461 (2008).
- [162] McAdams, H. H. & Shapiro, L. A bacterial cell-cycle regulatory network operating in time and space. *Science* **301**, 1874-1877 (2003).
- [163] Collier, J., McAdams, H. H. & Shapiro, L. A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17111-17116 (2007).
- [164] McAdams, H. H., Srinivasan, B. & Arkin, A. P. The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nature Reviews Genetics* **5**, 169-178 (2004).
- [165] Collier, J., Murray, S. R. & Shapiro, L. DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. *Embo Journal* **25**, 346-356 (2006).

8 GLOSSAR

AFM	atomic force microscopy (engl. für Rasterkraftmikroskopie bzw. Rasterkraftmikroskop)
APD	Avalanche-Photodiode
a.u.	arbitrary unit (engl. für relative Einheiten)
BS	bottom substrate (engl. für unteres Substrat)
CAD	computer assisted design
CFDA-SE	5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
DDM	n-Dodecyl- β -maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRIESO	deep reactive ion (RIE) etching of silicon dioxide (engl. für reaktives Ionentiefenätzen von Siliziumdioxid)
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIM	fluorescence life-time imaging (engl. für Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung)
G418	Geneticindisulfid (Antibiotikum)
GFP	green fluorescent protein (engl. für grün fluoreszierendes Protein)
h	Bodenhöhe
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	high-pressure liquid chromatography (engl. für Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICP	inductively coupled plasma
LPS	Lipopolysaccharide

M	Mittelwert (engl. mean)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MC	Methylcellulose
m/m	Massenprozent
MSI	mass spectrometry imaging
μTAS	miniaturized total chemical analysis system
N	Anzahl der Messungen
n	Bodenzahl
NaOH	Natriumhydroxid
nD	neutral density (engl. für neutrale Dichte, entspricht optischer Dichte über einen größeren Wellenlängenbereich)
o.D.	optical density (engl. für optische Dichte)
Omp	outer membrane protein (engl. für äußeres Membranprotein)
p.a.	pro analysi (lat. Bezeichnung für einen hohen Reinheitsgrad bei Chemikalien)
PBS	phosphate buffered saline (engl. für durch Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEI	Polyethylenimin
Pinhole	engl. für Lochblende
PMT	Photomultiplier
PKC γ	Proteinkinase C
PQW-Chips	PDMS-Quartz-Window-chips (engl. für PDMS-Quarzglas-Chips)
QG-Chips	full body quartz glass chips (engl. für Quarzglas-Chips)
R	Auflösung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat

SEM	scanning electron microscopy (engl. für Rasterelektronenmikroskopie bzw. Rasterkraftmikroskop (REM))
Sf9	Insekten-Zelllinie aus Eierstock-Zellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
S/N	signal to noise ratio (engl. für Signal-Rausch-Verhältnis)
smDivK	DivK-Protein aus dem Bakterium <i>S. meliloti</i>
smGcrA	GcrA-Protein aus dem Bakterium <i>S. meliloti</i>
stalked	engl. für gestielt
swarmer	engl. für schwärmende
STP	standard temperature and pressure (engl. für Standardtemperatur und Standarddruck)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TLFI	time-lapse fluorescence imaging (engl. für zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	top substrate (engl. für oberes Substrat)
UpM	Umdrehungen pro Minute (engl. rpm, revolutions per minute)
UV	ultraviolett
UV-LIF	UV laser induced fluorescence (engl. für UV Laser induzierte Fluoreszenz)
VIS	visible (engl. für sichtbar)
VMM	Vincent Minimalmedium
v/v	Volumenprozent
XHR	extreme high resolution (engl. für extrem hochauflösend)

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti aus der Abteilung für experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaft danke ich sehr für die interessante Aufgabenstellung dieser Arbeit, wie für die Nutzung der Labore und die Fähigkeit lösungsorientiert mit Begeisterung die Forschung zu unterstützen. Herrn Prof. Dr. Karsten Niehaus aus der Abteilung für Proteom- und Metabolomforschung danke ich sehr für seine ständige Gesprächsbereitschaft und die Fähigkeit andere Menschen mit seiner wissenschaftlichen Neugier anzustecken. Frau Prof.in Dr. Anke Becker aus der Abteilung für Molekulare Genetik der Universität Freiburg möchte ich besonders für die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Langzeitbeobachtungen lebender Zellen danken. Herrn Prof. Dr. Andreas Hütten danke ich sehr für die XHR SEM Abbildungen meiner Probe, die im Rahmen einer Demonstration von FEI in Eindhoven entstanden sind. Frau Assistant Professor Ph.D. Alexandra Ros danke ich für die Betreuung zu Beginn dieser Arbeit. Frau Dr. Katja Tönsing (AOR) danke ich für viele nette Gespräche und die Sicherheit im Labor. Herrn Dr. Jan Regtmeier danke ich sehr für die zielstrebige Fortführung der Betreuung der Mikrofluidik-Gruppe in der Abteilung für experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaft. Frau Dr. Nataliya Pobigaylo danke ich für die Herstellung der Mutanten, welche für die Langzeitbeobachtungen lebender Zellen verwendet worden sind. Herrn Dr. Mark Schüttpelz danke ich für die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren der Tryptophan-Lösungen bei verschiedenen pH-Werten und die Durchführung der Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung. Herrn Dr. Jörg Martini, Dr. Andy Sischka und Herrn Dr. Volker Walhorn danke ich für die Gesprächsbereitschaft und Hilfe bei Fragen zur Optik, die anfangs noch Neuland für mich war. Herrn Dr. Nickels Jensen danke ich sehr für die hilfreichen Hinweise im Umgang mit den Insektenzellen. Besonders großer Dank gilt Herrn Dipl.Ing. Christoph Pelargus für die Unterstützung beim Aufbau der parallelen Detektion, die Programmierung des DSP, nützliche Hinweise im Umgang mit dem Elektronenmikroskop und viele unterhaltsame Gespräche. Desweiteren möchte ich ausdrücklich meinen Bürokollegen danken, insbesondere Lukas Galla, mit dem ich zusammen Messungen mit paralleler UV/VIS-LIF Detektion durchgeführt habe, und Lukas Bogunovic gebührt dies auf außerordentliche Weise für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber auch Olaf Schulz, Katja Brandt, Sven Proppert, Sonja Wegener und Shikri Akbaba. Gleiches gilt auch für Henning Höfemann, Stefan Gerkens, Sebastian Zünkeler, Sebastian Horstmeier und Alexander Harder aufgrund wissenschaftlicher und humoristisch angehauchter Unterhaltungen. Dies gilt auch für Herrn Dipl. Chem. Daniel Wesner, dem ich zusätzlich aufgrund der AFM Abbildungen von den *S. meliloti* Bakterien zu Dank verpflichtet bin.

Hanna Bednarz, meiner „Lebensabschnittsgefährtin“ während dieser Arbeit danke ich besonders für ihre Rücksichtnahme an Tagen, die vom Stress regiert waren, wie für ihren Humor, der mich immer wieder aufmuntern konnte und unendlich vieles mehr. Natürlich danke ich auch dem ganzen Rest meiner Familie und meinen Freunden und Bekannten, die fast immer Verständnis zeigten wenn ich aufgrund der vielen Arbeit öfter keine Zeit für Sie hatte. Letztlich möchte ich meinen Eltern Ingrid Stevens und Herbert Greif meinen größten Dank aussprechen für die durch Papst Pius, den XI und seine Enzyklika Casti connubii unterstützte Ermöglichung meiner Existenz, aber auch weit darüber hinaus durch unterschiedlichste Hilfe in Situationen in denen ich mich hilflos fühlte, auch für die Rücksichtnahme, wie das Vertrauen und den Glauben an meine Person und ganz besonders für alles, was ich von Ihnen lernen durfte.

10 ANHANG

10.1 PUBLIKATIONEN

Improved native UV laser induced fluorescence detection for single cell analysis in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices.

Hellmich W, Greif D, Pelargus C, Anselmetti D, Ros A.

J Chromatogr A. 2006 Oct 20;1130(2):195-200. Epub 2006 Jun 30.

Systems nanobiology: from quantitative single molecule biophysics to microfluidic-based single cell analysis.

Martini J, Hellmich W, Greif D, Becker A, Merkle T, Ros R, Ros A, Toensing K, Anselmetti D.

Subcell Biochem. 2007;43:301-21. Review.

Single Cell Analysis by Native UV Laser Induced Fluorescence Detection in a PDMS Microfluidic Chip;

D. Greif, D. Anselmetti, A. Ros,

Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS)

October 7-11, 2007, Paris, France, 176-178, 2007

Single cell analysis in full body quartz glass chips with native UV laser-induced fluorescence detection.

Greif D, Galla L, Ros A, Anselmetti D.

J Chromatogr A. 2008 Oct 3;1206(1):83-8. Epub 2008 Jul 11.

Single cell analysis in with UV laser-induced fluorescence detection.

D. Greif

separation science. 2009 Feb; 1(2):8 (research round-up)

Single Cell Analysis: Technologies and Applications, Chapter 5. Protein Analysis of Single Cells in Microfluidic Format,

Alexandra Ros and Dominik Greif

p 91-107, March 2009 (online May 2009), WILEY-VCH

On Chip Protein Dynamics in Single Bacteria Cells with Spatio-Temporal Resolution.

D. Greif, N. Pobigaylo, A. Becker, J. Regtmeier and D. Anselmetti,

Thirteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS)

November 1 - 5, 2009, Jeju, Korea, 412-414, 2009.

High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells.

Greif D, Wesner D, Regtmeier J, Anselmetti D.

Ultramicroscopy. 2010 Sep;110(10):1290-6. Epub 2010 Jun 8.

Space- and time-resolved protein dynamics in single bacterial cells observed on a chip.

Greif D, Pobigaylo N, Frage B, Becker A, Regtmeier J, Anselmetti D.

J Biotechnol. 2010 Sep 15;149(4):280-8. Epub 2010 Jun 25.

High Resolution Imaging of Dried and Living Single Bacterial Cell Surfaces: Artifact or Not?.

D. Greif, D. Wesner, D. Anselmetti, and J. Regtmeier,

Microscopy Today, 2011 Sep;19(5):22-25.

Microfluidic carbon-blackened polydimethylsiloxane device with reduced ultra violet background fluorescence for simultaneous two-color ultra violet/visible-laser induced detection in single cell analysis.

L. Galla, D. Greif, J. Regtmeier, and D. Anselmetti,

Biomicrofluidics, 2012 March;6(1):014104-014104-10.

10.2 KONFERENZBEITRÄGE

Towards Molecular Systems Biology Workshop at ZiF in Bielefeld, Germany, June 6-9, 2006

Nanotech Montreaux 2006, Switzerland, November 14-16, 2006

Poster: "Native UV laser induced fluorescence detection for single cell analysis in microfluidic devices"

=> Poster Award Winner for the best poster presentation.

3rd Conference on Single Cell Analysis in Münster, Germany, December 4-5, 2006

Poster: "Native UV-LIF detection for single cell analysis in microfluidic devices"

EuroNanoforum 2007 Nanotechnology in Industrial Applications in Düsseldorf, Germany, June 19-21, 2007

Exhibition for Bielefeld University: "Lab-on-a-Chip: Mikro- und Nanofluidik für Einzelzellanalytik und Analytische Trennverfahren"

Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS)

October 7-11, 2007, Paris, France

Poster: "Single Cell Analysis by Native UV Laser Induced Fluorescence Detection in a PDMS Microfluidic Chip"

DPG-Frühjahrstagung 2008 in Berlin, Germany, February 25-29, 2008

Poster: "Native UV laser induced fluorescence detection for single cell analysis in a hybrid PDMS-Quartz microfluidic chip"

MicroScale Bioseparations (msb) Methods for Systems Biology in Berlin, Germany, March 9-13, 2008

Poster: "Single Cell Analysis In Full Body Quartz Glass Chips With Native UV Laser Induced Fluorescence Detection"

DPG-Frühjahrstagung 2009 in Dresden, Germany, March 22-27, 2009

Talk: "Spatio-Temporal Protein Dynamics in Single Bacteria Cells on Chip"

Biolmaging Symposium at ZiF in Bielefeld, Germany, August 25-27, 2009

Thirteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS)

November 1 - 5, 2009, Jeju, Korea, 412-414, 2009

Poster: "On Chip Protein Dynamics in Single Bacteria Cells with Spatio-Temporal Resolution"

nanobio-europe 2010 in Münster, Germany, June 15-17, 2010

Talk: "Life cell imaging: spatio-temporal protein dynamics in single bacteria"

DPG-Frühjahrstagung 2011 in Dresden, Germany, March 13-18, 2011

Talk: "High resolution imaging of the surface of single bacterial cells"