

**Björn Reiß**

**Mikrogravimetrische Untersuchung des Adhäsionskontakts  
tierischer Zellen:  
Eine biophysikalische Studie**

**- 2004 -**

**Biochemie**

**Mikrogravimetrische Untersuchung des Adhäsionskontakts**

**tierischer Zellen:**

**Eine biophysikalische Studie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Björn Reiß**

aus Hamm

**- 2004 -**

Dekan:

Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. J. Wegener

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Galla

Tag der mündlichen Prüfung:

23.11.2004

Tag der Promotion:

23.11.2004

*Meinen Eltern und Edith*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Molekulare Komposition des Adhäsionskontakts.....	1
1.1.1	Extrazelluläre Matrix.....	2
1.1.2	Zell-Matrix-Kontakte .....	3
1.2	Quantifizierung biologischer Adsorptionsprozesse mit der Quarzmikrowaage ....	4
1.3	Elektrische Untersuchung des Adhäsionskontakts zwischen Zelle und Substrat.....	8
1.4	Optische Untersuchung des Adhäsionskontakts zwischen Zelle und Substrat ....	12
1.5	Biophysikalische Untersuchungen zur Cytoskelett-vermittelten Mikromechanik der Zelle .....	15
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>19</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	19
3.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	19
3.1.1.1	Subkultivierung.....	19
3.1.1.2	Kryo-Konservierung .....	20
3.1.2	Isolierung, Anzucht und Kultivierung der verwendeten Zellsorten .....	20
3.1.2.1	Anzucht und Kultivierung von MDCK-Zellen.....	20
3.1.2.2	Anzucht und Kultivierung von bovinen Aortenendothelzellen.....	21
3.1.2.3	Anzucht und Kultivierung humaner Nabelschnur-Endothelzellen .....	22
3.1.2.4	Anzucht und Kultivierung muriner Fibroblasten.....	23
3.1.2.5	Anzucht und Kultivierung von NRK-Zellen .....	23
3.1.2.6	Präparation und Kultivierung von porcinen cerebralen Kapillarendothelzellen .....	23
3.1.2.7	Isolierung und Kultivierung primär kultivierter muriner Kapillarendothelzellen .....	25
3.2	Lichtmikroskopische Methoden.....	26
3.2.1	Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie.....	26
3.2.2	Experimentelle Durchführung .....	31
3.2.2.1	Herstellung der verwendeten FLIC-Chips.....	31
3.2.2.2	Vorbereitung der FLIC-Chips zur Zellkultur .....	32

3.2.2.3	Regeneration der FLIC-Chips.....	32
3.2.2.4	Anfärbung der Zellen mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl- Indocarbocyanin-perchlorat.....	32
3.2.2.5	Aufnahme der Fluoreszenzbilder mittels Aufricht-Mikroskopie.....	33
3.2.2.6	Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten.....	34
3.2.2.7	Errechnung des Zell-Substrat-Abstandes aus den relativen Fluoreszenzintensitäten.....	34
3.2.3	Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts mit TRITC-Phalloidin.....	34
3.3	Impedanzspektroskopie.....	35
3.3.1	Grundlagen der Impedanzspektroskopie.....	35
3.3.2	Auswertung von Impedanzspektren.....	36
3.4	Die Quarz-Mikrowaage-Technik.....	38
3.4.1	Grundlagen der Quarz-Mikrowaage-Technik.....	38
3.4.2	Elektromechanische Kopplung.....	41
3.4.3	Einfluß der elektrischen Kenngrößen auf den Verlauf des Bode- Diagramms.....	42
3.4.4	Beladung des Quarzes mit einer Fremdmasse und einer viskosen Flüssigkeit.....	44
3.4.5	Experimentelle Durchführung.....	45
3.4.5.1	Vorbereitung der Quarzresonatoren zur Zellkultur.....	46
3.4.5.2	Regeneration der Quarzresonatoren.....	46
3.4.5.3	Messaufbau zur impedanzspektroskopischen Untersuchung des Quarzes.....	46
3.4.5.4	Impedanzspektroskopie lebender Zellen im <i>Quarz-</i> und <i>ECIS-Modus</i> .....	48
3.4.5.5	Impedanzspektroskopische Untersuchung fixierter Zellen im <i>Quarz-</i> und <i>ECIS-Modus</i> .....	48
3.4.5.6	Impedanzspektroskopische Untersuchung von Zellen nach Abbau des Aktincytoskeletts.....	49
3.4.5.7	Vernetzung einer Proteinschicht.....	51
3.4.5.8	Osmotischer Einfluß von Glutardialdehyd.....	51
3.4.5.9	Kinetik der Vernetzungsreaktion.....	52
3.4.5.10	Einfluß von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die mikrogravimetrischen Parameter.....	52
3.4.5.11	Mikrogravimetrische Untersuchungen zum fototoxischen Effekt von	

Calcein AM.....	53
3.5 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing .....	54
3.5.1 Analyse der Impedanzspektren zellbedeckter Metallfilmelektroden für zylindrische Zellen .....	55
3.5.2 Analyse der Impedanzspektren zellbedeckter Metallfilmelektroden für Zellen mit ellipsoider Grundfläche.....	57
3.5.3 Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Daten .....	58
3.5.4 Bestimmung des spezifischen Widerstandes $\rho_{\text{sub}}$ zwischen Zelle und Substrat .....	60
3.5.5 <i>Micromotion</i> .....	60
3.5.6 Analyse der <i>Micromotion</i> -Daten .....	61
3.5.7 Experimentelle Durchführung.....	62
3.5.7.1 ECIS-Untersuchungen auf Goldelektroden .....	62
3.5.7.2 ECIS-Untersuchungen auf ITO-Elektroden .....	62
3.5.7.3 Experimenteller Aufbau.....	63
3.5.7.4 Fotolithografische Herstellung der ITO-Substrate .....	64
3.5.7.5 Reinigung der ITO-Substrate.....	64
3.5.7.6 ECIS-Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM.....	64
3.5.7.7 Einsatz von Natriumascorbat als Reduktionsmittel.....	65
3.5.7.8 Einsatz eines Caspase-3-Inhibitors als Nachweis für Apoptose.....	65
3.6 Rasterkraftmikroskopie .....	66
3.6.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie .....	66
3.6.2 Kraft-Abstands-Kurven .....	67
3.6.3 Experimentelle Durchführung .....	69
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>
4.1 Mikrogravimetrische Messungen an unterschiedlichen Zelltypen .....	70
4.1.1 Exemplarische Darstellung der mikrogravimetrischen Parameter von MDCK-2 Zellen .....	70
4.1.1.1 Dämpfungswiderstand R .....	71
4.1.1.2 Induktivität L .....	72
4.1.2 Bestimmung der mikrogravimetrischen Eigenschaften unterschiedlicher primär kultivierter Zellen und Zelllinien aus diversen Geweben.....	73
4.1.2.1 Dämpfungswiderstand R .....	74
4.1.2.2 Induktivität L .....	75

4.2	Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands $d$ mit Hilfe der Fluoreszenz- Interferenz-Kontrastmikroskopie .....	77
4.2.1	Exemplarische Darstellung des Zell-Substrat-Abstands $d$ von MDCK-2 Zellen.....	78
4.2.2	Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands für verschiedene Zelltypen .....	79
4.3	Elektrische Untersuchungen des Adhäsionsbereichs von primär kultivierten Zellen und Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben .....	80
4.3.1	Elektrische Charakterisierung eines konfluenten MDCK-2 Monolayers.....	81
4.3.2	Charakterisierung adhärenter Zellschichten mit der ECIS-Methode .....	85
4.3.3	Bestimmung des spezifischen Elektrolytwiderstands $\rho_{\text{sub}}$ im Adhäsionskontakt .....	90
4.4	Charakterisierung des Adhäsionskontaktes nach chemischer Vernetzung der Proteinbestandteile .....	95
4.4.1	Untersuchung konfluenter MDCK-2 Zellen nach chemischer Vernetzung des Zellproteins mit Glutardialdehyd-Lösung.....	96
4.4.1.1	Mikrogravimetrische Untersuchung der mit Glutardialdehyd behandelten MDCK-2 Zellen .....	96
4.4.1.2	ECIS-Messungen an MDCK-2 Zellen nach Vernetzung der zellulären Proteine mit Glutardialdehyd .....	99
4.4.1.3	Einfluß des Protein- <i>crosslinkings</i> auf die Motilität der MDCK-2 Zellen .....	103
4.4.2	Untersuchung konfluenter MDCK-2 Zellen nach chemischer Vernetzung des Zellproteins mit Paraformaldehyd-Lösung .....	104
4.4.2.1	Mikrogravimetrische Untersuchung der mit Paraformaldehyd behandelten MDCK-2 Zellen .....	105
4.4.2.2	Einfluß auf die elektrischen Parameter der Zellschicht.....	106
4.4.3	Zeitabhängige Untersuchung der Änderung des Dämpfungswiderstandes $R$ eines MDCK-2-Zelllayers nach der Vernetzung zellulärer Proteine mit Glutardialdehyd oder Paraformaldehyd .....	109
4.4.4	Unabhängigkeit des chemisch induzierten Dämpfungswiderstandsanstiegs vom Zelltyp .....	112
4.4.5	Einfluß der Vernetzung einer reinen Proteinschicht auf den Dämpfungswiderstand $R$ .....	113
4.4.6	Osmotischer Einfluß von Glutardialdehyd auf die Zellschicht.....	114

4.4.7	Einfluß der Vernetzungsreaktion auf das Aktin-Cytoskelett.....	115
4.4.8	Einfluß der Proteinvernetzung mit Paraformaldehyd auf den Zell-Substrat-Abstand von MDCK-2 Zellen.....	118
4.4.9	Untersuchung der Elastizitäten nativer und fixierter MDCK-2 Zellen mittels <i>atomic force microscopy</i> (AFM) .....	120
4.4.10	Einfluß von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die elektrischen und mikrogravimetrischen Parameter einer konfluenten MDCK-2-Zellschicht.....	122
4.4.10.1	Einfluß von M $\beta$ CD auf die elektrischen Parameter der Zellschicht.....	122
4.4.10.2	Untersuchung der Wirkung von M $\beta$ CD auf den Dämpfungs-widerstand R .....	126
4.5	Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM .....	127
4.5.1	Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM im <i>Quarz-Modus</i> .....	127
4.5.2	Untersuchungen zur Fototoxizität anhand von ECIS-Messungen .....	128
4.5.3	Untersuchung zum Mechanismus der Fototoxizität.....	130
4.5.3.1	Einsatz von Natriumascorbat als Reduktionsmittel.....	130
4.5.3.2	Einfluß des fototoxischen Effektes auf die drei Zellparameter $R_b$ , $\alpha$ und $C_m$ .....	131
4.5.3.3	Untersuchungen zum Mechanismus des Zelltodes.....	133
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>139</b>
5.1	Mikrogravimetrische Untersuchung des Adhäsionskontakts tierischer Zellen .....	139
5.2	Geometrische Charakterisierung des Adhäsionskontakts mit der FLIC-Mikroskopie .....	142
5.3	Untersuchung tierischer Zellen mit der ECIS-Methode .....	143
5.4	Einfluß der chemischen Vernetzung des zellulären Proteingerüsts auf das QCM-Signal.....	149
5.5	Einfluß von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die elektrischen und mechanischen Eigenschaften von MDCK-2 Zellen .....	156
5.6	Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM .....	159
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>165</b>

**Anhang**

<b>A</b>	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....	174
<b>B</b>	Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten .....	175
<b>C</b>	Geräte / Verbrauchsmaterialien .....	176

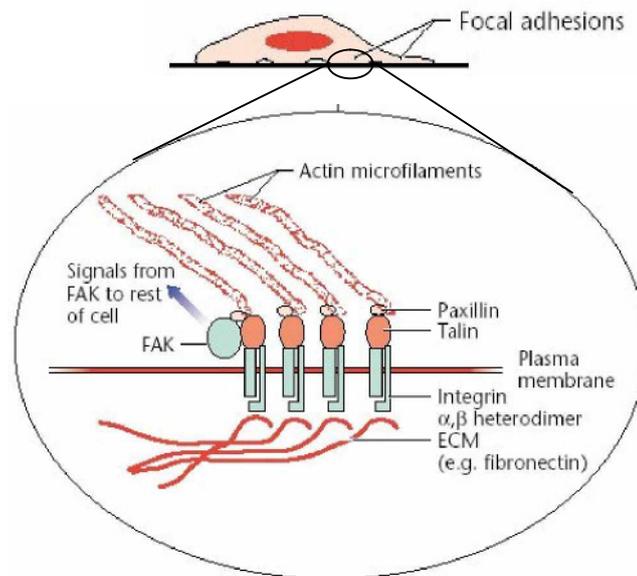
# 1 Einleitung

Viele moderne mikroskopische Techniken, die in der Zellbiologie Verwendung finden, erlauben eine genaue Untersuchung der Zelloberseite. So ermöglichen Methoden wie AFM (*atomic force microscopy*), SICM (*scanning ion-conductance microscopy*), SNOM (*scanning near-field optical microscope*), SEM (*scanning electron microscopy*) und TOF-SIMS (*time-of-flight secondary ion mass spectroscopy*) neben der hochauflösenden Abbildung auch die Bestimmung physikalischer Parameter der Zelloberfläche oder die molekulare Analyse der apikalen Zellkomponenten. Nicht-invasive Techniken, die eine detaillierte Aufklärung der Zellunterseite zulassen, sind dagegen rar. Dabei haben diese Methoden große Bedeutung, um unterschiedliche biochemische und medizinische Fragestellungen beleuchten zu können. So sind derartige Techniken besonders geeignet, um die Biokompatibilität von Materialien zu studieren, die für Prothesen und Implantate verwendet werden. Um eine Abstossungsreaktion des Körpers zu verhindern, ist eine bioverträgliche Oberfläche essentiell. Neben der Charakterisierung funktionalisierter Oberflächen ist auch der Einsatz einer solchen Methode als Biosensor möglich, da sich zelluläre Veränderungen oftmals an der Zellunterseite zeigen. Damit lassen sich sowohl Zellschädigungen als auch biologische Eigenschaften der Zellen detektieren. So kann die Messung der Zellbewegungen wichtige medizinische Informationen liefern, da maligne Tumorzellen eine deutlich erhöhte Motilität besitzen. Eine Abschätzung der Tendenz der jeweiligen Zellsorte zur Metastasierung ist dadurch möglich.

Die Quarzmikrowaage (QCM) ist eine nicht-invasive Methode, die den Zugang zur Unterseite der Zelle ermöglicht und diesen Bereich mit hoher Sensitivität charakterisieren kann. Um diese Technik allerdings zur Detailanalyse der Zell-Substrat-Region einsetzen zu können, ist ein genaues Verständnis des QCM-Signals nötig. Diese Arbeit soll das QCM-Signal anhand der mikrogravimetrischen Untersuchung unterschiedlicher Zelltypen sowie chemisch manipulierter Zellsysteme aufklären.

## 1.1 Molekulare Komposition des Adhäsionskontakts

Als Adhäsionskontakt wird der Bereich zwischen Zelle und proteinbeschichtetem Substrat bezeichnet, der für die Verankerung der Zelle auf der Kulturoberfläche verantwortlich ist. Dies umfasst die basolaterale Membran sowie das darunterliegende Cytoskelett, das die Anknüpfungspunkte zwischen der Zellmembran und den auf dem Substrat immobilisierten Proteinen enthält, sowie die extrazelluläre Matrix (ECM), eine Proteinschicht, die mit diesen Kontaktstellen spezifisch interagiert. Abbildung 1.1 zeigt den schematischen Aufbau des Adhäsionskontakts.



**Abb. 1.1:** Schematischer Aufbau des Adhäsionskontakts (Quelle: Encyclopedia of Life Sciences, <http://www.els.net/>).

### 1.1.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) findet sich in tierischem Gewebe besonders im Bereich von Stütz- und Bindegewebe. Außerdem besteht die Basallamina unterhalb der Blutgefäße und der Epithelien aus einer ca. 50 nm dicken Schicht, die aus ECM-Molekülen zusammengesetzt ist. Die ECM tierischer Zellen lässt sich grob in zwei wesentliche Komponenten unterteilen: eine amorphe Grundsubstanz, die hauptsächlich aus Gelbildnern wie Hyaluronsäure und Proteoglykanen besteht sowie unterschiedliche Faserproteine wie z.B. Elastin und Collagen. Bei Hyaluronsäure handelt es sich um ein großes (Molekulargewicht bis zu  $10^7$  g/mol) Polysaccharid, Proteoglykane sind Proteine, die mit langen Polysaccharidketten verknüpft sind. Beide Molekülklassen besitzen typischerweise an den Zuckereinheiten geladene funktionelle Gruppen (insbesondere Carboxyl-, Amino- und Sulfatreste), die mit Wassermolekülen wechselwirken und so für die Geleigenschaften der ECM verantwortlich sind. Die Faserproteine sind in dieses hochgradig vernetzte Gel eingebunden und ermöglichen unter anderem die Anbindung der Zellen über spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren, die Integrine. Dabei binden unterschiedliche Rezeptortypen selektiv an das entsprechende Protein, wie Collagen, Laminin oder Fibronectin. Die Zusammensetzung verschiedener ECM wird auch mit deren jeweiligen mechanischen Eigenschaften in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass das Verhältnis von relativ unelastischen Fasern wie die von Collagen und den vergleichsweise elastischen Fasern von Proteinen wie Elastin, das zwischen unterschiedlichen Matrices schwankt, maßgeblich an der Regulation der Elastizität der ECM beteiligt ist.

### 1.1.2 Zell-Matrix-Kontakte

Die Anbindung eukaryotischer Zellen an ihr Substrat erfolgt über die spezifische Interaktion zwischen einer Sorte von Haftproteinen (Zelloberflächen-Rezeptoren), den sogenannten Integrinen und der extrazellulären Matrix. Allen Haftproteinen ist gemein, dass sie über eine oder mehrere Transmembrandomänen die Verknüpfung zwischen Intra- und Extrazellularraum herstellen. Die Verknüpfung der Integrine mit unterschiedlichen Komponenten des Cytoskeletts führt zu einer besonderen Stabilität des Zell-Substrat-Kontakts.

#### Fokalkontakte

Fokalkontakte sind die wichtigsten Verbindungen zwischen Zelle und Matrix. Die auch als Adhäsionsplaques bezeichneten Proteinkomplexe enthalten transmembranäre Glykoproteine, die Integrine, die als Rezeptoren für die unterschiedlichen Matrixkomponenten dienen. Bei Integrinen handelt es sich um heterodimere Proteine, deren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit nichtkovalent aneinander binden. Die Untereinheiten weisen strukturell große Ähnlichkeiten auf. Beide bestehen aus einer globulären, extrazellulären Domäne, die die Bindung des Liganden unter Beteiligung zweiwertiger Kationen vermittelt sowie aus einem hydrophoben Teil, der die Zellmembran durchspannt. Eine Kombination der 18 verschiedenen  $\alpha$ - bzw. 8 verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten ist allerdings eingeschränkt, es sind bisher lediglich 24 Integrin-Subtypen bekannt, die als spezifische Rezeptoren dienen. Die Bindung der Integrine an das Substrat erfolgt über Bindungsmotive, die von den ECM-Proteinen präsentiert werden und meist aus kurzen Aminosäuresequenzen bestehen. Die bedeutendste Sequenz ist Arg-Gly-Asp (RGD), die in vielen Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Laminin vorkommt.

Der cytoplasmatische Teil der Integrine ist über die  $\beta$ -Untereinheit an das Aktincytoskelett gekoppelt. Dabei verknüpfen Proteine wie Talin, Vinculin oder Paxillin die an einem Fokalkontakt lokal angehäuften Integrine mit den Enden einzelner Aktinfilamente, die teilweise die gesamte Zelle durchspannen. Die Ausrichtung dieser sogenannten Stressfasern folgt häufig der Orientierung der ECM-Moleküle.

#### Hemidesmosomen

Hemidesmosomen sind strukturell ebenso wie die Fokalkontakte aus einer Anhäufung von transmembranären Glykoproteinen aufgebaut. Die Hemidesmosomen setzen sich aber im Gegensatz zu den Fokalkontakten nur aus einem speziellen Integrin-Subtyp ( $\alpha_6\beta_4$ ) zusammen,

der mit Laminin interagiert. Dieser Integrintyp vermittelt die Verbindung zwischen ECM und den Intermediärfilamenten, die als ein Teil des Cytoskeletts das gesamte Cytosol durchziehen. Die Intermediärfilamente besitzen im Gegensatz zu den Mikrofilamenten keine dynamischen, sondern eher statische Eigenschaften und tragen zu Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber mechanischem Stress bei.

## 1.2 Quantifizierung biologischer Adsorptionsprozesse mit der Quarzmikrowaage

Die Quarzmikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) wird schon seit beinahe 50 Jahren zur Quantifizierung von Adsorptionsprozessen eingesetzt. Im Zentrum des Messaufbaus steht ein Schwingquarz, auf den zwei Metallelektroden aufgedampft sind. Die Applikation einer Potentialdifferenz sorgt aufgrund der piezoelektrischen Eigenschaften des Quarzmaterials für eine mechanische Scherauslenkung des Resonators (*AT-cut* Quarz). Das Prinzip der Messung beruht nun darauf, dass die elektrisch angeregte, mechanische Schwingung gegenüber Oberflächenprozessen sehr sensitiv ist.

### Detektion molekularer Adsorptionsprozesse mit der QCM

Eine Anwendung der QCM auf biologische Fragestellungen war bis zur Mitte der achtziger Jahre nicht möglich, da die für diese Zwecke nötige wässrige Umgebung für eine viskose Dämpfung der Scheroszillation sorgte, die mit den zu diesem Zeitpunkt verfügbaren elektrischen Treibern zur Kompensation der Dämpfungsverluste nicht ausgeglichen werden konnte. Die Möglichkeiten der Mikrogravimetrie in der Bioanalytik lassen sich auf zwei verschiedene Arten nutzen. Zum einen kann der Quarz als frequenzbestimmendes Glied auf seiner Resonanzfrequenz unterstützt werden („aktive“ QCM). Dabei werden nur die entstehenden Reibungsverluste durch die elektronische Schaltung ausgeglichen und die Änderung der Resonanzfrequenz gegen die Zeit verfolgt. Schon Sauerbrey konnte 1959 den proportionalen Zusammenhang zwischen der Änderung der Resonanzfrequenz eines an Luft schwingenden Quarzes und einer abgeschiedenen, rigiden Fremdmasse finden. Da diese Methode die Detektion von Massen bis in den Nanogrammereich erlaubte, wurden solche Schwingquarze schon früh für analytische Zwecke genutzt, so z.B. zur Schichtdickenbestimmung in Aufdampfanlagen. Aber erst die Entwicklung leistungsfähiger Schaltkreise zur Unterstützung stark gedämpfter Oszillationen bereitete den Weg zur Anwendung der QCM als Biosensor. Die Resonanzfrequenz des Oszillators in einer Newton'schen Flüssigkeit ist hochsensitiv sowohl gegenüber reinen Massenabscheidungen als auch gegenüber Dichte- und Viskositätsänderungen des Mediums (Gordon und Kanazawa,

1985). Eine Diskriminierung zwischen diesen beiden Einflüssen ist aber nur anhand der Änderung der Resonanzfrequenz nicht möglich.

Zum anderen lässt sich ein solcher Resonator auch passiv mittels Impedanzspektroskopie in der Nähe seiner Resonanzfrequenz untersuchen. Eine Analyse der Impedanzspektren mit einem geeigneten Ersatzschaltbild ermöglicht die Unterscheidung zwischen Abscheidungen rigider Massen und Änderungen der Oszillation, die mit Dichte- und Viskositätsänderungen einhergehen. Aufgrund der piezoelektrischen Kopplung im Quarzmaterial ist es möglich, die mechanische Schwingung mit einem elektrischen Ersatzschaltbild zu beschreiben (Bottom, 1982). Dies eröffnet einen Zugang zu materialspezifischen Eigenschaften des Quarzes sowie der aufgetragenen Fremdmasse. Ein auf die wässrige Umgebung biologischer Anwendungen angepasstes elektromechanisches Modell der Quarzoszillation wurde 1991 von Martin et al. vorgestellt und ermöglichte sowohl die Beschreibung der Abscheidung einer rigiden Fremdmasse wie auch simultan die einer viskosen Beladung anhand von Parametern eines Ersatzschaltbildes. Allerdings geht der höhere Informationsgehalt der „passiven“ QCM zu Lasten der Sensitivität und der Zeitauflösung der Messung.

Der Vorteil der hohen Empfindlichkeit machte die „aktive“ QCM zu einem nützlichen Werkzeug zur Untersuchung unterschiedlicher Adsorptionsprozesse und machte Studien wie die von Muramatsu et al. (1987) möglich, die die Anbindung von Immunoglobulinen an eine Protein A-funktionalisierte Quarzoberfläche detektierten. In ähnlicher Art und Weise konnten Janshoff et al. (1996) die spezifische Anbindung von Agglutinin aus der Erdnuss an GM1-funktionalisierte Lipiddoppelschichten zeigen. Die zeitliche Änderung der Resonanzfrequenz erlaubt es anhand von solchen Experimenten auf Bindungskonstanten und Bindungskinetiken der beteiligten Reaktionspartner zu schließen. König und Grätzel (1994) entwickelten auf der Basis eines Antikörper-beschichteten Schwingquarzes einen Biosensor zur Detektion unterschiedlicher Typen von Herpes-Viren, der ohne messbaren Aktivitätsverlust mehrfach verwendet werden konnte.

### **Detektion zellulärer Adsorptionsprozesse mit der QCM**

Die außerordentlich gute Zeitauflösung und die hohe Empfindlichkeit der Detektion von Effekten nahe der Quarzoberfläche machte die QCM auch für die Beobachtung von komplexen Vorgängen wie das Anbinden und Spreiten von Zellen auf ihren Substraten interessant. Das Adhäsionsverhalten von Verozellen (Gryte et al., 1993) und Ratten-Osteoblasten (Redepenning et al., 1993) wurde mit Hilfe der Quarzmikrowaage studiert. Wegener et al. (1999) untersuchte in Adhäsionsexperimenten mehrere Zelltypen und konnte

für die verschiedenen Zellsorten jeweils unterschiedliche resultierende Resonanzfrequenzänderungen finden. Weiterhin konnten die Autoren den Adhäsionsprozess der Zellen durch spezifisch an die Integrine bindende Peptide inhibieren und somit nachweisen, dass nur die spezifische Integrin-vermittelte Zelladhäsion mit der QCM detektierbar ist.

Ein Problem der „aktiven“ QCM ist allerdings, dass allein über die Analyse der Resonanzfrequenzänderung keine Aussage über die Art und Beschaffenheit der Quarzbeladung gemacht werden kann. So führt sowohl die Adhäsion einer rigiden Masse zu einem Abfall der detektierten Frequenz als auch die Anbindung von Materialien mit viskosen, energiedissipierenden Eigenschaften. Dies ist insbesondere für die Untersuchung zellulärer Systeme von Belang. Rodahl et al. (1997) präsentierten eine Möglichkeit, die durch die Beladung des Quarzes hervorgerufene Energiedissipation parallel zur Frequenzänderung zu detektieren. Die sogenannte D-QCM erlaubt daher eine wesentlich eindeutigeren Interpretation der gemessenen Resonanzfrequenz und bietet einen Zugang zu den intrinsischen Eigenschaften der adsorbierten Spezies. Cans et al. (2001) untersuchten mit der D-QCM die Dynamik exocytotischer Prozesse zweier unterschiedlicher Zelllinien. Reiss et al. (2003) nutzten diese Technik, um die Adhäsion funktionalisierter Vesikel und die von Säugetierzellen zu vergleichen. Dabei konnten in beiden Fällen ähnliche Änderungen der Resonanzfrequenz und des Dissipationsfaktors festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Impedanzanalyse eines zellbedeckten Resonators, auch als „passive“ QCM bezeichnet, erreicht zwar nicht die Sensitivität und die Zeitauflösung der „aktiven“ QCM, ermöglicht dafür aber die Bestimmung und Unterscheidung von Materialeigenschaften der Beladung und somit eine wesentlich eindeutigeren Interpretation von komplexen Oberflächenprozessen. Untersuchungen von Janshoff et al. (1996) stellten eine auf die MDCK Zellen zurückzuführende Dissipation der Scherwelle fest, die zeigt, dass sich Zellen auf einem Resonator eher nicht wie eine rigide Masse, sondern wie eine verlustbehaftete Schicht verhalten. Die Autoren simulierten die auf die Anwesenheit der Zellschicht zurückzuführende Änderung des Dämpfungswiderstandes durch Glycerin/Wasser-Gemische bekannter Viskosität und Dichte und berechneten so die Viskosität der untersuchten Zellschichten. Das Ergebnis war um Größenordnungen kleiner als die literaturbekannten Daten, was auf den unbekanntem akustischen Einfluss des mit Wasser und Proteinen gefüllten Spaltes zwischen der Quarzoberfläche und den Zellen zurückgeführt wurde. Eine geringere Viskosität dieser Schicht im Vergleich zu den darüberliegenden Zellen

könnte die Scherwelle vor dem Eindringen in die Zelle dämpfen und so die Unterbestimmung der Viskosität erklären.

Eine von Wegener et al. (2000) anhand unterschiedlicher Zelllinien durchgeführte Untersuchung sollte einen Zusammenhang zwischen spezifischen Zelleigenschaften und korrespondierenden Änderungen der mikrogravimetrischen Parameter herstellen. Dazu wurden Epithelzellen verwendet, von denen bekannt ist, dass sie mit dem größten Teil der basolateralen Membran fest auf dem Substrat adhären, wie auch Fibroblasten, die die Kulturoberfläche nur an einigen Stellen in vergleichsweise kleinen Bereichen berühren, während der große Teil der Zellmembran weiter vom Substrat entfernt ist. Die für die einzelnen Zelllinien ermittelten mikrogravimetrischen Parameter ließen sich mit diesen Zelleigenschaften gut korrelieren. So konnten die Autoren zeigen, dass 3T3 Fibroblasten eine deutlich kleinere Änderung des Dämpfungswiderstands und der Induktivität induzieren als MDCK-2 Zellen. Offensichtlich wirkt sich der Abstand der Zellmembran zum Substrat auf die Oszillation aus.

Um aufzuklären, ob eine Verankerung der Zellen am Kultursubstrat nötig ist, um die Oszillation des Resonators zu beeinflussen oder ob die Präsenz des Zellkörpers allein ausreicht, wurde von den Autoren Aussaatstudien mit MDCK-2 Zellen unter Zusatz des Pentapeptids GRGDS durchgeführt. GRGDS bindet kompetitiv an verschiedene zelluläre Integrine und verhindert so eine Anheftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix. Diese Adhäsionsexperimente zeigen, dass ohne eine spezifische, integrin-medierte Zelladhäsion keine Beeinflussung der Scherschwingung durch die Zellschicht erfolgt.

Die Auswirkung der unter der Zellschicht liegenden ECM auf die mikrogravimetrischen Parameter beschränkt sich nach Wegener et al. (2000) fast vollständig auf einen Beitrag zur Induktivität. Ein Vergleich zwischen einer exogen aufgetragenen und der endogen sekretierten Proteinschicht ergab keinen wesentlichen Unterschied. Die Autoren führen die durch eine Zellschicht hervorgerufene Induktivitätsänderung zumindest zum Teil auf die extrazelluläre Matrix zurück.

Der Beitrag des Aktincytoskeletts, das als Aktincortex unterhalb der Zellmembran liegt und in Form der sogenannten Stressfasern mit den Zell-Substrat-Kontakten in Verbindung steht, zum QCM-Signal einer Zellschicht wurde durch eine selektive Zerstörung dieser Proteinfilamente mit Cytochalasin D nachgewiesen. Die dadurch ausgelöste Depolymerisation bewirkt einen deutlichen Rückgang von Dämpfungswiderstand und Induktivität. Dies wurde von den Autoren auf den kompletten Abbau der Stressfasern zurückgeführt und zeigt, dass es mit der QCM möglich ist, substratnahe Veränderungen des Aktincytoskeletts zu detektieren.

Ein Erhöhung der Viskosität des Kulturmediums über einer Zellschicht durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP), die sich lediglich auf der apikalen Zellseite bemerkbar macht, ändert dagegen das mikrogravimetrische Verhalten der Zellschicht nicht und weist nach, dass die Sensitivität des Resonators lediglich substratnahe Veränderungen erfasst. Einen Anstieg der Osmolarität des Mediums durch Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von Saccharose, wie sie von Wegener et al. (2000) untersucht wurde, erhöht dagegen den Dämpfungswiderstand und die Induktivität drastisch. Hierbei handelt es sich allerdings um einen Effekt, der indirekt Einfluss auf die Oberfläche des Oszillators nimmt. Die Autoren schreiben diesen aber weniger der osmotischen Schrumpfung des Zellkörpers zu sondern eher dem bei barrierebildenden Zellen wie den hier verwendeten MDCK-2 Zellen auftretenden transepithelialen Wasserflusses aus dem Adhäsionskontakt in das über den Zellen liegende Kulturmedium. Dadurch kann eine Änderung des Zell-Substrat-Abstands, eine veränderte Viskosität im Adhäsionskontakt und somit möglicherweise eine veränderte Kopplung der Zellen an den Quarz induziert werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die QCM sehr sensitiv für Veränderungen des Adhäsionskontakts ist und sich somit zur Untersuchung dieser Region anbietet. Gleichzeitig haben offensichtlich verschiedenste Parameter wie die einzelnen Komponenten des Zell-Substrat-Kontakts oder die Distanz zum Substrat einen Einfluss auf Dämpfungswiderstand und Induktivität. Dies erschwert eine genaue Analyse und die direkte Interpretation der jeweiligen Effekte.

### **1.3 Elektrische Untersuchung des Adhäsionskontakts zwischen Zelle und Substrat**

Zur genauen Interpretation der QCM-Messungen ist es nötig, den Zusammenhang zwischen den einzelnen Komponenten des Adhäsionskontaktes und den mikrogravimetrischen Messungen herstellen zu können. Spezielle elektrochemische Untersuchungsmethoden bieten die Möglichkeit, den Adhäsionskontakt von Zellen elektrisch zu charakterisieren. Eine Korrelation von mikrogravimetrischen und elektrochemischen Daten sollte darum zu einem genaueren Verständnis der Zusammensetzung des QCM-Signals führen. Ein geeignetes Verfahren um Änderungen der elektrischen Eigenschaften von adhären Zellen mit hoher Zeitauflösung zu quantifizieren, ist die ECIS- (*electric cell-substrate impedance sensing*) Technik. Dieses Verfahren, das die Kultivierung der zu untersuchenden konfluenten Zellschichten auf einer Metallfilmelektrode erfordert, wurde 1984 zum ersten Mal von Giaever und Keese beschrieben und in weiteren Arbeiten etabliert (1991; 1993). Das Prinzip

der Methode beruht auf der Applikation einer sinusförmigen, nicht-invasiven Wechselspannung variabler Frequenz und kleiner Amplitude von wenigen mV auf die Zellschicht. Die Messung des resultierenden Stroms ermöglicht die Bestimmung des Wechselstromwiderstandes des Zelllayers in Abhängigkeit von der Frequenz. Die hohe Empfindlichkeit des ECIS-Verfahrens bei gleichzeitiger Zeitauflösung von weniger als einer Sekunde eröffnet die Option zur Aufzeichnung und Analyse von kleinsten Zellbewegungen. Diese sogenannten *micromotion* äußern sich in geringen Fluktuationen der Impedanz, die maßgebliche Informationen über den Stoffwechselzustand und die Vitalität von Zellen liefern (Lo et al., 1993; 1994). Neben dieser sehr sensitiven aber vom Informationsgehalt limitierten Betriebsart können auch in einem definierten Frequenzbereich aufgezeichnete Impedanzspektren mehrparametrische Informationen über die Zellschicht liefern. Eine mathematische Anpassung der Spektren nach Wegener et al. (2000) ermöglicht die Beschreibung der Zellform anhand von drei Parametern. Dadurch lassen sich Impedanzänderungen konkret auf die Beiträge einzelner Zellbereiche zurückführen. Konkret ist die Beschreibung der Zellform anhand des parazellulären Widerstandes  $R_b$ , der die Stärke der Zell-Zell-Kontakte quantifiziert, der Kapazität  $C_m$ , die Aussagen über die Oberfläche der Zellmembran erlaubt, sowie des Impedanzbeitrages  $\alpha$  möglich, der den Adhäsionskontakt elektrisch charakterisiert. Das ECIS-Verfahren wurde in dieser Arbeit in einem experimentellen Aufbau mit der Untersuchung der mikrogravimetrischen Parameter (*Quarz-Modus*) eingesetzt. Die gemessenen elektrischen Daten wurden somit unter den exakt gleichen Bedingungen wie die mikrogravimetrischen Daten erhoben. Dies sollte zur Analyse der Resultate eine breitere Interpretationsbasis ermöglichen.

Die ECIS-Technik fand aufgrund des breiten Anwendungsspektrums und der großen Sensitivität gegenüber kleinsten Morphologieänderungen von Zellen schon vielfache Anwendung. Wang et al. (1995) untersuchten die Morphologieänderung von dermalen Fibroblasten und Fibroblasten der Augenhöhle nach Zugabe von Prostaglandin E2 sowohl mikroskopisch wie auch elektrisch. Die Autoren konnten nur für die Augenhöhlenfibroblasten eine sternförmige Verformung der Zellen feststellen. Diese Morphologieänderung wurde von einem starken Abfall der Impedanz in den ECIS-Messungen begleitet. Die den Impedanzabfall induzierende Änderung der Zellform wurde von den Autoren auf einen drastischen Anstieg des cAMP-Spiegels in den Zellen zurückgeführt. Wegener et al. (2000) setzten das ECIS-Verfahren in Adhäsions-Assays ein, um das Adhären und Spreiten von Zellen zeitaufgelöst zu verfolgen. Anhand der Kinetik ließen sich Aussagen über die Stärke der Interaktionen zwischen Zelle und dem jeweiligen unterschiedlich beschichteten Substrat

machen. Das breite Anwendungsspektrum der Technik zeigen auch Untersuchungen zur metastatischen Aktivität einzelner Tumorzelllinien gegenüber einem konfluenten Zellmonolayer (Keese et al., 2002) sowie mehrere weitere Studien, in denen zellbedeckte Elektroden als Biosensor gegenüber cytotoxischen Schadstoffen eingesetzt wurden (Luong et al., 2001; Xiao und Luong, 2003). Arndt et al. (2004) konnten zeigen, dass sich auch zellbiologisch äußerst komplexe Phänomene wie die Apoptose von Endothelzellen mit dem ECIS-Verfahren charakterisieren und die dabei auftretenden Änderungen der Zellform zeitlich verfolgen lassen.

Lo et al. (1998) nutzten die Sensibilität der Methode gegenüber Veränderungen im zellulären Adhäsionskontakt. Die Autoren bestimmten aus elektrischen Messungen den mittleren Zell-Substrat-Abstand, während die Zellen unter vertikalen Zugstress gesetzt wurden. Dazu wurden Collagen beschichtete Eisenoxid-Partikel auf die apikale Seite der Zellen gegeben, wo sie spezifisch mit den dort befindlichen Integrine interagierten. Über Permanentmagneten wurden dann Vertikalkräfte auf die Zellen appliziert. Da der aus den ECIS-Messungen ermittelbare Impedanzbeitrag  $\alpha$  vom Zell-Substrat-Abstand abhängt, ist eine geometrische Veränderung des Adhäsionskontakts detektierbar. Eine Auswertung der ECIS-Daten zeigte eine darauf zurückzuführende Zunahme des Zell-Substrat-Abstands zwischen 10 und 25 Prozent. Der Impedanzbeitrag  $\alpha$  ermöglicht aber nicht nur den Zugang zum Zell-Substrat-Abstand, sondern hängt auch mit dem mittleren Radius der Zellen sowie dem spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt zusammen. Die Bestimmung eines Parameters ist aber nur bei Kenntnis der beiden anderen möglich. Während der mittlere Zellradius mikroskopisch einfach ermittelt werden kann, ist eine Errechnung des Zell-Substrat-Abstandes aus experimentell bestimmten  $\alpha$ -Werten nicht durchführbar, ohne dass der spezifische Widerstand bekannt ist. So wird in Untersuchungen, die anhand von ECIS-Messungen auf den Abstand zwischen Zelle und Substrat schließen, in der Regel der spezifische Widerstand des überstehenden Mediums eingesetzt (Lo et al., 1998; Lo et al., 1999). Diese Vereinfachung kann aber zu signifikanten Verfälschungen des Messergebnisses führen, falls sich der spezifische Widerstand im Spalt wesentlich von dem des Mediums unterscheidet oder im Gegensatz zur Annahme ein dynamisches Verhalten aufweist. Lo et al. (1995) haben unter der Annahme, dass der spezifische Widerstand im Spalt  $60 \Omega\text{cm}$  beträgt, den Abstand von MDCK-2 Zellen zum Substrat zu weniger als 1 nm bestimmt. Ein Zell-Substrat-Abstand in dieser Größe ist nicht denkbar, da sowohl die Glykokalix wie auch die extrazelluläre Matrix eukaryotischer Zellen schon wesentlich mehr Platz benötigen.

Über den spezifischen elektrischen Widerstand zwischen Zelle und Substrat ist aufgrund fehlender Untersuchungen beinahe nichts bekannt. Erst die Arbeitsgruppe um Prof. Fromherz betrachtete die elektrischen und geometrischen Verhältnisse in der Zell-Substrat-Region im Rahmen von Arbeiten zur Neuron-Silizium-Kopplung genauer. So wurde der Zelle-Halbleiter-Kontakt in einem theoretischen Ansatz von Weis et al. (1997) als Kernmantel-Leiter beschrieben. Dabei trennen die nichtleitende basolaterale Membran der Zelle und die Siliziumdioxidschicht auf dem *gate* des Halbleiters die Elektrolytschicht im Spalt vom leitenden Cytoplasma bzw. dem Silizium. Die Übertragung der elektrischen Situation in ein Ersatzschaltbild (Punkt-Kontakt-Modell) ermöglichte den Autoren die Berechnung des spezifischen Membranwiderstandes sowie des Flächenwiderstandes zwischen Zelle und Substrat. Diese Erkenntnisse wurden dann zur Interpretation von Messungen der Neuronentransistoren und auch für Berechnungen des Zell-Substrat-Abstands herangezogen. Allerdings ging auch in diesem Fall lediglich der spezifische Widerstand des überstehenden Mediums in die Kalkulation ein. Eine experimentelle Bestimmung des spezifischen Widerstandes im Bereich von Zelle und Substrat gelang erst Kiessling et al. (2000). Die Autoren verwendeten Erythrozyten, die mit Hilfe einer Polylysin-Beschichtung auf ein Substrat mit einem integrierten Transistoren-Array aufgebracht wurden. Über das Medium wurde dann eine Wechselspannung in einem definierten Frequenzfenster appliziert und die jeweils resultierende Spannung im Spalt über die Transistoren registriert. Die Auswertung dieser Daten mit Hilfe des Punkt-Kontakt-Modells ermöglichte auch hier die Berechnung des Flächenwiderstandes im Zell-Substrat-Bereich. Um aus diesem den spezifischen Widerstand bestimmen zu können, ist die Breite des Subzellularraumes erforderlich. Die Autoren verwendeten die FLIC-Mikroskopie (s. 1.4) bei gleichen experimentellen Bedingungen, um den Abstand messen zu können. Die Kombination der beiden Techniken erlaubte schließlich die Errechnung des spezifischen Widerstandes unter der Zelle und somit eine Charakterisierung des Adhäsionskontaktes hinsichtlich der Elektrolytleitfähigkeit. Die Autoren stellten fest, dass der spezifische Elektrolytwiderstand im Spalt im Gegensatz zur allgemeinen Annahme etwa viermal so groß war, wie der Elektrolytwiderstand des Kulturmediums. Die möglicherweise aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung geringere Dichte freier Ionen sowie eine reduzierte Beweglichkeit im schmalen Spalt wurden von den Autoren als mögliche Gründe angeführt.

#### 1.4 Optische Untersuchung des Adhäsionskontakts zwischen Zelle und Substrat

Die Untersuchung des Adhäsionskontaktes vitaler Zellen mit Hilfe optischer Methoden wird schon seit 40 Jahren vorgenommen. 1964 stellte Curtis die Reflektions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) vor, die zehn Jahre später zur Entdeckung spezieller Zell-Substrat- und Fokalkontakte führte (Abercrombie und Dunn, 1975; Izzard und Lochner, 1976) und keine spezielle Markierung der Zellen erfordert. Die auf einer Glasoberfläche kultivierten Zellen werden lediglich mit einer inversen Optik von der Unterseite beleuchtet. Die Lichtstrahlen werden dann zum einen an der Grenzfläche zwischen Glas und dem unter der Zelle befindlichen dünnen Flüssigkeitsfilm partiell reflektiert, zum anderen an der Grenzfläche zwischen der Flüssigkeit und der Zellmembran. Die Überlagerung der reflektierten Strahlen führt schließlich zu Interferenz. Dadurch erscheinen Bereiche engen Zell-Substrat-Kontakts dunkel, während Stellen, an denen keine Zellen adhären, hell sind. In jüngerer Zeit wurde die RIKM vor allem zur Analyse der physikalischen Mechanismen der Zelladhäsion (Owens et al., 1988) sowie in Kombination mit Videotechnik und digitaler Bildaufnahme zur Beobachtung von dynamischen Prozessen eingesetzt (Schindl et al., 1995; Weber et al., 1995). Eine andere Technik, die sich zur Untersuchung des Zell-Substrat-Bereichs lebender Zellen eignet, ist die TIRF (*total internal reflection*)-Mikroskopie. Diese erfordert im Gegensatz zur RIKM allerdings eine Anfärbung der zu untersuchenden Probe mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Grundlage der Methode ist das Ausnutzen des evaneszenten Feldes, das entsteht, wenn Licht an der Grenzfläche zwischen einem Medium mit höherem Brechungsindex und einem Medium mit niedrigerem Brechungsindex total reflektiert wird. Dieses evaneszente Feld zeichnet sich dadurch aus, dass seine Intensität mit wachsendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell abfällt. Dadurch gibt es keine störenden Fluoreszenzsignale aus Schichten der Probe, die weiter vom Substrat entfernt sind als die typische Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ( $\approx 100$  nm). Da diese Eigenschaft einerseits das Signal-Rausch-Verhältnis der Methode erhöht, andererseits den Arbeitsbereich auf die Zell-Substrat-Region festlegt, ist diese Technik für solche Untersuchungen prädestiniert. So wurde von Axelrod (1981) mittels TIRFM festgestellt, dass sich Acetylcholin-Rezeptoren von primär kultivierten Muskelschlauchzellen aus der Ratte nahe am Kultursubstrat befinden. Andere Autoren nutzten diese Methode, um absolute Abstände zwischen den Fokalkontakten von eukaryotischen Zellen und der Kulturoberfläche zu berechnen. Lanni et al. (1985) bestimmten für 3T3 Fibroblasten, denen fluoreszenzmarkiertes Aktin mikroinjiziert worden war, einen Abstand von 49 nm. Burmeister et al. (1994) untersuchten bovine

Aortenendothelzellen und fanden eine Distanz von  $(24 \pm 13)$  nm zwischen den Anheftungspunkten der Zelle und dem Substrat.

### **Untersuchung des Zell-Substrat-Abstandes mit der FLIC-Mikroskopie**

Die in dieser Arbeit angewandte FLIC-(*fluorescence interference contrast*) Mikroskopie ist speziell zum Zweck der Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes entwickelt worden. Die Methode wurde gezielt am MPI für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Prof. Fromherz entwickelt, da sie gegenüber den oben beschriebenen Techniken unter anderem den Vorteil bietet, dass die Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands auf einer lichtundurchlässigen Siliziumoberfläche möglich ist. Für die in dieser Arbeitsgruppe untersuchte Neuron-Silizium-Kopplung (Fromherz, 1991; Fromherz 1995) ist der Abstand zwischen der Nervenzelle und der Oberfläche des Halbleiters ein fundamentaler Parameter, da die Stimulation und Detektion neuronaler Aktivität wesentlich von einer möglichst kleinen Distanz zwischen dem elektronischen Bauteil und der Zelle abhängt.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die Intensität der Fluoreszenzstrahlung einer Sonde in der Nähe einer optischen Grenzfläche durch die Reflektion von Anregungs- und Fluoreszenzlicht an diesen Grenzflächen moduliert wird. Dieser Effekt wurde schon vor einiger Zeit für Langmuir-Blodgett-Filme auf Metalloberflächen dokumentiert (Bücher et al., 1967) und später für die Eigeninterferenz von Anregungs- und Emissionslicht von Farbstoffen in freistehenden Seifen-Lamellen quantifiziert (Fromherz und Kotulla, 1984). Auch für das in der FLIC-Mikroskopie als Substrat verwendete oxidierte Silizium konnte ein solches Verhalten festgestellt werden. (Nakache et al., 1985; Brandstätter et al., 1988). Eine quantitative Beschreibung der Modulation der Fluoreszenzintensität wurde von Lambacher und Fromherz (1996) mittels Untersuchungen an farbstofftragenden Lipidfilmen auf fotolithografisch hergestellten Siliziumdioxidsubstraten erstellt. Dies eröffnete die Möglichkeit der Anwendung dieser Methode in wässriger Umgebung, um absolute Abstände zwischen der Membran und dem Substrat zu bestimmen. Dabei ist eine genaue Kenntnis der optischen Eigenschaften der Zellkomponenten wie der Brechungsindex der Zellmembran oder der des Cytoplasmas für eine äußerst genaue Bestimmung des Abstandes nicht notwendig, da diese im Gegensatz zu den bekannten Brechungsindices des Substrates nur unwesentlich zum Signal beitragen. Dies erlaubt einen flexiblen Einsatz der Methode bei großer Genauigkeit und macht ihren Vorteil gegenüber der RIKM und TIRFM aus, die zur Bestimmung der Größe des Spalts auf sehr genaue optische Parameter der Zellmembran angewiesen sind.

Als erste wendeten Braun und Fromherz (1997) die FLIC-Mikroskopie zur Abstandsbestimmung von Zellen an. Die Autoren benutzten leere Membranhüllen humaner Erythrozyten („Ghosts“). Dazu wurden die Siliziumsubstrate mittels Photolithographie so strukturiert, dass sich jeweils vier unterschiedlich hohe Stufen aus Siliziumdioxid in direkter Nachbarschaft befanden. Durch die Messung der relativen Fluoreszenzintensitäten der Erythrozytenghosts an diesen vier Positionen bekannter Oxiddicke konnte aus dem nicht eindeutigen weil periodischen Zusammenhang zwischen relativer Intensität des Fluoreszenzlichts und Abstand des Fluoreszenzmarkers DiI vom Substrat ein absoluter Zell-Substrat-Abstand errechnet werden.

Braun und Fromherz waren es auch, die die FLIC-Mikroskopie erstmals auf vitale Zellen anwandten (1998). Die von den Autoren untersuchten Astrocyten und Neuronen aus dem Rattenhirn zeigten bei identischer Beschichtung des Substrates mit Laminin gleiche Zell-Substrat-Abstände von etwa 100 nm. Lediglich ein Wechsel der Proteinbeschichtung zu Fibronectin führte zu einer signifikant verringerten Distanz von 60 nm zwischen Zelle und Substrat. Dies wurde von den Autoren mit den möglicherweise unterschiedlichen attraktiven und repulsiven Kräften der verschiedenen exogenen Proteinschichten erklärt. Sorribas et al. (2001) untersuchten in einer ähnlichen Studie den Einfluss von kovalent an die Siliziumdioxid-Oberfläche gebundenen speziellen Adhäsionsmolekülen neuronaler Zellen (axonin-1 und NgCAM) auf den Abstand zwischen diesen Zellen und der Oberfläche. Diese Daten wurden mit Abständen verglichen, die für Laminin-, Polylysin- und RGDC- und APTES-Beschichtungen bestimmt werden konnten. Für die mit axonin-1 beschichteten FLIC-Chips wurden die geringsten Zell-Substrat-Abstände gefunden ( $37 \pm 10$  nm), danach folgten die mit APTES ( $39 \pm 3$  nm), Ng-CAM ( $47 \pm 8$  nm), Polylysin ( $54 \pm 9$  nm) und Laminin ( $91 \pm 4$  nm) beschichteten Chips. Für die RGDC-beschichteten Substrate wurden sowohl Zellen gefunden, die sehr geringe Distanzen ( $39 \pm 4$  nm) zur Kulturoberfläche aufwiesen, wie auch Zellen mit wesentlichen höheren Abständen zum Substrat von 80 bis 160 nm. Iwanaga et al. (2001) setzten die FLIC-Mikroskopie ein, um den Abstand der Zellmembran vom Substrat in den Anheftungspunkten (*focal contacts*) der Zelle zu quantifizieren. Dazu wurden Fibroblasten analysiert, die mit GFP-markiertem Vinculin transfiziert worden waren und somit fluoreszenzmarkierte Fokalkontakte aufwiesen. Die Autoren konnten aber keine lokale Korrelation zwischen den Fokalkontakten der Zelle und einem dort signifikant verringerten Zell-Substrat-Abstand finden. Kiessling und Tamm (2003) benutzten die FLIC-Technik, um Lipiddoppelschichten zu untersuchen, die entweder direkt oder mit einer

darunterliegenden Polyethylenglykolschicht auf dem Siliziumdioxidsubstrat immobilisiert wurden. Weiterhin konnten die Autoren die aufrechte Orientierung des membranständigen t-SNARE-Proteins innerhalb eines solchen *lipid bilayer* nachweisen. Dies wurde über Abstandsmessungen eines an den Membranrezeptor t-SNARE spezifisch bindenden GFP-markierten Proteinliganden (GFP-VAMP) festgestellt.

### **1.5 Biophysikalische Untersuchungen zur Cytoskelett-vermittelten Mikromechanik der Zelle**

Das Cytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus unterschiedlichen Komponenten, die die äußere Form der Zelle stabilisieren, das Cytoplasma strukturieren und wesentlich zur Dynamik von Zellen beitragen. Während die Intermediärfilamente vor allem zur Stabilität der einzelnen Zelle und des Zellverbandes beitragen, übernehmen Mikrotubuli und die aus Aktin bestehenden Mikrofilamente vor allen Dingen Aufgaben, die eine große Flexibilität sowie die Möglichkeit eines dynamischen Auf- und Abbaus der einzelnen Strukturen erfordern. Daher sind auch viele zelluläre Prozesse wie Zellwachstum oder Genexpression mit Änderungen im Cytoskelett assoziiert. Der Untersuchung dieser zellulären Strukturen kommt somit eine große Bedeutung zu.

Die Kopplung zwischen Cytoskelett und Fokalkontakten (Abb. 1.1) bzw. Hemidesmosomen illustriert die Relevanz dieser Komplexe für den Adhäsionskontakt. Die mechanischen Eigenschaften dieser Region werden durch das Cytoskelett vermittelt, daher können Messungen der zellulären Mikromechanik Rückschlüsse auf den Zustand der Zelle ermöglichen, die über die elastischen Eigenschaften der apikalen Zellseite hinausgehen und somit auch Hinweise auf die mechanischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt liefern.

Die mechanischen Eigenschaften von Zellen werden schon seit mehr als zwei Jahrzehnten mit den unterschiedlichsten Methoden studiert. So wurden entsprechende Untersuchungen zum Beispiel mit dem sogenannten *cell poker* durchgeführt, ein Fiberglasstab mit flachem Ende, mit dem der Widerstand einer Zellschicht gegenüber einer Deformation gemessen wird (Petersen et al., 1982). Andere Techniken wie das Ansaugen einzelner Zellen mit einer Micropipette (*micropipette aspiration*) ermöglichten anhand der Verformung des in die Pipette gezogenen Zellkörpers Rückschlüsse auf die viskoelastischen Eigenschaften der Zelle (Yeung und Evans, 1989). Optische Methoden wie der Einsatz der oben schon beschriebenen RIKM (Zilker et al., 1987) zur Bestimmung des Elastizitätsmodulus der Zellmembran und die Verwendung von sogenannten *optical tweezers* zur Mikromanipulation von lebenden Zelle (Ashkin und Dziedzic, 1989) fanden ebenfalls Anwendung. Die Verwendung

magnetometrischer Analysen erlaubte selbst die Bestimmung intrazellulärer mechanischer Eigenschaften lebender Organismen (Valberg und Feldman, 1987). Die Autoren ließen Makrophagen aus der Lunge magnetische Partikel aufnehmen und brachten diese dann durch externe Felder zur Rotation. Aus der Drehfrequenz  $\omega$  in Abhängigkeit vom Magnetfeld wurde dann auf die Viskosität des Cytoplasmas geschlossen, die unter anderem durch Cytoskelettstrukturen bestimmt wird.

### **Bestimmung des Elastizitätsmodulus adhärenter Zellen mit der *atomic force microscopy***

Die *atomic force microscopy* (AFM) (Binnig et al., 1986) wurde schon kurz nach ihrer Entwicklung zum Studium biologischer Proben eingesetzt. Gerade für die Untersuchung von Zellen eröffnete die Technik neue Möglichkeiten, da diese unbehandelt, zerstörungsfrei und mit hoher Auflösung in ihrer physiologischen Umgebung abgebildet werden konnten. Dies wurde für ein breites Spektrum an Zelltypen gezeigt. So wurden beispielsweise epitheliale MDCK-2 Zellen und die aus diesen durch virale Transfektion mit einem Oncogen gewonnenen R5-Zellen hinsichtlich der Oberflächentopographie und ihrer mechanischen Stabilität untersucht (Hoh und Schoenenberger, 1994). Schauss und Henderson (1997) konnten anhand von XR1 Gliazellen eine durch die AFM-Messung hervorgerufene, lethale Zellschädigung ausschließen und das Ausmaß der Interaktion zwischen Zellmembran und Sonde näher beleuchten. Daneben erlaubte die Sensitivität der AFM-Technik die Auflösung einzelner Bestandteile der Zellmembran wie in der Membran verankerter Proteine (Haydon et al., 1994; Smith et al., 1997) oder intra- bzw. subzellulärer Strukturen wie das Aktincytoskelett (Braet et al., 1998).

Zusätzlich zur reinen topographischen Abbildung der Oberfläche ist es mit der AFM-Technik auch möglich die Materialeigenschaften einer Probe zu bestimmen. Sogenannte Kraft-Abstands-Kurven liefern Informationen über die Kompressibilität der Probe und erlauben anhand dieser Daten auch die Berechnung viskoelastischer Parameter. Tao et al. (1992) nutzten dies als erste, um quantitativ die lokalen elastischen Eigenschaften von biologischem Material zu messen. Aus den Kraft-Abstands-Kurven kann dann sowohl die Topographie wie auch der orts aufgelöste Elastizitätsmodulus berechnet werden (*force mapping*, Radmacher et al. 1994). Die Kalkulation wird nach dem Hertz'schen Modell für elastische Einkerbungen durchgeführt (Hertz, 1882; Sneddon, 1965). Auf diese Weise wurden unterschiedlichste Zelltypen hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften untersucht, unter anderem humane Blutplättchen (Radmacher et al., 1996), Kardiozyten aus dem Huhn (Hofmann et al., 1997), Kupffer-Zellen (Rotsch et al., 1997) und MDCK-Zellen (Weisenhorn

et al., 1993). Die von den Autoren ermittelten Elastizitätsmoduli unterscheiden sich je nach Zellsorte deutlich. So bestimmten Radmacher et al. (1996) an den Blutplättchen Werte zwischen 1 und 50 kPa, während Hofmann et al. (1997) für die Stressfasern im Bereich der Lamellipodien von Kardiozyten Elastizitätsmoduli von 10 bis 200 kPa fanden. Weisenhorn et al. (1993) konnten für MDCK-Zellen einen Elastizitätsmodulus im Bereich von 13 bis 15 kPa ermitteln.

Daneben konnten durch Elastizitätsmessungen an genetisch veränderten Vinculin-defizienten F9-Zellen (Goldmann et al., 1998) auch funktionelle Beziehungen zwischen der Abwesenheit eines Protein des Cytoskeletts und der in der Untersuchung reduzierten Viskosität der Zelle hergestellt werden. Insbesondere der Einfluss des Aktincytoskeletts auf die Elastizität der Zelle wurde häufig untersucht, da dieses eine wesentliche Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen spielt. So stabilisiert und strukturiert das Aktincytoskelett die Zelle einerseits, erfüllt aber andererseits durch seinen stetigen Auf- und Abbau auch dynamische Funktionen beispielsweise bei der Migration oder der Zellteilung. Chemisch induzierte Veränderungen der Aktin-Polymerisation, wie sie mit Cytochalasin, Latrunculin A oder Jasplakinolide hervorgerufen werden können, ermöglichen einen direkten Eingriff in das Cytoskelett und erlauben anhand der beobachteten Veränderungen Rückschlüsse auf die Aufgaben von f-Aktin in der Zelle. Anhand von Elastizitätsmessungen können diese Effekte dann quantifiziert werden. So stellten sowohl Rotsch et al. (1997) wie auch Wu et al. (1998) in Studien an unterschiedlichen Zelltypen eine deutliche Abnahme der Elastizität von Zellen fest, die mit Cytochalasin inkubiert worden waren. Rotsch und Radmacher (2000) untersuchten an NRK- und 3T3-Zellen den Einfluss unterschiedlicher Substanzen, die einen Effekt auf diverse Komponenten des Cytoskeletts haben. Die Autoren fanden für die Cytochalasine B und D, für Latrunculin A und Jasplakinolide, die alle auf die Polymerisation des Aktins wirken, eine deutliche Abnahme des Elastizitätsmodulus in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Konzentration und Inkubationszeit. Dagegen führte ein Eingriff in die Polymerisation der Mikrotubuli mit abbauenden (Colchicin und Colcemid) bzw. stabilisierenden Chemikalien (Taxol) zu keinerlei Änderung der Elastizitätsmoduli der untersuchten Zellen.

## 2 Zielsetzung

Die Quarzmikrowaage-(QCM) Technik hat sich in den letzten zehn Jahren zu einer leistungsfähigen Methode entwickelt, um die mechanischen Interaktionen zwischen adhären Zellen und ihrem Kultursubstrat zu untersuchen. Die Methode erlaubt eine Beschreibung und Quantifizierung der im Bereich des Adhäsionskontakts der Zelle auftretenden Wechselwirkungen mit dem Resonator. Allerdings ist eine genaue Interpretation des QCM-Signals bislang schwierig, da nicht eindeutig bekannt ist, welche zellulären Komponenten im Adhäsionskontakt einen Einfluss auf die Quarzoszillation ausüben.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die unterschiedlichen Bestandteile in der Zell-Substrat-Region auf ihren Beitrag zum QCM-Signal zu untersuchen. Dazu sollten verschiedene Zellsorten mit der QCM charakterisiert werden, um zelltypspezifische Unterschiede oder Gemeinsamkeiten bezüglich der resultierenden mechanischen Eigenschaften herauszufinden. Durch Einsatz der FLIC (*Fluorescence Interference Contrast*)-Mikroskopie und die Kombination der QCM-Technik mit einer elektrochemischen Impedanzanalyse [ECIS (*electric cell-substrate impedance sensing*)] der adhären Zellen sollten Möglichkeiten eröffnet werden, die geometrischen und elektrischen Eigenschaften im Adhäsionskontakt näher zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte die Auswirkung einer chemischen Vernetzung des zellulären Proteosoms sowie der Manipulation der Lipidkomposition der Zellmembran auf das QCM-Signal der Zellen näher beleuchtet werden.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Anzucht aller Zellkulturen erfolgte routinemäßig in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup>. Alle Zellkulturgefäße wurden in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank der Firma Gelaire durchgeführt. Dazu wurden alle verwendeten Medien und Lösungen autoklaviert (20 min, 120 °C) bzw. sterilfiltriert (Porenweite: 0.2 µm), soweit sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden.

##### 3.1.1.1 Subkultivierung

Die Subkultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte nach einem feststehenden Protokoll. Dazu wurden die Zellschichten zweimal mit PBS<sup>-</sup> (*phosphate buffered saline* ohne zweiwertige Ionen) gewaschen, um Mediumreste und zweiwertige Ionen zu entfernen, welche die nachfolgende proteolytische Ablösung der Zellen stören können. Durch Zugabe von 0.25 %iger Trypsinlösung konnten die Zellen nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten vom Substrat abgelöst werden. MDCK- und NRK-Zellen wurden aufgrund ihrer starken Anhaftung am Substrat vor der Zugabe der Protease für 10 min bei 37 °C mit einer EDTA-Lösung (5 mM in PBS<sup>-</sup>) inkubiert, um eine vollständigere Komplexbildung divalenter Kationen zu erreichen, welche die Ablösung der Zellen durch Zusatz von Trypsin beschleunigte. Nach der Ablösung der Zellen wurde der enzymatische Verdau durch Zugabe eines Überschusses des jeweiligen serumhaltigen Kulturmediums abgestoppt und die erhaltene Zellsuspension für 10 min bei 110 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 37 °C warmen Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Die anschließende Aussaat auf die jeweiligen Kultursubstrate erfolgte im Verhältnis 1:10 bezogen auf die Zelldichte pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche.

PBS <sup>-</sup>	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
in Reinst-Wasser

### 3.1.1.2 Kryo-Konservierung

Zur längerfristigen Aufbewahrung der untersuchten Zelllinien (MDCK, BAEC, NIH 3T3 und NRK) wurden die Zellen nach trypsin-induzierter Ablösung vom Boden einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche und nachfolgender Zentrifugation (s. 3.1.1.1) in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in sterile, speziell zur Kryokonservierung ausgelegte Behältnisse überführt. Das verwendete Einfriermedium enthält DMSO, das leicht in die Zellen eindringt und dadurch den Wassergehalt im Cytoplasma reduziert. Die Bildung scharfer Eiskristalle, die die Zellmembran dauerhaft schädigen und zum Zelltod führen könnten, wird so verhindert. Um zusätzlich eine möglichst schonende Abkühlung der Zellsuspension zu erreichen, wurde diese zuerst 2-3 Tage bei -72 °C in einem Isopropanol-Bad gelagert und erst danach in ein Behältnis mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt. Das Einfriermedium für alle Zelllinien besteht aus folgenden Komponenten:

Einfriermedium                      NCS (*normal calf serum*)  
                                                 10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid)

Der Auftauvorgang eingefrorener Zellen sollte ebenfalls möglichst schonend erfolgen. Dazu wurde das Kryogefäß nach der Entnahme aus dem Stickstofftank zuerst für etwa 1-2 h im Tiefkühlfach eines Kühlschranks (-20° C) gelagert und danach im Wasserbad vorsichtig erwärmt, bis der Inhalt nicht mehr vollständig gefroren war. Danach wurde langsam, zu Beginn tropfenweise, 37° C warmes Kulturmedium zugegeben und das enthaltene DMSO durch eine Zentrifugation bei 110 x g für 10 min entfernt. Das Zellpellet konnte dann wie in 3.1.1.1 beschrieben, in der entsprechenden Menge an Medium resuspendiert und auf die jeweiligen Kulturflaschen verteilt werden. Am Tag nach der Aussaat erfolgte der erste Mediumwechsel, um tote Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen.

## 3.1.2 Isolierung, Anzucht und Kultivierung der verwendeten Zellsorten

### 3.1.2.1 Anzucht und Kultivierung von MDCK-Zellen

Die Kultivierung von MDCK-C7 und MDCK-2 Zellen erfolgt unter identischen Bedingungen. Die verwendeten MDCK-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte im

Abstand von 2-3 Tagen oder 24 Stunden vor einem Experiment. Beide MDCK-Stämme wurden im Verhältnis 1:10 einmal wöchentlich subkultiviert und erreichten nach drei bis vier Tagen Konfluenz.

MDCK-Medium	MEM-Earle (1x)
	2.2 g/l NaHCO <sub>3</sub>
	1 g/l D-Glucose
	10 % (v/v) fötales Kälberserum
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

### 3.1.2.2 Anzucht und Kultivierung von bovinen Aortenendothelzellen

Die bovinen Aortenendothelzellen (BAEC) wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Zink und Herrn Prof. Rösen vom Diabetes-Forschungs-Institut der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden dort durch enzymatische Freisetzung (Dispase) aus isolierten Aorten frisch geschlachteter Kälber präpariert (Zink et al., 1993).

Das Kulturmedium der Zellen wurde alle 2-3 Tage oder 24 h vor einem Experiment gewechselt. Eine Subkultivierung erfolgte im Verhältnis von 1:10 einmal wöchentlich. Alle verwendeten Kultursubstrate mit Ausnahme der für die mikrogravimetrischen Untersuchungen nötigen Schwingquarze mit Glasaufsatz (s. 3.4.5) wurden vor der Zellaussaat mit einer 0.5 %igen (w/v) Gelatine-Lösung in PBS<sup>++</sup> (*phosphate buffered saline* mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> und 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>) für mindestens 30 min bei 37 °C beschichtet.

BAEC-Medium	DMEM-Medium
	3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
	1.0 g/l D-Glucose
	10 % (v/v) fötales Kälberserum
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	4 mM Glutamin

### 3.1.2.3 Anzucht und Kultivierung humaner Nabelschnur-Endothelzellen

Humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Vestweber vom Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung der Universität Münster zur Verfügung gestellt. Das Präparationsprotokoll dieser primär kultivierten Zellen soll hier nur in aller Kürze dargestellt werden.

Die menschlichen Nabelschnüre wurden vor Beginn der Arbeitsschritte in Ethanol gewaschen. Anschließend wurde ein Ende der Nabelschnur mit einem Skalpell abgetrennt und eine Spülkanüle vorsichtig in die Vene eingeführt und danach mit einer Klemme fixiert. Über die Kanüle wird die Vene mit ca. 20 ml Phosphatpuffer gespült und danach das untere Ende der Nabelschnur abgeklemmt. Anschließend wird die Nabelschnur mit einer Collagenase-Lösung (0.05 % (w/v) in PBS) befüllt und für ca. 10 min in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Waschen der Nabelschnur in Ethanol wird der enzymatische Ablöseprozeß der Zellen durch mechanisches Massieren der Nabelschnur unterstützt. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wird dann zu 10 ml Medium gegeben, um die Collagenase zu deaktivieren. Schließlich werden die Zellen durch eine siebenminütige Zentrifugation bei 110 x g pelletiert, der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen in dieser Verdünnung in Zellkulturflaschen ausgesät, die zuvor mit 0.5 %iger (w/v) Gelatinelösung beschichtet wurden. Ein konfluenten Zellmonolayer wird nach etwa 2 Tagen erhalten.

Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage oder 24 h vor einem Experiment gewechselt. Eine Subkultivierung erfolgte im Verhältnis von 1:2-1:3 einmal wöchentlich. Es wurden nur Zellen bis zur Passage 5 verwendet.

HUVEC-Medium	M199
	3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
	2.0 g/l D-Glucose
	20 % (v/v) FCS
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin
	80 µg/ml ECGS ( <i>endothelial cell growth supplement</i> )
	100 µg/ml Heparin

### 3.1.2.4 Anzucht und Kultivierung muriner Fibroblasten

Die verwendeten murinen Fibroblasten (NIH 3T3) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage oder 24 h vor einem Experiment gewechselt. Eine Subkultivierung im Verhältnis 1:10 erfolgte spätestens sobald die Zellen 90-95 % Konfluenz erreicht hatten. In der Regel war dies einmal wöchentlich der Fall.

NIH 3T3-Medium	DMEM-Medium
	3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
	4.5 g/l D-Glucose
	10 % (v/v) FCS
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	4 mM Glutamin

### 3.1.2.5 Anzucht und Kultivierung von NRK-Zellen

Bei den verwendeten NRK-Zellen handelt es sich um epithel-ähnliche Klone (NRK 52E), die aus der Niere normaler Ratten (*normal rat kidney*) gewonnen wurden (de Larco und Todaro, 1978). Diese Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage oder 24 h vor einem Experiment gewechselt. Eine Subkultivierung erfolgte im Verhältnis von 1:10 einmal wöchentlich.

NRK-Medium	DMEM-Medium
	3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
	4.5 g/l D-Glucose
	10 % (v/v) FCS
	100 µg/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

### 3.1.2.6 Präparation und Kultivierung von porcinen cerebralen Kapillarendothelzellen

Die Anzucht und Kultivierung cerebraler Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn (PBCEC) wurde nach einem Protokoll von Franke et al. (2000) durchgeführt. Eine detaillierte

Beschreibung der gesamten Präparation unterbleibt hier, nur die wesentlichen Punkte sollen kurz aufgeführt werden. Die Hirnhälften wurden frisch geschlachteten Schweinen entnommen und in 4 °C kaltem, physiologischem Phosphatpuffer mit Antibiotikazusätzen transportiert. Alle auf den Transport folgenden Präparationsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Zuerst wurden die Hirnhäute entfernt sowie sämtliche sekretorischen Bereiche und der Thalamus abgetrennt. Danach wurde das verbleibende Hirnmaterial mechanisch zerkleinert und einem unspezifischen enzymatischen Verdau unterworfen, der die cerebralen Kapillaren freisetzt. Diese wurden anschließend mittels einer Dichtezentrifugation isoliert und einem zweiten Verdau unterworfen. Die in diesem Schritt eingesetzte spezifische Collagenase baut die Basalmembran ab und setzt so die Endothelzellen frei. Durch eine diskontinuierliche Dichtezentrifugation wurden dann störende Zellfragmente sowie Erythrozyten abgetrennt. Die Aussaat der erhaltenen PBCEC erfolgte auf Collagen-G beschichteten Zellkulturflaschen. Aus einem Hirn wurden ca. 6 Flaschen à 75 cm<sup>2</sup> erhalten. Zur Abtrennung von nicht erwünschten Fremdzellen wie Pericyten und Astrozyten wurde zwei Tage nach der Zellaussaat ein Subkultivierungsschritt durchgeführt, der die im Vergleich zu den abzutrennenden Fremdzellen schwächere Adhäsion der PBCEC an das Substrat nutzt. Dazu wurde zu den Zellen eine Trypsin-Lösung gegeben, die Trypsinierung wurde allerdings abgebrochen, bevor sich sämtliche anhaftenden Zellen vom Boden der Kulturgefäße abgelöst hatten. Die erhaltenen Endothelzellen wurden gesammelt und konnten anschließend in der gewünschten Dichte auf die entsprechenden Substrate ausgesät werden. Zwei Tage nach der Passage wurde das serumhaltige Kulturmedium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Je nach experimentellen Bedingungen wurde dem Medium Hydrocortison in einer Konzentration von 550 nM zugesetzt.

Kultur-Medium	Earle's Medium 199 10 % (v/v) NCS 0.7 mM Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Serumfreies Medium	DMEM/Ham's F12-Medium 0.7 mM Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin



	100 µg/ml Gentamicin
	0.7 mM Glutamin
	1 µg/ml Heparin
	1 ng/ml bFGF
Aussaatmedium	Maus Kulturmedium
	4 µg/ml Puromycin

## 3.2 Lichtmikroskopische Methoden

### 3.2.1 Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie

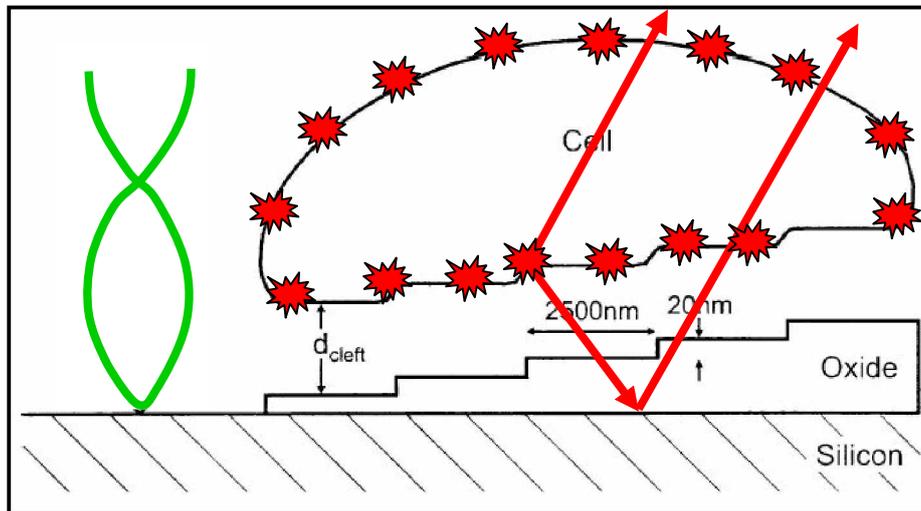
Die Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie (FLIC) ist eine nicht-invasive Methode zur exakten Bestimmung des Abstandes zwischen einer Zelle und ihrem Substrat. Die FLIC-Mikroskopie wurde 1996 von der Arbeitsgruppe von Professor Fromherz am MPI Martinsried entwickelt (Lambacher und Fromherz, 1996) und an die Untersuchung des Zell-Substrat-Abstandes angepasst (Braun und Fromherz, 1997), um die in der Arbeitsgruppe untersuchte Neuron-Silizium-Kopplung zu optimieren. Für die Transduktion des elektrischen Signals von einer Nervenzelle zum darunterliegenden Transistor ist ein möglichst geringer Abstand zwischen Zelle und Halbleiter essentiell. Die Ermittlung solcher absoluter Distanzen war mit herkömmlichen Methoden nicht möglich.

Die FLIC-Mikroskopie zur Bestimmung des absoluten Abstandes vitaler Zellen von ihrem Substrat wurde in dieser Arbeit an verschiedenen Zellsorten eingesetzt, um zusammen mit den durchgeführten elektrochemischen Messungen (ECIS) neue Erkenntnisse über die Beschaffenheit des wenig untersuchten Bereiches zwischen Zelle und Substrat zu liefern und Rückschlüsse auf die elektrischen Verhältnisse innerhalb dieses Adhäsionskontaktes zu ermöglichen.

#### Prinzip der FLIC-Mikroskopie

Das Prinzip der Methode basiert auf der Tatsache, dass die Intensität der Fluoreszenzstrahlung eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls in der Nähe einer optischen Grenzfläche (z.B. eine spiegelnde Oberfläche, hier: Silizium) durch Reflexion von Anregungs- und Fluoreszenzlicht an der Grenzfläche und der daraus resultierenden Interferenz moduliert wird. Der Abstand des Fluoreszenzfarbstoffmoleküls vom Substrat und dessen Fluoreszenzintensität sind somit in eine voneinander abhängig. (Abb. 3.1) Wird ein Fluorophor in eine Zellmembran eingetragen,

die sich auf einem Substrat aus oxidiertem Silizium befindet, so kommt es sowohl für das Anregungs- wie das Fluoreszenzlicht zur Reflexion an den unterschiedlichen optischen Grenzflächen. Die direkten und die indirekten Anteile des Lichts überlagern sich,



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung des Prinzips der FLIC-Mikroskopie. Abgebildet ist eine Zelle auf einem FLIC-Chip, die mit dem Membranfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI C<sub>18</sub>) gefärbt wurde. Die Farbstoffmoleküle verteilen sich in der Membran (rote Punkte) und senden bei Anregung im entsprechenden Wellenlängenbereich Fluoreszenzlicht aus (Pfeile). Dieses kann entweder direkt den Detektor treffen oder zuerst an der spiegelnden Oberfläche reflektiert werden. Dies führt zu einem Weglängenunterschied zwischen den beiden Strahlen und somit zu Interferenz.

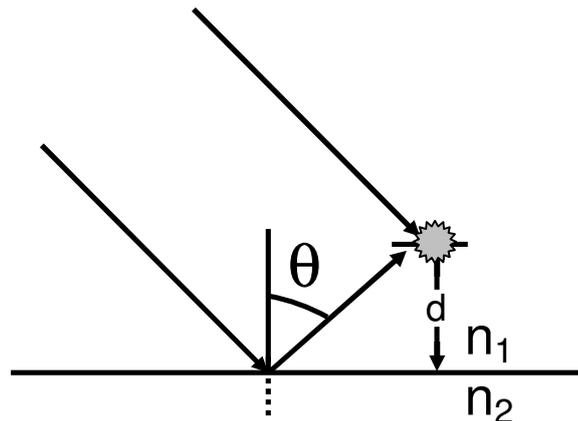
so dass es in der Anregung zu stehenden Wellen und in der Emission zur Weitwinkelinterferenz kommt.

In einem realen System findet man sehr komplexe optische Verhältnisse vor: So besteht das Modell der Zelle auf dem oxidierten Siliziumsubstrat aus unterschiedlichen optischen Schichten. Während die apikale Membran der Zelle zu weit vom Silizium-Substrat entfernt ist, als dass die Reflexionen an ihren Grenzflächen eine Rolle spielen könnten, so bleiben mit den Übergängen Cytoplasma/basolaterale Membran, basolaterale Membran/elektrolytgefüllter Spalt zwischen Zelle und Substrat, elektrolytgefüllter Spalt/Siliziumdioxid und Siliziumdioxid/Silizium insgesamt fünf optische Grenzflächen an denen Reflexion und Brechung stattfinden kann. Das Prinzip soll hier nur deutlich vereinfacht für ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül dargestellt werden, das sich im Abstand  $d$  in einem homogenen Medium vor einer ideal spiegelnden Oberfläche befindet.

### Excitationsinterferenz

Wird das Farbstoffmolekül nun beleuchtet, so trifft ein Teil der Lichtwelle den Chromophor direkt, ein anderer Teil wird zuerst an der spiegelnden Oberfläche des Substrats reflektiert und fällt dann auf das Molekül (Abb. 3.2).

Dadurch haben beide Lichtwellen, wenn sie auf das Farbstoffmolekül treffen, einen unterschiedlich langen Weg zurückgelegt. Der Wegunterschied zwischen dem reflektierten



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung der Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls vor einer spiegelnden Oberfläche. Das Anregungslicht kann den Fluorophor (☉) direkt oder erst nach Reflexion treffen. Dadurch ergibt sich für die beiden Strahlen ein Weglängenunterschied.

und dem direkten Anteil des Lichts beträgt

$$\Delta = 2d \cos \theta_1^{in}.$$

Aus Gleichung 3.1 errechnet sich folgender Phasenunterschied zwischen beiden Anteilen:

$$\Delta\Phi = 2\pi \frac{n_1}{\lambda_{in}} \Delta = 2\pi \frac{n_1}{\lambda_{in}} 2d \cos \theta_1^{in}.$$

Die Addition der Amplituden beider Anteile am Ort des Farbstoffs führt dann zur gesamten absorbierten Intensität  $I_{abs}$ . Diese ist zum Quadrat der resultierenden Feldstärken proportional

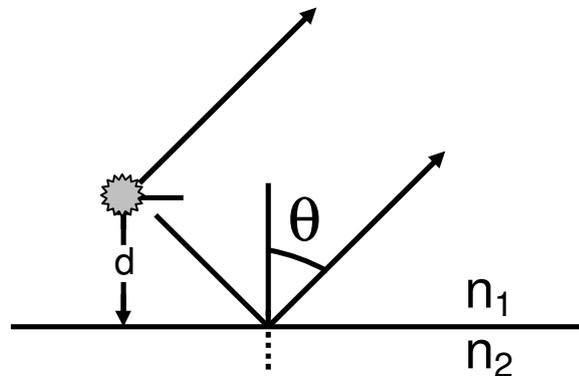
$$I_{abs} \propto |E_{in} - E_{in} e^{i\Delta\Phi}|^2 = E_{in}^2 |1 - \cos \Delta\Phi|^2 = E_{in}^2 4 \sin^2 \left( 2\pi \frac{d \cdot n_1}{\lambda_{in}} \cos \theta_1^{in} \right)$$

Die absorbierte Intensität weist also für die Anregung des Chromophors eine  $\sin^2$ -Abhängigkeit auf.

### Emissionsinterferenz

Ein analoges Verhalten ergibt sich auch für die Lichtemission. Befindet sich der Chromophor in einem angeregten Zustand, so kann abgestrahltes Fluoreszenzlicht entweder direkt auf den

Detektor fallen oder zuerst von der spiegelnden Oberfläche reflektiert werden. Dies resultiert dann analog zur Anregung des Farbstoffmoleküls in einem Weglängenunterschied zwischen den beiden Wellen.



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffmoleküls (☉) vor einer spiegelnden Oberfläche. Das Fluoreszenzlicht des angeregten Farbstoffs kann den Detektor direkt oder erst nach Reflexion an der spiegelnden Oberfläche treffen. Dadurch ergibt sich für die beiden Strahlen ein Weglängenunterschied in der Emission.

Da die Geometrie dieselbe ist wie im Falle der Anregung, ergibt sich nach Berechnung des Phasenunterschiedes beider Anteile entsprechend

$$I_{em} \propto |E_{out} - E_{out} e^{i\Delta\Phi}|^2 = E_{out}^2 |1 - \cos \Delta\Phi|^2 = E_{out}^2 4 \sin^2 \left( 2\pi \frac{d \cdot n_1}{\lambda_{out}} \cos \theta_1^{out} \right)$$

Somit findet sich für die emittierten Intensitäten ebenfalls eine  $\sin^2$ -Abhängigkeit.

### Gesamtintensität

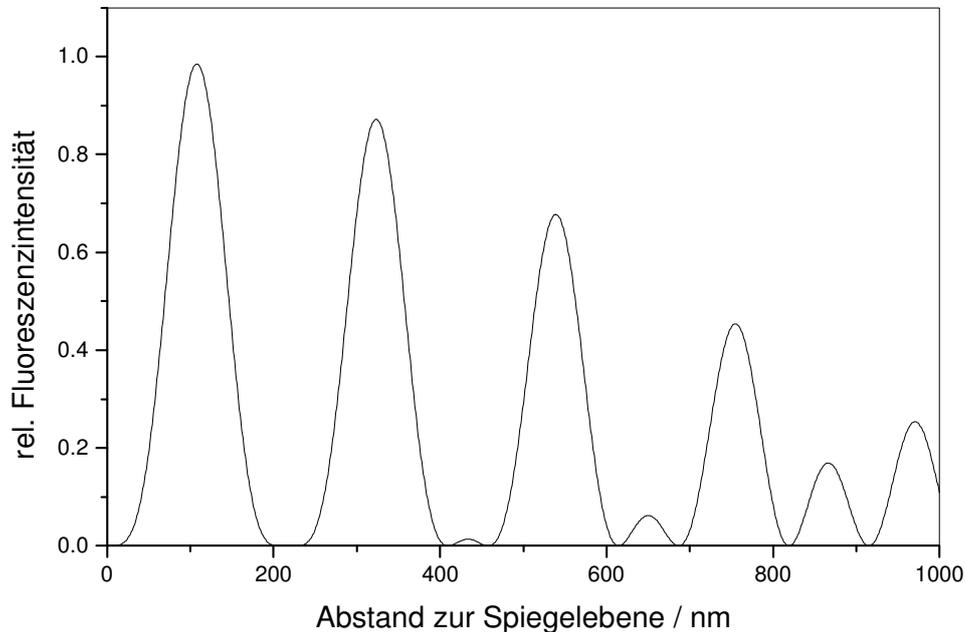
Die experimentell bestimmbare Fluoreszenzintensität eines Chromophors setzt sich als Produkt von absorbierter und emittierter Intensität zusammen. Während die absorbierte Intensität bestimmt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Fluorophor in einen angeregten Zustand übergeht, legt die emittierte Intensität die Wahrscheinlichkeit einer Emission eines Fluoreszenzquants in Richtung des Detektors fest. Zu beachten ist, dass nur relative Fluoreszenzintensitäten gemessen werden können, ein Vorfaktor bleibt frei.

$$I_{det} \propto I_{abs} I_{em}$$

Für das oben beschriebene idealisierte Modell einer Anregung und Emission senkrecht zur betrachteten Spiegelebene erhält man eine Schwebungskurve:

$$I_{\text{det}} \propto \sin^2\left(2\pi \frac{d \cdot n_1}{\lambda_{\text{in}}}\right) \sin^2\left(2\pi \frac{d \cdot n_1}{\lambda_{\text{out}}}\right)$$

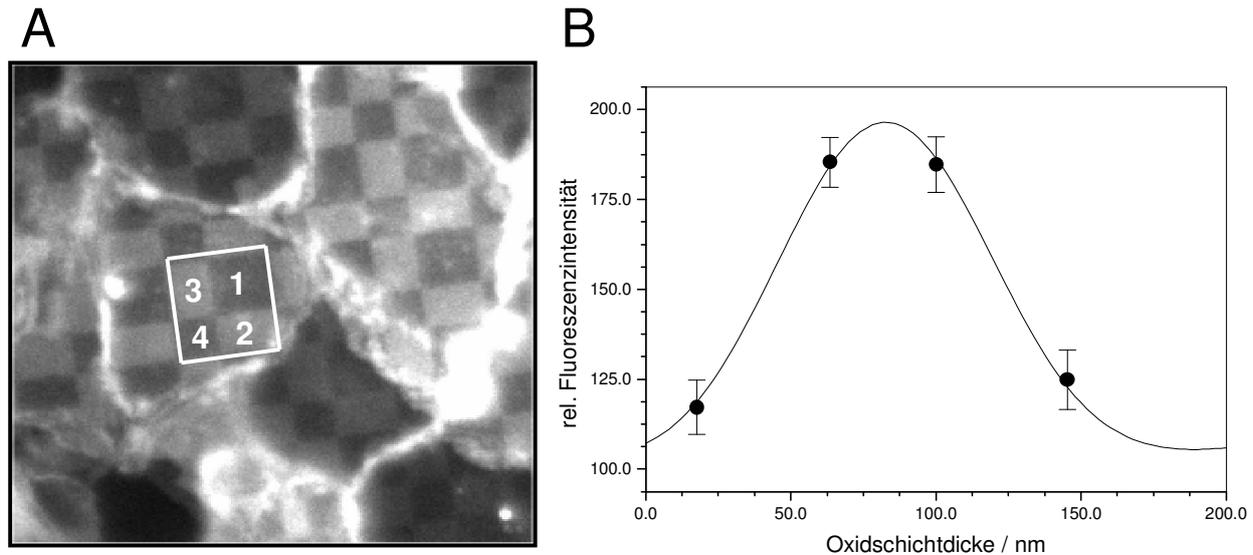
Dieser Zusammenhang ist in Abb. 3.4 graphisch dargestellt.



**Abb. 3.4:** Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität eines Fluorophors gegen dessen Abstand zur Spiegelebene.

Dieses Diagramm zeigt aber auch ein Problem dieser Methode. Die relative Fluoreszenzintensität lässt sich nicht exakt einem bestimmten Abstand zuordnen. Eine konkrete Abstandsbestimmung ist somit nicht ohne zusätzliche Informationen möglich, da verschiedene Abstände die gleiche relative Fluoreszenzintensität erzeugen.

Die Problemlösung erfolgt durch die Verwendung eines nicht-homogenen, strukturierten Siliziumsubstrats. Auf diesem befinden sich mittels fotolithografischer Techniken aufgebraute Höhenstufen aus Siliziumdioxid. Die Zellmembran paßt sich diesen vier unterschiedlich hohen Stufen an, so dass ihr Abstand zur Substratoberfläche überall konstant ist. Eine Analyse der Fluoreszenzintensitäten an diesen Stufen bekannter Höhe ermöglicht nun eine eindeutige Zuordnung zu einem exakten Zell-Substrat-Abstand (Abb. 3.5 A). Dabei wird eine Übertragungsfunktion mit dem Zell-Substrat-Abstand  $d$  als freiem Parameter an die Messdaten angepaßt und aus der Korrelation mit den zugehörigen Höhenstufen der Abstand zwischen Zelle und Substrat errechnet (Abb. 3.5 B).



**Abb. 3.5:** **A** Exemplarische Abbildung von MDCK-2 Zellen, die auf strukturierten FLIC-Chips kultiviert und mit dem Membranfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI C<sub>18</sub>) gefärbt wurden. Die durch Excitations- und Emissionsinterferenz des Fluoreszenzlichtes hervorgerufenen unterschiedlichen Intensitäten auf den jeweiligen Höhenstufen lassen sich deutlich erkennen. Die Zahlen markieren die Höhe der vier Stufen in ansteigender Reihenfolge von 10 nm (1) bis 150 nm (4). Die auf diesen Stufen bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten dienen als Grundlage für die Berechnung des Zell-Substrat-Abstandes. **B** Beispiel für die Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes aus den für die jeweiligen Höhenstufen gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätswerten durch mathematische Anpassung. Für diesen Fall ergibt sich ein Zell-Substrat-Abstand von  $(26.5 \pm 2.3)$  nm.

### 3.2.2 Experimentelle Durchführung

#### 3.2.2.1 Herstellung der verwendeten FLIC-Chips

Die verwendeten FLIC-Chips wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Fromherz (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung dieser Substrate erfolgte mittels fotolithografischer Methoden (Braun und Fromherz, 1997) und soll hier nur kurz beschrieben werden. Die Oberfläche gereinigter Silizium-Wafer wurde bei 1000 °C im Ofen zu Siliziumdioxid oxidiert. Nach Aufbringen einer Schicht Fotoresistlack wurde eine Metallmaske aufgelegt, deren Streifen einen Abstand von 5 µm aufwiesen. Nach Belichtung und Entwicklung des Fotoresistlackes wurde an den freigelegten Stellen mit Fluorwasserstoffsäure eine definierte Menge Siliziumdioxid abgetragen. Danach wurde der Fotoresistlack entfernt, der Silizium-Wafer erneut gereinigt und wiederum mit Fotoresistlack beschichtet. In einem zweiten Belichtungsschritt wurde die verwendete Metallmaske um 90° gedreht, der Fotoresistlack entwickelt und erneut eine definierte Schicht Siliziumdioxid entfernt. Nach der Ablösung des Fotoresistlackes ergibt sich ein Muster aus Quadraten mit vier unterschiedlichen Höhenstufen, die jeweils eine Kantenlänge von 5 µm aufweisen. Der Silizium-Wafer wurde in Chips der Größe (34 x 10) mm geschnitten. Die Chips wurden anschließend gereinigt und dann die Oxidschichtdicke der einzelnen Höhenstufen anhand von

vier Referenzquadraten der Größe 500 x 500  $\mu\text{m}$ , die während des Ätzzvorganges aufgebracht worden waren, mittels Ellipsometrie genau vermessen.

### 3.2.2.2 Vorbereitung der FLIC-Chips zur Zellkultur

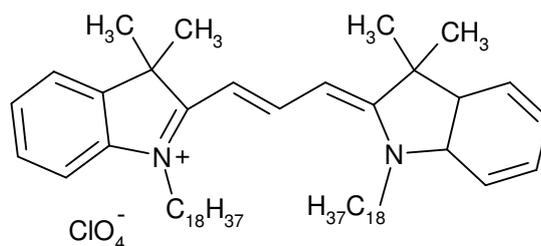
Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden alle FLIC-Chips für 30 s im Argonplasma sterilisiert. Anschließend wurden die FLIC-Chips in Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm) überführt. Für bestimmte Zellsorten (BAEC, HUVEC und PBCEC) mussten die Chips zur Verbesserung der Adhäsion beschichtet werden. Dazu wurden die FLIC-Chips im Falle von bovinen Aortenendothelzellen 30 min bei 37 °C mit 0.5 %iger (w/v) Gelatinelösung inkubiert. Humane Nabelschnurendothelzellen und porcine Kapillarendothelzellen benötigten zum Anwachsen auf der Siliziumdioxidoberfläche eine Beschichtung mit quervernetzter Gelatine (s. 3.4.5.1). Alle anderen Zelllinien konnten auf unbeschichtete FLIC-Chips ausgesät werden.

### 3.2.2.3 Regeneration der FLIC-Chips

Die Chips wurden für 10 min in eine Lösung aus 96 %iger Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung im Verhältnis 3:1 („Piranha“) getaucht. Danach spülte man die Chips zehnmal mit Reinst-Wasser. Abschließend wurden die Chips im Trockenschrank oder im Stickstoffstrom getrocknet.

### 3.2.2.4 Anfärbung der Zellen mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat

Zur Anfärbung der Zellmembran wurde der lipidlösliche Farbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI C<sub>18</sub>) verwendet (Abb. 3.6). Dieser integriert sich mit den beiden C<sub>18</sub>-Fettsäureketten in die Zellmembran und ermöglicht so mit Hilfe der Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie eine Detektion der Fluoreszenzintensitäten für die auf den unterschiedlich hohen Oxidstufen befindlichen Membranareale.

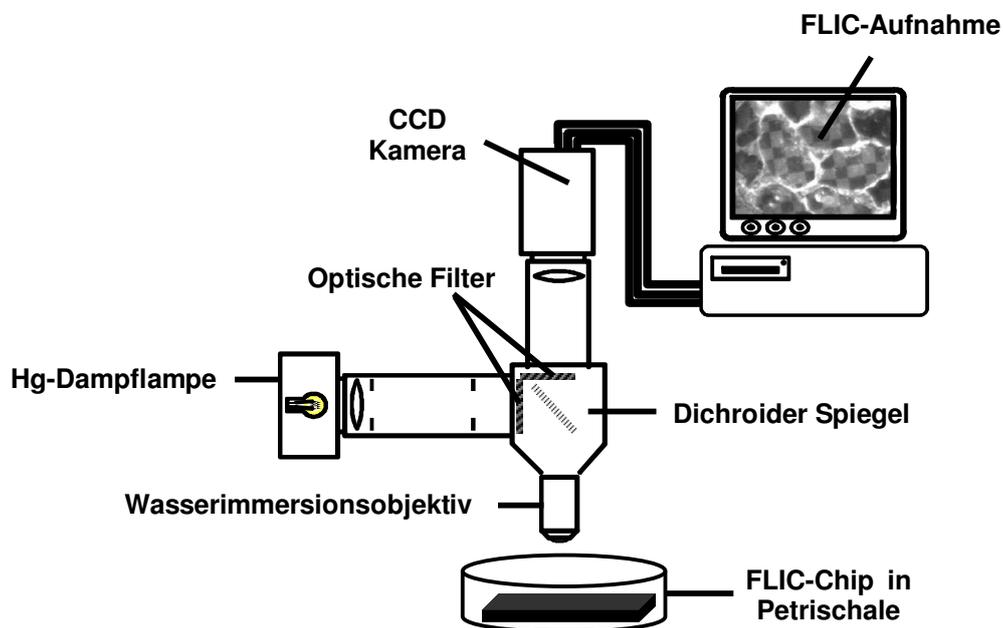


**Abb. 3.6:** Strukturformel des Membranfarbstoffs DiI C<sub>18</sub>.

Dazu wurden 2 ml der DiI-Färbelösung (1:1000 Verdünnung der DiI-Stammlösung (3 mg/ml DiI in DMF) in Krebs-Ringer-Puffer<sup>++</sup> nach dem Absaugen des jeweiligen Mediums auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde die Färbelösung entfernt und dreimal mit frischem KRP<sup>++</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in KRP<sup>++</sup> mit Hilfe der Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie vermessen.

### 3.2.2.5 Aufnahme der Fluoreszenzbilder mittels Auflicht-Mikroskopie

Die Verwendung eines aufrechten Epi-Fluoreszenzmikroskopes (Olympus Optical, Japan) ermöglichte es, digitale Fluoreszenzaufnahmen direkt von der Oberfläche des Quarzchips zu erhalten. Abbildung 3.7 illustriert den verwendeten Messaufbau. Die nötige Anregung des



**Abb. 3.7:** Experimenteller Aufbau zur Bestimmung von Zell-Substrat-Abständen mittels FLIC-Mikroskopie.

Fluoreszenzfarbstoffes (DiI) wurde durch Einsatz einer Quecksilberdampf-Lampe (100 Watt, Olympus Optical, Japan) in Kombination mit einem Excitationsfilter (XF 39, Omega Optical, Japan) erzeugt. Die Detektion des in längere Wellenlängenbereiche verschobenen Fluoreszenzlichts erfolgte mit einer Digital-Kamera (Hamamatsu C4742-95-10VRB, Japan), die die aufgenommenen Bilder direkt in einen herkömmlichen Computer einspeiste. Alle digitalen Aufnahmen wurden mit einem Wasserimmersionsobjektiv (63x, NA = 0.9, Olympus Optical, Japan) aufgenommen. Pro Chip wurden fünfzehn unterschiedliche Positionen untersucht. Für jede dieser Positionen wurde jeweils ein Fluoreszenzbild und ein Reflektionsbild aufgenommen. Bei dem Reflektionsbild handelt es sich um eine Aufnahme der Chipoberfläche, welche die Struktur der unterschiedlichen Oxidschichtdicken erkennen

lässt. Dieses Bild wird ohne Fluoreszenzfilter aufgenommen und dient der späteren Zuordnung der jeweiligen Höhenstufen zu den zugehörigen relativen Fluoreszenzintensitäten.

### 3.2.2.6 Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten geschieht mit Hilfe der Software FLIC-Extraktor, die von den Entwicklern der FLIC-Mikroskopie zu Verfügung gestellt wurde. Dieses Programm ermöglicht nach Eingabe der zum jeweiligen Chip zugehörigen Referenzwerte für die vier Oxidschichtdicken (s. 3.2.1) eine Festlegung der entsprechenden mittleren Fluoreszenzintensität der einzelnen Quadrate. Sobald dies für vier assoziierte Quadrate geschehen ist, werden diese Werte zusammen mit den Chip-Referenzwerten gespeichert.

### 3.2.2.7 Errechnung des Zell-Substrat-Abstandes aus den relativen Fluoreszenzintensitäten

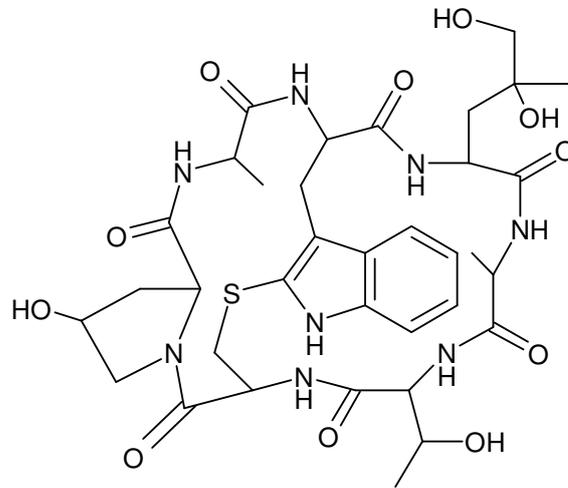
Die Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes wird mit Hilfe eines JAVA-Applets durchgeführt, das von den Entwicklern auf einer Internet-Seite ([http://www.dieterb.de/flic/flic\\_server\\_pro.html](http://www.dieterb.de/flic/flic_server_pro.html)) zur Verfügung gestellt wird. Dieses Programm ermöglicht nach Eingabe der Fluoreszenzintensitäten, der dazugehörigen Standardabweichungen sowie der Referenzwerte für die Oxidschichtdicken die Berechnung des Abstandes für unterschiedliche Fluoreszenz-Sonden (hier: DiI). Aus den individuellen Werten für die einzelnen Positionen wurde dann ein mittlerer Zell-Substrat-Abstand für jede Zellspezies bestimmt.

## 3.2.3 Anfärbung des Aktin-Cytoskeletts mit TRITC-Phalloidin

Zur Anfärbung der Mikrofilamente werden in der Zellbiologie häufig mit Fluoreszenzmarkern versehene Phalloidinmoleküle verwendet. Dabei nutzt man die ungewöhnlich hohe Affinität des Phalloidins zu filamentösem Aktin (f-Aktin) aus. Phalloidin gehört zu den Phallotoxinen und ist eine der Toxinkomponenten des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Die starke Toxizität des Phalloidins beruht darauf, dass das cyclische Heptapeptid (Abb. 3.8) durch die stabile Anbindung an das Aktincytoskelett zur Zelldegeneration führt, da das dynamische Gleichgewicht des ständigen Auf- und Abbaus der Mikrofilamente gestört wird.

In dieser Arbeit wurde zur Anfärbung des Aktincytoskeletts ein TRITC-markiertes Phalloinderivat verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden dazu auf zwei Kammer-LabTeks (*chambered coverglass*, NUNC, Wiesbaden) mit einer Wachstumsfläche von 4 cm<sup>2</sup>

kultiviert. Um eine Anfärbung des Cytoskeletts zu ermöglichen, mussten die Zellen zuerst fixiert und permeabilisiert werden, da das Phalloidinmolekül nicht membrangängig ist. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend für 10 min bei RT in



**Abb. 3.8:** Strukturformel des Phallotoxins Phalloidin.

einer Lösung von 4 % (w/v) PFA in PBS<sup>++</sup> inkubiert. Danach wurde das Fixans abgesaugt und für 5 min bei RT eine Lösung aus 0.2 %igen (v/v) Triton-X-100 in PBS<sup>++</sup> zugegeben. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS<sup>++</sup> wurde die Färbelösung für 45 min bei RT zugegeben. Die Färbelösung wurde für jedes Experiment frisch aus einer Stammlösung (0.3 mg/ml in Ethanol) angesetzt. Dazu verdünnte man die Stammlösung im Verhältnis 1:1000 mit PBS<sup>++</sup>. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung entfernt und dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, um sämtliche Farbstoffreste zu beseitigen. Anschließend konnte das Präparat mikroskopisch untersucht werden.

### 3.3 Impedanzspektroskopie

#### 3.3.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie ermöglicht es, Informationen über die elektrischen Eigenschaften eines Systems zu erhalten, indem die Frequenzabhängigkeit der Impedanz des Systems untersucht wird. Zur Aufnahme von Impedanzspektren gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Methoden. Das *continous-wave*-Verfahren verwendet als Erregersignal einen sinusförmigen Wechselstrom oder eine sinusförmige Wechselspannung kleiner Amplitude. Aus der Messung des zugehörigen Spannungsabfalls respektive des resultierenden Stroms kann dann die zugehörige Impedanz ermittelt werden. Diskrete Variation der Frequenz im gewünschten Messbereich ergibt separate Werte für die Impedanz des Systems bei der

betrachteten Frequenz. Die Impedanz lässt sich dann gegen die Frequenz auftragen und liefert das Impedanzspektrum. Die *fourier-transform*-Impedanzspektroskopie ermöglicht durch Verwendung transienter Erregersignale eine gleichzeitige Aufnahme aller Impedanzwerte in einem Frequenzbereich. Die gemessene Systemantwort muß jedoch mit Hilfe einer Fourier-Transformation von der Zeit- in die Frequenzdomäne überführt werden. Da in dieser Arbeit das *continuous-wave*-Verfahren Verwendung fand, soll im Weiteren nur noch darauf eingegangen werden.

### 3.3.2 Auswertung von Impedanzspektren

Um ein Impedanzspektrum quantitativ auswerten zu können, versucht man, ein Ersatzschaltbild zu erstellen, das anhand von klassischen elektrischen Bauteilen die elektrischen Eigenschaften des Systems beschreibt. Dazu muß das Ersatzschaltbild die gleiche Frequenzabhängigkeit der Impedanz wie das System selbst aufweisen.

Eine Zusammenstellung einzelner elektrischer Bauteile und ihrer individuellen Impedanzbeiträge soll hier nun kurz beschrieben werden. Während Ohmsche Widerstände frequenzunabhängig nur die Amplitude des aus einer Wechselspannung resultierenden Stroms beeinflussen, ist die Impedanz von induktiven und kapazitiven Elementen frequenzabhängig. Daneben zeigen diese Bauteile Phasenverschiebungen zwischen Spannung und Strom. Daher ist es sinnvoll, Spannung, Strom und Impedanz in komplexen Größen darzustellen. Für die Wechselspannung  $U(t)$  bei einer Frequenz  $\omega$  gilt:

$$U(t) = U_0 e^{i\omega t}$$

$U(t)$ : Momentanwert der Spannung

$U_0$ : Spannungsamplitude

$\omega$ : Kreisfrequenz

$t$ : Zeit

$i$ :  $\sqrt{-1}$

Für den resultierenden Strom folgt damit:

$$I(t) = I_0 e^{i(\omega t - \varphi)}$$

$I(t)$ : Momentanwert des Stromes

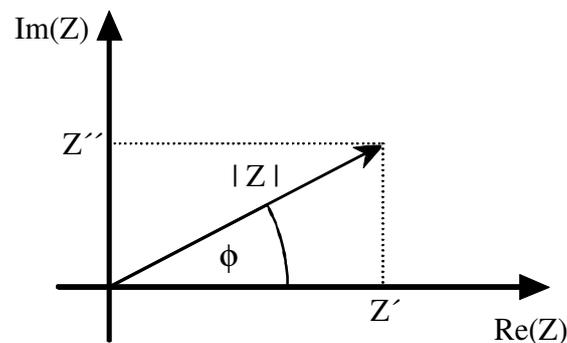
$I_0$ : Stromamplitude

$\varphi$ : Phasenverschiebung zwischen Spannung  $U(t)$  und Strom  $I(t)$

Die Impedanz ist definiert als Quotient aus Spannung und Stromstärke:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0}{I_0} e^{i\varphi} = |Z| e^{i\varphi}$$

Eine Darstellung in kartesischen Koordinaten ermöglicht die Aufteilung der komplexen Impedanz  $Z = Z' + i Z''$  in einen Realteil ( $Z'$ ), der Wirkwiderstand genannt wird, und einen als Blindwiderstand bezeichneten Imaginärteil  $Z''$ . Der Zusammenhang von  $|Z|$ ,  $\varphi$ ,  $Z'$ ,  $Z''$  lässt sich dann in einer Gaußschen Zahlenebene graphisch darstellen (Abb. 3.9):



**Abb. 3.9:** Darstellung der komplexen Impedanz  $|Z|$  in einer Gaußschen Zahlenebene.

Somit ergeben sich folgende Zusammenhänge für den Betrag der Impedanz  $|Z|$  und die Phasenverschiebung  $\varphi$ :

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2}$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right)$$

$|Z|$  und  $\varphi$  respektive  $Z'$  und  $Z''$  sind jeweils zwei voneinander unabhängige Messgrößen, die in der Impedanzspektroskopie verwendet werden.

Die in den Ersatzschaltbildern dieser Arbeit verwendeten Bauteile sind in Tab. 3.1 aufgeführt. Dabei ist das konstante Phasenelement CPE ein empirisches Impedanzelement, das keinerlei Entsprechung in einem idealen elektrischen Bauteil findet. Es wird häufig benötigt, um eine Beschreibung realer elektrochemischer Systeme zu ermöglichen, da seine

impedanzspektroskopischen Eigenschaften abhängig vom Parameter  $n$  zwischen denen eines ohmschen Widerstandes ( $n = 0$ ,  $R = 1/A$ ) und eines idealen Kondensators liegen ( $n = 1$ ,  $C = A$ ). Hier wird das konstante Phasenelement zur Beschreibung der Impedanz der

Bezeichnung	Impedanz	Phasenverschiebung
Ohmscher Widerstand R	R	0
Kondensator C	$\frac{1}{i\omega C}$	$-\frac{\pi}{2}$
Konstantes Phasenelement CPE	$\frac{1}{(i\omega)^n A}$	$-n\frac{\pi}{2}$ , $[0, 1] = n$
Spule L	$i\omega L$	$+\frac{\pi}{2}$

**Tab. 3.1:** Impedanz und Phasenverschiebung verschiedener Bauteile.

Grenzfläche zwischen der polarisierbaren Elektrode und dem angrenzenden Elektrolyten verwendet, da lokale Unregelmäßigkeiten in der Topografie und der chemischen Zusammensetzung des Elektrolyten für eine heterogene Verteilung der elektrischen Eigenschaften führt. Ein solches nicht-ideales System lässt sich daher nicht durch einen konventionellen Kondensator darstellen.

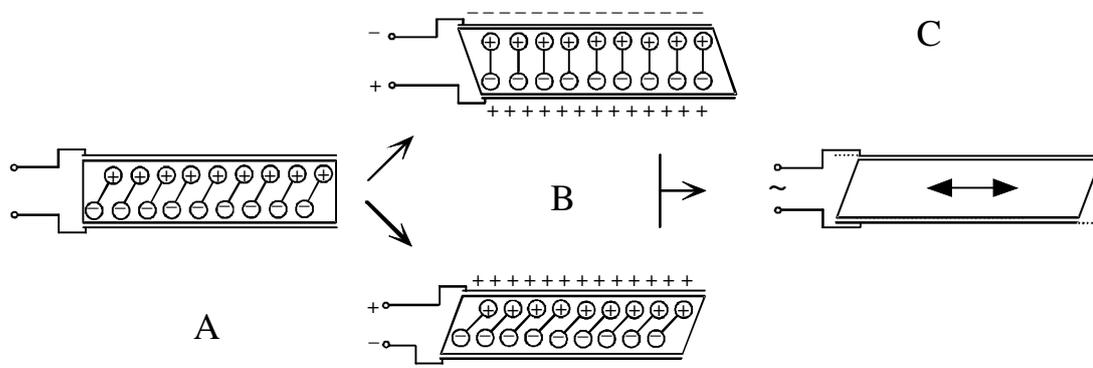
Die Berechnung der Gesamtimpedanz eines Netzwerkes verschiedener Bauteile erfolgt den Kirchhoffschen Gesetzen folgend durch Verknüpfung der Impedanzbeiträge der jeweiligen Bauteile in Abhängigkeit von ihrer Verschaltung. So bedingt eine Reihenschaltung eine Summierung der Einzelimpedanzen, während eine Parallelschaltung eine Addition der reziproken Impedanzen (Admittanz) verlangt. Dadurch lässt sich eine Übertragungsfunktion aufstellen, die durch iterative Anpassung an das gemessene Spektrum eine Charakterisierung des Systems anhand der Modellparameter ermöglicht.

### 3.4 Die Quarz-Mikrowaage-Technik

#### 3.4.1 Grundlagen der Quarz-Mikrowaage-Technik

Die Grundlage der Quarz-Mikrowaage-Technik ist der inverse piezo-elektrische Effekt, der auf einem endlichen Anteil eines ionischen Bindungscharakters und einem nicht-zentrosymmetrischen Kristallgitter bei piezoelektrischen Materialien beruht. Der für die hier eingesetzten Resonatoren verwendete  $\alpha$ -Quarz besitzt beide Eigenschaften. Setzt man diese

Quarze einer mechanischen Spannung längs einer räumlichen Vorzugsrichtung aus, so kommt es im Kristall zu einer Ladungsverschiebung, die sich in einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen den Oberflächen des Quarzes äußert und die der Stärke der mechanischen Verformung proportional ist. Dieser sogenannte piezoelektrische Effekt ist umkehrbar: Das Anlegen einer elektrischen Spannung an die Oberflächen dieses piezoelektrischen Kristalls deformiert den Quarz, da das elektrische Feld eine Verformung des Kristallgitters induziert. Da die Richtung der Auslenkung aus der Gleichgewichtslage von der Polarität der angelegten Spannung abhängt, ist es möglich, den Quarz mit Hilfe einer Wechselspannungsquelle zu einer Schwingungsbewegung anzuregen (Abb. 3.10). Dieses Verhalten wird als Messprinzip ausgenutzt.

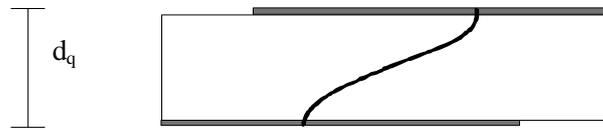


**Abb. 3.10:** Piezoelektrische Quarzscheibe im unbelasteten Zustand (A), beim Anlegen einer Gleichspannung (B) und beim Anlegen einer Wechselspannung (C).

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Anwendungen wurden nur AT-geschnittene Quarzscheiben verwendet, die zum Aufprägen des elektrischen Feldes auf beiden Seiten mit Goldelektroden bedampft waren. Die Bezeichnung AT-Schnitt gibt hierbei die kristallografische Ebene ( $35^\circ 10'$  in Richtung der z-Achse) an, parallel zu der die Scheiben aus dem Quarzkristall geschnitten wurden und die somit auch die Art der Deformation determiniert. Bei AT-geschnittenen Quarzen handelt es sich um Dickenschwinger (Abb. 3.11).

Wird eine elektrische Wechselspannung auf die Oberflächenelektroden aufgeprägt, so pflanzt sich diese Scherdeformation in Form einer transversalen akustischen Welle innerhalb des Quarzes fort. Stellt man nun die Frequenz der Wechselspannung so ein, dass die Wellenlänge dieser akustischen Welle gerade halb so groß ist wie die Dicke  $d_q$  des Quarzes (oder ein ungeradzahliges Vielfaches davon beträgt), so bildet sich eine stehende akustische Welle zwischen den Quarzoberflächen aus, die Schwingung ist resonant (Abb. 3.11). Die

Knotenebene der akustischen Welle liegt gerade in der Mitte der Quarzscheibe, während die maximale Auslenkung der Scheroszillation jeweils an der Quarzoberfläche erreicht wird.



**Abb. 3.11:** Ausbreitung einer transversalen akustischen Welle in einem Schwingquarz im Falle von resonanter Schwingung.

Die Resonanzfrequenz  $f_0$  wird folglich von der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle im Quarz und der Dicke des Quarzes  $d_q$  bestimmt. Das lässt sich analytisch ausnutzen. Die Abscheidung einer Fremdmasse  $\Delta m$  führt zu einer Zunahme von  $d_q$  um die Dicke der zusätzlich aufgetragenen Schicht  $\Delta d$ . Dies verringert wiederum die Resonanzfrequenz  $f_0$  des Quarzes um einen Frequenzbetrag  $\Delta f$ . Besitzt das abgeschiedene Material eine ähnliche Dichte und Elastizität wie der Quarz selbst, so verhalten sich Frequenzänderung  $\Delta f_M$  und abgeschiedene Masse  $\Delta m$  proportional zueinander (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta f_M = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\mu_Q\rho_Q}} \cdot \Delta m = -S_f \cdot \frac{\Delta m}{A}$$

Dabei bezeichnet  $\mu_Q$  den effektiven Elastizitätskoeffizienten ( $\mu_0 = 2.947 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$ ) für AT-geschnittene Quarze und  $\rho_Q$  die Dichte des Quarzes ( $\rho_Q = 2651 \text{ kg/m}^3$  für  $\alpha$ -Quarz). Die integrale Schichtwägemempfindlichkeit  $S_f$  ist ein Maß für die Sensitivität des Quarzes und steigt quadratisch mit der Fundamentalfrequenz  $f_0$  an. Eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit ist daher durch Verwendung dünnerer Quarzscheiben mit einer entsprechend höheren Grundfrequenz möglich. Dies hat aber aus Gründen der mechanischen Belastbarkeit praktische Grenzen. Die in dieser Arbeit verwendeten Quarze besaßen eine Resonanzfrequenz von 5 MHz und eine entsprechende Dicke von 330  $\mu\text{m}$ . Nach der Sauerbrey-Gleichung errechnet sich für diese Quarze eine integrale Schichtwägemempfindlichkeit  $S_f$  von:

$$S_f = 0.057 \frac{\text{Hz cm}^2}{\text{ng}}$$

Schwingt der Quarz nicht in der Gasphase, sondern in einer idealen Newtonschen Flüssigkeit (mit der Viskosität  $\eta_L$  und der Dichte  $\rho_L$ ), so müssen außerdem viskose Effekte in Betracht gezogen werden, die einen zusätzlichen Frequenzshift bewirken. Nach Gordon und Kanazawa (1985) ergibt sich für die Änderung der Resonanzfrequenz  $\Delta f_L$  bei Kontakt des Resonators zu einer Flüssigkeit mit der Dichte  $\rho_L$  und der Viskosität  $\eta_L$ :

$$\Delta f_L = -\frac{f_0^{3/2}}{A\sqrt{\pi\mu_Q\rho_Q}} \cdot \sqrt{\eta_L\rho_L}$$

Die dabei durch die Flüssigkeit entstehenden Dämpfungs- und Energieverluste werden bei der Ableitung der Gleichung aber nicht berücksichtigt. Diese lassen sich nach Rodahl et al. (1996) anhand des Qualitätsfaktors  $Q_0$  beschreiben, der dem Verhältnis aus gespeicherter und dissipierter Energie pro Schwingungszyklus entspricht:

$$\Delta Q_L = 2\pi \cdot \Delta(E_{\text{gespeichert}} / E_{\text{dissipiert}}) = -2Q_0^2 \sqrt{\frac{f_0}{\pi\mu_Q\rho_Q}} \cdot \sqrt{\eta_L\rho_L}$$

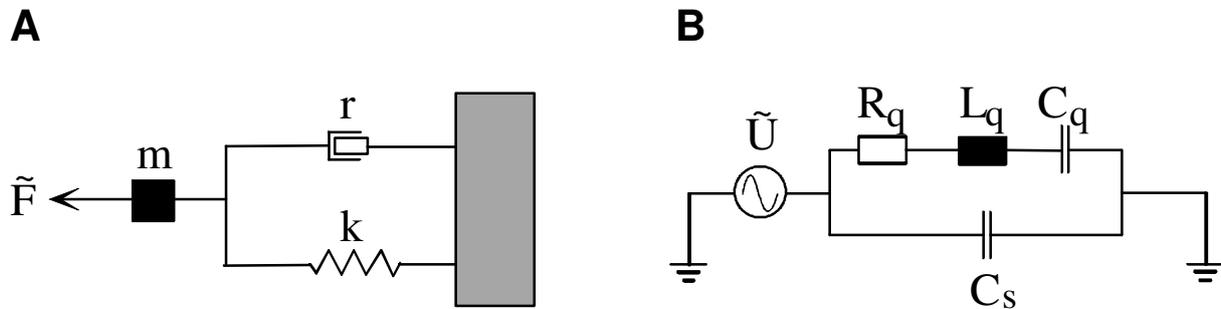
### 3.4.2 Elektromechanische Kopplung

Um die Oszillation des Quarzes detaillierter beschreiben zu können und die durch eine Beladung des Resonators mit einer Fremdmasse oder einer viskosen Flüssigkeit hervorgerufenen Änderungen unterscheiden zu können, wird die Quarzschwingung häufig mit einem mechanischen Modell beschrieben (Muramatsu et al., 1988). Dieses lässt sich aufgrund der elektromechanischen Kopplung in piezoelektrischen Materialien auf einen elektrischen Schaltkreis übertragen, dessen Kenngrößen die Berechnung derjenigen des mechanischen Modells erlauben, aber experimentell erheblich leichter zu bestimmen sind.

Das mechanische Modell des Schwingquarzes (Buttry und Ward, 1992) besteht aus einer schwingenden Masse  $m$ , die an einer Feder mit der Federkonstanten  $k$  schwingt (Abb. 3.12 A). Hier entspricht die Masse  $m$  den im Quarz bewegten Masselementen und die Federkonstante  $k$  den elastischen Eigenschaften des Resonators. Die im Quarz und an den Kontaktstellen zum Medium stattfindenden Reibungsverluste werden mit einem Dämpfungsglied  $r$  simuliert. Die Auslenkung der Feder mit einer Kraft  $F$  setzt die Schwingung in Gang.

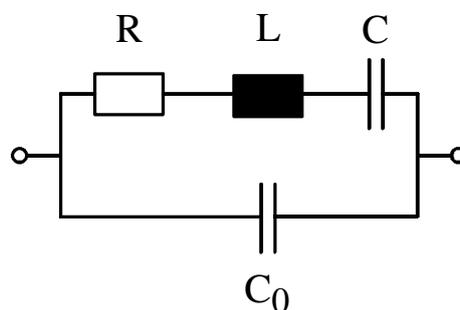
Die elektrischen Eigenschaften der Quarzschwingung lassen sich mit dem Ersatzschaltbild nach Dye und Butterworth beschreiben (Bottom, 1982). Eine Serienschaltung eines induktiven, eines kapazitiven und eines ohmschen Elements, die die piezoelektrischen Eigenschaften des Quarzes charakterisiert, wird parallel zu einer weiteren Kapazität geschaltet, die das Verhalten des Quarzes jenseits der Resonanzfrequenz beschreibt. Dabei entspricht die Induktivität  $L_q$  der schwingenden Masse  $m$ , der ohmsche Widerstand  $R_q$  dem Dämpfungsglied  $r$  und die Kapazität  $C_q$  der Federkonstante  $k$ . Einzig die Parallelkapazität  $C_0$  besitzt kein mechanisches Analogon, da sie das elektrische Verhalten der Quarzscheibe abseits der Resonanzfrequenz beschreibt, in dem die dielektrischen und nicht die piezoelektrischen Eigenschaften des Quarzes überwiegen. Die Kapazität  $C_0$  setzt sich

zusammen aus der statischen Kapazität  $C_s$ , die das Quarzmaterial als Dielektrikum zwischen den Oberflächenelektroden repräsentiert, und parasitären Kapazitäten des Messaufbaus  $C_p$ . Die auslenkende mechanische Kraft  $F$  entspricht der angelegten Wechselspannung  $U$  (Abb. 3.12 **B**).



**Abb. 3.12:** Mechanisches Modell des Federschwingers nach Buttry und Ward (1992) (A) im Vergleich mit dem entsprechenden Ersatzschaltbild der piezoelektrischen Oszillation nach Dye und Butterworth (B).

Die elektrische Schwingung des Quarzes lässt sich folglich mit dem sogenannten Butterworth-van Dyke Ersatzschaltbild beschreiben (Abb. 3.13).



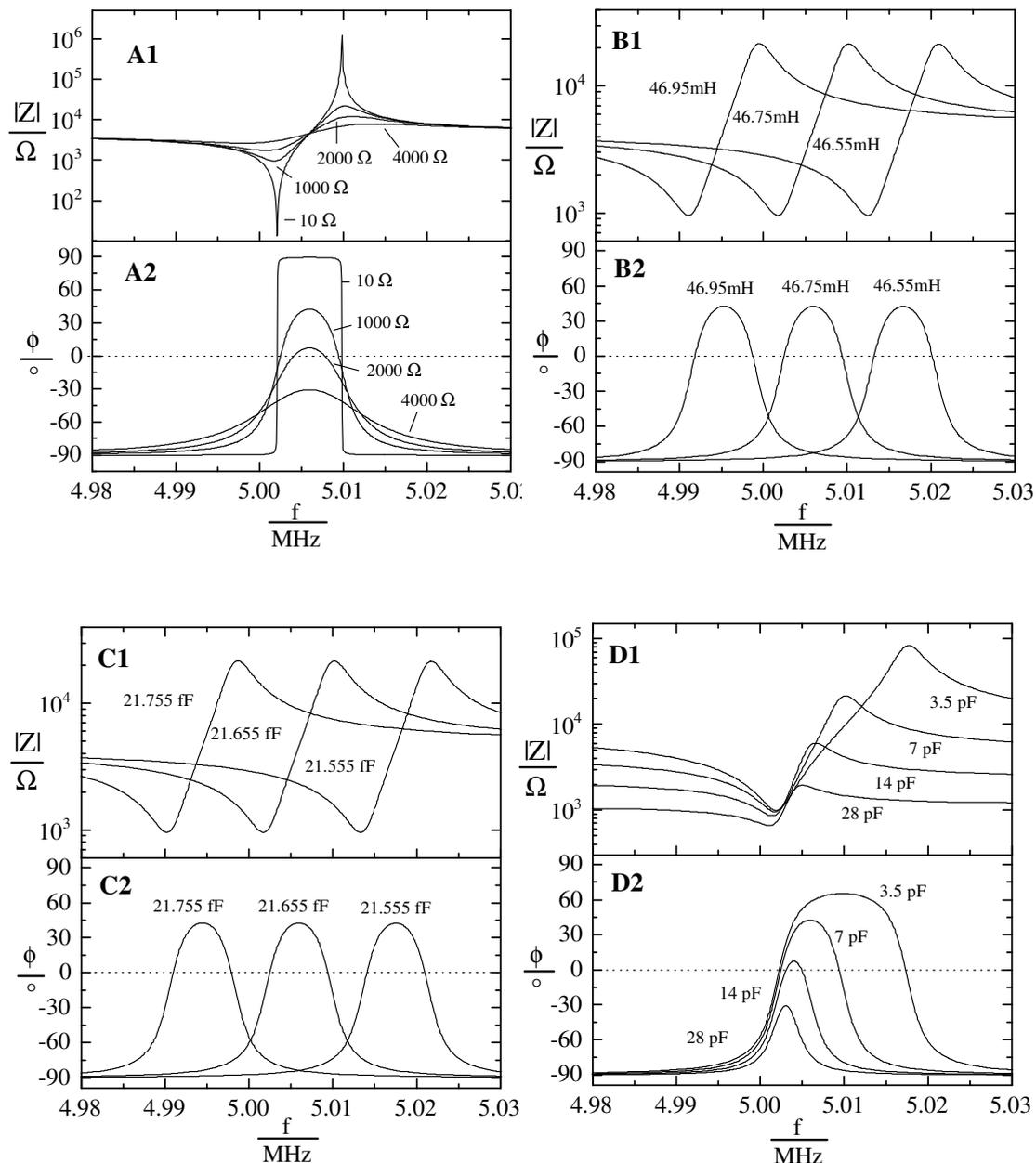
**Abb. 3.13:** Allgemeine Notation des Ersatzschaltbildes nach Butterworth-van Dyke (BVD-Schaltkreis).

### 3.4.3 Einfluß der elektrischen Kenngrößen auf den Verlauf des Bode-Diagramms

Eine Beladung des Quarzes kann die Quarzschwingung und somit auch die experimentell bestimmten elektrischen Kenngrößen  $C$ ,  $L$  und  $R$  beeinflussen. Eine Auswahl von Netzwerksimulationen, in denen immer ein Parameter variiert wird, während alle anderen konstant gehalten werden, zeigt den Einfluss der einzelnen Kenngrößen auf die Impedanz  $|Z|$  und die Phasenverschiebung  $\Phi$  (Abb. 3.14).

Die Erhöhung des Dämpfungswiderstandes  $R$  bewirkt keinerlei Verschiebung der Bode-Diagramme entlang der Frequenzachse, allerdings sinkt das Phasenmaximum der Spektren mit zunehmender Dämpfung, die Phasenspektren erfahren zusätzlich noch eine Verbreiterung

(Abb. 3.14 A2). Dagegen führt eine Änderung der Induktivität zu einer Translation des Spektrums entlang der Frequenzachse; eine Erhöhung der Induktivität geht dabei mit einer



**Abb. 3.14:** Variation von  $R$  (A),  $L$  (B),  $C$  (C) und  $C_0$  (D), dargestellt in simulierten Bode-Diagrammen. Der obere Teil jedes Diagramms zeigt den Verlauf der Impedanz  $|Z|$ , der untere den der Phasenverschiebung  $\Phi$  jeweils aufgetragen gegen die Frequenz  $f$  (Joachim Wegener, Dissertation 1998).

Verschiebung zu kleineren Frequenzen einher. Das Phasenmaximum und die Form der Kurven bleiben durch die Änderung in  $L$  unbeeinflusst (Abb. 3.14 B).

Die Variation der Kapazität  $C$  hat den gleichen Effekt auf die Form der Spektren wie die oben beschriebene Änderung der Induktivität. Eine Erhöhung von  $C$  führt ebenfalls zu einer Translation der Spektren zu kleineren Frequenzen (Abb. 3.14 C). Die Analogie in der Veränderung der Spektren bei Variation von  $L$  und  $C$  zeigt die Korrelation dieser beiden

Parameter an. Eine unabhängige Bestimmung beider Größen aus einem Impedanzspektrum ist prinzipiell nicht möglich. Da  $C$  die Elastizität des Quarzmaterials beschreibt, die von der Oberflächenbeladung weitgehend unabhängig ist, wird dieser Parameter konstant gesetzt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Quarze errechnet sich nach Noël und Topart (1994) eine Kapazität  $C$  von 21.665 pF.

Eine Änderung der Parallelkapazität  $C_0$  führt zu einer asymmetrischen Verformung der Spektren. Das Phasenmaximum sinkt mit zunehmender Kapazität ab, gleichzeitig erfolgt eine Verschiebung der Spektrenmittelpunkte zu kleineren Frequenzen (Abb. 3.14 D).

### 3.4.4 Beladung des Quarzes mit einer Fremdmasse und einer viskosen Flüssigkeit

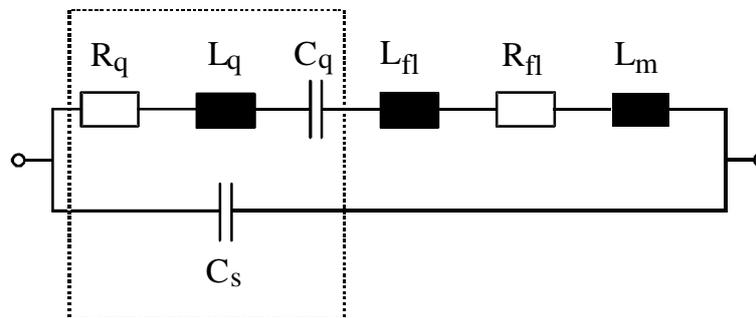
Eine Beladung des Oszillators mit einer Masse und/oder einer viskosen Flüssigkeit führt nach Martin et al. (1991) zusätzlich zu den im BVD-Netzwerk vorhandenen Elementen des unbelasteten Quarzes zu weiteren Induktivitäts- und Widerstandsbeiträgen. Die Autoren konnten zeigen, dass eine aufgebrauchte Massenbeladung nur die Induktivität  $L$  beeinflusst, während eine Newtonsche Flüssigkeit sowohl einen Beitrag zur Induktivität  $L$  wie auch zum Dämpfungswiderstand  $R$  liefert.

Eine starr an die Oberfläche des Resonators gekoppelte Fremdmasse wird bei der Oszillation des Quarzes verlustfrei mitbewegt und trägt nur zur Induktivitätsänderung bei, da eine zusätzliche Masse an der Quarzoberfläche nur die kinetische Energie des Systems erhöht, nicht aber die Energieverluste. Diese entstehen dagegen durch eine Flüssigkeitsbeladung. Das ist darauf zurückzuführen, dass sich die Scherwelle in die viskose Flüssigkeit hinein fortpflanzt. Während die erste, an der Phasengrenze immobilisierte Flüssigkeitsschicht gleichförmig mit der Scherschwingung des Quarzes mitbewegt wird (*non slip condition*), wird durch die viskose Ankopplung der weiteren Flüssigkeitsschichten kinetische Energie ins Medium abgeführt und so eine Dämpfung der Scherwelle hervorgerufen. Die Abklinglänge der Scherwelle  $\delta$  hängt von der Dichte  $\rho_{fl}$  und der Viskosität  $\eta_{fl}$  ab:

$$\delta = \sqrt{\frac{\eta_{fl}}{\pi f \rho_{fl}}}$$

Eine Beladung des Quarzes mit einer Flüssigkeit bewirkt folglich einen Induktivitätsbeitrag, der von der ersten, starr wie eine Fremdmasse an den Resonator angekoppelten Flüssigkeitsschicht herrührt. Außerdem muß aufgrund der Dämpfung der Oszillation im viskosen Medium ein zusätzlicher Dämpfungswiderstand berücksichtigt werden. Das Ersatzschaltbild des unbelasteten Quarzes muß bei einer gleichzeitigen Beladung des Quarzes mit einer Fremdmasse und einer Flüssigkeit also um die zusätzlichen seriellen

Induktivitätsbeiträge der Fremdmasse  $L_m$  und der Flüssigkeit  $L_{fl}$  sowie um einen seriellen Beitrag zum Dämpfungswiderstand  $R_{fl}$  erweitert werden (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** BVD-Ersatzschaltbild für die Beladung des Quarzes mit einer Masse und einer Flüssigkeit.

Eine Impedanzanalyse des Quarzes erlaubt jedoch keine separate Bestimmung der einzelnen Parameter, sondern nur Quantifizierung der jeweiligen Summe aller im piezoelektrischen bzw. dielektrischen Ast des Netzwerkes befindlichen Widerstände, Induktivitäten und Kapazitäten. Es gilt somit:

$$L = L_q + L_m + L_{fl}$$

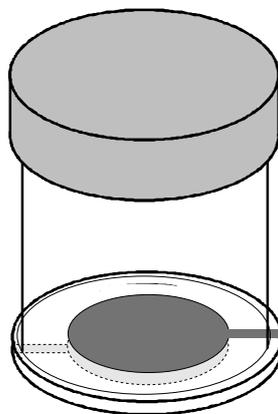
$$R = R_q + R_{fl}$$

$$C = C_q$$

$$C_0 = C_s + C_p$$

### 3.4.5 Experimentelle Durchführung

Für alle Messungen an der QCM wurden für die Zellkultur modifizierte Quarzresonatoren eingesetzt werden (Abb. 3.16). Diese bestanden aus Quarzscheiben (KVG, Niederbischofsheim), auf deren Oberseite ein Stück Glasrohr



**Abb. 3.16:** Darstellung der zur Messung eingesetzten Kulturgefäße. Diese wurden durch Aufkleben eines Glasrohrs auf die Quarzscheibe hergestellt und ermöglichten so den Einsatz in der Zellkultur. Ein Schraubgewinde am Ende des Glasrohrs ermöglicht ein Verschließen des Gefäßes.

( $\varnothing = 10$  mm,  $h = 10$  mm) mit Silikon-Kleber (Henkel, Düsseldorf) aufgeklebt war, das einen direkten Einsatz als Zellkulturgefäß ermöglichte. Alle Quarzresonatoren wurden im Brutschrank in sterilen 24-Lochplatten aufbewahrt.

#### **3.4.5.1 Vorbereitung der Quarzresonatoren zur Zellkultur**

Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden alle Schwingquarze für 5 min im Argonplasma sterilisiert. Für bestimmte Zellsorten (BAEC, HUVEC, MBCEC sowie PBCEC) musste zur Verbesserung der Adhäsion zusätzlich eine spezielle Beschichtung aus quervernetzter Gelatine auf die Quarze aufgebracht werden. Dazu wurde eine 0.5 %ige (w/v) Gelatinelösung in Wasser auf die Quarze gegeben und für mindestens 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurde eine 2.5 %ige (v/v) Glutardialdehyd-Lösung in Wasser zugegeben, die zu einer Vernetzung der Gelatine führt. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Aldehyd entfernt und für 5 min mit 70 %igen Ethanol überschichtet, um die Kulturgefäße zu sterilisieren. Danach wurde die alkoholische Lösung entfernt und die Gefäße gründlich mit Reinst-Wasser gewaschen. Anschließend wurden diese über Nacht mit Reinst-Wasser inkubiert. Um auch letzte Reste zelltoxischer Substanzen zu entfernen, wurde auch am folgenden Tag noch mindestens fünfmal mit Reinst-Wasser gewaschen. Danach wurde das Reinst-Wasser entfernt und die Zellen in der entsprechenden Dichte auf die Quarze ausgesät.

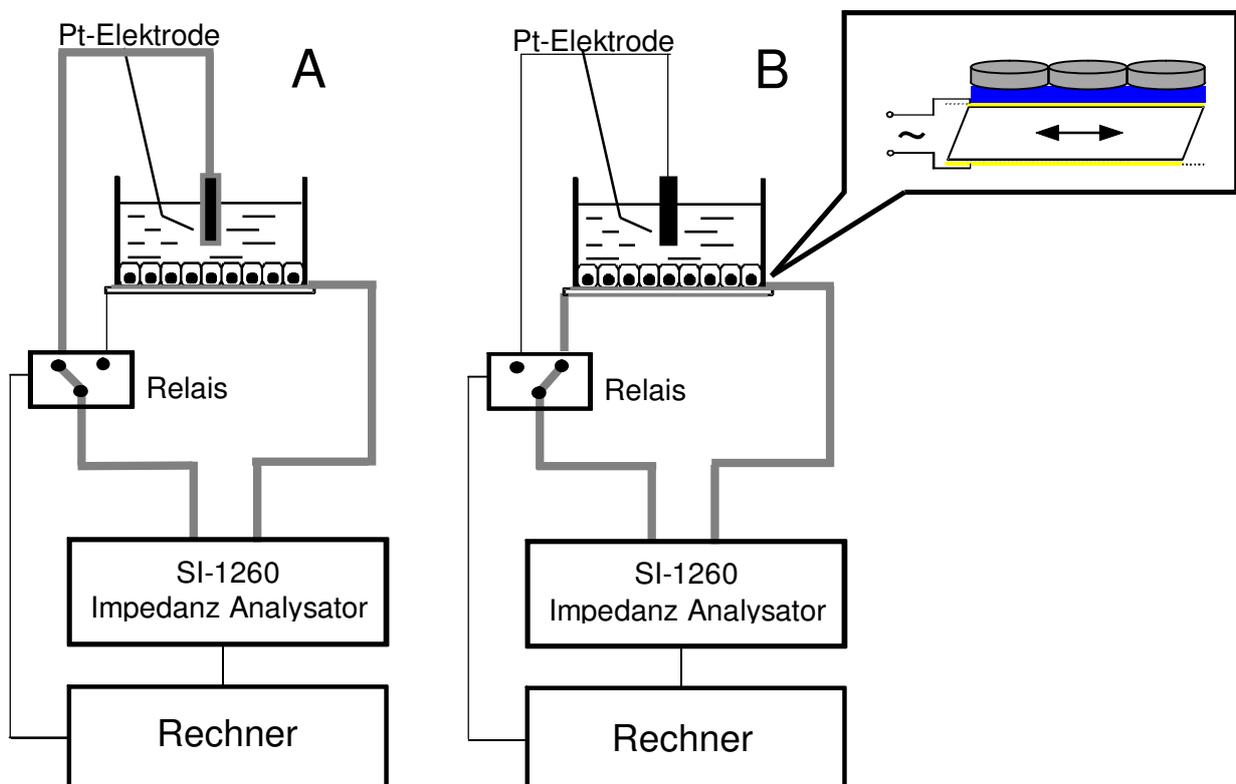
#### **3.4.5.2 Regeneration der Quarzresonatoren**

Die Quarze wurden bei einer Temperatur von 70 °C für 15 min mit einer wässrigen Detergenzlösung (Mucosol, 5 ml/l) im Ultraschallbad behandelt. Anschließend spülte man die Quarze fünfmal mit Reinst-Wasser und beschallte weitere 15 min. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, um Detergenzreste vollständig zu beseitigen. Abschließend wurden die Quarze im Trockenschrank oder im Stickstoffstrom getrocknet.

#### **3.4.5.3 Messaufbau zur impedanzspektroskopischen Untersuchung des Quarzes**

Der verwendete Messaufbau für alle bei Raumtemperatur durchgeführten impedanzspektroskopischen Messungen ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Zur Messung wurde der Quarz in einer von der feinmechanischen Werkstatt des Instituts angefertigten Halterung fixiert. Die Kontaktierung der Quarzunterseite erfolgte über einen in der Halterung eingelassenen Kupferring, während dies an der Oberseite über einen Federkontakt geschah. Um die elektrochemischen Eigenschaften des Zelllayers bestimmen zu können, tauchte eine

Platin-Gegenelektrode von oben in das die Zellen bedeckende Medium. Mit Hilfe eines computergesteuerten Relais kann zwischen der unteren Goldelektrode und der Platinelektrode umgeschaltet werden. Dies ermöglicht eine nahezu gleichzeitige Messung in zwei unterschiedlichen Modi: Zur Bestimmung der elektrischen Eigenschaften der Zellschicht im Sinne von ECIS-Messungen (*electric cell-substrate impedance sensing*; s. 3.5) sind die zellbedeckte Goldelektrode und die Platinelektrode mit dem Impedanzanalysator (Solatron Instruments, SI-1260) verbunden (Abb. 3.17 A), im *Quarz-Modus* (Abb. 3.17 B) dagegen die beiden auf dem Quarz aufgedampften Goldelektroden.



**Abb. 3.17:** Schematische Darstellung des für die Impedanzanalyse des Quarzes verwendeten Messaufbaus. Ein Relais ermöglicht das Umschalten zwischen ECIS- (A) und den mikrogravimetrischen Messungen (B). Die für den jeweiligen Modus verwendete Verschaltung von Quarzober- und unterseite sowie der Gegenelektrode wird durch die graue Linie gekennzeichnet. Die Bestimmung der Impedanz wird durch einen Impedanzanalysator (Solatron SI-1260) ermöglicht. Die Steuerung des Impedanzanalysators und die Auswertung der Daten erfolgt mit einem handelsüblichen Computer.

Dadurch kann der Einfluss der anwesenden Zellen auf die Scheroszillation des Quarzes parallel zu den passiven elektrischen Eigenschaften der Zellschicht bestimmt werden. Somit lassen sich durch bestimmte Effektoren hervorgerufene Veränderungen von Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen mit beiden Methodiken parallel untersuchen. Zur Steuerung des Impedanzanalysators sowie der Speicherung der Messdaten diente ein handelsüblicher PC.

### 3.4.5.4 Impedanzspektroskopie lebender Zellen im *Quarz-* und *ECIS-Modus*

Der zellbedeckte Quarz wurde aus dem Brutschrank entnommen und das Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden 500 µl Krebs-Ringer-Puffer<sup>++</sup> (KRP<sup>++</sup>; mit Calcium und Magnesium) zugegeben und der Quarz 15 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Nach dem Einbau in die Messapparatur wurden jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS-* und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Schließlich wurden an der Quarzoberfläche anhaftende Zellen und Proteine mechanisch entfernt und der gereinigte Quarz fünfmal im *Quarz-Modus* gemessen. Die für diesen „Leerquarz“ bestimmten mikrogravimetrischen Parameter dienen als Referenzwerte für die vorher gemessenen Gesamtwerte des zellbedeckten Quarzes. Dies ermöglicht die Ermittlung des allein auf den entsprechenden Zellmonolayer zurückzuführenden Anteils der im *Quarz-Modus* erhaltenen Parameter ( $\Delta R$  bzw.  $\Delta L$ ).

Krebs-Ringer-Puffer <sup>++</sup>	1.1 mM MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O
	1.25 mM CaCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O
	114 mM NaCl
	5 mM KCl
	20 mM NaHCO <sub>3</sub>
	1.65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12 H <sub>2</sub> O
	0.3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
	10 mM HEPES
	25 mM Glucose
	in Reinst-Wasser; pH = 7.40

### 3.4.5.5 Impedanzspektroskopische Untersuchung fixierter Zellen im *Quarz-* und *ECIS-Modus*

Um das Verhalten chemisch fixierter Zellen sowohl bezüglich der mikrogravimetrischen wie auch der passiven elektrischen Parameter untersuchen und diese mit denen von lebenden Zellen vergleichen zu können, wurden zwei unterschiedliche Protokolle eingesetzt. Diese



**Abb. 3.18:** Strukturformeln der eingesetzten Fixierungsreagenzien Glutaraldehyd (A) und Paraformaldehyd (B).

beruhen auf der Verwendung zweier häufig zur Stabilisierung von lebenden Proben experimentell eingesetzter aber chemisch unterschiedlich reaktiver Fixierungsreagenzien (Abb. 3.18). Während Glutardialdehyd (GA) als bifunktionelles Aldehyd mit definierter Kettenlänge zur Vernetzung von Proteinkopfgruppen führt, ist die Struktur von Paraformaldehyd (PFA) aufgrund seines polymeren Aufbaus weniger definiert. Die Kettenlänge  $n$  liegt etwa zwischen 8 und 100 Monomeren (<http://www.roempp.com>).

Eine sich an diese Präparation anschließende Permeabilisierung des Zelllayers mit einem nichtionischen Detergenz sollte weitere Aufschlüsse hinsichtlich des Einflusses der Zellmembran auf die passiven elektrischen wie die mikrogravimetrischen Parameter liefern.

Der zellbedeckte Quarz wurde aus dem Brutschrank entnommen und 15 min lang auf Raumtemperatur äquilibriert. Nach dem Einbau in die Messapparatur wurden jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Danach wurde das Medium abgesaugt und die entsprechende Fixierungslösung direkt auf das Substrat gegeben. Verwendet wurden Lösungen von 2.5 % (v/v) GA in PBS<sup>++</sup> oder 4 % (w/v) PFA in PBS<sup>++</sup>. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation der Zellen bei RT. Das Fixierungsreagenz wurde wieder gegen das jeweilige Zellkulturmedium ausgetauscht und der Quarz erneut in den Messaufbau eingebracht. Nach der Aufzeichnung von jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* wurde das Medium abgesaugt und eine 0.2 %ige (v/v) Triton-Lösung zugegeben. Der Zelllayer wurde für 5 min bei RT inkubiert, danach wurde die Triton-Lösung wiederum gegen Zellkulturmedium ausgetauscht und jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Schließlich wurden an der Quarzoberfläche anhaftende Zellen und Proteine mechanisch entfernt und der gereinigte Quarz fünfmal im *Quarz-Modus* gemessen. Die für diesen „Leerquarz“ bestimmten mikrogravimetrischen Parameter dienten als Referenzwerte für die vorher gemessenen Gesamtwerte des Quarzes mit konfluenter Zellschicht. Dies ermöglicht die Ermittlung des allein auf den entsprechenden Zellmonolayer zurückzuführenden Anteils der im *Quarz-Modus* erhaltenen Parameter ( $\Delta R$  bzw.  $\Delta L$ ).

#### **3.4.5.6 Impedanzspektroskopische Untersuchung von Zellen nach Abbau des Aktincytoskeletts**

Um den Einfluss des Aktincytoskeletts auf die Quarzoszillation zu untersuchen, wurde das Verhalten von Zellmonoschichten auf Schwingquarzen nach selektiver Zerstörung des Aktincytoskeletts mittels Cytochalasin D impedanzspektroskopisch untersucht. Eine

anschließende Fixierung sollte einen Vergleich mit den aus 3.4.5.4 erhaltenen Daten für fixierte Zellen mit intaktem Cytoskelett ermöglichen.

### Selektiver Abbau des Aktin-Cytoskeletts mit Cytochalasin D

Die Verwendung des zellpermeablen Pilzgiftes Cytochalasin D (CD) (Abb. 3.19) ermöglicht in der Zellbiologie den direkten Eingriff in die Aktin-Polymerisation. Cytochalasine sind Toxine aus primitiven Pilzen und verschieben das Gleichgewicht zwischen g- und f-Aktin in Richtung der Monomere. Da Cytochalasin D eine hohe Spezifität für Aktin aufweist, können dadurch hervorgerufene Veränderungen der Zelle selektiv auf die Zerstörung des Aktincytoskeletts zurückgeführt werden.

Die hier verwendete 5  $\mu\text{M}$  CD-Lösung in Zellkulturmedium wurde aus einer Stammlösung von Cytochalasin D in DMSO (2 mg/ml) hergestellt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde der zu untersuchende Zellschicht für 2 h mit der CD-Lösung inkubiert. Anschließend konnte für mikroskopische Studien das manipulierte Aktincytoskelett nach Fixierung mittels TRITC-Phalloidin angefärbt werden (s. 3.2.3).

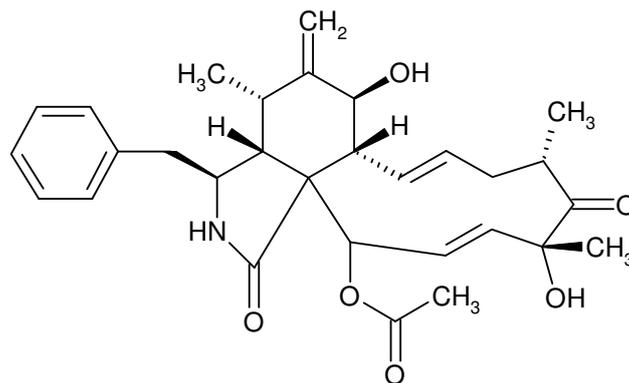


Abb. 3.19: Strukturformel des Pilzgiftes Cytochalasin D.

Der zellbedeckte Quarz wurde aus dem Brutschrank entnommen und 15 min auf Raumtemperatur äquilibriert. Nach dem Einbau in die Messapparatur wurden jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Danach wurde das Medium abgesaugt und gegen Zellkulturmedium getauscht, das 5  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D enthielt. Anschließend wurde der Quarz für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, daraufhin erneut 15 min bei RT äquilibriert und nach dem Einbau in den Messaufbau impedanzspektroskopisch charakterisiert. Schließlich wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellschicht durch Zugabe einer 2.5 %ige (v/v) Glutardialdehyd-Lösung für 30 min bei RT fixiert. Nach Absaugen des Fixierungsreagenzes wurde Zellkulturmedium hinzugefügt und nach dem Einbringen des Quarzes in den Messaufbau erneut jeweils 5 Impedanzspektren

im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Schließlich wurde der Zelloyer mechanisch entfernt und der gereinigte Quarz impedanzspektroskopisch charakterisiert.

#### **3.4.5.7 Vernetzung einer Proteinschicht**

Um den Einfluss einer fixierten Proteinschicht auf die Quarzschwingung zu untersuchen, wie sie bei der Fixierung von Zellen durch die gleichzeitige Fixierung der extrazellulären Matrix entsteht, wurde der Quarz mit einer 0.5 %igen (w/v) Gelatine-Lösung in Reinst-Wasser für 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Quarz mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und impedanzspektroskopisch untersucht. Danach wurde der Puffer abgesaugt und eine 2.5 %ige (v/v) Glutardialdehyd-Lösung in Reinst-Wasser zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde das Fixierungsreagenz wieder entfernt und erneut mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Auf die impedanzspektroskopische Untersuchung des Quarzes folgte schließlich die mechanische Entfernung des artifiziellen Proteinlayers von der Quarzoberfläche und eine erneute Untersuchung des gereinigten Quarzes.

#### **3.4.5.8 Osmotischer Einfluß von Glutardialdehyd**

Eine deutliche Veränderung der Osmolarität im umgebenden Medium hat einen drastischen Einfluss auf die Morphologie und die mikrogravimetrischen Parameter adhärenter Zellen (Wegener et al., 2000). So führt ein Anstieg der Osmolarität zu einer proportionalen Zunahme des Dämpfungswiderstandes und der Induktivität. Um einen solchen osmotischen Effekt auf die mikrogravimetrischen Parameter durch die Zugabe des Fixierungsreagenzes auszuschließen, wurde eine Saccharose-Lösung gleicher Osmolarität auf ihren Einfluss auf die Quarzszillation untersucht.

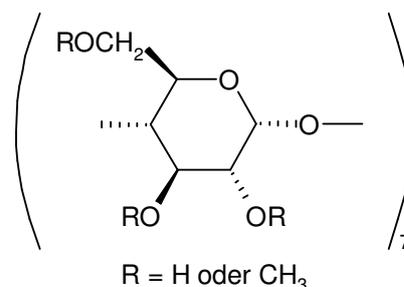
Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde der zellbedeckte Quarz mit 150 µl PBS<sup>++</sup> überschichtet und für 15 min bei RT äquilibriert. Danach wurde der Quarz in den Messaufbau eingebracht und im *Quarz-Modus* zeitaufgelöst untersucht, indem fortlaufend Impedanzspektren aufgezeichnet wurden. Sobald die Quarzspektren keine größeren Veränderungen mehr zeigten, wurde 800 µl einer 250 mM Saccharose-Lösung in PBS<sup>++</sup> zugegeben und die dadurch induzierten Änderungen impedanzspektroskopisch gegen die Zeit verfolgt. Nach dem Ende der Messung wurde der Quarz mechanisch gereinigt, um die Zellen und die darunterliegende Proteinschicht zu entfernen. Nach einer erneuten impedanzspektroskopischen Charakterisierung im *Quarz-Modus* dienten die mechanischen Parameter des gereinigten Quarzes zur Normierung der zuvor gemessenen Werte.

### 3.4.5.9 Kinetik der Vernetzungsreaktion

Um die Kinetik des Fixierungsvorgangs näher untersuchen zu können, wurde die Reaktion eines Zelllayers auf die beiden unterschiedlichen Fixantien in Abhängigkeit von der Zeit im *Quarz-Modus* verfolgt. Dazu wurde das Zellkulturmedium zuerst aus den Quarzgläsern entfernt und 150 µl PBS<sup>++</sup> zugegeben. Anschließend wurden Quarzspektren aufgenommen, bis ein stationärer Zustand des Zelllayers erreicht war. Danach wurden 800 µl des jeweiligen Reagenzes (2.5 % (v/v) GA bzw. 4 % (w/v) PFA in PBS<sup>++</sup>) zugegeben und die Änderungen der mechanischen Eigenschaften des Zelllayers impedanzspektroskopisch untersucht. Nach dem Ende der Messung wurde der Quarz mechanisch gereinigt, um die Zellschicht sowie die darunter liegende Proteinschicht zu entfernen. Nach einer erneuten impedanzspektroskopischen Charakterisierung im *Quarz-Modus* dienten die mechanischen Parameter des gereinigten Quarzes zur Normierung der zuvor gemessenen Werte.

### 3.4.5.10 Einfluß von Methyl-β-Cyclodextrin auf die mikrogravimetrischen Parameter

Bei Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) handelt es sich um einen cyclischen Zucker, der aus sieben Glucoseeinheiten aufgebaut ist, die über eine O-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind (Abb. 3.20). Dieses Molekül ist nach Francis et al. (1999) in der Lage, Cholesterin einzuschließen. Dies kann zellbiologisch in zweierlei Hinsicht genutzt werden. So ist es möglich, MβCD mit Cholesterin zu beladen, um diesen Komplex



**Abb. 3.20:** Strukturformel von Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD).

anschließend dazu zu nutzen, Cholesterin gezielt in eine Membran einzubringen. Andererseits führt eine Zugabe von unbeladenem MβCD zu einer nativen Zellmembran zu einer aktiven Entfernung des in der Membran befindlichen Cholesterins. Dieser Effekt soll in dieser Arbeit ausgenutzt werden, um zu untersuchen, wie sich eine Verringerung der Cholesterinkonzentration in der Membran um 70-80 % (Francis et al., 1999) auf die mikrogravimetrischen und die elektrischen Parameter auswirkt. Da eine wichtige Aufgabe des Cholesterins in der Zellmembran die Steuerung der Fluidität ist, könnten sich insbesondere

aus der Analyse der Daten im *Quarz-Modus* Anhaltspunkte für eine Veränderung der Membranelastizität finden lassen.

Für alle mit M $\beta$ CD durchgeführten Studien wurden MDCK-2 Zellen verwendet. Die Messungen zur simultanen Quantifizierung der mikrogravimetrischen und elektrischen Parameter der Zellschicht auf Schwingquarzen wurden in einem physiologischen Phosphatpuffer durchgeführt, dem zusätzlich Glucose (1 g/l) zugesetzt worden war. Dazu wurde der entsprechende Quarz aus dem Brutschrank entnommen, das Kulturmedium abgesaugt und der Puffer zugesetzt. Anschließend wurde der Quarz für 15 min auf Raumtemperatur äquilibriert. Danach wurden jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Daraufhin wurde der Puffer gegen Phosphatpuffer getauscht, der 20 mM M $\beta$ CD enthielt, und der Quarz für 2 h bei 37 °C inkubiert. In analogen Kontrollexperimenten wurde der Quarz ohne einen Mediumwechsel direkt für 2 h in einen Wärmeschrank bei 37 °C eingebracht. Nach dieser Inkubation wurden erneut jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen, der Quarz wurde mechanisch gereinigt und wiederum anhand von 5 Impedanzspektren im *Quarz-Modus* charakterisiert.

#### **3.4.5.11 Mikrogravimetrische Untersuchungen zum fototoxischen Effekt von Calcein AM**

Knight et al. (2003) haben festgestellt, dass der zellpermeable Vitalfarbstoff Calcein AM, der durch zelluläre Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgesetzt wird, bei Bestrahlung innerhalb seines Excitationsbereichs fototoxisch wirkt. Dies führt zum Tod der bestrahlten Zellen. Da dies mit starken morphologischen Änderungen der Zellen verbunden ist, wurde dieser Vorgang sowohl anhand der Änderung der elektrischen wie auch der mikrogravimetrischen Eigenschaften der Zellen untersucht.

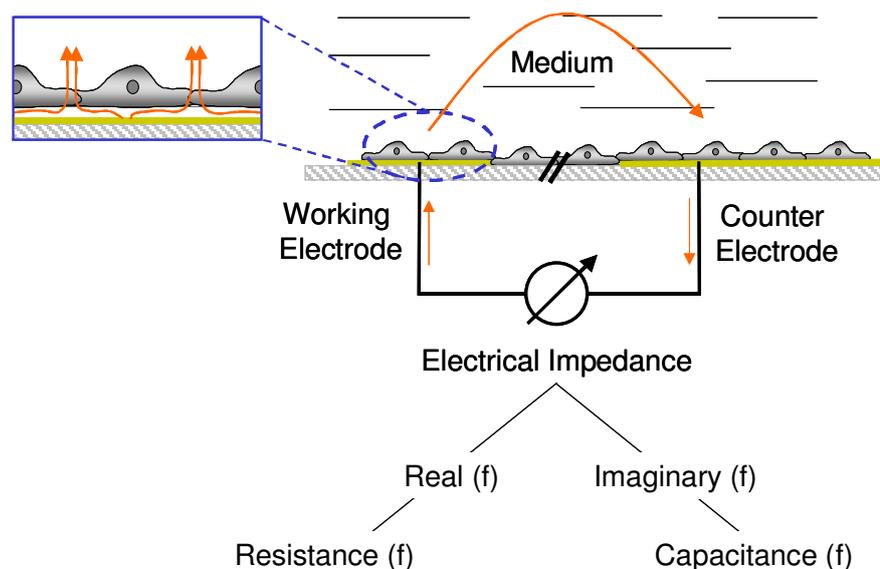
Das Medium wurde etwa 24 h vor dem Experiment letztmalig ausgetauscht. Zur Durchführung wurde das Medium vorsichtig aus den Quarzgläschen abgesaugt und durch 500  $\mu$ l einer 2  $\mu$ M Calcein AM-Lösung ersetzt. Diese wurde durch Mischen von 5  $\mu$ l einer Calcein AM-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO, Molecular Probes) mit 2.5 ml PBS<sup>++</sup>, dem 1 mg/ml Glucose zugesetzt war, hergestellt. Nach der Zugabe wurden die Zellen 45 min bei 37 °C mit der Calcein AM-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Schwingquarz in die Messapparatur eingebaut (s. Abb. 3.17), für 15 min auf Raumtemperatur äquilibriert und danach jeweils 5 Impedanzspektren im *ECIS*- und im *Quarz-Modus* aufgenommen. Mit Hilfe eines Auflichtmikroskops wurden die Zellschichten dann durch Einstrahlung von blauem

Licht (420-490 nm) über ein 5x Objektiv, das die mit Calcein beladenen Zellen sichtbar macht, fokussiert. Anschließend erfolgte für 10 min die Bestrahlung mit blauem (420-490 nm) bzw. im Falle der Kontrolle mit grünem Licht (515-560 nm). 24 Stunden nach der Belichtung wurden die Zellschichten anhand von 5 Impedanzspektren im *ECIS*- bzw. *Quarz-Modus* impedanzspektroskopisch untersucht, um die durch die Belichtung ausgelösten Effekte zu charakterisieren.

### 3.5 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing

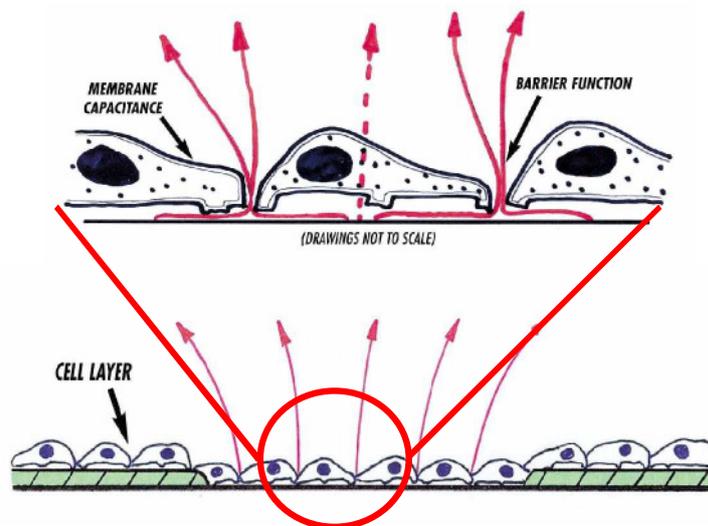
Die Morphologie adhärenter Zellen und ihre dynamische Veränderung, die durch biologische, chemische oder physikalische Stimuli hervorgerufen werden, können mit Hilfe der sogenannten *ECIS*-(*electric cell-substrate impedance sensing*) Technik quantitativ und mit einer zeitlichen Auflösung im Sekundenbereich erfasst und analysiert werden.

Das Prinzip der *ECIS*-Messung wurde 1984 von Giaever und Keese zum ersten Mal beschrieben. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen auf Goldoberflächen kultiviert, die einerseits als Wachstumssubstrat und andererseits als Elektrode für die elektrochemische Messung dienen. Die damit verbundene, unmittelbare Nähe zwischen den Zellen und der Elektrode begründet die Sensitivität des Verfahrens. Um einen geschlossenen Stromkreis zu gewährleisten, sind zwei Elektroden nötig (Arbeits- und Gegenelektrode), die über das Kulturmedium leitend miteinander verbunden sind (Abb. 3.21, Wegener, 2003).



**Abb. 3.21:** Schematische Darstellung des grundlegenden Prinzips von *ECIS*-Messungen.

Die Zellen verhalten sich auf der Goldelektrode wie Isolatorpartikel, die den Strom zwingen, um die Zellkörper herumzuzufießen, und damit den elektrischen Wechselstromwiderstand (Impedanz) der Elektrode im Vergleich zu einer nicht mit Zellen belegten Elektrode erhöhen (Abb. 3.22). Dieser kann als Funktion der Frequenz des Erregersignals gemessen werden. Durch die Messung des frequenzabhängigen Wechselstromwiderstandes lässt sich zwischen Impedanzbeiträgen des Zell-Substrat-Kontaktes und solchen aus dem Zell-Zell-Kontakt differenzieren. Wiederholte Messungen bieten somit die Möglichkeit morphologische Änderungen der Zellen als Funktion der Zeit zu detektieren. Das in dieser Arbeit eingesetzte *continuous-wave*-Verfahren verwendet zur Impedanzmessung als Erregersignal eine sinusförmige Wechselspannung kleiner Amplitude. Diese wurde in Abhängigkeit vom Flächeninhalt der eingesetzten Elektroden auf 0.07 V (ECIS-Array), 0.01 V (Schwingquarz) bzw. 0.02 V (ITO (*indium tin oxide*)-Substrate) festgelegt.

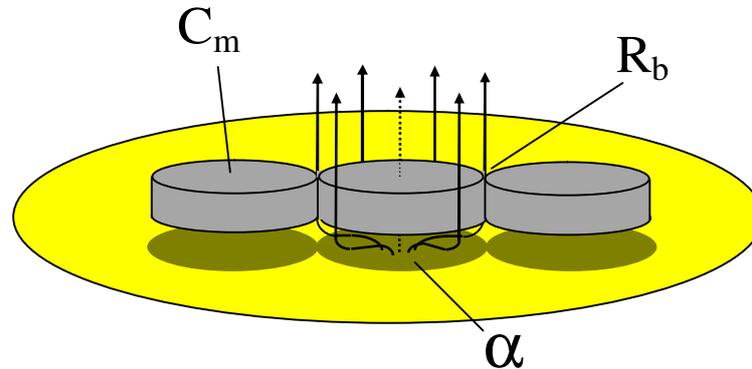


**Abb. 3.22:** Schematische Darstellung des Stromflusses aus einer zellbedeckten Arbeitselektrode. Die durchgezogenen Pfeile zeigen den Strom bei niedrigen und mittleren Frequenzen ( $< 10$  kHz), der parazellulär durchtritt. Der gestrichelte Teil repräsentiert den transzellulären Strom, der bei hohen Frequenzen ( $> 10$  kHz) kapazitiv durch die Zelle fließt.. (Quelle: <http://www.biophysics.com>)

### 3.5.1 Analyse der Impedanzspektren zellbedeckter Metallfilmelektroden für zylindrische Zellen

Die durch die Zellen zusätzlich verursachte Impedanz lässt sich in drei lokal voneinander getrennte Beiträge unterteilen (Abb. 3.23, Wegener, 2003). Der Hauptteil des Stromes fließt bei niedrigen und mittleren Frequenzen ( $< 10$  kHz) parazellulär, indem er zunächst den Spalt zwischen Elektrodenoberfläche und Zellunterseite passiert. Da dieser Spalt nicht selten weniger als 100 nm weit ist, liefert er einen der Hauptanteile zur gemessenen

Gesamtimpedanz und wird durch den Modellparameter  $\alpha$  gekennzeichnet (Wegener, 2003). Die Dimensionen des Interzellularspaltes zwischen zwei benachbarten Zellen entsprechen



**Abb. 3.23:** Schematische Darstellung des Modells von Giaever und Keese (1991). Die Zellen werden als Zylinder mit dem Radius  $r_c$  aufgefasst, die sich im Abstand  $d$  vom Substrat befinden. Der durchgezogene Pfeil kennzeichnet den parazellulären, der unterbrochene den transzellulären Stromfluß.

etwa denen zwischen Zelle und Substrat. Somit entsteht in diesem Bereich eine weitere Hauptkomponente der gemessenen Gesamtimpedanz, die durch den Parameter  $R_b$  charakterisiert wird.  $R_b$  ist der Widerstand zwischen benachbarten Zellen, der durch die barrierebildenden Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) bestimmt wird. Bei hohen Frequenzen ( $> 10$  kHz) fließt ein kleiner Anteil des Stromes kapazitiv durch die Zelle. Dieser transzelluläre Impedanzanteil wird durch den Parameter  $C_m$  charakterisiert und entspricht der spezifischen Kapazität der Plasmamembran. Der Betrag von  $C_m$  gibt Auskunft über die Größe der Zelloberfläche unter Berücksichtigung von Membranausstülpungen und -einfaltungen. Das von Giaever und Keese entwickelte Modell erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen Impedanzbeiträgen, die von Zell-Substrat-Interaktionen herrühren und jenen, die von Zell-Zell-Kontakten stammen. Die drei Parameter  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  können somit zur quantitativen Beschreibung der Zellmorphologie herangezogen werden. Für den zur Auswertung erforderlichen mathematischen Formalismus werden die Zellen als Zylinder mit dem Radius  $r_c$  aufgefasst, die sich in einem Abstand  $h$  vom Substrat befinden.

Mit Hilfe des Modells lässt sich die Gesamtimpedanz der zellbedeckten Elektrode  $Z_{total}$  mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\frac{1}{Z_{total}} = \frac{1}{Z_n} \left\{ \left[ \frac{Z_n}{(Z_n + Z_m)} \right] + \left[ \frac{Z_m}{(Z_n + Z_m)} \right] \times \left[ \frac{1}{2} \cdot \gamma r_c \left( \frac{I_0(\gamma r_c)}{I_1(\gamma r_c)} \right) + R_b \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right) \right]^{-1} \right\}$$

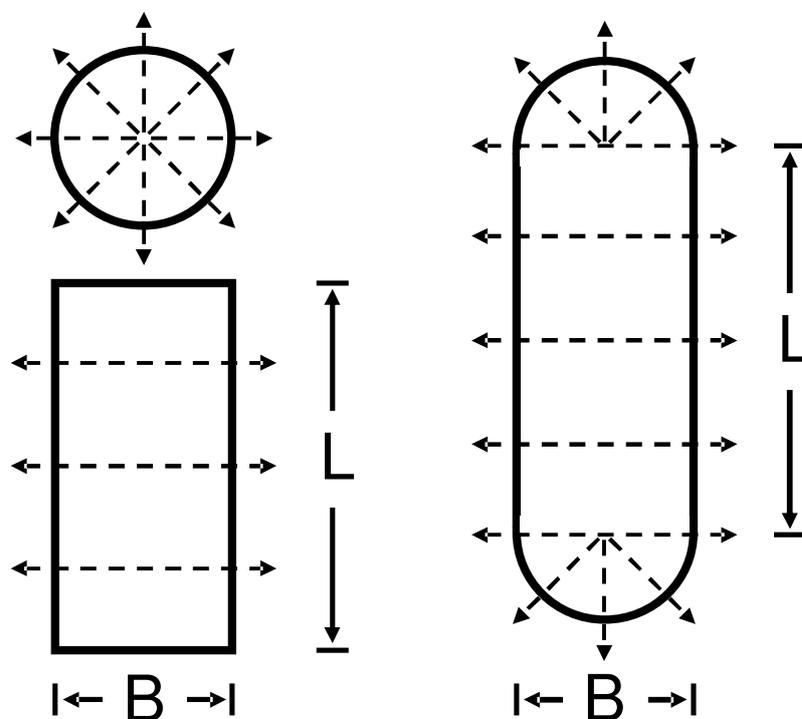
$$\text{mit } \gamma = \frac{\alpha}{r_c} \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}$$

$Z_n$  ist die Impedanz der zellfreien Elektrode,  $Z_m$  die Summe der Impedanzbeiträge der apikalen und basolateralen Membranen mit  $Z_m = 2/(i\omega C_m)$ . Bei  $I_0$  und  $I_1$  handelt es sich um modifizierte Besselfunktionen erster Art der Ordnung 0 und 1.

$\alpha$  ist definiert als  $\alpha = r_c \cdot (\rho_{\text{sub}} / d)^{1/2}$ , wobei  $r_c$  den Radius der Zelle,  $\rho_{\text{sub}}$  den spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionsspalt und  $d$  den Abstand zwischen Zelle und Substrat bezeichnen.

### 3.5.2 Analyse der Impedanzspektren zellbedeckter Metallfilmelektroden für Zellen mit ellipsoider Grundfläche

Der in Abschnitt 3.5.1 beschriebene mathematische Formalismus fasst sämtliche Zellen als flache Zylinder mit dem Radius  $r_c$  auf. Diese Modellvorstellung stimmt mit der pflastersteinartigen Morphologie (*cobblestone*) vieler bekannter Zelllinien (z.B. MDCK) und unterschiedlicher primär kultivierter Zellen (z.B. HUVEC) hinreichend überein. Für einen Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Zellen trifft diese Annahme ebenfalls zu. Primär kultivierte porcine Kapillarendothelzellen (PBCEC) zeigen allerdings eine von dieser Regel stark abweichende ausgeprägt längliche spindelförmige Morphologie. Die Anwendung eines



**Abb. 3.24:** Schematisches Modell für Zellen mit länglicher Grundfläche auf einer Metallfilmelektrode nach Lo und Ferrier (1998). Der Adhäsionskontakt der Zellen wird als rechteckige Box ( $L \times B$ ) mit Halbkreisen ( $r_c = B/2$ ) an jedem Ende modelliert.

Zylinder-Modells auf diese Zellen würde zu einer Überschätzung der durchschnittlichen Weglänge des Stromflusses und damit zu einer Überbestimmung des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  führen. Lo und Ferrier (1998) haben für Fibroblasten länglicher Morphologie ein angepasstes Modell entwickelt, das diesen besonderen Umstand berücksichtigt. Zur Berechnung der Gesamtimpedanz nehmen die Autoren eine Zellform an, die sich aus einem Rechteck und zwei Halbkreisen an dessen jeweiligen Enden zusammensetzt (Abb. 3.24).

Dabei gehen die geometrischen Dimensionen der Zelle als L (Länge des Rechtecks) und B (Breite des Rechtecks) in das Modell ein. Mit Hilfe dieses Modells lässt sich dann die Gesamtimpedanz der zellbedeckten Elektrode  $Z_{total}$  mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\frac{1}{Z_{total}} = \frac{1}{Z_n + Z_m} \left\{ \begin{array}{l} 1 + \left( \frac{LB}{LB + \frac{\pi B^2}{4}} \right) \frac{\frac{2Z_m}{Z_n}}{\gamma B \coth\left(\frac{\gamma B}{2}\right) + 2R_b^{rec} \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \\ + \left( \frac{\frac{\pi B^2}{4}}{LB + \frac{\pi B^2}{4}} \right) \frac{\frac{2Z_m}{Z_n}}{\frac{\gamma B}{2} \frac{I_0(\gamma B/2)}{I_1(\gamma B/2)} + 2R_b^{disk} \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \end{array} \right\}$$

$$\text{mit } R_b^{rec} = \frac{\frac{4L}{B} + 2\pi}{\frac{4L}{B} + \pi} R_b \quad \text{und} \quad R_b^{disk} = \frac{\frac{2L}{B} + \pi}{\frac{4L}{B} + \pi} R_b$$

$Z_n$  ist die Impedanz der zellfreien Elektrode,  $Z_m$  die Summe der Impedanzbeiträge der apikalen und basolateralen Membranen mit  $Z_m = 2/(i\omega C_m)$ . Bei  $I_0$  und  $I_1$  handelt es sich um modifizierte Besselfunktionen erster Art der Ordnung 0 und 1.

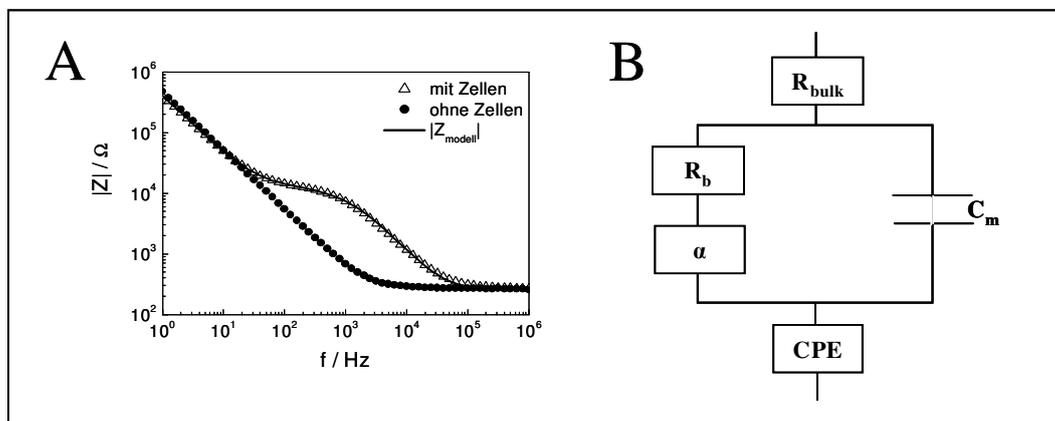
$\alpha$  ist definiert als  $\alpha = 0.5 B \cdot (\rho_{sub} / d)^{1/2}$ , dabei ist  $0.5 B$  der Radius des Halbkreises,  $\rho_{sub}$  der spezifische Elektrolytwiderstand im Adhäsionsspalt und  $d$  der Abstand zwischen Zelle und Substrat.

### 3.5.3 Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Daten

Die iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Impedanzspektren zur Bestimmung der drei Parameter  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  erfolgte nach einem Verfahren von Wegener et al. (2000) und ist anhand eines exemplarischen Spektrums in Abbildung 3.25 A dargestellt.

Abbildung 3.25 **B** zeigt ein Ersatzschaltbild, welches das beschriebene Modell von Giaever und Keese (1991) in erster Näherung veranschaulicht. Während die Parameter der Zell-Substrat- und Zell-Zell-Zwischenräume,  $\alpha$  und  $R_b$ , die die parazellulären Impedanzbeiträge widerspiegeln, in Reihe geschaltet sind, fließt parallel dazu der transzelluläre Strom kapazitiv durch die Zelle ( $C_m$ ). Mit diesen Zellkomponenten in Reihe geschaltet sind das CPE, die nicht-ideale Impedanz an der Grenzfläche zwischen der Goldelektrode und der Elektrolytlösung sowie der ohmsche Widerstand der Elektrolytlösung  $R_{\text{bulk}}$ .

Verfolgt man nun den Weg des Stroms anhand des Ersatzschaltbildes, so lässt sich die Frequenzabhängigkeit der Gesamtimpedanz anhand der unterschiedlichen elektrischen



**Abb. 3.25:** **A** Typische Impedanzspektren einer Goldelektrode ohne Zellen (●) und mit Zellen (△). Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion des oben beschriebenen Modells. **B** Ersatzschaltbild einer zellbewachsenen Elektrode zur näherungsweise Veranschaulichung des Modells von Giaever und Keese (1991).  $R_{\text{bulk}}$  symbolisiert den ohmschen Widerstand der Elektrolytlösung,  $R_b$  den ohmschen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte,  $\alpha$  die frequenzabhängige Impedanz des Zell-Substrat-Kontaktes.  $C_m$  charakterisiert die Kapazität der Plasmamembran und CPE steht für die nicht-ideale Impedanz an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt.

Eigenschaften der Komponenten erklären. So wird bei niedrigen Frequenzen der Betrag der Gesamtimpedanz ausschließlich von der Grenzflächenimpedanz der Elektrode bestimmt, während bei mittleren Frequenzen der Strom parazellulär fließt und so das Spektrum von  $R_b$  und  $\alpha$  dominiert wird. Die Frequenzunabhängigkeit des ohmschen Widerstandes  $R_b$  bewirkt, dass sich in diesem Bereich ein Plateau in den Spektren ausbildet, das für konfluente Zellschichten typisch ist. Die Steigung in diesem Plateau wird durch den Parameter  $\alpha$  bestimmt, der neben ohmschen auch frequenzabhängige Eigenschaften besitzt. Erst bei höheren Frequenzen fließt der Strom transzellulär. Der spezifische Elektrolytwiderstand des Kulturmediums beeinflusst die Gesamtimpedanz für die hier betrachteten Elektrodengrößen erst bei Frequenzen von  $10^5$  bis  $10^6$  Hz.

### 3.5.4 Bestimmung des spezifischen Widerstandes $\rho_{\text{sub}}$ zwischen Zelle und Substrat

Die direkte Bestimmung des extrazellulären Widerstandes im Adhäsionskontakt unterhalb der Zelle ist technisch sehr aufwendig und wurde erst in jüngster Zeit (Kiessling et al., 2000) für einzelne Erythrozyten bzw. Erythrozyten-Ghosts realisiert. In Ermangelung anderer Daten wurde davor von unterschiedlichen Autoren (Lo et al., 1995; Weis und Fromherz, 1997) der spezifische Widerstand mit dem des Kulturmediums  $\rho_{\text{bulk}}$  in der *bulk*-Phase gleichgesetzt. Die speziellen Gegebenheiten des Spaltes zwischen Zelle und Substrat wie z.B. der Einfluss der zur Anhaftung notwendigen Adhäsionsproteine blieben dabei weitestgehend unberücksichtigt. Auf ähnliche Art und Weise wurden mangels verlässlicher Methoden zur absoluten Bestimmung des Abstandes zwischen Zelle und Substrat Annahmen bezüglich der Ausdehnung des Spaltes gemacht. Verlässliche Werte für diese Abstände konnten erst nach Etablierung der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast- (FLIC) Mikroskopie (s. 3.2.1) bestimmt werden. In dieser Arbeit wird durch die Kombination von FLIC-Mikroskopie zur Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes und elektrochemischer Methoden (ECIS) eine Möglichkeit aufgezeigt, um den spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt zu bestimmen.

Als Grundlage zur Berechnung des spezifischen Widerstandes diene der aus den ECIS-Experimenten gewonnene Parameter  $\alpha$ :

$$\alpha = r_c \cdot \left( \frac{\rho_{\text{sub}}}{d} \right)^{1/2}.$$

Nach Umformen erhält man

$$\rho_{\text{sub}} = \left( \frac{\alpha}{r_c} \right)^2 \cdot d.$$

Mit Hilfe des aus den ECIS-Messungen erhaltenen Wertes für  $\alpha$ , dem aus den FLIC-Messungen bestimmten Abstand der jeweiligen Zellmonoschicht vom Substrat  $d$  sowie dem aus mikroskopischen Bildern bestimmten Zellradius  $r_c$  wird der spezifische Widerstand für die jeweilige Zellspezies errechnet.

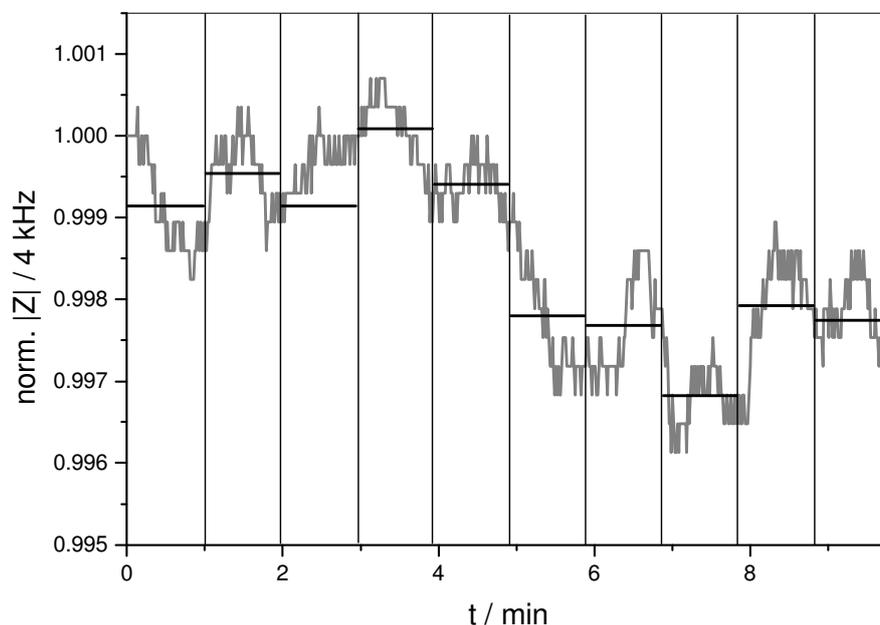
### 3.5.5 *Micromotion*

Adhärente Zellen sitzen nicht völlig starr auf ihrem Substrat, sondern führen kleine senkrechte Bewegungen aus, die sich in ECIS-Experimenten als Fluktuationen der elektrischen Impedanz registrieren lassen (Giaever und Keese, 1991). Dieses biologische Rauschen ist charakteristisch für die Vitalität der Zellen und lässt sich nach Untersuchungen von Lo et al. (1993) mit der metabolischen Aktivität der Zellen korrelieren. Daher soll diese Methode

Aufschluss darüber geben, wie sich eine Fixierung von MDCK-2 Zellen mit Glutardialdehyd auf die Bewegungsfluktuation der Zellschicht auswirkt. Dazu wurde die Impedanz der Zellschicht auf der entsprechenden Elektrode bei einer festen Frequenz von 4 kHz für jeweils 50 min registriert. Dies wurde für alle untersuchten Elektroden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich lange einer Inkubation mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung (10 min, 20 min bzw. 30 min) bei RT ausgesetzt. Danach wurden die Mikrobewegungen der Zellen erneut anhand von ECIS-Messungen für 1 h bei 4 kHz aufgezeichnet.

### 3.5.6 Analyse der *Micromotion*-Daten

Zur Analyse der Daten wird der gesamte Datensatz in gleich große Intervalle von 64 einzelnen Datenpunkten aufgeteilt. Abbildung 3.26 illustriert diese Aufteilung anhand der normierten Impedanz gemessen bei 4 kHz an konfluenten MDCK-2 Zellen. Da die Experimente mit einer zeitlichen Auflösung von 1 s aufgezeichnet wurden, entspricht die Intervallgröße einer Messzeit von 64 s. Die durchgezogene waagerechte Linie innerhalb jeder Box kennzeichnet den Mittelwert aus den betrachteten 64 Datenpunkten. Die Bestimmung der



**Abb. 3.26:** Schematische Darstellung zur Erläuterung der Analyse der *Micromotion*-Daten. Abgebildet ist die normierte Impedanz bei 4 kHz von MDCK-2 Zellen. Der Datensatz wurde in einzelne Blöcke zu je 64 Datenpunkten unterteilt. Von diesen Bereichen wurde dann jeweils der Mittelwert nebst Standardabweichung und Varianz ermittelt. Zur Beschreibung der Fluktuationen innerhalb des gesamten Datensatzes wird die Varianz aller 64 Datenblöcke gemittelt und für die unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

Varianz für jede Box liefert dann einen quantitativen Parameter für die Motilität der Zellen. Zur Beschreibung der Fluktuationen innerhalb des gesamten Datensatzes wird die Varianz aller 64er Datenblöcke gemittelt und für die unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

### **3.5.7 Experimentelle Durchführung**

#### **3.5.7.1 ECIS-Untersuchungen auf Goldelektroden**

Parallel zu den mikrogravimetrischen Untersuchungen auf Schwingquarzen wurden elektrochemische Messungen an exakt den gleichen Zellschichten (ECIS) durchgeführt. Neben der hier als Arbeitselektrode verwendeten Goldelektrode des Schwingquarzes mit einer Größe von  $0.33 \text{ cm}^2$  wird eine platierte Gegenelektrode benötigt, die in das Medium eintaucht (s. Abb. 3.17). Eine Anpassung der Rohdaten erfolgte nach Wegener et al. (2000).

Die Untersuchungen zur Zellmotilität fixierter und nativer Zellschichten (s. 3.5.6) sowie die zeitabhängige Messung des Einflusses von M $\beta$ CD auf MDCK-2 Zellen wurde auf kommerziellen ECIS-Elektrodenarrays durchgeführt. Diese planaren Goldfilmelektroden der Firma Applied Biophysics Inc. (Troy, NY) sind so angeordnet, dass acht unterschiedliche Messkammern nahezu simultan untersucht werden können. Diese *wells* weisen eine Kulturfläche von jeweils  $0.75 \text{ cm}^2$  auf. Jedes *well* enthält eine kleine Arbeitselektrode mit einer Fläche von  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$  sowie eine Gegenelektrode, die etwa 300mal größer ist. Die Beiträge der Gegenelektrode zur Gesamtimpedanz kann somit vernachlässigt werden. Das gesamte Array ist mit einer fotosensitiven Schicht überzogen, nur die Arbeitselektrode, die Gegenelektrode sowie die Kontaktpunkte, über die der Anschluß an die Messapparatur erfolgt, sind fotolithografisch freigelegt worden. Um eine automatisierte Messung der einzelnen *wells* gewährleisten zu können, wurde ein Relais verwendet, das die sequentielle Ansteuerung der einzelnen Elektroden regelt. Ein Microcontroller steuert die Kommunikation zwischen dem Relais, dem verwendeten Impedanz-Analysators (SI 1260, Solatron Instruments) und einem handelsüblichen PC, mit dem die Erfassung und Speicherung der Messdaten erfolgte.

#### **3.5.7.2 ECIS-Untersuchungen auf ITO-Elektroden**

Um den fototoxischen Effekt von Calcein AM auf MDCK-2 Zellen durch ECIS-Messungen zu dokumentieren, wurden die Zellen auf planaren Filmelektroden aus ITO kultiviert, die zu einem Array mit vier individuellen Messkammern (*wells*) arrangiert sind. Jedes *well* besitzt eine Arbeitselektrode mit einer Fläche von etwa  $8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$  sowie eine Gegenelektrode. Diese

ist etwa 300mal größer als die Arbeitselektrode, so dass deren Impedanzbeiträge im Vergleich zur Arbeitselektrode vernachlässigt werden können.

### 3.5.7.3 Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau besteht aus einem handelsüblichen inversen Forschungsmikroskop (Nikon Diaphot TMD; Nikon, Düsseldorf), das zusätzlich mit einem geschlossenen Kunststoffaufbau (Pfeile) versehen wurde (Harnischmacher Kunststofftechnik, Kassel), der auf den Mikroskoptisch aufgesetzt wurde (Abb. 3.27). Dieser ermöglicht eine auf  $\pm 0.5$  °C genaue Temperierung der Probe auf die zellkulturübliche Temperatur von 37 °C. Die elektrische Kontaktierung der ITO-Substrate erfolgte über Metallspangen, die auf den Mikroskoptisch fixiert sind. Um zwischen den einzelnen Arbeitselektroden wechseln zu können, wurde ein Relais-Modul verwendet, welches eine sequentielle Ansteuerung der einzelnen *wells* ermöglichte. Ein Microcontroller steuert die Kommunikation zwischen dem Relais, dem verwendeten Impedanz-Analysators (SI 1260, Solatron Instruments) und einem handelsüblichen PC, mit dem die Erfassung und Speicherung der Messdaten erfolgte.

Mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe (100 W, Nikon, Düsseldorf) und der entsprechenden Filter (FITC (420-490 nm), TRITC (510-560 nm)) können die Zellen auf den transparenten ITO-Elektroden mit Licht der gewünschten Wellenlänge bestrahlt werden. Zur Belichtung wurde ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung (NA = 0.25; Nikon, Düsseldorf) verwendet.



**Abb. 3.27:** Experimenteller Aufbau für die ECIS-Experimente mit ITO-Elektroden. Das ITO-Substrat befindet sich in dem Kunststoffaufsatz, der auf 37 °C temperiert wurde, und ist über Metallspangen auf dem Mikroskoptisch kontaktiert. Die verschiedenen Arbeitselektroden können über ein Relais-Modul angesteuert werden, welches mit einem Impedanzanalysator (Solatron Instruments, SI 1260) verbunden ist. Relais-Modul und Impedanzanalysator wurden von einem handelsüblichen PC gesteuert, der auch zur Datenaufnahme und -sicherung diente.

### 3.5.7.4 Fotolithografische Herstellung der ITO-Substrate

Das Aufbringen des gewünschten Elektrodenlayouts auf die ITO-Substrate erfolgte durch fotolithografische Methoden und ein anschließendes nasschemisches Ätzen. Zunächst wurden kommerziell erhältliche ITO-Substrate in Objektträgergröße (PGO, Iserlohn) mit einem Schichtwiderstand  $\leq 10 \Omega/\text{sq}$  aus einer Distanz von etwa 20 cm mit einem Fotoresistlack (Positiv 20, Kontakt Chemie; CRC Industries, Iffezheim) besprüht, so dass eine gleichmäßig dicke Lackschicht entstand. Anschließend erfolgte die Trocknung der Objektträger in einem Trockenofen (Memmert, Schwabach) bei 70 °C für 15 min. Zur Belichtung wurden die Objektträger zusammen mit einer für das jeweilige Elektrodenlayout erstellten Maske auf ein UV-Belichtungsgerät (Isel, Eiterfeld) gelegt und 2 min ultraviolettem Licht ausgesetzt. Die dabei belichteten Lackbereiche veränderten durch fotochemische Reaktionen ihre Farbe von grün nach blau und wurden anschließend durch eine 1-2 minütige Entwicklung mit einer verdünnten NaOH-Lösung (7 g/l) entfernt. Die so freigelegten Oberflächenbereiche wurden nun mit einem Gemisch aus konzentrierter Salpetersäure und konzentrierter Salzsäure sowie Reinst-Wasser im Verhältnis 6:47:47 für 45 bis 60 min bei RT geätzt. Der überschüssige Fotoresistlack wurde mit Aceton entfernt und die Objektträger mit Ethanol gereinigt. Abschließend wurde mit Hilfe von Silikonkleber (Henkel, Düsseldorf) ein 8-well-Kunststoffaufsatz (LabTek, Nunc, Wiesbaden) auf die Objektträger aufgebracht, der den Einsatz in der Zellkultur ermöglicht.

### 3.5.7.5 Reinigung der ITO-Substrate

Die ITO-Substrate wurden zur Reinigung mit einer wässrigen Detergenzlösung (Mucosol, 5 ml/l) bei einer Temperatur von 70 °C für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Substrate fünfmal mit Reinst-Wasser gespült und erneut für weitere 15 min dem Ultraschallbad ausgesetzt. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, um Detergenzreste vollständig zu beseitigen. Schließlich wurden die ITO-Substrate im Trockenschrank oder im Stickstoffstrom getrocknet.

Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden alle ITO-Substrate für 3 min im Argonplasma sterilisiert.

### 3.5.7.6 ECIS-Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM

Zellmorphologische Veränderungen, die möglicherweise durch den fototoxischen Effekt von Calcein AM induziert werden, wurden mit Hilfe der ECIS-Methode untersucht. Dabei kann

zwischen Impedanzbeiträgen des Zell-Zell-Kontaktes und solchen des Zell-Zell-Kontaktes unterschieden werden.

Etwa 24 h vor dem Experiment wurde das Medium letztmalig ausgetauscht. Am Tag des Experiments wurde das Medium vorsichtig von den Zellen abgesaugt und durch 400  $\mu$ l einer 2  $\mu$ M Calcein AM-Lösung ersetzt. Diese wurde durch Mischen von 5  $\mu$ l einer Stammlösung (1 mg/ml in DMSO, Molecular Probes) mit 2.5 ml PBS<sup>++</sup>, dem 1 mg/ml Glucose zugesetzt worden war, hergestellt. Als Kontrolle wurde einem *well* nur 400  $\mu$ l PBS-Glucose ohne Calcein AM zugesetzt. Nach der Zugabe wurden die Zellen 90 min mit der Calcein AM-Lösung inkubiert. Währenddessen wurde das ITO-Substrat auf dem eingehausten Mikroskopisch (37 °C) kontaktiert (s. Abb. 3.27) und von allen Elektroden Impedanzspektren aufgenommen, bis sich stationäre elektrische Parameter eingestellt hatten. Anschließend wurden die Proben 5 min lang blauem Licht (420-490 nm) ausgesetzt. Die Kontrolle (kein Calcein AM) wurde nur 5 min mit blauem Licht bestrahlt. Die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften der Zellen wurden gegen die Zeit verfolgt.

### 3.5.7.7 Einsatz von Natriumascorbat als Reduktionsmittel

Natriumascorbat ist ein Reduktionsmittel, welches die gegebenenfalls bei der Belichtung entstehenden reaktiven Sauerstoff-Spezies abfangen soll. Dadurch soll der fototoxische Effekt von Calcein AM inhibiert und die Beteiligung von reaktiven Sauerstoff-Spezies an der Zellschädigung nachgewiesen werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 3.5.7.6 beschrieben, wobei die Calcein AM-Lösung zusätzlich Natriumascorbat in einer Konzentration von 1 mM enthielt. Die Zellen wurden vor der Exposition 90 min mit der Reagenzlösung inkubiert und anschließend 5 min mit blauem Licht (420-490 nm) bestrahlt. Der Effekt wurde wie zuvor anhand von ECIS-Messungen verfolgt.

### 3.5.7.8 Einsatz eines Caspase-3-Inhibitors als Nachweis für Apoptose

Viele apoptotische Prozesse werden durch Caspasen vermittelt und als solche können sie experimentell durch die spezifische Inhibition der Caspasen nach einem zu untersuchenden Stimulus identifiziert werden. In diesem Experiment wurde Ac-DEVD-CHO als Caspase-3-Inhibitor eingesetzt. Dieser besitzt die für die Caspase-3 spezifische Spaltungssequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp).

Zur Durchführung des Experimentes wurden die Zellen wie unter 3.5.7.6 beschrieben kultiviert und präpariert. Die 2  $\mu$ M Calcein AM-Lösung enthielt jedoch zusätzlich Ac-DEVD-

CHO in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$ . Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurden die Zellen 5 min mit blauem Licht (420-490 nm) bestrahlt und der Effekt anhand von ECIS-Messungen zeitlich verfolgt.

### 3.6 Rasterkraftmikroskopie

#### 3.6.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) ermöglicht eine zerstörungsfreie Abbildung von Oberflächen in atomarer Auflösung sowie die Bestimmung von Materialeigenschaften einer Probe. Im Gegensatz zu anderen Techniken, mit denen sich ähnliche oder bessere Auflösungen erreichen lassen wie z. B. die Elektronenmikroskopie, ist dazu keinerlei Vorbehandlung der Probe nötig, die eventuell zu artifiziellen Strukturveränderungen biologischer Proben führen kann. Die Rasterkraftmikroskopie hat somit seit ihrer Entwicklung im Jahre 1986 durch Binnig, Quate und Gerber (Binnig et al., 1986) und insbesondere mit der darauf folgenden Optimierung der Methode an eine Messung im wässrigen Milieu (Alexander et al., 1989) die Möglichkeit zur Untersuchung der Dynamik vitaler Zellen bei hoher Auflösung geschaffen.

Zur Untersuchung einer Probe tastet in der Rasterkraftmikroskopie ein Hebelarm (Cantilever) mit sehr feiner Spitze die Oberfläche ab. Wechselwirkungen zwischen den Atomen der Spitze und denen der Probenoberfläche wie z.B. Coulomb-, Van der Waals- oder elektrostatische Kräfte resultieren in einer Auslenkung des Cantilevers.

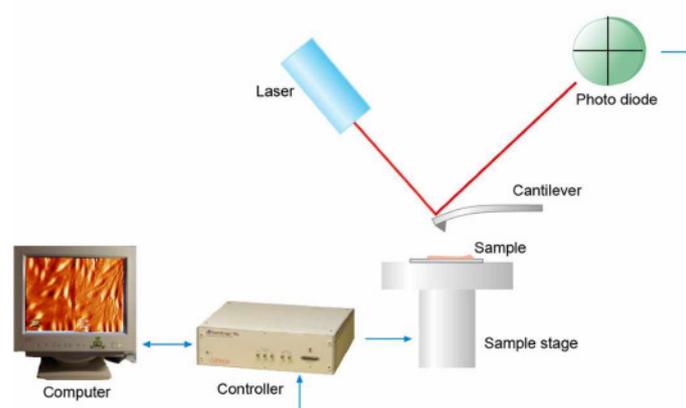


Abb. 3.28: Schematischer Aufbau des AFM.

Hält man nun die Kraft, mit der über die Probe gerastert wird, mittels eines piezoelektrischen Bewegungssystems konstant (*constant force mode*), so wird die Topographie der Substratoberfläche nachgezeichnet. Die dazu nötige Auslenkung des Cantilevers wird über

einen Laserstrahl detektiert, der vom Hebelarm auf eine als Detektor dienende Vier-Segment-Fotodiode reflektiert wird. Eine computergestützte Auswertung dieser Bewegung ermöglicht dann die Errechnung einer dreidimensionalen Abbildung der Oberfläche. Abbildung 3.28 stellt den Aufbau des AFM schematisch dar.

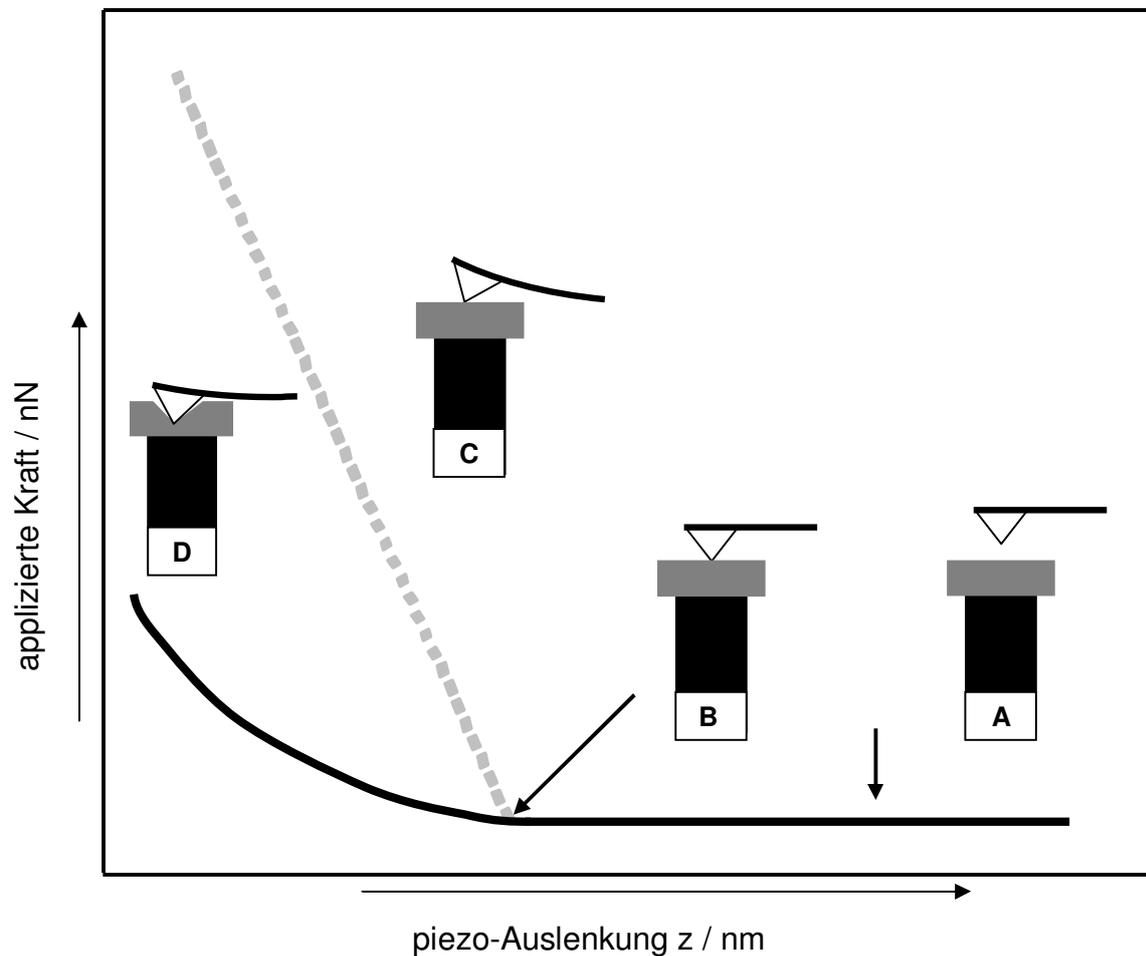
Zwei Betriebsmodi lassen sich in der Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Probe verwenden: Der *contact*-Modus ist eine statische Betriebsart und zur Abbildung biologischer Proben nur bedingt geeignet. Während der Messung ist die Spitze in direktem Kontakt mit Oberfläche. Trifft der Cantilever auf eine Erhöhung, so wird dessen Auslenkung detektiert und der Abstand zur Spitze wieder auf eine konstante Kraft reguliert. Dies kann bei vitalen Systemen mit geringer Rigidität wie z.B. Zellen zu einer nicht erwünschten Kompression oder sogar einer irreversiblen Deformation der Probe führen. Der *tapping*-Modus dagegen bietet eine dynamische Möglichkeit die Oberfläche zu untersuchen. Der Cantilever wird hier zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt und dann an die Probe angenähert. In der Nähe der führt dies zu einer Dämpfung der Schwingungsamplitude des Cantilevers. Durch Justierung des Abstandes zwischen der Spitze und dem Substrat wird diese Schwingungsamplitude konstant gehalten und die Oberflächentopographie trotz diskontinuierlichen Kontakts aufgezeichnet. Dies minimiert Reibungskräfte an der Probenoberfläche des Substrates und eignet sich deshalb besonders zur Untersuchung vitaler Systeme.

### 3.6.2 Kraft-Abstands-Kurven

Das Rasterkraftmikroskop lässt sich nicht nur als bildgebendes Verfahren mit atomarer Auflösung verwenden, sondern mit ihm kann man auch lokal Kräfte messen oder applizieren und so insbesondere Informationen über die mechanischen Eigenschaften einer untersuchten Probe liefern. Dies ist speziell für zelluläre Systeme interessant, da viele mechanische Eigenschaften eukaryotischer Zellen in zellulären Prozessen eine große Rolle spielen. (Elson, 1988)

Durch Aufzeichnung der wirkenden Kräfte während der Annäherung und Entfernung der Spitze des Cantilevers an die Probenoberfläche können die Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe quantifiziert werden. Abbildung 3.29 stellt die Annäherung des Cantilevers an eine Probe und die resultierende Kraft-Abstandskurve dar. Für eine steife, rigide Probe findet man während der Annäherung an die Oberfläche eine konstante Auslenkung des Cantilevers (Abb. 3.29 A). Dies ändert sich, sobald die Spitze mit dem Substrat in Kontakt

tritt (Abb. 3.29 **B**). Die Auslenkung nimmt nun proportional mit der piezo-Auslenkung zu (Abb. 3.29 **C**). Weiche Substrate zeigen dagegen ein anderes Verhalten. Nachdem die Spitze



**Abb. 3.29:** Exemplarische Auftragung der auf eine Probe applizierte Kraft gegen die piezo-Auslenkung des Cantilevers während der Messung einer Kraft-Abstands-Kurve (nach Radmacher et al., 1995). Zu Beginn der Messung hat der Cantilever keinen Kontakt zur Probe, die applizierte Kraft bleibt konstant (**A**). Dies ändert sich, sobald die Spitze des Cantilevers auf die Probenoberfläche trifft (**B**). Handelt es sich bei der Probe um ein sehr steifes, rigides Material, das sich vom Cantilever nicht verformen lässt, so nimmt die Verformung des Hebelarms proportional zur aufgebrachten Kraft zu (**C**). Wird allerdings eine vergleichsweise weiche (z.B. biologische) Probe untersucht, die durch die Spitze des Hebelarms verformt werden kann, so steigt die gemessene Kraft wesentlich langsamer an (**D**). Die Differenz zwischen diesen beiden Zuständen ist ein Maß für die Elastizität der weichen Probe.

die Oberfläche berührt, führt eine weitere Erhöhung der applizierten Kraft zu einem langsameren, der piezo-Auslenkung nicht proportionalem Anstieg der Auslenkung des Cantilevers (Abb. 3.29 **D**). Dieser Unterschied zwischen piezo- und Cantilever-Auslenkung ist auf die Kompression der Probe durch die Spitze zurückzuführen. (Tao et al., 1992; Weisenhorn et al., 1993; Radmacher et al., 1995).

### 3.6.3 Experimentelle Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm) kultiviert. In Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen wurden die entsprechenden Präparationsschritte vorgenommen.

Die Aufnahme der Bilder sowie die Elastizitätsmessungen wurden mit einem handelsüblichen AFM (Bioscope, Digital Instruments, Santa Barbara, California, USA) durchgeführt. Vor Beginn der Messung wurde das Medium durch einen physiologischen Phosphatpuffer ersetzt (PBS<sup>++</sup> bzw. PBS<sup>++</sup> mit 1 g/l Glucose) und die Probe auf eine Temperatur von 20 °C äquilibriert. Es wurden weiche Cantilever mit einer Federkonstante von weniger als 0.01 N/m (Microlever, Park Scientific, Santa Clara, California, USA) verwendet wie von Butt und Jaschke (1995) vorgeschlagen (*thermal noise method*).

Alle Bilder wurden im *contact mode* aufgenommen. Um das Elastizitätsmodul zu bestimmen, wurde das AFM im *force volume mode* betrieben, dabei wurde ein zweidimensionales Feld von 64 x 64 Kraft-Abstands-Kurven erfasst, während die Probenoberfläche abgerastert wurde. Die Kraft-Abstands-Kurven wurden bei einer Frequenz von 2.5 Hz gemessen. Aus der Analyse der einzelnen Kraft-Abstands-Kurven konnte dann eine zweidimensionale Karte der gemessenen Elastizitätsmoduli abgeleitet werden (Radmacher, 2002). Außerdem können aus diesen Daten auch topografische Bilder gewonnen werden. Die Aufnahme einer solchen Karte nahm 90 Minuten in Anspruch. Um eine mechanische Beanspruchung der biologischen Probe zu minimieren und um zu gewährleisten, dass ausschließlich die Oberseite des Zelllayers durch den Cantilever eingedrückt wird, wurde die maximal applizierte Kraft auf 350-500 pN minimiert. Die Berechnung der Elastizitätsmoduli erfolgte unter der Benutzung des durch Sneddon optimierte Hertz'sche Modell für elastische Einkerbungen (Radmacher, 2002; Johnson, 1994; Sneddon, 1965).

## 4 Ergebnisse

Die Mikrogravimetrie hat sich in biologischen Anwendungen zu einem nützlichen Werkzeug zur Detektion von Adhäsionsprozessen entwickelt. Die Etablierung der Methode in der Zellbiologie ermöglicht die Untersuchung der mechanischen Interaktion zwischen adhärennten Zellen und dem Resonator. Dabei ist aber eine genaue Interpretation des gemessenen QCM-Signals schwierig, da wenig über die einzelnen Zellkomponenten und ihre Wirkung auf die Quarzoszillation bekannt ist. Diese Arbeit soll anhand von Messungen unterschiedlicher Zelltypen sowie durch die Bestimmung der Auswirkungen der chemischen Veränderung einzelner Zellkomponenten auf die Quarzoszillation einen Ansatz bieten, die Ergebnisse mikrogravimetrischer Untersuchungen besser zu verstehen und eine präzisere Interpretation dieser Messungen vornehmen zu können.

### 4.1 Mikrogravimetrische Messungen an unterschiedlichen Zelltypen

Um die unterschiedlichen mechanischen Wirkungen der einzelnen Zellsorten auf die Quarzoszillation quantifizieren zu können, werden diverse Zelllinien sowie primär kultivierte Zellen auf den Resonatoren kultiviert und untersucht. Die Untersuchung der mechanischen Komponenten des Zell-Substrat-Adhäsionskontaktes erfolgt mittels eines Schwingquarzes, der im Bereich seiner fundamentalen Resonanzfrequenz impedanzspektroskopisch untersucht wird (*Quarz-Modus*). Der Einfluß einer Zellschicht oder eines Proteinfilms auf die Quarzschwingung wird anhand der Änderung des Oszillationsverhaltens detektiert. Diese Änderung kann anhand der aus dem BVD-Ersatzschaltbild (s. 3.4.2) erhaltenen mikrogravimetrischen Parameter  $R$  und  $L$  quantifiziert werden. Dabei führen viskoelastische Effekte an der Quarzoberfläche, wie sie durch eine Änderung von Dichte oder Viskosität der Umgebung hervorgerufen werden können, zu einer korrespondierenden Änderung des Dämpfungswiderstandes  $R$ . Reine Massenabscheidungen, wie die Absorption eines Proteinlayers auf dem Resonator, sowie eine Veränderung der elastischen Gegebenheiten induzieren dagegen eine Erhöhung der Induktivität  $L$ .

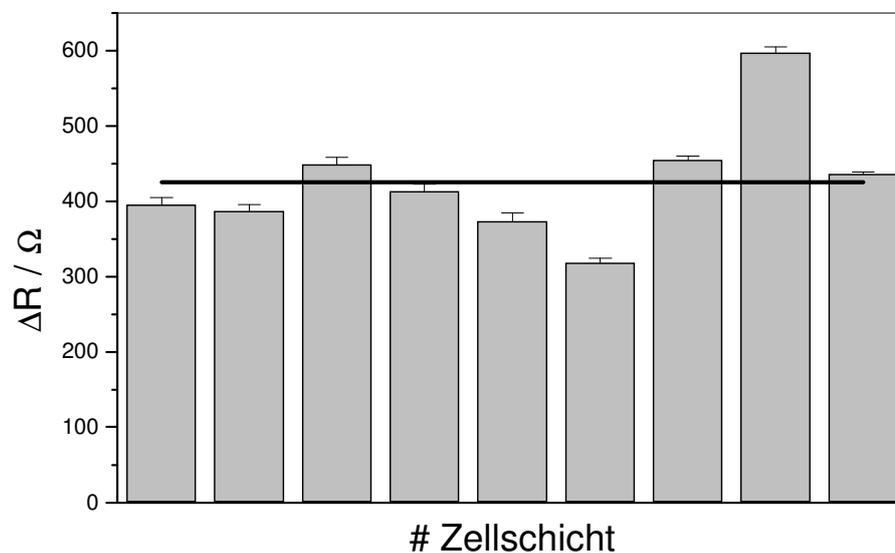
#### 4.1.1 Exemplarische Darstellung der mikrogravimetrischen Parameter von MDCK-2 Zellen

Sämtliche für die MDCK-2 Zellen (*Madin-Darby canine kidney*) erhaltenen Einzelergebnisse sollen hier einmal exemplarisch dargestellt werden, um einen Überblick über die Streuung innerhalb der verschiedenen Messgrößen zu vermitteln. Der Vergleich mit den anderen

Zellsorten, die in dieser Studie untersucht wurden, erfolgt dann anhand der Mittelwerte für die jeweiligen Parameter.

#### 4.1.1.1 Dämpfungswiderstand R

Die Bedeckung der Quarzoberfläche mit einem konfluenten Zellmonolayer führt zu einer signifikanten Erhöhung des Dämpfungswiderstandes. Für diesen Anstieg ist die Adhäsion der Zellen an die Quarzoberfläche vermittelt über die Integrine und die extrazelluläre Matrix verantwortlich. Unspezifische Wechselwirkungen, die nicht durch eine Ligand-Rezeptor-Interaktion vermittelt werden, haben keine derartigen Effekte zur Folge (Wegener et al. 2000).



**Abb. 4.1:** Inkrementeller Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  von konfluenten MDCK-2 Zellen.  $\Delta R$  wurde aus der Differenz zwischen dem Dämpfungswiderstand  $R$  des zellbedeckten Quarzes und dem Dämpfungswiderstand  $R$  des mechanisch gereinigten, mit Medium überschichteten Quarzes bestimmt. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert ( $425 \pm 26$ )  $\Omega$  ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

In dieser Arbeit wird die durch die Zellschicht induzierte Zunahme der Schwingungsdämpfung nicht anhand des absoluten Dämpfungswiderstands  $R$  vorgestellt, sondern anhand des inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$ . Dieser wird aus der Differenz des Dämpfungswiderstandes des zellbedeckten Resonators und des mechanisch gereinigten, mit Medium überschichteten Quarzes bestimmt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass sämtliche Effekte, die nicht auf die Zellschicht zurückzuführen sind und möglicherweise auf die Herstellung der Zellkulturgefäße aus Quarzscheibe und aufgeklebtem Glasaufsatz zurückgehen (s. 3.4.5), nicht in die Betrachtung eingehen und der Wert von  $\Delta R$  damit nur die jeweilige Zellschicht charakterisiert. Abbildung 4.1 zeigt die Streuung der

gemessenen Dämpfungswiderstände  $\Delta R$ . Es wurden minimale Werte von  $300 \Omega$  und maximale Werte bis zu  $600 \Omega$  bei einem Mittelwert von  $(425 \pm 26) \Omega$  gemessen.

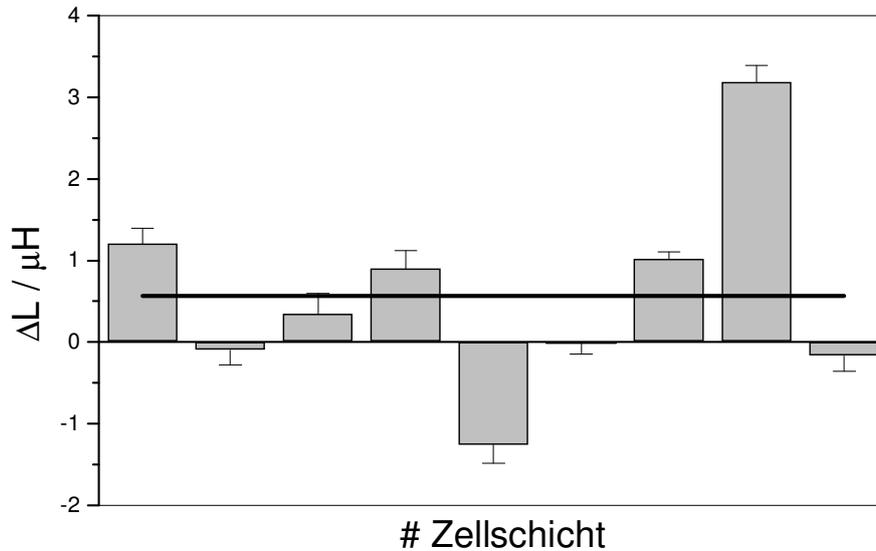
#### 4.1.1.2 Induktivität L

Eine Änderung der Induktivität L charakterisiert Veränderungen an der Quarzoberfläche, die auf reine Massenabscheidungen oder elastische Veränderungen zurückzuführen sind. Massenabscheidungen können durch die Adsorption von Serumproteinen aus dem Kulturmedium oder die zelluläre Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen erfolgen. Proteinschichten verhalten sich in der Regel wie eine rigide Masse, da sie nur vergleichsweise geringe Wassereinschlüsse zeigen, die Änderungen der viskosen Eigenschaften bedingen können. Ein zusätzlicher Beitrag zur Gesamtinduktivitätsänderung ergibt sich möglicherweise aus einer Beteiligung der basolateralen Zellmembran am Gesamtsignal.

Analog wie in 4.1.1.1 für die Änderung des Dämpfungswiderstandes beschrieben, wird auch zur Charakterisierung der Massenabscheidung nicht die absolute Induktivität sondern die inkrementelle Induktivität  $\Delta L$  verwendet. Ein Grund für diese Vorgehensweise ist hier ebenfalls, dass so nur die auf eine Protein- bzw. Zelladsorption zurückzuführenden Anteile der Induktivität betrachtet werden. Außerdem sind die inkrementellen Änderungen im Vergleich zum Grundwert, der in etwa bei  $46 \text{ mH}$  liegt, sehr klein und lassen sich so wesentlich einfacher miteinander vergleichen.

Die in Abbildung 4.2 dargestellten Induktivitätsänderungen  $\Delta L$  der MDCK-2 Zellen weisen eine sehr große Streuung auf, die möglicherweise auch auf die im Vergleich zum Grundwert kleinen Änderungen zurückzuführen sind. Die Messwerte liegen zwischen  $-1 \mu\text{H}$  und  $3 \mu\text{H}$ . Der Mittelwert liegt bei  $(0.6 \pm 0.4) \mu\text{H}$ . Somit induzieren MDCK-2 Zellen im Mittel nur eine geringe Induktivitätsänderung im Vergleich zu anderen Zellsorten (s. 4.1.2.2). Eine Ursache dafür kann eine vergleichsweise geringe Proteinmenge im Bereich zwischen Zelle und Quarzoberfläche sein.

Die im Vergleich zum Dämpfungswiderstand große Streuung der einzelnen Induktivitäten macht allerdings eine konkrete Interpretation der Werte sowie des daraus bestimmten Mittelwertes schwierig.



**Abb. 4.2:** Inkrementelle Induktivität  $\Delta L$  von konfluenten MDCK-2 Zellen.  $\Delta L$  wurde aus der Differenz zwischen der Induktivität  $L$  des zellbedeckten Quarzes und der Induktivität  $L$  des mechanisch gereinigten, mit Medium überschichteten Quarzes bestimmt. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert ( $0.6 \pm 0.4$   $\mu\text{H}$  ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

#### 4.1.2 Bestimmung der mikrogravimetrischen Eigenschaften unterschiedlicher primär kultivierter Zellen und Zelllinien aus diversen Geweben

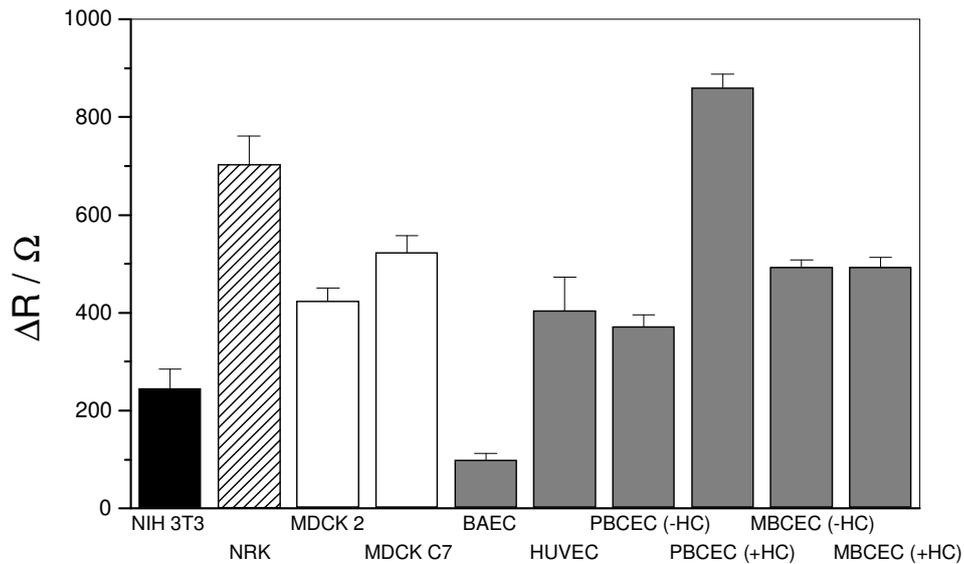
Neben MDCK-2 Zellen wurden weitere Zellsorten aus verschiedenen Spezies- und Gewebetypen mikrogravimetrisch charakterisiert. Untersucht wurden die epitheliale Zelllinie MDCK-C7, die epithelienähnlichen Fibroblasten NRK (*normal rat kidney*), die murine Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 sowie verschiedene Endothelzellarten: bovine Aorten-Endothelzellen (BAEC), humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) sowie porcine (PBCEC) und murine (MBCEC) Kapillarendothelzellen aus dem Hirn. Die primär kultivierten PBCEC und MBCEC wurden zusätzlich jeweils noch unter zwei verschiedenen Kultivierungsbedingungen betrachtet, die die Differenzierung der Zellen wesentlich beeinflussen. Die Auswahl der Zellsorten deckt ebenfalls ein breites Speziesspektrum ab: So stammen die beiden MDCK-Stämme aus Hund, die NRK-Zellen aus der Ratte, die Fibroblasten aus Maus (NIH 3T3) und die Endothelien aus Rind (BAEC), Mensch (HUVEC), Schwein (PBCEC) sowie Maus (MBCEC). Außerdem unterscheiden sich Zellen des gleichen Gewebes in Abhängigkeit vom Ursprungsorgan teilweise deutlich hinsichtlich ihrer physiologischen Aufgabe. So bilden die porcinen und murinen Kapillarendothelzellen die Blut-Hirn-Schranke und somit eine dichte Barriere, während Aortenendothelzellen aufgrund ihrer Fenestrierungen dazu nicht befähigt sind. Die mikrogravimetrische Untersuchung dieser unterschiedlichen Zellsorten sollte vor dem Hintergrund von deren bekannten morphologischen und funktionellen Eigenschaften Rückschlüsse auf die Einflüsse zellulärer

Komponenten auf die mikrogravimetrischen Parameter R und L ermöglichen und damit zur weiteren Interpretation der elektromechanischen Daten beitragen.

#### 4.1.2.1 Dämpfungswiderstand R

Die aus dem BVD-Ersatzschaltbild erhaltene elektromechanische Größe R kennzeichnet den viskosen, dissipativen Anteil der Quarzoszillation. Ein publizierter Vergleich unterschiedlicher Zelltypen (Wegener et al., 2000) ergab, dass dieser Parameter die mechanische Adhäsion von Zellen bzw. zellulären Komponenten an das Substrat charakterisiert. Die Autoren zeigten, dass der bei Anwesenheit einer Zellschicht auf der Resonatoroberfläche resultierende Anstieg des Dämpfungswiderstandes auf die spezifische, integrinvermittelte Anbindung der Zellen über die extrazelluläre Matrix an die Quarzoberfläche zurückzuführen ist. Außerdem stellten sie fest, dass der Betrag der Änderung des Dämpfungswiderstands in Abhängigkeit vom Zelltyp individuell unterschiedlich ist. Diese Abhängigkeit vom Zelltyp oder von der Art des Ursprungsgewebes soll hier beleuchtet werden.

Die bestimmten inkrementellen Dämpfungswiderstände der Zellschichten  $\Delta R$  liegen je nach Zellsorte und Kultivierungsbedingungen zwischen 100 und 900  $\Omega$  (Abb. 4.3). Der Betrag der Dämpfungswiderstände  $\Delta R$  ist dabei offensichtlich unabhängig davon, ob es sich um Epithelien, Fibroblasten oder Endothelien handelt. Für alle Zelltypen finden sich Vertreter mit größeren und solche mit kleineren  $\Delta R$ -Werten. Während für NIH 3T3-Zellen mit  $\Delta R = (245 \pm 40) \Omega$  einer der niedrigsten Werte bestimmt werden konnte, erreichen die morphologisch und funktionell ähnlichen NRK-Zellen im Mittel einen sehr großen Dämpfungswiderstand von  $\Delta R = (704 \pm 57) \Omega$ . MDCK-2 Zellen zeigen mit  $\Delta R = (425 \pm 26) \Omega$  einen etwas geringeren Dämpfungswiderstand als die verwandten MDCK C7-Zellen ( $546 \pm 34 \Omega$ ). Einen großen Unterschied findet man innerhalb der untersuchten makrovaskulären Endothelzelllinien. Bovine Aortenendothelzellen zeigen mit  $\Delta R = (99 \pm 13) \Omega$  den für alle Zellsorten mit Abstand geringsten Dämpfungswiderstand, für HUVEC-Zellen konnte mit  $\Delta R = (405 \pm 68) \Omega$  ein ähnlicher Wert wie bei den Epithelien bestimmt werden. Die primär kultivierten Hirnkapillarendothelzellen aus Schwein weisen für die zwei untersuchten Kultivierungsbedingungen einen ausgeprägten Unterschied auf. Der mittlere Dämpfungswiderstand steigt bei Zusatz von Hydrocortison (+HC) zum serumfreien Medium auf mehr als das zweifache des Wertes für  $\Delta R$  bei hydrocortisonfreier Kultivierung (-HC) an. Für PBCEC (-HC) findet sich ein  $\Delta R$  von  $(372 \pm 23) \Omega$ , für PBCEC (+HC) dagegen ein Wert von  $\Delta R = (861 \pm 27) \Omega$ . Für MBCEC wurde ein derartiges Verhalten nicht



**Abb. 4.3:** Mittlere Dämpfungswiderstände  $\Delta R$  der untersuchten Zellschichten. Für die einzelnen Zellsorten wurden folgende Werte bestimmt: NIH 3T3 ( $245 \pm 40$ )  $\Omega$  / NRK ( $704 \pm 57$ )  $\Omega$  / MDCK-2 ( $425 \pm 26$ )  $\Omega$  / MDCK C7 Zellen ( $546 \pm 34$ )  $\Omega$  / BAEC ( $99 \pm 13$ )  $\Omega$  / HUVEC ( $405 \pm 68$ )  $\Omega$  / PBCEC (-HC) ( $372 \pm 23$ )  $\Omega$  / PBCEC (+HC) ( $861 \pm 27$ )  $\Omega$  / MBCEC (-HC) ( $493 \pm 15$ )  $\Omega$  / MBCEC (+HC) ( $494 \pm 20$ )  $\Omega$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

beobachtet. Statt dessen finden sich hier für MBCEC (-HC)<sup>1</sup> ( $\Delta R = (493 \pm 15) \Omega$ ) und MBCEC (+HC) ( $\Delta R = (494 \pm 20) \Omega$ ) nahezu identische Werte.

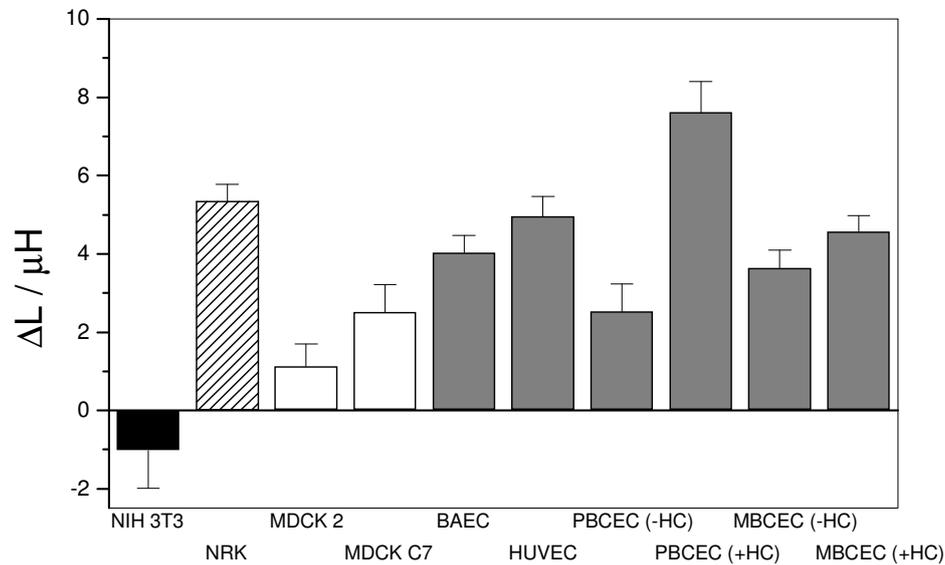
Die dargestellten Unterschiede im Dämpfungswiderstand zwischen den einzelnen Zelltypen sind nicht ohne weiteres erklärbar und lassen keinen Zusammenhang mit dem Herkunftsgewebe oder der physiologischen Aufgabe der einzelnen Zellart erkennen. Eine genauere Untersuchung des QCM-Signals sowie die Aufklärung, welche Zellkomponenten in welchem Maß zum Dämpfungswiderstand beitragen, ist somit erforderlich.

#### 4.1.2.2 Induktivität L

Die im Gegensatz zum Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  für eine reine Massenabscheidung charakteristische Induktivitätsänderung  $\Delta L$  kann als Maß für die Abscheidung eines Proteins auf der Quarzoberfläche dienen. Proteine werden durch die Oszillation des Quarzes nahezu verlustfrei als steife rigide Massen mitbewegt, da sie nicht zu größeren Wassereinschlüssen neigen, die zu Dichte- und Viskositätsänderungen innerhalb des Proteinlayers führen können. Allerdings können auch Beiträge des Zellkörpers, wie die basolaterale Zellmembran, die Induktivität beeinflussen. Außerdem ist eine Änderung der Induktivität L nur dann eindeutig auf reine Massenbewegungen zurückführbar, wenn die die elastischen Eigenschaften des

<sup>1</sup> Das Medium der unter hydrocortisonfreien Bedingungen kultivierten MBCEC (-HC) enthielt zusätzlich 10 % Serum.

Quarzes beschreibende Kapazität  $C$  sich durch die Adhäsion von Zellen nicht ändert. Beide Größen können nicht unabhängig voneinander bestimmt werden, so dass die Induktivität  $L$  indirekt auch elastische Komponenten enthalten kann.



**Abb. 4.4:** Mittlere Induktivitätsänderung  $\Delta L$  der untersuchten Zellschichten. Für die einzelnen Zellsorten wurden folgende Werte bestimmt: NIH 3T3 ( $-1.0 \pm 1.0$ )  $\mu\text{H}$  / NRK ( $5.4 \pm 0.4$ )  $\mu\text{H}$  / MDCK-2 ( $0.6 \pm 0.4$ )  $\mu\text{H}$  / MDCK C7 Zellen ( $2.5 \pm 0.7$ )  $\mu\text{H}$  / BAEC ( $4.0 \pm 0.4$ )  $\mu\text{H}$  / HUVEC ( $5.0 \pm 0.5$ )  $\mu\text{H}$  / PBCEC (-HC) ( $2.5 \pm 0.7$ )  $\mu\text{H}$  / PBCEC (+HC) ( $7.6 \pm 0.8$ )  $\mu\text{H}$  / MBCEC (-HC) ( $3.7 \pm 0.4$ )  $\mu\text{H}$  / MBCEC (+HC) ( $4.6 \pm 0.4$ )  $\mu\text{H}$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

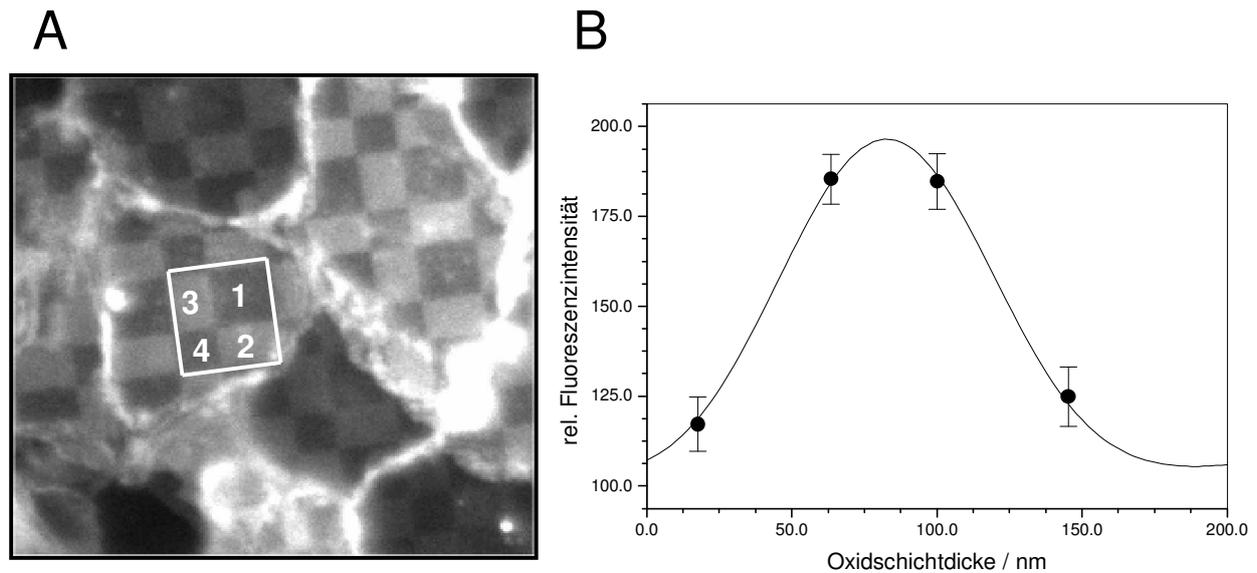
Insgesamt konnten für die Induktivitätsänderungen häufig sehr große Streuungen für die jeweiligen Zelltypen gefunden werden. Dies wurde schon für MDCK-2 Zellen im Detail gezeigt (s. 4.1.1.2). Teilweise wurden dort deutlich negative Werte gemessen, die darauf hinweisen, dass elastische Zellkomponenten den Wert der Kapazität  $C$  beeinflussen und somit eine Unterbestimmung der Induktivität  $L$  resultiert. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt ist, liegt der große Teil der gemessenen, mittleren Induktivitätsbeiträge  $\Delta L$  für die verschiedenen Zellsorten im Bereich von 2 bis 8  $\mu\text{H}$ . Die murinen Fibroblasten NIH 3T3 weisen den einzigen Wert auf, der im Mittel wesentlich den der anderen Zelltypen unterschreitet ( $\Delta L = (-1.0 \pm 1.0)$   $\mu\text{H}$ ), wohingegen für die aus der Ratte stammenden NRK-Zellen eine Induktivitätsänderung von  $\Delta L = (5.4 \pm 0.4)$   $\mu\text{H}$  bestimmt werden konnte. Beide MDCK-Stämme zeigen eine deutlich geringere Induktivitätsänderung als die NRK-Zellen. MDCK-2 Zellen weisen dabei einen Wert von  $\Delta L = (0.6 \pm 0.4)$   $\mu\text{H}$  auf, MDCK C7-Zellen besitzen ein etwas größere Induktivitätsänderung von  $\Delta L = (2.5 \pm 0.7)$   $\mu\text{H}$ . Für die Endothelzellen konnten teilweise etwas höhere Induktivitätsänderungen beobachtet werden. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass zusätzlich zum endogen sekretierten Protein jeweils noch eine

Proteinschicht zur Adhäsionsvermittlung vor der Aussaat der Zellen auf den Quarz aufgebracht worden ist. Für BAEC wurde eine Induktivitätsänderung von  $\Delta L = (4.0 \pm 0.4) \mu\text{H}$  detektiert. Ein ähnlicher Wert wurde für HUVEC gefunden ( $\Delta L = (5.0 \pm 0.5) \mu\text{H}$ ). Die porcinen Kapillarendothelzellen zeigen wie schon für den Dämpfungswiderstand auch hier eine Besonderheit, die offenbar auf eine Induktion von Hydrocortison zurückzuführen ist. Während sich für PBCEC (-HC) eine Induktivitätsänderung von  $\Delta L = (2.5 \pm 0.7) \mu\text{H}$  bestimmen lässt, weisen PBCEC (+HC) einen signifikant höheren Wert von  $\Delta L = (7.6 \pm 0.8) \mu\text{H}$  auf. Analog zur Bestimmung des Dämpfungswiderstandes kann ein ähnlicher Zusammenhang für die murinen Kapillarendothelzellen nicht gefunden werden (MBCEC (-HC):  $\Delta L = (3.7 \pm 0.4) \mu\text{H}$ ; MBCEC (+HC):  $\Delta L = (4.6 \pm 0.4) \mu\text{H}$ ).

Ähnlich wie schon für die Dämpfungswiderstandsänderungen der einzelnen Zelltypen festgestellt werden konnte, ist auch hier eine direkte Einordnung und Interpretation der durch die jeweiligen Zellsorten induzierte Induktivitätsänderung nur sehr schwer möglich. Außerdem führt die relativ große Streuung der Einzelwerte dazu, dass die Mittelwerte teilweise mit großen Unsicherheiten behaftet sind und eine Differenzierung zwischen den untersuchten Zellarten in einigen Fällen schwierig macht. Zur Interpretation der Induktivitätsänderung sind ebenfalls weitere Untersuchungen des Zell-Substrat-Bereichs nötig.

#### **4.2 Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands $d$ mit Hilfe der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie**

Die mikrogravimetrischen Untersuchungen zum Dämpfungswiderstand und zur Induktivität unterschiedlicher Zelltypen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den diversen Zellsorten. Da diese Differenzen ihren Ursprung vermutlich im Bereich zwischen der basolateralen Membran und der Substratoberfläche haben, bietet sich eine eingehende Betrachtung dieser Region an. Die Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-(FLIC) Mikroskopie ermöglicht es, den Abstand  $d$  zwischen basaler Membran und Kultursubstrat (kurz: Zell-Substrat-Abstand) der jeweiligen Zellsorte zu bestimmen und diese Werte mit den mikrogravimetrischen Daten zu vergleichen. Dazu werden die Zellen auf speziellen, strukturierten Siliziumsubstraten kultiviert, die mit einer dünnen Schicht Siliziumdioxid überzogen sind. In die  $\text{SiO}_2$ -Schicht sind nasschemisch vier unterschiedliche Höhenstufen geätzt, die erforderlich sind, um aus den an diesen Stellen bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten einen eindeutigen Zell-Substrat-Abstand ermitteln zu können (s. 3.2.1).



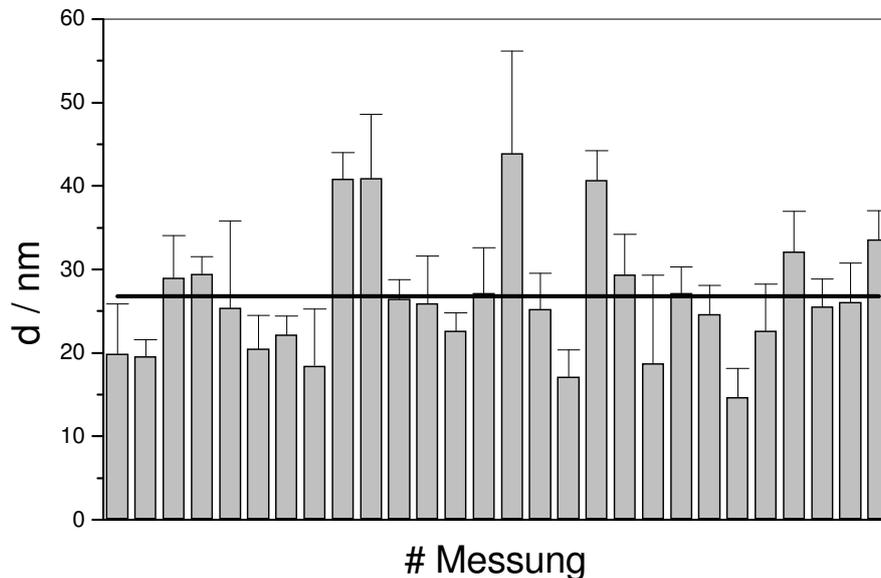
**Abb. 4.5:** **A** Fluoreszenzmikroskopisches Bild von MDCK-2 Zellen, die auf strukturierten FLIC-Chips kultiviert und mit dem Membranfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI C<sub>18</sub>) gefärbt wurden. Die durch Excitations- und Emissionsinterferenz des Fluoreszenzlichtes hervorgerufenen unterschiedlichen Intensitäten auf den jeweiligen Höhenstufen lassen sich deutlich erkennen. Die Zahlen markieren die Höhe der vier Stufen in ansteigender Reihenfolge von 10 nm (1) bis 150 nm (4). Die auf diesen Stufen bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten dienen als Grundlage für die Berechnung des Zell-Substrat-Abstandes. **B** Beispiel für die Bestimmung des Zell-Substrat-Abstandes aus den für die jeweiligen Höhenstufen gemessenen relativen Fluoreszenzintensitätswerten durch mathematische Anpassung. Für diesen Fall ergibt sich ein Zell-Substrat-Abstand von  $(26.5 \pm 2.3)$  nm.

Abbildung 4.5 zeigt auf der linken Seite (**A**) exemplarisch ein fluoreszenzmikroskopisches Bild einer MDCK-2 -Zellschicht, die auf einem strukturierten Siliziumchip kultiviert und mit dem Membranfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI) gefärbt wurde. Die Zahlen kennzeichnen die SiO<sub>2</sub>-Höhenstufen in ansteigender Reihenfolge. Der rechte Teil der Abbildung (**B**) stellt die auf diesen Höhenstufen bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten als Funktion der Oxiddicke dar. Die mathematische Anpassung der charakteristischen Schwebungskurve, die aus der Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen den Abstand des Fluorophors vom Substrat resultiert, liefert dann den entsprechenden Zell-Substrat-Abstand  $d$  (s. 3.2.1).

#### 4.2.1 Exemplarische Darstellung des Zell-Substrat-Abstands $d$ von MDCK-2 Zellen

Für MDCK-2 Zellen sollen, ebenso wie es für die mikrogravimetrischen Messungen durchgeführt wurde, einmal exemplarisch alle Messungen gezeigt werden, um die Streuung der Ergebnisse zu verdeutlichen. Abbildung 4.6 zeigt die für jeweils individuell ausgewählte Zellen gemessenen Zell-Substrat-Abstände. Jeder Balken entspricht dem Messergebnis einer Einzelzelle. Die Standardabweichungen der für die einzelnen Zellen bestimmten Abstände ergeben sich aus der Güte der jeweiligen Anpassung der Transferfunktion. Die erhaltenen Resultate für den Zell-Substrat-Abstand von MDCK-2 Zellen liegen in einem recht weiten

Bereich von unter 15 bis zu über 40 nm. Es lässt sich ein Mittelwert für  $d = (26.8 \pm 1.4)$  nm bestimmen.



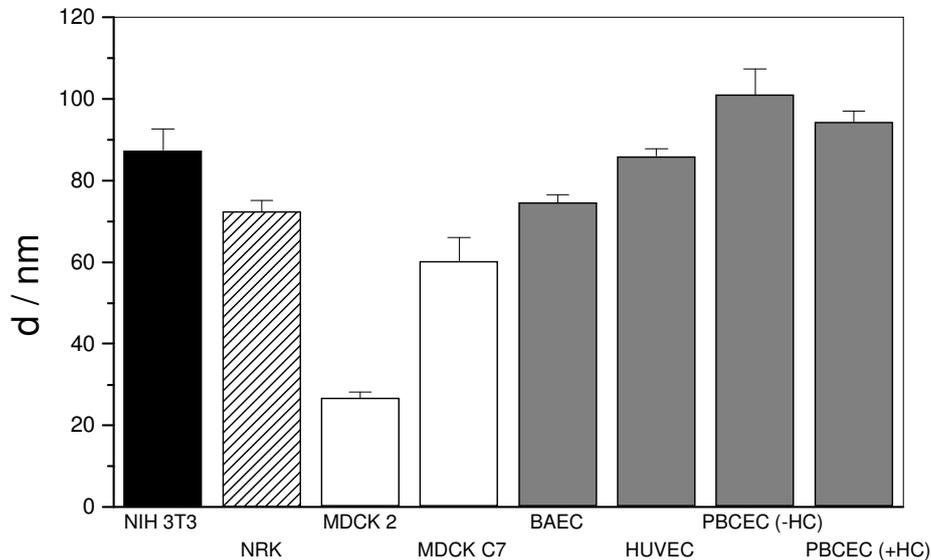
**Abb. 4.6:** Mittlerer Abstand zwischen Zelle und Substrat von konfluenten MDCK-2 Zellen. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert für  $d = (26.8 \pm 1.4)$  nm ( $n = 28$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

#### 4.2.2 Bestimmung des Zell-Substrat-Abstands für verschiedene Zelltypen

Eine detaillierte Darstellung aller Einzelergebnisse, wie sie für MDCK-2 Zellen gezeigt wurde, soll für alle weiteren Zelltypen unterbleiben. Die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt anhand des jeweils bestimmten mittleren Zell-Substrat-Abstands  $d$ . Abbildung 4.7 zeigt diese mittleren Zell-Substrat-Abstände. Der Großteil der untersuchten Zellschichten weist sehr ähnliche Zell-Substrat-Abstände zwischen 50 und 100 nm auf. Einzig die MDCK-2 Zellen weichen davon deutlich ab.

Für MDCK-2 Zellen wurde der mit Abstand kleinste Wert von  $d = (27 \pm 1)$  nm gemessen. Die untersuchten NIH 3T3-Zellen sind im Mittel etwa  $d = (87 \pm 5)$  nm von der Substratoberfläche entfernt. Für die epithelähnlichen NRK-Zellen wurde ein Abstand von  $d = (73 \pm 3)$  nm bestimmt. MDCK C7-Zellen zeigen ein deutlich größeres  $d$  von  $(60 \pm 6)$  nm. Sämtliche betrachteten Endothelzellen zeigen ebenfalls Zell-Substrat-Abstände in dieser Größenordnung. Während für die makrovaskulären bovinen Aortenendothelzellen ein mittlerer Abstand von  $d = (75 \pm 2)$  nm bestimmt wurde, konnte für die humanen Endothelien aus der Nabelschnur eine durchschnittliche Distanz von  $d = (86 \pm 2)$  nm ermittelt werden. Die primär kultivierten porcinen Kapillarendothelzellen weisen die größten Abstände aller Zellen auf, zeigen aber für die verschiedenen Kulturbedingungen keine signifikanten Unterschiede (PBCEC (-HC):  $(101 \pm 6)$  nm; PBCEC (+HC):  $(94 \pm 3)$  nm. Murine Kapillarendothelzellen

wurden aufgrund des für einen konfluenten Zellschicht der entsprechenden Größe nötigen Zellmenge und des damit einhergehenden präparativen Aufwandes nicht untersucht.



**Abb. 4.7:** Mittlerer Zell-Substrat-Abstand  $d$  der untersuchten Zelltypen. Für die einzelnen Zelltypen wurden folgende Werte gemessen: NIH 3T3 ( $87 \pm 5$ ) nm / NRK ( $73 \pm 3$ ) nm / MDCK-2 ( $27 \pm 1$ ) nm / MDCK C7 Zellen ( $60 \pm 6$ ) nm / BAEC ( $75 \pm 2$ ) nm / HUVEC ( $86 \pm 2$ ) nm / PBCEC (-HC) ( $101 \pm 6$ ) nm / PBCEC (+HC) ( $94 \pm 3$ ) nm ( $n > 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

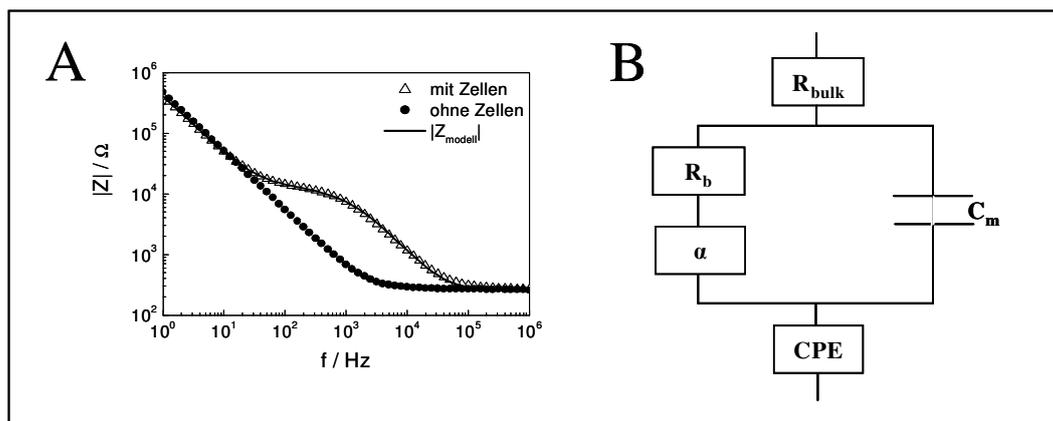
Die Ergebnisse der FLIC-Mikroskopie geben keine einfache Korrelation mit den ermittelten mikrogravimetrischen Daten zu erkennen. Nach den vorliegenden Untersuchungen sind die Zell-Substrat-Abstände nicht entscheidend für die mikrogravimetrisch bestimmten Dämpfungswiderstände. Möglicherweise können aber durch elektrische Untersuchungen der diversen Zelltypen Zusammenhänge zwischen diesen Parametern hergestellt werden, da die Geometrie des subzellulären Spalts Einfluß auf die dort herrschenden elektrischen Zustände hat. Diese Abhängigkeit wurde von Giaever und Keese (1991) im ECIS-Modell formuliert.

### 4.3 Elektrische Untersuchungen des Adhäsionsbereichs von primär kultivierten Zellen und Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben

Auf elektrisch leitenden Substraten verhalten sich Zellen wie Isolatorpartikel und erhöhen dadurch die Gesamtimpedanz des Systems. Über die Analyse elektrochemischer Impedanzmessungen nach dem sogenannten ECIS-Modell können Daten einer adhären Zellschicht gewonnen werden, die aus einer Messung Informationen zur Stärke der Zell-Zell-Kontakte ( $R_b$ ), der elektrochemischen Beschaffenheit des Bereichs zwischen basolateraler Zellmembran und Substrat ( $\alpha$ ) wie auch der Struktur der Oberfläche der Zellmembran ( $C_m$ )

liefern und wichtige Rückschlüsse auf die Morphologie und die Vitalität der Zellen ermöglichen.

Abbildung 4.8 **A** stellt exemplarisch die Spektren für eine zellbewachsene sowie eine leere Goldfilmelektrode gegenüber. Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion des ECIS-Modells. Die iterative Anpassung der elektrischen Parameter an die gemessene Kurve erfolgte nach einer Methode von Wegener et al. (2000). Abbildung 4.8 **B** zeigt das zugehörige Ersatzschaltbild mit den zellspezifischen ECIS-Parametern  $R_b$ ,  $\alpha$



**Abb. 4.8:** **A** Typische Impedanzspektren einer planaren Goldfilmelektrode mit und ohne einer darauf befindlichen Zellschicht. Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion. **B** Zugehöriges Ersatzschaltbild einer zellbewachsenen Elektrode zur näherungsweisen Veranschaulichung des Modells von Giaever und Keese (1991).  $R_{\text{bulk}}$  symbolisiert den ohmschen Widerstand der Elektrolytlösung,  $R_b$  den ohmschen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte,  $\alpha$  die frequenzabhängige Impedanz des Zell-Substrat-Kontaktes.  $C_m$  charakterisiert die Kapazität der Plasmamembran und CPE steht für die nicht-ideale Impedanz an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt.

und  $C_m$  sowie den Parametern, die die elektrischen Eigenschaften des Mediums ( $R_{\text{bulk}}$ ) und der Elektrodengrenzfläche (CPE) beschreiben. Dabei charakterisiert  $R_b$  den parazellulären Widerstand der Zell-Zell-Kontakte,  $\alpha$  den Parameter, der aus dem Bereich zwischen Zelle und Substrat resultiert und  $C_m$  die spezifische Membrankapazität der Zellschicht.  $R_{\text{bulk}}$  symbolisiert den Widerstand der Elektrolytlösung und CPE die nicht-ideale Impedanz an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt (Giaever und Keese, 1991).

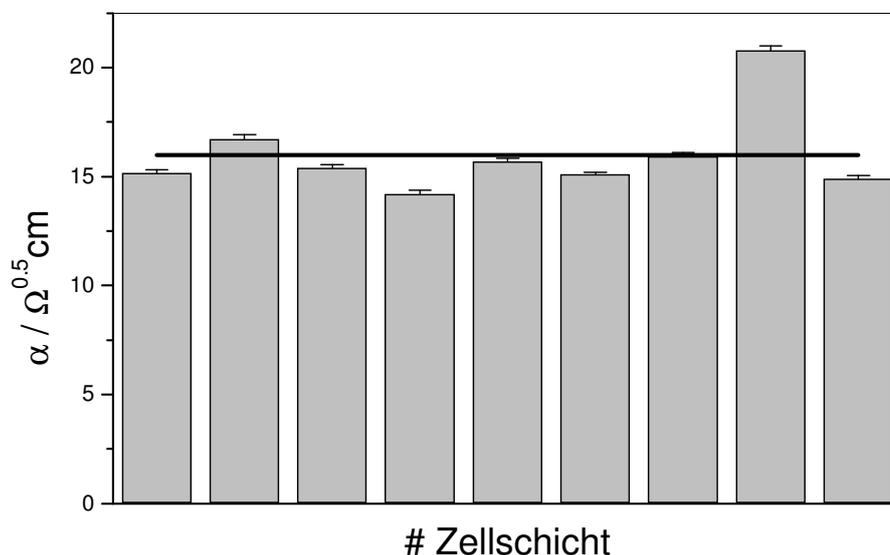
#### 4.3.1 Elektrische Charakterisierung eines konfluenten MDCK-2 Monolayers

Analog zu den bereits gezeigten mikrogravimetrischen Untersuchungen und den Daten der FLIC-Messungen sollen auch hier die detaillierten Ergebnisse der einzelnen ECIS-Messungen exemplarisch anhand von MDCK-2 Zellen dargestellt werden. Für alle weiteren untersuchten Zellsorten werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur noch die statistischen Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Die elektrischen Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  wurden aus ECIS-Messungen bestimmt, die parallel zu den mikrogravimetrischen Untersuchungen an den auf Schwingquarzen kultivierten Zellen durchgeführt wurden.

### Zell-Substrat-Parameter $\alpha$

Der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  beschreibt den frequenzabhängigen Impedanzbeitrag, der sich aus dem Fluß des Stromes durch den schmalen Spalt des Adhäsionskontakts ergibt. Dies ermöglicht eine Charakterisierung dieser Region hinsichtlich der speziellen elektrochemischen Verhältnisse, die sich sowohl aufgrund der nanoskaligen Dimensionen als auch durch die spezielle molekulare Komposition dieses Bereiches (ECM, Integrine) ergeben.



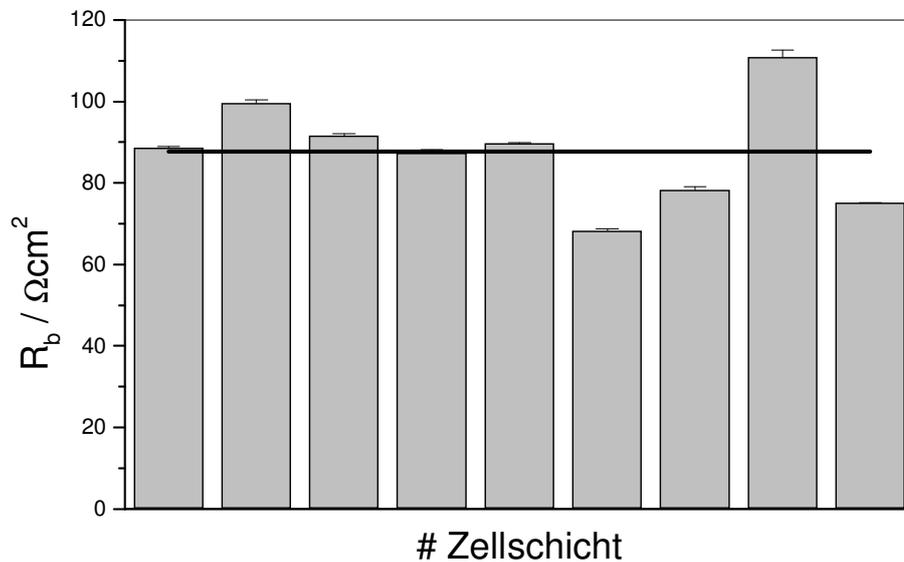
**Abb. 4.9:** Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  konfluenter MDCK-2 Zellen aus unabhängigen Einzelexperimenten. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert ( $16.0 \pm 0.6$ )  $\Omega^{0.5} \text{ cm}$  ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Die hier gemessenen Werte für  $\alpha$  umfassen Werte von etwa 15 bis zu 20  $\Omega^{0.5} \text{ cm}$ . Abbildung 4.9 illustriert die Streuung der Messwerte. Als Mittelwert aus neun Experimenten ergibt sich für  $\alpha$  ein Wert von ( $16.0 \pm 0.6$ )  $\Omega^{0.5} \text{ cm}$ .

### Spezifischer parazellulärer Widerstand $R_b$

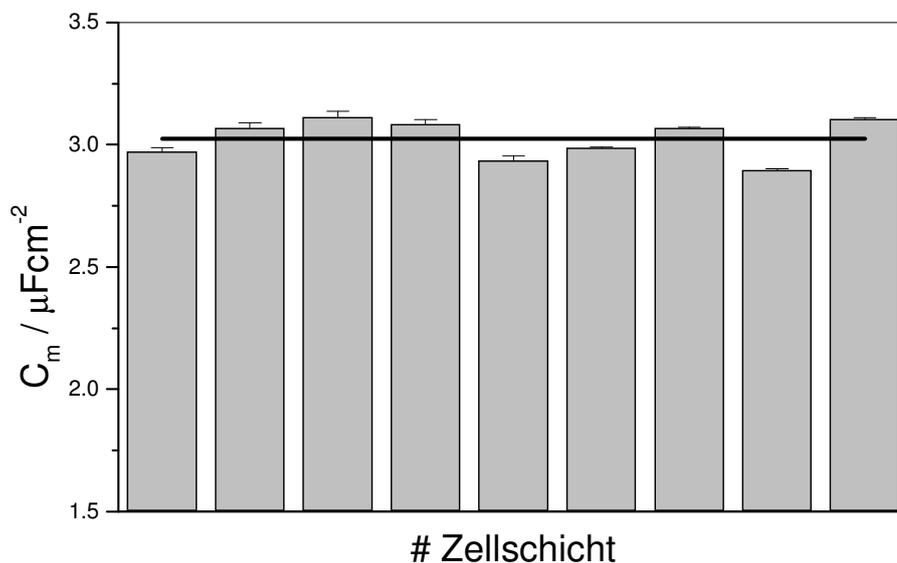
Der spezifische parazelluläre Widerstand  $R_b$  ist ein Maß für die Stärke der Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*). MDCK-2 Zellen gehören zu den weniger dichten Epithelien und bilden vergleichsweise durchlässige Zellschichten aus. Abbildung 4.10 veranschaulicht die Streuung der Messwerte. Die hier ermittelten Werte für  $R_b$  liegen in einem Bereich von 70 bis zu

$110 \Omega\text{cm}^2$ . Als Mittelwert aus neun Experimenten ergibt sich für  $R_b$  ein Wert von  $(88 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$ .



**Abb. 4.10:** Parazellulärer Widerstand  $R_b$  konfluenter MDCK-2 Zellen aus unabhängigen Einzelexperimenten. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert  $(88 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$  ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

### Spezifische Kapazität der Zellmembran $C_m$



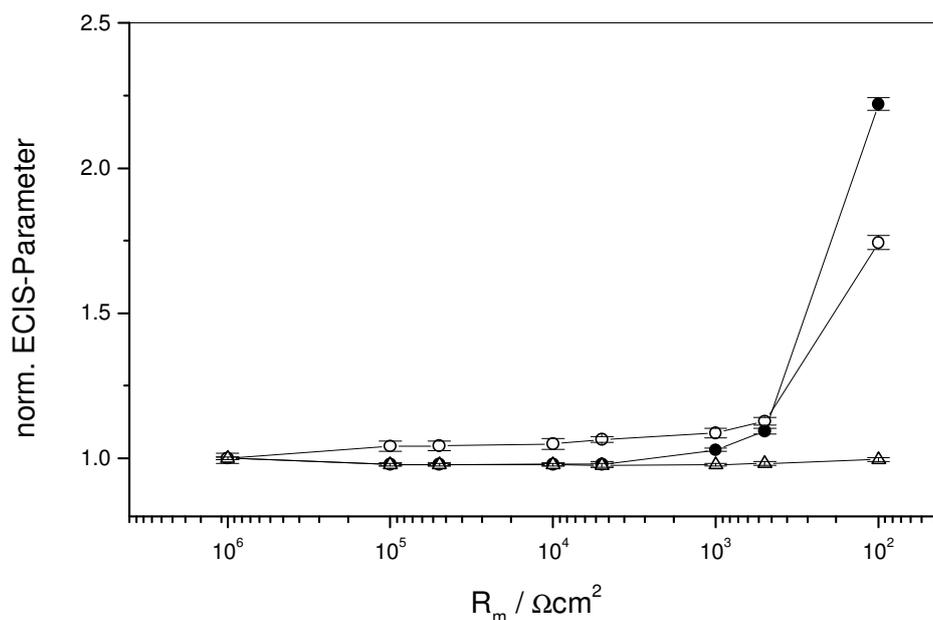
**Abb. 4.11:** Spezifische Kapazität der Zellmembran  $C_m$  konfluenter MDCK-2 Zellen aus unabhängigen Einzelexperimenten. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert  $(3.03 \pm 0.03) \mu\text{Fcm}^{-2}$  ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Die flächenspezifische Kapazität der Zellmembran  $C_m$  liefert Informationen über die Struktur der Zelloberfläche. Während die Kapazität einer ideal glatten Zellmembran bei vielen

verschiedenen Zelltypen zu  $1 \mu\text{Fcm}^{-2}$  bestimmt wurde (Cole, 1972) führt jede Oberflächenvergrößerung wie z.B. die bei transportaktiven Epithelien vorkommenden Mikrovilli zu einer Erhöhung der flächennormierten Kapazität. Somit können direkte Rückschlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit anhand des Kapazitätswertes getroffen werden. Abbildung 4.11 zeigt die aus neun verschiedenen Experimenten bestimmten Kapazitätswerte für MDCK-2 Zellen. Die Werte der Einzelmessungen weisen nur eine sehr geringe Schwankungsbreite auf und liegen im Bereich von 2.9 bis  $3.1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ . Als Mittelwert ergibt sich für  $C_m$  ein Wert von  $(3.03 \pm 0.03) \mu\text{Fcm}^{-2}$ .

### Einfluß des Membranwiderstandes $R_m$ auf die ECIS-Parameter

Der Membranwiderstand  $R_m$  bleibt bei der mathematischen Analyse der Daten nach Wegener et al. (2000) unberücksichtigt. Im verwendeten Ersatzschaltbild wird von einem rein kapazitiven Verhalten der Zellmembran ausgegangen und ein Einfluß des als beliebig groß



**Abb. 4.12:** Änderung der normierten ECIS-Parameter von MDCK-2 Zellen in Abhängigkeit vom gewählten Membranwiderstand  $R_m$  bei der iterativen Modellanpassung. Dargestellt sind die Parameter  $R_b$  ( $\bullet$ ),  $\alpha$  ( $\circ$ ) und  $C_m$  ( $\triangle$ ).

angenommenen Membranwiderstandes auf die gesamte Impedanz der Zellschicht wird vernachlässigt. Um zu hinterfragen, ob diese Annahme zu einer Verfälschung der resultierenden Werte für die ECIS-Parameter führt, wurde ein Auswertalgorithmus entwickelt, der die Berechnung der elektrischen Parameter des ECIS-Modells aus einem experimentell bestimmten Impedanzspektrum für einen frei gewählten Membranwiderstand ermöglicht. Dieses Verfahren wurde für unterschiedliche Membranwiderstände  $R_m$

durchgeführt und der Einfluß auf die Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  dokumentiert (Abb. 4.12)<sup>2</sup>. Dies sollte eine Abschätzung möglich machen, ab welcher Größenordnung die Membranwiderstände für die Bestimmung der ECIS-Parameter nicht mehr vernachlässigbar sind.

Abbildung 4.12 zeigt deutlich, dass erst nach einem Absinken des Membranwiderstandes auf Werte unter  $500 \Omega\text{cm}^2$  eine signifikante Zunahme der Parameter  $\alpha$  und  $R_b$  zu beobachten ist. Eine drastische Zunahme dieser beiden Parameter auf etwa das 1.5fache des Ausgangswertes ist erst für einen Membranwiderstand von  $100 \Omega\text{cm}^2$  zu erkennen. Im Gegensatz dazu bleibt die Membrankapazität  $C_m$  für alle Membranwiderstände nahezu unverändert. Da der typische Membranwiderstand tierischer Zellen deutlich über  $10 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  liegt (Asami et al., 1990: HeLa- und Myeloma-Zellen:  $10\text{-}11 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ ; Asami und Takashima, 1994: Myoblasten:  $17\text{-}20 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ ), kann eine darauf zurückzuführende Verfälschung der Daten ausgeschlossen werden.

### 4.3.2 Charakterisierung adhärenter Zellschichten mit der ECIS-Methode

Die elektrochemische Charakterisierung unterschiedlicher Zelllinien und primär kultivierter Zellen aus verschiedenen Geweben sollte eine Beschreibung der elektrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt und eine mögliche Korrelation mit den mikrogravimetrischen Messungen erlauben. Daher wurden die elektrochemischen Untersuchungen, wie schon exemplarisch in 4.3.1 für MDCK-2 Zellen dargelegt wurde, parallel zu den mikrogravimetrischen Messungen durchgeführt. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Daten, wie sie dort erfolgt ist, soll hier aber unterbleiben. Die Zelltypen werden anhand der jeweiligen Mittelwerte der entsprechenden Parameter charakterisiert.

Die Bestimmung der elektrischen Parameter nach dem ECIS-Formalismus ermöglicht eine Einordnung der Zellen hinsichtlich der Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte ( $R_b$ ), Oberflächenstruktur der Zellmembran ( $C_m$ ) sowie der Stärke der Zell-Substrat-Kontakte, die durch den Parameter  $\alpha$  beschrieben werden. Diese elektrische Charakterisierung mit Hilfe der ECIS-Methode erlaubt dann Rückschlüsse auf die Funktion der Zelle in physiologischer Umgebung. Bei der Analyse von ECIS-Daten werden die Zellen als zylindrische Isolator-Partikel angenähert, die sich in einem bestimmten Abstand zur Elektrode befinden. Die Annahme einer zylindrischen Form ist für die meisten Zellen zutreffend. Eine Ausnahme bilden hier die spindelförmigen, porcinen Kapillarendothelzellen. Daher wurden die ECIS-

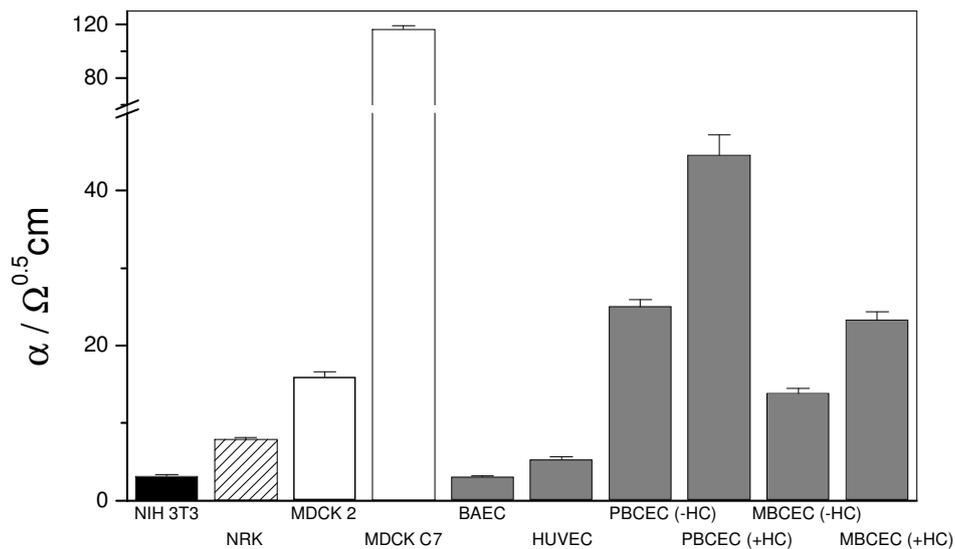
---

<sup>2</sup> Der angenommene Wert für  $R_m$  wird während der iterativen Anpassung der Modellparameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  nicht variiert.

Daten der PBCEC mit einem für diese Zellform optimierten Modell (Lo et. al., 1998) an die elektrischen Rohdaten angepasst.

### Zell-Substrat-Parameter $\alpha$

Der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  ermöglicht eine elektrische Charakterisierung des Adhäsionskontaktes zwischen Zelle und Substrat. Die elektrischen Verhältnisse im Raum zwischen Zelle und Substrat sind aufgrund der experimentellen Anforderungen bisher wenig untersucht. Wie in 4.3.1 für MDCK-2 Zellen exemplarisch dargelegt wurde, kann der Parameter  $\alpha$  mit Hilfe des mittleren Zellradius  $r_c$  sowie des Zell-Substrat-Abstandes  $d$ , der sich aus der FLIC-Mikroskopie gewinnen lässt, einen Zugang zum spezifischen Widerstand  $\rho_{\text{sub}}$  unter den Zellen bieten. Dies kann auch ein Ansatz sein, um das unterschiedliche Adhäsionsverhalten der verschiedenen Zellen zu erklären.



**Abb. 4.13:** Mittlerer Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  der untersuchten Zellsorten. Für die einzelnen Zelltypen wurden folgende Mittelwerte gemessen: NIH 3T3 ( $3.2 \pm 0.2$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / NRK ( $7.9 \pm 0.3$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / MDCK-2 ( $16.0 \pm 0.6$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / MDCK C7 ( $117 \pm 3$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / BAEC ( $3.1 \pm 0.1$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / HUVEC ( $5.3 \pm 0.3$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / PBCEC (-HC) ( $25.1 \pm 0.9$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / PBCEC (+HC) ( $42 \pm 3$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / MBCEC (-HC) ( $13.8 \pm 0.6$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  / MBCEC (+HC) ( $23 \pm 1$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Abbildung 4.13 stellt die Ergebnisse für die verschiedenen Zelltypen vergleichend dar. Die betrachteten Zellsorten zeigen für den Parameter  $\alpha$  ein analoges Verhalten wie für den parazellulären Widerstand  $R_b$ . Eine Zellsorte, die ein vergleichsweise großen Widerstand  $R_b$  zeigt, weist auch einen relativ großen Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  auf, bzw. eine Zellsorte mit eher geringem parazellulärem Widerstand besitzt analog dazu nur einen sehr kleinen Wert für  $\alpha$ . Für die nicht barrierebildenden NIH 3T3-Zellen wurden ( $3.2 \pm 0.2$ )  $\Omega^{0.5} \text{cm}$  für  $\alpha$  gemessen,

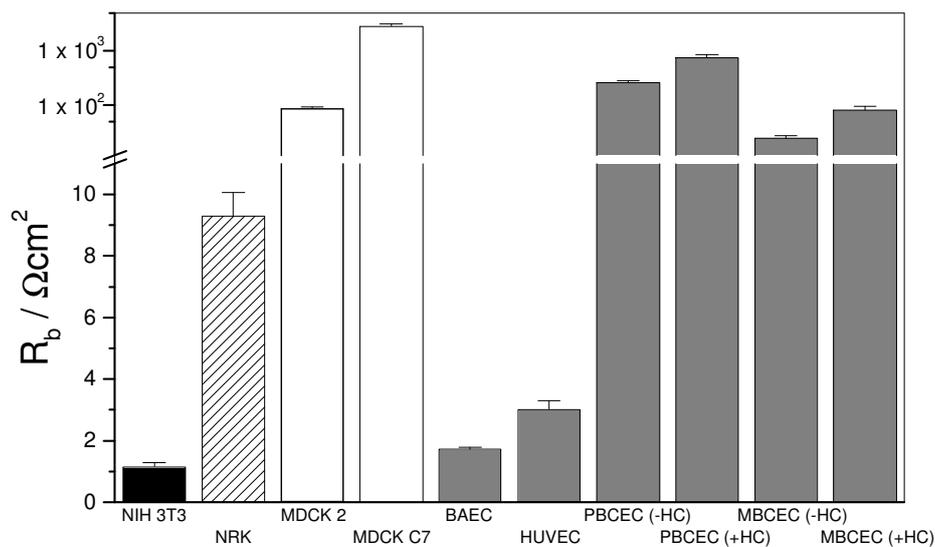
die NRK-Zellen zeigen etwas höhere mittlere Werte von  $(7.9 \pm 0.3) \Omega^{0.5} \text{cm}$ . Für die MDCK-2 Zellen konnte im Vergleich mit den anderen untersuchten Zellsorten ein mittelgroßer Wert für  $\alpha$  ( $(16.0 \pm 0.6) \Omega^{0.5} \text{cm}$ ) bestimmt werden. Für die parazellulär sehr dichten MDCK C7-Zellen wurde dagegen der mit Abstand größte Wert aller untersuchten Zellsorten gefunden ( $(117 \pm 3) \Omega^{0.5} \text{cm}$ ). Ähnlich wie für die Fibroblasten zeigen die makrovaskulären Endothelien nur sehr geringe Werte für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$ . Bovine Aortenendothelzellen ( $(3.1 \pm 0.1) \Omega^{0.5} \text{cm}$ ) und HUVEC-Zellen ( $(5.3 \pm 0.3) \Omega^{0.5} \text{cm}$ ) liegen am unteren Ende des beobachteten Spektrums. Davon heben sich sowohl die primär kultivierten PBCEC wie auch MBCEC durch signifikant größere Werte für  $\alpha$  ab. Unterschiede ergeben sich auch für die verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Der Einfluß der hydrocortisonhaltigen Kultivierung lässt sich für beide Zelltypen am Anstieg des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  in ähnlicher Weise erkennen wie es auch schon für  $R_b$  beobachtet werden konnte. So wurde für PBCEC unter hydrocortisonfreien Bedingungen ein Wert von  $\alpha = (25.1 \pm 0.9) \Omega^{0.5} \text{cm}$  bestimmt, unter Zusatz von Hydrocortison dagegen ein deutlich höheres  $\alpha$  von  $(42 \pm 3) \Omega^{0.5} \text{cm}$ . Ähnlich verhält es sich für MBCEC: Unter serumhaltiger Kultivierung ohne Zugabe von Hydrocortison konnte ein Wert von  $\alpha = (13.8 \pm 0.6) \Omega^{0.5} \text{cm}$  bestimmt werden, im Falle des Serumentzuges bei gleichzeitiger Zugabe von Hydrocortison statt dessen  $\alpha = (23 \pm 1) \Omega^{0.5} \text{cm}$ .

### **Parazellulärer Widerstand $R_b$**

Der parazelluläre Widerstand  $R_b$  charakterisiert die Dichtigkeit einer Zellschicht gegenüber anorganischen Ionen, die nicht durch die Zellmembran hindurchdiffundieren können. Da durch Messungen von  $R_b$  somit direkt auf die Beschaffenheit des Zell-Zell-Kontaktes (*tight junctions*) geschlossen werden kann, ermöglicht dieser Parameter auch eine Einordnung unterschiedlicher Zelltypen hinsichtlich ihrer physiologischen Aufgaben. Die Ergebnisse für alle Zelltypen sind in Abbildung 4.14 vergleichend gegenübergestellt. Die hier untersuchten acht Zellsorten weisen Werte für  $R_b$  auf, die zwischen 1 und  $3000 \Omega \text{cm}^2$  liegen. Die Widerstände der epithelähnlichen NRK-Zellen liegen bei  $R_b = (9.3 \pm 0.8) \Omega \text{cm}^2$  und liegen damit signifikant höher als die ebenfalls untersuchten murinen Fibroblasten (NIH 3T3), die typischerweise keine barrierebildenden Zell-Zell-Interaktionen ausbilden. Für diese murinen NIH 3T3-Zellen findet sich ein Wert von  $R_b = (1.15 \pm 0.13) \Omega \text{cm}^2$ . Die aus dem Epithel der Niere des Hundes gewonnenen MDCK-2 Zellen zeigen dagegen eine deutlich höhere Dichtigkeit des Zelllayers ( $R_b = (88 \pm 4) \Omega \text{cm}^2$ ). Die mit Abstand höchsten Werte für  $R_b$  finden sich für den zweiten MDCK-Stamm, die epithelialen MDCK C7-Zellen

( $R_b = (2870 \pm 240) \Omega\text{cm}^2$ ). Für die untersuchten makrovaskulären Endothelzellen konnten statt dessen nur sehr kleine parazelluläre Widerstände bestimmt werden. Bovine Aortenendothelzellen weisen Widerstände von  $R_b = (1.72 \pm 0.06) \Omega\text{cm}^2$  auf, für humane Nabelschnurendothelzellen wurde ein mittlerer Widerstand von  $R_b = (3.02 \pm 0.28) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt. Die aus dem Gehirn von Schweinen bzw. Mäusen präparierten Kapillarendothelzellen gehören zum mikrovaskulären Endothel und bilden in beiden Spezies die Grundlage der Blut-Hirn-Schranke. Die für diese physiologische Aufgabe erforderlichen Barriereigenschaften finden sich auch in den gemessenen parazellulären Widerständen wieder.

Sowohl für porcine wie auch für murine Kapillarendothelzellen zeigen sich für die zwei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen große Unterschiede in den resultierenden parazellulären Widerständen. So weisen die in serumfreien Medium unter Zugabe einer physiologischen Konzentration an Hydrocortison (550 nM) kultivierten Zellschichten etwa



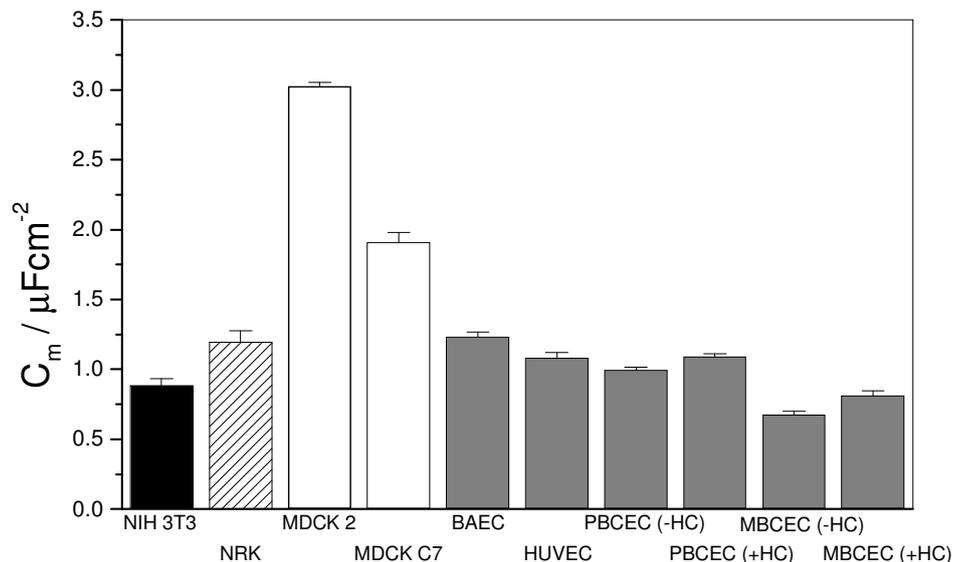
**Abb. 4.14:** Mittlerer parazellulärer Widerstand  $R_b$  der untersuchten Zellsorten. Für die einzelnen Zellspezies wurden folgende Werte gemessen: NIH 3T3 ( $1.15 \pm 0.13) \Omega\text{cm}^2$  / NRK ( $9.3 \pm 0.8) \Omega\text{cm}^2$  / MDCK-2 ( $88 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$  / MDCK C7 ( $2870 \pm 240) \Omega\text{cm}^2$  / BAEC ( $1.72 \pm 0.06) \Omega\text{cm}^2$  / HUVEC ( $3.02 \pm 0.28) \Omega\text{cm}^2$  / PBCEC (-HC) ( $263 \pm 16) \Omega\text{cm}^2$  / PBCEC (+HC) ( $830 \pm 90) \Omega\text{cm}^2$  / MBCEC (-HC) ( $25 \pm 3) \Omega\text{cm}^2$  / MBCEC (+HC) ( $82 \pm 13) \Omega\text{cm}^2$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

dreimal höhere Werte für  $R_b$  auf als die in serumfreien Medium ohne Hydrocortison (PBCEC) bzw. in serumhaltigen Medium ohne Hydrocortison kultivierten Zellen (MBCEC).

Für PBCEC wurde in Abwesenheit von HC für  $R_b$  ein Wert von  $(263 \pm 16) \Omega\text{cm}^2$  gemessen, im Gegensatz zu  $(830 \pm 90) \Omega\text{cm}^2$  für hydrocortisonhaltiges Kulturmedium<sup>3</sup>. Trotz deutlich kleinerer Absolutwerte wurde für MBCEC ein analoges Verhalten gefunden. In serumhaltigem Kulturmedium ohne Hydrocortison wurde für MBCEC ein Wert von  $R_b = (25 \pm 3) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt im Vergleich zu  $R_b = (82 \pm 13) \Omega\text{cm}^2$  bei Kultivierung in hydrocortisonhaltigem serumfreiem Medium.

### Spezifische Kapazität der Zellmembran $C_m$

Die flächennormierte Kapazität  $C_m$  einer ideal glatten Zellmembran ohne Ausstülpungen liegt bei  $1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ . Sind bei Zellen Oberflächenvergrößerungen wie z.B. Mikrovilli vorhanden, so führt dies zu einem deutlichen Anstieg von  $C_m$ .



**Abb. 4.15:** Mittlere Membrankapazität  $C_m$  der untersuchten Zellsorten. Für die einzelnen Bedingungen wurden folgende Werte gemessen: NIH 3T3 ( $0.88 \pm 0.05$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / NRK ( $1.20 \pm 0.08$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / MDCK-2 ( $3.03 \pm 0.03$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / MDCK C7 ( $1.91 \pm 0.07$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / BAEC ( $1.23 \pm 0.03$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / HUVEC ( $1.08 \pm 0.04$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / PBCEC (-HC) ( $0.99 \pm 0.02$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / PBCEC (+HC) ( $1.09 \pm 0.02$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / MBCEC (-HC) ( $0.68 \pm 0.03$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / MBCEC (+HC) ( $0.81 \pm 0.04$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Abbildung 4.15 zeigt die Ergebnisse für alle Zelltypen. Die bestimmten Kapazitätswerte liegen bis auf die beiden MDCK-Zelltypen alle in der Größenordnung der Kapazität der ungefalteten Zellmembran von  $1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ . So wurden für die Fibroblasten Werte sowohl leicht über wie auch etwas unter  $1 \mu\text{Fcm}^{-2}$  gemessen (NIH 3T3 ( $0.88 \pm 0.05$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  / NRK ( $1.20 \pm 0.08$ )  $\mu\text{Fcm}^{-2}$ ), was auf weitgehend glatte Zellmembranen hindeutet. Für MDCK-2 Zellen wurde dagegen eine deutlich höhere Kapazität von

<sup>3</sup> Zur Anpassung der elektrischen Daten der PBCEC wurde ein von Lo et al. (1998) beschriebenes Modell verwendet, das die ellipsoide Form der Zellen berücksichtigt (s. 3.5.2). Die dazu nötige Bestimmung der beiden Halbachsen wurde anhand von fluoreszenzmikroskopischen Bildern durchgeführt (s. 4.4.3).

$C_m = (3.03 \pm 0.03) \mu\text{Fcm}^{-2}$ , für MDCK C7-Zellen ein etwas kleinerer Wert von  $C_m = (1.91 \pm 0.07) \mu\text{Fcm}^{-2}$  bestimmt. Da es sich bei den MDCK-Zellen um transportaktive Epithelzellen aus der Niere handelt, ist eine Oberflächenvergrößerung in Form von Mikrovilli zu erwarten, da nur in einer vergrößerten Membranfläche mehr Transporter Platz finden. Ähnlich wie die Fibroblasten verhalten sich die Membrankapazitäten der untersuchten Endothelzellen. Unabhängig davon, aus welchem Organ sie gewonnen wurden, zeigen alle Zellsorten Kapazitäten in der Größenordnung der ungefalteten Membran. Da Endothelzellen *in vivo* Blut- und Lymphgefäße auskleiden sind diese ständig einem laminaren Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Da Membranausstülpungen in diesem Fall aufgrund der herrschenden Scherkräfte ungünstig sind, besitzen Endothelzellen näherungsweise glatte Oberflächen. Im Einzelnen wurde für BAEC ein Kapazität von  $C_m = (1.23 \pm 0.03) \mu\text{Fcm}^{-2}$ , sowie für HUVEC-Zellen ein Wert von  $C_m = (1.08 \pm 0.04) \mu\text{Fcm}^{-2}$  gefunden. Die primär kultivierten Endothelzellen weisen für die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen jeweils leicht unterschiedliche Kapazitäten auf. So führt eine Kultivierung unter Einfluß von Hydrocortison zu leicht, aber signifikant erhöhten Membrankapazitäten. Für PBCEC ohne Zusatz von HC wurden  $(0.99 \pm 0.02) \mu\text{Fcm}^{-2}$  im Vergleich zu  $(1.09 \pm 0.02) \mu\text{Fcm}^{-2}$  bei Kultivierung mit hydrocortisonhaltigem Medium bestimmt. Analog dazu findet man für MBCEC, die in hydrocortisonfreiem, aber serumhaltigem Medium kultiviert wurden einen Wert von  $C_m = (0.68 \pm 0.03) \mu\text{Fcm}^{-2}$  im Gegensatz zu  $C_m = (0.81 \pm 0.04) \mu\text{Fcm}^{-2}$  für Zellen nach Serumentzug bei gleichzeitiger Zugabe von Hydrocortison. Auffällig ist im Falle der MBCEC ebenso wie für die NIH 3T3, dass die bestimmte Kapazität teilweise deutlich unter der einer ungefalteten Membran liegt. Das kann auf ein Überlappen der einzelnen Zellen im Monolayer im Bereich des Zell-Zell-Kontaktes hindeuten.

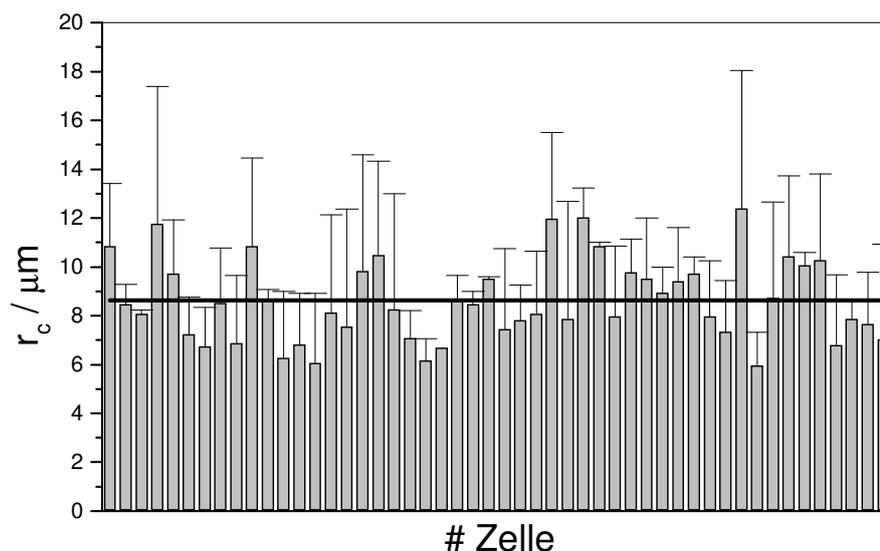
#### 4.3.3 Bestimmung des spezifischen Elektrolytwiderstands $\rho_{\text{sub}}$ im Adhäsionskontakt

Die biologische Bedeutung des spezifischen Widerstands  $\rho_{\text{sub}}$  zwischen Zelle und Substrat ergibt sich aus dem Einfluß dieser Größe auf die lokalen elektrischen Eigenschaften der Zellmembran.  $\rho_{\text{sub}}$  kontrolliert die lokale extrazelluläre Spannung, die aus dem Stromfluß entlang des Spalts resultiert. Dies kann z.B. Ionenkanäle beeinflussen, wenn sie spannungsgesteuert sind. Eine zelltypspezifische Komposition des Spalts zwischen Zelle und Substrat lässt sich möglicherweise ebenfalls anhand dieser elektrischen Größe erkennen und erlaubt eventuell so eine Korrelation mit den mikrogravimetrischen Daten.

Der spezifische Elektrolytwiderstand  $\rho_{\text{sub}}$  kann aus der Definition für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  gewonnen werden:  $\alpha = (\rho_{\text{sub}} / d)^{0.5} \cdot r_c$ . Dabei ist  $d$  der Abstand zwischen Zelle

und Substrat und  $r_c$  der Radius einer Zelle. Daraus ergibt sich für den spezifischen Elektrolytwiderstand:  $\rho_{\text{sub}} = (\alpha^2 / r_c^2) \cdot d$ . Somit ist  $\rho_{\text{sub}}$  proportional vom Quadrat des Wertes von  $\alpha$  sowie antiproportional vom Quadrat des jeweiligen Zellradius  $r_c$  abhängig. Zur Errechnung des Wertes für  $\rho_{\text{sub}}$  werden in dieser Arbeit die mikroskopisch gewonnenen Daten des Zell-Substrat-Abstands  $d$  und der Zellradius  $r_c$  sowie die aus ECIS-Messungen bestimmten Werte des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  eingesetzt.

Der mittlere Zellradius wird aus mikroskopischen Aufnahmen der Zellen bestimmt. Für jede Zelle wird ein mittlerer Radius  $r_c$  mit entsprechender Standardabweichung errechnet. Abbildung 4.16 zeigt dies exemplarisch für MDCK-2 Zellen. Es wurden die mittleren Radien von 50 Einzelzellen bestimmt. Die individuellen Werte unterliegen einer großen Streuung. Es konnten minimale Zellradien von 6  $\mu\text{m}$  und maximale Werte für  $r_c$  von 12  $\mu\text{m}$  gemessen werden. Daraus ergibt sich ein mittlerer Zellradius für MDCK-2 Zellen von  $r_c = (8.6 \pm 0.2) \mu\text{m}$ .

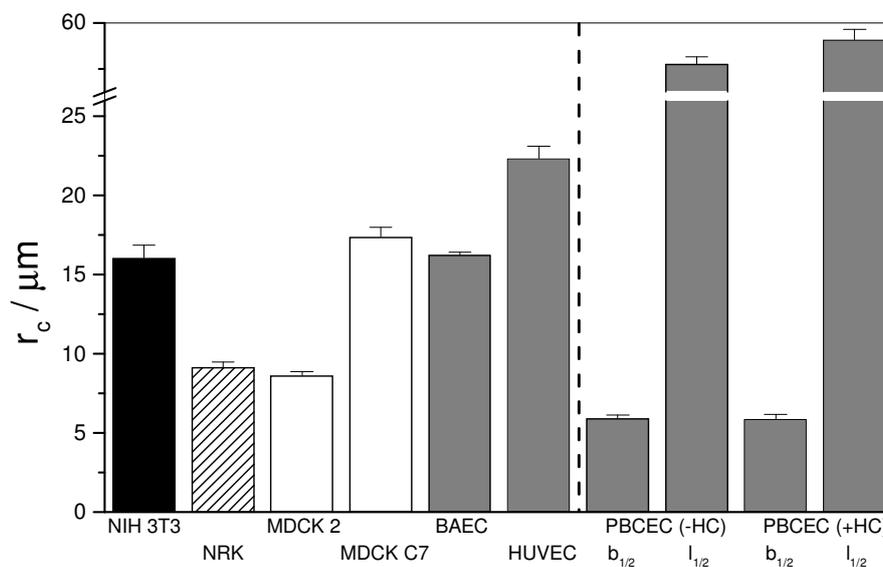


**Abb. 4.16:** Mittlerer Zellradius  $r_c$  von konfluenten MDCK-2 Zellen. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert  $(8.6 \pm 0.2) \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Nach Bestimmung des mittleren Zell-Substrat-Abstandes  $d$  und des mittleren Zellradius  $r_c$  kann aus dem elektrochemisch bestimmten Wert des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  der spezifische Elektrolytwiderstand im Adhäsionsbereich nach der oben beschriebenen Gleichung errechnet werden. Es ergibt sich ein Wert von  $(920 \pm 150) \Omega\text{cm}$ , welcher um mehr als das 10fache über dem für das Zellkulturmedium typischen Wert von 60  $\Omega\text{cm}$  liegt. Offensichtlich sind die elektrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt anders als im Kulturmedium. Dies ist möglicherweise auf eine veränderte Viskosität oder auf eine durch die

Anwesenheit von Polyelektrolyten (ECM) reduzierte Ionenbeweglichkeit in diesem Bereich zurückzuführen.

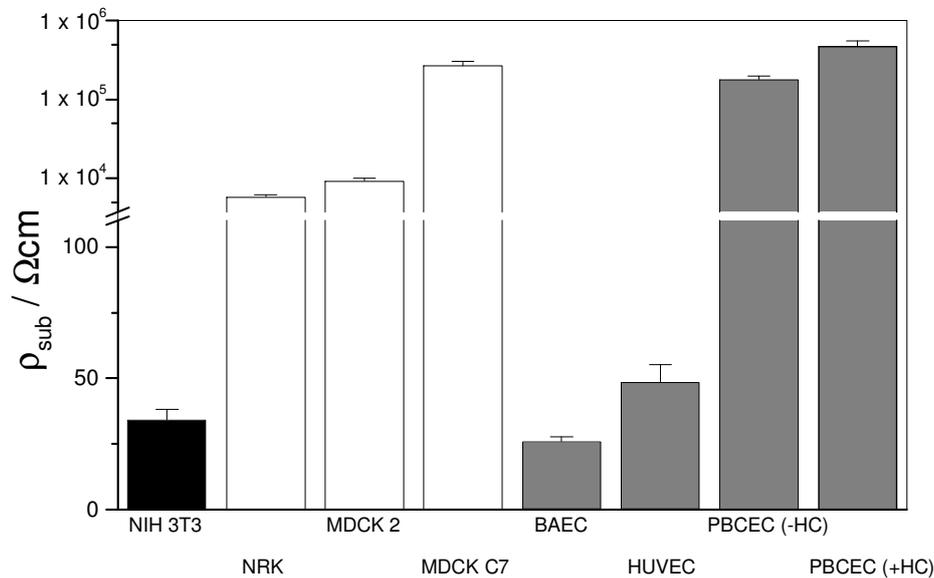
Analog kann durch die Bestimmung des jeweiligen mittleren Radius  $r_c$  und die Verwendung des Zell-Substrat-Abstandes  $d$  aus dem ECIS-Parameter  $\alpha$  der spezifische Widerstand zwischen Zelle und Substrat  $\rho_{\text{sub}}$  für alle weiteren Zellsorten errechnet werden. Zur Bestimmung der Zellradien wurden die jeweiligen konfluenten Zelllayer phasenkontrast- oder fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die entsprechenden Radien wurden aus der statistischen Analyse von mindestens 26 Einzelzellen gewonnen.



**Abb. 4.17:** Mittlere Radien  $r_c$  der untersuchten Zellsorten.  $l_{1/2}$  und  $b_{1/2}$  bezeichnen die lange und die breite Halbachse der PBCEC, die aufgrund der spindelförmigen Morphologie dieser Zellen anstelle eines Radius bestimmt wurden. Für die einzelnen Zellspezies wurden folgende Werte gemessen: NIH 3T3 ( $16 \pm 2$ )  $\mu\text{m}$  / NRK ( $9.2 \pm 0.3$ )  $\mu\text{m}$  / MDCK-2 ( $8.6 \pm 0.2$ )  $\mu\text{m}$  / MDCK C7 Zellen ( $17.4 \pm 0.6$ )  $\mu\text{m}$  / BAEC ( $16.3 \pm 0.2$ )  $\mu\text{m}$  / HUVEC ( $22.4 \pm 0.8$ )  $\mu\text{m}$  / PBCEC (-HC)  $b_{1/2}$  = ( $5.9 \pm 0.2$ )  $\mu\text{m}$   $l_{1/2}$  = ( $51.1 \pm 1.6$ )  $\mu\text{m}$  / PBCEC (+HC)  $b_{1/2}$  = ( $5.8 \pm 0.3$ )  $\mu\text{m}$   $l_{1/2}$  = ( $56.4 \pm 2.2$ )  $\mu\text{m}$  ( $n > 25$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Abbildung 4.17 stellt die Ergebnisse aller untersuchten Zellsorten dar. Die murinen Fibroblasten 3T3 weisen hier einen sehr großen Zellradius auf ( $r_c = (16 \pm 2) \mu\text{m}$ ), während die NRK-Zellen zu den kleinsten untersuchten Zellen gehören ( $r_c = (9.2 \pm 0.3) \mu\text{m}$ ). Die beiden MDCK-Stämme zeigen auch hier deutliche Unterschiede. MDCK-2 Zellen zeigen den mit Abstand kleinsten Radius von  $r_c = (8.6 \pm 0.2) \mu\text{m}$ , dagegen konnte für die MDCK C7-Zellen ein mehr als doppelt so großer mittlerer Radius von  $r_c = (17.4 \pm 0.6) \mu\text{m}$  bestimmt werden. Die makrovaskulären Endothelzellen gehören ebenfalls zu den größeren Zellen. BAEC zeigen Radien von  $r_c = (16.3 \pm 0.2) \mu\text{m}$ , für HUVEC wurde der mit Abstand größte Zellradius bestimmt ( $r_c = (22.4 \pm 0.8) \mu\text{m}$ ). Für porcine Kapillarendothelzellen wurde aufgrund ihrer

länglichen Morphologie ein an diese Geometrie adaptiertes Modell zur Analyse der elektrochemischen Daten eingesetzt, bei dem die Halbachsen des Ellipsoids ausgemessen



**Abb. 4.18:** Mittlerer spezifischer Elektrolytwiderstand  $\rho_{\text{sub}}$  der untersuchten Zellsorten. Für die einzelnen Zellspezies wurden folgende Werte errechnet: NIH 3T3 ( $34 \pm 11$ )  $\Omega\text{cm}$  / NRK ( $540 \pm 60$ )  $\Omega\text{cm}$  / MDCK-2 ( $920 \pm 150$ )  $\Omega\text{cm}$  / MDCK C7 Zellen ( $27000 \pm 3400$ )  $\Omega\text{cm}$  BAEC ( $26 \pm 2$ )  $\Omega\text{cm}$  / HUVEC ( $49 \pm 7$ )  $\Omega\text{cm}$  / PBCEC (-HC) ( $18000 \pm 2100$ )  $\Omega\text{cm}$  / PBCEC (+HC) ( $48000 \pm 8100$ )  $\Omega\text{cm}$  ( $n > 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM; Die Bestimmung der Standardabweichungen erfolgte nach dem Gauß'schen Gesetz zur Fehlerfortpflanzung).

wurden. In Abbildung 4.17 sind daher für die beiden Kultivierungsbedingungen jeweils die Werte für die lange Halbachse ( $l_{1/2}$ ) und die breite Halbachse ( $b_{1/2}$ ) dargestellt. Diese Werte sind daher nicht mit den Radien der Zellen mit kreisförmiger Morphologie vergleichbar. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen wurde nicht gefunden (PBCEC (-HC):  $b_{1/2} = (5.9 \pm 0.2) \mu\text{m}$   $l_{1/2} = (51.1 \pm 1.6) \mu\text{m}$  / PBCEC (+HC)  $b_{1/2} = (5.8 \pm 0.3) \mu\text{m}$   $l_{1/2} = (56.4 \pm 2.2) \mu\text{m}$ ). MBCEC wurden nicht hinsichtlich ihrer Größe untersucht, da in Ermangelung eines mittleren Zell-Substrat-Abstandes keine Berechnung des spezifischen Widerstandes  $\rho_{\text{sub}}$  erfolgen konnte.

Abbildung 4.18 zeigt die für die einzelnen Zellsorten aus den Parametern  $\alpha$ ,  $d$  und  $r_c$  errechneten spezifischen Elektrolytwiderstände  $\rho_{\text{sub}}$ . Die Werte für  $\rho_{\text{sub}}$  liegen in einem Bereich von etwa 25  $\Omega\text{cm}$  bis zu knapp 50  $\text{k}\Omega\text{cm}$ . Die relativ großen und mit einem kleinen Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  behafteten murinen Fibroblasten NIH 3T3 zeigen einen sehr kleinen spezifischen Widerstand ( $\rho_{\text{sub}} = (34 \pm 11) \Omega\text{cm}$ ). Für die nur halb so großen NRK-Zellen wurden Werte von  $\rho_{\text{sub}} = (540 \pm 60) \Omega\text{cm}$  gefunden. Damit liegt der spezifische Widerstand etwa in der Größenordnung von MDCK-2 Zellen ( $\rho_{\text{sub}} = (920 \pm 150) \Omega\text{cm}$ ).

MDCK C7-Zellen weisen dagegen mit  $\rho_{\text{sub}} = (27000 \pm 3400) \Omega\text{cm}$  einen der höchsten subzellulären spezifischen Widerstände auf. Dagegen zeigen die vergleichsweise großen makrovaskulären Endothelzelllinien (BAEC:  $\rho_{\text{sub}} = (26 \pm 2) \Omega\text{cm}$ ; HUVEC:  $\rho_{\text{sub}} = (49 \pm 7) \Omega\text{cm}$ ) Widerstände, die sich mit denen der Fibroblasten vergleichen lassen und teilweise unter dem spezifischen Widerstand des Kulturmediums liegen. Die mikrovaskulären Kapillarendothelzellen weisen im Vergleich zu den meisten anderen untersuchten Zellsorten sehr hohe spezifische Elektrolytwiderstände im Adhäsionskontakt auf. Außerdem haben die verschiedenen Kultivierungsbedingungen einen wesentlichen Einfluß auf die bestimmten Werte für  $\rho_{\text{sub}}$ . So konnte für PBCEC ohne Zusatz von Hydrocortison ein spezifischer Widerstand von  $\rho_{\text{sub}} = (18000 \pm 2100) \Omega\text{cm}$  bestimmt werden, für PBCEC bei Zusatz von Hydrocortison dagegen ein mehrfach höherer Widerstand von  $\rho_{\text{sub}} = (48000 \pm 8100) \Omega\text{cm}$ . Dieses Ergebnis stellt eine direkte Folge der Zunahme  $\alpha$  dar, da die anderen Größen, die Einfluß auf  $\rho_{\text{sub}}$  nehmen, konstant bleiben. Spezifische Elektrolytwiderstände im Adhäsionskontakt für murine Kapillarendothelzellen konnten aufgrund des nicht bestimmten Zell-Substrat-Abstandes  $d$  nicht berechnet werden.

Die errechneten spezifischen Elektrolytwiderstände im Adhäsionskontakt sind offensichtlich in Abhängigkeit von der betrachteten Zellsorte höchst unterschiedlich. Dabei können für  $\rho_{\text{sub}}$  einerseits Werte detektiert werden, die im Bereich des typischen spezifischen Elektrolytwiderstand des Zellkulturmedium (etwa  $60 \Omega\text{cm}$ ) liegen. Dies ist in aller Regel für die Zelltypen der Fall, die keine ausgeprägt starken Zell-Substrat-Interaktionen aufweisen (z.B. NIH 3T3 und BAEC). Diese Zellarten besitzen parallel dazu auch nur eine geringe parazelluläre Dichtigkeit, so dass von einem ungehinderten Austausch zwischen den Ionen des Mediums und des Subzellularbereichs ausgegangen werden kann. Für Zellen mit wesentlich stärkeren Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakten (z.B. MDCK C7 und PBCEC (+HC)) werden dagegen spezifische subzelluläre Elektrolytwiderstände gefunden, die teilweise um den Faktor 500-1000 höher sind als die, die für Zellen ohne Barriereigenschaften gemessen wurden. Dieser große Unterschied ergibt sich hauptsächlich aus den für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$ , von dessen Wert  $\rho_{\text{sub}}$  quadratisch abhängt, bestimmten starken Differenzen der verschiedenen Zellspezies. Die ebenfalls in den spezifischen Elektrolytwiderstand unter der Zelle eingehende Parameter des Zell-Substrat-Abstandes  $d$  und des Zellradius  $r_c$  haben dagegen aufgrund geringerer Unterschiede zwischen den Zelltypen ( $r_c$ ) oder wegen eines nur linearem Zusammenhangs ( $d$ ) eher einen geringeren Einfluß auf  $\rho_{\text{sub}}$ .

Da nur einige Zellsorten (NIH 3T3, BAEC) gleichzeitig eine kleine Änderung des Dämpfungswiderstands und einen kleinen spezifischen Widerstand im Adhäsionskontakt zeigen, ist ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen den elektrischen Verhältnissen im Spalt und den mikrogravimetrischen Eigenschaften der Zelle anscheinend nicht vorhanden.

#### **4.4 Charakterisierung des Adhäsionskontaktes nach chemischer Vernetzung der Proteinbestandteile**

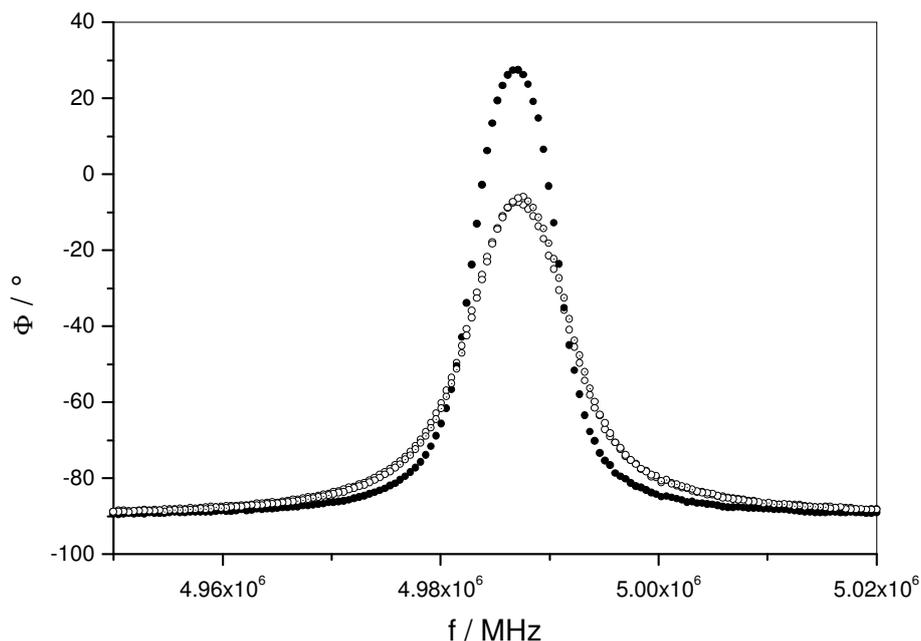
Messungen mit der *atomic force microscopy* (AFM) haben ergeben, dass eine chemische Vernetzung (*crosslinking*) aller zellulären Proteine mit Glutardialdehyd zu einer drastischen Änderung der Zellelastizität führt (Hoh und Schoeneberger, 1994; Wu et al., 1998). Die manipulierten Zellschichten zeigen drastisch erhöhte Elastizitätsmoduli. Da durch eine solche Manipulation offensichtlich die mechanischen Eigenschaften der Zelle verändert werden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit die Proteinvernetzung Einfluß auf den Adhäsionskontakt nimmt und wie sich diese Versteifung des Cytoskeletts auf das QCM-Signal auswirkt. Dazu werden die chemisch veränderten Zellschichten zuerst mit der QCM auf gegenüber nativen Zellen detektierbare mikrogravimetrische Unterschiede untersucht. Zusätzliche Charakterisierungen der elektrischen Eigenschaften und der Geometrie des Zell-Substrat-Bereichs mit der ECIS-Methode und der FLIC-Mikroskopie sollen eine Interpretation der mikrogravimetrischen Daten erleichtern. Parallel durchgeführte AFM-Messungen sollen die mechanische Veränderung der Zellen auf unabhängigem Wege verifizieren.

Die Stabilisierung von Zellen mit fixierenden Reagenzien ist eine routinemäßig angewandte Methode, um Gewebe oder Zellschichten zu konservieren und so nachfolgende Untersuchungen möglich zu machen, die aufgrund der verwendeten Präparationstechnik zelluläre Strukturen vitaler Zellen zerstören würden. So werden Proben in der Elektronenmikroskopie für die Messung im Vakuum dehydriert und kontrastiert, ein Vorgang, der ohne die stabilisierende Wirkung der Fixierung auf lebende Zellen nicht möglich wäre. Die chemische Wirkung der Fixierungsreagenzien beruht auf der Reaktion von Aldehydgruppen mit den Aminogruppen von Proteinen. Dies führt zu einer Vernetzung aller zellulären Proteine und erklärt die stabilisierende Wirkung der Reagenzien. In dieser Arbeit werden 2.5 %ige Glutardialdehyd- (GA) und 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) als *crosslinking*-Reagenzien eingesetzt.

#### 4.4.1 Untersuchung konfluenter MDCK-2 Zellen nach chemischer Vernetzung des Zellproteins mit Glutardialdehyd-Lösung

Die Inkubation der Zellen wurde mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung für 30 min bei RT durchgeführt. Eine mikrogravimetrische Untersuchung vor und nach dem Fixierungsschritt sollte Änderungen an den viskoelastischen Eigenschaften der Zellschicht offenlegen. Anschließend wurde durch eine Permeabilisierung des Zelllayers mit einer 0.2 %igen Triton-Lösung das im Zellkörper eingeschlossene Wasser befreit und dieser Zustand erneut mikrogravimetrisch mit der QCM charakterisiert, da die intrazelluläre Flüssigkeit zu einem großen Teil für das von Zellen hervorgerufene QCM-Signals verantwortlich gemacht wird (Reiss et al., 2003) Parallel zu den QCM-Untersuchungen der Zellschichten wurden auch ECIS-Messungen durchgeführt, um eine elektrische Charakterisierung der Zelllayer vor und nach den chemischen Manipulationen leisten zu können.

##### 4.4.1.1 Mikrogravimetrische Untersuchung der mit Glutardialdehyd behandelten MDCK-2 Zellen

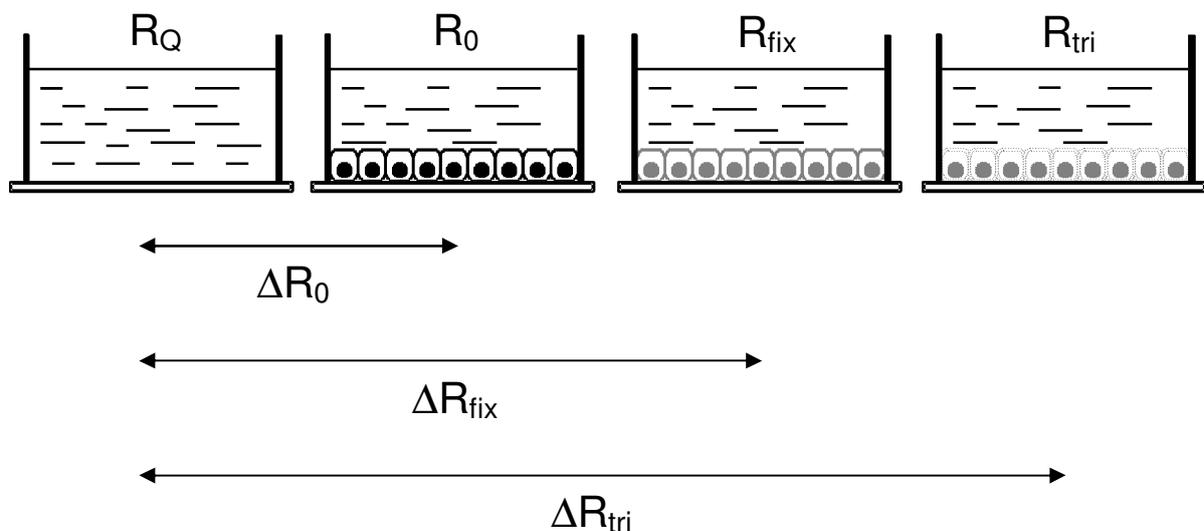


**Abb. 4.19:** Frequenzabhängige Phasenverschiebung eines mit MDCK-2 Zellen belegten Quarzes. Gezeigt ist ein exemplarischer Kurvenverlauf für eine native Zellschicht (—), für dieselbe nach 30-minütiger Fixierung mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung (---) sowie nach anschließender 5-minütiger Permeabilisierung mit 0.2 %iger Triton-Lösung (···).

Die Inkubation der Zellschicht in glutardialdehydhaltigem Puffer für 30 min führt zu einem sehr deutlichen Anstieg des auf die Zellen zurückzuführenden inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$ . Diese Änderung lässt sich bereits gut anhand der Rohdaten beschreiben. Der in Abbildung 4.19 dargestellte Kurvenverlauf der Phasenverschiebung als

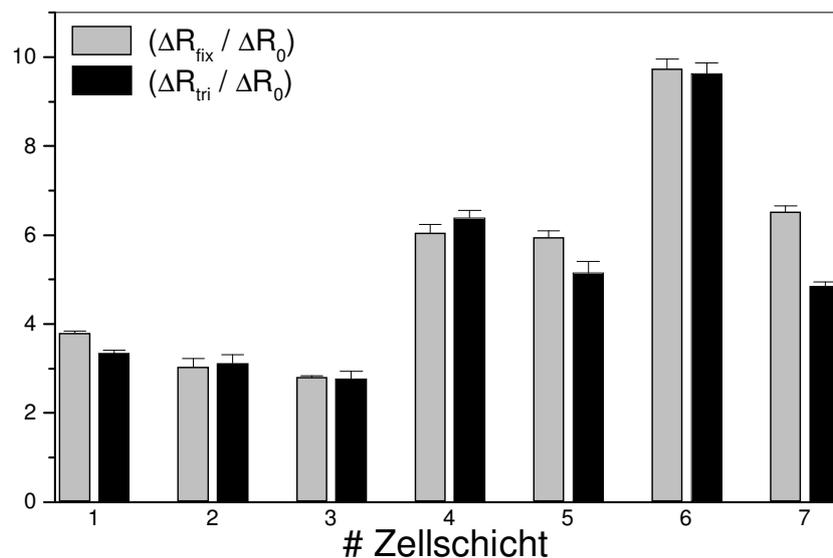
Funktion der Frequenz einer exemplarisch ausgewählten Zellschicht macht die Effekte der einzelnen Präparationsschritte auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen deutlich. Während das Phasenmaximum des oszillierenden Quarzes mit der nicht fixierten, nativen Zellschicht etwa einen Wert von  $30^\circ$  erreicht, sinkt dieser Maximalwert nach Zugabe des Fixierungsreagenzes drastisch auf beinahe  $-10^\circ$  ab. Gleichzeitig verbreitert sich die Kurve im unteren Teil des Graphen deutlich. Beide Phänomene sind eindeutige Indizien für eine zunehmende Energiedissipation innerhalb der Zellschicht. Die danach erfolgte Permeabilisierung der Zellschicht durch eine 5-minütige Inkubation mit 0.2 %iger Triton-Lösung zeigte keinerlei signifikante Änderung des Kurvenverlaufs.

Analog zu den betrachteten Rohdaten lässt sich diese durch die Fixierung induzierte Änderung im viskoelastischen Verhalten anhand der Dämpfungswiderstände  $R$  der auf den Quarzen untersuchten Zellschichten nachweisen. Abbildung 4.20 macht die experimentelle Vorgehensweise sowie die spätere Darstellung der relativen Änderungen des Dämpfungswiderstandes deutlich. So werden zunächst für die nacheinander vorgenommenen Präparationsschritte absolute Werte für den Dämpfungswiderstand bestimmt ( $R_0$ ,  $R_{\text{fix}}$  und  $R_{\text{tri}}$ ), von denen anschließend der absolute Wert des mechanisch gereinigten Quarzes  $R_Q$  subtrahiert wird, um ausschließlich zellschichtspezifische Größen zu detektieren. Die sich hieraus ergebenden Parameter  $\Delta R_0$ ,  $\Delta R_{\text{fix}}$  sowie  $\Delta R_{\text{tri}}$  charakterisieren die relativen Änderungen des Dämpfungswiderstandes nach Fixierung bzw. Permeabilisierung. Anschließend werden die Werte von  $\Delta R_{\text{fix}}$  und  $\Delta R_{\text{tri}}$  durch  $\Delta R_0$  geteilt. Dies ermöglicht eine einfachere und von der Streuung der einzelnen relativen Dämpfungswiderstände  $\Delta R_0$  der nativen Zellschichten unabhängige Darstellung der Ergebnisse anhand von Faktoren.



**Abb. 4.20:** Schematische Darstellung der einzelnen Präparationsschritte und der jeweils daraus gewonnenen Parameter  $\Delta R_0$ ,  $\Delta R_{\text{fix}}$  und  $\Delta R_{\text{tri}}$ .

Abbildung 4.21 zeigt die für die Präparationsschritte beobachteten Änderungen der Dämpfungswiderstände anhand der Quotienten  $(\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0)$  und  $(\Delta R_{\text{tri}} / \Delta R_0)$ . Nach der Vernetzung des zellulären Proteins mit Glutardialdehyd lässt sich ein Anstieg des auf die Zellschicht zurückzuführenden Dämpfungswiderstandes  $(\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0)$  um mindestens das dreifache feststellen. Die maximale Zunahme von  $(\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0)$  beträgt nahezu das zehnfache. Im Mittel ergibt sich eine relative Zunahme von  $(5.4 \pm 0.9)$ . Die nachfolgende Permeabilisierung wird anhand von  $(\Delta R_{\text{tri}} / \Delta R_0)$  charakterisiert. Hier kann bezogen auf den Ausgangszustand im Mittel eine Zunahme des Dämpfungswiderstandes um den Faktor  $(5.0 \pm 0.9)$  festgestellt werden. Die Änderung der Induktivität  $L$  wird aus der weiteren Betrachtung herausgelassen, da, wie schon in 4.1.2.2 für vitale Zellschichten dargelegt wurde, sehr große Schwankungen innerhalb von Messungen unter gleichen Bedingungen auftreten, die eine sinnvolle Interpretation erschweren oder unmöglich machen.

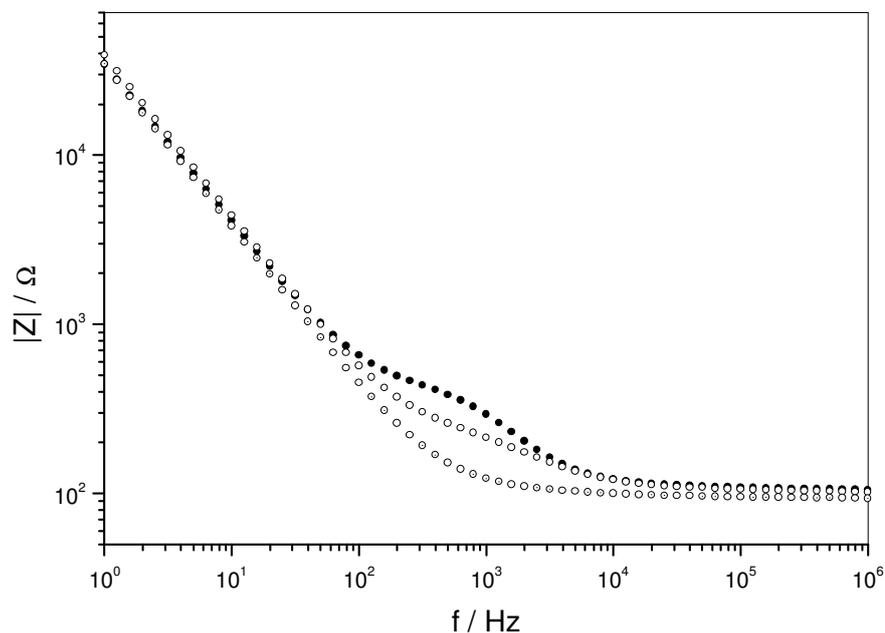


**Abb. 4.21:** Darstellung der Quotienten der relativen Dämpfungswiderstände  $(\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0)$  und  $(\Delta R_{\text{tri}} / \Delta R_0)$  von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung fixiert (graue Säulen) bzw. anschließend 5 min lang mit 0.2 %iger Triton-Lösung permeabilisiert wurden (schwarze Säulen). Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Präparation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für das mittlere Verhältnis der fixierten Zellen kann ein Wert von  $(5.4 \pm 0.9)$ , für die zusätzlich permeabilisierten Zellschichten ein Wert von  $(5.0 \pm 0.9)$  bestimmt werden ( $n = 9$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM)

Offensichtlich ist die drastische Zunahme des Dämpfungswiderstands auf die chemische Vernetzung der Proteinbestandteile zurückzuführen. Da die anschließende Permeabilisierung der Zellschicht mit dem Detergenz Triton und die daraus resultierende Freisetzung des im Zellkörper eingeschlossenen Wassers zu keiner wesentlichen Abnahme des erhöhten Dämpfungswiderstands führt, kann eine Beteiligung der intrazellulären Flüssigkeit am QCM-Signal in diesem Fall ausgeschlossen werden.

#### 4.4.1.2 ECIS-Messungen an MDCK-2 Zellen nach Vernetzung der zellulären Proteine mit Glutardialdehyd

Abbildung 4.22 zeigt jeweils ein exemplarisches Impedanzspektrum von nativen, fixierten sowie fixierten und permeabilisierten MDCK-2 Zellen. Die chemische Fixierung führt im Spektrum zu einem starken Abfall der Impedanz zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz, während sowohl der niedrigfrequenten wie auch der hochfrequenten Bereich keine wesentliche Beeinflussung zeigen. Die Impedanz des Spektrums zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz ist sensitiv für die elektrischen Eigenschaften der Zellschicht und zeigt dort für Zellen mit Barriereigenschaften typischerweise eine plateauähnliche Struktur. Somit kann von einer durch die chemische Manipulation der zellulären Proteine mit GA induzierten signifikanten Veränderung der elektrischen Zelleigenschaften ausgegangen werden. Nach der Zugabe der Triton-Lösung ist in diesem Bereich keinerlei plateauähnliche Struktur mehr zu sehen. Das Spektrum entspricht dem einer leeren Elektrode. Offensichtlich verlieren die Zellen durch die Zugabe der Triton-Lösung und der damit verbundenen Permeabilisierung der Plasmamembranen ihre isolatorischen Eigenschaften.



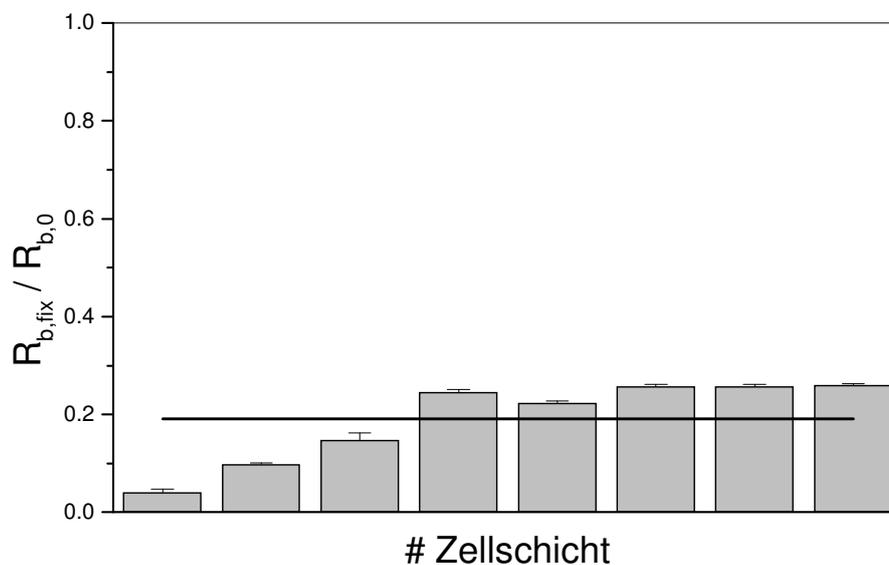
**Abb. 4.22:** Impedanzspektren im ECIS-Modus von MDCK-2 Zellen bei unterschiedlichen Bedingungen. Gezeigt sind native Zellen (l ), Zellen nach der Fixierung mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung (j ) sowie nach einer sich anschließenden Behandlung mit 0.2 %iger Triton-Lösung ( / ).

Eine Anpassung der Rohdaten nach Wegener et al. (2000) sollte genauere Aufschlüsse hinsichtlich der Wirkung des Glutardialdehyds auf die Morphologie der Zelle ermöglichen. Diese detailliertere Analyse kann Informationen bezüglich der durch die Fixierung

beeinflussten zellulären Komponenten wie z. B. die *tight junctions*, den Zell-Substratbereich oder die Struktur der Zellmembran liefern.

### Einfluß auf den Parameter $R_b$

Abbildung 4.23 stellt das für den parazellulären Widerstand  $R_b$  ermittelte Verhältnis zwischen dem fixiertem und dem nativen Zelllayer ( $R_{b,fix} / R_{b,0}$ ) der einzelnen untersuchten Zellschichten dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle untersuchten Zellschichten nach der Fixierung einen drastischen Rückgang von  $R_b$  zeigen. In Einzelfällen fällt der Widerstand bis



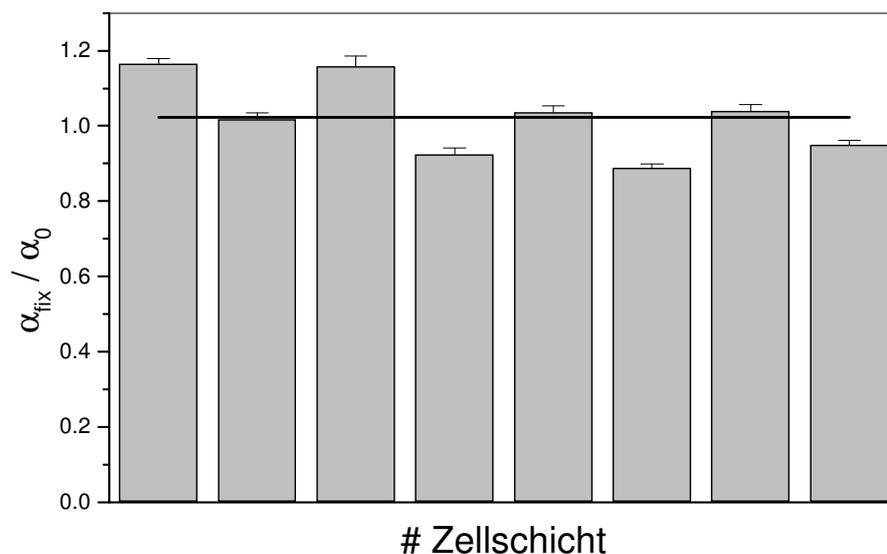
**Abb. 4.23:** Normierter parazellulärer Widerstand ( $R_{b,fix} / R_{b,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Fixierung bestimmten Wert von  $R_b$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.19 \pm 0.03)$  bestimmt werden. ( $n = 8$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Modellierung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich.

auf etwa 5 % des ursprünglichen Wertes. Im Mittel resultiert eine Abnahme auf etwa  $(0.19 \pm 0.03)$  bezogen auf den Ausgangswertes. Diese Beobachtung lässt sich gut mit der oben gezeigten Abnahme der Impedanz im Spektrum zwischen  $10^2$  bis  $10^4$  in Einklang bringen. Die Reaktion des Glutardialdehyds mit zellulären Proteinen führt somit offensichtlich zu einer funktionellen Störung der *tight junctions*. Eventuell verhindert eine Vernetzung der im Zell-Zell-Kontakt befindlichen Proteine deren funktionelle Interaktion untereinander. Möglicherweise ist der Effekt auf den parazellulären Widerstand aber auch in einer Aufweitung des parazellulären Spaltes zu suchen. Dies könnte z.B. durch eine von der Inkubation mit GA osmotisch bedingten Schrumpfung der Zellen herrühren. Diese Möglichkeit wird in Kap. 4.46 experimentell hinterfragt. Eine Anpassung der nach der Behandlung der fixierten Zellschichten mit 0.2 %iger Triton-Lösung erhaltenen Daten wurde

nicht durchgeführt, da nach der Permeabilisierung der Zellen die Gesamtimpedanz des Systems keine zellulären Beiträge mehr aufweist und sinnvolle, interpretierbare Werte für die ECIS-Parameter damit nicht zu erwarten sind.

### Einfluß auf den Zell-Substrat-Parameter $\alpha$

In Abbildung 4.24 ist das Verhältnis ( $\alpha_{\text{fix}} / \alpha_0$ ) des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  der unbehandelten und der danach mit Glutaraldehyd fixierten Zellschicht dargestellt. Die Fixierung zeigt jedoch keinen signifikanten Einfluß auf den Parameter  $\alpha$ . Einige der untersuchten Quarze zeigen zwar kleinere Ab- oder Zunahmen, die aber wenige Prozent des Ausgangswertes betragen und somit nicht signifikant sind. Als Mittelwert lässt sich für ( $\alpha_{\text{fix}} / \alpha_0$ ) ein Wert von  $(1.02 \pm 0.04)$  ermitteln. Somit wird der Wert für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  durch die chemische Vernetzung der Proteine praktisch nicht beeinflusst. Dieser Befund zeigt, dass sowohl die elektrischen wie auch die geometrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt durch die Vernetzung der Proteine nicht verändert werden.



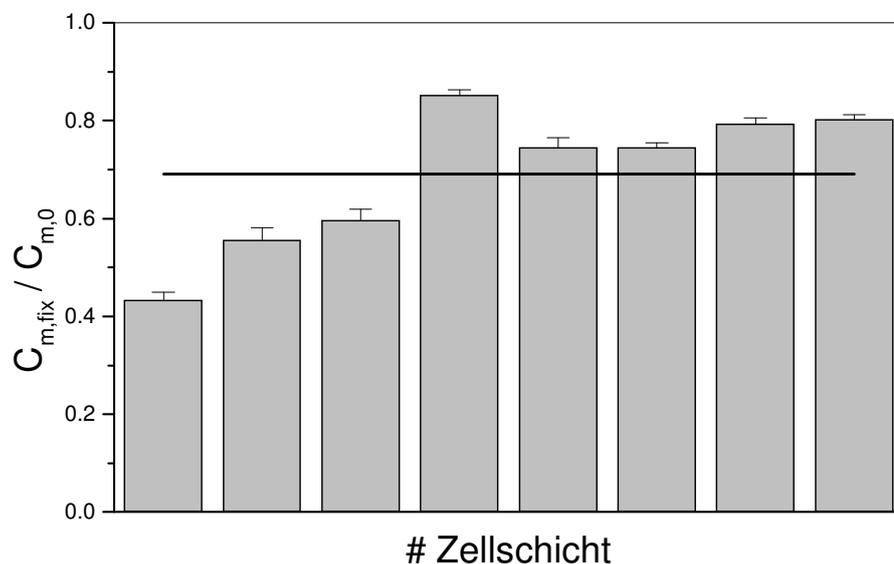
**Abb. 4.24:** Normierter Zell-Substrat-Parameter ( $\alpha_{\text{fix}} / \alpha_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min in 2.5 %iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Fixierung bestimmten Wert des Parameters  $\alpha$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.02 \pm 0.04)$  bestimmt werden. ( $n = 8$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Modellierung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich.

### Einfluß auf die Kapazität der Zellmembran $C_m$

Die Plasmamembran tierischer Zellen besteht zu etwa 50 Prozent aus Proteinen. Die absolute Proteinmenge unterscheidet sich aber in Abhängigkeit vom Zelltyp. So stellte Guidotti (1972) für Leberzellen aus Maus einen Proteingehalt von 44 Prozent, für Zellen der HeLa-Zelllinie

sogar einen Gehalt von 60 Prozent bezogen auf die Gesamtmasse fest. Da insbesondere Membraneinfaltungen wie z.B. Mikrovilli mit aus Proteinen zusammengesetzten Elementen des Cytoskeletts verbunden sind, ist ein Einfluß der vermittelten Proteinvernetzung auf die spezifische Membrankapazität  $C_m$  denkbar.

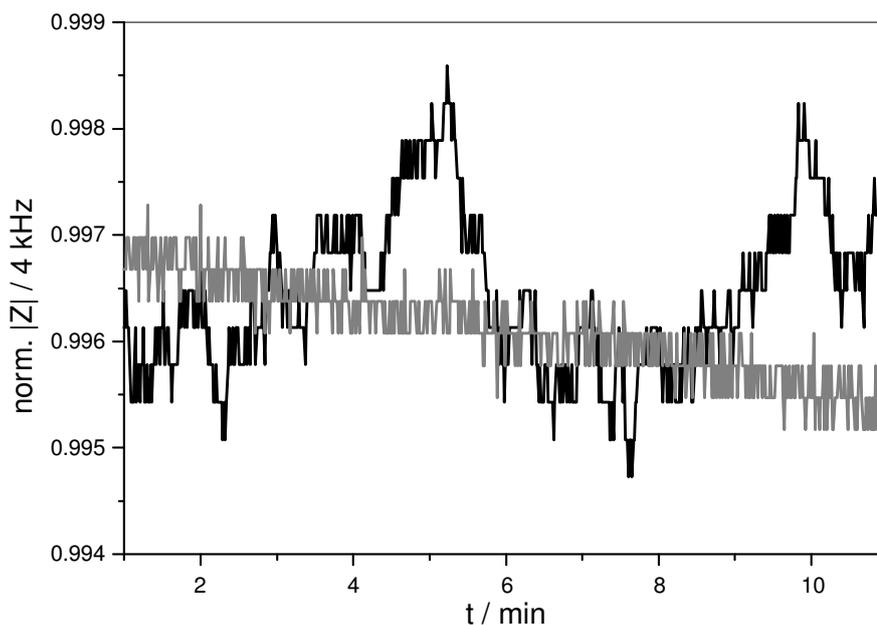
Abbildung 4.25 zeigt die relative Änderung der Membrankapazität nach chemischer Fixierung mit GA. Es zeigte sich generell eine Abnahme der spezifischen Membrankapazität für alle untersuchten Zellschichten. Die Kapazitätswerte der behandelten Zellschichten gingen auf Werte von mindestens dem 0.8fachen, teilweise auf das 0.4fache der Ausgangskapazität der nicht manipulierten Zellschicht zurück. Im Mittel kann ein Rückgang auf einen Faktor von  $(0.69 \pm 0.05)$  bezogen auf die unbehandelte Kontrolle festgestellt werden. Dies lässt auf einen Einfluß des Fixierungsreagenzes auf die effektive Gesamtfläche der Zellmembran schließen. Da die Absolutwerte von  $C_m$  nach der Vernetzung der Proteine noch Kapazitätswerte erreichen, die zweimal so hoch wie die einer ungefalteten Membran ( $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) sind, kann lediglich von einer Verringerung oder Beeinträchtigung der für MDCK-2 Zellen typischen Mikrovilli ausgegangen werden, nicht von einem vollständigen Rückgang.



**Abb. 4.25:** Normierte spezifische Membrankapazität ( $C_{m,fix} / C_{m,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen der nach und der vor der Fixierung bestimmten Kapazität  $C_m$  der Zellmembran. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.69 \pm 0.05)$  bestimmt werden ( $n = 8$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Modellierung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich.

#### 4.4.1.3 Einfluß des Protein-crosslinkings auf die Motilität der MDCK-2 Zellen

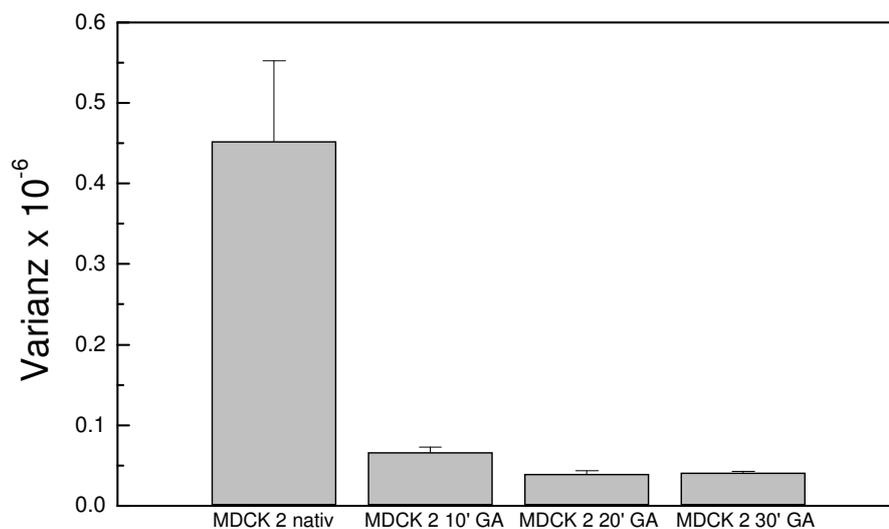
Giaever und Keese (1991) konnten anhand von elektrischen Messungen zeigen, dass die Zellform adhärenter WI-38 VA13-Zellen zeitlich nicht konstant ist. Dazu wurden die auf einer Elektrode kultivierten Zellen einer ECIS-analogen Messung bei einer Frequenz unterworfen. Die von den Autoren festgestellte zeitliche Änderung der Impedanz wurde auf Fluktuationen im Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakt zurückgeführt. Mit analogen Messungen sollte die Motilität von MDCK-2 Zellen vor und nach der chemischen Vernetzung der Proteinbestandteile quantifiziert werden. Dazu wurden MDCK-2 Zellen untersucht, die unterschiedlich lange mit einer 2.5 %igen Glutardialdehyd-Lösung inkubiert worden waren. Abbildung 4.26 stellt den Zeitverlauf der normierten Impedanz bei 4 kHz für MDCK-2 Zellen, die 30 min lang mit dem Vernetzungsreagenz behandelt wurden, dem von unbehandelten nativen MDCK-2 Zellen gegenüber. Diese Rohdaten lassen schon deutliche Unterschiede im Ausmaß der Impedanzfluktuationen erkennen, die ein Maß für die Motilität der Zellen sind.



**Abb. 4.26:** Zeitverlauf der normierten Impedanz  $|Z|$  bei einer Messfrequenz von 4 kHz für MDCK-2 Zellen, die mit 2.5 %iger GA-Lösung behandelt wurden (grau) bzw. unbehandelt blieben (schwarz).

Um die Motilitätsänderung nach dieser Präparation quantifizieren zu können, wurde nach einem Vorschlag von Lo et al. der Datensatz in gleich große Teile von 64 aufeinander folgenden Datenpunkten aufgeteilt. Von diesen gleich großen Datenpaketen wurde dann jeweils Mittelwert, Standardabweichung sowie Varianz errechnet. Durch Mittelung der Varianzen für die 64er Blöcke ergibt sich ein Maß für die Fluktuation innerhalb des

Datensatzes. Je größer die Varianz ist, um so stärker sind die zellulären Bewegungen. Abbildung 4.27 zeigt die mittlere Varianz der normierten Impedanz  $|Z|$  für die unterschiedlichen Bedingungen. Anhand dieses Parameters kann die Stärke der elektrischen Fluktuation beurteilt werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Motilität der Zellen schon nach einer Inkubationszeit von 10 min im Vergleich zu den nativen Zellen drastisch sinkt. Eine Verlängerung der Fixierung um weitere 10 bzw. 20 min hat allerdings nur noch einen wenig senkenden Effekt auf die Beweglichkeit der Zellen. Die Fixierung führt erwartungsgemäß durch die Vernetzung der Proteine zu einer signifikant



**Abb. 4.27:** Mittlere Varianz der normierten Impedanz  $|Z|$  bei 4 kHz für MDCK-2 Zellen, die mit 2.5 %iger Glutaraldehyd-Lösung fixiert wurden. Gezeigt ist die Varianz für native Zellen sowie für diese Zellen nach einer 10-, 20- und 30 minütigen Fixierung. Die Größe der betrachteten Datensätze liegt bei 64 Datenpunkten ( $n = 2$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

eingeschränkten Motilität der Zellen. Die für die Zellmotilität notwendige Dynamik der Cytoskelettkomponenten ist durch die chemische Vernetzung unterbunden. Die komplette Vernetzung des zellulären Proteins ist nach 10 min abgeschlossen, da eine Verlängerung der Inkubationszeit zu keiner wesentlichen Verstärkung des GA-induzierten Effekts führt.

#### 4.4.2 Untersuchung konfluenter MDCK-2 Zellen nach chemischer Vernetzung des Zellproteins mit Paraformaldehyd-Lösung

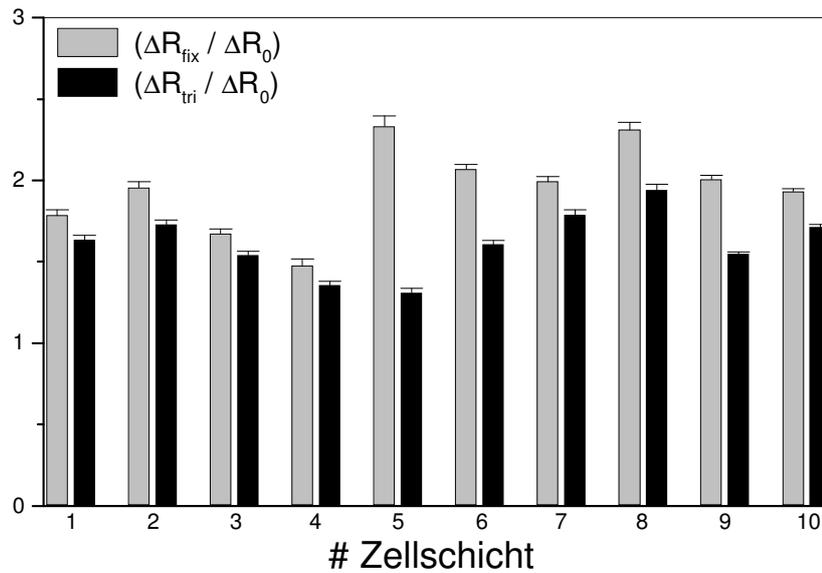
Die für 2.5 %ige GA-Lösung gefundenen Effekte in den ECIS- und in den QCM-Messungen zeigen eine durch das chemische *crosslinking* der Proteine hervorgerufene drastische Zunahme des Dämpfungswiderstands in den mikrogravimetrischen sowie eine deutliche Abnahme des parazellulären Widerstands und der spezifischen Membrankapazität in den elektrischen Messungen. Um zu überprüfen, inwiefern und in welchem Ausmaß sich derartige

Reaktionen auch mit anderen vernetzenden Agentien induzieren lassen, sollte die für GA durchgeführte Untersuchung in analoger Weise mit dem ebenfalls häufig verwendeten Fixierungsreagenz Paraformaldehyd wiederholt werden. Dazu wurden die Zellen für 30 min bei RT mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Anschließend sollte eine mikrogravimetrische Untersuchung nach dem Fixierungsschritt sowie nach einer zusätzlichen Permeabilisierung des Zelllayers durch Zugabe einer 0.2 %igen Triton-Lösung eventuelle Änderungen der mikrogravimetrischen Eigenschaften der Zellschicht zum vorher charakterisierten Zustand der vitalen Zellen aufzeigen. Parallel dazu wurde der Zelllayer mit der ECIS-Technik auf veränderte elektrische Eigenschaften untersucht.

#### **4.4.2.1 Mikrogravimetrische Untersuchung der mit Paraformaldehyd behandelten MDCK-2 Zellen**

Abbildung 4.28 zeigt den auf den inkrementellen Dämpfungswiderstand  $\Delta R_0$  der unbehandelten Zellschicht normierten Dämpfungswiderstand der manipulierten Zellschicht. Dargestellt sind die relativen Dämpfungswiderstände nach der Fixierung ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) und die nach der anschließenden Permeabilisierung ( $\Delta R_{\text{tri}} / \Delta R_0$ ). Die für die Fixierung mit GA-Lösung beobachtete drastische Erhöhung des Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  der MDCK-2 - Zellschicht wird bei Fixierung mit PFA in abgeschwächter Form bestätigt. Das Verhältnis ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) erreicht Werte zwischen 1.5 und 2.5. Im Mittel wurde eine Zunahme des Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  um einen Faktor von  $(1.95 \pm 0.08)$  bestimmt.

Die nach der Fixierung erfolgte Permeabilisierung der Zellmembran ändert den Dämpfungswiderstand analog zur Fixierung/Permeabilisierung mit der Kombination Glutardialdehyd/Triton nur wenig. Für ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) ist ein leichter Rückgang des Quotienten auf Werte zwischen 1.3 und 1.9 zu beobachten. Im Mittel liegt die nach der Tritonbehandlung verbliebene Zunahme des Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  bei einem Faktor von  $(1.62 \pm 0.06)$  bezogen auf die durchschnittliche native Zellschicht. Die Änderung der Induktivität  $L$  wird aus der weiteren Betrachtung herausgelassen, da, wie schon in 4.1.2.2 für vitale Zellschichten dargelegt wurde, sehr große Schwankungen innerhalb individueller Messreihen unter gleichen Bedingungen auftreten, die eine sinnvolle Interpretation erschweren oder unmöglich machen. Diese zur Behandlung mit Glutardialdehyd analogen Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung des Dämpfungswiderstandes kein spezieller Effekt des Glutardialdehyds ist, sondern auf die proteinvernetzenden Eigenschaften der verwendeten Reagenzien zurückgeführt werden kann.



**Abb. 4.28:** Quotienten der relativen Dämpfungswiderstände ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) und ( $\Delta R_{\text{tri}} / \Delta R_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert (graue Säulen) bzw. anschließend 5 min lang mit 0.2 %iger Triton-Lösung permeabilisiert wurden (schwarze Säulen). Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Präparation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für das mittlere Verhältnis der fixierten Zellen kann ein Wert von  $(1.95 \pm 0.08)$ , für die zusätzlich permeabilisierten Zellschichten ein Wert von  $(1.62 \pm 0.06)$  bestimmt werden ( $n = 10$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Das *crosslinking* der Zellproteine führt zu einem starren, “eingefrorenen” Proteinkorsett, das für eine höhere Energiedissipation sorgt. Der Grund für die geringere Zunahme des Dämpfungswiderstands nach Manipulation der Zellschichten mit Paraformaldehyd ist vermutlich in der Struktur des Fixierungsreagenzes zu suchen. Während GA-Moleküle eine definierte Kettenlänge aufweisen, ist die Anzahl der miteinander verknüpften PFA-Monomere in einer wässrigen Lösung deutlichen Schwankungen unterworfen. Dieser Unterschied resultiert dann eventuell auch in einer verschieden starker Vernetzung der Proteine.

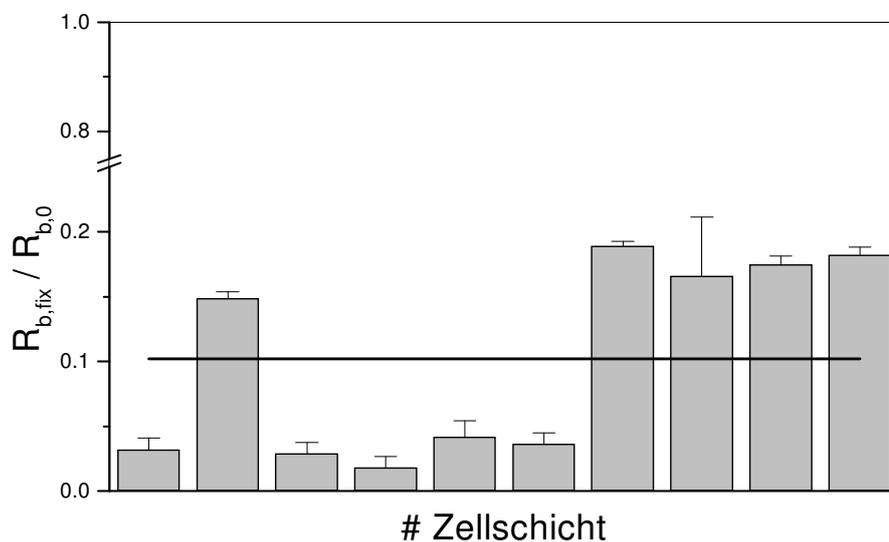
#### 4.4.2.2 Einfluß auf die elektrischen Parameter der Zellschicht

Die für die Fixierung mit Glutaraldehyd-Lösung mit Hilfe der ECIS-Methode festgestellten Änderungen der Zellmorphologie sollten auch für die Fixierung mit Paraformaldehyd untersucht werden, um ähnliche Zusammenhänge zwischen den durch die verschiedenen Präparationsmethoden ausgelösten Effekten aufzuzeigen, wie dies schon für die mikrogravimetrischen Daten dargelegt wurde.

### Einfluß auf den Parameter $R_b$

Abbildung 4.29 illustriert das für den parazellulären Widerstand  $R_b$  ermittelte Verhältnis zwischen dem fixiertem und dem nativen Zelloy (  $R_{b,fix} / R_{b,0}$  ) der einzelnen untersuchten Zellschichten. Analog zur Fixierung mit GA führt auch die Inkubation mit PFA zu einer drastischen Abnahme des parazellulären Widerstands  $R_b$ . Der Quotient  $(R_{b,fix} / R_{b,0})$  fällt auf einen Wert zwischen 0.02 und 0.2 ab. Im Mittel wurde für die fixierte Zellschicht ein Faktor von  $(0.10 \pm 0.02)$  bezogen auf den Ausgangswert bestimmt.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den für GA ermittelten Daten. Es ist also von einer ähnlichen Wirkung des Reagenzes auf die Zell-Zell-Kontakte auszugehen, wie sie für GA bestimmt werden konnte.

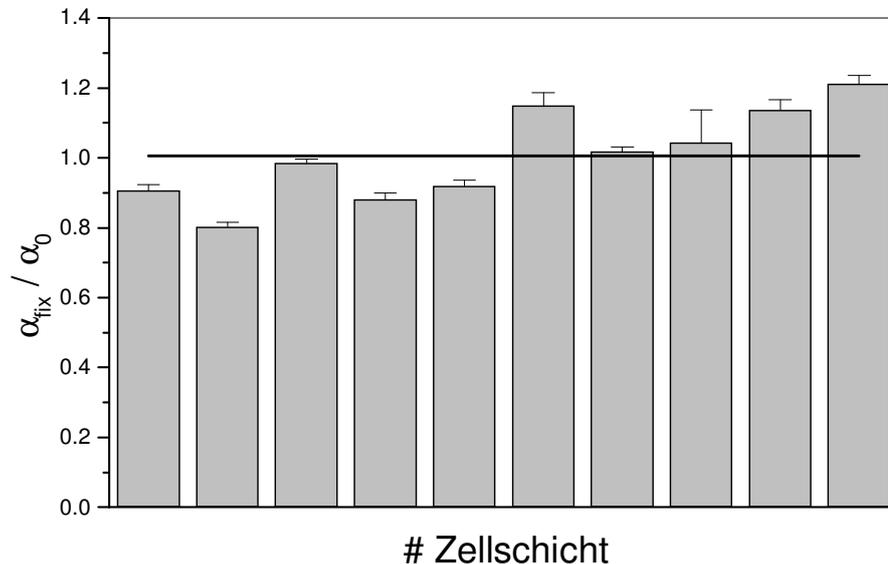


**Abb. 4.29:** Normierter parazellulärer Widerstand ( $R_{b,fix} / R_{b,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelloy bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Inkubation bestimmten Wert von  $R_b$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.10 \pm 0.02)$  bestimmt werden. ( $n = 10$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Modellierung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich.

### Einfluß auf den Zell-Substrat-Parameter $\alpha$

Abbildung 4.30 zeigt den Quotienten  $(\alpha_{fix} / \alpha_0)$  der untersuchten Zellschichten, der aus dem jeweiligen Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  eines Zelloy nach bzw. vor der Behandlung mit Paraformaldehyd errechnet wurde. Die Fixierung der Zellschicht mit PFA hat analog zu den Resultaten bei einer Fixierung mit GA keinen deutlichen Einfluß auf den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$ . Es sind nur geringfügige Ab- sowie Zunahmen zu beobachten. Das Spektrum des bestimmten Verhältnisses  $(\alpha_{fix} / \alpha_0)$  reicht von Werten von 0.8 bis zu Werten von 1.2. Im Mittel findet sich ein Wert von  $(1.01 \pm 0.04)$  und somit keine signifikante Änderung für  $\alpha$ .

Somit bleiben ebenso wie für eine Behandlung der Zellen mit GA die elektrischen und geometrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt unverändert.

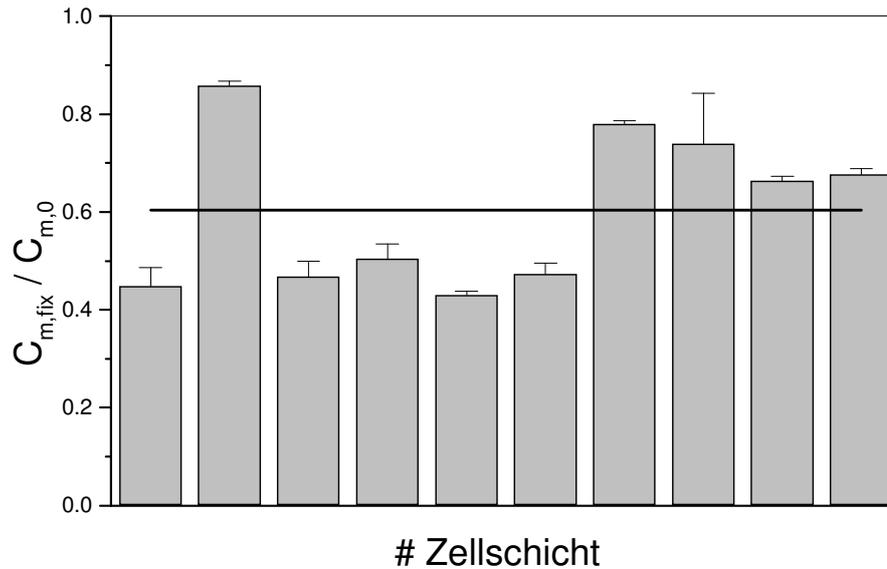


**Abb. 4.30:** Normierter Zell-Substrat-Parameter ( $\alpha_{\text{fix}} / \alpha_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 30 min in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Fixierung bestimmten Wert von  $\alpha$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.01 \pm 0.04)$  bestimmt werden ( $n = 10$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Modellierung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich.

### Einfluß auf die spezifische Membrankapazität $C_m$

Abbildung 4.31 zeigt die für die jeweils untersuchten Zelllayer aus der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  nach der PFA-Fixierung und der vor der Behandlung der Zellschicht bestimmten Quotienten ( $C_{m,\text{fix}} / C_{m,0}$ ). Die Zugabe von PFA-Lösung zu einer MDCK-2-Zellschicht führt analog zur Fixierung mit Glutaraldehyd-Lösung zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen spezifischen Membrankapazität  $C_m$ . Diese ist in Abhängigkeit vom individuell betrachteten Zelllayer allerdings unterschiedlich ausgeprägt. So lassen sich für das Verhältnis ( $C_{m,\text{fix}} / C_{m,0}$ ) Werte zwischen 0.4 und 0.8 bestimmen. Im Mittel wurde ein Faktor von  $(0.60 \pm 0.05)$  bezogen auf die Kapazität der nativen Zellschicht bestimmt.

Die Abnahme der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  liegt beim chemischen *crosslinking* mit PFA etwa in der gleichen Größenordnung, wie sie für die Inkubation der Zellen mit GA festgestellt werden konnte. Da die Absolutwerte von  $C_m$  nach dem *crosslinking* der Proteine mit PFA analog dazu noch Kapazitätswerte erreichen, die doppelt so hoch sind wie die einer ungefalteten Zellmembran ( $1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ ), kann auch hier lediglich von einer Verringerung oder Beeinträchtigung der Mikrovilli ausgegangen werden, nicht von einem vollständigen Rückgang.



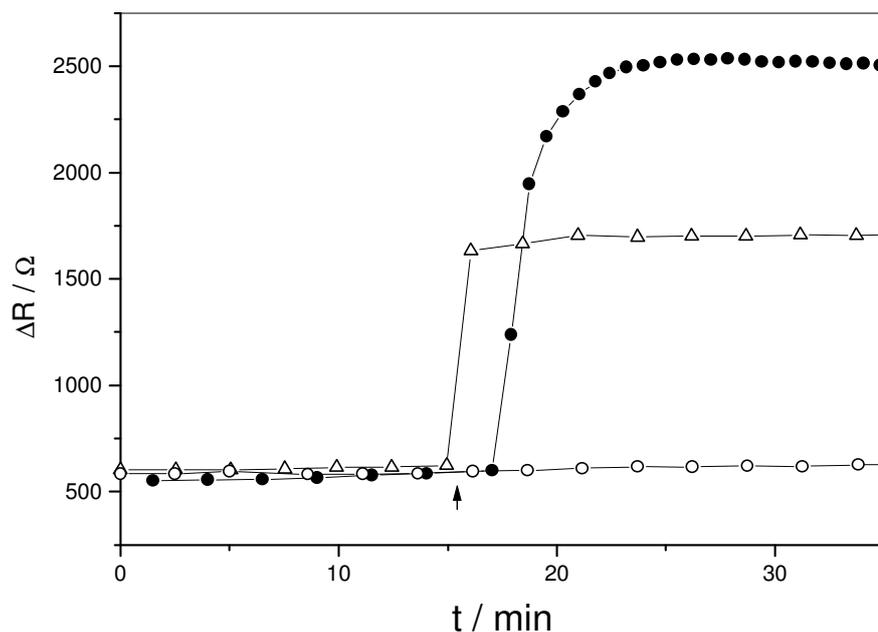
**Abb. 4.31:** Normierte spezifische Membrankapazität  $C_m$  von MDCK-2 Zellen, die 30 min mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen der nach und der vor der Fixierung bestimmten Kapazität der Zellmembran. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.60 \pm 0.05)$  bestimmt werden ( $n = 10$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). Eine sinnvolle Anpassung der nach der Permeabilisierung der Zellschicht erhaltenen Daten war nicht möglich, daher wurde darauf verzichtet.

#### 4.4.3 Zeitabhängige Untersuchung der Änderung des Dämpfungswiderstandes R eines MDCK-2-Zellayers nach der Vernetzung zellulärer Proteine mit Glutardialdehyd oder Paraformaldehyd

Um die Kinetik der Vernetzungsreaktion und des daraus resultierenden Anstiegs des Dämpfungswiderstandes näher beleuchten zu können, wurde diese auch in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dazu wurden zunächst die nativen Zellen in Phosphatpuffer impedanzspektroskopisch untersucht. Nachdem stationäre Werte für den Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  erreicht waren, wurde das entsprechende Fixans zugegeben und der Anstieg des Dämpfungswiderstands mittels Impedanzspektroskopie verfolgt, bis sich erneut ein Gleichgewicht eingestellt hatte.

Abbildung 4.32 stellt den zeitlichen Verlauf des Dämpfungswiderstandes für die Reaktion der Zellschicht mit GA und PFA sowie für eine unbehandelte Kontrolle dar. Die Zugabe von 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung zu der in Phosphatpuffer befindlichen Zellschicht führte zu einem steilen Anstieg von  $\Delta R$  (gefüllte Kreise). Ausgehend vom Dämpfungswiderstand der nativen Zellschicht mit  $500 \Omega$  wurden schon nach etwa zwei Minuten  $1000 \Omega$  erreicht, die Halbwertszeit der Reaktion  $\tau_{1/2}$  (GA) beträgt  $(170 \pm 10)$  s. Nach acht Minuten war dann ein Maximum von etwa  $2500 \Omega$  erreicht. Im weiteren Zeitverlauf ändert sich der Dämpfungswiderstand nicht mehr wesentlich. Der stationäre Maximalwert liegt in einem

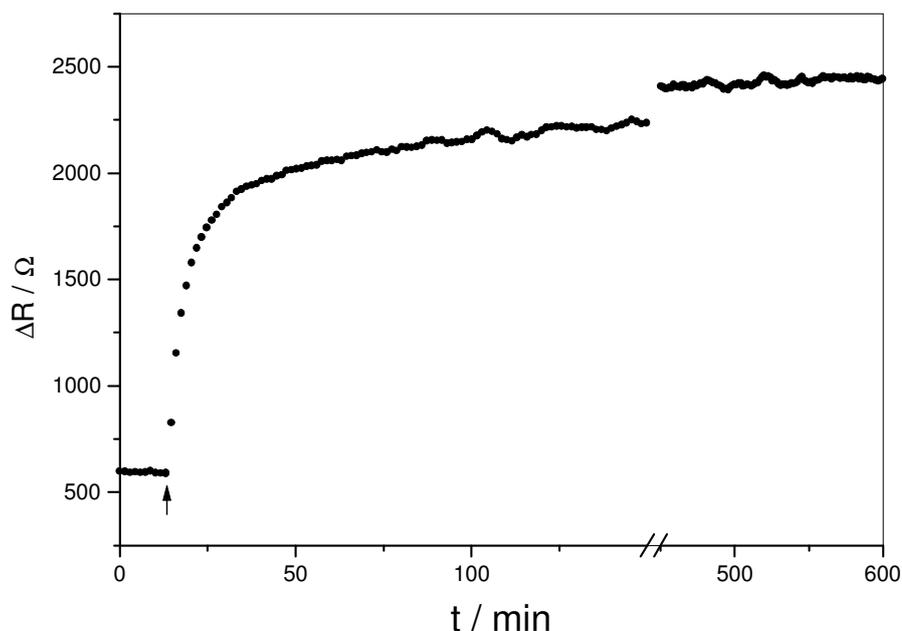
Bereich, der auch für die nicht zeitabhängigen Messungen bestimmt wurde (s. 4.4.1.1). Die Zugabe von 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (offene Dreiecke) führte ebenso wie für GA gezeigt zu einem äußerst steilen Anstieg des inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  der Zellschicht. Die Reaktion lief in diesem Fall sogar noch deutlich schneller ab, war mit dem hier eingesetzten Aufbau zeitlich nicht aufzuklären. Für eine  $\tau_{1/2}$  Berechnung reicht die zeitliche Auflösung nicht. Der Dämpfungswiderstand stieg auf einen Maximalwert von etwa 1650  $\Omega$ . Dieser Maximalwert korrespondiert gut mit den Werten, die nach 30minütiger Inkubationszeit in den zuvor geschilderten Endpunkt- Messungen bestimmt wurden (s. 4.4.2.1). Die Kontrolle (offene Kreise) sollte zeigen, dass der Anstieg des Dämpfungswiderstandes allein mit der Zugabe des entsprechenden Fixierungsreagenzes zusammenhängt und kein Phänomen des Flüssigkeitstausches darstellt. Dazu wurde der Quarz mit der MDCK-2-Zellschicht mikrogravimetrisch gegen die Zeit untersucht. Nach der Aufnahme einer Grundlinie wurde statt eines Fixierungsreagenzes nur der verwendete Phosphatpuffer zugegeben.



**Abb. 4.32:** Zeitabhängige Änderung des inkrementellen Dämpfungswiderstandes einer MDCK-2-Zellschicht nach Zugabe einer 2.5 %igen Glutardialdehyd-Lösung ( $\bullet$ ), einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung ( $\triangle$ ) sowie eines physiologischen Phosphatpuffers ( $\circ$ ). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe bei allen drei Messungen. Für den Anstieg des Dämpfungswiderstandes durch Zugabe von Glutardialdehyd-Lösung lässt sich nach Anpassung der Kurve mit einer sigmoidalen Fitfunktion (Boltzmann) folgende Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  bestimmen:  $\tau_{1/2}$  (GA) =  $(168 \pm 6)$  s. Eine  $\tau_{1/2}$  Berechnung wurde für PFA aufgrund der mangelnden zeitlichen Auflösung nicht durchgeführt.

Dies führte zu keiner sichtbaren Änderung des inkrementellen Dämpfungswiderstandes der Zellschicht, der Wert für  $\Delta R$  bleibt nahezu konstant bei 600  $\Omega$ .

Um die Änderung des Dämpfungswiderstands allein auf die Vernetzung zellulärer Proteine zurückführen und eine Beteiligung anderer Prozesse ausschließen zu können, wird die Reaktion der Fixierungsreagenzien mit dem entsprechenden Zelllayer auf ihre Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Kann aus diesen Untersuchungen eine deutlich langsamere Kinetik, aber ein vergleichbarer Dämpfungswiderstand nach Abschluß der Reaktion bestimmt werden, so ist nur die chemische Vernetzung der Proteinbestandteile für die Änderung des Dämpfungswiderstands verantwortlich. Daher wurde am Beispiel der Fixierung mit GA untersucht, ob eine zehnfach niedrigere Konzentration eine andere Reaktionsgeschwindigkeit hervorruft und ob vergleichbare Gesamtänderungen des Dämpfungswiderstandes nach Erreichen eines stationären Zustands beobachtet werden können. Die Messungen wurden analog zu Kapitel 4.4.3 durchgeführt. Abbildung 4.33 zeigt die Änderung des Dämpfungswiderstands gegen die Zeit.



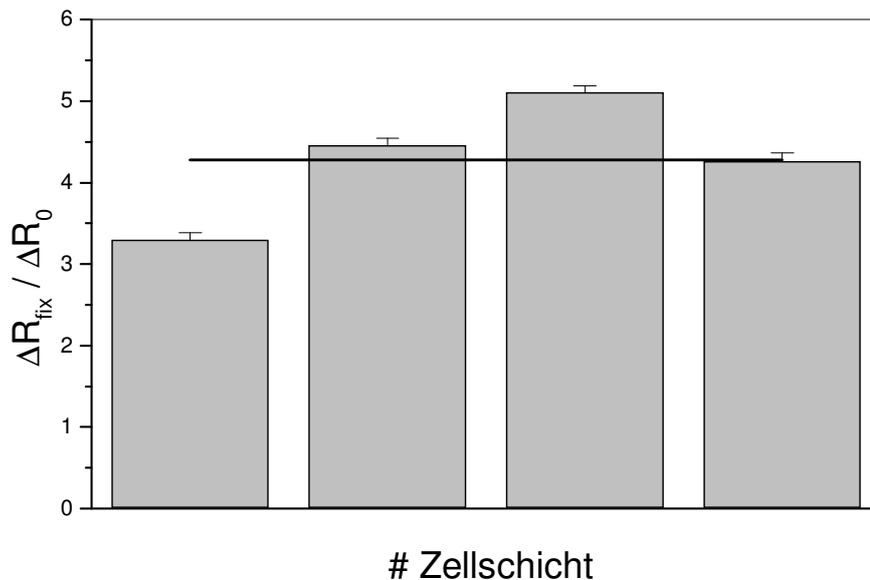
**Abb. 4.33:** Zeitabhängige Änderung des Dämpfungswiderstandes bei Fixierung eines MDCK-2-Zelllayers mit 0.25 %iger Glutardialdehyd-Lösung. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe. Für den Anstieg des Dämpfungswiderstandes durch Zugabe des Fixierungsreagenzes lässt sich nach Anpassung der Kurven mit einer sigmoidalen Fitfunktion (Boltzmann) folgende Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  bestimmen:  $\tau_{1/2}$  (0.25 % GA) = (690 ± 40) s.

Nach Zugabe der 0.25 %igen Glutardialdehyd-Lösung kann hier ebenfalls ein deutlicher Anstieg des Dämpfungswiderstandes gemessen werden. Die Steigung der Kurve ist allerdings deutlich geringer. So nimmt der Dämpfungswiderstand von einem Wert von  $\Delta R = 600 \Omega$  innerhalb der ersten drei Minuten auf ungefähr das Doppelte zu und erreicht erst nach mehr als einer halben Stunde einen Wert von ungefähr  $2000 \Omega$ . Die Steigung lässt danach deutlich

nach, ohne dass innerhalb von kurzer Zeit eine Sättigung erreicht wird. Erst nach etwa 10 Stunden wurde ein konstanter inkrementeller Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  von etwa  $2400 \Omega$  gemessen. Offensichtlich werden im Vergleich zur Fixierung mit 2.5 %iger GA-Lösung nach vollständiger Abreaktion ähnliche Dämpfungswiderstände erreicht, allerdings erst nach einer deutlich verlängerten Reaktionszeit. Diese Experimente legen die Schlußfolgerung nahe, dass die QCM ausschließlich die Vernetzung der zellulären Proteine und keine unspezifischen Nebenreaktionen erfasst.

#### 4.4.4 Unabhängigkeit des chemisch induzierten Dämpfungswiderstandsanstiegs vom Zelltyp

Um zu beleuchten, inwiefern der Anstieg des Dämpfungswiderstands nach Zugabe der Vernetzungsreagenzien vom Zelltyp abhängt, wurde eine weitere Zelllinie



**Abb. 4.34:** Quotienten des relativen Dämpfungswiderstands ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) von NRK-Zellen, die 30 min lang mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung fixiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen NRK-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Präparation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(4.3 \pm 0.4)$  bestimmt werden ( $n = 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

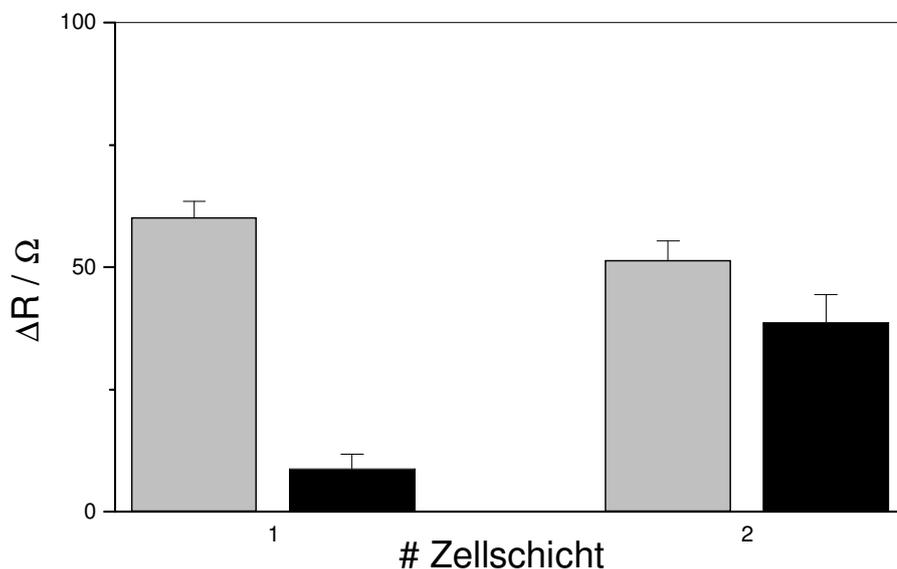
mikrogravimetrisch in nativem und fixiertem Zustand untersucht. Die Fixierung wurde mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung durchgeführt und danach das Verhältnis der inkrementellen Dämpfungswiderstände der nativen und der fixierten Zellschicht ( $\Delta R_{\text{fix}} / \Delta R_0$ ) gebildet. Abbildung 4.34 stellt diesen Quotienten für vier individuelle Zellschichten dar. Die Fixierung führt auch im Falle von NRK-Zellen zu einem signifikanten Anstieg des zellulären Dämpfungswiderstandes. Dieser wurde um das drei- bis

fünffache erhöht, im Mittel konnte ein Anstieg um einen Faktor von  $(4.3 \pm 0.4)$  bestimmt werden. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des für MDCK-2 Zellen bestimmten Faktors von  $(5.4 \pm 0.9)$  (s. 4.4.1.1).

Da eine Vernetzung der zellulären Proteine von NRK-Zellen mit GA zu einer vergleichbaren Erhöhung des Dämpfungswiderstands führt, wie dies für MDCK-2 Zellen festgestellt wurde, ist diese Reaktion offensichtlich vom Zelltyp unabhängig.

#### 4.4.5 Einfluß der Vernetzung einer reinen Proteinschicht auf den Dämpfungswiderstand R

Um zu hinterfragen, inwieweit der gemessene Anstieg des Dämpfungswiderstandes auf eine Vernetzung der sich direkt an der Quarzoberfläche befindlichen Proteinschicht der extrazellulären Matrix (ECM) zurückzuführen ist, wurde eine definiert auf Quarze aufgebraute Gelatineschicht mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung fixiert. Eine mikrogravimetrische Untersuchung der Proteinschicht vor und nach der chemischen Vernetzung sollte den Einfluß ECM auf die Dämpfungswiderstandsänderungen fixierter Zellen aufklären.



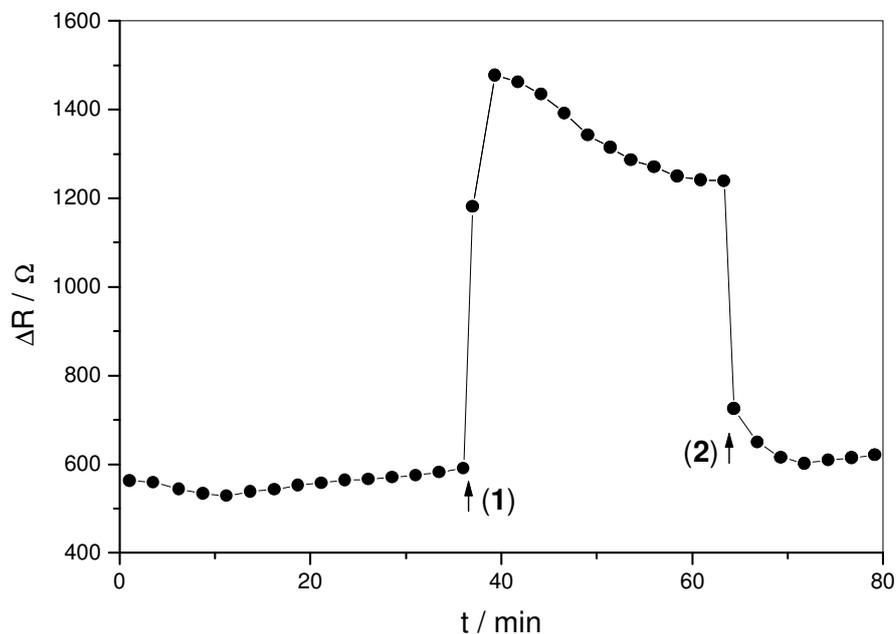
**Abb. 4.35:** Inkrementeller Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  von Gelatineschichten, die durch eine 90-minütige Inkubation einer 0.5 %igen Gelatinelösung auf den jeweiligen Quarz aufgebracht wurden (graue Säulen) sowie derselben Proteinschichten nach einer 30 minütigen Fixierung mit 2.5 %iger Glutardialdehyd-Lösung (schwarze Säulen).

Abbildung 4.35 stellt die auf die Proteinschichten zurückzuführenden Änderungen des Dämpfungswiderstands vor und nach der Vernetzung mit GA dar.

Die untersuchten nativen Proteinschichten zeigen generell nur sehr geringe Dämpfungswiderstände von maximal  $50 \Omega$ . Nach der Fixierung kommt es zu keiner Erhöhung des Dämpfungswiderstandes. Die beobachteten Änderungen senken den Betrag von  $\Delta R$  offenbar sogar leicht. Offensichtlich verändert die chemische Vernetzung die Proteine derart, dass sie deutlich rigider und ihre schon vorher geringen viskoelastischen Eigenschaften weiter reduziert werden. Der Grund für die drastische Erhöhung des Dämpfungswiderstandes fixierter Zellen steht also nicht mit einer Vernetzung der extrazellulären Matrix in Zusammenhang.

#### 4.4.6 Osmotischer Einfluß von Glutardialdehyd auf die Zellschicht

Da Wegener et al. (2000) zeigen konnten, dass hyperosmolare Medien zu einem starken Anstieg des Dämpfungswiderstands von MDCK-2 Zellen führen können, wurde eine der Glutardialdehyd-Lösung äquimolare Saccharose-Lösung (250 mM) auf MDCK-2 Zellen gegeben und die resultierende Änderung des Dämpfungswiderstandes mikrogravimetrisch verfolgt. Dies sollte einen nur auf die Osmolaritätsverschiebung, die durch den Zusatz von GA zum Puffer hervorgerufen wird, beruhenden Effekt ausschließen.



**Abb. 4.36:** Zeitabhängige Änderung des Dämpfungswiderstands  $\Delta R$  nach Zugabe einer 250 mM Saccharose-Lösung (1) bzw. nach Austausch der Lösung gegen herkömmlichen isotonischen Phosphatpuffer (2). Die Pfeile markieren die Zugabe der Saccharoselösung bzw. die Umstellung auf isotonischen Phosphatpuffer.

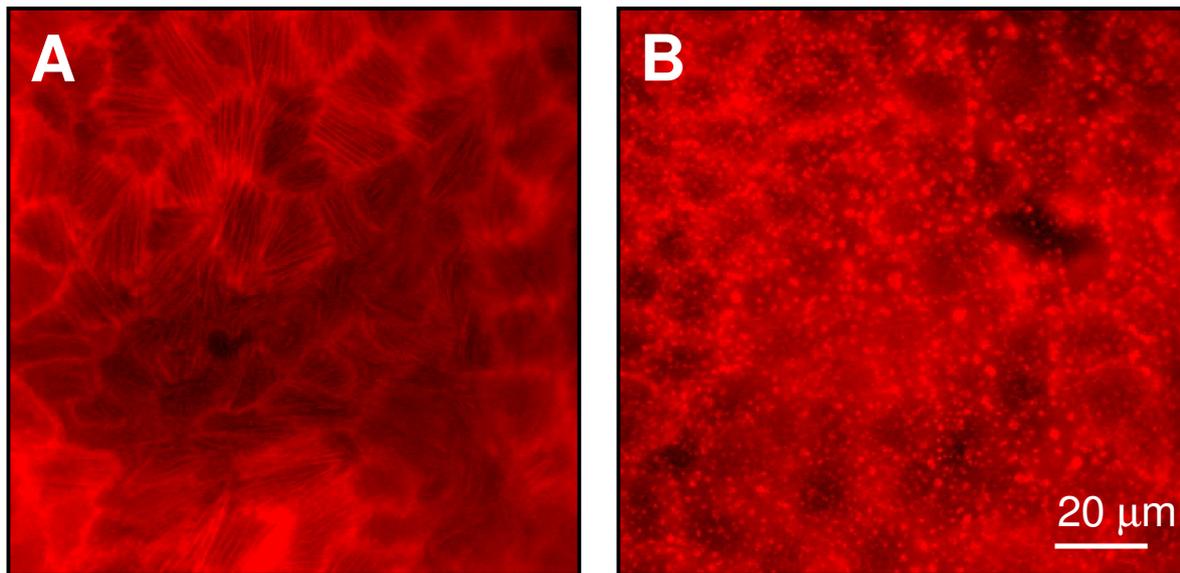
Abbildung 4.36 zeigt die Änderung des Dämpfungswiderstands  $\Delta R$  als Funktion der Zeit. Die Zugabe der Saccharose-Lösung erfolgte nach einer Äquilibrierungsphase und führte zu einem

sofortigem steilen Anstieg des Dämpfungswiderstandes, der innerhalb von zwei Minuten einen Maximalwert von etwa 1500  $\Omega$  erreicht. Anschließend fällt  $\Delta R$  innerhalb von etwa 20 Minuten um ungefähr 200  $\Omega$  ab. Um die Reversibilität dieses Effektes zu überprüfen, wie sie von Wegener et al. festgestellt wurde, wurde das hyperosmolare Medium dann wieder gegen einen isotonischen Phosphatpuffer ausgetauscht. Der Dämpfungswiderstand fiel sofort sehr deutlich auf einen Wert um 700  $\Omega$  ab, nach weiteren 20 min wurde der Ausgangswert zu Beginn der Messung wieder erreicht. Die Zunahme des Dämpfungswiderstandes zeigt zunächst, dass möglicherweise ein gewisser Teil der durch das Vernetzungsreagenz induzierten Änderungen des viskoelastischen Verhaltens auf eine Verschiebung der Osmolarität zurückgeführt werden kann. Allerdings liegen die hier bestimmten  $\Delta R$  mindestens um den Faktor zwei unter denen, die für eine Vernetzung zellulärer Proteine mit Glutardialdehyd gemessen wurden. Zusätzlich ist der durch das Fixans ausgelöste Effekt in keinsten Weise reversibel. Ein fixierter Zellschicht zeigt auch bei einem Austausch der über dem Zellschicht befindlichen Reaktionslösung gegen Zellkulturmedium keine Anzeichen einer Rückkehr zum Ausgangszustand. Auch die Tatsache, dass verdünnte GA-Lösung die gleiche Änderung des Dämpfungswiderstands hervorruft, die Reaktion aber deutlich langsamer stattfindet, kann mit einer auf der Osmolaritätsverschiebung beruhenden Begründung nicht erklärt werden. Zudem muss beachtet werden, dass GA offensichtlich ein zellpermeables Reagenz ist und somit deutlich weniger Einfluß auf das Zellvolumen nimmt als die hier als Osmolyt verwendete Saccharose.

#### **4.4.7 Einfluß der Vernetzungsreaktion auf das Aktin-Cytoskelett**

Da die Zunahme des Dämpfungswiderstandes offensichtlich nicht mit einer Quervernetzung der unter den Zellen befindlichen extrazellulären Matrix (s. 4.4.5) und höchstens zu einem sehr geringem Teil mit einem osmotischen Einfluss des Glutardialdehyds (s. 4.4.6) erklärt werden kann, müssen andere zelluläre Komponenten die durch die chemische Manipulation induzierten Veränderungen der viskoelastischen Eigenschaften der Zellschicht hervorrufen. So konnten Wegener et al. (2000) zeigen, dass das Aktincytoskelett, das den gesamten Zellkörper in Form eines Aktincortex umgibt, sie in Form von Stressfasern durchzieht und über die Fokalkontakte an das Substrat anbindet, an dem Gesamtbetrag des Dämpfungswiderstandes beteiligt ist. Dies wurde über eine selektive Zerstörung des Aktincytoskeletts mit Cytochalasin D nachgewiesen, die zu einer Abnahme des inkrementellen Dämpfungswiderstandes um etwa ein viertel des Ausgangswertes führt.

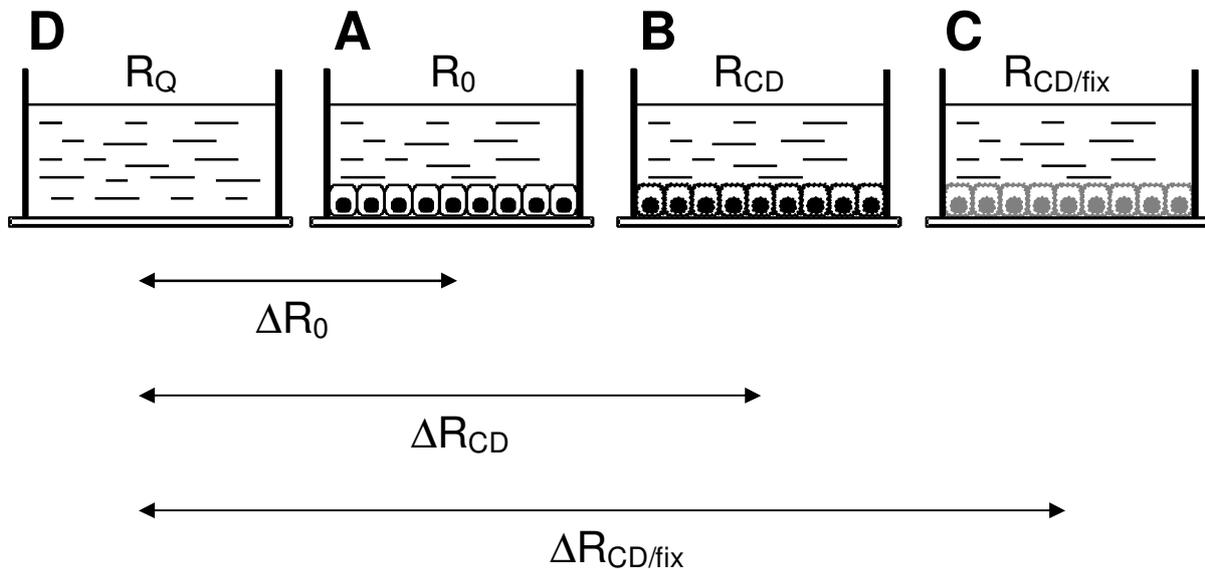
Die Phalloidin-Färbung des Aktincytoskeletts in Abbildung 4.37 verdeutlicht die Auswirkungen des durch das Cytochalasin D hervorgerufenen Abbaus von f-Aktin. Abbildung 4.37 **A** zeigt das Aktincytoskelett unbehandelter MDCK-2 Zellen. Neben den um die einzelnen Zellkörper laufenden Aktिंगürtel kann man besonders gut die innerhalb der Zellen parallel verlaufenden Stressfasern erkennen, die den Kontakt zum Adhäsionsbereich herstellen.



**Abb. 4.37:** Anfärbung des Cytoskeletts von MDCK-2 Zellen mit TRITC-Phalloidin. **A** Aktincytoskelett unbehandelter MDCK-2 Zellen. Insbesondere die Stressfasern, die parallel zueinander innerhalb der einzelnen Zellen verlaufen, lassen sich deutlich erkennen. **B** Aktincytoskelett von MDCK-2 Zellen, die zuvor 2 h lang mit 5 µM Cytochalasin D behandelt wurden. Es sind nur noch punktförmige Aktinaggregate vorhanden.

Eine zweistündige Inkubation der Zellen mit Cytochalasin D zerstört diese Strukturen vollständig. Abbildung 4.37 **B** illustriert die Situation nach der Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D und zeigt, dass nur noch einzelne angefärbte Aktinaggregate vorhanden sind. Diese experimentellen Erkenntnisse wurden nun benutzt, um zu überprüfen, inwieweit die chemische Veränderung des Aktincytoskeletts durch das Fixierungsreagenz zu einer Änderung der mechanischen Eigenschaften der Zellschicht beiträgt. Abbildung 4.38 macht die experimentelle Vorgehensweise sowie die spätere Darstellung der relativen Änderungen des Dämpfungswiderstandes deutlich. Die auf den Quarzen kultivierten Zellschichten wurden zuerst mikrogravimetrisch (4.38 **A**) untersucht und anschließend für 2 h bei 37° C mit einer 5 µM Cytochalasin D-Lösung inkubiert (4.38 **B**). Nach einer erneuten Charakterisierung der Zellschichten mit der QCM wurden diese dann mit 2.5 %iger Glutaraldehyd-Lösung für 30 min bei RT fixiert (4.38 **C**) und der Effekt dieser Fixierung auf die nun im wesentlichen f-aktinfreien Zellen mikrogravimetrisch gemessen. So wurden für die nacheinander vorgenommenen Präparationsschritte absolute Werte für den Dämpfungswiderstand bestimmt ( $R_0$ ,  $R_{CD}$  und  $R_{CD/fix}$ ), von denen anschließend der Wert des mechanisch gereinigten Quarzes

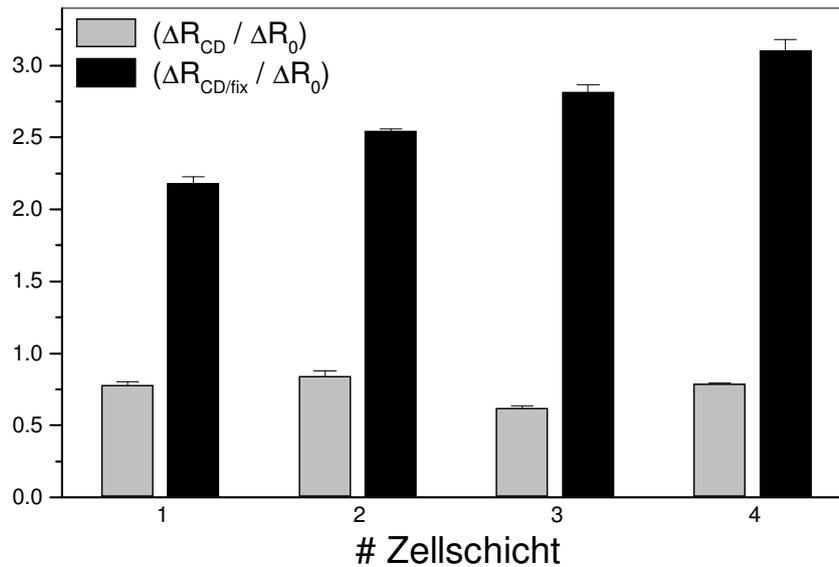
$R_Q$  (Abb. 4.38 D) subtrahiert wird. Die sich hieraus ergebenden Parameter  $\Delta R_0$ ,  $\Delta R_{CD}$  sowie  $\Delta R_{CD/fix}$  bilden dann die Grundlage für die relativen Änderungen des Dämpfungswiderstandes nach Inkubation mit Cytochalasin D bzw. nach Inkubation mit Cytochalasin D und anschließender Fixierung. Um eine einfachere und von der Streuung der einzelnen inkrementellen Dämpfungswiderstände  $\Delta R_0$  der nativen Zellschichten unabhängige



**Abb. 4.38:** Schematische Darstellung der einzelnen Präparationsschritte und der jeweils daraus gewonnenen normalisierten Parameter  $\Delta R_0$ ,  $\Delta R_{CD}$  und  $\Delta R_{CD/fix}$ .

Darstellung der Ergebnisse anhand von Faktoren zu ermöglichen, werden die Werte von  $\Delta R_{CD}$  und  $\Delta R_{CD/fix}$  durch  $\Delta R_0$  geteilt. Die Quotienten  $(\Delta R_{CD} / \Delta R_0)$  und  $(\Delta R_{CD/fix} / \Delta R_0)$  werden in Abbildung 4.39 dargestellt.

Der inkrementelle Dämpfungswiderstand der Zellschicht sinkt nach der Inkubation mit Cytochalasin D im Mittel auf etwa drei Viertel des Wertes für den unbehandelten Zelllayer. Eine anschließende Fixierung der aktinmanipulierten Zellschichten lässt einen deutlichen Anstieg des Dämpfungswiderstandes erkennen. Allerdings werden im Vergleich zu der Untersuchung nativer Zellschichten nur maximal dreimal höhere Dämpfungswiderstände gefunden. Im Mittel kann eine Zunahme von  $\Delta R$  um den Faktor  $(2.7 \pm 0.2)$  bestimmt werden. Dies ist nur die Hälfte des für Zellschichten mit intaktem Aktincytoskelett gefundenen Wertes  $((5.4 \pm 0.9)$ , s. 4.4.1.1). Das deutet darauf hin, dass die Zunahme des Dämpfungswiderstandes zu einem großen Teil auf die chemische Vernetzung des Aktincytoskeletts durch die Fixierungsreagenzien zurückgeführt werden kann. Da aber durch die Behandlung der Zellen



**Abb. 4.39:** Quotienten der relativen Dämpfungswiderstände ( $\Delta R_{CD} / \Delta R_0$ ) und ( $\Delta R_{CD/fix} / \Delta R_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h mit 5  $\mu$ M Cytochalasin D inkubiert (graue Säulen) bzw. danach noch mit 2.5 % GA fixiert wurden (schwarze Säulen). Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Präparation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für die nur mit Cytochalasin D inkubierten Zellen kann für dieses Verhältnis ein Mittelwert von  $(0.76 \pm 0.05)$  bestimmt werden. Die zusätzlich noch fixierten Zellschichten weisen ein mittleres Verhältnis von  $(2.7 \pm 0.2)$  auf. ( $n = 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

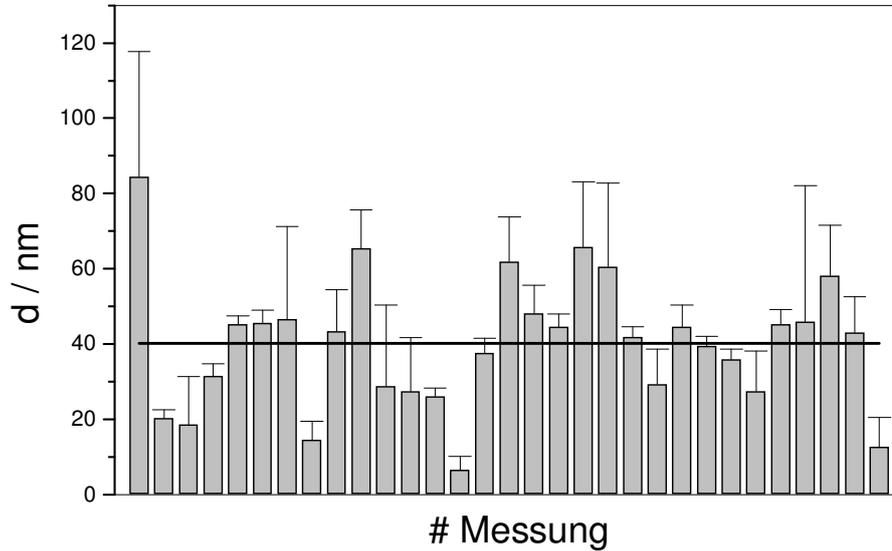
mit Cytochalasin D nicht der gesamte Effekt der Proteinvernetzung aufgehoben werden konnte, sind vermutlich noch weitere Komponenten an der Erhöhung des Dämpfungswiderstands beteiligt. Insbesondere die Vernetzung der membranständigen Proteine und andere Komponenten aus dem Cytoskelett könnten hier eine Rolle spielen.

#### 4.4.8 Einfluß der Proteinvernetzung mit Paraformaldehyd auf den Zell-Substrat-Abstand von MDCK-2 Zellen

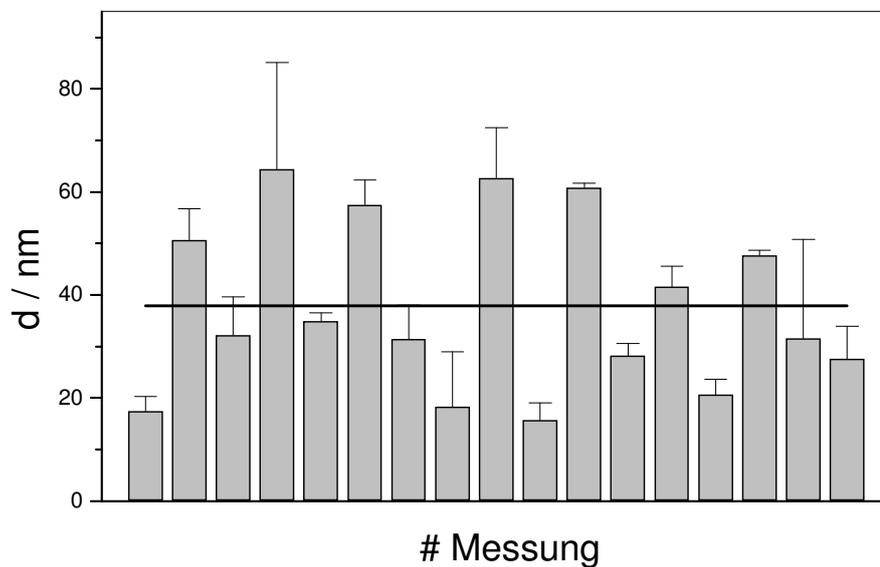
Es sollte überprüft werden, inwiefern sich der Abstand von MDCK-2 Zellen vom Substrat durch eine Fixierung ändert. Dies sollte Erklärungsansätze für die zuvor schon bestimmten Änderungen der elektrischen bzw. mikrogravimetrischen Parameter erlauben. Das Experiment konnte ausschließlich mit Paraformaldehyd als Vernetzungsreagenz durchgeführt werden, da eine Fixierung mit Glutardialdehyd zur Autofluoreszenz der Probe in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen führt (Ergebnisse nicht gezeigt; Tagliaferro et al., 1997) und dies eine Analyse der Zellschicht mit Hilfe der FLIC-Mikroskopie unmöglich macht.

Abbildung 4.40 zeigt die gesamte Population untersuchter Zellen, die mit Paraformaldehyd fixiert wurden. Im Einzelnen können Werte für  $d$  im Bereich von über 80 nm bis zu weniger als 10 nm gefunden werden. Im Mittel findet sich ein Wert von  $d = (40.2 \pm 3.1)$  nm. Die Daten für eine unbehandelte Kontrolle sind in Abbildung 4.41 abgebildet. Hier wurden

nichtbehandelte MDCK-2 Zellen untersucht, die unter identischen Bedingungen ausgesät und kultiviert worden sind. Es konnten minimale Abstände von 20 nm und maximale Abstände



**Abb. 4.40:** Darstellung des Zell-Substrat-Abstandes  $d$  von MDCK-2 Zellen, die mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden. Die durchgezogene Linie markiert den für diese Population bestimmten mittleren Abstand  $d = (40.2 \pm 3.1)$  nm ( $n = 31$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

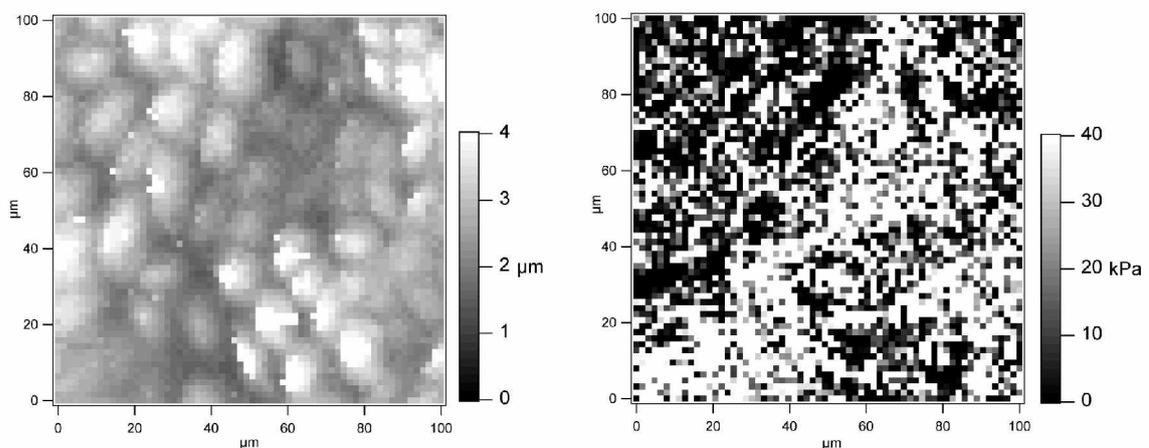


**Abb. 4.41:** Zell-Substrat-Abstand  $d$  von MDCK-2 Zellen, die nicht fixiert wurden. Die durchgezogene Linie markiert den für diese Population bestimmten mittleren Abstand  $d = (37.9 \pm 4.0)$  nm ( $n = 17$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

von deutlich über 60 nm gemessen werden. Der Mittelwert wurde zu  $d = (37.9 \pm 4.0)$  nm bestimmt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Zell-Substrat-Abstand von fixierten und nativen MDCK-2 Zellen. Dies korreliert mit den schon vorher dargelegten Messungen der elektrischen Parameter, die nachweisen konnten, dass eine Fixierung mit PFA oder GA den Wert des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  nicht verändert. Der Anstieg des Dämpfungswiderstands ist somit nicht mit einer Änderung des Zell-Substrat-Abstands verbunden, sondern wird von den mechanischen Eigenschaften der unteren Membran bestimmt, die maßgeblich vom Proteingerüst der Zelle bestimmt ist.

#### 4.4.9 Untersuchung der Elastizitäten nativer und fixierter MDCK-2 Zellen mittels *atomic force microscopy* (AFM)

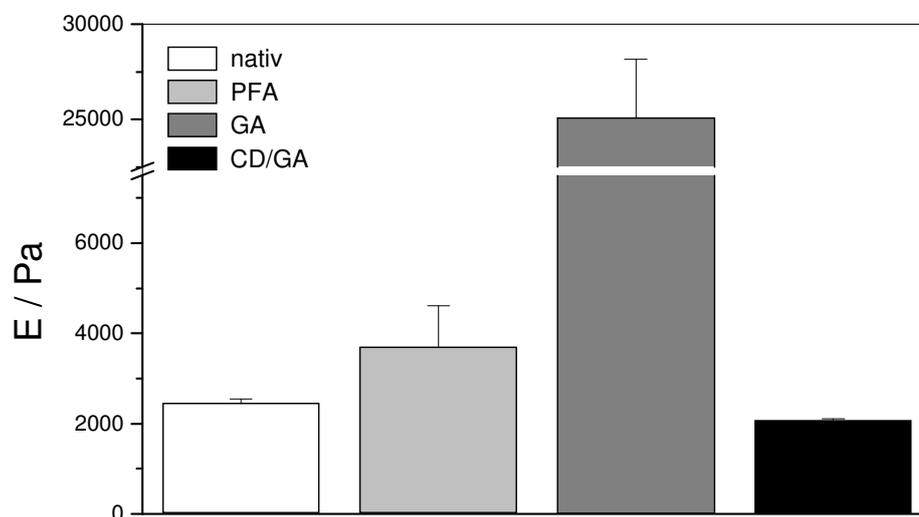
Der durch die Fixierungsreagenzien hervorgerufene Anstieg des Dämpfungswiderstandes ist nach den bislang vorgestellten Untersuchungen auf eine chemische Vernetzung der Zellen zurückzuführen. Zur Quantifizierung dieser Veränderungen mit einer unabhängigen Methode wird die AFM-Technik verwandt. Diese wird standardmässig eingesetzt, um mechanische Eigenschaften von Zellen zu bestimmen. So ist es möglich die Elastizität einer Zellschicht durch AFM-Messungen zu quantifizieren, indem sogenannte Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet werden. Aus diesen Messungen erhält man direkt einen Wert für das Elastizitätsmodul, ein Maß dafür wie stark sich ein Material unter einer applizierter Kraft deformieren lässt. Es wurden AFM-basierte Elastizitätsmessungen an nativen, mit PFA fixierten und mit GA fixierten MDCK-2 Zellen durchgeführt. Außerdem wurde untersucht,



**Abb. 4.42:** **A** Höhenbild von MDCK-2 Zellen, das aus Kraftabstandskurven abgeleitet wurde. **B** Elastizitätskarte der MDCK-2 Zellen. Dunkle Bereiche kennzeichnen Regionen mit niedrigem Elastizitätsmodul, helle Bereiche Areale mit hohem Elastizitätsmodul. Die Bilder wurden aus 64 x 64 Kraftabstandskurven in einem Bereich von 100 x 100  $\mu\text{m}$  errechnet.

wie sich das Elastizitätsverhalten GA-fixierter Zellen ändert, wenn man diese vor der Fixierung für 2 h mit 5  $\mu$ M Cytochalasin D-Lösung behandelt. Abbildung 4.42 **A** zeigt exemplarisch ein Höhenbild von MDCK-2 Zellen, das aus den Elastizitätsmessungen abgeleitet wurde. Die Daten wurden aus 64 x 64 Kraftabstandskurven errechnet. Abbildung 4.42 **B** stellt die Elastizitätskarte desselben Ausschnitts dar. Helle Bereiche kennzeichnen Regionen mit hohem Elastizitätsmodulus, dunkle Bereiche zeigen einen niedrigen Wert für den Elastizitätsmodulus an.

Abbildung 4.43 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. MDCK-2 Zellen weisen in nativer Form einen mittleren Elastizitätsmodulus von  $(2500 \pm 100)$  Pa auf. Die Fixierung mit Paraformaldehyd führt zu einem kleinen, aber signifikanten Anstieg auf  $(3700 \pm 900)$  Pa. Dagegen zeigt eine Fixierung mit Glutardialdehyd unter gleichen Bedingungen einen drastischen Anstieg des Elastizitätsmoduls auf  $(25000 \pm 3100)$  Pa. Eine selektive Zerstörung des Aktincytoskeletts (s. 4.4.7) mit Cytochalasin D vor der Fixierung mit Glutardialdehyd inhibiert diesen Anstieg vollständig. Es kann nur noch ein Elastizitätsmodul in der Größenordnung nativer Zellen gemessen werden ( $E = (2100 \pm 100)$  Pa). Der Elastizitätsmodulus von MDCK-2 Zellen, die ohne anschließende chemische Vernetzung nur mit Cytochalasin D behandelt worden waren, war nicht messbar.



**Abb. 4.43:** Elastizitätsmodule von MDCK-2 Zellen, wie sie aus Kraft-Abstands-Kurven ermittelt wurden. Für native MDCK-2 Zellen kann ein Wert für E von  $(2500 \pm 100)$  Pa, für PFA-fixierte MDCK-2 Zellen ein Wert von  $(3700 \pm 900)$  Pa und für GA-fixierte Zellen ein Wert für E von  $(25000 \pm 3100)$  Pa bestimmt werden. Für MDCK-2 Zellen, die zuerst 2 h lang mit 5  $\mu$ M Cytochalasin D behandelt und dann mit 2.5 % Glutardialdehyd fixiert wurden, konnte ein Elastizitätsmodul von  $(2100 \pm 100)$  Pa gefunden werden. (n = 2; Mittelwert  $\pm$  SDM)

Diese Ergebnisse bestätigen die schon mit der QCM (s. 4.4.1.1) festgestellte Beteiligung des Aktincytoskeletts an der durch die chemische Vernetzung induzierten „Versteifung“ des

Zelllayers. Sobald ein großer Anteil des f-Aktins innerhalb der Zellen zerstört ist, kann eine chemische Manipulation durch GA oder PFA die viskoelastischen Eigenschaften der Zellschicht nicht mehr verändern.

#### **4.4.10 Einfluß von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die elektrischen und mikrogravimetrischen Parameter einer konfluenten MDCK-2-Zellschicht**

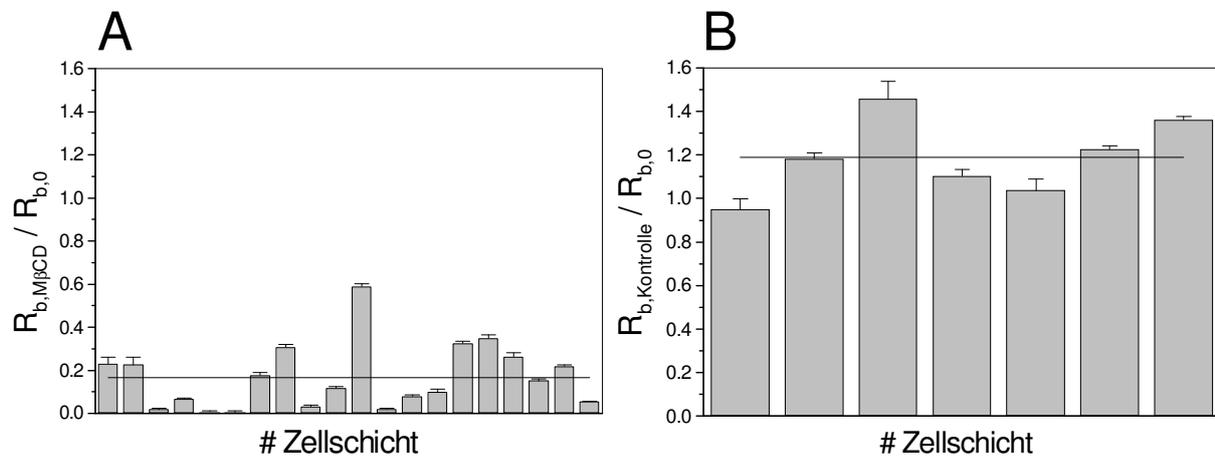
Die Behandlung der Zellen mit den *crosslinking*-Reagenzien PFA und GA führt sowohl zu einer Vernetzung der cytoplasmatischen wie auch der membranständigen Proteine. Um Rückschlüsse auf den Einfluss dieser chemischen Manipulation auf die Zellmembran ziehen zu können, soll nun untersucht werden, inwiefern eine Veränderung der Lipidkomposition der Membran einen Einfluss auf den Dämpfungswiderstand ausübt. Die Membranfluidität in Säugetierzellen wird maßgeblich vom Gehalt des Cholesterins in der Membran gesteuert. Eine Änderung von dessen Konzentration sollte somit mit einer Änderung der Membranfluidität und gegebenenfalls auch der Membranelastizität einhergehen, die sich möglicherweise impedanzspektroskopisch nachweisen lässt. Eine Möglichkeit den Gehalt von Cholesterin in der Membran einer lebenden Zelle zu verringern, ist die Verwendung von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD). Bei Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin handelt es sich um ein cyclisches Oligosaccharid, das Cholesterin in einem unpolarem Hohlraum bindet und es dadurch aktiv aus der Zellmembran entfernt, ohne in diese einzudringen (Pitha et al., 1988; Ohtani et al., 1989). Die durch eine zweistündige Inkubation von MDCK-2 Zellen mit 20 mM M $\beta$ CD-Lösung ausgelösten Effekte auf die viskoelastischen und die elektrischen Eigenschaften der Zellschicht wurden untersucht.

##### **4.4.10.1 Einfluß von M $\beta$ CD auf die elektrischen Parameter der Zellschicht**

###### **Parazellulärer Widerstand $R_b$**

Abbildung 4.44 A stellt die relativen Auswirkungen der Inkubation mit M $\beta$ CD auf den parazellulären Widerstand  $R_b$  dar. Betrachtet wird das Verhältnis zwischen  $R_{b,M\beta CD}$  und dem jeweiligen Ausgangswert der Zellschicht  $R_{b,0}$ . Der Cholesterinentzug führt zu einer deutlichen Abnahme des parazellulären Widerstandes. Der individuelle Rückgang von  $R_b$  weist für die einzelnen untersuchten Zellschichten allerdings große Unterschiede auf. So konnten für den Quotienten ( $R_{b,M\beta CD} / R_{b,0}$ ) Werte zwischen 0.01 und 0.4 bestimmt werden. Im Mittel geht der parazelluläre Widerstand durch die Behandlung mit M $\beta$ CD auf einen Faktor von  $(0.17 \pm 0.03)$  bezogen auf den Ausgangswert  $R_{b,0}$  zurück. Um diese Abnahme spezifisch auf die Zugabe von M $\beta$ CD zurückführen zu können, wurden parallel Zellschichten untersucht, die für 2 h in

dem verwendeten glucosehaltigen Puffer ohne M $\beta$ CD inkubiert wurden. Die in Abbildung 4.44 **B** gezeigte Kontrollmessung lässt auch hier eine Streuung des parazellulären Widerstandes erkennen. Gemessen wurden allerdings fast ausschließlich Zunahmen des Widerstandswertes. In Einzelfällen war dieser um einen Faktor von 1.45 bezogen auf den



**Abb. 4.44:** **A** Relativer parazellulärer Widerstand ( $R_{b,M\beta CD} / R_{b,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer mit 20 mM M $\beta$ CD inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Inkubation bestimmten Wert von  $R_b$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.17 \pm 0.03)$  bestimmt werden. ( $n = 20$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). **B** Relativer parazellulärer Widerstand ( $R_{b,Kontrolle} / R_{b,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Inkubation bestimmten Wert von  $R_b$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.19 \pm 0.07)$  bestimmt werden ( $n = 7$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

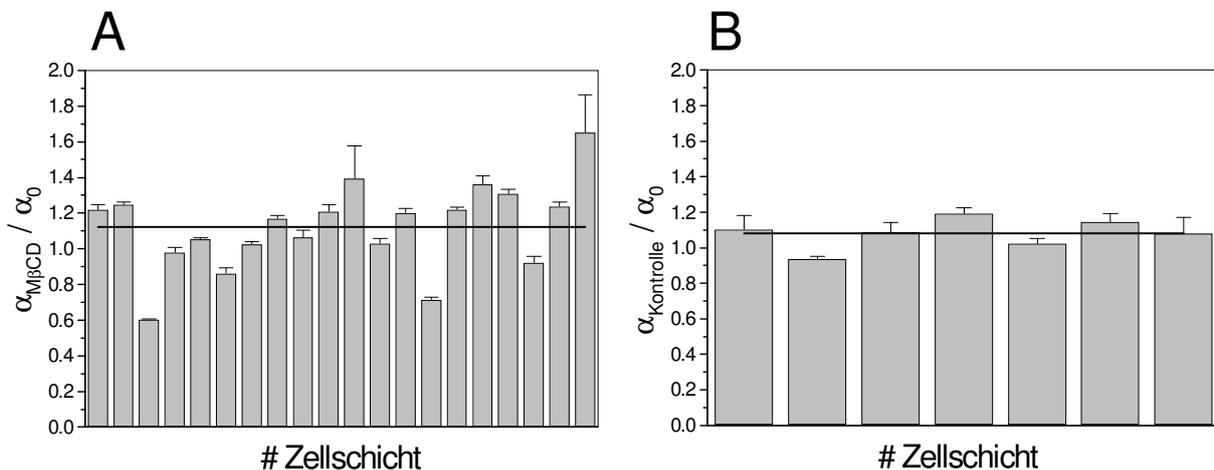
Ausgangswert erhöht. Im Mittel kann eine leichte Zunahme des Widerstandes nach der Inkubation um den Faktor  $(1.19 \pm 0.07)$  festgestellt werden. Diese Erhöhung des parazellulären Widerstandes  $R_b$  der Kontrollpopulation kann auf den Serumentzug zurückgeführt werden, da die MDCK-2 Zellen in glucosehaltigem Phosphatpuffer ohne Serumzusatz inkubiert wurden (Conyers et al., 1990).

Die beobachtete Abnahme des Werts für  $R_b$  wird somit durch die M $\beta$ CD-induzierte Cholesterinverarmung der Zellmembran hervorgerufen. Die Anwesenheit von Cholesterin in der Zellmembran ist offensichtlich für die Funktionalität der Zell-Zell-Kontakte nötig.

### Zell-Substrat-Parameter $\alpha$

Neben der oben beschriebenen Beeinträchtigung der Zellen im Bereich des Zell-Zell-Kontakts sollten die ECIS-Messungen anhand des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  Rückschlüsse darauf ermöglichen, inwiefern gleichzeitig Auswirkungen im Zell-Substrat-Bereich induziert werden. Abbildung 4.45 **A** zeigt das Verhältnis des Parameters  $\alpha$  von Zellschichten vor und nach der Inkubation mit M $\beta$ CD. Die Werte für das Verhältnis ( $\alpha_{M\beta CD} / \alpha_0$ ) weisen deutliche

Streuungen auf. So sind in Einzelfällen sowohl Abnahmen von  $\alpha_{M\beta CD}$  um einen Faktor 0.4 wie auch Zunahmen um einen Faktor von 1.6 bezogen auf den Ausgangswert  $\alpha_0$  zu beobachten. Im Mittel bleibt der Wert von  $\alpha$  im Vergleich zum parazellulären Widerstand  $R_b$  relativ konstant. Nur eine leichte mittlere Zunahme um einen Faktor von  $(1.12 \pm 0.05)$  ist feststellbar. Auch für den Parameter  $\alpha$  wurde eine Kontrolle durchgeführt, die andere Einflüsse als die durch die spezifische Wirkung des M $\beta$ CD hervorgerufenen Effekte ausschließen sollte. Abbildung 4.45 **B** stellt den Quotienten ( $\alpha_{Kontrolle} / \alpha_0$ ) dar, der aus dem Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  der jeweiligen Zellschicht vor und nach der Inkubation in glucosehaltigem Phosphatpuffer bestimmt wurde. Die Abbildung zeigt deutlich, dass nur sehr geringe Schwankungen zu beobachten sind. Im Mittel lässt sich eine leichte Zunahme von  $\alpha$  um einen Faktor von  $(1.08 \pm 0.03)$  feststellen.



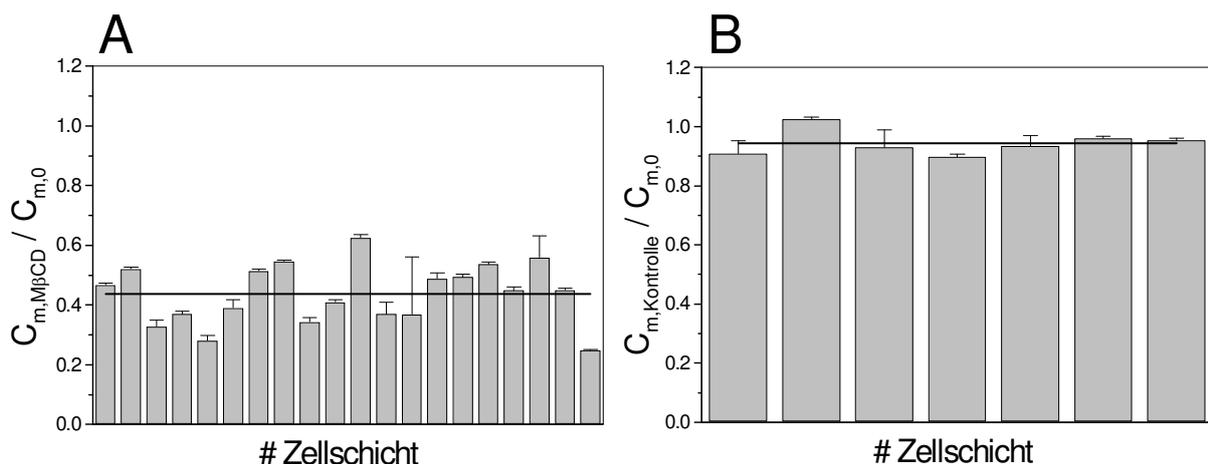
**Abb. 4.45:** **A** Relativer Zell-Substrat-Parameter ( $\alpha_{M\beta CD} / \alpha_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer mit 20 mM M $\beta$ CD inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Inkubation bestimmten Wert von  $\alpha$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.12 \pm 0.05)$  bestimmt werden ( $n = 20$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). **B** Relativer Zell-Substrat-Parameter ( $\alpha_{Kontrolle} / \alpha_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem nach und dem vor der Inkubation bestimmten Wert von  $\alpha$ . Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.08 \pm 0.03)$  bestimmt werden ( $n = 7$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Da der Parameter  $\alpha$  durch die Inkubation mit M $\beta$ CD nahezu unbeeinflusst bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass die elektrischen und geometrischen Verhältnisse im Spalt zwischen Zelle und Substrat denen von unbehandelten Zellen entsprechen.

### Spezifische Membrankapazität $C_m$

Francis et al. (1999) konnten mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen einen deutlichen Effekt von M $\beta$ CD auf die Mikrovilli von MDCK-Zellen feststellen. Beobachtet wurde ein Rückgang der Mikrovilli auf der Oberfläche der Zellen. Das legt einen direkten Einfluss von M $\beta$ CD auf die spezifische Membrankapazität  $C_m$  nahe, da eine Veränderung der Oberflächengeometrie auch einen direkten Effekt auf die Kapazität der Zellmembran haben sollte.

Abbildung 4.46 **A** stellt das Verhältnis ( $C_{m,M\beta CD} / C_{m,0}$ ) zwischen der Kapazität der M $\beta$ CD-behandelten sowie der nativen Zellen dar. Ein deutlicher Rückgang der spezifischen Kapazität  $C_m$  ist zu erkennen. Der Wert von  $C_m$  verringert sich mindestens um einen Faktor von 0.6, teilweise sogar um einen Faktor von 0.25 bezogen auf den Ausgangswert. Dies entspricht Absolutwerten von  $C_m$  zwischen  $(2.2 \pm 0.4) \mu\text{Fcm}^{-2}$  und  $(1.08 \pm 0.01) \mu\text{Fcm}^{-2}$ . Im Mittel kann ein Rückgang der Membrankapazität nach Behandlung mit M $\beta$ CD um einen Faktor von  $(0.44 \pm 0.02)$  festgestellt werden.



**Abb. 4.46:** **A** Relative spezifische Membrankapazität ( $C_{m,M\beta CD} / C_{m,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer mit 20 mM M $\beta$ CD inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen der nach und der vor der Inkubation bestimmten Kapazität der Zellmembran. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.44 \pm 0.02)$  bestimmt werden ( $n = 20$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). **B** Relative spezifische Membrankapazität ( $C_{m,Kontrolle} / C_{m,0}$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen der vor und nach der Inkubation bestimmten Kapazität der Zellmembran. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(0.94 \pm 0.02)$  bestimmt werden ( $n = 7$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

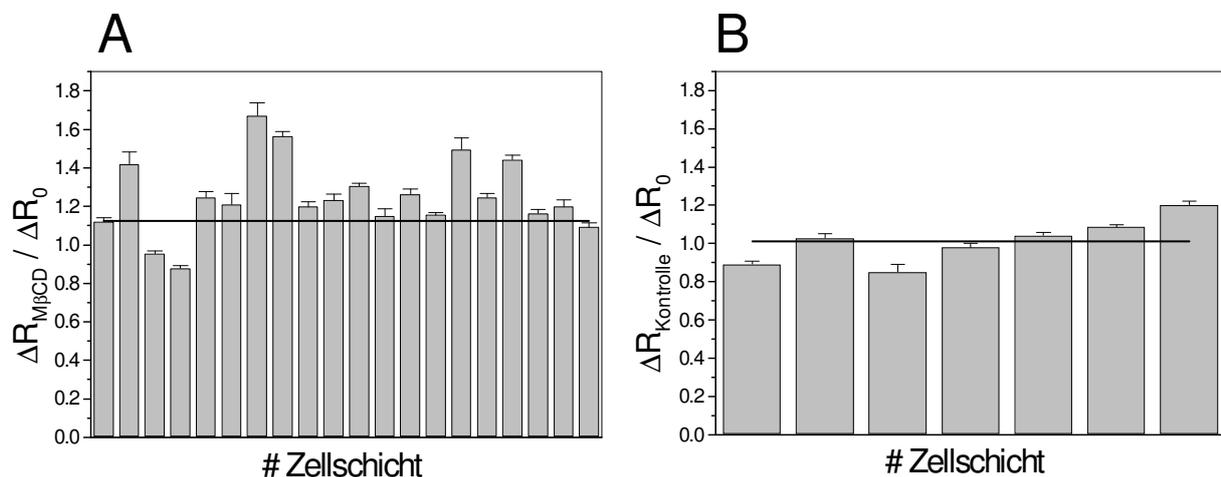
In Abbildung 4.46 **B** sind die Ergebnisse einer zweistündigen Kontrollinkubation der Zellschicht mit glucosehaltigem Phosphatpuffer ohne Zusatz von M $\beta$ CD dargestellt. Es lassen sich keine wesentlichen Änderungen der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  erkennen. Im Mittel findet man eine leichte Abnahme der Kapazität um einen Faktor von  $(0.94 \pm 0.02)$ .

Die durch die Inkubation mit M $\beta$ CD induzierte Abnahme der spezifischen Membrankapazität deutet auf eine signifikante Änderung der Oberflächentopographie hin. Das von Francis et al. (1999) beschriebene Verschwinden der Mikrovilli nach Behandlung der Zellen mit M $\beta$ CD ist mit diesen Daten konsistent und erklärt die hier gemessene Änderung der Membrankapazität.

#### 4.4.10.2 Untersuchung der Wirkung von M $\beta$ CD auf den Dämpfungswiderstand R

Um einen möglichen Effekt des M $\beta$ CD auf die Elastizität der Zellschicht respektive des Adhäsionskontakts zu untersuchen, wurden die Zellschichten vor und nach der Inkubation mit M $\beta$ CD auch im *Quarz-Modus* mikrogravimetrisch analysiert. Die durch die Vernetzung der zellulären Proteine induzierte Änderung des Dämpfungswiderstandes (s. 4.4.1.1), die mit einem deutlichen Anstieg der Elastizität des Zellkörpers einher geht, lässt vermuten, dass möglicherweise auch Änderungen der Membranzusammensetzung den Dämpfungswiderstand beeinflussen können. Da Cholesterin wesentlich zur Regulation der Membranfluidität beiträgt, lässt eine durch die Inkubation mit M $\beta$ CD hervorgerufene Reduktion des Cholesteringehaltes signifikante Änderungen des Dämpfungswiderstandes vermuten.

Abbildung 4.47 A stellt die für die einzelnen Zellschichten bestimmten relativen Änderungen des Dämpfungswiderstandes anhand des Quotienten ( $\Delta R_{M\beta CD} / \Delta R_0$ ) dar. Es können vereinzelte Abnahmen des Dämpfungswiderstandes um einen Faktor von 0.87 bezogen auf den Ausgangswert als auch deutliche Anstiege des Dämpfungswiderstandes bis zu einem



**Abb. 4.47:** **A** Relativer Dämpfungswiderstand ( $\Delta R_{M\beta CD} / \Delta R_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer mit 20 mM M $\beta$ CD inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Inkubation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.25 \pm 0.19)$  bestimmt werden ( $n = 20$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM). **B** Relativer Dämpfungswiderstand ( $\Delta R_{Kontrolle} / \Delta R_0$ ) von MDCK-2 Zellen, die 2 h in glucosehaltigem Phosphatpuffer inkubiert wurden. Jeder Balken charakterisiert das für einen einzelnen MDCK-2-Zelllayer bestimmte Verhältnis zwischen dem vor und dem nach der Inkubation bestimmten Dämpfungswiderstand. Für dieses Verhältnis kann ein Mittelwert von  $(1.01 \pm 0.04)$  bestimmt werden ( $n = 7$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

Faktor von 1.67 bestimmt werden. Im Mittel findet man eine im Vergleich zu den Vernetzungsexperimenten kleine, aber signifikante Erhöhung des Dämpfungswiderstandes  $\Delta R_0$  um einen Faktor von  $(1.25 \pm 0.19)$ . Die in Abbildung 4.47 **B** dargestellte, ebenfalls mitgeführte Kontrolle weist keinen derartigen Anstieg des Dämpfungswiderstandes auf. Im Mittel findet man nur eine nicht signifikante Zunahme um den Faktor  $(1.01 \pm 0.04)$  bezogen auf den Ausgangswert.

Die betragsmäßig kleine, aber signifikante Zunahme des Dämpfungswiderstandes ist also auf die Inkubation von M $\beta$ CD zurückzuführen und hängt somit offensichtlich mit dem Cholesteringehalt der Membran zusammen.

## 4.5 Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM

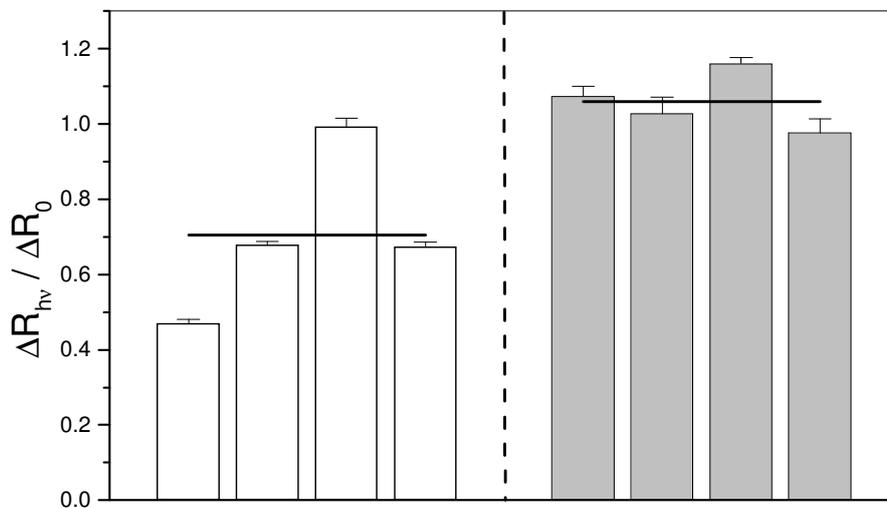
Das Sterben von Säugerzellen ist mit drastischen Veränderungen der Zellmorphologie verbunden. Da es im Laufe eines solchen zellbiologischen Prozesses zu Änderungen im Zell-Substrat-Bereich kommt (z.B. Ablösen der Zelle vom Substrat), sollte nach den vorliegenden mechanischen Untersuchungen auch ein mikrogravimetrisches *monitoring* des Zellsterbens möglich sein.

Knight et al. (2003) konnten zeigen, dass der Vitalfarbstoff Calcein AM unter Bestrahlung fototoxisch wirkt und vermuteten einen apoptotischen Mechanismus für das Sterben der untersuchten Chondrozyten. Bei Calcein AM handelt es sich um einen zellpermeablen Farbstoffderivat, das im Cytoplasma durch nur in lebenden Zellen aktiven Esterasen in den Fluoreszenzfarbstoff Calcein gespalten wird. Bei Bestrahlung dieses blau absorbierenden und grün fluoreszierenden Farbstoffs mit Licht im Bereich der entsprechenden Excitationswellenlänge wird dieser fototoxisch. Dies führt nach entsprechenden Expositionszeiten zum Tod der bestrahlten Zelle.

### 4.5.1 Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM im *Quarz-Modus*

Untersucht wurde nun, inwiefern dieser durch die Bestrahlung induzierte Zelltod Änderungen der mechanischen Eigenschaften der Zellschicht auslöst. Dazu wurden MDCK-2 Zellen auf Quarzresonatoren kultiviert, mit dem Vitalfarbstoff inkubiert und mikrogravimetrisch untersucht, um den Zustand der Zellen vor der Lichteinwirkung zu charakterisieren. Danach erfolgte die Belichtung mit blauem bzw. grünem Licht (Probe oder Kontrolle) und nach 24 h wurden die Zellen erneut mikrogravimetrisch untersucht. Zur Bestrahlung wurde eine Hg-Dampflampe (100 W) verwendet, die Fokussierung der Probe erfolgte über ein 5x Objektiv. Abbildung 4.48 zeigt auf der linken Seite das Verhältnis  $(\Delta R_{iv} / \Delta R_0)$  für

Zellschichten, die 45 min lang mit Calcein AM inkubiert und dann 10 min lang mit blauem Licht (450-490 nm) bestrahlt wurden. Für drei von vier untersuchten Zelllayern konnte eine deutliche Abnahme des Dämpfungswiderstands  $\Delta R_0$  gefunden werden. Im Mittel ergibt sich eine Änderung dieses Werts um einen Faktor von  $(0.70 \pm 0.11)$ . Dagegen zeigen die auf der rechten Seite von Abbildung 4.46 dargestellten Ergebnisse der Kontrollexperimente keine wesentliche Änderung für das Verhältnis  $(\Delta R_{hv} / \Delta R_0)$ . Im Mittel kann für diese Zellschichten, die mit grünem Licht (515-560 nm) bestrahlt wurden, nur eine nicht signifikante Änderung um einen Faktor von  $(1.06 \pm 0.04)$  festgestellt werden.



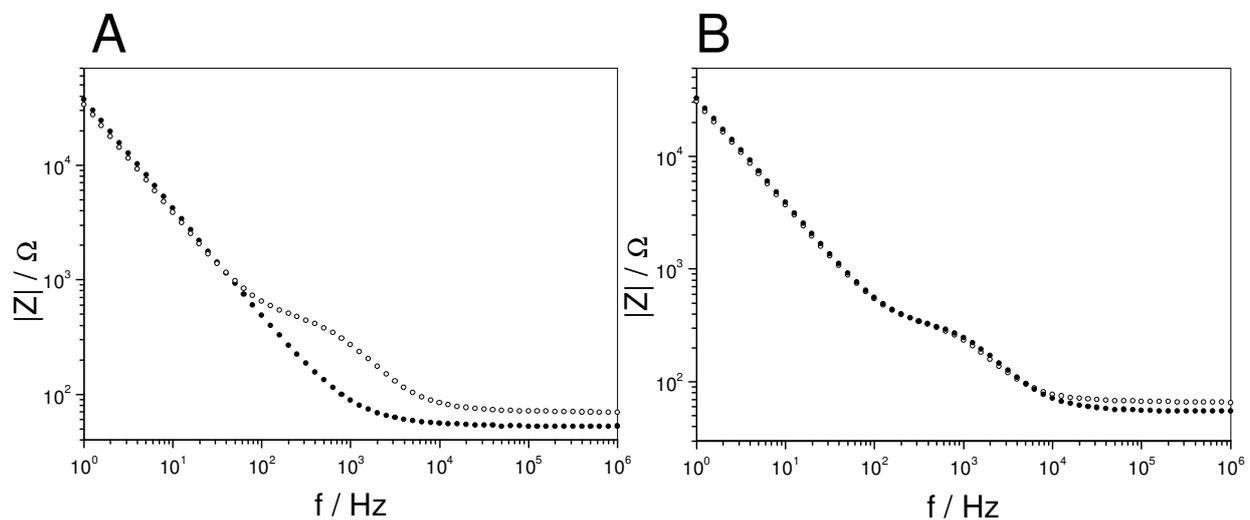
**Abb. 4.48:** Relative Dämpfungswiderstand ( $\Delta R_{hv} / \Delta R_0$ ) von MDCK-2-Zellschichten, die für 45 min in einer  $2 \mu\text{M}$  Calcein AM-Lösung inkubiert wurden und anschließend 10 min lang mit blauem Licht (weiße Säulen) oder grünem Licht (graue Säulen) bestrahlt wurden. Für die mit blauem Licht bestrahlten Zellschichten ergibt sich im Mittel eine deutliche Abnahme des relativen Dämpfungswiderstandes um einen Faktor von  $(0.70 \pm 0.11)$  bezogen auf den Ausgangswert. Dagegen zeigen die mit grünem Licht bestrahlten Zellschichten lediglich eine Tendenz zu einer leichten Zunahme von  $\Delta R$  um  $(1.06 \pm 0.04)$ . Die durchgezogenen Linien markieren den für die jeweiligen Bedingungen bestimmten Mittelwert ( $n = 4$ ; Mittelwert  $\pm$  SDM).

#### 4.5.2 Untersuchungen zur Fototoxizität anhand von ECIS-Messungen

Neben der oben dargestellten Veränderung des Dämpfungswiderstandes des Zellkörpers wurde auch der Einfluss des fototoxischen Effekts auf die elektrischen Eigenschaften der Zellschicht untersucht. Dazu wurden die Zellen sowohl vor als auch nach der Bestrahlung mit Licht im ECIS-Modus charakterisiert. Abbildung 4.49 A zeigt exemplarisch ein typisches Impedanzspektrum einer konfluenten MDCK-2-Zellschicht sowohl vor als auch 24 h nach der Induktion des fototoxischen Effekts. Es ist deutlich zu erkennen, dass die vor der Belichtung vitalen Zellen einen Tag nach der Bestrahlung mit blauem Licht im Bereich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz keinerlei Plateaubereich mehr aufweisen. Das Impedanzspektrum ähnelt im Verlauf

dem einer nicht mit Zellen belegten leeren Elektrode. Das deutet daraufhin, dass die Zellschicht ihre dem Strom gegenüber isolatorische Eigenschaft verloren und somit zu großen Teilen oder vollständig in dem bestrahlten Bereich zerstört ist.

Um diesen fototoxischen Effekt spezifisch auf das eingestrahlte blaue Licht (450-490 nm) zurückführen zu können, wurde als Kontrolle eine mit Calcein AM inkubierte Zellschicht mit grünem Licht (515-560 nm) bestrahlt und das Zellspektrum sowohl vor wie auch 24 Stunden nach der Lichteinwirkung bestimmt. Abb. 4.49 B lässt sich erkennen, dass insbesondere im Plateaubereich keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zuständen zu finden sind. Die Zerstörung der Zellschicht ist also spezifisch auf die Einwirkung von blauem Licht (450-490 nm) auf die Calcein AM-inkubierten Zellen zurückzuführen.



**Abb. 4.49:** Exemplarische Darstellung der Impedanzspektren von MDCK-2 Zellen, die für 45 Minuten in einer  $2 \mu\text{M}$  Calcein AM-Lösung inkubiert wurden. Abbildung 4.49 A zeigt das Spektrum sowohl vor ( $\circ$ ) wie auch 24 h nach ( $\bullet$ ) einer 10-minütigen Belichtung mit blauem Licht (450-490 nm). Das Zellspektrum nach der Belichtung zeigt die Beschädigung der Zellen eindeutig durch den Verlust der Plateauregion an. Abbildung 4.49 B zeigt das dazugehörige Kontrollexperiment. Dargestellt ist das Spektrum sowohl vor ( $\circ$ ) wie auch 24 h nach ( $\bullet$ ) einer 10-minütigen Belichtung mit grünem Licht (515-560nm). Es konnte keine signifikante Änderung des Kurvenverlaufs festgestellt werden.

Die Abweichung der Impedanz im hohen Frequenzbereich ( $10^4$ - $10^6$  Hz) zwischen den vor und den nach der Belichtung aufgenommenen Spektren kann auf Verdunstungseffekte zurückgeführt werden, die möglicherweise durch die Inkubation der Proben bei  $37^\circ \text{C}$  auftraten. Da dieser Inkubationsschritt nicht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre durchgeführt wurde, ist ein kleiner Wasserverlust wahrscheinlich. Dies kann in einer höheren Ionenkonzentration und somit in einer erhöhten Leitfähigkeit des Puffers resultieren, was sich in einer verringerten Impedanz im für den Mediumwiderstand charakteristischen Bereich zwischen  $10^4$ - $10^6$  Hz äußern würde. Ein weiterer Grund kann eine gegenüber der Arbeitselektrode verschobene Position des Platin-Drahtes sein, der als Gegenelektrode in den

Puffer eintaucht, da die Impedanz zwischen  $10^4$ - $10^6$  Hz auch hinsichtlich solcher Änderungen der experimentellen Anordnung sensitiv ist.

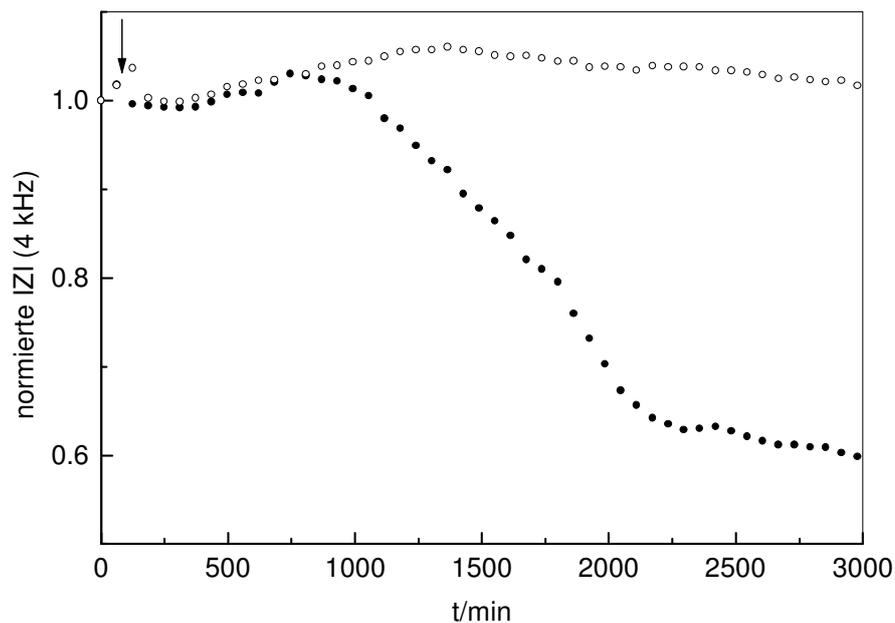
### 4.5.3 Untersuchung zum Mechanismus der Fototoxizität

Die Ursache des fototoxischen Effekts von Calcein AM sollte näher untersucht werden, um die im *Quarz-Modus* und in den ECIS-Messungen beobachteten Effekte auf die mechanischen Eigenschaften und die Zellmorphologie verstehen zu können. Da sich die elektrischen Messungen im Vergleich zu den mikrogravimetrischen Untersuchungen als wesentlich sensitiver gegenüber den Auswirkungen der Fototoxizität auf die Zellschicht erwiesen haben, wurden alle weiteren Untersuchungen lediglich mit der ECIS-Technik durchgeführt. Dazu wurden spezielle Metallfilmelektroden-Arrays aus Indium-Zinn-Oxid (ITO) verwendet, die neben der obligaten elektrischen Leitfähigkeit auch die Eigenschaft optischer Transparenz besitzen. Diese ITO-Elektroden besitzen zudem weitere Vorteile: So ist eine parallele Messung mehrerer Wells möglich, außerdem kann durch Verwendung eines beheizbaren Mikroskopaufsatzes die simultane mikroskopische Beobachtung bzw. Belichtung des Substrats und die impedanzspektroskopische Untersuchung der Probe erfolgen. Weiterhin wurden an diesen Substraten mikroskopische Studien durchgeführt, die den eigentlichen Mechanismus des Zelltods aufklären sollten.

#### 4.5.3.1 Einsatz von Natriumascorbat als Reduktionsmittel

Natriumascorbat ist ein Reduktionsmittel, welches die möglicherweise in den fotochemischen Reaktionen entstehenden reaktiven, radikalischen Spezies unschädlich machen kann. Um eine mögliche Beteiligung von radikalischen Sauerstoff-Spezies am fototoxischen Effekt von Calcein AM zu untersuchen, wurden die MDCK-2 Zellen 90 min lang mit Calcein AM bzw. mit Calcein AM und 1 mM Natriumascorbat inkubiert. Danach wurden die behandelte Zellschichten jeweils 5 min lang mit blauem Licht (420-490 nm) bestrahlt.

In Abbildung 4.50 ist der zeitliche Verlauf der normierten Impedanz bei 4 kHz der Zellen im Vergleich zu dem der zusätzlich mit Natriumascorbat behandelte Zellen dargestellt.



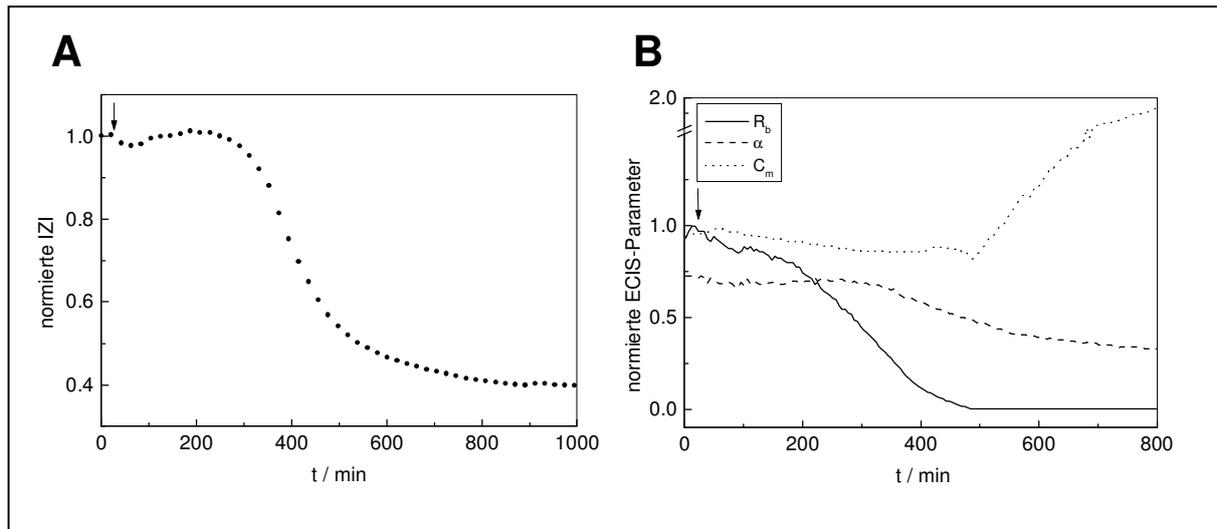
**Abb. 4.50:** Vergleich des Verlaufs der normierten Impedanz (bei 4 kHz) 90 min mit Calcein AM beladener (●) bzw. zusätzlich mit Natriumascorbat behandelter Zellen (○) nach 5-minütiger Belichtung mit blauem Licht (420-490 nm). Die gemessenen Werte wurden auf den jeweiligen Impedanzwert bei  $t = 0$  min normiert ( $|Z|_0(\circ) = 2344 \Omega$ ;  $|Z|_0(\bullet) = 2581 \Omega$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Belichtung.

Dabei zeigte sich, dass durch Zusatz von 1 mM Natriumascorbat der fototoxische Effekt vollständig inhibiert wurde. Die Impedanz blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum weitgehend konstant.

Bei den ausschließlich mit Calcein AM behandelten Zellen hingegen trat der fototoxische Effekt etwa 1000 min nach der Belichtung ein. Die Impedanz nahm langsam ab, bis sie nach etwa 2000 min ein Minimum erreichte. Die Impedanz wurde jedoch nicht, wie bei den zuvor beschriebenen Messungen, vollständig bis auf den Wert der zellfreien Goldelektrode reduziert.

#### 4.5.3.2 Einfluss des fototoxischen Effektes auf die drei Zellparameter $R_b$ , $\alpha$ und $C_m$

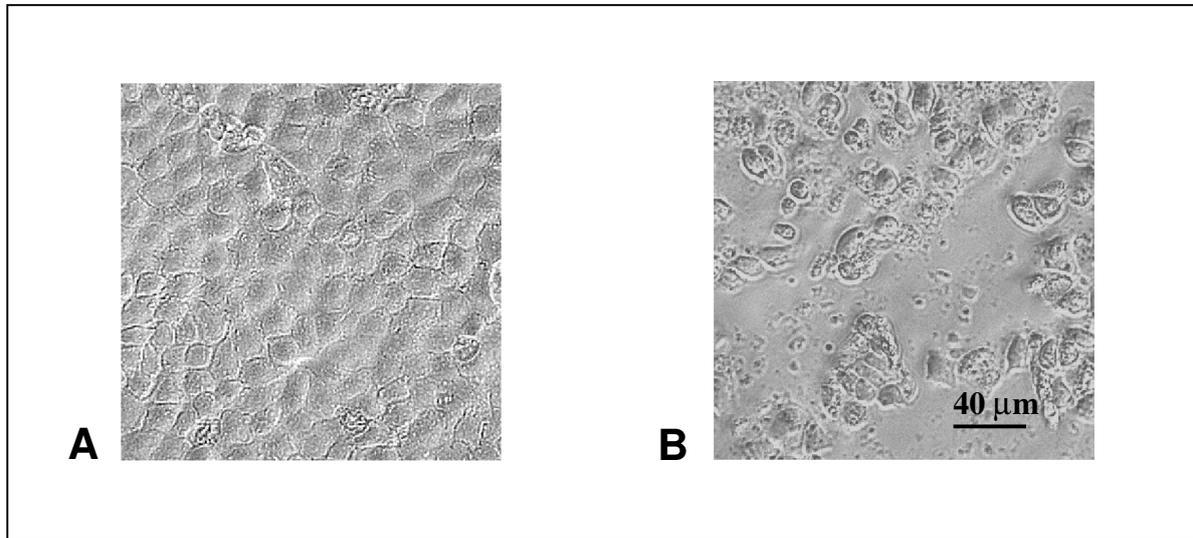
Um den Einfluss des fototoxischen Effektes auf die drei ECIS-Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  zu untersuchen wurden die aufgezeichneten Impedanzdaten mit Hilfe des Modells von Wegener et al. (2000) analysiert. Die Modellierung der Daten sollte Aufschlüsse auf die durch den fototoxischen Effekt hervorgerufenen Schäden an den Zellen ermöglichen. In Abbildung 4.51 A ist exemplarisch der zeitliche Verlauf der normierten Impedanz (bei 4 kHz) der 90 min mit Calcein AM beladenen und 5 min lang mit blauem Licht (420-490 nm) bestrahlten MDCK-2 Zellen dargestellt. Entsprechend dazu zeigt Abbildung 4.51 B den zeitlichen Verlauf der drei morphologischen Parameter.



**Abb. 4.51:** **A** Zeitlicher Verlauf der normierten Impedanz (bei 4 kHz) 90 min mit Calcein AM beladener MDCK-2 Zellen nach 5-minütiger Belichtung mit blauem Licht (420-490 nm). **B** Zeitlicher Verlauf der normierten Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$ . Die gemessenen Werte wurden auf den jeweiligen Wert bei  $t = 0$  min normiert ( $|Z|_0(\bullet) = 1995 \Omega$ ;  $R_{b,0} = 32.5 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha_0 = 13.6 \Omega\text{cm}^{0.5}$ ,  $C_{m,0} = 5.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Die Pfeile markieren jeweils den Zeitpunkt der Belichtung.

Auffällig ist, dass nach Einsetzen des fototoxischen Effektes (ab ca. 200 min) zunächst der Widerstand zwischen den Zellen ( $R_b$ ) abfällt im Vergleich zu den Werten von  $\alpha$  und  $C_m$ . Innerhalb von 100 min nach dem Einsetzen des fototoxischen Effektes hatte  $R_b$  bereits die Hälfte seines Ausgangswertes erreicht. Etwa 300 min nach Einsetzen des fototoxischen Effektes ging der Wert von  $R_b$  schließlich gegen Null. Im Gegensatz dazu fielen die Werte von  $\alpha$  deutlich langsamer ab. Etwa 150 min nach Einsetzen des Effektes nahm  $\alpha$  langsam ab. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Wert von  $R_b$  nur noch 40 % seines Ausgangswertes. Nach 250 min war  $\alpha$  um die Hälfte des Ausgangswertes gesunken und erreichte nach 500 min ein Minimum. Im Vergleich zu  $R_b$  und  $\alpha$  nahmen die Werte von  $C_m$  300 min nach Einsetzen des fototoxischen Effektes stark zu und waren nach 800 min auf das Doppelte des Ausgangswertes angestiegen. Eine derartige Erhöhung von  $C_m$  ist für die hier untersuchten Zellen jenseits jeder zu erwartenden Veränderung der Membrankapazität und kann als Indikator für das partielle Ablösen der Zellen von der Elektrodenoberfläche oder das Auftreten weniger unbedeckter Bereiche auf der Elektrode herangezogen werden, wie es sich auch bei den mikroskopischen Untersuchungen zeigte. Die ECIS-Untersuchungen zeigen somit, dass die durch Calcein AM induzierte Fototoxizität zunächst zu einer Beeinflussung der Zell-Zell-Kontakte führt. Der zeitliche Verlauf von  $R_b$  zeigte eine drastische Aufweitung des Interzellularspaltes an, wie es für schrumpfende Zellen charakteristisch ist. Erst einige Zeit später führt das fortgesetzte Abrunden der Zellen zum Lösen der Zell-Substrat-Kontakte. Der Verlauf der drei Zellparameter in Abbildung 4.51 **B** ist für alle ECIS-Messungen, bei denen ein Effekt zu beobachten war, repräsentativ. Allerdings setzte der Effekt zu

unterschiedlichen Zeitpunkten ein, was auch schon die zuvor beschriebenen Abbildungen zeigten.



**Abb. 4.52:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von MDCK-2 Zellen auf ITO-Elektroden. Diese Bilder wurden im Anschluß an die ECIS-Messung aufgenommen. **A** Zellen, die nicht mit Calcein AM vorinkubiert wurden, **B** Zellen, die 90 min mit Calcein AM beladen wurden, nach 5-minütiger Belichtung mit blauem Licht (420-490 nm).

Nach Abschluß der ECIS-Messungen wurden die MDCK-2 Zellen auf den ITO-Elektroden phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Die in Abbildung 4.52 exemplarisch dargestellten Aufnahmen sollen den Einfluss des fototoxischen Effektes auf die Zellmorphologie visualisieren. Die mit Calcein AM beladenen und 5 min mit blauem Licht bestrahlten Zellen wiesen erhebliche Veränderungen der Morphologie auf (Abb. 4.52 **B**). Ein Großteil der Zellen hatte sich komplett abgerundet, wodurch ihre Zell-Zell-Kontakte zerstört wurden. An einigen Stellen sind Löcher im Zelllayer entstanden, wo sich Zellen abgelöst haben. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht mit Calcein AM vorinkubierten Zellen nach 5-minütiger Belichtung mit blauem Licht keine Veränderungen. Sie besaßen die für MDCK-2 Zellen typische Zellform und die Zellgrenzen waren deutlich zu erkennen (Abb. 4.52 **A**).

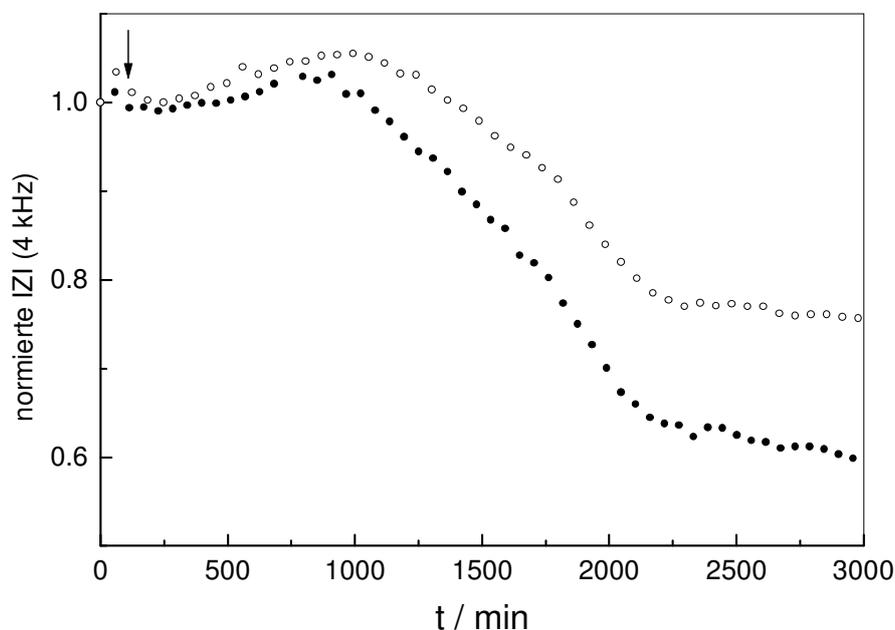
#### 4.5.3.3 Untersuchungen zum Mechanismus des Zelltodes

Der durch die Fototoxizität induzierte Zelltod kann über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen: Apoptose und Nekrose. Die mikroskopisch beobachteten und durch ECIS-Untersuchungen quantifizierten, morphologischen Veränderungen zeigen ein ausgeprägtes Schrumpfen der Zellen an, was auf einen apoptotischen Zelltod schließen lässt. Um herauszufinden, welche spezifische Form des Zelltodes durch den fototoxischen Effekt von Calcein AM vermittelt wird, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

### Einsatz eines Caspase-3-Inhibitors zur Unterdrückung von Apoptose

Viele apoptotische Prozesse werden durch Caspasen vermittelt und können somit durch deren Inhibition indirekt nachgewiesen werden. Dazu wurden die 90 min mit Calcein AM beladenen Zellen zusätzlich mit einem Caspase-3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO) in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  inkubiert und anschließend 5 min mit blauem Licht (420-490 nm) bestrahlt. Der Caspase-Inhibitor konnte den fototoxischen Effekt von Calcein AM jedoch nicht inhibieren (Abb. 4.53). Etwa 1000 min nach der Belichtung der mit dem Inhibitor behandelten Zellen nahm die Impedanz auch hier ab, bis sie nach etwa 2250 min ein Minimum erreichte. Auch bei den ausschließlich mit Calcein AM inkubierten Zellen setzte der fototoxische Effekt etwa 1000 min nach der Belichtung ein. Die Impedanz nahm ab und erreichte ebenfalls nach etwa 2250 min ein Minimum.

Beim Vergleich der zeitlichen Impedanzverläufe beider Zellpopulationen fällt auf, dass die Impedanzabnahme der mit dem Inhibitor behandelten Zellen nur halb so groß ist wie die Impedanzabnahme der ausschließlich mit Calcein AM inkubierten Zellen. Dies kann allerdings auf den niedrigeren Impedanzwert bei  $t = 0$  min und die hier aufgetragenen behandelten Zellen normierten Daten zurückzuführen sein. Während der Impedanzwert für die mit dem Inhibitor zu Anfang der Messung 2229  $\Omega$  betrug, lag er für die ausschließlich



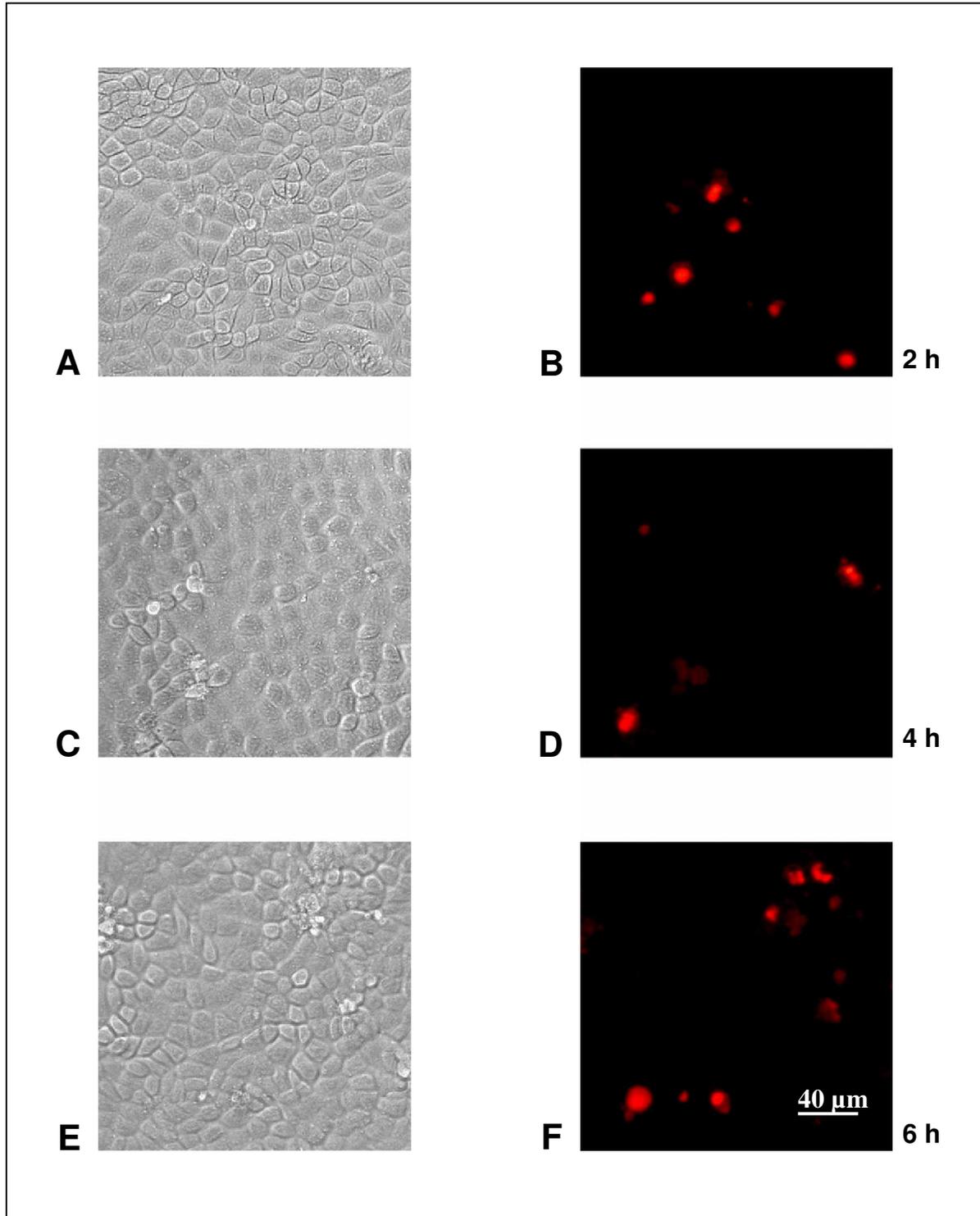
**Abb. 4.53:** Vergleich des zeitlichen Verlaufs der normierten Impedanz (bei 4 kHz) 90 min mit Calcein AM beladener (●) und zusätzlich mit dem Caspase-3-Inhibitor inkubierter MDCK-2 Zellen (○) nach 5 minütiger Belichtung mit blauem Licht (420-490 nm). Die gemessenen Werte wurden auf den jeweiligen Impedanzwert bei  $t = 0$  min normiert ( $|Z|_0(\circ) = 2229 \Omega$ ;  $|Z|_0(\bullet) = 2581 \Omega$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Belichtung.

mit Calcein AM inkubierten Zellen bei 2581  $\Omega$ . Die Impedanzwerte am Ende der Messung waren jedoch für beide Zellpopulationen in etwa gleich. Während der Impedanzwert für die mit Inhibitor behandelten Zellen am Ende der Messung 1686  $\Omega$  betrug, lag er für die ausschließlich mit Calcein AM inkubierten Zellen bei 1541  $\Omega$ . Der zeitliche Impedanzverlauf der mit dem Inhibitor behandelten Zellen zeigte zudem eine leichte Verschiebung zu größeren Zeiten, die jedoch vor dem Hintergrund der großen Varianz in den zeitabhängigen Messungen nur wenig signifikant ist.

Da sich der fototoxische Effekt von Calcein AM nicht mit dem Caspase-3-Inhibitor unterdrücken liess, sprechen die Ergebnisse der Messung für einen nekrotischen oder aber einen Caspase-unabhängigen, apoptotischen Signalweg.

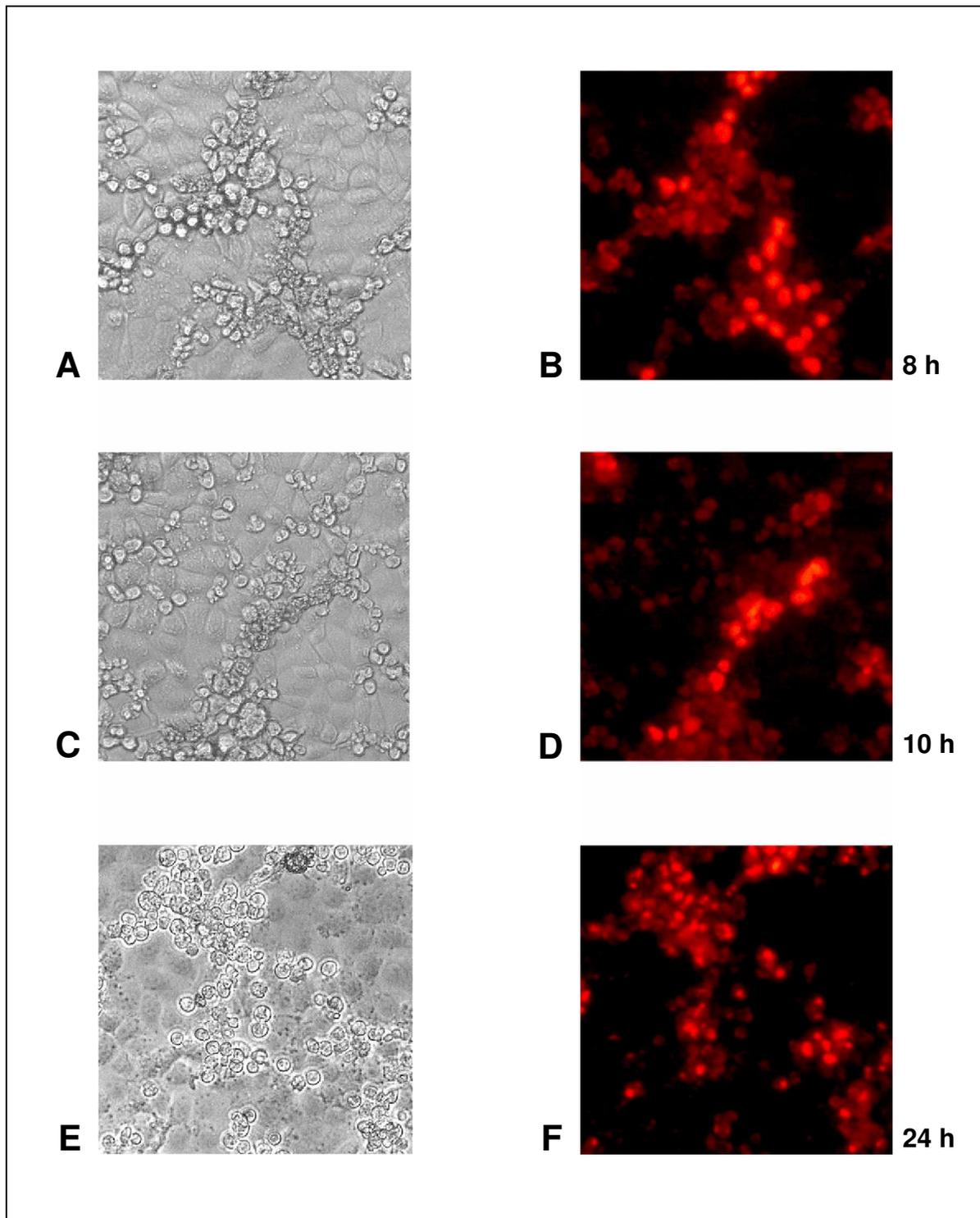
### **Zeitaufgelöste EthD-Färbung als Nachweis für Nekrose**

Die beiden Formen des Zelltodes unterscheiden sich unter anderem dadurch, dass im Gegensatz zur Apoptose bei der Nekrose die Zellmembran sehr früh in Mitleidenschaft gezogen und permeabilisiert wird. EthD kann unter diesen Umständen in die Zelle bzw. den Zellkern eindringen, an die DNA binden und dadurch eine rote Kernfluoreszenz erzeugen. Somit könnte im Falle eines nekrotischen Zelltodes dieser sich mit Hilfe einer positiven EthD-Färbung kurz nach dem Auslösen des schädigenden Effekts zu erkennen geben. Dazu wurden die auf einem ITO-Substrat kultivierten Zellen 90 min mit einer Calcein AM-Lösung inkubiert, die zusätzlich EthD in einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  enthielt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 5 min lang mit blauem Licht (450-490 nm) bestrahlt. Anschließend wurde der fototoxische Effekt von Calcein AM alle 2 h anhand von Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Aufnahmen verfolgt. In den ersten 4 h nach der Belichtung waren keine signifikanten Veränderungen der Zellmorphologie zu erkennen (Abb. 4.54). Auch bei der EthD-Färbung waren nur vereinzelt ein paar Zellkerne angefärbt. Nach 6 h begannen sich die Zellen stellenweise abzurunden. Noch eindeutiger waren diese Veränderungen nach 8 h (Abb. 4.55). Zu diesem Zeitpunkt hatten sich etwa 40 % der Zellen komplett abgerundet. Ihre Zellkerne waren bei der EthD-Färbung deutlich angefärbt. Auch nach 10 h bzw. 24 h konnten die stark abgerundeten und permeabilisierten Zellen durch ihre rot fluoreszierenden Kerne von den noch vitalen Zellen unterschieden werden. Nach 24 h hatten sich die abgerundeten Zellen vom Untergrund abgelöst und befanden sich auf der Substratoberfläche. Parallel dazu wurden zur Kontrolle MDCK-2 Zellen, die nicht mit Calcein AM vorinkubiert wurden, 5 min lang blauem Licht im Wellenlängenbereich von 450-490 nm ausgesetzt. Diese zeigten im

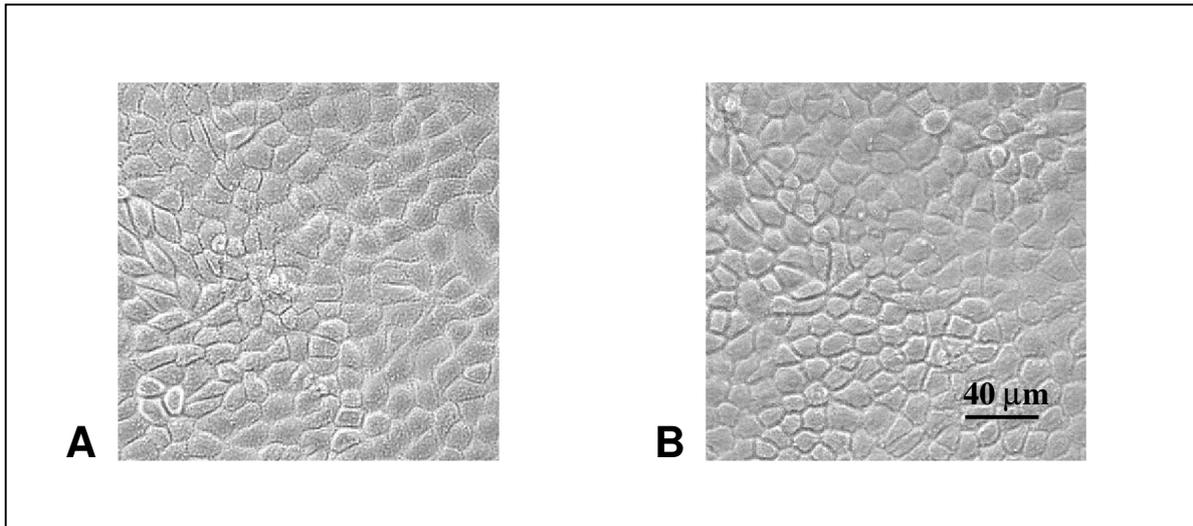


**Abb. 4.54:** Phasenkontrast- (links) und die zugehörigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (rechts) der 90 min mit Calcein AM beladenen MDCK-2 Zellen nach einer Belichtungszeit von 5 min mit blauem Licht (450-490 nm). **A/B** nach 2 h, **C/D** nach 4 h, **E/F** nach 6 h.

Gegensatz zu den mit Calcein AM beladenen Zellen (Abb. 4.54 + 4.55) weder nach 2 h noch nach 24 h Veränderungen der Morphologie (Abb. 4.56).



**Abb. 4.55:** Phasenkontrast- (links) und die zugehörigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (rechts) der 90 min mit Calcein AM beladenen MDCK-2 Zellen nach einer Belichtungszeit von 5 min mit blauem Licht (450-490 nm). **A/B** nach 8 h, **C/D** nach 10 h, **E/F** nach 24 h.



**Abb. 4.56:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von MDCK-2 Zellen, die nicht mit Calcein AM vorinkubiert wurden, nach einer Belichtungszeit von 5 min mit blauem Licht (450-490 nm). **A** nach 2 h, **B** nach 24 h.

Die zeitaufgelöste EthD-Färbung in Abb. 4.55 zeigt nach 8 h eine Permeabilisierung der Zellmembran an einem Großteil der bestrahlten Zellen. Dieser Effekt tritt zu einem Zeitpunkt ein, an dem auch in den Phasenkontrastaufnahmen deutliche morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar sind. Dieser Zusammenhang weist auf eine schnelle Permeabilisierung der Zellmembran und somit auf einen nekrotischen Zelltod hin. Die Beobachtung, dass der Zusatz eines Caspase-3-Inhibitors zum Kulturmedium das Sterben der Zelle nicht verhindern kann (Abb. 4.53), spricht ebenfalls für Nekrose.

## 5 Diskussion

### 5.1 Mikrogravimetrische Untersuchung des Adhäsionskontakts tierischer Zellen

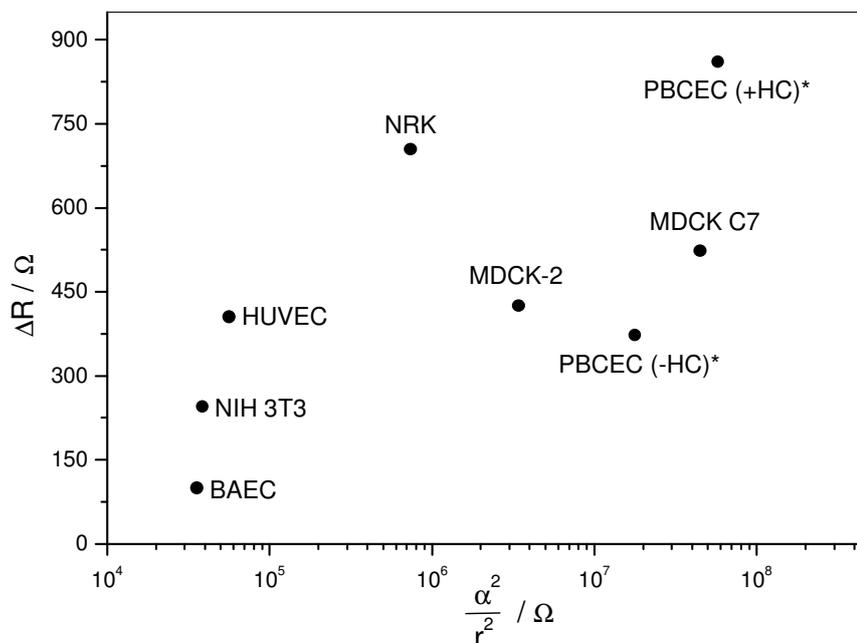
Die in dieser Arbeit mit der QCM gemessenen mikrogravimetrischen Parameter adhärenter tierischer Zellen zeigen individuelle Werte für unterschiedliche Zellarten. Um eine genaue Interpretation dieser Unterschiede zu ermöglichen und das volle Anwendungspotential der Methode in der Zellbiologie auszuloten, muss bekannt sein, welche zellulären Komponenten überhaupt einen Einfluss auf das QCM-Signal haben. Nach Wegener et al. (2000) sind dies nur die basolateralen Anteile der Zelle, da die Scherwelle der Quarzoszillation in Kulturmedium eine charakteristische Abklinglänge von etwa 250 nm hat und von den Autoren gezeigt wurde, dass Prozesse auf der apikalen Zellseite nur detektiert werden können, wenn sie den gesamten Zellkörper beeinflussen. Die in dieser Arbeit - ähnlich wie von Wegener et al. (2000) - gefundene deutliche Abhängigkeit des Dämpfungswiderstands vom untersuchten Zelltyp muss ihre Ursache demnach im je nach Zellsorte unterschiedlichen Adhäsionskontakt haben. Ein Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen inkrementellen Induktivitäten  $\Delta L$ , die hauptsächlich von der basolateralen Zellmembran und der unter den Zellen liegenden extrazellulären Matrix beeinflusst werden, liefert keine wesentlichen Erkenntnisse, da die Werte von  $\Delta L$  einer großen Streuung unterworfen sind. So ergeben sich teilweise negative Einzelwerte, die mit Hilfe des BVD-Ersatzschaltbildes nicht mehr erklärt werden können. Möglicherweise führt in diesen Fällen die von Noël und Topart (1994) übernommene Fixierung der Kapazität im BVD-Ersatzschaltbild, die einer durch das Quarzmaterial dominierten und daher invarianten Elastizität des Gesamtsystems entspricht, zu einer Verfälschung des Messwertes. Diese Festlegung der Kapazität ist notwendig, da sich die Induktivität nicht unabhängig von ihr bestimmen lässt. Allerdings ist diese Vereinfachung nur gerechtfertigt, falls sich die elastischen Eigenschaften des Quarzes durch die Adsorption einer Zellschicht nicht ändern. Verringert sich diese Kapazität durch die Zellbeladung, so ist eine Unterbestimmung der Induktivität und somit auch ein negativer Wert für  $\Delta L$  möglich. Dies ist anhand der Daten nicht auszuschließen und verhindert eine sinnvolle Interpretation. Ein Vergleich der durch die unterschiedlichen Zellsorten hervorgerufenen Induktivitätsänderungen ist aber auch aus präparativen Gründen problematisch, da alle verwendeten Endothelzellen auf eine exogen aufgetragene Gelatineschicht ausgesät wurden, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Diese Beschichtung zu einem zusätzlichen

Beitrag zu  $\Delta L$ , der nicht mehr von dem der Zellen getrennt werden kann. Ein Vergleich ist allerdings für die jeweils zwei Kultivierungsbedingungen der Kapillarendothelzellen aus Schwein (PBCEC) und Maus (MBCEC) möglich, da diese bis auf die Medienzusätze identisch behandelt wurden. Auffällig ist, dass sich nur für die zwei Kultivierungsbedingungen der PBCEC signifikante Unterschiede in  $\Delta L$  ergeben, während MBCEC in beiden Fällen in etwa die gleiche Induktivitätsänderung zeigen. Dieser bei PBCEC durch Zusatz von Hydrocortison (HC) zum Kulturmedium induzierte Effekt wurde bereits näher untersucht (Björn Reiß, Diplomarbeit, 2001). Eine mikrogravimetrische Analyse nach chemischer Ablösung der Zellkörper unter Zurücklassung der extrazellulären Matrix ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Beitrags der Matrix für die beiden Kultivierungsbedingungen. Offensichtlich ist zumindest in diesem Fall die Erhöhung der Induktivität nicht auf eine durch HC veränderte Proteinsekretion der Zellen zurückzuführen, sondern vermutlich auf eine strukturelle Änderung der basolateralen Zellmembran oder des Adhäsionskontaktes.

Die durch die Zellschicht hervorgerufenen Änderungen des inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  zeigen Werte, die je nach Zellsorte deutlich variieren. Abhängigkeiten vom Ursprungsgewebe oder von der physiologischen Aufgabe der Zellen lassen sich keine beobachten. So wurde für Endothelzellen sowohl der höchste (PBCEC +HC) als auch der niedrigste Wert (BAEC) für  $\Delta R$  gefunden. Im Vergleich zu allen anderen Zelllinien auffällig niedrige Dämpfungswiderstände zeigen neben den bovinen Aortenendothelzellen auch die murinen Fibroblasten. Wegener et al. (2000) untersuchten beide Zellsorten ebenfalls und konnten vergleichbare Werte finden. Die Autoren führten dieses Verhalten im Falle der BAEC auf den mittels konfokaler Laser-Scanningmikroskopie auf 500 nm Breite abgeschätzten Spalt (Wegener et al., 1999) zwischen Zelle und Substrat und die daraus resultierende schlechte Detektierbarkeit der Zellen mit der QCM zurück. Ähnliche Gründe wurden für die vergleichsweise geringen Dämpfungswiderstände der NIH 3T3-Zellen angeführt. Nach Parak et al. (1999) zeigen Fibroblasten nur kleine Bereiche mit niedrigem Zell-Substrat-Abstand, große Teile der Zellmembran sind weit vom Substrat entfernt. Die in dieser Arbeit unter anderem an den beiden Zelllinien durchgeführten FLIC-Messungen können derart große Distanzen zwischen den Zellen und dem Substrat aber nicht bestätigen. Ein Zusammenhang zwischen der Größe des Spaltes und dem detektierten Dämpfungswiderstand ist daher eher unwahrscheinlich (s. 5.2). Weitere Abweichungen im Vergleich zur Studie von Wegener et al. (2000) zeigen die in dieser Arbeit ebenfalls hinsichtlich ihres Dämpfungswiderstandes untersuchten Epithelien des MDCK-Stammes.

Während hier etwa 400-500  $\Omega$  für beide Zellsorten gefunden wurde, detektierten die Autoren teilweise doppelt so hohe Werte. Die Abweichung lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die mikrogravimetrischen Parameter einer Abhängigkeit von der Kulturdauer, dem metabolischen Zustand sowie der Passagenanzahl der Zellen unterliegen und diese Bedingungen in beiden Untersuchungen nicht vergleichbar sind.

Die durch die Kapillarendothelzellen induzierte Änderung des Dämpfungswiderstands weist einige Besonderheiten auf. So führt die Zugabe von Hydrocortison im Falle der PBCEC zu einem Anstieg des inkrementellen Dämpfungswiderstandes um etwa 100 % im Vergleich zu den Zellen, denen das Glucocorticoid nicht zugesetzt wurde. Ein analoger durch HC induzierter Anstieg kann auch für die ECIS-Parameter  $R_b$  und  $\alpha$  beobachtet werden, die die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Kontakte charakterisieren (s. 5.3) Das wirft die Frage auf, inwiefern möglicherweise ein struktureller oder funktioneller Zusammenhang zwischen der Änderung der mikrogravimetrischen und der elektrischen Parameter beider Techniken besteht. So ist der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  unter anderem vom Abstand der Zelle zum Substrat abhängig. Ein verringerter Abstand führt zu einer Zunahme des Wertes von  $\alpha$ . Eine Annäherung der Zelle an ihr Substrat könnte gleichzeitig mit einer Zunahme des Dämpfungswiderstandes verbunden sein. Ein ähnlicher Zusammenhang müsste dann aber grundsätzlich für alle Zellen zu finden sein, d.h. Zelllinien, die eine großen



**Abb. 5.1:** Auftragung von  $(\alpha^2 / r^2)$  gegen  $\Delta R$ . \*Aufgrund der länglichen Morphologie der PBCEC wurde für r der Betrag der kleinen Halbachse eingesetzt.

Dämpfungswiderstand aufweisen, sollten in erster Näherung auch einen hohen Wert für  $\alpha$  zeigen. Abbildung 5.1 zeigt eine Auftragung des von der Zellgröße bereinigten Zell-Substrat-Parameters ( $\alpha^2 / r^2$ ) gegen den Dämpfungswiderstand für alle in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen. Es kann kein eindeutiger und für alle Zellsorten gültiger Zusammenhang zwischen dem mikrogravimetrischen und dem elektrischen Parameter festgestellt werden. So weisen z.B. NRK-Zellen einen hohen Dämpfungswiderstand auf, aber nur einen vergleichsweise kleinen Wert für ( $\alpha^2 / r^2$ ), genau andersherum verhält es sich für die MDCK C7-Zellen. Lediglich die für PBCEC, die mit bzw. ohne Hydrocortison kultiviert wurden, beobachteten Unterschiede bezüglich des inkrementellen Dämpfungswiderstands (PBCEC (-HC) 372  $\Omega$  / PBCEC (+HC) 861  $\Omega$ ) und des zellgrößenbereinigten Parameters ( $\alpha^2 / r^2$ ) (PBCEC (-HC)  $7.39 \cdot 10^6 \Omega$  / PBCEC (+HC)  $5.77 \cdot 10^7 \Omega$ ) legen einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nahe. Dagegen kann für die murinen Kapillarendothelzellen keine hydrocortisoninduzierte Erhöhung des inkrementellen Dämpfungswiderstands gefunden werden (MBCEC (-HC) 493  $\Omega$  / MBCEC (+HC) 494  $\Omega$ ), während der Wert des Parameters  $\alpha$  deutliche Unterschied für die beiden Kultivierungsbedingungen aufwies (MBCEC (-HC)  $13.8 \Omega^{0.5} \text{cm}$  / MBCEC (+HC)  $23 \Omega^{0.5} \text{cm}$ ) (Da keine Werte für die Radien der MBCEC vorliegen, kann nur  $\alpha$  zur Korrelation herangezogen werden). Im Falle der MBCEC führt die Stimulation der Zellen mit Hydrocortison nur zu Änderung der elektrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt, die mikromechanischen Eigenschaften der Zellen bleiben unverändert und sind somit offensichtlich von dieser Änderung unabhängig.

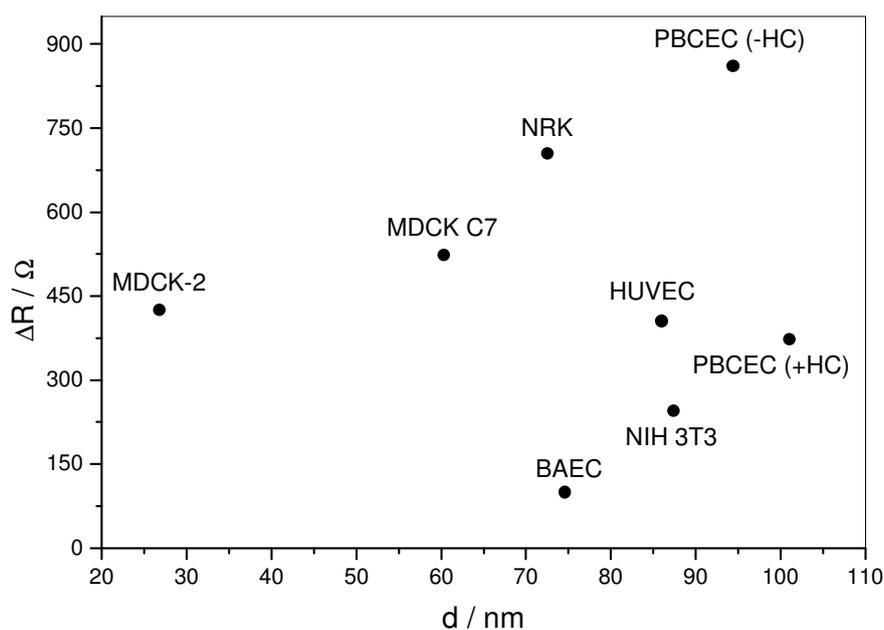
## 5.2 Geometrische Charakterisierung des Adhäsionskontakts mit der FLIC-Mikroskopie

Die FLIC-Mikroskopie an Säugetierzellen (Braun und Fromherz, 1998) ermöglicht den optischen Zugang zur Breite des Spaltes zwischen basaler Zellmembran und Substrat. Die hier untersuchten Zellsorten zeigen Abstände, die zwischen etwa 30 und 100 nm liegen. Allerdings decken die meisten Zellarten nur einen Bereich zwischen 60 und 100 nm ab. Lediglich die MDCK-2 Zellen liegen mit deutlich unter 30 nm dichter am Substrat. Vergleichbare Untersuchungen zur Bestimmung von Zell-Substrat-Abständen mit der FLIC-Mikroskopie finden sich in der Literatur nur wenige. Iwanaga et al. (2001) untersuchten die lokale Korrelation zwischen der Vinculin-Expression und Zellbereichen mit kleinem Zell-Substrat-Abstand an GD25-Fibroblasten. Die Autoren konnten im Gegensatz zur bis dahin gültigen Lehrmeinung keine Korrelation zwischen lokal kleinen Membran-Substrat-

Abständen und entsprechender Expression der Fokalkontakte finden. Für die Fibroblasten wurde ein mittlerer Abstand von 50 nm gemessen. Dieser Wert ist deutlich geringer als der in dieser Arbeit für murine NIH 3T3-Fibroblasten bestimmte, allerdings sind sowohl Zellsorte wie auch Kultivierungsbedingungen verschieden. Braun und Fromherz (1998) untersuchten den Abstand von Neuronen und Gliazellen zur Oberfläche des in der FLIC-Mikroskopie eingesetzten Siliziumchips. Die Autoren konnten dabei die Breite des Spaltes auf etwa 60 bis 100 nm bestimmen. Allerdings stellten sie einen wesentlichen Einfluss der unter den Zellen liegenden Proteinbeschichtung auf den jeweiligen Messwert fest. Astrocyten, die auf einer Lamininbeschichtung kultiviert wurden, waren etwa 40 nm weiter vom Substrat entfernt als die auf einer Fibronectinbeschichtung ausgesäten Zellen. In vorangegangenen Studien wurde von den gleichen Autoren (Braun und Fromherz, 1997) der Abstand von Erythrozytenghosts gemessen, die auf eine Polylysinschicht aufgebracht worden waren. Hier konnte mit 12 nm ein vergleichsweise geringer Zell-Substrat-Abstand detektiert werden. Diese offensichtliche Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung muss auch für die Bewertung der in dieser Arbeit bestimmten Abstände Beachtung finden, da alle hier betrachteten Endothelzellen nur auf einer mit Gelatine bzw. quervernetzter Gelatine versehenen Oberfläche adhäreren. Dies kann möglicherweise die für das Endothel gemessenen relativ ähnlichen Zell-Substrat-Abstände erklären. Trotz dieser Einschränkung erlauben diese Daten den Vergleich von Zellen, die auf der gleichen Oberflächenbeschichtung ausgesät wurden. So ist eine Beurteilung der Abstände der unterschiedlich kultivierten PBCEC zulässig. Der für PBCEC unter hydrocortisonhaltiger Kultivierung gefundene Anstieg der elektrischen ( $\alpha$ ) und mikrogravimetrischen ( $\Delta R$ ) Parameter des Adhäsionskontakts (s. 5.1 bzw. 5.3) ist nach den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen eindeutig nicht auf eine durch die Zugabe von HC induzierte reduzierte Breite des Spaltes zurückzuführen. Der Unterschied im Zell-Substrat-Abstand zwischen den beiden Bedingungen ist nicht signifikant. Somit müssen andere Faktoren für die beobachteten funktionellen Änderungen des Adhäsionskontakts verantwortlich sein. Ein Vergleich der mit der FLIC-Methode bestimmten Zell-Substrat-Abstände  $d$  für PBCEC (+HC) und (-HC) erweist sich allerdings aus präparativen Gründen als problematisch. So konnte anhand von mikrogravimetrischen und elektrischen Untersuchungen gefärbter PBCEC-Zellen eine auf das Präparationsprotokoll zurückzuführende drastische Abnahme des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  und des inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), die möglicherweise auch den Zell-Substrat-Abstand wesentlich beeinträchtigt.

Neben der exogen aufgetragenen Proteinbeschichtung ist ebenso die Beeinflussung des Abstandes durch eine je nach Zellsorte unterschiedliche endogene Sekretion von ECM-Molekülen denkbar. Außerdem kann die Glykokalix von Zellen signifikante Ausmaße annehmen und somit eventuell zum Ergebnis beitragen. So wurden z.B. für Endothelzellen in Abhängigkeit von der Zellart und der verwendeten Technik Werte für die Breite der Glykokalix zwischen 20 nm und 1  $\mu\text{m}$  gefunden (Pries et al., 2000). Für die apikale Membran der meisten Epithelzellen wurden dagegen Werte zwischen 70 und 100 nm bestimmt (Rosenberg, 1995).

Neben der Problematik der Interpretation der Einzelergebnisse hinsichtlich des Beitrags unterschiedlicher zellulärer und subzellulärer Komponenten zur Breite des Spalts stellte sich nach Abschluss der Untersuchung der einzelnen Zellsorten ein zusätzliches technisches Problem dar. Eine routinemäßige Überprüfung eines Siliziumchips zeigte einen über die gesamte Fläche verteilten Abtrag der Oxidschicht um etwa 10 nm (Dieter Braun, persönliche Mitteilung). Da nicht genau nachzuhalten ist, ob der Abtrag linear vorangeschritten ist und wie oft die einzelnen Substrate im Verhältnis zueinander benutzt wurden, lässt sich nur der maximale Einfluss dieses systematischen Fehlers auf 10-15 nm quantifizieren. Da der Fehler die Messungen aller Zelllinien gleichermaßen betrifft, ist nicht von einer Änderung der relativen Abstände der verschiedenen Zellsorten auszugehen. Somit ändert sich die obige Interpretation nicht. Allerdings setzt sich diese systematische Unterbestimmung in die Zahlenwerte des Widerstandes  $\rho_{\text{sub}}$  unter den Zellen fort, da der Zell-Substrat-Abstand für



**Abb. 5.2:** Auftragung des Zell-Substrat-Abstands  $d$  gegen den inkrementellen Dämpfungswiderstand  $\Delta R$ .

dessen Berechnung herangezogen wird. Dieser Einfluss auf den numerischen Wert von  $\rho_{\text{sub}}$  wird an entsprechender Stelle diskutiert.

Zusätzlich zum in 5.1 diskutierten möglichen Zusammenhang zwischen den elektrisch ( $\alpha$ ) und mikrogravimetrisch ( $\Delta R$ ) ermittelten Parametern des Adhäsionskontakts ist auch eine direkte Abhängigkeit des inkrementellen Dämpfungswiderstandes  $\Delta R$  vom Zell-Substrat-Abstand  $d$  denkbar. Um dies zu überprüfen, ist in Abbildung 5.2 der Zell-Substrat-Abstand  $d$  der jeweiligen Zellsorte gegen den entsprechenden inkrementellen Dämpfungswiderstand aufgetragen. Die Abbildung verdeutlicht, dass kein Zusammenhang zwischen dem Dämpfungswiderstand und dem Zell-Substrat-Abstand existiert. Die verschiedenen Zelltypen weisen sehr unterschiedliche inkrementelle Dämpfungswiderstände auf, sind aber bis auf die MDCK-2 Zellen ähnlich weit vom Substrat entfernt. Der für die einzelnen Zellsorten bestimmte Dämpfungswiderstand hängt somit nicht von der Distanz zwischen basolateraler Zellmembran und Kulturoberfläche ab. Damit kann auch ein Einfluss des Abstands  $d$  zwischen Zelle und Substrat auf das QCM-Signal ausgeschlossen werden.

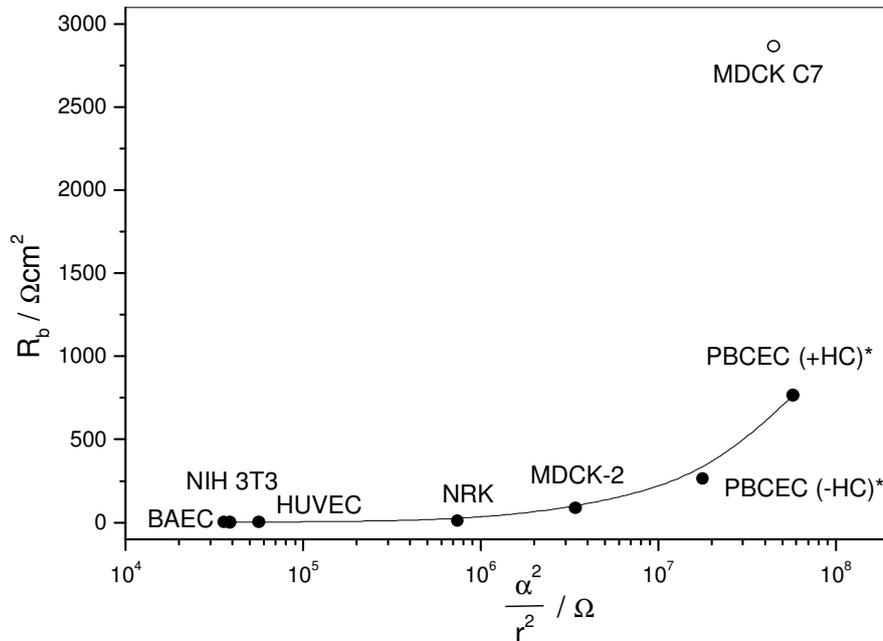
### 5.3 Untersuchung tierischer Zellen mit der ECIS-Methode

Die elektrische Untersuchung konfluenter Zellschichten wird zur Bestimmung der Barriereigenschaften schon lange mit unterschiedlichen Gleich- und Wechselspannungstechniken durchgeführt. Die ECIS-Technik (Giaever und Keese, 1991) ermöglicht seit mehr als einem Jahrzehnt eine detaillierte und quantitative Beschreibung der Zellmorphologie anhand von impedanzspektroskopischen Messungen. Dabei kann neben dem Zell-Zell- auch der Adhäsionskontakt anhand von elektrischen Parametern charakterisiert werden. Diese Methode wird in dieser Arbeit in einer Kombination mit impedanzspektroskopischen Untersuchungen der Zellen auf einem Schwingquarz (*Quarz-Modus*) eingesetzt. Diese von Wegener et al. (2001) vorgestellte Methodenkombination erzielt einen erheblich höheren Informationsgehalt, da es sich um die Verknüpfung einer elektrischen und einer mikrogravimetrischen Messung handelt. So lassen sich aus diesen Untersuchungen für jede Zellspezies für ein und dieselbe Probe die drei elektrischen Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_m$  sowie die mikrogravimetrischen Parameter  $\Delta R$  und  $\Delta L$  bestimmen. Insbesondere die elektrischen Parameter lassen Schlüsse auf zelltypspezifische Eigenschaften und physiologische Aufgaben zu. So können die Zellen anhand des parazellulären Widerstands  $R_b$ , der die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte angibt, in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden.

Die untersuchte Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3, die epithelähnlichen NRK-Zellen sowie die bovinen Aorten- und die humanen Nabelschnurendothelzellen weisen nur kleine bis sehr kleine parazelluläre Widerstände auf ( $1-10 \Omega\text{cm}^2$ ). Dies ist im Falle der Fibroblasten auf die nicht vorhandenen *tight junctions* zurückzuführen, die in vielen epithelialen und endothelialen Zellen für einen dichten Zell-Zell-Kontakt sorgen. BAEC und HUVEC, die zum makrovaskulären Endothel zählen, weisen diskontinuierliche *tight junctions* auf, die die Durchlässigkeit der Zellschicht und die entsprechend niedrigen Widerstände erklären. Die ebenfalls untersuchten mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn der Maus und des Schweins zeigen deutlich höhere Werte für  $R_b$ . Diese Zellen bilden in beiden Spezies die Blut-Hirn-Schranke und müssen daher in der Lage sein, dichte, ionenundurchlässige Zellverbände aufzubauen. Allerdings sind die für die Kapillarendothelzellen aus Schwein bestimmten Widerstände  $R_b$  trotz gleicher physiologischer Aufgabe um eine Zehnerpotenz größer als die der Mäusezellen. (Christian Weidenfeller, Dissertation 2003). In beiden Fällen ist aber eine deutliche Induktion des Widerstandes zu finden, sobald dem Kulturmedium das Serum entzogen und Hydrocortison zugesetzt wird. Die gemessenen  $R_b$ -Werte für PBCEC liegen in der gleichen Größenordnung, wie die TER-Werte, die von Hoheisel et al. (1998) auf Filtersubstraten bestimmt wurden. Die untersuchten Epithelzellen aus dem MDCK-Stamm zeigen die für die beiden Klone bekannten Unterschiede für die Dichtigkeit des Zelllayers (Stevenson et al., 1988). Die Autoren konnten auf permeablen Filtersubstraten für die niedrigohmigen MDCK-2 Zellen Widerstandswerte von  $50-70 \Omega\text{cm}^2$ , für die hochohmigen MDCK C7-Zellen dagegen  $2500-5000 \Omega\text{cm}^2$  bestimmen. Lo et al. (1999) untersuchten MDCK-2 Zellen auf Goldelektroden mit der ECIS-Methode und konnten etwa  $60 \Omega\text{cm}^2$  für  $R_b$  messen. Die in dieser Arbeit detektierten Werte für  $R_b$  stimmen mit denen aus beiden Studien gut überein.

Die Kultivierung der Zellen auf Goldelektroden ermöglicht zusätzlich zur Messung des parazellulären Widerstandes die Bestimmung des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$ , der den Adhäsionskontakt elektrisch charakterisiert. Vergleichbare Literaturwerte für  $\alpha$  existieren nur für MDCK-2 Zellen (Lo et al., 1999). Die Autoren ermittelten mit  $18 \Omega^{0.5}\text{cm}$  einen Mittelwert für  $\alpha$ , der dem in dieser Arbeit detektierten nahezu entspricht. Allgemein weisen die hier für  $\alpha$  bestimmten Werte aller Zellen deutliche Analogien zum jeweils zugehörigen parazellulären Widerstand  $R_b$  auf. So kann für Zellen mit geringer parazellulärer Dichtigkeit wie die untersuchten Fibroblasten, die NRK-Zellen sowie die makrovaskulären Endothelzellen nur ein kleiner Wert für  $\alpha$  gefunden werden. Für die parazellulär sehr dichten Zellen ergibt sich ein analoger Zusammenhang. Das lässt vermuten, dass die elektrisch unabhängigen

Eigenschaften in den beiden Spalten zwischen den Zellen sowie zwischen Zelle und Substrat möglicherweise funktionell miteinander verknüpft sind. Dafür spricht auch der gleichzeitige Anstieg der Parameter  $\alpha$  und  $R_b$  der beiden Endothelzellspezies nach Zugabe von Hydrocortison. Eventuell kann nur dann eine niedrige Leitfähigkeit innerhalb des



**Abb. 5.3:** Auftragung von  $(\alpha^2 / r^2)$  gegen den parazellulären Widerstand  $R_b$ . Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen kubischen Spline. \*Aufgrund der länglichen Morphologie der PBCEC wurde für  $r$  der Betrag der kleinen Halbachse eingesetzt.

Adhäsionskontakts gemessen werden, wenn die Zellen eine hohe parazelluläre Dichtigkeit aufweisen. Sobald ein praktisch freier Ionenaustausch zwischen dem Kulturmedium und dem Interzellularspalt gegeben ist (wie z.B. für NIH 3T3 Zellen), kann möglicherweise auch eine freie Diffusion der Ionen in den Subzellulärspalt erfolgen und für einen Ausgleich der spezifischen Widerstände im Spalt und im Kulturmedium sorgen, was sich direkt im Parameter  $\alpha$  widerspiegeln würde. Abbildung 5.3 zeigt eine Auftragung von  $(\alpha^2 / r^2)$  gegen den parazellulären Widerstand  $R_b$ . Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Parametern wird über einen kubischen Spline angedeutet. MDCK C7-Zellen fallen aus diesem potentiellen Zusammenhang heraus. Dies liegt möglicherweise an einer fehlerhaften Ermittlung des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$ , da das ECIS-Modell bei hohen parazellulären Widerständen, wie sie für diesen Zelltyp bestimmt werden konnten, gegenüber dem Parameter  $\alpha$  deutlich an Sensitivität einbüßt.

Die in dieser Arbeit ermittelte flächennormierte Membrankapazität  $C_m$  sollte Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Plasmamembran erlauben. Die Kapazität wird durch die

Komposition und die Topographie der Membran beeinflusst. So beträgt die flächennormierte Kapazität einer Lipiddoppelschicht ( $\epsilon_r \approx 2$ ;  $d \approx 4$  nm) etwa  $0.44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Adam et al.), für die spezifische Membrankapazität einer ideal flachen Zellmembran ist unabhängig vom Zelltyp aber ein Wert von etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt worden. Diese Differenz ist auf den Wasser- und Proteinanteil einer zellulären Plasmamembran im Vergleich zur proteinfreien Lipiddoppelschicht zurückzuführen. Größere Auffaltungen der Membran führen ebenfalls zu einer Vergrößerung der Membrankapazität, da die effektive Oberfläche dadurch entsprechend erhöht wird. Da bei der Berechnung der flächenspezifischen Membrankapazität jedoch immer die Grundfläche der Zelle zugrunde gelegt wird und nicht ihre tatsächliche Oberfläche, führen Membraneinfaltungen formal zu einer entsprechenden Erhöhung der spezifischen Membrankapazität. Für die in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen wurden Membrankapazitäten gefunden, die für alle Zellen abgesehen von den Epithelien des MDCK-Stammes in der Nähe des Wertes einer glatten Zellmembran liegen. Die marginalen Unterschiede in der Kapazität zwischen den einzelnen Endothel- bzw. Fibroblastenzelllinien sind vermutlich auf zelltypspezifische Membranzusammensetzungen zurückzuführen. Die Ursache für die vergleichsweise hohen Membrankapazitäten der MDCK-Zellen sind durch Oberflächeneinfaltungen wie Mikrovilli hervorgerufene Membranvergrößerungen. Zellen, die Membrankapazitäten zeigen, die deutlich unterhalb von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  liegen, wachsen entweder nicht nur in einer Monoschicht (NIH 3T3) oder überlappen zumindest teilweise mit ihren Ausläufern (MBCEC). Dies führt zur elektrischen Detektion von mehr als einer Lipiddoppelschicht in Serie und resultiert in einer dementsprechenden Kapazitätserniedrigung. Anhand solcher Kapazitätsmessungen lassen sich somit morphologische und funktionelle Aussagen über die untersuchten Zelltypen treffen.

Eine bei der Bestimmung der ECIS-Parameter nicht betrachtete Variable ist der jeweilige Membranwiderstand. Das Ersatzschaltbild, das die elektrischen Eigenschaften der Zellen beschreibt, berücksichtigt nur ein rein kapazitives Verhalten der Zellmembran und geht damit von einem beliebig großen Membranwiderstand aus. Um eine Verfälschung der Messergebnisse auszuschließen, wurde in einer Modellrechnung exemplarisch für MDCK-2 Zellen überprüft, wie weit der Membranwiderstand absinken darf, bis es zu einer falschen Ermittlung der ECIS-Parameter kommt. Da anhand dieser Simulationen der Membranwiderstand erst ab Werten von deutlich unter  $500 \Omega\text{cm}^2$  Einfluss auf die Parameter gewinnt und ein für tierische Zellen typischer Membranwiderstand bei  $10 \text{k}\Omega\text{cm}^2$  (Asami et al., 1990: HeLa-Zellen) liegt, kann von der Eignung des Ersatzschaltbildes für die hier betrachtete Situation ausgegangen werden.

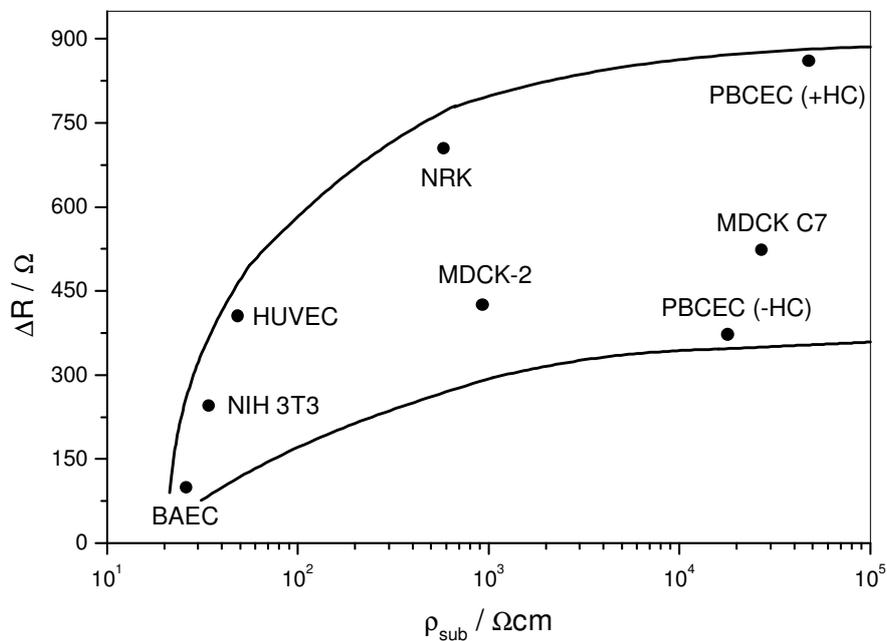
## **Elektrische Charakterisierung des Subzellularspalts anhand des spezifischen Widerstands $\rho_{\text{sub}}$**

Über die elektrischen Eigenschaften im Spalt zwischen Zelle und Substrat war bislang nicht viel bekannt. Möglicherweise weicht der dortige spezifische Widerstand aufgrund der Anwesenheit polyionischer Makromoleküle und der räumlichen Begrenzung wesentlich von dem des über der Zelle befindlichen Kulturmediums ab. Da eine direkte Messung dieser subzellulären elektrischen Eigenschaften nur mit großem technischem Aufwand durchführbar ist und bisher nur von Kiessling et al. (2000) an einer Population von Einzelzellen gezeigt wurde, wird dieser spezifische Widerstand  $\rho_{\text{sub}}$  in dieser Arbeit indirekt über eine Kombination von FLIC-Mikroskopie und ECIS-Messungen bestimmt. Der aus den impedanzspektroskopischen Messungen der elektrischen Eigenschaften der Zellen zugängliche Parameter  $\alpha$  ist vom durchschnittlichen Radius einer Zelle, dem Abstand dieser Zelle vom Substrat sowie dem spezifischen Widerstand  $\rho_{\text{sub}}$  zwischen Zelle und Substrat abhängig. Die Messung des Zell-Substrat-Abstandes und des mittleren Radius einer Zelle des jeweiligen konfluenten Zelllayers ermöglicht so bei einem bekannten Wert von  $\alpha$  die Errechnung eines mittleren spezifischen Elektrolytwiderstandes im Adhäsionskontakt. Die für die verschiedenen Zellsorten ermittelten spezifischen Widerstände unterscheiden sich um einige Zehnerpotenzen voneinander und erreichen Werte, die teilweise unter dem des Kulturmediums (50-60  $\Omega\text{cm}$ ) liegen (NIH 3T3, BAEC, HUVEC) sowie Beträge, die bis zu 50  $\text{k}\Omega\text{cm}$  (PBCEC) reichen. Auf Basis des ECIS-Modells lässt sich dieses Verhalten damit näher beleuchten, dass sich der spezifische Elektrolytwiderstand  $\rho_{\text{sub}}$  zu  $\alpha^2$  proportional und zum Quadrat des Radius antiproportional verhält. Zelltypen, die einen großen Wert für  $\alpha$  aufweisen und gleichzeitig einen sehr kleinen mittleren Radius besitzen, zeigen einen dementsprechend hohen spezifischen Elektrolytwiderstand. Dagegen erhöht ein verringerter Abstand der Zellen vom Substrat den Wert von  $\rho_{\text{sub}}$  weniger, da die Breite des Spaltes nicht quadratisch in die Rechnung eingeht. Dies spiegelt sich in den für MDCK C7 und PBCEC gefundenen maximalen spezifischen Elektrolytwiderständen wider. Auf Basis dieser Daten ist die generelle Annahme, dass die elektrischen Verhältnisse im Spalt mit denen im Kulturmedium identisch sind, nicht zulässig, sondern von der individuellen Architektur des Adhäsionskontaktes und dem Zelltyp abhängen. Unterstützung dieses Befundes ergeben sich aus direkten elektrischen Messungen an einzelnen Erythrozyten, für die etwa ein gegenüber dem spezifischen Elektrolytwiderstand des Mediums vierfach überhöhter spezifischer Elektrolytwiderstand unter den Zellen gefunden wurde (Kiessling et al., 2000).

Eine annähernde Übereinstimmung der elektrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt und in der *bulk*-Phase über den Zellen scheint lediglich für Zellen ohne wesentliche Barriereigenschaften gültig zu sein, die nach den Messungen in dieser Arbeit auch immer einen sehr kleinen Wert für  $\alpha$  aufweisen. Zumindest für die hier untersuchten NIH 3T3, BAEC und HUVEC kann vermutet werden, dass zwischen dem Adhäsionskontakt und dem überstehenden Kulturmedium ein freier Austausch von Ionen möglich ist und sich somit auch ein identischer spezifischer Widerstand zwischen Zelle und Substrat einstellt. Dies erklärt auch die Beobachtung, dass Zellen mit einem hohen parazellulären Widerstand  $R_b$  einen ebenfalls hohen Wert für den Impedanzbeitrag  $\alpha$  zeigen, da  $\alpha$  direkt vom spezifischen Widerstand  $\rho_{\text{sub}}$  abhängt. Warum die Werte für  $\rho_{\text{sub}}$  teilweise unterhalb des Widerstandes des Kulturmediums liegen, kann nicht ohne weiteres erklärt werden. Eventuell rührt dies aus der Streuung der Einzelparameter, die aus den FLIC-Messungen, der Bestimmung des Radius und den impedanzspektroskopischen Messungen hervorgehen. Die für die barrierebildenden Zelltypen gefundenen stark erhöhten spezifischen Widerstände im Spalt zeigen, dass im Adhäsionskontakt dieser Zellen offenbar wesentlich andere elektrische Verhältnisse herrschen, als dies für Zellen ohne Zell-Zell-Interaktionen der Fall ist. Möglicherweise spielen hier elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Zelle und ihrem Substrat oder eine stark herabgesetzte Mobilität der Ionen eine Rolle. Diese könnte ihre Ursache in einer im Adhäsionskontakt gegenüber dem Kulturmedium signifikant erhöhten Viskosität haben. Ein zellvermittelter Ionentransport ist als Grund für den experimentellen Befund ebenfalls denkbar, da aufgrund des kleinen Volumens im Adhäsionskontakt eine kleine Änderung der Ionenkonzentration zu einer deutlichen Konzentrationsänderung führt.

Ein Vergleich der Änderungen der Dämpfungswiderstände (s. 5.1) mit den entsprechenden spezifischen Widerständen der verschiedenen Zelltypen lässt keinen allgemeingültigen Zusammenhang erkennen. Abbildung 5.4 zeigt dies in der Auftragung des spezifischen Elektrolytwiderstands  $\rho_{\text{sub}}$  gegen den inkrementellen Dämpfungswiderstand  $\Delta R$ . Die eingezeichnete Einhüllende soll keine funktionelle Abhängigkeit der Parameter aufzeigen, sondern nur ein paar allgemeine Beobachtungen verdeutlichen. So konnten in dieser Arbeit keine Zellen gefunden werden, die einen sehr kleinen spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt und gleichzeitig einen sehr großen inkrementellen Dämpfungswiderstand aufweisen. Ebenso besitzen Zellen, für die ein sehr großer spezifischer Elektrolytwiderstand  $\rho_{\text{sub}}$  bestimmt wurde, immer einen mittleren inkrementellen Dämpfungswiderstand, der größer als  $300 \Omega$  ist.

Ähnlich wie für den Parameter  $\alpha$  (s. 5.3) scheint keine Abhängigkeit zwischen der Beeinflussung der Scherschwingung durch individuelle Zelltypen und dem spezifischen Widerstand unter den Zellen zu bestehen.



**Abb. 5.4:** Auftragung des spezifischen Elektrolytwiderstands  $\rho_{\text{sub}}$  gegen den inkrementellen Dämpfungswiderstand  $\Delta R$ . Die eingezeichnete Einhüllende kennzeichnet keinen funktionellen Zusammenhang der beiden Parameter, sondern dient lediglich zur Orientierung.

#### 5.4 Einfluß der chemischen Vernetzung des zellulären Proteingerüsts auf das QCM-Signal

Da die Interpretation der zelltypspezifischen inkrementellen Dämpfungswiderstandsänderungen aufgrund der nicht vollständig bekannten mechanischen Einflüsse der unterschiedlichen Zellkomponenten auf das QCM-Signal schwierig ist, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer chemischen Vernetzung des Zellproteins auf die mikrogravimetrischen Parameter von Zellen untersucht. Da Hoh und Schoenenberger (1994) mittels AFM-Messungen an MDCK-2 Zellen die Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften des Zelllayers nach der Vernetzung mit Glutardialdehyd zeigen konnten, wurden QCM-Messungen an GA- und PFA-behandelten Zellen durchgeführt.

Der durch Vernetzung der zellulären Proteine induzierte Anstieg des Dämpfungswiderstandes zeigt die Änderung der mechanischen Zelleigenschaften. Die Zugabe von GA erhöht den inkrementellen Dämpfungswiderstand  $\Delta R$  der Zellschicht etwa auf den fünffachen Wert. Die Fixierung mit PFA hat eine deutlich geringere Zunahme von  $\Delta R$  zur Folge, im Mittel kann

gegenüber den vitalen Zellen nur eine Verdopplung des Dämpfungswiderstandes gefunden werden. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die strukturellen Unterschiede von GA und PFA zurückführbar. So induziert GA als Dialdehyd eine Quervernetzung von Proteinen in einem definierten Abstand, wohingegen PFA aufgrund seiner Polymereigenschaften vermutlich unterschiedlich verknüpfte Strukturen erzeugt. Möglicherweise führt das eher zu einem lockeren Verbund der miteinander gekoppelten Proteine, da die Verbrückung vergleichsweise wesentlich länger und undefinierter sein kann als die im Falle des GA (<http://www.roempp.com>), wo immer eine Verbindung gleicher Länge und Struktur resultiert. Ein weiterer Punkt, der die unterschiedlichen Effekte erklären könnte, ist die möglicherweise geringere Stabilität von PFA, da sich innerhalb des gesamten Polymers zusätzliche Aldehydfunktionen befinden, die weitere Reaktionen eingehen können. Glutardialdehyd erzeugt dagegen eine definierte, chemisch äußerst stabile Verbindung zwischen zwei Aminogruppen. Diese Quervernetzung sorgt für eine ausgeprägte Versteifung der Zellen. Dies wurde schon von verschiedenen Autoren mittels *atomic force microscopy* gezeigt (Hoh und Schoenenberger, 1994; Wu et al., 1998).

Die anschließende Zerstörung der Integrität der Zellmembran durch eine Permeabilisierung mit dem Detergenz Triton-X-100 ändert den Dämpfungswiderstand für beide Fixierungsprotokolle nicht wesentlich. Das legt den Schluss nahe, dass die mikrogravimetrischen Parameter der Zellschicht im fixierten Zustand ausschließlich durch Proteinbestandteile bestimmt wird, die Plasmamembran und das im Cytoplasma eingeschlossene Wasser jedoch nicht merklich beitragen. Gerade der Wassereinschluss im Cytoplasma wurde schon mit dem QCM-Signal adhärenter Zellen in Verbindung gebracht (Reiß et al., 2003). Eine mikrogravimetrische Untersuchung der Permeabilisierung lebender Zellen wurde nicht vorgenommen, da dies zur sofortigen Ablösung der Zellkörper vom Substrat führte.

Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurden weitere Experimente durchgeführt, die die Ursache der beobachteten Änderungen der mikrogravimetrischen Parameter aufklären sollten. Dazu muss zuerst sichergestellt sein, dass die Modulation der QCM-Parameter unabhängig von der Zellspezies ist. Daher wurden NRK-Zellen in gleicher Weise wie MDCK-2 Zellen mit GA behandelt und auf eine Änderung der mikrogravimetrischen Parameter hin untersucht. Da im Mittel eine Zunahme des Dämpfungswiderstands auf etwa den vierfachen Wert festgestellt wurde, ist davon auszugehen, dass es sich um einen zelltypunabhängigen Effekt handelt. Weil eine Fixierung der Zellschicht auch immer mit der chemischen Veränderung der ECM einhergeht, wurde der Einfluss der Vernetzung einer prä-adsorbierten Proteinschicht auf

die Oszillation des Quarzes untersucht. In Übereinstimmung mit Wegener et al. (2000) kann weder für die native noch für die chemisch quervernetzte Gelatineschicht ein inkrementeller Dämpfungswiderstand gemessen werden, dessen Betrag einen Wert von  $50 \Omega$  übersteigt. Der durch die Proteinschicht induzierte Dämpfungswiderstand nimmt sogar nach der Vernetzung leicht ab, was auf eine Abnahme der dissipativen Eigenschaften des Proteins hindeutet. Diese werden bei einer schon vergleichsweise rigiden Proteinschicht durch die Vernetzung vermutlich weiter reduziert, da die Proteine mechanisch fester aneinander gekoppelt werden und somit die Proteinschicht sich insgesamt versteift. Ein weiterer Grund für diesen Effekt könnte auch eine durch die Vernetzung der Proteinschicht deutliche Reduzierung des Wasseranteils im Protein sein, da möglicherweise hydrophile Kavitäten in der Gelatineschicht durch die Quervernetzung beeinträchtigt werden.

Da Wegener et al. (2000) einen drastischen Effekt von hyperosmolaren Medien auf die mikrogravimetrischen Parameter einer Zellschicht feststellen konnten, die durch die Zugabe unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen zum Kulturmedium induziert wurden, erfolgte auch in dieser Arbeit eine Untersuchung, inwieweit der durch die Vernetzungsreaktion induzierte Effekt auf osmotischen Gründen beruht. Die Autoren hatten mit zunehmender Osmolarität einen Anstieg des Dämpfungswiderstands der Zellschicht um ein vielfaches beobachtet, der durch die Umstellung der Zellen auf isotonisches Medium umzukehren war. Dies wurde weniger auf eine Volumenänderung der Zellen als auf eine osmotische Beeinflussung des Adhäsionskontaktes zurückgeführt.

Da die in dieser Arbeit verwendete GA-Konzentration einer Änderung der Osmolarität um  $250 \text{ mOsm/l}$  entspricht, wurde in einem Versuch dem Zellkulturmedium von MDCK-2 Zellen eine entsprechende Saccharosekonzentration ( $250 \text{ mM}$ ) zugesetzt und die Änderung des Dämpfungswiderstandes gegen die Zeit registriert. Es wurde eine Zunahme von  $\Delta R$  um den Faktor zwei beobachtet. Dies deutet auf einen möglichen osmolaren Einfluß des Fixierungsreagenzes hin. Allerdings lassen sich mit diesem Experiment nicht die mehr als doppelt so großen Zunahmen des Dämpfungswiderstandes erklären, die durch die Zugabe von Glutardialdehyd im Mittel erreicht werden. Außerdem konnte sowohl von Wegener et al. (2000) als auch in dieser Arbeit eine schnelle Reversibilität des Osmolarität-induzierten Effektes gezeigt werden, sobald das hypertone Medium wieder gegen isotones ausgetauscht wurde. Da sämtliche fixierten Zellschichten nach der Präparation wieder auf normales Zellkulturmedium umgestellt und erst danach elektrisch bzw. mikrogravimetrisch charakterisiert wurden, hätte im Falle eines rein osmotischen Effekts keine Änderung der viskoelastischen Parameter detektiert werden können. Da dies nicht der Fall ist, kann die

durch das Fixans hervorgerufene Osmolaritätsänderung nicht der wesentliche Grund für den Anstieg des Dämpfungswiderstands sein. Ein zusätzlicher Grund, der gegen diese Vermutung spricht, ist die Tatsache, dass Glutardialdehyd im Gegensatz zu Saccharose zellpermeabel ist und so einen wesentlich geringeren Einfluss auf das Zellvolumen nimmt.

Eine Untersuchung der Kinetik der chemisch induzierten Veränderung der zellulären Mechanik sollte genauere Aussagen über den Reaktionsverlauf liefern. Die zeitaufgelöste Detektion des Dämpfungswiderstandes nach Zugabe der Fixantien zeigt deutlich, dass es sich um äußerst schnelle Reaktionen handelt. Innerhalb weniger Minuten hat der Dämpfungswiderstand sein Maximum erreicht und das System befindet sich wieder im Gleichgewicht. Die Reaktion der Zellschicht mit Paraformaldehyd scheint sogar noch etwas schneller abzulaufen als die Fixierung mit Glutardialdehyd. Ein Problem der Messung ist in diesem Fall aber die zu geringe Zeitauflösung. Für die impedanzspektroskopische Bestimmung der Schwingungsparameter sind etwa 30 bis 60 s erforderlich. In dieser Zeit schreitet die Reaktion besonders zu Beginn aber sehr schnell fort. Ein direkter Vergleich zwischen den beiden Reagenzien ist in jedem Fall nicht zulässig, da die jeweiligen Konzentrationen nicht identisch sind und im Falle des PFA auch nur schwer bestimmt werden können, da dazu eine Kenntnis der mittleren Kettenlänge des Polymers nötig wäre. Allerdings kann durch Reaktion einer MDCK-2 Zellschicht mit zehnfach verdünnter Glutardialdehyd-Lösung eine Konzentrationsabhängigkeit des Reaktionsverlaufes gezeigt werden. Die Kinetik bei Verwendung von 0.25 %iger Glutardialdehyd-Lösung ist eine vollständig andere. Die Reaktion erreicht erst nach mehreren Stunden eine Gleichgewichtslage, bis dahin steigt der Dämpfungswiderstand stetig an. Der Gleichgewichtswert entspricht aber hier wie auch in den anderen Experimenten zur Kinetik den zuvor stationär bestimmten Werten. Die Tatsache, dass lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Reagenzes abhängt, nicht aber die resultierende Änderung des Dämpfungswiderstands, zeigt, dass diese Zunahme lediglich auf die Vernetzung der zellulären Proteine zurückzuführen ist. Nebenreaktionen spielen somit vermutlich keine Rolle.

Um zu überprüfen, in welchem Maß das Aktincytoskelett für die Zunahme des Dämpfungswiderstands verantwortlich ist, wurde die Proteinvernetzung auch an Zellschichten durchgeführt, deren Aktincytoskelett durch Behandlung mit Cytochalasin D zerstört worden war. Eine selektive Zerstörung des Aktincytoskeletts vor der Fixierung des Zelllayers sollte für einen deutlich verringerten Anstieg des Dämpfungswiderstands sorgen, falls das Aktincytoskelett an der Zunahme von  $\Delta R$  beteiligt ist. Der durch Cytochalasin D induzierte Abbau des f-Aktins äußert sich in einem Rückgang des Dämpfungswiderstandes um 25 %

(s. Wegener et al., 2000). Zusätzlich geht diese Manipulation mit dem Abbau der barrierebildenden Zell-Zell-Kontakte einher und lässt sich somit auch anhand von ECIS-Messungen verfolgen (Daten nicht gezeigt). Eine sich an die vollständige Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts anschließende Fixierung zeigte einen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen um die Hälfte reduzierten Anstieg von  $\Delta R$ . Ein wesentlicher Anteil der Änderung des Dämpfungswiderstandes ist somit auf die Vernetzung des Aktincytoskeletts zurückzuführen, die nach dem Abbau des f-Aktins zu punktförmigen Strukturen nicht mehr stattfinden kann. Möglicherweise haben aber auch andere Cytoskelettbestandteile, eine chemische Vernetzung der Membranproteine oder zu einem sehr geringem Maß ein osmotischer Effekt des Fixierungsreagenzes Anteil an der Zunahme des Dämpfungswiderstandes. Diese Messung bestätigt die Vermutung von Wegener et al. (2000), die anhand der durch Cytochalasin D hervorgerufene Abnahme des Dämpfungswiderstandes auf eine Beteiligung des Aktingerüsts am QCM-Signal von Säugetierzellen geschlossen haben. Die vergleichsweise geringe Abnahme (25 %) lässt aber darauf schließen, dass das Aktincytoskelett im Falle von vitalen Zellen nur zu einem kleineren Teil zum Gesamtdämpfungswiderstand beiträgt. Im Falle der Fixierung Cytochalasin-behandelter Zellen kann eine Zunahme des inkrementellen Dämpfungswiderstands beobachtet werden, der etwa die Hälfte des für die Fixierung nativer Zellen bestimmten Wertes beträgt. Somit tragen neben dem vernetzten Aktincytoskelett noch weitere durch die Fixierungsreagenzien chemisch manipulierte Proteinkomponenten der Zelle zum Anstieg von  $\Delta R$  bei. Die Reaktion des Aktincytoskeletts mit dem Fixans sorgt möglicherweise für eine Quervernetzung des Aktincortex sowie der Stressfasern und führt so zu einer verbesserten mechanischen Kopplung der einzelnen Aktinfasern untereinander, die diese drastische Steigerung des Dämpfungswiderstandes auslöst. Dies könnte ebenfalls den im Falle der Vernetzung der Zellen mit Paraformaldehyd geringeren Effekt auf den Dämpfungswiderstand erklären. Da PFA aufgrund seiner polymeren Struktur keine definierte Kettenlänge besitzt, kann eine definierte Verbrückung von Aminogruppen, wie sie durch GA erzeugt wird, durch Paraformaldehyd nicht hervorgerufen werden. Dadurch ist der Grad der Versteifung der Zellschicht vermutlich deutlich reduziert. Die unterschiedliche Wirkung von GA und PFA auf die Elastizität von MDCK-2 Zellen sowie die Beteiligung des Aktincytoskeletts an diesen Effekten wurde in dieser Arbeit auch noch mittels *atomic force microscopy* untersucht. Diese Technik wird standardmäßig zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften von Zellen eingesetzt und ermöglicht eine quantitative Beschreibung anhand des Elastizitätsmodulus. Ein Vergleich der Daten kann möglicherweise

weitere Hinweise darauf geben, wie die mikrogravimetrischen Daten zu interpretieren sind und welche Teile der Zelle in die Erhöhung des Dämpfungswiderstandes involviert sind.

Die parallel zu den mikrogravimetrischen Untersuchungen durchgeführten ECIS-Messungen zeigen deutliche Abnahmen des parazellulären Widerstands  $R_b$  und der Membrankapazität  $C_m$  nach Zugabe von Glutardialdehyd. Anscheinend führt die Reaktion der Membranproteine mit dem Dialdehyd zu einer zumindest funktionellen Modulation der Zell-Zell-Kontakte. Vermutlich führt die Vernetzung der Proteine im *tight junction* Bereich zu einer Inaktivierung des gesamten Proteinkomplexes und somit zu einer höheren Permeabilität. Die anhand der Änderung der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  feststellbare Topographieänderung der Oberfläche kann nur mit einer Reduzierung der Membraneinfaltungen verbunden sein. Diese resultiert möglicherweise auch aus der chemischen Vernetzung des Aktincytoskeletts, das die Mikrovilli in vitalen Zellen unterstützt. Analoge Ergebnisse werden für die elektrischen Eigenschaften von MDCK-2 Zellen gefunden, die mit Paraformaldehyd fixiert wurden. So ist der Effekt von PFA auf die elektrischen Parameter der Zellen nahezu identisch. Neben einer deutlichen Abnahme des parazellulären Widerstands  $R_b$  und der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  kann ein durch die Proteinvernetzung unbeeinflusster Parameter  $\alpha$  beobachtet werden. Die Konstanz des Parameters  $\alpha$  bei Fixierung der Zellen wird durch den Vergleich des Zell-Substrat-Abstandes PFA-fixierter und nativer MDCK-2 Zellen bestätigt. Die mittels FLIC-Mikroskopie bestimmten mittleren Abstände weichen nicht signifikant voneinander ab. Von einer Bestätigung dieses Messergebnisses für GA musste abgesehen werden, da Glutardialdehyd zu einer starken Autofluoreszenz der Probe führt (Tagliaferro et al., 1997). Die unabhängig von der chemischen Struktur des Vernetzungsreagenzes festgestellten Effekte auf die elektrischen Parameter von MDCK-2 Zellen legen nahe, dass nur die eigentliche Vernetzungsreaktion der Aldehyde mit den Aminogruppen der Proteine für die Änderungen der Zellmorphologie verantwortlich ist. Aus diesen elektrischen Messungen ergibt sich allerdings eine Konsequenz für an fixierten Zellen durchgeführte strukturelle Untersuchungen der molekularen Komposition des Zell-Zell-Kontaktes. Die Präparation mit einem Fixierungsreagenzes resultiert immer in einer Veränderung der *tight junctions*. Damit erfolgen alle diese Untersuchungen an Zell-Zell-Kontakten, die präparationsbedingt nicht mehr funktionell sind.

Eine sich an das jeweilige Fixierungsprotokoll anschließende Permeabilisierung der Zellschicht mit verdünnter Triton-X-100-Lösung zerstört die nach der Fixierung noch vorhandenen Barriereigenschaften der Zellkörper völlig. Dies ist auf die durch das Detergenz induzierte punktuelle Öffnung der apikalen und basolateralen Membran zurückzuführen.

Damit verlieren die Zellkörper ihre isolierenden Eigenschaften und die Gesamtimpedanz des Systems wird nur noch durch die Elektrode und den Elektrolyten bestimmt.

Die nach einem Verfahren von Giaever und Keese (1984; 1991) durchgeführten elektrischen Messungen zur Motilität von nativen und fixierten Zellen stützen die Einschätzung, dass die Vernetzung des Zellproteins im Allgemeinen und des Cytoskeletts im Besonderen der Grund für die veränderten mikromechanischen Eigenschaften der Zelle ist. Da die untersuchten Zellen nach Zugabe von Glutardialdehyd eine deutlich reduzierte Beweglichkeit zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass das für die Zellmotilität entscheidend verantwortliche Aktingerüst der Zelle durch die Fixierung versteift und dadurch die Reduzierung der Motilität ausgelöst wird.

Die AFM-Technik wird standardmäßig als eine Methode zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften von Zellen benutzt. Daher wurde die durch die Vernetzung zellulärer Proteine induzierten mechanischen Änderungen der Zellschicht auch mit der AFM-Technik untersucht und verifiziert. Dazu werden an den adhären Zellschichten für die verwendeten experimentellen Bedingungen Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet, die eine Quantifizierung des Einflusses der chemischen Vernetzung auf die untersuchte Zellschicht ermöglichen. Der drastische Anstieg der Steifheit der Zellschicht nach Behandlung mit Glutardialdehyd oder Manipulation mit anderen quervernetzenden Reagenzien, wie 3,3'-Dithiobis(sulphosuccinimidylpropionat) (DTSSP) oder Concanavalin A, wurde von Hoh und Schoeneberger (1994) bzw. Wu et al. (1998) bereits gezeigt. Der Einfluss des Aktincytoskeletts auf die Elastizität des Zelllayer wurde ebenfalls nachgewiesen. Rotsch und Radmacher (2000) untersuchten die Wirkung verschiedener Aktin-abbauender Substanzen wie Cytochalasin B und D, Latrunculin und Jasplakinolide auf die viskoelastischen Eigenschaften von Zellen. Die Autoren konnten so den Zusammenhang zwischen der induzierten Auflösung des Aktincytoskeletts und einem abnehmenden Elastizitätsmodulus der Zellen herstellen. Die in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen bestätigen eine enorme Veränderung der Zellelastizität nach Zugabe von GA, die mit den Resultaten der mikrogravimetrischen Untersuchungen zu korrelieren sind. Im Vergleich zu vitalen Zellen wird in etwa ein zehnfach höherer Elastizitätsmodulus gefunden. Allerdings kann in den AFM-Untersuchungen für die Behandlung der Zellen mit PFA lediglich eine sehr kleine Zunahme des Elastizitätsmodulus nach der Fixierung bestimmt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die mikrogravimetrischen Experimente auch für PFA eine deutliche Änderung der zellabhängigen Messparameter an. Möglicherweise sind die durch die beiden unterschiedlichen Techniken detektierten Zellveränderungen nicht direkt miteinander

vergleichbar, da die AFM-Technik vor allem auf die Messung von Prozessen an der Zelloberseite beschränkt ist, während die Mikrogravimetrie nur Effekte im Adhäsionskontakt der Zelle erfasst. Die Untersuchung von MDCK-2 Zellen, deren Cytoskelett zuerst mit Cytochalasin D abgebaut wurde und die danach fixiert wurden, ergibt ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen der Mikrogravimetrie und den AFM-Messungen. Während die mikrogravimetrischen Untersuchungen nach Zerstörung des Aktincytoskeletts einen im Vergleich zu nicht-vernetzten Zellen noch deutlich erhöhten inkrementellen Dämpfungswiderstand zeigen, liegt der mit der AFM-Technik bestimmte Elastizitätsmodulus dieser Zellen lediglich im Bereich von nativen, unbehandelten Zellen. Somit inhibiert die Zerstörung des Aktincytoskeletts offensichtlich eine Zunahme des Elastizitätsmoduls der Zellschicht nach der Fixierung. Diese Messungen bestätigen die akzeptierte Meinung, dass das Aktingerüst einen wesentlichen Beitrag zu den mechanischen Eigenschaften der Zelle leistet. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Rotsch und Radmacher (2000), die allgemein einen Verlust der Zellrigidität bei Abbau des Aktincytoskeletts feststellten. Die Verstärkung der mechanischen Eigenschaften der Zelle durch die induzierte Quervernetzung des Aktincytoskeletts mit Glutardialdehyd zeigt den Zusammenhang zwischen Zellelastizität und Aktingerüst in analoger Weise. Mit Hilfe anderer ähnlich wirkender Reagenzien konnten eine derartige Verstärkung des Elastizitätsmodulus von Wu et al. (1998) gezeigt werden. Diese Untersuchungen sowie die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Behandlung eines Zelllayers mit vernetzenden Reagenzien zu einer Versteifung des Zellkörpers führt. Dies kann mit der für diese Anwendung etablierten AFM-Technik anhand eines deutlich erhöhten Elastizitätsmoduls quantifiziert werden. Eine Bestimmung der mikromechanischen Zelleigenschaften mit der QCM führt zu tendenziell analogen Ergebnissen. So kann mit beiden Methoden die unterschiedliche starke Vernetzungsfähigkeit von PFA und GA detektiert werden. Deutliche Unterschiede zeigen sich aber für Zellen, deren Aktincytoskelett vor der Fixierung abgebaut wurde.

## **5.5 Einfluß von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die elektrischen und mechanischen Eigenschaften von MDCK-2 Zellen**

Die Elastizität der Zellmembran wird maßgeblich durch den Gehalt der Lipiddoppelschicht an Cholesterin reguliert. Eine Änderung der Cholesterinkonzentration ändert also die mechanischen Eigenschaften der Membran und somit auch die der gesamten Zelle. Es sollte überprüft werden, inwieweit durch eine definierte Änderung der molekularen Zusammensetzung der Zellmembran ein Einfluss auf das QCM-Signal zu generieren ist. Ein

solcher Effekt kann durch die Verwendung von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) induziert werden, ein zyklisches Oligosaccharid, das in der Lage ist, Cholesterin und ähnliche Moleküle einzuschließen und somit aktiv aus der Zellmembran zu entfernen. Da auch Einflüsse von M $\beta$ CD auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) von Zellen beschrieben sind (Stankewich et al., 1996; Francis et al., 1999) werden die MDCK-2 Zellschichten mit Hilfe der ECIS-Methode auch parallel im Hinblick auf Änderungen der elektrischen Eigenschaften hin untersucht. Eine Inkubation von MDCK-2 Zellen mit 20 mM M $\beta$ CD-Lösung führt zu einer drastischen Abnahme des parazellulären Widerstandes  $R_b$  und der Membrankapazität  $C_m$ . Der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  bleibt dagegen nahezu unverändert. Offensichtlich beeinflusst die Entfernung des Cholesterins die Integrität der *tight junctions* und führt zudem zu einer Änderung der Oberflächentopographie der Zelle. Francis et al. (1999) konnten nach einer zweistündigen Inkubation von MDCK-Zellen mit einer 10 mM M $\beta$ CD-Lösung ebenfalls deutliche Änderungen der *tight junction*-Struktur erkennen. Die Autoren stellten immunocytochemisch an den Zellgrenzen eine Abnahme der Proteinmenge für Occludin und ZO-1 fest. Unterhalb der *tight junctions* wurde außerdem eine Reorganisation der Aktinfilamente beobachtet, die eine Akkumulation von Aktin an den Kontaktstellen zur Folge hatten, an denen drei Zellen zusammentrafen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zell-Zell-Kontaktes zeigten außerdem einen Verlust von Verzahnungen der lateralen Zellmembranen sowie eine Vesikelansammlung in diesem Bereich. Diese Beobachtungen sowie die mit der Widerstandsabnahme einhergehende Zunahme der parazellulären Permeabilität des Zelllayers ließen Francis et al. auf eine durch die Abnahme des Cholesteringehalts der Membran induzierte Änderung der Organisation des Cytoskeletts schließen, die zu einer Störung des *tight junction* Netzwerks führt.

Die durch die M $\beta$ CD-Inkubation hervorgerufene Abnahme der Membrankapazität  $C_m$  und die daraus ableitbaren Veränderungen der Oberflächenstruktur wurden ebenfalls schon von Francis et al. (1999) anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. Parallel zum Verlust der bei nativen MDCK-Zellen beobachteten Verzahnung der lateralen Membranen wurde von den Autoren eine drastische Abnahme der Anzahl der apikalen Mikrovilli registriert. Colarusso und Spring (2002) konnten für DiI-gefärbte MDCK-Zellen, die einer M $\beta$ CD-Inkubation unterworfen worden waren, den Verlust einer netzartigen Oberflächenstruktur feststellen, wie sie von den Autoren für native MDCK-Zellen gefunden worden war. Da dieses nach der Membranfärbung beobachtete Muster auf die für MDCK-Zellen typischen Mikrovilli zurückgeführt wurde, konnten Colarusso und Spring den Verlust dieser netzartigen Oberflächenfluoreszenz nach Zugabe von M $\beta$ CD mit dem Rückgang der

Membranausstülpungen erklären. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten zur Membrankapazität lassen ebenfalls nur den Schluss zu, dass eine deutliche Veränderung der Oberflächengeometrie stattfindet. Damit stehen diese Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den literaturbekannten Untersuchungen von Francis et al. (1999) sowie von Colarusso und Spring (2002). Im Gegensatz dazu konnten Poole et al. (2004) allerdings in AFM-Studien den Rückgang der Mikrovilli nicht allein durch die Inkubation mit M $\beta$ CD induzieren. Erst nach der Inhibierung der Biosynthese von Sphingolipiden bzw. Sphingolipiden und Cholesterin führte eine Behandlung der Zellen mit M $\beta$ CD zum Verlust der Membranausstülpungen.

Ob die Wirkung von M $\beta$ CD auf die Topographie der Membran auf der direkten Entfernung des Cholesterins beruht, oder über einen indirekten Weg über die Interaktion von membran- oder cytoskelettassoziierten Proteine mit Lipiden stattfindet, kann allerdings von keiner der Autoren abschließend geklärt werden. Lediglich die wesentliche Rolle von Cholesterin für das Entstehen und den Erhalt der Mikrovilli scheint festzustehen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte mikrogravimetrische Untersuchung von Zellen, die einer Inkubation mit M $\beta$ CD unterworfen wurden, sollte die Auswirkungen einer drastischen Änderung der Lipidkomposition der Zellmembran auf die Mikromechanik der Zellschicht aufzeigen. Im Vergleich zu der nativen Kontrollpopulation konnte für die M $\beta$ CD-behandelten Zellen im Mittel eine geringfügige Zunahme des inkrementellen Dämpfungswiderstandes um etwa 25 Prozent gemessen werden. Allerdings ist die Zunahme nicht einheitlich für jede betrachtete Zellschicht feststellbar, teilweise geht der Dämpfungswiderstand auch leicht zurück. Trotz der darauf zurückzuführenden Streubreite der Einzelwerte ergibt sich eine signifikante Erhöhung von  $\Delta R$ . Die Entfernung des Cholesterins aus der Membran ändert also die mechanischen Eigenschaften der Zelle im Sinne einer zunehmenden Energiedissipation. Es kann aber auch hier nicht entschieden werden, ob dies direkt auf den Cholesterinmangel der Lipiddoppelschicht und somit auf die Veränderung der Fluidität der Membran zurückzuführen ist oder ob indirekte Effekte eine Rolle spielen, die möglicherweise über das Zusammenwirken von Proteinen der Zellmembran und des Cytoskeletts mit entsprechenden Lipiden ausgelöst werden. Falls lediglich die Fluidität der Membran dieses Phänomen dominiert, so lässt sich diese leichte Versteifung der Zelle dadurch erklären, dass die Messung bei Raumtemperatur und damit unterhalb der Umwandlungstemperatur der Zellmembran von MDCK-Zellen (Giocondi und Le Grimellec, 1989) durchgeführt wurde. In diesem Zustand sorgt die Einlagerung von Cholesterin für eine erhöhte Fluidität der Membran. Eine Abnahme des Cholesterinanteils in der Lipiddoppelschicht führt damit zu einer Versteifung. Diese Messung zeigt auch, dass die Zellmembran offensichtlich zum QCM-Signal beiträgt, wenn

auch nicht in dem Maß wie dies für das Aktincytoskelett festgestellt werden konnte. Um diesen Effekt aber eindeutig interpretieren zu können, sind weitere Untersuchungen zur Ursache-Wirkungs-Beziehung notwendig. So können möglicherweise andere Techniken wie AFM die veränderten mechanischen Eigenschaften der Zelle bestätigen, wie dies schon für die Untersuchung fixierter Zellen gezeigt werden konnte (s. 5.4).

## 5.6 Untersuchungen zur Fototoxizität von Calcein AM

Die Fototoxizität des eigentlich als Vitalfarbstoff eingesetzten Calcein AM wurde erstmals von Knight et al. (2003) an Chondrozyten eher zufällig gefunden und mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie näher untersucht. In dieser Arbeit wurde zur Belichtung ein Argon-Laser mit zwei verschiedenen Leistungsstufen (15 und 30  $\mu\text{W}$ ) verwendet, der Licht genau in der Absorptionsbande des Calceins (488 nm) emittiert. Die Zellen wurden mit einem 20er-Objektiv fokussiert. Anschließend wurden einzelne Zellen in 10 s-Intervallen 1 h lang belichtet. Die Belichtung der mit Calcein AM beladenen Zellen führte in Abhängigkeit von der Lichtintensität zu gravierenden Zellschädigungen und schließlich zum Zelltod. Der fototoxische Effekt wurde auf die Wechselwirkung zwischen eingestrahlem Laserlicht und aktivem Fluoreszenz-Farbstoff (Calcein) zurückgeführt.

Da diese Zellschädigungen mit drastischen morphologischen Änderungen der Zelle verbunden sind, sollte überprüft werden, inwiefern es möglich ist den Tod des bestrahlten Teils der Zellschicht mikrogravimetrisch zu verfolgen. Dazu wurden die auf den Quarzresonatoren kultivierten MDCK-2 Zellen mit dem fototoxischen Farbstoff beladen und anschließend mit dem der Anregungswellenlänge von Calcein AM entsprechenden Licht bestrahlt. Im Vergleich zu der Kontrollpopulation, die mit Licht außerhalb der Anregungswellenlänge des Farbstoffs belichtet wurden, zeigte sich 24 h nach der Behandlung im Mittel ein deutlicher Rückgang des Dämpfungswiderstandes um etwa 30 % bezogen auf den Ausgangswert. Die parallel bestimmten elektrischen Eigenschaften der Zellschichten zeigen ebenfalls eine deutliche Schädigung der Zellen. Da nur noch das Spektrum der leeren Elektrode detektiert werden konnte, hat die Zellschicht offensichtlich ihre isolatorische Eigenschaft verloren. Diese Befunde unterstützen die Ansicht, dass der Rückgang des inkrementellen Dämpfungswiderstandes auf die Ablösung zerstörter Zellen vom Oszillator zurückzuführen ist. Da allerdings nur eine partielle Abnahme von  $\Delta R$  gefunden wird und kein Rückgang auf den Wert des leeren Quarzes sind wahrscheinlich nicht alle Zellen gleichermaßen geschädigt. Möglicherweise sind aber auch Zellen vom unbelichteten Randbereich des Quarzes zur Mitte des Oszillators hin hineingewachsen und erhöhen auf

diese Weise den nach 24 Stunden gemessenen Dämpfungswiderstand. Um diesen Befund und die Ursache der Fototoxizität genauer studieren zu können, werden die Experimente auf sogenannten ITO-Filmelektroden wiederholt und erweitert, da diese gleichzeitig elektrische und optische Charakterisierung der Zellen erlauben.

Knight et al. (2003) stellten fest, dass durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Reduktionsmittel Natriumascorbat der fototoxische Effekt komplett inhibiert werden konnte. Sie konnten somit die Beteiligung radikalischer Spezies, die durch die Wechselwirkung zwischen Licht und Fluoreszenz-Farbstoff entstehen können, an der Zellschädigung explizit nachweisen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Radikalen um reaktive Sauerstoff-Spezies handelt.

Auch in dieser Arbeit konnte durch Verwendung von Natriumascorbat, welches in der von Knight et al. angegebenen Konzentration von 1 mM zur Calcein AM-Lösung zugesetzt wurde, der fototoxische Effekt unterdrückt und somit auf radikalische Spezies zurückgeführt werden. Somit ist auch hier von der Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies auszugehen. Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoff-Spezies durch Reaktionen mit Biomolekülen, wie z.B. ungesättigten Phospholipiden und Cholesterin, zu strukturellen Veränderungen in den Zellen führen können (Hirth et al., 1999). Da diese Moleküle auch Membranbestandteile sind, könnten solche Reaktionen für die in dieser Arbeit beobachteten Membranschädigungen und den nachfolgenden Zelltod verantwortlich sein.

Der Zelltod kann prinzipiell verschiedene Mechanismen erfolgen: Apoptose oder Nekrose. Ob eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch wird, hängt von der Konzentration der reaktiven Sauerstoff-Spezies in der Zelle ab. Während geringere Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezies eher einen apoptotischen Prozess induzieren, führen höhere Konzentrationen zu einer nekrotischen Noxe. Kang und Zheng (2004) haben diese Abhängigkeit des Zelltodes von der Konzentration reaktiver Sauerstoff-Spezies näher untersucht. In dieser Studie wurden mit Hilfe des Hypoxanthine-Xanthine Oxidase Systems unterschiedliche Konzentrationen reaktiver Sauerstoff-Spezies in humanen Hepatom-Zellen erzeugt. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 16  $\mu\text{M}$  einen apoptotischen Prozess bewirkt, während eine Verdopplung der Konzentration auf 32  $\mu\text{M}$  den nekrotischen Zelltod induziert.

Durch die Auswertung der Impedanzspektren nach Wegener et al. (2000) konnte zwischen Impedanzbeiträgen des Zell-Zell-Kontaktes ( $R_b$ ) und solchen aus dem Zell-Substrat-Kontakt ( $\alpha$ ) differenziert werden. Dabei zeigte sich, dass nach Einsetzen des fototoxischen Effektes die Werte für  $R_b$  im Vergleich zu den Werten von  $\alpha$  viel schneller abnahmen. Somit bewirkte

der fototoxische Effekt gemessen an den Zellparametern im zeitlichen Verlauf zunächst den Verlust der Zell-Zell-Kontakte und dann erst die Auflösung der Zell-Substrat-Kontakte. Aufgrund des Verlustes der Zell-Substrat-Kontakte lösten sich die MDCK-2 Zellen schließlich vom Untergrund ab. Dies konnte auch anhand der mikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden.

Der hier beobachtete zeitliche Verlauf der Zellparameter  $R_b$  und  $\alpha$  ist mit dem aus einer Studie von Arndt et al. (2004) in etwa vergleichbar, bei der der apoptotische Zelltod ebenfalls anhand von ECIS-Messungen näher untersucht wurde. Die Apoptose der Zellen wurde hier durch Zugabe von Cycloheximid (CHX) induziert. Analog zu dem in dieser Arbeit beobachteten Verlauf der Zellparameter nahmen die Werte von  $R_b$  schneller ab als die von  $\alpha$ . Der einzige Unterschied zu dieser Arbeit ist, dass die Abnahme der Werte für  $\alpha$  zweistufig verlief. Ansonsten bewirkt CHX auch zunächst den Verlust der Zell-Zell-Kontakte und dann erst die Auflösung der Zell-Substrat-Kontakte. Da Apoptose zu einer Zellschrumpfung und somit zuerst zu einer Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte führt, spricht ein derartiger Verlauf der Zellparameter für einen apoptotischen Zelltod. Dies lässt auch im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Calcein AM eine apoptotische Wirkung vermuten. Um welchen Mechanismus es sich jedoch hier handelt, wird an späterer Stelle explizit diskutiert.

Auffällig war, dass der Zeitpunkt für das Einsetzen der Impedanzabnahme sehr variabel ist. Dies ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass MDCK-2 Zellen MDR-kompetente Zellen sind. Calcein AM ist ein Substrat des MDR-Transportproteins Pgp. Das Calcein AM wird somit wieder aus der Zelle herausgepumpt und damit die Hydrolyse zum Calcein sowie die Anreicherung des Fluorophors in der Zelle verhindert. Abhängig von der Anzahl der exprimierten MDR-Transportproteine können Konzentrationsschwankungen des Calceins in der Zelle auftreten. Während höhere Konzentrationen an Calcein eher den fototoxischen Effekt induzieren, würden geringere Konzentrationen wie in diesem Falle zu einer Verzögerung des Effektes führen.

### **Mechanismus des Zelltodes**

Der Zelltod kann entweder über Apoptose oder Nekrose erfolgen. Nagata et al. (2003) beobachteten in einer Studie zur Fototoxizität in der Fotodynamischen Therapie am Beispiel von humanen malignen Melanom-Zellen eine Abhängigkeit des Zelltodes von der Konzentration des Fluorophors in der Zelle, von der Lichtintensität und von der Belichtungsdauer. In Abhängigkeit von der Dosis entstehen letztlich in der Zelle unterschiedliche Konzentrationen reaktiver Sauerstoff-Spezies. Wie schon erwähnt bewirken

geringere Konzentrationen eher einen apoptotischen Prozess, während höhere Konzentrationen zu einem nekrotischen Zelltod führen (Kang und Zheng, 2004).

Um herauszufinden, welcher Mechanismus durch den fototoxischen Effekt von Calcein AM ausgelöst wird, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Es ist bekannt, dass Apoptose neben einer Vielzahl verschiedener Stimuli auch durch intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies ausgelöst werden kann (Bennet, 1999), wie sie anhand der Ascorbinsäure-Inhibition auch für die Experimente dieser Arbeit gezeigt werden konnten. Viele apoptotische Prozesse werden durch Caspasen vermittelt. Daher sollte im Falle eines apoptotischen Zelltodes dieser indirekt über Caspase-Inhibition blockiert werden und dadurch nachweisbar sein. Dieser Nachweis für Apoptose ist schon lange bekannt. Beispielsweise konnten Takahashi et al. (1998) auf diesem Wege PKN, eine Fettsäure- und Rho-aktivierte Serin/Threonin Kinase, in Jurkat- und U937-Zellen als ein Substrat der Caspase-3 identifizieren. Da die Caspase-3 die wichtigste und effizienteste Effektor-Caspase ist (Leist und Jaattela, 2001; Takahashi, 1999), wurde auch in dieser Arbeit ein Caspase-3-Inhibitor eingesetzt. Der Caspase-Inhibitor wurde in der von Takahashi et al. angegebenen Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zur Calcein AM-Lösung zugesetzt. Nach der Belichtung wurden die zellmorphologischen Veränderungen mit Hilfe einer ECIS-Messung zeitlich verfolgt. Der fototoxische Effekt von Calcein AM konnte jedoch nicht inhibiert werden, was für einen nekrotischen Mechanismus sprechen würde. Auffällig war allerdings, dass der fototoxische Effekt bei den mit Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den ausschließlich mit Calcein AM inkubierten Zellen mit einer leichten Verzögerung eintrat. Zudem war der Gesamteffekt der mit dem Caspase-Inhibitor behandelten Zellen nur halb so groß wie der der ausschließlich mit Calcein AM inkubierten Zellen. Dies kann zum einen auf den niedrigeren Impedanzwert der mit Inhibitor behandelten Zellen bei  $t = 0$  min zurückzuführen sein. Am Ende der Messung waren die Impedanzwerte der beiden Zellpopulationen in etwa gleich. Es ist aber auch möglich, dass der Caspase-Inhibitor in einer für diese Verhältnisse zu geringen Konzentration zugesetzt wurde und damit den durch reaktive Sauerstoff-Spezies induzierten apoptotischen Prozess nicht vollständig unterdrücken konnte.

Die anschließende zeitaufgelöste EthD-Färbung sollte daher genaueren Aufschluß über den vorliegenden Mechanismus geben. Die Phasenkontrast-Aufnahmen ließen 8 h nach der Belichtung eine deutliche Schädigung der Zellen erkennen. Viele Zellen hatten sich bereits abgerundet. Die Fluoreszenz-Aufnahmen zeigten eindeutig die rot-fluoreszierenden Kerne der abgerundeten Zellen zu diesem Zeitpunkt, jedoch nicht früher. Diese positive EthD-Färbung kurz nach dem Auslösen des morphologisch erkennbaren fototoxischen Effektes deutet auf

eine schnelle Permeabilisierung und Zerstörung der Zellmembran und damit ebenfalls eher auf einen nekrotischen Zelltod hin.

Wenn es sich allerdings tatsächlich um einen nekrotischen Prozess handelt, sollte es aufgrund des typischen Anschwellens der Zellen und der damit verbundenen Verkleinerung des Interzellularspaltes zumindest vorübergehend zu einer Zunahme der elektrischen Impedanz des Zelllayers kommen. Diese konnte jedoch in keinem der Experimente beobachtet werden. Somit kann bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt werden, welcher Mechanismus vorliegt, oder ob sogar beide Formen auftreten. Die Konzentration des Fluorophors kann in einer Zellpopulation von Zelle zu Zelle sehr verschieden sein. Dies führt bei Belichtung der Zellen letztlich zu unterschiedlichen Konzentrationen reaktiver Sauerstoff-Spezies. Somit können innerhalb der gleichen Zellpopulation in Abhängigkeit von der Konzentration des Fluorophors und damit der reaktiven Sauerstoff-Spezies apoptotische neben nekrotische Zellen entstehen.

Knight et al. nahmen an, dass der Zelltod eher über einen apoptotischen Prozess erfolgt. Die Zellen zeigten nach der 1-stündigen Belichtung mit Laserlicht immer noch charakteristisch schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes, die durch ATP stimuliert wurden und auf die Vitalität der Zellen hindeuten. Folglich wurden die Zellen nach dem Auslösen des fototoxischen Effektes nicht sofort permeabilisiert und zerstört. Dies ist konsistent zu den ECIS-Daten, die in dieser Arbeit gemessen wurden.

Eine Möglichkeit, um den Mechanismus aufzuklären, könnte ein Annexin V-Assay bieten, der als extrazelluläre Nachweismethode für Apoptose eingesetzt wird. Ein besonderes Merkmal der Apoptose ist die Veränderung der Zellmembran, die schon in einem sehr frühen Stadium der Apoptose eintritt. Dabei werden Phosphatidylserine von der inneren auf die äußere Membran verlagert (Raynal und Pollard, 1994). Annexin V ist ein Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserinen. Durch die Kopplung von Annexin V, welches an die Phosphatidylserine bindet, an Fluorophore können apoptotische Zellen spezifisch angefärbt werden. Da Calcein ein grün-emittierender Farbstoff ist, sollte das Annexin V an einen TRITC-Farbstoff gekoppelt sein, um mögliche Wechselwirkungen und Überlagerungen mit der Calcein-Emission zu vermeiden.

## 6 Zusammenfassung

Die Quarzmikrowaage-Technik hat sich im letzten Jahrzehnt zu einer wertvollen Methode entwickelt, um die mechanischen Interaktionen adhärenter Zellen mit ihrem Kultursubstrat zu studieren. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welche Komponenten des zellulären Adhäsionskontakts zum Signal der Quarzmikrowaage beitragen, um eine direktere Interpretation der QCM-Daten auf zellbiologischer Ebene zu ermöglichen. Dazu wurden unterschiedliche Zellsorten mikrogravimetrisch untersucht. Dabei konnten je nach Zellsorte deutliche individuelle Unterschiede in den QCM-Parametern gefunden, aber keine Zusammenhänge zum untersuchten Zelltyp hergestellt werden.

Eine Untersuchung des Zell-Substrat-Abstands mit der FLIC-Mikroskopie sollte aufklären, inwieweit die Distanz zwischen der basolateralen Membran und dem Substrat Einfluss auf das QCM-Signal hat. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Abstand  $d$  und dem Dämpfungswiderstand des QCM-Signals als sensitivstem Schwingungsparameter liess sich aber nicht herstellen. Durch eine elektrochemische Impedanzanalyse der adhärenen Zellen (ECIS) und aus mikroskopischen Untersuchungen bekannten Dimensionen des Adhäsionskontaktes erlaubte erstmals die Berechnung des spezifischen Elektrolytwiderstands im Adhäsionskontakt. Dabei stellte sich heraus, dass dieser je nach Zelltyp teilweise um Größenordnungen im Vergleich zum spezifischen Elektrolytwiderstand der *bulk*-Phase erhöht war. Ein Vergleich der Elektrolytwiderstände im Adhäsionskontakt mit mikrogravimetrischen Daten ergaben eine schwache und noch wenig belastbare Korrelation. Der spezifische Elektrolytwiderstand im Spalt war für die Zellsorten besonders groß, die über barrierebildende Zell-Zell-Kontakte den Interzellularspalt zur *bulk*-Phase hin abdichten.

Zur weiteren Analyse der Zusammensetzung des QCM-Signals wurden gezielt Manipulationen des Proteingerüsts der Zelle und der Zusammensetzung der Zellmembran vorgenommen, die Veränderungen im mikrogravimetrisch detektierbaren Adhäsionskontakt induzierten. So bewirkte die Vernetzung der zellulären Proteine einen drastischen Anstieg der Energiedissipation. Eine selektive Zerstörung des Aktincytoskeletts vor dieser chemischen Vernetzungsreaktion konnte diese Wirkung deutlich vermindern. Diese Resultate implizieren, dass das Aktincytoskelett und weitere am Adhäsionskontakt beteiligte Proteine für das QCM-Signal bedeutsam sind. Die Entfernung des Cholesterins aus der Zellmembran durch Verwendung von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin führte zu einem kleinen, aber signifikanten Anstieg des Dämpfungswiderstands. Somit konnte gezeigt werden, dass auch Veränderungen der Membranzusammensetzung mit der QCM detektierbar sind und einen Einfluss auf die Mikromechanik des Adhäsionskontaktes nehmen.

## 7 Literaturverzeichnis

### A

- Adam G., Luger P., Stark G. (2003) *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag Berlin
- Abercrombie M., Dunn G.A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.* **92**(1), 57-62.
- Alexander S., Hellemans L., Marti O., Schneir J., Elings V., Hansma P.K., Longmiro M., Gurley J. (1989). An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J. Appl. Phys.* **65** (1), 164-167.
- Arndt S., Seebach J., Psathaki K., Galla H.-J., Wegener J. (2004). Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosens. Bioelectron.* **19** (6), 583-94.
- Asami K., Takahashi Y., Takashima S. (1990). Frequency domain analysis of membrane capacitance of cultured cells (HeLa and myeloma) using the micropipette technique. *Biophys. J.* **58** (1), 143-8.
- Asami K., Takashima S. (1994). Membrane admittance of cloned muscle cells in culture: use of a micropipet technique. *Biochim. Biophys. Acta.* **1190** (1), 129-36.
- Ashkin A., Dziedzic J.M. (1989). Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (20), 7914-8.
- Axelrod D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* **89** (1), 141-5.

### B

- Bennett M.R. (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc. Res.* **41** (2), 361-8.
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56** (9), 930-933.
- Bottom V.E. (1982). Introduction to quartz crystal unit design. van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Braet F., Seynaeve C., De Zanger R., Wisse E. (1998). Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. *J. Microsc.* **190**, 328-38.
- Brandstatter M., Fromherz P., Offenhusser A. (1988). Fluorescent dye monolayers on oxidized silicon. *Thin Solid Films* **160** (1-2), 341-346.
- Braun D., Fromherz P. (1997). Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Appl. Phys. A* **65**, 341-348.
- Braun D., Fromherz P. (1998). Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon. *Phys. Rev. Lett.* **81** (23), 5241-5244.

- Bücher H., Drexhage K.H., Fleck M., Kuhn H., Möbius D., Schäfer F.P., Sondermann J., Sperling W., Tillmann P., Wiegand J. (1967). Controlled transfer of excitation energy through thin layers.  
*Molec. Crystals*. **2**, 199-230.
- Burmeister J.S., Truskey G.A., Reichert W.M. (1994). Quantitative analysis of variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM) of cell/substrate contacts.  
*J. Microsc.* **173**, 39-51.
- Butt H.J., Jaschke M. (1995). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy.  
*Nanotechnology* **6**, 1-7.
- Buttry D., Ward M.D. (1992). Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance.  
*Chem. Rev.* **92**, 1355-1379.

## C

- Cans A.S., Hook F., Shupliakov O., Ewing A.G., Eriksson P.S., Brodin L., Orwar O. (2001). Measurement of the dynamics of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance.  
*Anal. Chem.* **73** (24), 5805-11.
- Colarusso P., Spring K.R. (2002). Reticulated lipid probe fluorescence reveals MDCK cell apical membrane topography.  
*Biophys. J.* **82** (2), 752-61.
- Cole K.S. (1972). Membranes, Ions and Impulses.  
University of California, Berkeley Press
- Conyers G., Milks L., Conklyn M., Showell H., Cramer E. (1990). A factor in serum lowers resistance and opens tight junctions of MDCK cells.  
*Am. J. Physiol.* **259**, C577-85.
- Curtis A.S. (1964). The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy.  
*J. Cell Biol.* **20**, 199-215.

## D

- De Larco J.E., Todaro G.J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation.  
*J. Cell Physiol.* **94** (3), 335-342.
- Deli M.A., Abraham C.S., Niwa M., Falus A. (2003). N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers.  
*Inflamm. Res.* **52**, S39-40.

## E

- Elson, E. L. (1988). Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function.  
*Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 397-430.

**F**

- Francis S.A., Kelly J.M., McCormack J., Rogers R.A., Lai J., Schneeberger E.E., Lynch R.D. (1999). Rapid reduction of MDCK cell cholesterol by methyl-beta-cyclodextrin alters steady state transepithelial electrical resistance.  
*Eur. J. Cell Biol.* **78** (7), 473-84.
- Franke H., Galla H.-J., Beuckmann C.T. (2000). Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro.  
*Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* **5** (3), 248-56.
- Fromherz P., Kotulla R. (1984). Fluorescent dye in soap lamella as a probe of the electric potential.  
*Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **88**, 1106-1112.
- Fromherz P., Offenhäusser A., Vetter T., Weis J. (1991). A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor.  
*Science* **252** (5010), 1290-3.
- Fromherz P., Stett A. (1995). Silicon-Neuron Junction: Capacitive Stimulation of an Individual Neuron on a Silicon Chip.  
*Phys. Rev. Lett.* **75** (8), 1670-1673.

**G**

- Giaever I., Keese C.R. (1984). Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (12), 3761-4.
- Giaever I., Keese C.R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (17), 7896-900.
- Giaever I., Keese C.R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells.  
*Nature* **366** (6455), 591-2.
- Giocondi M.C., Le Grimellec C. (1989). Temperature dependence of plasma membrane physical state in living Madin-Darby canine kidney cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162** (3), 1004-9.
- Goldmann W.H., Galneder R., Ludwig M., Xu W., Adamson E.D., Wang N., Ezzell R.M. (1998). Differences in elasticity of vinculin-deficient F9 cells measured by magnetometry and atomic force microscopy.  
*Exp. Cell Res.* **239** (2), 235-42.
- Gryte D.M., Ward M.D., Hu W.S. (1993). Real-time measurement of anchorage-dependent cell adhesion using a quartz crystal microbalance.  
*Biotechnol. Prog.* **9** (1), 105-8.
- Guidotti G. (1972). Membrane proteins.  
*Annu. Rev. Biochem.* **41**, 731-52.

**H**

- Haydon P.G., Henderson E., Stanley E.F. (1994). Localization of individual calcium channels at the release face of a presynaptic nerve terminal.  
*Neuron* **13** (6), 1275-80.
- Hertz H. (1882). Über die Berührung fester elastischer Körper.  
*J. Reine Angew. Mathematik* **92**, 156-171.
- Hirth A., Michelsen U., Wöhrle D. (1999). Photodynamische Tumortherapie.  
*Chemie in unserer Zeit* **2**, 84-94.

- Hofmann U.G., Rotsch C., Parak W.J., Radmacher M. (1997). Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope.  
*J. Struct. Biol.* **119** (2), 84-91.
- Hoh J.H., Schoenenberger C.A. (1994). Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy.  
*J. Cell Sci.* **107**, 1105-14.
- Hoheisel D., Nitz T., Franke H., Wegener J., Hakvoort A., Tilling T., Galla H.-J. (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244** (1), 312-6.

## I

- Iwanaga Y., Braun D., Fromherz P. (2001). No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing GFP-vinculin and fluorescence interference of Dil.  
*Eur. Biophys. J.* **30** (1), 17-26.
- Izzard C.S., Lochner L.R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique.  
*J. Cell Sci.* **21** (1), 129-59.

## J

- Janshoff A., Steinem C., Sieber M., Galla H.-J. (1996). Specific binding of peanut agglutinin to GM1-doped solid supported lipid bilayers investigated by shear wave resonator measurements.  
*Eur. Biophys. J.* **25**, 93-103.
- Janshoff A., Wegener J., Sieber M., Galla H.-J. (1996). Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators.  
*Eur. Biophys. J.* **25** (2), 93-103.
- Johnson K.L. (1994). Contact Mechanics.  
Cambridge University Press, Cambridge

## K

- Kanazawa K.K., Gordon J.G. (1985). Frequency of a quartz microbalance in contact with liquids.  
*Anal. Chem.* **57**, 1770-1771.
- Kasemo B. (1997). Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion.  
*Faraday Discuss.* **107**, 229-46.
- Keese C.R., Bhawe K., Wegener J., Giaever I. (2002). Real time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture.  
*Biotechniques* **33**, 842-850
- Khang J., Zheng R. (2004). Dose-dependent regulation of superoxide anion on the proliferation, differentiation, apoptosis and necrosis of human heptoma cells: the role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .  
*Redox. Rep.* **9** (1), 37-48.
- Kiessling V., Müller B., Fromherz P. (2000). Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe.  
*Langmuir* **16**, 3517-3521.

- Kiessling V., Tamm L.K. (2003). Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference-contrast microscopy: polymer supports and SNARE proteins.  
*Biophys. J.* **84** (1), 408-18.
- Knight M.M., Roberts S.R., Lee D.A., Bader D.L. (2003). Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death.  
*Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284** (4), C1083-9.
- König B., Grätzel, M. (1994). A Novel Immunosensor for Herpes Viruses.  
*Anal. Chem.* **66**, 341-344.

## L

- Lambacher A., Fromherz P. (1996). Fluorescence Interference-Contrast Microscopy on Oxidized Silicon using a Monomolecular Dye Layer.  
*Appl. Phys. A* **63** (3), 207-216.
- Lanni F., Waggoner A.S., Taylor D.L. (1985). Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy.  
*J. Cell Biol.* **100** (4), 1091-102.
- Leist M., Jaattela M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** (8), 589-598.
- Lo C.-M., Keese C.R., Giaever I. (1993). Monitoring Motion of Confluent Cells in Tissue Culture.  
*Exp. Cell Res.* **204**, 102-109.
- Lo C.-M., Keese C.R., Giaever I. (1994). pH changes in pulsed CO<sub>2</sub> incubators cause periodic changes in cell morphology.  
*Exp. Cell Res.* **213** (2), 391-7.
- Lo C.-M., Keese C.R., Giaever I. (1995). Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing.  
*Biophys. J.* **69** (6), 2800-7.
- Lo C.-M., Ferrier J. (1998). Impedance analysis of fibroblastic cell layers measured by electric cell-substrate impedance sensing.  
*Phys. Rev. E* **57** (6), 6982-6987.
- Lo C.-M., Glogauer M., Rossi M., Ferrier J. (1998). Cell-substrate separation: effect of applied force and temperature.  
*Eur. Biophys. J.* **27** (1), 9-17.
- Lo C.-M., Ferrier J. (1999). Electrically measuring viscoelastic parameters of adherent cell layers under controlled magnetic forces.  
*Eur. Biophys. J.* **28** (2), 112-8.
- Lo C.-M., Keese C.R., Giaever I. (1999). Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters.  
*Exp. Cell Res.* **250** (2), 576-80.
- Luong J.H., Habibi-Rezaei M., Meghrou J., Xiao C., Male K.B., Kamen A. (2001). Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor.  
*Anal. Chem.* **73** (8), 1844-8.

## M

- Martin S.J., Granstaff V.E., Frye G.C. (1991). Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading.  
*Anal. Chem.* **63**, 2272-2281.

- Muramatsu H., Dicks J. M., Tamiya E., Karube I. (1987). Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins.  
*Anal. Chem.* **59** (23), 2760-3.
- Muramatsu H., Tamiya E., Karube I. (1988). Computation of equivalent circuit parameters of quartz crystals in contact with liquids and study of liquid properties.  
*Anal. Chem.* **60**, 2142-2146.

## N

- Nagata S., Obana A., Gohto Y., Nakajima S. (2003). Necrotic and apoptic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-Sa10(Na).  
*Lasers in Surgery and Medicine* **33**, 64-70.
- Nakache M., Schreiber A.B., Gaub H., McConnell H.M. (1985). Heterogeneity of membrane phospholipid mobility in endothelial cells depends on cell substrate.  
*Nature* **317** (6032), 75-7.
- Noël M.A.M., Topart P.A. (1994). High frequency impedance analysis of quartz crystal microbalances. I. General considerations.  
*Anal. Chem.* **66**, 484-491.

## O

- Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. (1989). Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes.  
*Eur. J. Biochem.* **186** (1-2), 17-22.
- Owens N.F., Gingell D., Trommler A. (1988). Cell adhesion to hydroxyl groups of a monolayer film.  
*J. Cell Sci.* **91**, 269-79.

## P

- Parak W.J., Domke J., George M., Kardinal A., Radmacher M., Gaub H.E., de Roos A.D., Theuvenet A.P., Wiegand G., Sackmann E., Behrends J.C. (1999). Electrically excitable normal rat kidney fibroblasts: A new model system for cell-semiconductor hybrids.  
*Biophys. J.* **76** (3), 1659-67.
- Petersen N.O., McConnaughey W.B., Elson E.L. (1982). Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin B.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (17), 5327-31.
- Pitha J., Irie T., Sklar P.B., Nye J.S. (1988). Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives.  
*Life Sci.* **43** (6), 493-502.
- Poole K., Meder D., Simons K., Muller D. (2004). The effect of raft lipid depletion on microvilli formation in MDCK cells, visualized by atomic force microscopy.  
*FEBS Lett.* **565** (1-3), 53-8.
- Pries A.R., Secomb T.W., Gaehtgens P. (2000). The endothelial surface layer.  
*Pflügers Arch.* **440** (5), 653-66.

**QR**

- Radmacher M., Cleveland J.P., Fritz M., Hansma H.G., Hansma P.K. (1994). Mapping interaction forces with the atomic force microscope.  
*Biophys. J.* **66** (6), 2159-65.
- Radmacher M., Fritz M., Hansma P.K. (1995). Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol.  
*Biophys. J.* **69** (1), 264-70.
- Radmacher M., Fritz M., Kacher C.M., Cleveland J.P., Hansma P.K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope.  
*Biophys. J.* **70** (1), 556-67.
- Radmacher M. (2002). Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope.  
*Methods Cell Biol.* **68**, 67-90.
- Raynal P., Pollard H.B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1197** (1), 63-93.
- Redepenning J., Schlesinger T.K., Mechalke E.J., Puleo D.A., Bizios R. (1993). Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance.  
*Anal. Chem.* **65** (23), 3378-81.
- Reiß B., (2001). Mikrogravimetrische Untersuchungen zum Einfluß von Hydrocortison auf den Zelladhäsionsbereich cerebraler Kapillarendothelzellen.  
*Diplomarbeit, Universität Münster*
- Reiß B., Janshoff A., Steinem C., Seebach J., Wegener J. (2003). Adhesion kinetics of functionalized vesicles and mammalian cells: A comparative study.  
*Langmuir* **19** (5), 1816-1823.
- Rodahl M., Höök F., Kasemo B. (1996). QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity.  
*Anal. Chem.* **68**, 2219-2227.
- Rodahl M., Höök F., Fredriksson C., Keller C.A., Krozer A., Brzezinski P., Voinova M., Kasemo B. (1997). Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion.  
*Faraday Discuss.* **107**, 229-46.
- Rosenberg A. (1995). Biology of the sialic acids.  
Plenum Press, New York and London
- Rotsch C., Braet F., Wisse E., Radmacher M. (1997). AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages.  
*Cell Biol. Int.* **21** (11), 685-96
- Rotsch C., Radmacher M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study.  
*Biophys. J.* **78** (1), 520-35.

**S**

- Sauerbrey G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung.  
*Z. Phys.* **155**, 206-222.
- Schaus S.S., Henderson E.R. (1997). Cell viability and probe-cell membrane interactions of XR1 glial cells imaged by atomic force microscopy.  
*Biophys. J.* **73** (3), 1205-14.

- Schindl M., Wallraff E., Deubzer B., Witke W., Gerisch G., Sackmann E. (1995). Cell-substrate interactions and locomotion of Dictyostelium wild-type and mutants defective in three cytoskeletal proteins: a study using quantitative reflection interference contrast microscopy.  
*Biophys. J.* **68** (3), 1177-90.
- Smith P.R., Bradford A.L., Schneider S., Benos D.J., Geibel J.P. (1997). Localization of amiloride-sensitive sodium channels in A6 cells by atomic force microscopy.  
*Am. J. Physiol.* **272**, C1295-8.
- Sneddon I.N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile.  
*Int. J. Eng. Sci.* **3**, 47-57.
- Sorribas H., Braun D., Leder L., Sonderegger P., Tiefenauer L. (2001). Adhesion proteins for a tight neuron-electrode contact.  
*J. Neurosci. Methods.* **104** (2), 133-41.
- Stevenson B.R., Anderson J.M., Goodenough D.A., Mooseker M.S. (1988). Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance.  
*J. Cell Biol.* **107**, 2401-8.

## T

- Tagliaferro P., Tandler C.J., Ramos A.J., Pecci Saavedra J., Brusco A. (1997). Immunofluorescence and glutaraldehyde fixation. A new procedure based on the Schiff-quenching method.  
*J. Neurosci. Methods.* **77** (2), 191-7.
- Takahashi A. (1999). Caspase: executioner and undertaker of apoptosis.  
*Int. J. Hematol.* **70** (4), 226-232.
- Takahashi M., Mukai H., Toshimori M., Miyamoto M., Ono Y. (1998). Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (20), 11566-71.
- Tao N.J., Lindsay S.M., Lees S. (1992). Measuring the microelastic properties of biological material.  
*Biophys. J.* **63** (4), 1165-9.

## UV

- Valberg P.A., Feldman H.A. (1987). Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity.  
*Biophys. J.* **52** (4), 551-61.

## W

- Wang H.S., Keese C.R., Giaever I., Smith T.J. (1995). Prostaglandin E2 alters human orbital fibroblast shape through a mechanism involving the generation of cyclic adenosine monophosphate.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80** (12), 3553-60.
- Weber I., Wallraff E., Albrecht R., Gerisch G. (1995). Motility and substratum adhesion of Dictyostelium wild-type and cytoskeletal mutant cells: a study by RICM/bright-field double-view image analysis.  
*J. Cell Sci.* **108**, 1519-30.

- Wegener J., Janshoff A., Galla H.-J. (1999). Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines.  
*Eur. Biophys. J.* **28** (1), 26-37.
- Wegener J., Hakvoort A., Galla H.-J. (2000). Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro.  
*Brain. Res.* **853** (1), 115-24.
- Wegener J., Seebach J., Janshoff A., Galla H.-J. (2000). Analysis of the composite response of shear wave resonators to the attachment of mammalian cells.  
*Biophys. J.* **78** (6), 2821-33.
- Wegener J., Keese C.R., Giaever I. (2000). Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces.  
*Exp. Cell Res.* **259** (1), 158-66.
- Wegener J. (1998). Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Goldelektroden.  
*Dissertation, Universität Münster*
- Wegener J. (2003). Lebende Zellen als Sensoren.  
*Forschungsjournal Universität Münster* **6**, 11-17.
- Weidenfeller C., (2003). Morphological and functional characterisation of a new murine serum-free *in vitro* model of the blood-brain barrier.  
*Dissertation, Universität Münster*
- Weis R., Fromherz P. (1997). Frequency dependent signal transfer in neuron transistors.  
*Phys. Rev. E* **55**, 877-889.
- Weisenhorn A.L., Khorsandi M., Kasas S., Gotzos V., Butt H.J. (1993). Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM.  
*Nanotechnology* **4**, 106-113.
- Wu H.W., Kuhn T., Moy V.T. (1998). Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking.  
*Scanning* **20** (5), 389-97.

## X

- Xiao C., Luong J.H. (2003). On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS).  
*Biotechnol. Prog.* **19** (3), 1000-5.

## Y

- Yeung A., Evans E. (1989). Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets.  
*Biophys. J.* **56** (1), 139-49.

## Z

- Zilker A., Engelhardt H., Sackmann E. (1987). Dynamic reflection interference contrast (RIC) microscopy: a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli.  
*J. Phys.* **48**, 2139-2151.
- Zink S., Rosen P., Sackmann B., Lemoine H. (1993). Regulation of endothelial permeability by beta-adrenoceptor agonists: contribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1178** (3), 286-98.

# Anhang

## A Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>atomic force microscopy</i>
APTES	<i>Aminopropyltriethoxysilan</i>
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BVD	<i>Butterworth-van Dyke</i>
CD	<i>Cytochalasin D</i>
CPE	<i>constant phase element</i>
DiI	<i>1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>Dimethylformamid</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
ECIS	<i>electric cell-substrate impedance sensing</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
EthD	<i>Ethidium-Homodimer</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
FLIC	<i>fluorescence interference contrast (microscopy)</i>
GA	<i>Glutardialdehyd</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRGDS	<i>Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat-Serin</i>
HC	<i>Hydrocortison</i>
HEPES	<i>2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ITO	<i>indium tin oxide</i>
KRP <sup>++</sup>	<i>Krebs-Ringer-Puffer mit Calcium und Magnesium</i>
M199	<i>Medium 199 mit Earle's Salzen</i>
M $\beta$ CD	<i>Methyl-<math>\beta</math>-Cyclodextrin</i>
MBCEC	<i>murine brain capillary endothelial cells</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
NA	<i>numerical aperture (numerische Apertur)</i>
NCS	<i>normal calf serum</i>
NRK	<i>normal rat kidney</i>
PBCEC	<i>porcine brain capillary endothelial cells</i>
PBS <sup>-</sup>	<i>phosphat buffered saline</i>
PBS <sup>++</sup>	<i>phosphat buffered saline mit Calcium und Magnesium</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PDS	<i>plasma derived serum</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidon</i>
Pgp	<i>P-glycoprotein</i>
QCM	<i>quartz crystal microbalance</i>
RGD	<i>Arginin-Glycin-Aspartat</i>
RGDC	<i>Arginin-Glycin-Aspartat-Cystein</i>
RIKM	<i>Reflexions-Interferenz-Kontrastmikroskopie</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SEM	<i>standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwerts)</i>
TER	<i>transendothelial/epithelial electrical resistance</i>
TIRFM	<i>total internal reflection microscopy</i>
TRITC	<i>Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat</i>
(v/v)	<i>Volumenanteil</i>
(w/v)	<i>Gewichtsanteil</i>

*Symbolverzeichnis*

A	Fläche, Parameter des CPE, Konstante	g	Erdbeschleunigung
C	Kapazität	h	Höhe
C <sub>m</sub>	spezifische Membrankapazität (ECIS-Modell)	k	Federkonstante
E	Elastizitätsmodul, Energie	m	Masse
F	Kraft	n	Stoffmenge, Brechungsindex, Parameter des CPE
I	Stromstärke, Lichtintensität	r	Radius, Dämpfungsglied
L	Induktivität	t	Zeit
M	Molare Masse	α	Zell-Substrat-Parameter (ECIS-Modell)
R	Widerstand	δ	Abklinglänge der Scherwelle
R <sub>b</sub>	parazellulärer Widerstand (ECIS-Modell)	ε <sub>r</sub>	relative Dielektrizitätszahl
S	integrale Schichtwägemempfindlichkeit	φ	Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom
T	absolute Temperatur	η	Viskosität
U	Spannung	λ	Wellenlänge
Z	Impedanz	ρ	Dichte, spezifischer Widerstand
Z'	Wirkwiderstand	θ	Einfallswinkel
Z''	Blindwiderstand	ω	Kreisfrequenz
d	Abstand, Dicke		
f	Frequenz		

**B Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten**

5 MHz-AT-Quarzresonatoren	KVG, Niederbischofsheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Calcein AM	Molecular Probes, Leiden (NL)
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Caspase-3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Collagen G	Seromed, Berlin
CO <sub>2</sub>	Westfalen AG, Münster
Cytochalasin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dextran	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DiI	Molecular Probes, Leiden (NL)
DMF	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's MEM Earle	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's MEM/Ham's F12	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol (techn. und abs.)	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Lab GmbH, Linz (Aut)
Gelatine	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gentamicin	Biochrom KG, Berlin
D-Glucose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethidium-Homodimer	Molecular Probes, Leiden (NL)
Glutarialdehyd	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Medium M199 Earle	Seromed, Berlin
MEM Earle (1x)	Biochrom KG, Berlin
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Mucasol	Brand, Wertheim
Natriumascorbat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt

NaOH  
 NCS (Kälberserum)  
 Paraformaldehyd  
 Penicillin  
 Percoll  
 Fotoresistlack Positiv 20

Reinst-Wasser  
 Saccharose  
 Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>)  
 Salzsäure (HCl)  
 Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
 Silikon-Kleber  
 Streptomycin  
 TRITC-Phalloidin  
 Triton-X-100  
 Trypsin  
 Wasserstoffperoxid (30 %)

Merck, Darmstadt  
 Seromed, Berlin  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Seromed, Berlin  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Kontakt Chemie, CRC Industries,  
 Iffezheim  
 Millipore, Eschborn  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Janssen Chimica, Geel (B)  
 Henkel, Düsseldorf  
 Seromed, Berlin  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Sigma Aldrich, Deisenhofen  
 Biochrom KG, Berlin  
 Fluka, Buchs (CH)

## C Geräte / Verbrauchsmaterialien

6-well-Gewebekulturplatten  
 24-well-Gewebekulturplatten  
 8-well Arrays  
 Autoklav 3870EL  
 Brutschränke:  
 BB 6220 CU  
 IG 150  
 IR 1500  
 Bunsenbrenner:  
 Fireboy  
 Fireboy plus  
 Digitalkamera  
 Digitalkamera Nikon F-301  
 Einmalpipetten  
 Einwegspritzen (5 und 20 ml)  
 Fluoreszenzmikroskop  
 FITC-Filter I3  
  
 TRITC-Filter N2.1  
  
 Greiner Röhrchen (10 ml und 50 ml)  
 Impedanzanalysator SI-1260  
  
 Kanülen  
 Kryoröhrchen (1.8 ml)  
 Kühlzentrifuge (J2-21/Rotor JA-14)  
 Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 180 cm<sup>2</sup>)  
 Kunststoffaufsatz (LabTek)  
 Latexhandschuhe  
 Markierungsobjektiv  
 Mikroskop-Kunststoffaufsatz  
  
 Objektträger (mit ITO-Beschichtung)  
 Petrischalen  
  
 Phasenkontrastmikroskop Diaphot TMD  
 FITC-Filter

Costar, Bodenheim  
 Costar, Bodenheim  
 Applied Biophys. Inc. (USA)  
 Jürgens, Münster  
  
 Heraeus, Hanau  
 Jouan, Unterhaching  
 Flow, Meckenheim  
  
 Tecnomare, Fernwald  
 Integra Biosciences, Fernwald  
 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar  
 Nikon, Düsseldorf  
 Brand, Wertheim  
 Henke-Sass, Tuttlingen  
 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar  
 Anregungsfilter: BP 450-490 nm  
 Dichroider Spiegel: 510 nm  
 Sperrfilter: LP 515 nm  
 Anregungsfilter: BP 515-560 nm  
 Dichroider Spiegel: 580 nm  
 Sperrfilter: LP 590 nm  
 Greiner, Frickenhausen  
 Solartron Instruments,  
 Farnborough (GB)  
 Henke-Sass Wolf Tuttlingen  
 Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach  
 Beckmann, München  
 Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach  
 Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach  
 Roth GmbH, Karlsruhe  
 Nikon, Japan  
 Harnischmacher Kunststofftechnik,  
 Kassel  
 PGO, Iserlohn  
 Greiner, Frickenhausen  
 Becton Dickinson, NJ, USA  
 Nikon, Düsseldorf  
 Anregungsfilter: 420-490 nm  
 Dichroider Spiegel: 510 nm

## TRITC-Filter

Pipettenspitzen

Quecksilberdampf-Lampe (100 W)

Quecksilberdampf-Lampe (100 W)

Reaktionsgefäße (1.5 und 2 ml)

Sterilbank: Laminar Flow BSB 6A und BSB 4A

Sterilfilter (12 mm, Porengröße 0.2 µm)

Sterilisator: UT 6120

Tischzentrifuge

Trockenofen

UV-Belichtungsgerät

Wärmeschrank: B 6120

Wasserbad GFL 1004

Sperrfilter: 520 nm

Anregungsfilter: 510-560 nm

Dichroider Spiegel: 580 nm

Sperrfilter: 590 nm

Ratiolab GmbH, Dreieich

Leistungselektronik Jena GmbH, Jena

Nikon, Düsseldorf

Eppendorf, Hamburg

Gelaire, Meckenheim

Satorius, Göttingen

Heraeus, Meckenheim

Poly Labo (USA)

Memmert, Schwabach

Isel, Eiterfeld

Heraeus, Hanau

GFL, Burgwedel

# Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei...

Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Wegener für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit der Promotion, die vielen wissenschaftlichen Anregungen sowie für seine großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft in jeder Form.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat und für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Frau Dipl.-Chem. Vanessa Wiemann für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen der Diplomarbeit und darüber hinaus.

Frau Dr. Silke Albermann, Frau Christina Rommel und Frau Dipl.-Chem. Vanessa Wiemann und Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Wegener für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Herrn Dipl.-Chem. Sebastian Schrot für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der AFM-Messungen.

Herrn Dr. Christian Weidenfeller für die Bereitstellung frisch präparierter, muriner Kapillarendothelzellen (MBCEC).

Frau Dr. Ines Nasdala und dem gesamten AK Vestweber für die „Versorgung“ mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC).

Frau Sabine Hüwel und Frau Steffi Wulff für die Organisation der Arbeitsgruppe und die vielen Unterhaltungen über Gott und die Welt.

Herrn Dr. Walter Storkebaum für die Organisation des Instituts sowie für seine Hilfe beim Überqueren der allgegenwärtigen Verwaltungshürden.

Frau Hedda Elverich, Frau Lydia Klapper und Frau Antje Wiese für ihre stete Hilfsbereitschaft bei den vielen alltäglichen Problemen und so manches Schwätzchen zwischendurch.

Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Willenbrink für das Lösen jedweder EDV-Probleme, den Aufbau und die Pflege des institutseigenen Intranets sowie für die immer wieder unterhaltsame DaSiBel.

Herrn Dr. Fredrick Höhn für seine Unterstützung bei allen technischen Schwierigkeiten, die Einweisung in „Die kleine Welt der Löttechnik“ und so manche „Wiederbelebung“ von schon tot geglaubtem Gerät.

Christina, Christoph, Jan, Johannes, Karin, Katta, Lertyot, Lindsay, Mairin, Miriam, Sabine, Sevgi, Tina, Thorsten und Vanessa für die gute Zusammenarbeit und die lustigen Stunden im Labor und außerhalb. Insbesondere an die legendären Gesprächsrunden am Freitagnachmittag sei hier erinnert.

Silke ebenfalls für die tolle Zeit im Labor, aber auch für die vielen nicht-wissenschaftlichen Aktivitäten, die in Erinnerung bleiben werden. Außerdem dafür, dass sie meinen manchmal unaufhaltsamen Wortschwall -fast immer- stoisch ertragen hat und ich meistens ausreden durfte J .

allen Mitgliedern des Arbeitskreises (Hirnis und Lipidis) und des gesamten Instituts für Biochemie für ihren Beitrag zur guten Arbeitsatmosphäre.

meinen Freunden in Hamm und anderswo, besonders bei Daniel, Dom, Fuhli, Timo und Ulrich.

meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mich während des gesamten Chemiestudiums und in der Zeit der Promotion jederzeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Edith für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihre Liebe.

## Lebenslauf

**Name:** Reiß  
**Vorname:** Björn  
**Geburtsdatum:** 27.06.1976  
**Geburtsort:** Hamm / NRW  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Veronika Reiß geb. Bittner und Gerhard Reiß

### Schulbildung

---

Dietrich-Bonhoeffer-Grundschule, Hamm-Westtünen 1982-1986  
Beisenkamp Gymnasium, Hamm 1986-1995  
Allgemeine Hochschulreife: Beisenkamp Gymnasium am 14. Juni 1995

### Wehrdienst

---

Paracelsus Kaserne, Hamm 07/1995-04/1996

### Studium

---

Studium der Chemie (Diplom) an der WWU Münster 1996-2001  
Studium der Pharmazie (Staatsexamen) an der WWU Münster 1998-2004  
Promotionsstudium im Fachbereich Chemie und Pharmazie an der WWU Münster 2001-2004

### Prüfungen

---

Diplom-Vorprüfung im Fach Chemie an der WWU Münster 09.12.1998  
Diplom-Prüfung im Fach Chemie an der WWU Münster 26.03.2001

### Tätigkeiten

---

Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie der WWU Münster 10/2000-02/2001  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie der WWU Münster 04/2001-03/2004

### Dissertation

---

Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie der WWU Münster unter der Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Joachim Wegener 04/2001