

Biochemie

**Tierische Zellen auf nanoporösen Oberflächen:  
Grundlagen und bioanalytische  
Anwendungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität

vorgelegt von  
**Christina Elisabeth Rommel**  
aus Speyer

**2007**

Dekan:

Prof. Dr. E. Hahn

Erster Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. J. Wegener

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Galla

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.07

Tag der Promotion: 17.04.07

*Meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Zelluläre Grenzflächengewebe.....	4
1.1.1	Zell-Zell-Kontakte barrierebildender Zellen.....	4
1.1.2	Aufbau und Funktion des Adhäsionskontaktes adhärenter Zellen.....	9
1.1.3	Aufbau und Erhalt der Zellpolarität in Epithelzellen.....	11
1.1.4	Bestimmung der mikromechanischen Eigenschaften adhärenter Zellen.....	12
1.2	Zellbasierte Sensorsysteme.....	14
1.2.1	Cytokompatibilität sensorischer Oberflächen.....	14
1.2.2	Elektrische Untersuchungen zur Zellmorphologie und zum Kontaktbereich zwischen Zelle und Substrat.....	16
1.2.3	Poröse Oberflächen als Kultursubstrat für adhärenente Zellen.....	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	23
3.1.1	Kultivierung von Zelllinien.....	23
3.1.1.1	Subkultivierung.....	24
3.1.1.2	Kryokonservierung.....	25
3.1.2	Primärkultivierte Zellen.....	26
3.1.2.1	Epithelzellen des porcinen <i>Plexus Chorioideus</i> .....	27
3.1.2.2	Porcine cerebrale Kapillarendothelzellen.....	29
3.2	Mikroskopische Methoden.....	30
3.2.1	Konfokale Laser-Raster Mikroskopie.....	31
3.2.1.1	Konfokale Bildentstehung.....	31
3.2.1.2	Optisches Auflösungsvermögen.....	33
3.2.2	Charakterisierung der nanoporösen Silizium-Substrate mit Hilfe der CLSM.....	36
3.2.2.1	Reinigung der Substrate.....	36
3.2.2.2	Eindringen einer Fluoreszenzsonde in die Poren.....	36
3.2.3	Charakterisierung des Zellwachstums auf nanoporösen Substraten.....	36
3.2.3.1	Zellkultivierung auf nanoporösen Silizium-Substraten.....	37
3.2.3.2	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von ZO-1, Occludin, Claudin-1, Vinculin und der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....	38
3.2.3.3	Fluoreszenzmarkierung des filamentösen Aktins durch TRITC-Phalloidin.....	39
3.2.3.4	Lebend/Tot – Assay.....	40

3.2.4	Ortsaufgelöste Untersuchungen zur Permeation einer Fluoreszenzsonde (Permeationsassay).....	41
3.2.4.1	Permeabilisierung von Einzelzellen .....	42
3.2.4.2	Permeabilisierung von Zellbereichen.....	43
3.2.5	Rasterkraftmikroskopie.....	43
3.2.5.1	Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie.....	44
3.2.5.2	Kraft-Abstands-Messungen.....	45
3.2.5.3	Messung von Kraft-Abstands-Kurven osmotisch gestresster Zellen....	46
3.2.5.4	Zellhöhenbestimmung durch extrazelluläre Fluorophore am CLSM....	48
3.3	Impedanzspektroskopische Untersuchungen .....	49
3.3.1	Grundlagen der Impedanzspektroskopie.....	50
3.3.2	Experimentelle Durchführung von Impedanzmessungen.....	53
3.3.3	Impedanzspektroskopische Messungen im <u>TER-Modus</u> .....	55
3.3.4	Impedanzspektroskopische Messungen im <u>ECIS-Modus</u> .....	58
3.3.4.1	Auswertung und Ersatzschaltbild der Impedanzspektren zellbedeckter Metallelektroden .....	59
3.3.4.2	Messung von biologischer <i>Micromotion</i> .....	62
3.3.4.3	ECIS-Untersuchungen auf planaren und porösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten.....	64
3.3.5	ECIS-Untersuchungen auf porösen Elektroden in Kombination mit Messungen im TER-Modus.....	69
3.3.5.1	Untersuchungen an Elektroden unterschiedlicher Porosität.....	72
3.3.5.2	<i>Micromotion</i> auf porösen Elektroden.....	72
3.3.5.3	Vergleichende Untersuchung im ECIS- und TER-Modus.....	73
3.3.5.4	Einsatz von Collagenase als Nachweis des basolateralen Zugangs auf porösen Elektroden (ECIS-Modus).....	73
3.3.5.5	Untersuchungen zum spezifischen Widerstand im Zell-Substrat-Kontakt.....	74
3.4	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie.....	75
3.4.1	Messprinzip und Messaufbau.....	75
3.4.2	Probenpräparation.....	81
<b>4</b>	<b>Lateral aufgelöste Permeationsstudien auf Basis nanoporöser Substrate.....</b>	<b>83</b>
4.1	Charakterisierung der nanoporösen Oberflächen.....	84
4.1.1	Untersuchungen zur Oberflächentopographie.....	84
4.1.2	Oberflächenbenetzung und Befüllung der Poren.....	88
4.2	Zelldifferenzierung auf porösen Silizium-Substraten.....	94
4.2.1	Immuncytochemische Charakterisierung der Epithelzelllinie	

---

MDCK II .....	95
4.2.2 Immuncytochemische Charakterisierung der Primärkultur des porcinen <i>Plexus chorioideus</i> Epithels.....	99
4.2.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung von MDCK II-Zellen auf nanoporösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten.....	104
4.2.3.1 Impedanzspektroskopische Charakterisierung zellfreier planarer und poröser Goldelektroden.....	105
4.2.3.2 Impedanzspektroskopische Charakterisierung von MDCK II-Zellen auf planaren und porösen Elektroden mit Hilfe ECIS-Modell.....	107
4.3 Lateral aufgelöste Permeationsstudien.....	111
4.3.1 Optische Analyse mit der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie.....	112
4.3.1.1 Einsatz der Epithelzelllinie MDCK II im Permeationsassay.....	113
4.3.1.2 Untersuchungen zur Porenbefüllung unterhalb von Zellkörpern bei parazellulärem Permeationsweg.....	117
4.3.1.3 Simulation von Defektstellen im Permeationsassay.....	122
4.3.2 Ortsaufgelöster Permeationsassay an anderen Grenzflächengeweben.....	126
4.3.2.1 Die epithel-ähnlichen Zelllinie NRK im Permeationsassay.....	126
4.3.2.2 Die Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 im Permeationsassay.....	127
4.3.2.3 Primärkultivierte Endothelzellen aus dem Schweinehirn (PBCEC) im lateral aufgelösten Permeationsassay.....	129
4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der Porenfüllung .....	131
4.3.3.1 Oberflächenanalyse der zellfreien porösen Substrate im <i>burst alignment</i> Modus.....	132
4.3.3.2 Untersuchungen zur Stabilität der Proben im Hochvakuum und zur massenspektrometrischen Analyse in Abhängigkeit von der Probenpräparation.....	134
4.3.3.3 ToF-SIMS-Untersuchungen Methanol/Eisessig-fixierter Zellen auf nanoporösem Silizium.....	143
4.4 Diskussion.....	145
4.4.1 Allgemeine und mikroskopische Charakterisierung der nanoporösen Oberflächenstrukturen .....	146
4.4.2 Untersuchungen zur Zelldifferenzierung auf porösen Silizium-Substraten..	148
4.4.2.1 Immuncytochemische Untersuchungen zum Differenzierungs- zustand der Epithelzelllinie MDCK II.....	148
4.4.2.2 Immuncytochemische Untersuchungen zum Differenzierungs- zustand der Primärkultur des porcinen <i>Plexus chorioideus</i> Epithels .....	151

4.4.2.3	Impedanzspektroskopische Untersuchungen von MDCK II-Zellen auf porösen Elektroden.....	153
4.4.3	Lateral aufgelöste Permeationsstudien.....	160
4.4.3.1	Der optische Nachweis mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie am Beispiel der Epithelzelllinie MDCK II.....	162
4.4.3.2	Untersuchungen zum orts aufgelösten Permeationsassay an anderen Grenzflächengeweben.....	165
4.4.3.3	Massenspektrometrische Analyse der Porenfüllung im Permeationsassay am Beispiel der Epithelzelllinie MDCK II.....	168
<b>5</b>	<b>Impedanzspektroskopische Untersuchungen barrierebildender Zellschichten auf porösen Goldfilm-Elektroden.....</b>	<b>174</b>
5.1	Charakterisierung zellfreier poröser Goldelektroden mit durchgehenden Poren..	175
5.1.1	Eigenschaften der Elektroden auf Basis permeabler Membranen .....	175
5.1.2	Vorstellung des kombinierten Messaufbaus für die Impedanzspektroskopie und Charakterisierung der Gegenelektrode.....	177
5.1.2.1	Modellrechnungen zum Einfluss der Impedanz der Gegenelektrode..	178
5.1.2.2	Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Gegenelektrode...181	
5.2	Impedanzspektroskopische Untersuchungen epithelialer Zellschichten auf porösen Goldelektroden.....	183
5.2.1	Impedanzspektroskopische Charakterisierung der zellfreien porösen Goldelektroden.....	183
5.2.2	Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Epithelzelllinie MDCK II auf nanoporösen Goldelektroden im ECIS-Modus.....	186
5.2.3	Untersuchungen zur Motilität von MDCK II-Zellen auf porösen Goldelektroden.....	188
5.2.4	ECIS- und TER-Modus: Vergleichende Untersuchungen am Beispiel epithelialer Zellschichten.....	189
5.2.4.1	Untersuchungen zum Einfluss einer passiven Goldschicht auf impedanzspektroskopische Messungen im TER-Modus.....	189
5.2.4.2	Charakterisierung <u>derselben</u> Zellschicht durch Messungen im ECIS- und TER-Modus.....	194
5.2.4.3	Charakterisierung <u>derselben</u> Zellschicht nach Vernetzung der zellulären Proteine durch Messungen im ECIS- und TER-Modus.....	197
5.3	Anwendungen für ECIS-Messungen auf porösen Goldelektroden.....	202
5.3.1	Impedanzspektroskopische Untersuchungen zur Zelldifferenzierung von <i>Plexus Chorioideus</i> auf porösen Goldelektroden.....	202
5.3.2	Untersuchungen zur apikalen bzw. basolateralen Zugabe einer Protease	

am Beispiel von MDCK II-Zellen.....	207
5.3.3 Modulation des spezifischen Elektrolytwiderstandes $\rho_{sub}$ im Adhäsionskontakt.....	208
5.4 Diskussion.....	213
5.4.1 Der kombinierte Messaufbau und Modellrechnungen zum Einfluss der Gegenelektrode auf impedanzspektroskopische Untersuchungen.....	214
5.4.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen epithelialer Zellschichten auf porösen Elektroden.....	217
5.4.3 ECIS- und TER-Modus: Vergleichende Betrachtung am Beispiel <u>derselben</u> epithelialen Zellschicht.....	223
5.4.3.1 Einfluss einer passiven Goldschicht auf die Modellparameter im TER-Modus.....	223
5.4.3.2 Der Einfluss unterschiedlicher Messmodi auf die Modellparameter...	224
5.4.4 Anwendungsbeispiele für den ECIS-Messaufbau auf porösen und gleichzeitig permeablen Elektroden.....	229
5.4.4.1 Zeitaufgelöste Beobachtung der Zellmorphologie auf permeablen Membranen mit der ECIS-Methode .....	229
5.4.4.2 Untersuchungen zur apikalen bzw. basolateralen Zugabe einer Protease am Beispiel von MDCK II-Zellen.....	230
5.4.4.3 Elektrische Charakterisierung des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt am barrierebildenden Epithel.....	231
<b>6 Massenspektrometrische 3D-Tiefenprofilierung von tierischen Zellen.....</b>	<b>235</b>
6.1 Dreidimensionale Tiefenprofilierung von NRK-Zellen.....	235
6.2 Diskussion.....	240
<b>7 Mikromechanik adhärenter Zellen unter osmotischem Stress.....</b>	<b>244</b>
7.1 Untersuchung der Zellhöhenänderung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.....	244
7.2 Mikromechanik adhärenter Zellen unter osmotischem Stress.....	245
7.3 Diskussion.....	249
<b>8 Zusammenfassung.....</b>	<b>253</b>
<b>9 Summary.....</b>	<b>255</b>
<b>10 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>257</b>
 <b>Anhang</b>	
<b>A</b> Abkürzungsverzeichnis.....	267
<b>B</b> Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten.....	268
<b>C</b> Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	269



# 1 Einleitung

Die Isolierung und *in vitro*-Kultivierung von Zellen aus tierischen Organismen ermöglicht unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen, herausgelöst aus dem komplexen System eines lebenden Tieres, die Eigenschaften und die Physiologie von Zellen zu untersuchen. Grundlegend für die Kultivierung von Zellen ist, dass die essentiellen Parameter der *in vivo*-Situation wie Temperatur, pH-Wert und die Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren auf die Bedingungen der *in vitro*-Situation übertragen werden können. Seit Ende des 19. Jahrhunderts haben Wissenschaftler daher versucht, über die Zusammensetzung der verwendeten Medien und durch Verwendung spezieller Zellkultursubstrate die Voraussetzungen der natürlichen Umgebung so gut es geht zu simulieren (Jayme und Smith, 2000). Mittlerweile steht aufgrund der ständigen Verbesserung der Isolationstechniken und Kulturbedingungen eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellmodellen für die meisten Gewebe des Körpers zur Verfügung, die über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden können. So bietet allein die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ in Braunschweig über 580 verschiedene humane und tierische Zelllinien an (DSMZ, 2007). Dies bedeutet allerdings nicht, dass durch die Kulturbedingungen das tatsächliche chemische Milieu und die dreidimensionale Architektur des Herkunftsgewebes einer Zelllinie so weit nachgestellt werden kann, dass Veränderungen von Phänotyp und Differenzierung isolierter Zellen ausgeschlossen sind. Ist eine möglichst exakte Modellierung der *in vivo*-Situation das Ziel, werden daher üblicherweise primärkultivierte Zellen eingesetzt, die nach ihrer mechanischen oder enzymatischen Freisetzung allerdings nur für einen sehr begrenzten Zeitraum in Kultur gehalten werden können. Primärkultivierte Zellen zeigen hinsichtlich ihrer Differenzierung die größte Verwandtschaft zu den entsprechenden Zellen *in vivo* (Freshney, 1984). Die Co-Kultur von Zellen, die *in vivo* eng vergesellschaftet vorliegen, ist eine Möglichkeit, die Ähnlichkeit zum natürlichen System weiter zu erhöhen (Dehouck et al., 1992; Cecchelli et al., 1999). Für viele Fragestellungen, in denen die allgemeinen zellulären Eigenschaften im Vordergrund stehen, werden allerdings Zelllinien eingesetzt, deren Vorteil darin besteht, dass sie sich über einen langen Zeitraum kultivieren lassen (Freshney, 1984). So kann zum Beispiel die Epithelzelllinie MDCK II als Modell für ein Grenzflächengewebe genutzt werden, das relativ einfach in der Handhabung ist, und durch die Möglichkeit zur Kryokonservierung der Zellen sogar bevorratet werden kann (Simons und Fuller, 1985). Obwohl auch im Bereich der zellulären Grundlagenforschung die Fragestellungen bei weitem noch nicht als komplett aufgeklärt angesehen werden können, geht die Nutzung der *in vitro*-Zellkultursysteme mittlerweile weit über diesen Anwendungsbereich hinaus. So werden zum Beispiel endo- und epitheliale Zellschichten dazu genutzt, in Permeationsassays den Metabolit- und Pharmakatransport über eine zelluläre Barriere zu untersuchen. In diesem Zu-

sammenhang hat die Verwendung von porösen Filtermembranen als Kulturoberfläche Bedeutung erlangt. Diese beeinflussen im Idealfall den Transfer der Substanzen nicht, erlauben aber, zwei räumlich getrennte Kompartimente zu beiden Seiten der Zellschicht aufzubauen (Pitt und Gabriel, 1987). Das erhaltene Ergebnis ist integral, das heißt es ermöglicht keine Unterscheidung zwischen dem trans- oder parazellulären Permeationsweg. Eine eingeschränkte Vorhersage darüber, ob eine Substanz trans- oder parazellulär permeieren wird, ist jedoch dennoch möglich, wenn die Hydrophilie eines Moleküls bekannt ist. Für hydrophobe Moleküle ist es möglich, durch die Zellmembran zu diffundieren, während hydrophile Substanzen im Interzellularraum verbleiben. Dadurch ist der parazelluläre Weg bevorzugt. Zur Bestimmung der Hydrophilie wird der Verteilungskoeffizient einer Testsubstanz zwischen einer wässrigen Phase und n-Oktanol ermittelt (Rim et al., 1986). Allerdings kann dadurch weder der Weg von hydrophilen Stoffen über die Membran durch spezifische Transportsysteme noch ein möglicher Rücktransport aus dem Zelllumen oder ein Abbau der hydrophoben Substanzen vorhergesagt werden. Ein technisch aufwendiger Ansatz untersucht den Einbau einer Testsubstanz in eine an der Luft-Wasser-Grenzfläche gespreitete Lipid-Monoschicht durch die Messung des lateralen Filmdrucks mit der Langmuirschen Filmwaage (Seelig et al., 1994). Unberücksichtigt bleibt aber auch bei diesem Ansatz die Aktivität von zellulären Transportsystemen wie den *Multi-Drug-Resistance*-Proteinen, die lipophile Substanzen aus der Membran in den Interzellularraum zurücktransferieren (Borst et al., 2000).

Neben der Untersuchung des Transportes über zelluläre Grenzflächengewebe stellt der Einsatz von zellbasierten, chemischen Sensoren eine Nutzung lebender Zellen mit hohem Anwendungsbezug dar. Die Spezifität der zellulären Rezeptoren macht die Zellen zu hochsensitiven Werkzeugen. So werden Zellen immer häufiger eingesetzt, um Substanzen zu charakterisieren oder ihre Verträglichkeit an komplexen, lebenden Systemen zu testen. Anwendungsmöglichkeiten bestehen daher in der klinischen Diagnostik, dem pharmakologischen Screening oder dem Umwelt-Monitoring (Pancrazio et al., 1999). Auf diese Weise können zum Beispiel Untersuchungen an komplexen Organismen besser vorbereitet werden, oder werden zumindest in frühen Entwicklungsphasen sogar hinfällig. Zum Teil findet eine noch stärkere Reduktion der Komplexität statt, indem Assays verwendet werden, in denen einzelne, isolierte und aufgereinigte Biomoleküle genutzt und auf ihre Wechselwirkung mit der Testsubstanz geprüft werden. Allerdings bringt diese Reduktion auf die unmittelbar an einer Reaktion beteiligten Moleküle den Nachteil mit sich, dass zwar eine Aktivierung oder Inhibierung der unmittelbaren, biologischen Zielstruktur erfasst wird, das Auslösen der physiologischen Reaktion aber von einer nachgeschalteten, komplexen Signaltransduktion abhängig sein kann (Wegener, 2003). Daher stellen zellbasierte Biosensoren in diesem Zusammenhang quasi das Bindeglied zwischen Untersuchungen zum Verständnis molekularer Wechselwirkungen und zur Auswirkung auf komplexe Organismen dar. Genutzt wird die Eigen-

schaft von Zellen, ständig die verschiedenen Signale physikalischer und chemischer Natur aus ihrer Umwelt zu integrieren, um angemessen zum Wohle des Organismus zu reagieren. Auf diese Weise werden zum Beispiel Entscheidungen über Zellteilung oder Zelltod getroffen, und die Aktivierung bestimmter Stoffwechselwege oder die Produktion und Freisetzung von Proteinen eingeleitet. Die Beobachtung solcher zellulärer Prozesse ist im wesentlichen Inhalt funktionaler zellulärer Assays (Brischwein et al., 2005). Grundvoraussetzung ist, dass es gelingt, die durch eine Substanz ausgelöste zelluläre Reaktion zu registrieren und im Idealfall auch zu quantifizieren. Im Idealfall ist die Sensormessung extrazellulär und so angelegt, dass sie keine Beeinträchtigung oder Störung des Systems verursacht. An die Beschaffenheit dieser Schnittstelle werden daher sowohl von technischer als auch von zellulärer Seite extreme Ansprüche gestellt. Diese können zum Teil im Vorfeld berücksichtigt, müssen häufig aber empirisch untersucht werden. Entscheidend ist, dass das richtige Substrat und *Interface*, sowie eine der Problemstellung angemessene zelluläre Komponente miteinander verknüpft werden können. Viele zelluläre Sensorsysteme sind auf den Nachweis von Stoffwechselprodukten in Abhängigkeit von chemischen, biologischen oder physikalischen Stimuli spezialisiert (Wolf et al., 1998). Diese Arten von Sensorsystemen spielen allerdings im Hinblick auf diese Arbeit eine eher untergeordnete Rolle. Studien, in denen zellbedeckte Elektroden als Biosensoren zur Detektion von cytotoxischen Schadstoffen eingesetzt wurden, wurden von *Luong et al.* (2001) und *Xiao und Luong* (2003) bereits erfolgreich vorgestellt.

Aus Sicht der Cytokompatibilität von Oberflächen, die zum Beispiel in Zusammenhang mit medizinischen Implantaten eine entscheidende Rolle spielt, sind Methoden, die den Zugang zum Adhäsionskontakt der Zellen ermöglichen, von großer Bedeutung. Neben der ECIS-Technik, die in Kapitel 1.2.2 genauer vorgestellt werden soll, ist die Quarzmikrowaage (QCM) Technik eine geeignete Methode, die mit hoher Sensitivität zur Charakterisierung von Adhäsionsprozessen eingesetzt werden kann. *Wegener et al.* (1999) nutzen die QCM, um in Adhäsionsexperimenten mehrere Zelltypen zu untersuchen, und stellen für die verschiedenen Zellsorten unterschiedliche resultierende Resonanzfrequenzänderungen fest. Umfangreiche mikrogravimetrische Untersuchungen des Adhäsionskontaktes tierischer Zellen stellt *Reiß* (2004) vor. Im Bereich der medizinischen Diagnostik wird von *Süselbeck et al.* (2005) ein System vorgestellt, das die Impedanzmessung innerhalb eines Blutgefäßes im lebenden Organismus erlauben soll. Die dazu nötigen Elektroden sind auf einem Katheter aufgebracht und werden an entsprechender Position gegen die Gefäßwand gepresst. Das elektrische *Interfacing* von Nervenzellen auf Halbleiterchips untersucht die Möglichkeiten zum Aufbau neuronaler Netze (Fromherz, 2001). Grundlage dafür ist die Möglichkeit zur extrazellulären Ableitung der elektrischen Aktivität von Neuronen, die durch den Einsatz von Feldeffekt-Transistoren erreicht wird (Fromherz et al., 1991, Fromherz und Stett, 1995).

## 1.1 Zelluläre Grenzflächengewebe

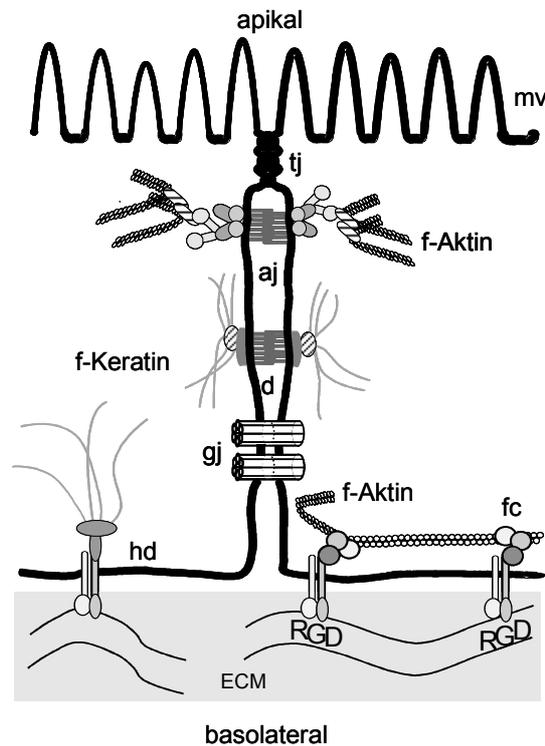
Die beste Medizin wirkt nur dann, wenn die Arzneistoffe dorthin gelangen, wo sie wirken sollen. Die Natur errichtet aus guten Gründen, häufig, um sich vor Krankheitserregern und toxischen Substanzen zu schützen, biologische Barrieren in Form von Grenzflächengeweben. Deren physiologische Bedeutung besteht darin, als hochselektive Permeabilitätsbarriere zwischen zwei Kompartimenten zu fungieren, und auf diese Weise abgegrenzte Reaktionsräume voneinander entstehen zu lassen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene barrierebildende Zelllinien zur Sensorentwicklung eingesetzt, wobei die grundlegenden Studien an der Epithelzelllinie MDCK II (*Madin-Darby Canine Kidney, Strain II*) durchgeführt wurden. Epithelien sind Grenzflächengewebe, die in praktisch jedem Organ die strategisch wichtige Funktion der Trennung zwischen dem äußeren und inneren Milieu übernehmen. Eine andere Rolle nehmen die Endothelzellen ein, die die inneren Oberflächen der Blutgefäße auskleiden. Unabhängig von einer speziellen Differenzierung können grundlegende morphologische Merkmale für Epithelien formuliert werden. Die molekularen und morphologischen Grundlagen für die Barriereigenschaften der Gewebe liegen in der Ausbildung mehr oder weniger dichter Zell-Zell-Kontakte, die eine ungehinderte parazelluläre Diffusion von Metaboliten und Ionen verhindern. Die sekretorischen und absorbierenden Eigenschaften werden durch spezielle Transportsysteme in der apikalen und basolateralen Membran umgesetzt. Daher ist der Erhalt einer ausgeprägten Polarität der Zellen enorm wichtig und stellt auch *in vitro* ein charakteristisches Merkmal dar. Im Folgenden sollen die Merkmale von Grenzflächengeweben, insbesondere epithelialer Zellen, vorgestellt werden.

### 1.1.1 Zell-Zell-Kontakte barrierebildender Zellen

Die Zellen sind über spezielle Kontaktstellen untereinander sowie mit der Extrazellulären Matrix verbunden. Es können drei verschiedene Klassen unterschieden werden: undurchlässige Verbindungen, Haftverbindungen und kommunizierende Verbindungen. Für die zelluläre Barriere entscheidend ist die undurchlässige Verbindung. Durch die *tight junctions* sind die Zellen in der Lage, Konzentrationsunterschiede für hydrophile Moleküle über die Zellschicht aufrecht zu erhalten. Innerhalb der Haftverbindungen gibt es zwei Untergruppen, die Adhärenzverbindungen, an die die Aktinfilamente binden und die Desmosomen, an denen die Intermediärfilamente zusammenlaufen. Die Haftverbindungen verknüpfen die Zellen zu widerstandsfähigen Struktureinheiten, indem das Cytoskelett jeder einzelnen Zelle einbezogen wird. *Gap junctions* gehören dagegen zu den kommunizierenden Verbindungen, die den direkten Informationsaustausch zwischen zwei Zellen ermöglichen.

Abbildung 1.1 gibt eine schematische Übersicht, die die Lokalisation der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte widerspiegelt, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.



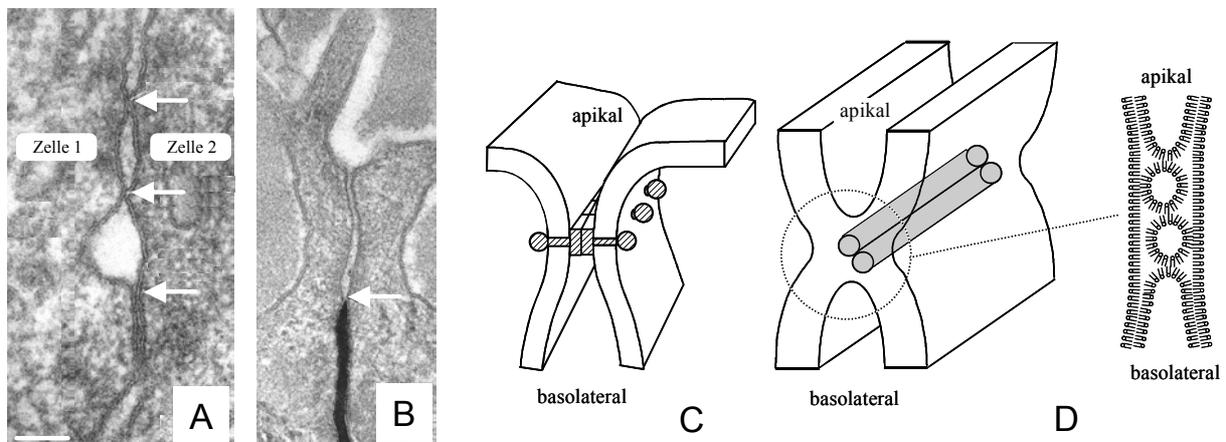
**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen in Epithelzellen (mv: Mikrovilli; tj: *tight junctions*; aj: *adherens junctions*; d: Desmosomen; gj: *gap junctions*; hd: Hemidesmosomen; fc: Fokalkontakte; ECM: Extrazelluläre Matrix; RGD: Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp innerhalb von ECM-Proteinen) (aus Wegener, 1998).

### **Tight junctions**

Die *tight junctions* als undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen sind hauptverantwortlich für die Barriere des Zell-Zell-Kontaktes, die den Ionen- und Metabolittransport auf dem parazellulären Weg limitiert (*gate*-Funktion). Daneben erfüllen sie die wichtige Aufgabe der Diffusionsbarriere innerhalb der Zellmembran, und ermöglichen so die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Membranpolarität (*fence*-Funktion) (Wegener, 2001; Tsukita, 2004). Die Membranpolarität resultiert aus einer Ungleichverteilung von Membranbestandteilen, die in einem eigenen Kapitel (1.1.3) im Zusammenhang mit der Zellpolarität genauer beleuchtet werden soll. Aus der Barrierefunktion resultiert die eingeschränkte parazelluläre Permeabilität für Moleküle und Ionen. Dabei existieren für verschiedene Grenzflächengewebe durchaus gewebsspezifische Unterschiede in Bezug auf die parazelluläre Permeabilität. Zusätzlich können individuelle Differenzen aufgrund des Differenzierungszustandes und durch äußere Stimuli auch innerhalb eines Epitheltyps auftreten (Cerejido et al., 1993). Insbesondere im Fall von *in vitro*-Modellen ist der Differenzierungszustand ein wichtiger Parameter und eine Möglichkeit zur nicht invasiven Kontrolle des Differenzierungszustandes. Besonders dichte Epithelien werden typischer Weise in Organen ausgebildet, in denen ein hoher elektrochemischer Gradient aufrechterhalten werden muss (z.B. in der Niere). Weniger dichte Zell-Zell-

Kontakte werden in den Darmepithelien ausgebildet, die einen hohen isoosmotischen Flüssigkeitsfluss ermöglichen. Der parazelluläre Transport ist im Unterschied zum transzellulären ausnahmslos passiv, d.h. entlang von Konzentrationsgefällen. Ist dieser Weg durch die *tight junctions* streng limitiert, entsteht die Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung im Interzellularraum auf beiden Seiten der Barriere zu modifizieren. So können durch spezifische Transportsysteme in der apikalen bzw. basolateralen Membrandomäne elektrische und chemische Gradienten aufgebaut und aufrechterhalten werden (Wegener, 2001). Zur Bestimmung der Permeationsrate über die *tight junctions* werden wie unter Kapitel 1 erwähnt, Permeationsassays eingesetzt, die den Stofffluss über eine Zellschicht in Abhängigkeit von der Zeit bestimmen. *Schneeberger* und *Lynch* (1992 und 2004) zeigen außerdem, dass die Permeabilität für Moleküle und Ionen mit dem elektrischen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte korreliert ist.

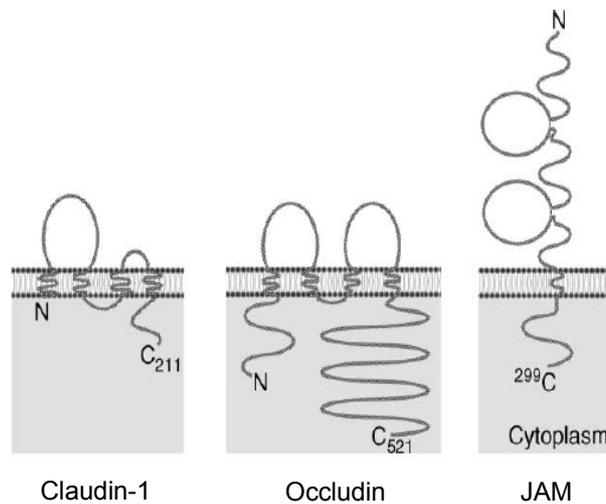
Die *tight junctions* befinden sich an den Kontaktstellen von Epithelzellen nahe der apikalen Membran, in der sogenannten *Zonula occludens* (**Abb. 1.1**). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dünnschnitten entlang der lateralen Membran werden Kontaktstellen zwischen den Zellmembranen zweier Zellen sichtbar (**Abb. 1.2 A**). Die restriktive Diffusionsbarriere kann anhand von Markersubstanzen hervorgehoben werden (**Abb. 1.2 B**).



**Abb. 1.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Morphologie der *tight junctions*. **A:** lokale Kontaktbereiche (Pfeile) der Membran zweier Zellen. **B:** *tight junctions* formen eine restriktive Barriere (Pfeil) gegenüber der Permeation einer Markersubstanz; Aufnahmen aus Alberts et al., 1995. **C:** Proteinmodell für den Zell-Zellkontakt. **D:** Lipidmodell (Wegener, 1998)

Die molekulare Struktur der *tight junctions* ist nach wie vor noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings existieren mittlerweile gesicherte Erkenntnisse darüber, dass bestimmte Proteine daran beteiligt sind. Nach dem daraus entwickelten Proteinmodell sind mehrere Proteine bzw. Proteinfamilien an den *tight junctions* beteiligt (**Abb. 1.2 C**). Prominente Vertreter sind Occludin sowie die JAMs (*Junctional Adhesion Molecule*) und die Claudin-Proteinfamilie. Das Occludin und die Claudine haben dreidimensionale Strukturmerkmale gemein. Neben vier Transmembrandomänen ragen Schleifen in den Extrazellulärraum, während die N- und C-terminalen Enden der Proteine ins Cytoplasma reichen. JAM zeigt eine etwas andere

Struktur mit nur einer Transmembrandomäne. Auch hier sind extrazelluläre Proteinschleifen vorhanden, aber das N-terminale Ende verbleibt im Extrazellulärraum (**Abb. 1.3**). Auf cytosolischer Seite ist das ZO-1-Protein an den Zell-Zell-Kontakten beteiligt und stellt die Verbindung zum Aktin-Cytoskelett her (Furuse et al., 1994). Für die extrazellulären Schleifen der drei Proteine zw. Proteinfamilien geht man davon aus, dass Wechselwirkungen zwischen den Molekülen zweier Zellen den Spalt sehr effektiv verschließen können, wobei bisher nicht geklärt ist, ob homophile oder heterophile Interaktionen hierfür verantwortlich sind. Im Fall von Occludin konnte durch Überexpression des Proteins eine Verstärkung der Barriereeigenschaften nachgewiesen werden (Fanning et al., 1999). Für die Transmembranproteine konnte gezeigt werden, dass Verbindungen zum Aktincytoskelett vorhanden sind, was grundsätzlich an Strukturmerkmale der *adherens junctions* und Desmosomen erinnert (Wegener, 2001).



**Abb. 1.3:** Übersicht über die Transmembranproteine, die am Aufbau der *tight junctions* beteiligt sind (Tsukita, 2004).

Über das Proteinmodell lassen sich allerdings nicht alle Eigenschaften der *tight junctions* erklären. Nach dem Lipidmodell (**Abb. 1.2 D**) sind die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren Stränge invertierte micellenartige Lipidzylinder, die durch Fusion der äußeren Lipidmonoschichten benachbarter Zellen entstehen. Unterstützt wird die Annahme der Beteiligung solcher Lipidstrukturen dadurch, dass *Grebenkämper* und *Galla* (1994) zeigen konnten, dass fluoreszenzmarkierte Lipidsonden in der exoplasmatischen Lipidschicht interzellulär diffundieren können, so lange die *tight junctions* intakt sind. Auch eine Kombination beider Modelle ist denkbar, bei dem die Proteine die Bildung der Lipidzylinder initiieren und stabilisieren (Wegener und Galla, 1996).

### **Desmosomen und *adherens junctions***

Desmosomen sind Haftverbindungen, die in Epithelzellen häufig anzutreffen sind, während sie in Endothelzellen meist fehlen. Die Desmosomen sind in der lateralen Membran unter-

halb der *tight junctions* angesiedelt (**Abb. 1.1**). Sie ähneln in ihrer Ausprägung den Hemidesmosomen im Adhäsionskontakt der Zellen und sind wie diese an die Intermediärfilamente der Zellen gebunden. Die *adherens junctions* bilden in Epithelschichten oft einen durchgehenden Adhäsionsgürtel unmittelbar unterhalb der *tight junctions* und sind, im Unterschied zu den Desmosomen, an die Aktinfilamente der Zellen gebunden. Daraus entsteht der Eindruck eines Aktinürtels in der lateralen Membran. Die Adhäsionsgürtel benachbarter Zellen stehen einander gegenüber, und die beteiligten Membranen werden über Proteinwechselwirkungen zusammengehalten (Alberts et al., 1995). Beiden Haftverbindungen liegt dazu ein ähnliches Konstruktionsprinzip aus zwei Arten von Proteinen zugrunde. Die Transmembrankomponente zwischen den Zellen sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherine. Nach einem Modell von Gumbiner und Patel (1995) wird die Verbindung der Zellen zunächst durch eine homophile Interaktion zweier benachbarter Cadherine einer Zelle gebildet. Diese Strukturen wechselwirken dann jeweils mit den Cadherin-Dimeren von benachbarten Zellen und bilden so den so genannten *Cadherin-Zipper* aus (in Anlehnung an das Funktionsprinzip eines Reißverschlusses). Es ist also weniger die molekulare Struktur als vielmehr die Art und Weise und mit welchen Komponenten des Cytoskeletts eine Verbindung hergestellt wird, die ein deutliches Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Haftverbindungen darstellt. Dementsprechend unterscheiden sich die intrazellulären Anheftungsproteine. Im Fall der *adherens junctions* zählen dazu verschiedene periphere Membranproteine wie  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Catenine,  $\alpha$ -Aktinin, Vinkulin und Paxilin. Die Desmosomen sind dagegen über Desmoplakin und Plakoglobin an die Intermediärfilamente gebunden.

Beide Haftverbindungen stehen über jeweiligen Komponenten des Cytoskeletts intrazellulär mit weiteren Haftverbindungen in der basolateralen Membran in Verbindung. Die Aktinbündel laufen in so genannten Fokalkontakten zusammen, die Intermediärfilamente sind an die Hemidesmosomen gebunden. Beide Haftverbindungen stellen so die Verbindung des Cytoskeletts zur Extrazellulären Matrix her, einer Proteinschicht im Adhäsionskontakt. Sowohl die Fokalkontakte als auch die Hemidesmosomen sollen im Zusammenhang mit dem Zell-Substrat-Kontakt genauer beschrieben werden (Kapitel 1.1.2)

### **Gap junctions**

Die *gap junctions* dienen im Gegensatz zu den bisher betrachteten Zell-Zell-Verbindungen weder dem Verschluss des Interzellularspaltes noch der mechanischen Stabilisierung des Epithels. Sie dienen zur Kommunikation innerhalb des Epithels, da sie einen Informationsaustausch zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Durch die freie Diffusion von anorganischen Ionen, Zuckern, Aminosäuren, Nucleotiden und Vitaminen resultiert eine metabolische Kooperation von Zellen. Man spricht auch von einer chemischen und elektrischen Kopplung benachbarter Zellen (Alberts, 1995). Die Verbindungen werden innerhalb der

Membran einer Zelle durch sechs Transmembranproteine, den Connexinen aufgebaut, durch die ein wassergefüllter Kanal (Connexon) erzeugt wird. Durch eine identische Struktur in der Membran der Nachbarzelle kann eine Verbindung zwischen beiden Cytosolen hergestellt werden (Beyer, 1993). Der effektive Durchmesser des Kanals wird auf bis zu 1.5 nm geschätzt und er erlaubt sowohl den Austausch von Ionen als auch von Metaboliten (< 1000 Da) von Zelle zu Zelle (Wegener, 2001). Gesteuert werden kann die Öffnung des Kanals durch Phosphorylierung der Connexine, und indem in den verbundenen Zellen der pH-Wert bzw. die Calcium-Konzentration verändert wird. Der gleiche Mechanismus schützt umgebende Zellen außerdem im Fall der Apoptose oder Verletzungen von Einzelzellen. Der akute Anstieg an intrazellulärem Calcium bzw. der fallende pH-Wert führt zu einem Verschluss der Verbindung zur Nachbarzelle.

### 1.1.2 Aufbau und Funktion des Adhäsionskontaktes adhärenter Zellen

*In vivo* sind die Aufgaben der Proteinschicht im Interzellularraum (Extrazelluläre Matrix, ECM) vielfältig. So trennt sie Gewebe voneinander, bildet bevorzugte Migrationsräume für Zellen, leitet Signale an die Zellen weiter und kapselt biologisch aktive Substanzen wie Wachstumsfaktoren ab (Davies, 2001). In lockerem Bindegewebe, Knorpel und Knochen ist die ECM besonders ausgeprägt (Alberts, 1995). Für Grenzflächengewebe bzw. im Zusammenhang mit *in vitro*-Untersuchungen wird dieses Geflecht aus Makromolekülen häufig vor allem in Bezug auf die adhäsionsvermittelnde Wirkung zum Substrat hin betrachtet. Denn die Adhäsion von Zellen *in vitro* erfolgt nicht direkt an das Kultursubstrat, sondern die Zellen wechselwirken mit der Proteinschicht. Die Makromoleküle der ECM werden von den Zellen sezerniert bzw. stammen *in vitro* zum Teil aus den Serumzusätzen der Zellkulturmedien (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Die vollständige Matrix besteht aus zwei Hauptkomponenten: den Glycosaminoglycanen, die zu den Polysacchariden gehören und gewöhnlich an Proteine gekoppelt in Form von Proteoglycanen vorliegen, und den Faserproteinen. Beispiel für die erste Komponente ist die Hyaluronsäure. Die Proteoglycane bilden eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in die die Faserproteine eingebettet sind. Die wässrige Phase erlaubt die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen zwischen den Zellen. Die Faserproteine können anhand ihrer Funktion in Strukturproteine (Collagene und Elastin) und Anheftungsproteine (z.B. Fibronectin, Laminine) unterschieden werden. Die Collagenanteile verleihen der ECM Zugfestigkeit, die Elastin-Komponenten Elastizität (Alberts, 1995). Die Anheftungsproteine wiederum sind entscheidend für den Kontakt der Zellen mit der Matrix, der über Integrine vermittelt wird.

Integrine sind  $\alpha$ ,  $\beta$ -heterodimere Transmembranproteine. Die beiden Untereinheiten können aufgrund von lokalen Strukturbesonderheiten unterschieden werden, besitzen jedoch beide eine Transmembrandomäne. Bisher wurden 18 verschiedene humane  $\alpha$ -Ketten nachgewie-

sen sowie 8  $\beta$ -Ketten, aus denen 24-Kombination gebildet werden (Askari und Humphries, 2004). Durch die spezifische Bindung zur ECM initiiert, fusionieren zunächst  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, um sich im Anschluss mit weiteren  $\alpha$ ,  $\beta$ -Heterodimeren zusammenzulagern. Der cytoplasmatische Teil der  $\beta$ -Untereinheit ist durch Proteine wie das Talin, Vinkulin oder Paxilin mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden (Krissansen, 2001; Clark und Brugge, 1995). Durch die lokalen Ansammlungen von Integrinen entstehen sogenannte Fokalkontakte oder Adhäsionsplaques. Die Integrine werden dabei von weiteren Membranmolekülen in der Bindung untereinander unterstützt, deren genaue Rolle allerdings noch nicht geklärt ist (Zamir und Geiger, 2001). Von den Fokalkontakten ausgehend durchziehen Bündel von Stressfasern die Zelle. Daher können die Integrine als Transmembranlinker zwischen dem Cytoskelett und der ECM betrachtet werden, die im Zell-Substrat-Kontakt eine hohe Stabilität erzeugen. Durch die Kombination der  $\alpha_6$ -Kette mit der  $\beta_4$ -Untereinheit wird ein spezielles Dimer gebildet, das mit den Lamininen der ECM interagiert. Auf cytosolischer Seite ist diese Transmembraneinheit mit den Intermediärfilamenten des Cytoskeletts verbunden. Es bestehen daher Ähnlichkeiten zu den Desmosomen der Zell-Zell-Kontakte. In Anlehnung an diese Haftverbindungen wird dieser spezielle Integrinsubtyp als Hemidesmosom bezeichnet. Intermediärfilamenten werden im Gegensatz zum Aktin-Cytoskelett eher statische Eigenschaften zugesprochen, wenn Zellen in einem konfluenten Zellschicht vorliegen. Während der Wundheilung und in metastasierenden Tumorzellen werden Hemidesmosomen daher nicht gefunden (Dusek et al., 2004). Die gezielte Beschichtung einer Zellkulturoberfläche mit einzelnen Komponenten der ECM kann dazu eingesetzt werden, das Adhäsionsverhalten von Zellen zu verändern (Schoenenberger et al., 1994). Häufig wird eine adhäsionsfördernde Wirkung angestrebt, so wirkt sich eine Laminin-Beschichtung unterstützend auf die Adhäsion und Proliferation von primärkultivierten Zellen des porcinen *Plexus chorioideus* aus (Haselbach et al., 2001).

Obwohl die beschriebenen Schritte der Zelladhäsion allgemeingültigen Charakter besitzen, ist der Zell-Substrat-Abstand stark vom Zelltyp und unter Umständen auch von dem jeweiligen Substrat bzw. der Beschichtung abhängig. Hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen können durch vertikal geschnittene Zellpräparate Auskunft über die Spalthöhe geben. Für lebende Zellen hat Reiß umfangreiche Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie (FLIC, Braun und Fromherz, 1997) durchgeführt, so dass für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen auf planaren Substraten von einem Zell-Substrat-Abstand von 20 - 100 nm ausgegangen werden kann. Möglicherweise resultieren die Differenzen aus einer je nach Zellsorte unterschiedlichen endogenen Sekretion von ECM-Molekülen oder aus der unterschiedlich ausgeprägten Glykokalix der Zellen (Reiß, 2004).

### 1.1.3 Aufbau und Erhalt der Zellpolarität in Epithelzellen

Die Voraussetzung für die Ausbildung verschiedener Organe ist unter anderem die Möglichkeit, Grenzflächengewebe mit spezifischer polarer Ausstattung der Plasmamembran aufzubauen. Die Polarität der Zellen ist die Basis für die Funktionalität der Epithelien. Die Plasmamembran epithelialer Zellen ist typischerweise in zwei Domänen aufgeteilt: die apikale Seite, die dem Lumen eines Organs zugewandt ist und die basolaterale Seite, die den Kontakt zur Extrazellulären Matrix sowie den Nachbarzellen herstellt. Die beiden Domänen werden durch die Zell-Zell-Kontakte, speziell durch die *tight junctions* von einander getrennt, die innerhalb der Membran eine Diffusionsbarriere darstellen (*fence*-Funktion, Tsukita, 2004; Wegener, 2001). Die Mechanismen, die zu der unterschiedlichen morphologischen molekularen und funktionellen Gestaltung der Plasmamembran führen, sind unterschiedlich und noch nicht im Detail aufgeklärt. Grundsätzlich kann jedoch zwischen einem gezielten Transport der Membrankomponenten in die entsprechende Domäne und einer Stabilisierung der Ungleichverteilung in der Membran unterschieden werden. Der gezielte Transport führt zur Polarität, indem ein Proteinkomplex zu einer bestimmten Position in der Plasmamembran transportiert wird. Vom Golgi-Apparat ausgehend werden auf diese Weise neu synthetisierte Bestandteile verteilt. Gleichmaßen werden die durch Endocytose internalisierten Membranbestandteile entsprechend gezielt recycled (Matter, 2000). Der gezielte Transport ist stärker verbreitet als die selektive Stabilisierung bestimmter Domänen. Für die in dieser Arbeit als klassisches Modellsystem eingesetzten MDCK II-Zellen wurde aber zum Beispiel für das  $\beta_1$ -Integrin festgestellt, dass aus einer zunächst unspezifischen Verteilung in der Membran durch selektive Stabilisierung in der basolateralen Membran eine Anreicherung stattfindet (Gut et al., 1998). Die Mechanismen zur Rekonstruktion der Ungleichverteilung werden insbesondere benötigt, wenn die Polarität nach einem enzymatisch induzierten Ablösen der Zellen vom Kultursubstrat und erneuter Adhäsion hergestellt werden muss. Daher wird der Zelladhäsion eine Schlüsselrolle bei der Polarisierung zugeschrieben (Drubin und Nelson, 1996). Während des Prozesses wird über Adhäsionsproteine der Kontakt zur Substratoberfläche sowie der Kontakt zu den benachbarten Zellen hergestellt. Die ersten Zell-Zell-Kontakte werden dabei durch die *adherens junctions* gebildet, die Zell-Substrat-Kontakte mit den spezifischen Verbindungen zum Cytoskelett bilden sich aus, nachdem sich Integrine durch Kontakt zu ECM-Proteinen zusammengelagert haben (Askari und Humphries, 2004). Untersuchungen an MDCK II-Zellen konnten außerdem zeigen, dass die Substratoberfläche einen entscheidenden Einfluss auf die polare Verteilung der Proteine in der Membran nehmen kann. Die Zellen, die auf einem permeablen Substrat kultiviert wurden, zeigen in Bezug auf Proteinmarker eine ungleiche Verteilung in der Membran, während diese bei MDCK II-Zellen auf planarem Substrat nicht gezeigt werden konnte (Balcarova-Ständer et al., 1984). Im Anschluss an die Kontaktaufnahme zum Substrat führt die Anbindung der Komponenten

des Cytoskeletts an die Adhäsionsverbindungen in der basalen Membran zu einer Etablierung der Polarität (Heintzelman und Mooseker, 1992). Außerdem findet eine Anbindung und Fixierung bestimmter Membranproteine wie der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase an das Cytoskelett statt (Hammerton et al., 1991; Bennett und Gilligan, 1993; Bennett, 1992). Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist mitverantwortlich für den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über der Membran, und ist auf diese Weise Triebkraft für unterschiedliche Stoffwechselprozesse wie zum Beispiel dem sekundäraktiven Transport von Aminosäuren. Im Fall des physiologischen Nierenepithels wird durch den Transport von Natrium-Ionen aus dem Zelllumen auf basolateraler Seite die Rückresorption von Natrium-Ionen und Glucose (aus dem Primärharn) an der apikalen Membran unterstützt (Koolmann, 1998). An der apikalen Membran werden die Mikrovilli als eine weitere Besonderheit der Epithelien durch quervernetzte Aktinfasern stabilisiert (Insall und Machesky, 2001). Die Oberfläche der Mikrovilli besteht aus Membranausstülpungen, wodurch die Zelloberfläche vergrößert und die Resorptionsfläche maximiert wird. Diese Vergrößerung der Zelloberfläche gegenüber einer ideal glatten Membran kann durch impedanzspektroskopische Methoden wie sie in Kapitel 1.2.2 vorgestellt werden, detektiert und quantifiziert werden. *Hakvoort et al.* (1998) konnten in impedanzspektroskopischen Messungen am Beispiel des primärkultivierten Epithels des porcinen *Plexus chorioideus* zeigen, dass die Ausbildung von Mikrovilli zu einer Erhöhung der spezifischen Membrankapazität der Zellen führt.

#### 1.1.4 Bestimmung der mikromechanischen Eigenschaften adhärenter Zellen

Die dreidimensionale Struktur und die Stabilität der Zellen gegenüber äußeren Kräften wird durch das Cytoskelett adhärenter Zellen aufrechterhalten. Darüber hinaus unterstützt es die Zellpolarität. Der Begriff des Skeletts ist dabei insofern irreführend, als dass sich Teile der drei Hauptkomponenten (Aktinfilamente, Mikrotubuli) mit Ausnahme der Intermediärfilamente in einem ständigen Auf- und Abbau befinden und es sich somit um kein stationäres Skelett vergleichbar mit dem eines Wirbeltieres handelt (Insall und Machesky, 2001). Durch Veränderungen des Cytoskeletts sind Zellen in der Lage, auf äußere Reize zu reagieren bzw. diese weiterzuleiten. Auch Veränderungen der Gestalt etwa zur Zellteilung werden dadurch möglich. Das Cytoskelett spielt außerdem im Zuge einiger Krankheiten bzw. der Infektion mit Krankheitserregern eine Rolle. So wirkt das Gift des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), indem es mit dem Aktin der Zellen wechselwirkt und so das empfindliche Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Filamente stört (Streyer, 1999). *Rotsch und Radmacher* (2000) zeigen, dass der Einfluss, den bestimmte Wirkstoffe auf das Cytoskelett nehmen, durch die elastischen Eigenschaften der Zellen widerspiegelt wird. Am Beispiel von Fibroblastenzelllinien zeigen die Autoren den Einfluss auf die Mikromechanik der Zellen durch die Cytochalasine B und D, für Latrunculin A und Jasplakinolide. Alle Wirkstoffe beein-

flussen die Polymerisation des filamentösen Aktins und führen zu einer deutlichen Abnahme der Elastizitätsmoduli der Zellen. Dagegen führte der Eingriff in die Polymerisation der Mikrotubuli (durch Colchicin, Colcemid und Taxol) zu keiner Veränderung des elastischen Verhaltens. Für die Bestimmung der so genannten Elastizitätsmoduli der Zellen wurde die Rasterkraft-Mikroskopie genutzt. Ursprünglich wurde diese Technik von *Binning et al.* (1986) vorgestellt, um Oberflächen im Nanometerbereich mechanisch abzutasten. Dabei wird eine an einer Blattfeder befestigte Nadel zeilenweise über die Oberfläche geführt. Die Topographie der Oberfläche kann dadurch abgebildet werden. Eine aus biologischer Sicht entscheidende Weiterentwicklung gelang dann *Alexander* (1989), der eine Methode zur Messung in wässrigem Milieu und damit die Möglichkeit zur Untersuchung der Dynamik vitaler Zellen bei hoher Auflösung vorstellte. Die Methode bereits bald nach ihrer Entwicklung für biologische Proben eingesetzt, da im Gegensatz zu anderen hochauflösenden Techniken wie der Elektronenmikroskopie mit vitalen Zellen unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden kann. So wurde die apikale Membran der in dieser Arbeit eingesetzten epithelialen MDCK II-Zellen von *Hoh* und *Schoenenberger* (1994) erfolgreich abgebildet. Zusätzlich zu diesen topographischen Abbildungen ist es möglich, die Materialeigenschaften der Probe zu bestimmen. So genannte Kraft-Abstands-Kurven liefern Informationen über die Kompressibilität der Probe und können dazu genutzt werden, die viskoelastischen Parameter zu bestimmen (*Tao et al.*, 1992). Dazu wird die Messspitze ein- oder mehrmals auf die Probe abgesenkt, mit definierter Kraft aufgedrückt und wieder von der Probe entfernt. Die auf die Messnadel wirkende Kraft wird in Abhängigkeit von der Spitzenposition aufgezeichnet. Das zweidimensionale Abrastern einer Probe und Bestimmung der elastischen Eigenschaften an jedem Rasterpunkt liefert daher sowohl die topographische als auch die viskoelastischen Informationen einer Probe (*force mapping*, *Radmacher et al.*, 1994). Aus den Kraft-Abstands-Kurven kann quantitativ der Elastizitäts- oder Young-Modulus bestimmt werden, indem ein von *Hertz* und *Sneddon* (*Hertz*, 1882; *Sneddon*, 1965) vorgestelltes Modell angewendet wird. Für die in dieser Arbeit eingesetzten MDCK II-Zellen wurde von *Mathur et al.* (2001) ein Elastizitätsmodulus zwischen 5 – 7 kPa unter physiologischen Bedingungen bestimmt. *Almqvist et al.* (2004) bestimmen den Elastizitätsmodulus zu 3 – 6 kPa für bovine Aortenendothelzellen während *Caille et al.* (2002) Endothelzellen untersucht haben und den Modulus zu 0.1 - 2.5 kPa bestimmen. Weitere Untersuchungen wurden an humanen Blutplättchen (*Radmacher et al.*, 1996), Kardiozyten aus dem Huhn (*Hofmann et al.*, 1997) sowie Kupfer-Zellen (*Rotsch et al.*, 1997) durchgeführt.

## 1.2 Zellbasierte Sensorsysteme

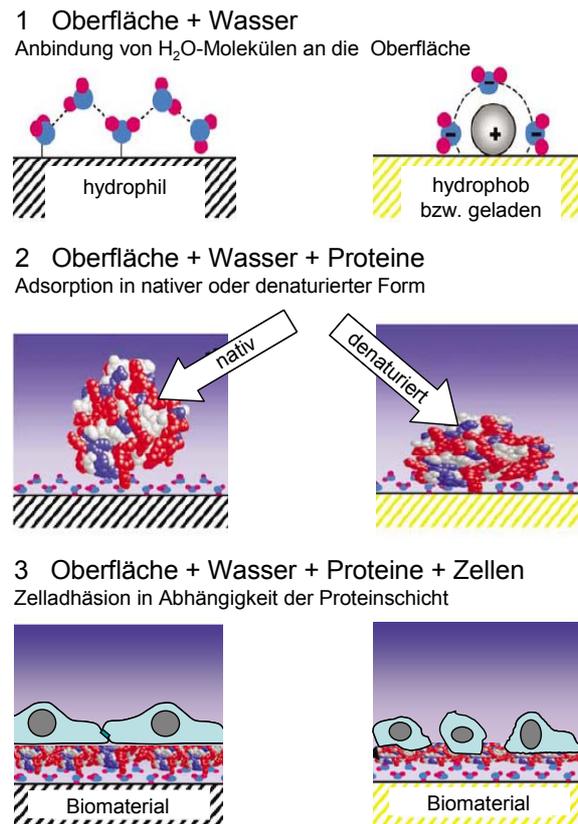
Eine Besonderheit zellulärer Sensoren liegt darin, dass lebende Zellen mit technischen Oberflächen oder sensorischen Einheiten verknüpft werden. Die Frage danach, welches Material für die Sensorik am geeignetsten ist, ist daher direkt mit zwei weiteren verknüpft: Der Frage nach der Stabilität der sensorischen Komponente unter Zellkulturbedingungen und nach der Cytokompatibilität. Lebende, tierische Zellen werden in der Regel bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert, wodurch Korrosion an metallischen Oberflächen auftreten kann. Daneben müssen Möglichkeiten zur Sterilisation bestehen, was entweder die Toleranz von hohen Temperaturen voraussetzt oder aber die Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Für die Cytokompatibilität ist zu berücksichtigen, dass der Adhäsionsprozess von Zellen auf einem Substrat mehrschrittig ist und gewissermaßen aufgeteilt werden kann, in den Schritt Proteinadsorption an die Oberfläche des Substrates und im Anschluss daran die rezeptorvermittelte Adhäsion der Zellen an diese Schicht (Extrazelluläre Matrix, ECM).

Die sensorische Komponente ist dafür verantwortlich, dass die Reaktion der Zellen in ein messbares Signal umgesetzt wird. Dabei können optische oder impedanzspektroskopische Methoden sowie Verfahren zum Nachweis von Stoffwechselprodukten oder extrazellulären Strömen eingesetzt werden (Pancrazio et al., 1999). Nach Ziegler (2000) können zellbasierte Sensorsysteme daher in drei Kategorien eingeteilt werden: i: Sensoren, die die mechanischen Kontakte zwischen Zellen und im Zell-Substrat-Kontakt untersuchen und auf diese Weise Rückschlüsse auf morphologische Veränderungen der Zellen erlauben. ii: Sensoren, die Stoffwechselprodukte im Zellkulturmedium nachweisen und iii: Sensoren, die elektrische Reaktionen von Zellen aufnehmen. Während Sensoren der dritten Kategorie häufig für Untersuchungen im Zusammenhang mit neuronalen Strukturen und Netzwerken eingesetzt werden und daher hochspezialisiert sowohl in Bezug auf den Ausleseprozess als auch die eingesetzten Zellen sind (Vassanelli und Fromherz, 1999; Fromherz, 2002), sind die Systeme der anderen Kategorien breiter einsetzbar. So können Stoffwechselprodukte wie Laktat und CO<sub>2</sub> aber auch der Sauerstoffgehalt im Medium durch pH- und O<sub>2</sub>-sensitive Elektroden gemessen und die Informationen dazu genutzt werden, um auf die Stoffwechselraten unterschiedlicher Zelltypen rückzuschließen (Wolf et al., 1998).

### 1.2.1 Cytokompatibilität sensorischer Oberflächen

Zellen interagieren nicht direkt mit der Oberfläche des Substrates sondern sie wechselwirken mit einer darauf adsorbierten Proteinschicht (Kapitel 1.1.2). Um die hochspezifische rezeptorvermittelte Anbindung der Zellen wirkungsvoll zu gewährleisten, ist daher der Erhalt der dreidimensional gefalteten, biologisch aktiven Konformation der Proteine auf der Substrat-

oberfläche entscheidend. Die Tertiärstruktur resultiert aus unterschiedlichen Strukturelementen, den so genannten Sekundärstrukturen etwa der  $\alpha$ -Helix oder dem  $\beta$ -Faltblatt. Diese Elemente werden durch Wasserstoff-Brücken innerhalb der Peptidkette oder zwischen benachbarten Ketten stabilisiert. Außerdem sind Bindungen zwischen den Proteinresten in Form von Wasserstoff-Brücken, Disulfidbrücken, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen strukturgebend bzw. -erhaltend. Wasserlösliche Proteine stabilisieren sich darüber hinaus zu komplexen Strukturen mit unpolaren Kernen. Auf diese Weise werden die hydrophoben Seitenketten im Inneren versteckt und die polaren, geladenen Reste liegen an der Oberfläche (Stryer, 1999). Hydrophile Substratoberflächen unterstützen daher den Erhalt der Konformation während hydrophobe Oberflächen durch Wechselwirkungen mit den innenliegenden Bereichen zu einer Strukturveränderung führen. Paradoxe Weise entsteht auf diesem Weg eine Tendenz, dass hydrophobe Materialien eine größere Menge an Protein binden können, während hydrophile Oberflächen für die molekulare Wiedererkennung eine wertvollere Proteinadsorption erzielen (Kasemo, 2002). Abbildung 1.4 verdeutlicht die Bedingungen und die Bedeutung der Oberflächenadsorption von Proteinen an Biomaterialien für die Kultur von Zellen. In Abhängigkeit von der Hydrophilie der Oberfläche benetzen Wassermoleküle aus dem Medium das Substrat (1). Im Fall der hydrophilen Oberfläche wird die Anlagerung der Proteine in ihrer nativen Konformation unterstützt, während die hydrophobe Oberfläche zu einer Denaturierung führt (2). Während durch den Erhalt der Konformation die spezifischen Wechselwirkungen der Rezeptoren der Zellen mit den Proteinen die Zelladhäsion möglich ist, wirken die denaturierten Proteine adhäsionshemmend (3). Da die Hydrophilie einer Oberfläche über die Benetzbarkeit mit Wasser eingeordnet werden kann, ist dies ein gutes Indiz, um die Cytokompatibilität eines Substrates vor der tatsächlichen Zellaussaat abzuschätzen (Vogler, 1998).



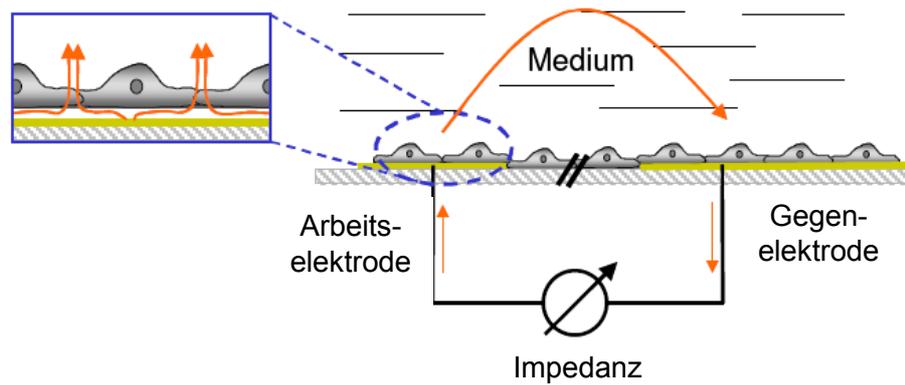
**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung zur Zelladhäsion auf Biomaterialien. 1: Wasser benetzt die Oberfläche in Abhängigkeit von den Ladungsverhältnissen; 2: Proteine adsorbieren; 3: Zelladhäsion (Kasemo, 2002).

Der Einfluss der Oberfläche auf die Zelladhäsion kann dazu genutzt werden, die Kulturoberflächen gezielt zu modifizieren. Häufig werden Goldoberflächen eingesetzt, an die funktionalisierte Thiolverbindungen wie Octadecanthal oder Mercaptoethanol über einen selbstorganisierenden Prozess quasi kovalent binden können (Mrksich und Whitesides, 1996). Mittels „*microcontact-printing*“ können außerdem Areale gezielt adhäsionsfördernd bzw. –hemmend verändert werden. So zeigen *Zhang et al.* (1999) für verschiedene Endo- und Epithelien sowie Fibroblasten, wie die Zelldichte durch Beschichtung entlang linearer Strukturen aber auch komplexerer *layouts* erhöht werden kann. Die Beschichtung der Oberflächen mit Komponenten der Extrazellulären Matrix kann die Zelladhäsion spezifisch unterstützen, wodurch die Biokompatibilität in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp bzw. der zellulären Rezeptoren modifiziert werden kann (Schoenenberger et al., 1994).

### 1.2.2 Elektrische Untersuchungen zur Zellmorphologie und zum Kontaktbereich zwischen Zelle und Substrat

In Bezug auf die vorliegende Arbeit haben elektrochemische Sensorsysteme, die einen Rückschluss auf die zelluläre Barriere und morphologische Veränderungen zulassen, besondere Bedeutung (Kategorie i nach Ziegler, 2000). Als Messgröße dient der elektrische

Wechselstromwiderstand (Impedanz), der mit schwachen nicht-invasiven elektrischen Feldern in einem geeigneten Frequenzfenster aufgezeichnet wird. Beim Verfahren zur Bestimmung des transendo- bzw. transepithelialen Widerstandes werden die Zellen analog zu dem oben erwähnten Verfahren des Permeationsassays für Testsubstanzen auf einer permeablen Filtermembran kultiviert. In die beiden Kompartimente tauchen jeweils Elektroden, so dass durch Anlegen einer Spannung aus dem resultierenden Strom der Widerstand der Zellschicht bestimmt werden kann. Dieser korreliert nach *Schneeberger* und *Lynch* (1992 und 2004) mit der parazellulären Permeabilität der Zellschicht. Durch die Möglichkeit zur Bestimmung der Zellschichtkapazität können darüber hinaus Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Zellmembran gezogen werden. Hinter dem Akronym ECIS (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*) verbirgt sich eine weitere impedanzspektroskopische Methode, die im Gegensatz zum vorherigen Beispiel außerdem dazu geeignet ist, die Zell-Substrat-Interaktionen adhärent wachsender Zellen zu bestimmen. Dadurch werden zum Beispiel Untersuchungen zur Biokompatibilität von Oberflächen oder eine Detailuntersuchung der Zelladhäsion möglich. Allerdings gilt dabei eine Beschränkung auf elektrisch leitfähige Oberflächen, wodurch keine Untersuchung von Polymeren oder Keramiken möglich ist. Das Verfahren wurde erstmals 1984 von *Giaever* und *Keese* beschrieben und in der Folge in weiteren Arbeiten etabliert (1991; 1993). Das Prinzip der Methode beruht auf der Applikation einer sinusförmigen nicht-invasiven Wechselspannung variabler Frequenz und kleiner Amplitude auf die Zellschicht. Die Messung des resultierenden Stromes ermöglicht die Bestimmung des Wechselstromwiderstandes. Üblicherweise werden Goldfilmelektroden kleiner Fläche eingesetzt, die sowohl als Kultursubstrat als auch als sensorische Oberfläche dienen. Daneben werden aber auch andere Materialien verwendet (Ehret et al., 1997, Hillebrandt et al., 2001). Diese unmittelbare räumliche Nähe zwischen den Zellen und der Elektrode ist für die Sensitivität der Technik entscheidend, beschränkt die Anwendung allerdings bisher auf planare Oberflächen. Es wird zwischen einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode unterschieden, die über das Kulturmedium leitend miteinander verbunden sind (**Abb. 1.5**). Die Gegenelektrode kann sowohl oberhalb der Arbeitselektrode in das Medium eintauchen als auch coplanar angeordnet sein. Entscheidend für die Interpretation der Daten ist jedoch, dass die Impedanz dieser Elektrode erheblich kleiner als die der Arbeitselektrode ist. Auf diese Weise wird der gemessene Widerstand von den Verhältnissen an der kleineren Arbeitselektrode dominiert.



**Abb. 1.5:** Schemazeichnung zum Messprinzip der ECIS-Technik. Die zu untersuchenden Zellen werden auf Goldfilmelektroden kultiviert. Der Wechselstromwiderstand dieser Elektroden wird gemessen und die darin enthaltenen Informationen über die Zellen analysiert (Wegener, 2003).

Die Untersuchungen zur Impedanz bei einer konstanten Frequenz können dazu genutzt werden, die Adhäsion und das Ausbreiten von Zellen quantitativ zu untersuchen. Die ECIS-Technik ist dabei eine der wenigen Techniken, die einen sensitiven Zugang zu Vorgängen an der Zellunterseite gewähren. So nutzen *Wegener et al.* (2000) die ECIS-Technik, um das Adhäsionsverhalten von MDCK II-Zellen in Abhängigkeit von Beschichtungen mit Proteinen der extrazellulären Matrix zu untersuchen. Die hohe Sensitivität der ECIS-Messungen und die sehr hohe Zeitauflösung, die erreicht wird (unter einer Sekunde), ermöglichen außerdem die Aufzeichnung und Analyse von kleinsten Impedanzfluktuationen bei konstanter Frequenz. Diese so genannten *micromotion* liefern Informationen resultierend aus kleinsten Zellbewegungen und dadurch Informationen zum Stoffwechselzustand und zur Vitalität der Zellen (Lo et al.; 1993; 1994). Neben diesen Betriebsmodi bei konstanter Frequenz ist es außerdem möglich, die Impedanz des Systems in Abhängigkeit von der Frequenz in einem definierten Bereich aufzuzeichnen. Durch Analyse der Daten nach dem Modell von *Wegener et al.* (2000) ist es möglich, zwischen den Beiträgen der Zell-Zell-Kontakte und der Zellmembran zur Gesamtimpedanz zu differenzieren. Darüber hinaus kann der Beitrag des Zell-Substrat-Kontaktes zur Gesamtimpedanz quantifiziert werden. Da alle drei Parameter in unmittelbarem Zusammenhang mit der dreidimensionalen Zellform stehen, wird mit diesem Verfahren auf die Morphologie der Zellen rückgeschlossen. Im Gegensatz zu bildgebenden Verfahren wie der Mikroskopie werden durch die ECIS-Technik objektive Parameter erhalten, die dazu genutzt werden können, die Reaktion der Zellen auf äußere Stimuli zu quantifizieren. *Wang et al.* (1995) untersuchen die Änderung der Morphologie von Fibroblasten nach Zugabe von Prostaglandin E2 sowohl mikroskopisch als auch elektrisch. Für Augenhöhlenfibroblasten stellten die Autoren fest, dass sich die Zellen sternförmig verformten. Diese Morphologieänderung konnte außerdem durch einen starken Abfall der Impedanz in den ECIS-Messungen dokumentiert werden. Auslöser für die morphologischen Veränderungen war laut *Wang et al.* ein drastischer Anstieg des cAMP-Spiegels in den Zellen. Eine Abhän-

gigkeit der Barrierefunktion des porcinen *Plexus chorioideus* Epithels vom intrazellulären cAMP-Spiegel haben *Wegener et al.* (2000) gezeigt. Mit Hilfe der ECIS-Technik auf planaren Goldfilmelektroden konnten neben dem Anstieg der parazellulären Widerstände gleichzeitig Veränderungen im Zell-Substrat-Kontakt festgestellt werden. Das breite Anwendungsspektrum der ECIS-Technik unterstreichen die Untersuchungen zur metastatischen Aktivität einzelner Tumorzelllinien gegenüber einer konfluenten Zellschicht, wie sie von *Keese et al.* (2002) durchgeführt wurden. Dass auch sehr komplexe Phänomene wie die Apoptose von Endothelzellen mit diesem Verfahren untersucht werden können, stellen *Arndt et al.* (2004) vor. Sie zeigen Veränderungen in den Zell-Zell- sowie Zell-Substrat-Kontakten nach Induktion der Apoptose, die mit der Caspase-3-Aktivität in den Zellen korreliert sind.

Die ECIS-Technik ist, wie bereits erwähnt, eine der wenigen Techniken, die einen nicht-invasiven Zugang zu Informationen aus dem Zell-Substrat-Kontakt gewährt. *Lo et al.* (1998) nutzen die Methode, um Veränderungen im Adhäsionskontakt der Zellen zu bestimmen. Die Autoren schließen vom Modell-Parameter  $\alpha$  auf den mittleren Zell-Substrat-Abstand, der sich in Abhängigkeit vom vertikalen Zugstress, der über die apikale Membran appliziert wird, ändert. Der Parameter des Adhäsionskontaktes wird allerdings nicht ausschließlich durch die Höhe des Spaltes beeinflusst, sondern auch durch die Zellradien und vom spezifischen Elektrolytwiderstand unterhalb der Zellen. Die Möglichkeiten den spezifischen Elektrolytwiderstand direkt zu bestimmen, sind aufgrund der Dimension des Spaltes beschränkt, weshalb häufig vereinfachend davon ausgegangen wird, dass der spezifische Widerstand der *bulk*-Phase ( $\rho_{bulk}$ ) gleich dem spezifischen Widerstand im Adhäsionskontakt ( $\rho_{sub}$ ) ist. Für den resultierenden Kontakt- oder Schichtwiderstand im Adhäsionskontakt ( $r_{sub}$ ) formulieren *Gleixner* und *Fromherz* (2006) einen einfachen Zusammenhang in Abhängigkeit vom Zell-Substrat-Abstand ( $d$ ):

$$r_{sub} = \frac{\rho_{bulk}}{d} \quad \text{Gl. 1.1}$$

(BRICA, *Bulk Resistivity In Cell Adhesion*). Diesen Zusammenhang konnten die Autoren am Beispiel von Einzelzellen belegen. Dies bedeutet jedoch, dass die oben beschriebenen Komponenten der Extrazellulären Matrix und der zellulären Komponenten im Adhäsionskontakt (Integrine, Glykokalix) keinen Einfluss auf den Kontaktwiderstand nehmen. Inwieweit dieser Zusammenhang auch für Grenzflächengewebe gilt, wurde von den Autoren nicht untersucht. Möglicherweise entsteht unterhalb der Zellschicht ein relativ abgeschlossener Bereich, der durch das Substrat sowie die zelluläre Barriere begrenzt wird. *Reiß* (2004) konnte für barrierebildende Zellschichten grundsätzlich einen erhöhten spezifischen Widerstand im Adhäsionskontakt feststellen. *Lo et al.* (1995) bestimmen unter der Annahme eines spezifischen Elektrolytwiderstandes im Adhäsionskontakt wie im umgebenden Medium (60  $\Omega\text{cm}$ ) den Abstand von MDCK II-Zellen zum Substrat zu unter 1 nm. Ein Abstand dieser Größenordnung

ist jedoch eher unwahrscheinlich. Für Endothelzellen wurde in Abhängigkeit von der Zellart und der verwendeten Technik allein für die Glykokalix eine Höhe zwischen 20 nm und 1  $\mu\text{m}$  gefunden (Pries et al., 2000). *Reiß* (2004) konnte schließlich mit Hilfe der FLIC-Mikroskopie den Abstand für MDCK II-Zellen auf  $(27 \pm 1)$  nm bestimmen. *Kiessling et al.* (2000) gelang eine experimentelle Bestimmung des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt. Für Erythrocyten stellen die Autoren fest, dass der spezifische Widerstand im Spalt etwa viermal höher war, als der Widerstand der umgebenden *bulk*-Phase. Die Vereinfachung zum spezifischen Elektrolytwiderstand unterhalb der Zellen führt also möglicherweise zu signifikanten Verfälschungen in Bezug auf den Kontaktwiderstand. Dieser ist allerdings in Verbindung mit dem *Interface* zwischen den lebenden Zellen und der sensorischen Komponente von großer Bedeutung. Insbesondere bei der extrazellulären Ableitung der elektrischen Aktivität von Neuronen ist der Einfluss des Kontaktwiderstandes groß (Fromherz, 2001 und 2003). *Weis* und *Fromherz* (1997) beschreiben den Zelle-Festkörper-Kontakt elektrisch als Kernmantelleiter, in dem eine leitende Elektrolytschicht durch die isolatorischen Eigenschaften der Zellmembran und der Siliziumdioxidschicht auf dem *gate* des verwendeten Halbleiters begrenzt wird. Durch die Übertragung der elektrisch wirksamen Komponenten in ein Ersatzschaltbild (Punkt-Kontakt-Modell) ist es den Autoren möglich, den spezifischen Membranwiderstand sowie den Flächenwiderstand zwischen Zelle und Substrat zu berechnen. Diese Erkenntnisse werden dann zur Interpretation der Messungen zur Neuron-Silizium-Kopplung sowie zur Berechnung des Zell-Substrat-Abstandes genutzt. Auch an dieser Stelle wurde jedoch der spezifische Widerstand der *bulk*-Phase direkt auf den Adhäsionskontakt übertragen.

### 1.2.3 Poröse Oberflächen als Kultursubstrat für adhärente Zellen

Ein Kernpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung poröser Oberflächen als Kultursubstrat für adhärente Zellen. Neben Silizium-Substraten mit hochgeordneter Porenstruktur werden auch Kunststoffmembranen mit statistisch verteilten Poren eingesetzt bzw. als Basis für Goldfilmelektroden genutzt. Die letztgenannten Kunststoffmembranen sind kommerziell erhältlich und werden für unterschiedliche zelluläre Systeme erfolgreich als Kultursubstrat genutzt. Sowohl für Permeationsstudien (Pitt und Gabriel, 1987) als auch für Messungen des transendo- bzw. transepithelialen Widerstandes (Schneeberger und Lynch, 1992 und 2004) werden diese Oberflächen eingesetzt. Für die verwendeten Silizium-Oberflächen mit definierter Topographie liegen bisher keine Erfahrungen mit adhärennten Zellen vor. Modifikationen von Oberflächen im Submikrometerbereich werden allerdings häufig durchgeführt, um das Zellwachstum zu beeinflussen bzw., um ein verbessertes Adhäsions- und Wachstumsverhalten zu erhalten. Insbesondere im Bereich der Implantologie werden diese Ansätze verfolgt (Keller und Schneider, 2003). Die Autoren *Butor* und *Davoust* (1992) stellen am Beispiel von MDCK-Zellen vor, dass die Permeabilität des Substrates Einfluss auf das Differenzierungs-

---

verhalten der Zellen nimmt. Daneben existieren auch Ansätze, die versuchen, über Strukturierungen im Mikrometerbereich eine präferierte Wachstumsausrichtung der Zellen entlang von Kanälen zu erreichen (Petronis et al., 2003). Dass tatsächlich die Topographie Einfluss auf das Zellwachstum nehmen kann, wurde von *Curtis* und *Wilkinson* (2001) dadurch gezeigt, dass die gleiche Struktur auf unterschiedlichen Materialien eine sehr ähnliche Zellreaktion hervorruft. Inwieweit die porösen Oberflächen der Substrate Einfluss auf die sensorische Funktionalisierung bzw. den Auslesevorgang im Fall elektrischer Sensoren nehmen, kann nicht explizit vorhergesagt werden. *Drexler* und *Steinem* (2003) nutzen goldbelegte nanoporöse Aluminiumsubstrate mit einem Porendurchmesser von  $(50 \pm 5)$  nm in impedanzspektroskopischen Untersuchungen von porenüberspannenden Lipidschichten. In einem System, das einen sehr ähnlichen Versuchsaufbau nutzt, wie für die ECIS-Technik vorgestellt wurde (Kapitel 1.2.2), zeigen die Autorinnen für diese Substrate ein ähnliches Impedanzverhalten, wie es für planare Goldelektroden durch *Gieaver* und *Keese* beschrieben wurde.

## 2 Zielsetzung

Die Entwicklung und Erprobung von pharmazeutischen Wirkstoffen sowie die Grundlagenforschung profitieren von der Möglichkeit, tierische Zellen außerhalb eines Organismus kultivieren zu können. Auf diese Weise ist es möglich, bereits in frühen Entwicklungsstadien Informationen durch den Test am lebenden System zu erhalten. Die Verwendung von Zellkulturmodellen setzt allerdings voraus, dass geeignete Sensorsysteme zur Verfügung stehen, die unter reproduzierbaren Bedingungen die Reaktion der Zellen mit hoher Sensitivität wiedergeben. Dabei sollte der Einfluss der sensorischen Komponente auf das Zellmodell so gering wie möglich sein.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Entwicklung eines orts aufgelösten Permeationsassays zur Untersuchung des Metabolit- und Pharmakatransportes über zelluläre Grenzflächengewebe angestrebt. Auf Basis geordneter Nanoporen unterhalb der Zellen soll es möglich werden, den Permeationsweg eines Sondenmoleküls zu bestimmen. Die Auswertung des Assays soll zunächst und während der grundlegenden Entwicklungsphase mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie (CLSM) erfolgen und in einem folgenden Schritt auf die lateral aufgelöste Massenspektrometrie (ToF-SIMS) übertragen werden.

Die Impedanzspektroskopie und insbesondere die ECIS-Technik (*Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*) ermöglichen es, die passiven elektrischen Eigenschaften von adhären-ten Zellen zu bestimmen. Diese können zur quantitativen Charakterisierung der zellulären Morphologie herangezogen werden und erlauben dadurch zum Beispiel Rückschlüsse auf die zelluläre Barriere des Grenzflächengewebes. Während der Messung dient das Substrat der Zellen gleichzeitig als Elektrode. Die Untersuchungen können nicht invasiv und mit einer hohen Zeitauflösung durchgeführt werden und sind daher für zelluläre Sensoren geeignet. Allerdings ist die ECIS-Technik bisher auf planare Metallfilmelektroden limitiert. Dadurch sind die Möglichkeiten zur chemischen Stimulation der Zellen auf die elektrodenabgewandte obere Zellseite beschränkt. Ziel dieser Arbeit ist es, die ECIS-Technik auf poröse Elektroden zu übertragen und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zu überprüfen. Im Fokus stehen dabei der Vergleich mit impedanzspektroskopischen Methoden auf permeablen Filtermembranen sowie der Einsatz der porösen Elektroden zur gezielten Manipulation der elektrischen Bedingungen im Zell-Substrat-Kontakt.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Zellbiologische Methoden

### Allgemeine Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden sowohl Zelllinien als auch primärkultivierte Zellen untersucht. Trotz spezifischer Unterschiede in einzelnen Kulturschritten sind Gemeinsamkeiten vorhanden. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank *LaminAir* der Firma Holten durchgeführt. Die Zellen wurden in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Die zur Kultur verwendeten Medien und Lösungen wurden autoklaviert (20 min, 120 °C) bzw. sterilfiltriert (Porenweite: 0.2 µm), soweit sie vom Hersteller nicht steril geliefert wurden.

### 3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Zellen lassen sich über einen langen Zeitraum subkultivieren und zeichnen sich durch eine einfache Handhabung aus. Die zelltypspezifische Differenzierung erwies sich auch bei langen Kulturzeiten als stabil. Wurden die Zellen einer Linie über einen längeren Zeitraum nicht benötigt, wurde die Möglichkeit zur Kryokonservierung genutzt. Zum Einsatz kamen Epithelzellen (MDCK II), epithel-ähnliche Zellen (NRK, Klon 52E) sowie Fibroblasten (NIH 3T3), die sich hinsichtlich der Subkultivierung und der Kryokonservierung nur geringfügig unterschieden. Auf diese Unterschiede wird entsprechend hingewiesen, in den übrigen Punkten galt das Standardprotokoll.

Alle Zelllinien wurden von der *Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

### MDCK II-Epithelzellen

Ursprünglich wurden diese Zellen aus der Niere eines Cockerspaniels isoliert (*Madin-Darby Canine Kidney, Strain II*) und von *Fuller et al.* 1984 beschrieben. Auf herkömmlichen Zellkultursubstraten zeichnen sie sich durch die Bildung konfluenter Monolayer mit regelmäßigen polygonen Zellen aus, weshalb von einer Pflastersteinartigen-Morphologie gesprochen wird. Charakteristisch ist die Ausbildung von sogenannten Blistern, flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen unterhalb der Zellen, die durch die Sezernierung von Ionen in den Zell-Substrat-Zwischenraum und dem passiven Nachstrom von Wasser entstehen. Die Zellen besitzen eine epitheltypische Polarität der Zellkörper mit apikalen Mikrovilli und *tight junctions* (Tj). Für einzelne Membranproteine konnte eine polare Verteilung gezeigt werden. Der Zelllayer zeigt hohe Barriereigenschaften für Ionen und hydrophile Moleküle.

### NRK-Zellen (Klon 52E)

Diese epithel-ähnlichen, adhärenent wachsenden Zellen wurden aus der Niere von Ratten (*Normal Rat Kidney*) gewonnen und von *De Larco* und *Todaro* (1978) beschrieben. Aufgrund relativ schwach ausgeprägter *tight junctions* zeigen sie niedrigere Barriereigenschaften für kleine Ionen oder Moleküle als MDCK II-Zellen.

### NIH 3T3-Fibroblasten

Die murinen Fibroblasten wachsen in adhärenenten Monolayern und wurden ursprünglich aus Mäuseembryonen gewonnen. Die kontaktinhibierten Zellen bilden keine *tight junctions* aus und besitzen dadurch keine klassischen Barriereigenschaften. Sie besitzen eine Tendenz zur Ausbildung von Multilayern. *Aaronson et al.* lieferten 1969 erstmals eine Beschreibung. Abweichend von dem unten beschriebenen Verfahren zur Subkultivierung wurde bei der Aussaat standardmäßig eine 1:20 Verdünnung der Zellsuspension, bezogen auf die Zelldichte pro Quadratzentimeter Wachstumsfläche, eingestellt. Dadurch konnte ein Intervall von wöchentlicher Subkultivierung eingehalten werden, ohne dass die Zellen konfluente Zellschichten ausbilden.

#### 3.1.1.1 Subkultivierung

Die zum Zeitpunkt der Passage in der Regel konfluenten Zellmonolayer wurden zweimal mit PBS<sup>-</sup> (*Phosphate Buffered Saline*, ohne zweiwertige Ionen) gewaschen. Dies diente dem Entfernen der Mediumreste sowie der zweiwertigen Ionen, welche die nachfolgende proteolytische Ablösung der Zellen gestört hätten.

PBS <sup>-</sup>	140 mM	NaCl
	2.7 mM	KCl
	8.1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	in Reinst-Wasser	

Durch Zugabe von 0.25 %iger Trypsinlösung (w/v), der 1 mM EDTA zugesetzt war, konnten die Zellen nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten vom Substrat abgelöst werden. MDCK II- und NRK-Zellen wurden aufgrund ihrer starken Anhaftung an die Substratoberfläche vor Zugabe der Protease für 10 min bei 37 °C mit einer EDTA-Lösung (5 mM in PBS<sup>-</sup>) inkubiert, um eine vollständige Komplexierung divalenter Kationen zu erreichen, welche die Ablösung der Zellen beim Trypsinierungsschritt erleichtert. Der Ablöseprozess konnte im Lichtmikroskop verfolgt werden, die Zellen erschienen zunehmend rund. Unterstützend wurden Scherkräfte durch seitliches Klopfen erzeugt. Der enzymatische Verdau wurde nach

dem Ablösen der Zellen durch Zugabe eines Überschusses des jeweiligen serumhaltigen Kulturmediums abgestoppt, die Zellen grob suspendiert, und die so erhaltene Zellsuspension für 10 min bei 110 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 37 °C warmem Kulturmedium resuspendiert. Die anschließende Aussaat auf die jeweiligen Kultursubstrate erfolgte in der Regel im Verhältnis 1:10 bezogen auf die ursprüngliche Zelldichte pro Quadratzentimeter Wachstumsfläche. Zwei bis drei Tage nach der Subkultivierung bzw. ca. 24 h vor Messbeginn erfolgte ein Medienwechsel.

In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden unterschiedliche Medien genutzt:

#### MDCK II-Medium

MEM-Earle

2.2 g/l NaHCO<sub>3</sub>

1 g/l D-Glucose

10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)

100 µg/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

4 mM Glutamin

#### NRK-Medium

DMEM

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

#### 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.

### **3.1.1.2 Kryokonservierung**

Eine vielfach wiederholte Subkultivierung ist nur dann sinnvoll, wenn die Zellen kontinuierlich benötigt werden. Ist dies nicht der Fall, dient die Kryokonservierung zur längerfristigen Aufbewahrung der Zelllinien (MDCK II, NRK, NIH 3T3 sowie z.T. auch der cerebralen Endothel-

zellen aus dem Schweinehirn und der Epithelzellen des *Plexus chorioideus*, s.u.). Dazu wurden die Zellen zunächst dem Protokoll der Subkultivierung entsprechend proteolytisch von der Substratoberfläche abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet im Einfriermedium (1 ml) resuspendiert und in sterile, speziell zur Kryokonservierung ausgelegte Behälter überführt. Das verwendete Einfriermedium enthielt DMSO, was aufgrund seiner Membrangängigkeit leicht in Zellen eindringt und dadurch den Wassergehalt im Cytosol reduziert. Dies verhindert die Bildung von scharfen Eiskristallen beim Einfrierprozess, welche durch Schädigung der Zellmembran zum Zelltod führen könnten. Der hohe Proteingehalt im Serum (NCS) schützt zusätzlich, da dadurch auch bei kleinen vorübergehenden Verletzungen der Zellmembran keine Proteine aus dem Cytosol herausströmen. Das verwendete Einfriermedium wurde für alle Zelllinien genutzt.

Zusätzlich wurde eine möglichst schonende Abkühlung der Zellsuspension herbeigeführt, indem sie zunächst mindestens 24 Stunden bei  $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Isopropanol-Bad gelagert wurde. Erst im Anschluss daran wurden die Gefäße in den Kryobehälter, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, zur dauerhaften Lagerung bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  überführt.

<u>Einfriermedium</u>	NCS ( <u>N</u> ormal <u>C</u> alf <u>S</u> erum)
	10% (v/v) DMSO ( <u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid)

Analog zum Einfriervorgang muss auch das Auftauen der Zellen möglichst schonend erfolgen. Dazu wurde das Kryogefäß aus dem flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zunächst in ein Tiefkühlfach bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  überführt und dort für ein bis zwei Stunden belassen. Danach wurde der Inhalt vorsichtig im Wasserbad erwärmt, bis er vollständig aufgetaut war. Im Anschluss wurde der Inhalt in ein 50 ml Zellkulturgefäß überführt und, zu Beginn tropfenweise,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmes Kulturmedium (15 ml) langsam zugegeben. Das enthaltene DMSO wurde durch Zentrifugation bei  $110 \times g$  für 10 min und Verwerfen des Überstandes entfernt. Das Zellpellet konnte dann analog zur Subkultivierung in der entsprechenden Menge an Medium resuspendiert und auf die jeweiligen Kulturflaschen verteilt werden. Am ersten Tag nach der Aussaat wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen.

### 3.1.2 Primärkultivierte Zellen

Zur möglichst genauen Modellierung der entsprechenden *in vivo*-Situation wurden in dieser Arbeit auch primärkultivierte Zellen eingesetzt. Diese Zellen zeigen hinsichtlich ihrer Differenzierung die größte Verwandtschaft zu den entsprechenden Zellen in einem Organ oder Organismus. Allerdings bedeutet dies, dass regelmäßig eine aufwendige Isolation und Präparation aus frischem Gewebe durchgeführt werden muss. Die Zellen einer Präparation zei-

gen gewöhnlich die höchste Ähnlichkeit untereinander, Zellen einer anderen Präparation können in Einzelmerkmalen aber eine gewisse Varianz dazu aufweisen.

In dieser Arbeit wurden primärkultivierte Epithelzellen des *Plexus chorioideus* und cerebrale Kapillarendothelzellen aus Schweinen eingesetzt.

### 3.1.2.1 Epithelzellen des porcinen *Plexus chorioideus*

#### Präparation

Die hier verwendeten Zellen des *Plexus chorioideus* sind primär kultivierte Zellen, die dem Hirn adulter Schweine entnommen wurden. Die Methode basiert auf einem Verfahren von *Crook et al.* (1981), welches von *Gath et al.* (1997) modifiziert wurde.

Zur Präparation wurde das benötigte Hirngewebe frisch geschlachteter Schweine vor Ort direkt nach Öffnung des Schädels entnommen. Mit einer sterilen Pinzette wurden die lateralen *plexus chorioidei* in ungekühltes PBS<sup>++</sup> (PBS<sup>-</sup> mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> und 0.5 mM Mg<sup>2+</sup> sowie jeweils 200 µg/ml Penicilin und Streptomycin) überführt und gewaschen. Die Stränge wurden in serumfreies Medium überführt und ins Labor transportiert. Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Zunächst wurden von den Enden der Gewebestränge jeweils ca. 0.5 cm abgeschnitten, um Reste des umgebenden Gewebes im Hirn zu entfernen. Durch dreimaliges Waschen in PBS<sup>-</sup> wurden die verbliebenen Erythrozyten entfernt. Es folgte der enzymatische Verdau mit einer 0.2 %igen Trypsinlösung (w/v, in PBS<sup>++</sup>/HEPES). Zunächst wurden die Plexustränge 45 min bei 4 °C in der Lösung inkubiert, um eine vollständige Durchtränkung der Stränge zu erreichen. Anschließend wurde der Erlenmeyerkolben im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Erwärmung der Suspension wurde für 18 bis 19 Minuten durchgeführt, wobei der Kolben alle fünf Minuten kräftig geschwenkt wurde. Dies wirkte sich unterstützend auf den Ablöseprozess der Epithelzellen von dem darunter liegenden Stroma aus. Der Verdau wurde durch Zugabe von 50 ml fötalem Kälberserum abgestoppt. Zur endgültigen Gewinnung der Epithelzellen wurde die Suspension mit den anverdauten Plexusträngen in Petrischalen überführt. Um noch anheftende Epithelzellen zu lösen, wurden die Gewebestränge in der Lösung ausgeschlagen und dann verworfen. Die Zellsuspension wurde bei 16 x g für 10 min zentrifugiert, die Pellets anschließend in serumfreiem Medium resuspendiert. Hierbei wurde mikroskopisch kontrolliert, dass Zellverbände von 10 bis 20 Zellen erhalten blieben.

Für die Präparation wurden folgende Medien verwendet:

PBS<sup>-</sup>/HEPES-Waschlösung PBS<sup>-</sup> (Kapitel 3.1.1.1), zusätzlich:

- 15 mM HEPES
- 200 µg/ml Penicillin
- 200 µg/ml Streptomycin

PBS<sup>++</sup>

wie PBS<sup>-</sup>/HEPES-Waschlösung, zusätzlich:

- 200 mg/l CaCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
- 100 mg/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

Serumfreies Medium (SFM) DMEM und Ham's F12 im Verhältnis 1:1

- 5 mg/l Insulin
- 100 µg/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

Serumhaltiges Medium

wie serumfreies Medium, zusätzlich

- 10 % (v/v) fötales Kälberserum
- 20 µM Cytosinarabinosid

### **Zellkultivierung – Proliferation –**

Für die Aussaat wurden drei sich grundsätzlich unterscheidende Kultursubstrate verwendet: nanoporöse Silizium-Chips, Petrischalen und permeable Filtermembranen (z.T. für elektrische Messungen mit 100 nm Gold belegt). Auf die Besonderheiten wird im Kontext der jeweiligen Experimente hingewiesen, hier wird das allgemeingültige Protokoll beschrieben. Um die Adhäsion der Zellen zu erleichtern, wurden sowohl die Filtermembranen als auch die nanoporösen Silizium-Chips einen Tag vor Aussaat der Zellen mit Laminin (Protein der extrazellulären Matrix) beschichtet. Dazu wurde die Oberfläche mit einer wässrigen (50 µg/ml) Laminin-Lösung benetzt und bis zur Trockene unter der Sterilbank belassen. Die Aufbewahrung über Nacht erfolgte bei Raumtemperatur. Vor Aussaat der Zellen wurden die Substrate dann auf 37 °C vorgewärmt. Die Aussaatdichte betrug umgerechnet 18 mg Nassgewebe pro Quadratcentimeter. Für die planaren Substrate wurde in der Regel keine Beschichtung durchgeführt, es wurden 8 mg Nassgewebe pro Quadratcentimeter eingesetzt. Die Silizium-Chips und die planaren Substrate (Kunststoffplättchen aus den Böden von Kulturflaschen) wurden in Petrischalen (10 cm<sup>2</sup>) gelagert.

Nach der Aussaat und zusätzlich 1 h später wurden die Substrate lateral geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Substratoberfläche zu erreichen. Am ersten Tag nach der Aussaat wurden die Zellen auf Filtersubstraten auf der apikalen Seite mit serumfreiem Medium gewaschen, um nicht adhärierte Zellen sowie Fremdzellen zu entfernen.

Bei den planaren sowie porösen Substraten wurde analog verfahren, standardmäßig erfolgte der Wechsel bei allen Substraten am zweiten, vierten und siebten Tag der Kultur.

Um das Auswachsen von Fremdzellen (z.B. Fibroblasten) in der Kultur zu verhindern, wurde dem serumhaltigen Medium das Zytostatikum *Cytosinarabinosid* (Ara C) zugesetzt. Dieses Nucleosidanalogen wird von den unspezifischen Nucleosid-Transportsystemen der Fremdzellen ins Lumen transportiert und wirkt dort inhibierend auf die DNA-Synthese. Im Gegensatz dazu besitzen die Zellen des *Plexus chorioideus* spezifische Nucleosid-Transportsysteme, die das Zytostatikum nicht transportieren.

### **Zellkultivierung – Differenzierung –**

Durch den Zusatz von fötalem Kälberserum zum Kulturmedium wird die Proliferation der Zellen angeregt, deren Anheftung und Ausbreiten auf der Matrix begünstigt und die Ausbildung eines konfluenten Zellmonolayers möglich gemacht. Allerdings hemmt das Serum gleichzeitig die Differenzierung der Zellen. Daher wurden die Zellen am neunten Tag in Kultur auf serumfreies Medium umgestellt. Kennzeichnend für die verstärkte Zelldifferenzierung sind die Bildung eines dichten Mikrovillisaumes auf der apikalen Seite und die Erhöhung der transepithelialen Widerstände. Parallel dazu bildet sich eine epitheltypische Zellpolarität heraus. In der Membran resultiert daraus die polare Verteilung von spezifischen Transportern (z.B. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase). Makroskopisch wird diese Differenzierung auf Filtersubstraten durch eine Anhebung des apikalen Mediumspiegels in Folge eines transepithelialen Wasserflusses sichtbar.

Ab dem 14. bis zum 16. Tag in Kultur konnte von vollständig ausdifferenzierten Zellen ausgegangen werden. Der letzte Mediumwechsel erfolgte standardmäßig am 11. Kulturtag.

#### **3.1.2.2 Porcine cerebrale Kapillarendothelzellen**

Die Präparation, Anzucht und Kultivierung der cerebralen Kapillarendothelzellen aus Schweinehirn (PBCEC) wurde nach einem Protokoll von *Franke et al.* (2000) durchgeführt. Daher soll hier nur auf die jeweils wesentlichen Punkte der Präparationsschritte hingewiesen werden.

Die Hirnhälften wurden frisch geschlachteten adulten Schweinen direkt nach Öffnung des Schädels entnommen und kurz in Ethanol zwischengelagert. Für den Transport wurden die Hälften in 4 °C kalten, physiologischen Phosphatpuffer mit Antibiotikazusätzen (PBS<sup>++</sup> jeweils 200 µg/ml Penicillin und Streptomycin) überführt. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Hirnhäute entfernt sowie sämtliche sekretorischen Bereiche und der Thalamus abgetrennt. Im Anschluss daran wurde das Hirnmaterial mechanisch zerkleinert und einem unspezifischen enzymatischen Verdau aus-

gesetzt, der die cerebralen Kapillaren freilegt. Durch eine Dichtezentrifugation konnten diese vom übrigen Material abgetrennt und einem zweiten Verdau zugeführt werden. Die in diesem Schritt eingesetzte spezifische Collagenase baut die Basalmembran ab und setzt somit die Endothelzellen frei. Durch anschließende diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation wurden störende Zellfragmente und Erythrozyten abgetrennt. Die Aussaat erfolgte auf Collagen- (Col. I und Col. III) beschichteten Kulturflaschen. Entscheidender Schritt zur Abtrennung von nicht erwünschten Fremdzellen wie Pericyten und Astrocyten war die zwei Tage nach Zellaussaat durchgeführte Subkultivierung, die die im Vergleich zu den Fremdzellen schwächere Adhäsion der Endothelzellen auf dem Substrat ausnutzt. Um den Zeitpunkt der differenzierten Ablösung beim trypsininduzierten Verdau zu treffen, wurde dieser Schritt lichtmikroskopisch verfolgt. Die Endothelsuspension wurde gesammelt und anschließend in gewünschter Dichte auf die Substrate aufgebracht. Zwei Tage nach der Aussaat wurde das serumhaltige Kulturmedium gegen serumfreies ausgetauscht, wobei dem Medium Hydrocortison in einer Konzentration von 550 nM zugesetzt wurde. Hydrocortison erhöht die Barriereigenschaften der Zellen signifikant.

<u>Serumhaltiges Medium</u>	Earle's Medium 199 10 % (v/v) NCS 0.7 mM Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
<u>Serumfreies Medium</u>	DMEM/Ham's F12-Medium 0.7 mM Glutamin 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 100 µg/ml Gentamycin 550 nM Hydrocortison

### 3.2 Mikroskopische Methoden

Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit sind Zellen und ihr Verhalten auf porösen Materialien. Das hat zur Folge, dass Methoden genutzt werden müssen, die eine Beobachtung in den Dimensionen der Zellen, also in einem Bereich unter 30 µm, zulassen. Zur Detektion einzelner Organellen und der Charakterisierung der nanoporösen Substrate wird sogar noch ein deutlich höheres Auflösungsvermögen im Bereich von wenigen hundert Nano-

metern benötigt. In Kombination mit spezifischen Anfärbungen bietet sich für den qualitativen Nachweis die optische Fluoreszenzmikroskopie an. Zur Untersuchung der Mikromechanik adhärenter Zellen wurde außerdem ein Rasterkraftmikroskop eingesetzt.

### 3.2.1 Konfokale Laser-Raster Mikroskopie

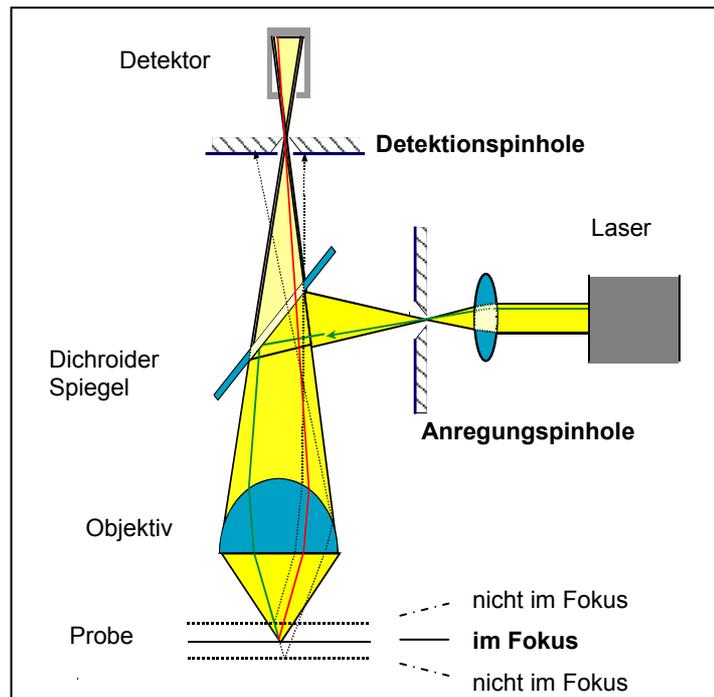
Die Konfokale Laser-Raster Mikroskopie (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*) verbindet zwei methodische Erweiterungen der konventionellen Lichtmikroskopie – das Prinzip der konfokalen Abbildung und die sequenzielle Beleuchtung einzelner Objektpunkte (Rasterverfahren). Durch die Kombination dieser beiden Techniken eröffnet sich die Möglichkeit, optische Schnitte eines transparenten Objektes parallel oder senkrecht zur optischen Achse anzufertigen, ohne das Objekt dabei zu zerstören. Aufwendige Präparationsschritte etwa zur Anfertigung von Dünnschichtpräparaten entfallen. Neben dieser Vereinfachung ist aber noch entscheidender, dass die CLSM optische Schnitte an lebenden Objekten und somit (im Rahmen der optischen Auflösung) die Beobachtung von zellulären Prozessen *in vivo* ermöglicht. Damit ist eine nicht-invasive real dreidimensionale Rekonstruktion biologischer Proben möglich. Die digitale Rekonstruktion einzelner Bildebenen erlaubt zudem eine Längen- und Flächenbestimmung auch in Ebenen, die nicht parallel zur Brennebene liegen (Engelhardt und Knebel, 1993; Stelzer et al., 1991).

Insgesamt ist die CLSM eine relativ junge mikroskopische Methode, denn obwohl bereits 1955 durch *Minsky* vorgestellt (Minsky, 1988), wurde erst in den letzten zwanzig bis dreißig Jahren durch die Verfügbarkeit von leistungsfähigen Lasern ein routinemäßiger Einsatz möglich. *Brakenhoff et al.* (1979) stellten ein Mikroskop vor, bei dem die Fokussierung auf einen einzelnen Punkt im Objekt gelang und gleichzeitig dazu die Detektion desselben Punktes durch Einfügen einer zweiten optisch konjugierten Lochblende vor dem Detektor ermöglicht wurde. Zur Kontrastierung in der CLSM dienen im Wesentlichen der Reflexions- und Fluoreszenzkontrast, wobei letzterem bei biologischen Fragestellungen besondere Bedeutung zukommt. Vor allem die Kombination von Antikörpern und Fluoreszenzsonden (Lazarides und Weber, 1974) hat die Möglichkeit des Anfärbens bestimmter Protein- und Lipidklassen bis hin zu ganzen Zellorganellen entscheidend erweitert.

#### 3.2.1.1 Konfokale Bildentstehung

In der konfokalen Mikroskopie werden Strukturen erkannt, indem das von einer Probe emittierte oder reflektierte Licht aus einer einzigen Fokalebene gebündelt, und sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, unterdrückt wird. Die Bildentstehung kann daher als Prozess mit mehreren Verarbeitungsschritten dargestellt werden (Wilhelm et al., 2003).

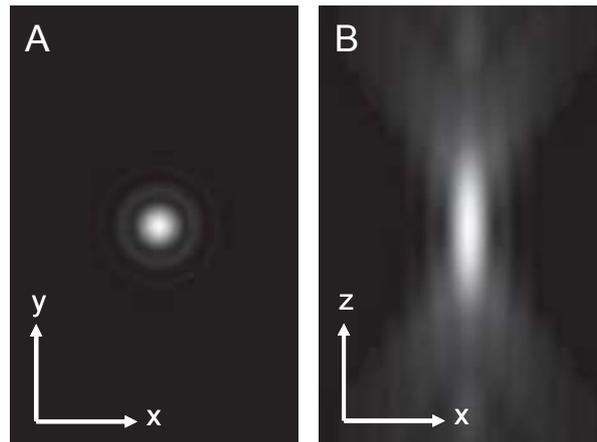
Zur Abbildung eines Objektes fokussieren die Linsen des Mikroskops das Laserlicht auf einen einzelnen Punkt der Probe (Fokalpunkt). Dazu wird ein kollimierter und polarisierter, durch eine Apertur geleiteter, Laserstrahl von einem Strahlenteiler (dichroider Spiegel) in den hinteren Teil der Objektivlinse reflektiert und auf die Probe fokussiert. Der Laser tastet die Probe nun Punkt für Punkt ab, und erzeugt so das gescannte Bild. Fluoreszenzlicht und Reflektionslicht der Probe werden durch das Objektiv zurückgeleitet. Wie bei konventionellen Epifluoreszenzmikroskopen wird die Linse ebenso als Kondensor wie auch als Objektiv verwendet. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, zwei Linsen exakt miteinander abzugleichen. Das Mikroskop fokussiert das vom Fokalpunkt emittierte Licht auf den Konfokalpunkt. An dieser Stelle befindet sich die Konfokalöffnung (*pinhole*), durch die alles außerfokale Licht, das heißt Licht, das von anderen Bereichen ober- und unterhalb der Fokalebene abgegeben wird, unterdrückt wird. Das Volumen der optischen Schnitte hängt von verschiedenen Parametern wie der Größe des *pinholes*, dem Objektiv und der Wellenlänge des Lichtes ab. Eine genauere Betrachtung folgt im nächsten Kapitel. Die innerfokalen Daten jedes Punktes auf der Probe werden von einem lichtempfindlichen Detektor (PMT, *Photo-Multiplier Tube*) in ein der Lichtintensität des betrachteten Objektpunktes proportionales, elektrisches Signal umgewandelt. Der beschriebene Strahlengang kann anhand der schematischen Abbildung **3.1** nachvollzogen werden. Da es sich bei dem Detektor um einen Punktdetektor handelt, kann mit einem konfokalen Mikroskop zu einem Zeitpunkt immer nur ein Punkt der Probe beobachtet werden. Das Gesamtbild der Probe ergibt sich daher erst durch das punktweise Ab-rastern der Probe. Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskop der Firma *Leica* (Heidelberg) nutzt dazu das Strahl-Scan-Verfahren, bei dem im Gegensatz zum Objekt-Scan-Verfahren die Probe lateral stationär bleibt und der Laserstrahl durch Justierung von Spiegeln bewegt wird. Das Rasterverfahren hat zur Folge, dass die Aufnahme eines Bildes mehrere Sekunden in Anspruch nimmt und so für die Beobachtung schneller Reaktionen zum limitierenden Faktor werden kann. Durch die Aufnahme einer Abfolge von optischen Schnitten durch die Probe und anschließende digitale Verarbeitung kann je nach zur Verfügung stehender Software aus dem dreidimensionalen Datensatz ein berechnetes zweidimensionales Bild in beliebiger optischer Ebene sowie eine dreidimensionale Darstellung der Probe erfolgen (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 2006)



**Abb. 3.1:** Schematische Abbildung eines konfokalen Laser-Raster Mikroskops. (Abbildung nach: <http://www.Leica.com>).

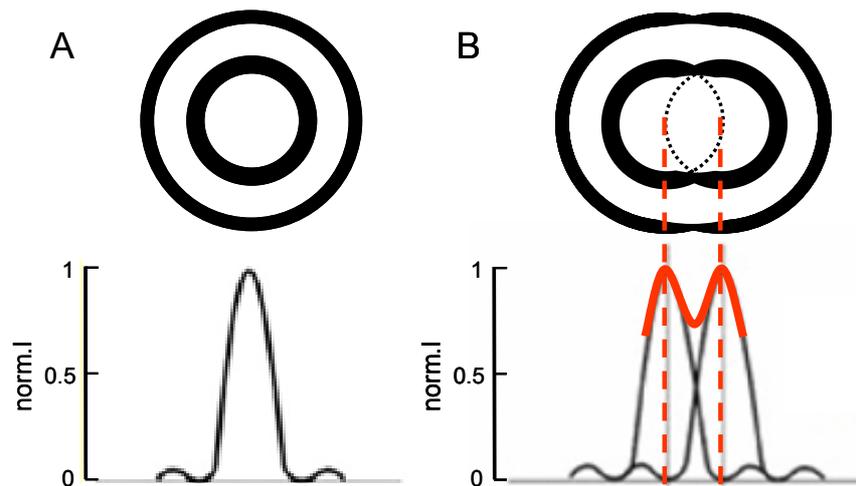
### 3.2.1.2 Optisches Auflösungsvermögen

Der Begriff der Auflösung bezieht sich auf die Fähigkeit, feinste Details in einer Struktur zu unterscheiden, also auf die Fähigkeit, zwei Punkte der Probe auch als solche getrennt darstellen zu können. Auch in einem idealen optischen System ist die Auflösung allerdings durch physikalische Faktoren begrenzt. In einem hypothetischen System ohne jede Art von Aberration ist das Auflösungsvermögen durch die Beugung begrenzt. Unter Beugung versteht man die Abweichung der Wellenausbreitung von der geometrischen Strahlrichtung an einer Öffnung im Strahlengang (Tipler, 1994). Für ein Mikroskop hat die Beugung an einer kreisförmigen Öffnung Bedeutung, wodurch bei Abbildung der Strahlen auf einem Schirm so genannte Fraunhofer-Beugungsmuster entstehen (**Abb. 3.2 A**). Die Intensitätsverteilung im dreidimensionalen Raum wird als *Point Spread Function* (PSF) bezeichnet (**Abb. 3.2 B**) (Wilhelm et al., 2003).



**Abb. 3.2:** Beugungsmuster (*Point Spread Funktion*) eines Bildpunktes in lateraler (**A**) und axialer (**B**) Ansicht.

Obwohl die PSF eine dreidimensionale Erscheinung ist, soll zunächst die zweidimensionale Vorstellung genutzt werden, um die Auflösungsbegrenzung, die aus diesem Phänomen heraus entsteht, genauer zu beleuchten. Die Beugungsmuster resultieren aus kreisförmigen Intensitätsverläufen, ausgehend vom zentralen Beugungsmaximum. Dadurch entstehen in jede Richtung deutlich schwächere Nebenmaxima und Bereiche minimaler Intensität. Die Distanz zwischen den Beugungsringen hängt von der numerischen Apertur ( $NA$ ) des Systems sowie der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des Lichtes ab (**Abb. 3.3 A**). Die Bedingungen, unter denen zwei Punkte noch getrennt wahrnehmbar sind, nennt man das *Rayleigh*-Kriterium der Auflösung. Dies ist erfüllt, wenn das erste Beugungsminimum der einen Quelle mit dem zentralen Maximum der anderen Quelle zusammen fällt (**Abb. 3.3 B**). Grundsätzlich gilt, je tiefer das Minimum zwischen den beiden Intensitätsmaxima (rote Hilfslinie), desto leichter ist es, die Objektpunkte getrennt voneinander aufzulösen. Um diese Aussage zu quantifizieren, soll an dieser Stelle zusätzlich der Kontrast-Begriff eingeführt werden. Zwei Objektpunkte können dann als getrennt dargestellt werden, wenn ein ausreichender Kontrast zwischen den beiden Bildpunkten hergestellt werden kann, also ein Bereich geringerer Intensität dazwischen verbleibt. Das *Rayleigh*-Kriterium ist für Fluoreszenzanwendungen erfüllt, wenn ein Intensitätsverhältnis zwischen dem Minimum zwischen zwei Punkten und den Maxima der Punkte von etwa 74 % erhalten wird.



**Abb. 3.3:** **A:** Intensitätsverteilung für ein zweidimensionales Beugungsmuster eines Bildpunktes. **B:** Kombination der Beugungsmuster zweier benachbarter Bildpunkte zur Veranschaulichung des Rayleigh-Kriteriums.

Die oben genannten Kriterien zur Auflösung gelten für alle optischen Lichtmikroskope. Auch für die konfokale Mikroskopie gilt, dass die Distanz zwischen den Beugungsringen, die letztendlich das Auflösungsvermögen bestimmt, von der numerischen Apertur des Systems sowie der Wellenlänge des Lichtes abhängt. Allerdings resultiert aus der punkweisen Anregung und der punkweisen Detektion, dass sich die Gesamt- *Point Spread Function* aus den unabhängigen Anregungs- und Detektions- *Point Spread Functions* zusammensetzt. Ausschließlich die Intensität aus den sich überlappenden Volumina der PSF wird detektiert. Daraus resultiert eine schmalere Gesamt-*Point Spread Function*.

Aus den oben benannten Kriterien für den PSF kann für die laterale Auflösung, die durch den minimalen Abstand ( $d_{lateral}$ ) zwischen zwei auflösbaren Punkten definiert ist folgende Gleichung formuliert werden:

$$d_{lateral} = \frac{0.4 \cdot \lambda}{NA} \quad \text{Gl. 3.1}$$

mit:  $NA = n \cdot \sin \alpha . \quad \text{Gl. 3.2}$

Parameter  $n$  steht für den Brechungsindex des Mediums,  $\alpha$  für den halben Öffnungswinkels des Objektivs.

Analog zu der oben geführten Argumentation kann die axiale Auflösung ( $d_{axial}$ ) definiert werden als der Radius des ersten Intensitätsminimums entlang der Beleuchtungsachse.

$$d_{axial} = \frac{1.4 \cdot \lambda \cdot n}{NA^2} \quad \text{Gl. 3.3}$$

(Quelle: <http://www.olympusfluoview.com>)

Aus Gleichung 3.3 folgt, dass die numerische Apertur auf das axiale Auflösungsvermögen einen deutlich größeren Einfluss hat als die Wellenlänge des Lichtes. Die in dieser Arbeit

verwendeten Tauchobjektive besitzen eine numerische Apertur von 0.9 (63er) und 0.3 (10er), das 20er Trockenobjektiv wird mit  $NA = 0.5$  angegeben.

### **3.2.2 Charakterisierung der nanoporösen Silizium-Substrate mit Hilfe der CLSM**

Die nanoporösen Silizium-Substrate wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gösele am Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik in Halle im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Poren sind in einem hexagonalen Gitter angeordnet und besitzen einen Durchmesser von 900 nm bzw.  $1.3 \mu\text{m}$  bei einer Tiefe von  $10 \mu\text{m}$ .

#### **3.2.2.1 Reinigung der Substrate**

Die Reinigung der Substrate erfolgte nach einer Standardprozedur. Dazu wurden die Substrate unabhängig von der Porenstruktur zunächst in ein Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung im Verhältnis 3:1 gelegt, um alle organischen Überreste zu entfernen. Die Substrate wurden anschließend in einen Halter eingebracht, um zu gewährleisten, dass in den folgenden Waschschrritten die gesamte Oberfläche erreicht wurde. Das Waschen wurde durch eine Ultraschallbehandlung unterstützt (15 min bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Nach mehrmaligem Spülen mit Reinstwasser wurde die Ultraschallbehandlung noch weitere vier Mal durchgeführt, um sämtliche Säurereste zu entfernen. Im Anschluss wurden die Substrate für 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet, und direkt vor einem Experiment für eine Minute im Argonplasma sterilisiert.

#### **3.2.2.2 Eindringen einer Fluoreszenzsonde in die Poren**

Eine  $0.5 \text{ mM}$  FITC-Dextran-Lösung ( $4 \text{ kDa}$ ) wurde auf die zuvor gereinigten Substrate gegeben und für mindestens 1 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. In Abhängigkeit vom Experiment wurde der Farbstoff in  $\text{PBS}^{++}$  oder in Zellkulturmedium gelöst. Das Eindringen der Fluoreszenzsonde in die Poren wurde durch optische Schnitte am CLSM dokumentiert.

### **3.2.3 Charakterisierung des Zellwachstums auf nanoporösen Substraten**

Nanoporöse Substrate unterscheiden sich hinsichtlich der Topographie der Oberfläche deutlich von planaren Substraten für die Zellkultur. Die Reaktionen der Zellen darauf können vielfältig ausfallen, vom Zelltod über Unterschiede in der Differenzierung bis hin zu ungehinderterem Wachstum. Daher wurde das Zellwachstum anhand verschiedener Marker immunocytochemisch sowie in Färbe-Assays untersucht und verglichen.

### 3.2.3.1 Zellkultivierung auf nanoporösen Silizium-Substraten

Das Standard-Kulturprotokoll ist unter Kapitel 3.1 angegeben und nur in den im folgenden Abschnitt benannten Bereichen als Anpassung an die Kulturoberflächen verändert worden. Die verwendeten Chips wurden in Petrischalen gelegt, woraus ein kompletter Bewuchs der gesamten Oberfläche resultierte.

#### MDCK II-Epithelzellen

Die Aussaat auf Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1-Substrate) verlangte eine Beschichtung der Oberfläche, da sonst kein oder nur ein lückenhaftes Zellwachstum beobachtet werden konnte. Hierfür wurden unterschiedliche Proteine der extrazellulären Matrix genutzt und auf ihre Wirksamkeit getestet. Die Substrate wurden vor Aussaat der Zellen mit einer 10 µg/ml Rattenschwanzkollagenlösung oder mit einer 100 µg/ml Fibronectinlösung dünn überzogen und bis zur Trockene unter der Sterilbank inkubiert. Dies war nach ca. 1 h erreicht. Daneben wurde die Inkubation mit einer Gelatinelösung (0.5 %ig (w/v)), Lamininlösung (50 µg/ml) und reinem fötalen Kälberserum für 1 h getestet. Nach der Inkubation wurden die Substrate zunächst mit Reinstwasser gewaschen, dann mit Medium gespült. Für die Charakterisierung der Proben durch immunzytologische Färbungen erfolgte ausnahmslos eine Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen (Endell, 2003, Diplomarbeit), bei allen anderen Experimenten wurde mit Fibronectin beschichtet.

Bei den Substraten mit einem Porendurchmesser von 1.3 µm (Typ 2-Substrate) wurde zunächst zu Vergleichszwecken ebenfalls mit Fibronectin beschichtet. Es stellte sich jedoch heraus, dass für ein konfluentes Zellwachstum keine Beschichtung notwendig war.

Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2, bezogen auf die Zelldichte pro Quadratzentimeter Wachstumsfläche, ausgesät. 24 h vor dem Experiment wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### NRK-Zellen (Klon 52E, epithel-ähnlich)

Für die NRK-Zellen war keine Beschichtung der Substratoberfläche nötig. Durch konfluente Aussaat (1:1) war nach 24 h ein konfluenten Zelllayer vollständig ausgeprägt.

#### NIH 3T3 Fibroblasten

Alle nanoporösen Substrate wurden vor der Aussaat mit Gelatine (0.5 %ig, (w/v) in Wasser) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran zweimal mit Medium gewaschen. Die Zellaussaatdichte betrug 180.000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

### **Epithelzellen des porcinen *Plexus chorioideus***

Die Zellen des *Plexus chorioideus* wurden auf nanoporöse Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm ausgesät. Analog zur etablierten Präparation der Primärkultur auf permeablen Filtersubstraten erfolgte eine Inkubation der Substrate mit Laminin (4 µg/cm<sup>2</sup>) bis zur Trockene. Um ein hohes Maß an Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden auch die planaren Substrate mit Laminin beschichtet.

### **Porcine cerebrale Kapillarendothelzellen**

Der Einsatz von Endothelzellen wurde ausschließlich auf Substraten mit einem Porendurchmesser von 900 nm untersucht. Hierzu wurden die Substrate mit quervernetzter Gelatine beschichtet. An eine mindestens 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit der Gelatinelösung (0.5 %ig (w/v) in Wasser) schloss sich nach Absaugen der Lösung die Vernetzung durch Glutardialdehyd (2.5 %ig (v/v) in Wasser) an. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde der Aldehyd entfernt und das Substrat mindestens viermal mit Reinstwasser gewaschen. Zur Aussaat wurden 220.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingesetzt.

#### **3.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von ZO-1, Occludin, Claudin-1, Vinculin und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

Die Fluoreszenzmarkierung der spezifischen Proteine erfolgte nach einem einheitlichen experimentellen Protokoll. Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Entfernen des Kulturmediums zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend 10 min mit einer 4 %igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in PBS<sup>++</sup> bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen unter dem Einfluss des Detergenzes Triton X-100 (0.2 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>) für 5 - 10 min bei RT permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS<sup>++</sup> wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 20-minütige Inkubation mit einer 3 %igen (w/v) BSA-Lösung in PBS<sup>++</sup> bei RT abgesättigt. Es folgte ein Inkubationsschritt mit einem spezifischen monoklonalen Erstantikörper gegen das gewünschte Protein für 90 min bei 37 °C (**Tab. 3.1**). Zur Kontrolle der Spezifität des Erstantikörpers wurde eine bis hierhin analog behandelte Probe statt mit einer Erstantikörper-Lösung mit einem entsprechenden Volumen PBS<sup>++</sup> inkubiert, in den nachfolgenden Schritten dann aber wieder gleich behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte zunächst wiederum ein gründliches Waschen mit PBS<sup>++</sup> und eine erneute Inkubation mit einer 3 %igen BSA-Lösung (in PBS<sup>++</sup>, 20 min, RT). Es schloss sich ein weiterer Waschschriff mit PBS<sup>++</sup> sowie eine 45 minütige Inkubation bei 37 °C mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper an, der sich gegen die konstante Region des Erstantikörpers richtete (**Tab. 3.2**). Der überschüssige Zweitantikörper wurde gründlich gewaschen und es folgte optional eine weitere Fixierung mit PFA (s.o.), durch die die Haltbarkeit der Färbung verlängert wurde. Dieser Schritt wurde vor allem dann durchgeführt, wenn die Pro-

ben erst am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden sollten. In diesem Fall wurden die Präparate zusätzlich lichtgeschützt und bei 4 °C aufbewahrt. Da die Untersuchungen am CLSM mit einem Tauchobjektiv durchgeführt wurden, wurde direkt in der PBS<sup>++</sup>-Lösung mikroskopiert, es folgte kein Einbettungsschritt mit Deckgläschenabdeckung.

**Tab. 3.1:** Übersicht über die verwendeten Erstantikörper sowie die eingesetzten Konzentrationen.

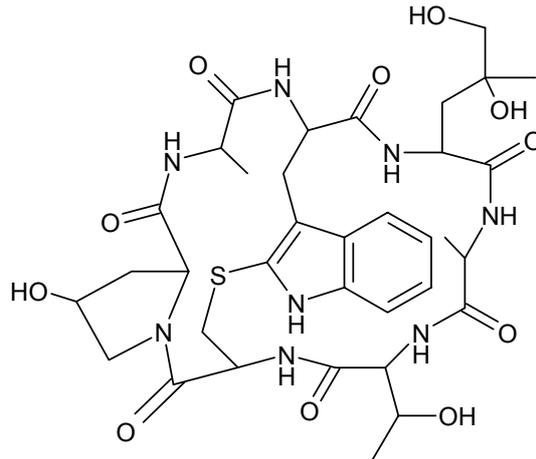
Antigen	1. Antikörper	Konzentration, Inkubationszeit	Hersteller
ZO-1	monoklonal aus Kaninchen	2.5 µg/ml, 90 min	Zymed GmbH, Berlin
Occludin	monoklonal aus Kaninchen	2.5 µg/ml, 90 min	Zymed GmbH, Berlin
Claudin-1	monoklonal aus Kaninchen	2.5 µg/ml, 90 min	Zymed GmbH, Berlin
Vinculin	monoklonal aus Maus	40 µg/ml, 90 min	Sigma, Saint Louis, USA
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	monoklonal aus Maus	50 µg/ml, 90 min	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA

**Tab. 3.2:** Übersicht über die verwendeten Zweitantikörper sowie die eingesetzten Konzentrationen

	2. Antikörper	Konzentration, Inkubationszeit	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Alexa-Fluor®-546, polyklonal aus Ziege	2 µg/ml	MoBiTec GmbH, Göttingen
Anti-Maus-IgG	polyklonal aus Schaf	2 µg/ml	Chemicon Inc., Temecula, USA

### 3.2.3.3 Fluoreszenzmarkierung des filamentösen Aktins durch TRITC-Phalloidin

Phalloidin besitzt eine hohe spezifische Affinität zu filamentösem Aktin (f-Aktin). Diese Affinität wird zur Anfärbung der Mikrofilamente in der Zellbiologie genutzt, indem fluoreszenzmarkierte Phalloidinmoleküle eingesetzt werden. Phalloidin gehört zu den Phallotoxinen und ist eine der Toxinkomponenten des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Für die Anfärbung wird der gleiche Mechanismus ausgenutzt, der in den Organismen für die toxische Wirkung verantwortlich ist. Das cyclische Heptapeptid (**Abb. 3.4**) heftet sich an die Seiten der Aktinfilamente und stabilisiert sie so gegen die Depolymerisation. Hierdurch wird das empfindliche Gleichgewicht des ständigen Auf- und Abbaus des filamentösen Aktins gestört, und es resultieren tiefgreifende Veränderungen des Cytoskeletts.



**Abb. 3.4:** Strukturformel des Phalloidins.

In dieser Arbeit wurde zur Anfärbung ein TRITC-markiertes Phalloidinderivat verwendet. Die Zellen wurden auf den zu untersuchenden Substraten nach dem jeweiligen Standardprotokoll kultiviert. Um eine Anfärbung des Cytoskeletts zu ermöglichen, mussten die Zellen zuerst fixiert und im Anschluss daran permeabilisiert werden. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und für 10 min bei RT in PFA (4 %ig (w/v) in PBS<sup>++</sup>) inkubiert. Das Fixans wurde abgesaugt und die Zellen für 5 min bei RT durch eine 0.2 %ige (v/v) Triton X-100 Lösung (in PBS<sup>++</sup>) permeabilisiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die Phalloidinlösung wurde nach Zugabe für 45 min auf dem Substrat belassen, wobei die Lösung frisch aus einer Stammlösung (0.3 mg/ml TRITC-Phalloidin in Ethanol, Verdünnung 1:1000 in PBS<sup>++</sup>) angesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen gründlich mit PBS<sup>++</sup> gewaschen (3 x), um Farbstoffreste zu entfernen. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte direkt im Anschluss an die Färbung und wurde in PBS<sup>++</sup> vorgenommen.

#### 3.2.3.4 Lebend/Tot – Assay

Der in dieser Arbeit verwendete Lebend/Tot – Test (Molecular Probes) bestand aus zwei Komponenten. Die Vitalität der eukaryotischen Zellen wurde indirekt durch den Nachweis aktiver Esterasen im Cytoplasma erbracht. Hierzu wurde die oft verwendete Sonde Calcein AM genutzt. Der membrangängige nicht-fluoreszierende Farbstoff-Vorläufer Calcein-Acetoxy-methylester wird durch intrazelluläre Esterasen in das intensiv grün fluoreszierende Calcein hydrolysiert. Calcein AM ist aufgrund seines hydrophoben Charakters in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Nach der Spaltung durch die Esterasen ist das entstandene Polyanion im Cytoplasma der Zelle eingeschlossen. Die Calcein AM-Lösung wurde jeweils frisch vor dem Experiment aus einer Stammlösung (1 mg/ml in DMSO) hergestellt, indem 20 µl der Stammlösung in 10 ml PBS<sup>++</sup> gegeben wurden. Daraus resultierte eine Konzentration von 2 µM. Im Falle einer längeren Beobachtungsdauer wie bei der selektiven Verletzung

eines Zelllayers wurde dem Puffer 1 mg/ml D-Glucose zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels zugesetzt. Für den Vitalitätstest wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS<sup>++</sup> gespült und anschließend mit der Farbstofflösung für 30 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Dokumentation erfolgte nach dem Entfernen der Färbelösung und Waschen mit PBS<sup>++</sup> direkt im Anschluss am CLSM (Anregung 494 nm, Emission 517 nm).

Obwohl es bereits als ein deutliches Indiz gewertet werden kann, wenn Zellen nicht durch den Vitalitätsmarker angefärbt werden, wurde eine zweite Komponente eingesetzt, die tote Zellen eindeutig markiert. Durch Verwendung von Ethidiumhomodimer (EthD) wurde ein Farbstoff genutzt, der mit der DNA im Zellkern interagieren kann. Das zunächst nicht-fluoreszierende Molekül ist allerdings nur dann in der Lage, in den Zellkern zu gelangen, wenn die Integrität der Membranen der Zelle verletzt ist. Dieser Fall wird mit dem Tod der Zelle gleichgesetzt. Nach dem Passieren der Plasma- und Kernmembranen erfolgte eine Interkalation des EthD in die DNA im Zellkern, wodurch der Farbstoff bei einer Anregung von 528 nm intensiv rot fluoreszierte (Emission: 617 nm). Zur Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und im Anschluss mit einer 4 µM EthD-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde hergestellt, indem 20 µl einer Stammlösung (2 mM in DMSO) in 10 ml PBS<sup>++</sup> gegeben wurden. Auch hier wurde in Einzelfällen D-Glucose (1 mg/ml) zugesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 30 min bei 37 °C, es folgten drei Waschschrte mit PBS<sup>++</sup>. Für einen kombinierten Lebend/Tot-Test wurden beiden Stammlösungen zusammen in Puffer gelöst und für 30 min bei 37 °C auf die Zellen gegeben.

### **3.2.4 Ortsaufgelöste Untersuchungen zur Permeation einer Fluoreszenzsonde (Permeationsassay)**

Alle Experimente zur Permeation wurden mit einem fluorophormarkierten Dextran durchgeführt, wobei standardmäßig ein 4 kDa Dextran gewählt wurde, das mit FITC (*Fluorescein-Isothiocyanat*) gelabelt war. Die Größe des Dextrans ließ eine leichte Permeation durch die Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) zu, wurde allerdings nicht oder nur in einem geringen Maße in die Zellen aufgenommen. Das Dextran wurde in PBS<sup>++</sup> gelöst (0.5 mM) und in Abhängigkeit vom Experiment auf RT oder 37 °C vortemperiert, ehe es auf den Zelllayer gegeben wurde. Allen Lösungen wurde D-Glucose in einer Konzentration zugesetzt, die vergleichbar mit der Konzentration im Standardkulturmedium war (z.B. MDCK II: 1mg/ml). Abweichend von allen anderen Zelltypen wurde für die NIH 3T3-Fibroblasten ein 2.5 MDa FITC-Dextran (2 mg/ml) eingesetzt, um eine möglichst langsame Permeation durch die Zellzwischenräume zu erreichen. NIH 3T3-Fibroblasten besitzen keine *tight junctions* und zeigen dadurch keine klassischen Barriereigenschaften. Die Dokumentation am CLSM erfolgte in diesem Fall so schnell wie möglich nach Zugabe des Fluorophors.

Die Dokumentation des Permeationsweges wurde mit Hilfe eines 63er Tauchobjektives direkt in der fluoreszierenden Lösung durchgeführt (Anregungswellenlänge des Farbstoffs: 488 nm). Es wurden standardmäßig Bilder in verschiedenen Ebenen aufgenommen. In Höhe des Zelllayers waren die Zellen in den Aufnahmen als dunkle Bereiche eindeutig zu erkennen (Kapitel 3.2.5.4). Daneben wurden optische xy-Schnitte in Höhe der Substratoberfläche und darunterliegend durchgeführt.

Zur Datenprozessierung wurden die Rohdaten mit Hilfe der von der Firma *Leica* zur Verfügung gestellten Software bearbeitet. Zur Bestimmung der Intensität in der optischen xy-Ebene wurden so genannte *line scans* durchgeführt, die die relative Intensität der Fluoreszenz entlang einer Linie dokumentieren.

Zur Bestimmung der relativen axialen Intensitätsverläufe innerhalb einer zusammenhängenden Bilderserie wurden so genannte *ROIs* (*region of interest*) definiert. Die gemittelte Intensität der Pixel wurde gegen die z-Position aufgetragen.

Bei einer kontinuierlichen Beobachtung der gleichen Position des Präparates wurden bei RT zusammenhängende Bilderserien, bestehend aus optischen xy-Schnitten aus unterschiedlichen Positionen entlang der z-Achse, aufgenommen. Daneben wurden aber auch Experimente durchgeführt, bei denen nach jeweils 1 h Inkubationszeit eine Dokumentation durchgeführt wurde. Diese Substrate wurden zwischen den Aufnahmen bei 37 °C bzw. 4 °C gelagert. Im Falle einer kontinuierlichen Versuchsführung wurde in Sonderfällen eine Wärmeplatte unterhalb der Zellen etabliert. Über einen Wasserkreislauf war diese an einen Thermostaten angeschlossen.

### 3.2.4.1 Permeabilisierung von Einzelzellen

Die Untersuchungen zum Permeationsassay wurden dadurch erweitert, dass absichtlich die Permeabilisierung von einzelnen Zellen innerhalb eines Zellrasens herbeigeführt wurde. So wurde eine punktuelle Verletzung des Zelllayers simuliert. Zunächst wurden die Zellen auf porösen Substraten kultiviert (in 10 cm<sup>2</sup> Petrischalen) und analog zu den in Kapitel 3.2.4 genannten Bedingungen mit einer FITC-Dextran-Lösung (4 kDa, 0.5 mM in PBS<sup>++</sup> mit 1 g/l Glucose) für 6 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit permeierte die Sonde durch die Zellzwischenräume und in die darunterliegenden Poren des porösen Substrates (Porendurchmesser 900 nm). Dieser Zustand wurde mit Hilfe des CLSM in allen relevanten Positionen dokumentiert. Anschließend wurde eine sehr verdünnte Triton X-100-Lösung (0.2 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>) zugegeben. Unter diesen Bedingungen befinden sich vereinzelt Triton X-100- Mizellen in der Lösung, die sich durch Diffusion verteilen und statistisch auf die Zellen treffen. Dort wird durch Interaktion der Moleküle mit der Membran eine Permeabilisierung hervorgerufen. Im Anschluss wurde zeitabhängig an einer konstanten Stelle die Permeabilisierung einzelner

Zellen beobachtet und durch optische xy-Schnitte dokumentiert. Schnelles Einfließen des Fluorophors in den Zellkörper zeigte die Verletzung der Membran an.

#### 3.2.4.2 Permeabilisierung von Zellbereichen

Durch *Knight et al.* (2003) wurde gezeigt, dass der zellpermeable Vitalfarbstoff Calcein AM, der durch Esterasen im Zellinnern zum fluoreszierenden Calcein hydrolysiert wird, bei Bestrahlung mit geeigneter Wellenlänge (494 nm) in Abhängigkeit von Lichtintensität und Belichtungsdauer zum Zelltod führen kann. Hierbei konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, ob es sich um einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod handelt (Wiemann, 2004, Diplomarbeit).

Diese Phototoxizität von Calcein wurde ausgenutzt, um gezielt weite Bereiche von Zellen auf porösen Substraten zu schädigen und so eine Defektstelle zu simulieren. Im Anschluss daran sollte das angrenzende unverletzte Epithel im Permeationsassay untersucht werden. Dazu wurden konfluente Zellschichten mit der Calcein AM-Lösung (2 µM in PBS<sup>++</sup>) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Mikroskop auf ihre Beladung mit dem Fluorophor untersucht und für 5 min mit Licht der Wellenlänge 420 - 490 nm bestrahlt (63er Tauchobjektiv). Im Anschluss wurde die Lösung gegen Kulturmedium ausgetauscht, und die Zellen im Inkubator gelagert (37 °C). 15 h nach der Belichtung wurde das Kulturmedium durch eine FITC-Dextran-Lösung (4 kDa, 0.5 mM in PBS<sup>++</sup> mit 1 g/l D-Glucose) ersetzt. Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte sowohl mit einem 10er als auch mit einem 63er Tauchobjektiv am CLSM. Es wurden optische xy-Schnitte in Höhe der Zellkörper, der Substratoberfläche und in Höhe der Poren aufgenommen. Von besonderem Interesse war der Grenzbereich zwischen vitalem und geschädigtem Zellschicht.

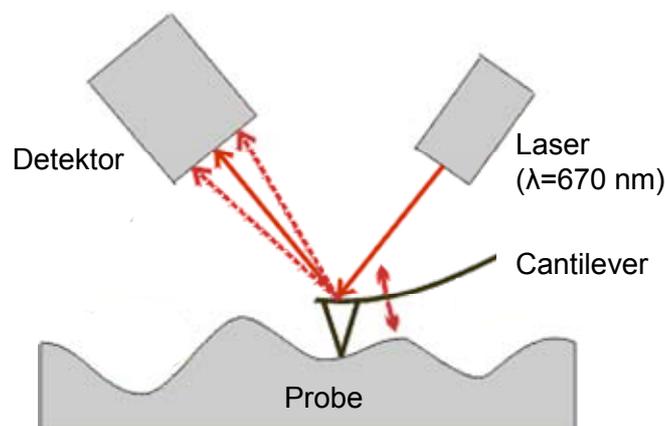
#### 3.2.5 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy, SFM) hat in der Untersuchung von biologischen Systemen eine neue Anwendung gefunden. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie oder der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie werden Dimensionen erreicht, die deutlich unterhalb der Auflösung eines optischen Mikroskops liegen. Es können ähnliche Dimensionen wie bei der Elektronenmikroskopie (0.1 nm) erreicht werden, allerdings entfällt beim SFM eine aufwendige Probenpräparation, und die Messung ist unter normalen Laborbedingungen möglich. Dadurch besteht die Möglichkeit zur Messung vitaler Zellproben. Die SFM-Technik ist eine oberflächensensitive Methode, die eine exakte Oberflächenabbildung ermöglicht, direkte Rückschlüsse auf darunter ablaufende Prozesse im Fall biologischer Proben aber nur schwer zulässt. Daher ist eine Kombination von optischen Verfahren wie der CLSM mit einem hochauflösenden Rasterkraftmikroskop von hohem Informationsgehalt. In

dieser Arbeit wurde das SFM genutzt, um durch die Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven die mechanischen Eigenschaften osmotisch gestresster Zellen zu bestimmen. Parallel dazu wurden die gleichen Experimente am CLSM durchgeführt, um optische Informationen bezüglich der Zellhöhenveränderungen zu dokumentieren.

### 3.2.5.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie wurde 1986 von *Binning, Quate* und *Gerber* (Binning et al., 1986) eingeführt. Sie nutzten dabei eine Entdeckung aus, die sie bei der Weiterentwicklung der Tunnelstrommikroskopie machten: Kräfte mit relativ kurzer Reichweite. Das AFM gehört zu den Rastersondenmikroskopen, deren Funktionsprinzip darauf beruht, dass Wechselwirkungen durch z.B. Coulomb-, Van der Waals- oder elektrostatische Kräfte zwischen der Probe und der Spitze des Mikroskops während des Scanvorganges auftreten. Damit erinnert es an die Funktionsweise eines Plattenspielers. Eine aus biologischer Sicht entscheidende Weiterentwicklung gelang dann *Alexander* (1989), der eine Methode zur Messung in wässrigem Milieu und damit die Möglichkeit zur Untersuchung der Dynamik vitaler Zellen bei hoher Auflösung vorstellte. Sowohl im Trockenen als auch im Nassen rastert eine sehr feine Spitze die Oberfläche der Probe ab. Diese Spitze sitzt an einem Ende eines Federbalkens (engl.: *cantilever*), der wiederum an einer Piezokeramik befestigt ist (**Abb. 3.5**). Die Cantilever bestehen häufig aus Silizium oder Siliziumnitrid und besitzen eine spezifische Federkonstante, die für die Auswertung einer Messung bekannt sein muss. Typischer Wert für eine Federkonstante ist 0.001 bis 50 N/m (Steltenkamp, 2006). Die während der Annäherung an die Probe bzw. beim Abrastern einer Probe stattfindende Verbiegung des Federbalkens wird optisch detektiert. Dazu ruht ein Laserstrahl auf dem *cantilever* bzw. wird von diesem reflektiert und über einen Spiegel auf eine Vierquadrant-Photodiode (Detektor) geleitet. Aus der Differenz der Photoströme der einzelnen Quadranten lässt sich die Auslenkung feststellen, wobei der große Abstand zwischen *cantilever* und Detektor auch kleinste Auslenkungen messbar macht.



**Abb. 3.5:** Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. (Quelle: <http://www.shef.ac.uk>)

Die Technik des SFM kann für unterschiedliche Messmodi genutzt werden.

Im Kontaktmodus (engl.: *contact-mode*) steht die Spitze im ständigen Kontakt mit der Probe und wird mit konstanter Kraft auf die Probe gedrückt. Diese Variante eignet sich besonders für die Abbildung von harten Materialien wie Kristallen. Im *contact-mode* lässt sich die höchste Auflösung erzielen, für biologische Proben ist er allerdings nur bedingt geeignet, da aufgrund des ständigen Kontaktes die Probe beschädigt werden kann. Daneben erscheinen weiche Bereiche auf der Probe aufgrund der hohen Elastizität tiefer als gleich hohe harte Bereiche. Für biologische Proben werden daher meist dynamische Messmodi bevorzugt, um die für eine Zerstörung verantwortliche Kontaktzeit zu minimieren. Die Kontaktzeit ist von der Elastizität der Probe abhängig und nimmt mit zunehmendem *Young Modulus* der Probe ab (San Paulo et al., 2000). Durch eine geringere Kontaktzeit werden die lateralen Kräfte minimiert. Beispiel für einen dynamischen Modus ist der so genannte *tapping-mode*. Hier wird der *cantilever* in seiner Resonanzfrequenz zu einer konstanten Schwingung angeregt, wobei in der Nähe der Probe eine Dämpfung der Schwingungsamplitude detektiert wird. Durch Justierung des Abstandes zur Probe wird die Schwingungsamplitude konstant gehalten, und die Oberflächentopographie kann ohne kontinuierlichen Kontakt aufgezeichnet werden.

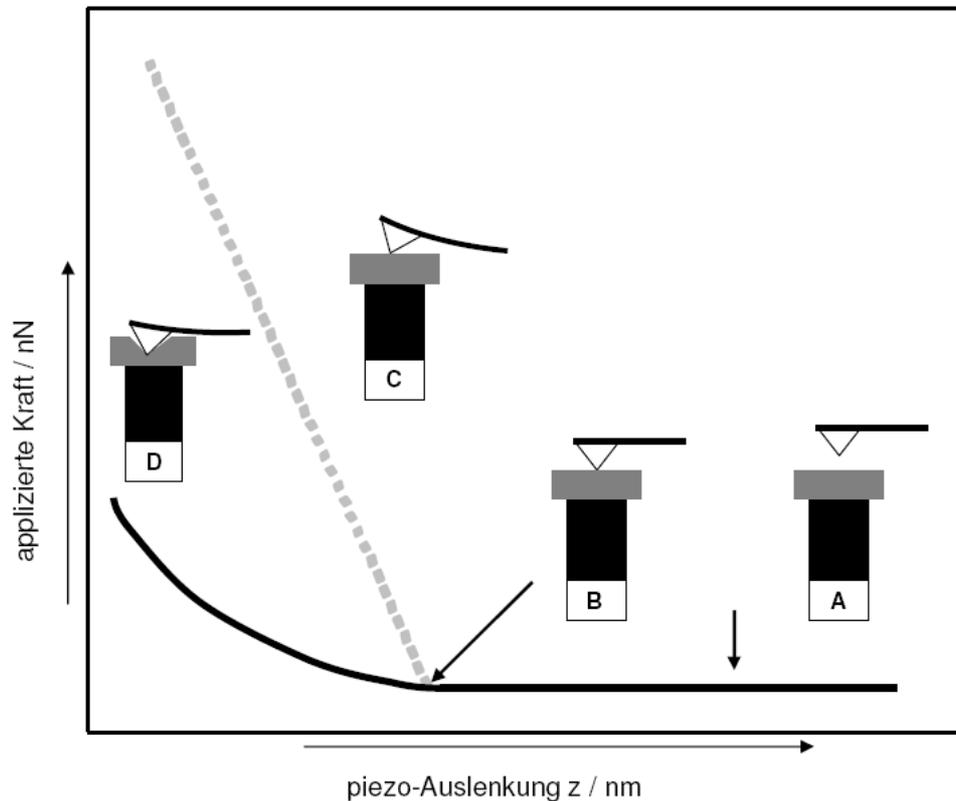
### 3.2.5.2 Kraft-Abstands-Messungen

Neben der Abbildung von Oberflächen können mit dem SFM lokal Kräfte gemessen werden, um Informationen über die molekularen Wechselwirkungen an der Oberfläche und die mechanischen Eigenschaften einer Probe zu erhalten. (A-Hassan, 1998). Die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften ist bei zellulären Systemen von großem Interesse, da bei vielen Wirkstoffen eine Auswirkung auf das Aktin-Cytoskelett prognostiziert wird oder schon gezeigt werden konnte (Rotsch und Radmacher, 2000).

Zur Messung der Kraft-Abstands-Kurven wird der *cantilever* ein- oder mehrmals auf die Probe abgesenkt, mit definierter Kraft aufgedrückt und wieder von der Probe entfernt. Die auf die Messnadel wirkende Kraft wird dabei in Abhängigkeit von der Position aufgezeichnet. So können Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Materials und die Oberfläche gewonnen werden, wie Adhäsionskräfte und Elastizität (<http://www.tazgmbh.com>).

In Abbildung 3.6 ist die Annäherung des *cantilevers* an eine Probe dargestellt. Der horizontale Abschnitt in der rechten Bildhälfte (**Abb. 3.6 A**) repräsentiert die Nulllinie bevor Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Probenoberfläche beobachtet werden können. Kraftkurven werden normalerweise von der Nulllinie aus gelesen. Nähert sich die Spitze der Probenoberfläche (**Abb. 3.6 B**), wirkt eine kurzreichweitige, attraktive Kraft („*snap-on*“ - Effekt bei der Kontaktaufnahme mit der Probe nicht abgebildet). Danach steigt die Kraft proportional mit dem weiteren Annähern des *cantilevers* an (**Abb. 3.6 C**). Dieser Fall wird beobachtet, wenn es sich um eine sehr steife Probe handelt. Der in Abbildung 3.6 D dargestellte Fall

weicht von diesem Verlauf ab. Die Verlaufskurve ist nicht mehr linear, sondern verläuft zunächst flacher und wird dann steiler. Die nicht-lineare Kennlinie kann entweder durch eine Verhärtung des Materials während des Eindrückens zustande kommen (Kompression der Probe) oder dadurch, dass bei dünnen Proben mit zunehmender Kompression die Probenunterlage die Messung beeinflusst. Für biologische Proben ist ein elasto-plastisches Verhalten zu erwarten (A-Hassan et al., 1998; Weisenhorn et al., 1993).



**Abb. 3.6:** Kraft-Abstands-Kurven (nach Radmacher et al., 1995).

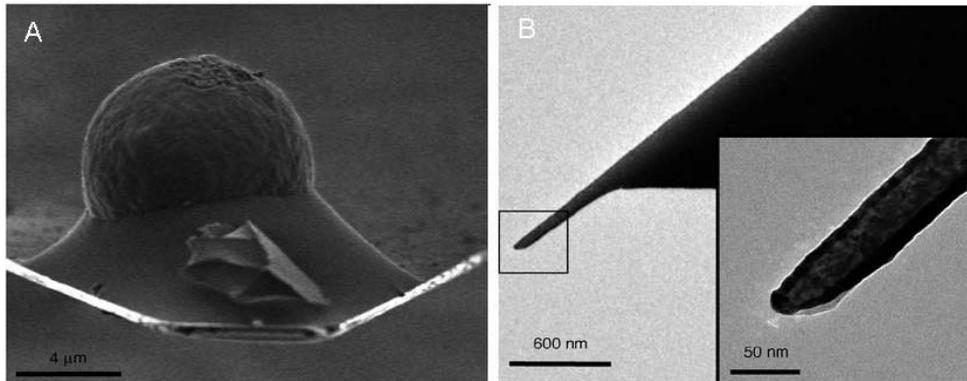
Zu Beginn der Messung hat die Spitze keinen Kontakt zur Probe, daher bleibt die applizierte Kraft konstant (A). Beim Auftreffen auf die Probe (B) ist die Kraft im Fall einer steifen Probe proportional zur Piezo-Auslenkung (C). Bei weichen Proben (D) zeigt sich ein elasto-plastisches Verhalten, d.h. die Probe lässt sich zunächst eindrücken und verhärtet sich dann während des weiteren Annäherungsprozesses.

### 3.2.5.3 Messung von Kraft-Abstands-Kurven osmotisch gestresster Zellen

Alle rasterkraftmikroskopischen Experimente wurden in einer Kooperation mit Herrn *Siegfried Steltenkamp* (Johannes Gutenberg Universität, Mainz) durchgeführt.

Die Aufnahmen wurden mit einem MFP 3D-Mikroskop (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) angefertigt. Neben handelsüblichen SFM-*cantilevern* (Olympus BLRC150 VB-C1, AFPE, Mannheim, Deutschland; Federkonstante  $k = 6 \text{ mN/m}$ ) wurden außerdem *cantilever* verwendet, an deren Spitze eine Polystyrolkugel ( $d = 9 \text{ }\mu\text{m}$ ) geklebt wurde. Ausgang hierfür bildete ein Olympus PSA 400 *cantilever*. Dadurch wurde die Auflagefläche des *cantilevers* auf der Zelloberfläche vergrößert und so die Gefahr minimiert, dass die Spitze in die Zellmembran einbricht. Abbildung 3.7 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der verwen-

deten *cantilever*. **A** zeigt den Kugel-*cantilever* **B** den herkömmlichen *cantilever* mit einem Öffnungswinkel von  $\alpha = 20 \pm 5^\circ$ .



**Abb. 3.7:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten *cantilever*.

**A:** Olympus PSA 400 *cantilever* mit einer aufgeklebten Polystyrolkugel ( $d = 9 \mu\text{m}$ ), **B:** handelsüblicher Olympus BLRC150 VB-C1, AFM *cantilever* mit einem Öffnungswinkel von  $\alpha = 20 \pm 5^\circ$ .

Die MDCK II-Zellen wurden in Petrischalen ( $10 \text{ cm}^2$ ) nach dem Standardprotokoll (Kapitel 3.1.1) bis zu einem konfluenten Monolayer kultiviert.

Für die Messungen wurden Puffer-Lösungen verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Osmolarität unterschieden. Ausgehend von einem HEPES-Puffer wurde durch Saccharose-Zugabe die gewünschte Osmolarität erzeugt und mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Gonotec, Berlin) bestimmt (**Tab. 3.3**).

<u>HEPES-Puffer</u>	75 mM	NaCl
	4 mM	CaCl <sub>2</sub>
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	HEPES, pH 7.2
	in Reinst-Wasser	

**Tab. 3.3:** Pufferlösungen mit Osmolaritätsangaben.

Der HEPES-Grundpuffer entsprach hypotonen Bedingungen, durch Zugabe von Saccharose wurden unterschiedliche Osmolaritäten erzeugt.

Puffer-Bedingung	Saccharose-Zugabe [mM]	Osmolarität [mOsmol/kg]
Hypoton	-	167
Isoton	150	328
Hyperton (1)	300	486
Hyperton (2)	450	664
Hyperton (3)	650	921

Die Zellen wurden zunächst mit isoosmolarem Puffer bei Raumtemperatur äquilibriert. Der Komplettaustausch der Lösungen erfolgte im Anschluss, wobei der Flüssigkeitsstand nur soweit erhöht wurde, dass die Zellen gerade bedeckt waren und der Meniskus zum *cantilever* aufgebaut werden konnte.

Zur Berechnung der Elastizitätsmoduli wurden die Daten nach dem Modell von *Sneddon* (1965), basierend auf dem Modell von *Hertz* (1882), ausgewertet. Während das Hertz-Modell die elastische Deformation von zwei elastischen, nicht adhäsiven, homogenen Kugeloberflächen beschreibt, erweitert das Sneddon-Modell die Anwendbarkeit auch für unterschiedliche Geometrien (Radmacher, 2002; Johnson, 1994). Die Kraft ( $F$ ) als eine Funktion der Auslenkung ( $z$ ) eines *cantilevers* mit sphärischer Geometrie gegen eine Oberfläche hängt durch folgenden Zusammenhang vom Elastizitätsmodulus ( $E$ ) ab:

$$F(z) = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{r_{Tip}} \sqrt{z^3} \quad \text{Gl. 3.4}$$

Zur Anpassung an die Messdaten wird der Radius des *cantilevers* ( $r_{Tip}$ ) sowie das *Poisson-Verhältnis* ( $\nu$ ) berücksichtigt. Da dieses als konstant (0.5) angesehen wird (A-Hassan et al., 1998; Almqvist et al., 2004), verbleibt als einzige Variable der Elastizitätsmodulus.

Für handelsübliche *cantilever* wurde der Elastizitätsmodulus ( $E$ ) aus der Kraft ( $F$ ) aus dem Zusammenhang

$$F(z) = \frac{2E}{\pi(1-\nu^2) \tan \alpha} z^2 \quad \text{Gl. 3.5}$$

bestimmt.

Die Experimente zum Einfluss von osmotischem Stress auf adhärenente Zellen in einem konfluenten Zellrasen wurden analog mit dem CLSM durchgeführt, um die Zellhöhenveränderungen optisch zu dokumentieren.

Die Untersuchungen zum mikromechanischen Verhalten chemisch fixierter Zellen wurden ebenfalls an konfluenten MDCK II-Zellschichten durchgeführt. Zur Fixierung der Zellen wurde Paraformaldehyd (4 %ig in PBS<sup>++</sup>, w/v, 20 min) sowie Glutardialdehyd (2.5 %ig in PBS<sup>++</sup>, v/v, 20 min) eingesetzt und die Proben anschließend zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die Messung erfolgte in isoosmolarem Puffer.

### 3.2.5.4 Zellhöhenbestimmung durch extrazelluläre Fluorophore am CLSM

Aufgrund der Zell-Zell- und der Zell-Substrat-Kontakte sind die Möglichkeiten adhärenenter Zellen, in einem Zellmonolayer auf osmolaren Stress zu reagieren, eingeschränkt. Eine Volumenänderung von Zellen in einem Zellverband macht sich darum im Wesentlichen durch eine Änderung der Zellhöhe bemerkbar (Kimmelberg et al., 1992). Um diese Volumen- bzw. Zellhöhenänderungen mit einem optischen Mikroskop verfolgen zu können, sind zwei Wege

denkbar: die Markierung des Zellinneren oder des Extrazellularraumes. In dieser Arbeit wurde der Extrazellularraum durch die Fluoreszenzsonde FITC-Dextran angefärbt, die nicht oder nur in geringem Maße in das Zelllumen eindringt. Zur Ermittlung der Zellhöhen wurden am CLSM zusammenhängende Bildserien von optische xy-Schnitten durchgeführt, wobei sich die Zellen als dunkle Bereiche vor grün fluoreszierendem Hintergrund abhoben. Durch die nachträgliche elektronische Bildverarbeitung der Einzelschnittaufnahmen ist die Rekonstruktion in z-Richtung möglich, und die Zellen können in Seitenansicht gezeigt werden.

Zur experimentellen Durchführung wurden die Zellen in Petrischalen mit einer Wachstumsfläche von 10 cm<sup>2</sup> zur Konfluenz kultiviert. Etwa 24 h vor Beginn des Experimentes wurde der letzte Mediumwechsel vorgenommen. Es wurden die gleichen Pufferlösungen verwendet, die zur Bestimmung der mikromechanischen Eigenschaften eingesetzt wurden (Kapitel 3.2.5.3). Zusätzlich wurde den HEPES-gepufferten Systemen 0.5 mM FITC-Dextran (4 kDa) beigefügt. Die daraus resultierenden Osmolaritätsänderungen waren vernachlässigbar klein. Um zu verhindern, dass aufgrund von Endocytose oder durch einen osmotisch bedingten Einfluss kleine Anteile der Fluoreszenzsonde auch in die Zellen gelangten, wurde jeweils zunächst mit dem jeweiligen Puffergemisch ohne Farbstoff vorinkubiert. Zu Beginn des Experimentes wurde 1 h bei 37 °C mit isotonem Puffer inkubiert, in allen weiteren Schritten glich die Inkubation eher einem sehr langsamen Spülen der Zellschicht (ca. 2 min). Diese Prozedur gewährleistete außerdem den Komplettaustausch des jeweiligen Puffers woraus eine definierte Osmolarität ohne Durchmischungsartefakte resultiert. Im Anschluss an die Inkubation mit isotonem Puffer ohne Sonde schloss sich eine Inkubationszeit für 30 min mit FITC-Dextran an, um eine Diffusion des Farbstoffes durch den Interzellularspalt hindurch bis in den Zwischenraum zwischen Zelle und Substrat zu ermöglichen. Diese Inkubation sowie die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Petrischale wurde auf dem Objektisch mit doppelseitigem Klebeband (Beiersdorf AG, Hamburg) fixiert, um eine Beobachtung der gleichen Stelle auch nach Austausch der Puffer zu ermöglichen. Der Austausch der Pufferlösungen wurde mit Hilfe einer abgewinkelten Pipettenspitze in der Messposition durchgeführt. Der Meniskus zwischen Flüssigkeit und Objektivspitze wurde final durch einen Tropfen direkt am Objektiv wieder aufgebaut. Nach Auswahl eines geeigneten Bereiches vitaler Zellen wurden im Abstand von 10 min zwei zusammenhängende Bildererien von optischen xy-Schnitten in unterschiedlicher z-Position aufgenommen.

### 3.3 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

Die Impedanzspektroskopie (IS) ermöglicht es, Informationen über die passiven elektrischen Eigenschaften von Systemen zu erhalten. Sie dient der Untersuchung von Grenz- und Oberflächenprozessen, z.B. im Zusammenhang mit der Korrosionsforschung oder der Fertigung

von elektrochemischen Sensoren. In der IS legt man an das zu untersuchende System eine Wechselspannung an, die in ihrer Frequenz diskret variiert wird. In Abhängigkeit von dem Erregersignal wird der frequenzabhängige Wechselstromwiderstand (Impedanz) des Systems gemessen (Ende und Mangold, 1993). Zur Auswertung der Daten wird das elektrochemische System durch ein Ersatzschaltbild so gut wie möglich beschrieben, dass aus Reihen- und Parallelschaltungen von Impedanzelementen (z.B. ohmscher Widerstand und Kondensator) besteht. Ist das gewählte Ersatzschaltbild zur Beschreibung des Systems geeignet, werden durch iterative Anpassung der theoretischen Übertragungsfunktion an die experimentellen Daten Parameter erhalten, bei denen die Abweichungen zwischen dem frequenzabhängigen Impedanzverhalten des Ersatzschaltbildes und dem des untersuchten Systems minimiert sind (Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate). Den Impedanzelementen werden dann physikalische Eigenschaften des Systems zugeordnet. Dadurch können die Parameter des Ersatzschaltbildes zur Charakterisierung des elektrochemischen Systems und zur Berechnung systemspezifischer Größen herangezogen werden (Wegener, 1998).

In der IS wird mit sinusförmiger Wechselspannung kleiner Amplitude gearbeitet, was die zerstörungsfreie Messung einer Probe ermöglicht. Die Durchführbarkeit nicht-invasiver Messungen macht eine Anwendung der IS zur Bestimmung der passiven elektrischen Eigenschaften von lebenden Zellen möglich. Die Parameter der Impedanzelemente des Ersatzschaltbildes werden entsprechend zur Charakterisierung der Zellen genutzt.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Elektrodeanordnungen zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung adhärenter Zellschichten genutzt. Für die ECIS- (*Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*) Technik werden die Zellen direkt auf der Elektrode kultiviert, wohingegen bei der TER- (*Transsepithelial Electrical Resistance*) Technik die Zellen auf einem permeablen Substrat kultiviert werden, und die Elektroden in die flüssigkeitsgefüllten Kompartimente ober- und unterhalb der Zellschicht eintauchen. Da beide Methoden der gleiche theoretische Intergrund der IS auszeichnet, werden zunächst die Grundlagen erläutert, ehe die spezifischen Besonderheiten aufgezeigt werden.

### 3.3.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Impedanzspektren können grundsätzlich durch zwei unterschiedliche Verfahren aufgenommen werden, beide untersuchen die Frequenzabhängigkeit der elektrischen Impedanz des Systems. Beim *continuous-wave*-Verfahren wird als Erregersignal ein sinusförmiger Wechselstrom oder eine Wechselspannung kleiner, konstanter Amplitude auf das zu untersuchende System aufgeprägt. Aus dem daraus resultierenden Spannungsabfall bzw. dem resultierenden Strom kann die zugehörige Impedanz (Wechselstromwiderstand) in Abhängigkeit von der verwendeten Frequenz des Erregersignals ermittelt werden. Daneben existiert die *fourier-transform*-Impedanzspektroskopie, die durch die Verwendung transienter Erregersignale

eine gleichzeitige Aufnahme aller Impedanzwerte in einem Frequenzbereich ermöglicht. Die gemessenen Werte müssen dann allerdings im Anschluss mit Hilfe einer Fourier-Transformation bearbeitet werden. In dieser Arbeit kam das *continuous-wave*-Verfahren zum Einsatz und wird daher im Folgenden weiter erläutert.

Ein sinusförmiger Wechselstrom ändert bei gegebener Frequenz seine Polarität zwischen einem positiven und negativen Maximalwert (Amplitude). Die Impedanz beschreibt analog zum Ohmschen Gesetz für Gleichströme den Quotienten aus einer anliegenden Wechselspannung und dem resultierenden Wechselstrom. Auch die Kirchhoffschen Regeln behalten für den Wechselstromkreis Gültigkeit. Betrachtet man die Einzelkomponenten eines ohmschen Widerstandes und eines Kondensators als mögliche Bauteile für einen Stromkreis, so ergibt sich für einen Schaltkreis, der ausschließlich Ohmsche Widerstände enthält, dass die momentane Spannung und der momentane Strom stets in Phase schwingen. Im Gegensatz dazu gilt für einen Stromkreis, der ausschließlich einen Kondensator enthält, dass der Momentanwert des Stromes dem Momentanwert der Spannung vorseilt. Man spricht anschaulich von einer Phasenverschiebung. Auch bei einer Kombination der Bauteile muss mit einer Phasenverschiebung gerechnet werden, weshalb es sinnvoll ist, für eine formale Betrachtung die Spannung ( $U$ ), den Strom ( $I$ ) und die Impedanz ( $Z$ ) als komplexe Zahlen darzustellen.

Für die Wechselspannung  $U(t)$  bei einer Frequenz  $\omega$  gilt:

$$U(t) = U_0 \cdot e^{i\omega t} . \quad \text{Gl. 3.6}$$

$U(t)$  steht für den Momentanwert der Spannung zur Zeit  $t$  bei einer Spannungsamplitude von  $U_0$  und der Kreisfrequenz  $\omega$  ( $i = \sqrt{-1}$ ).

Für den resultierenden Strom folgt:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi)} . \quad \text{Gl. 3.7}$$

Analog zur Gleichung 3.6 stehen die Parameter für den Momentanwert des Stromes ( $I(t)$ ) zur Zeit  $t$ .  $I_0$  ist die Stromamplitude,  $\varphi$  steht für die Phasenverschiebung zwischen Spannung  $U(t)$  und Strom  $I(t)$ .

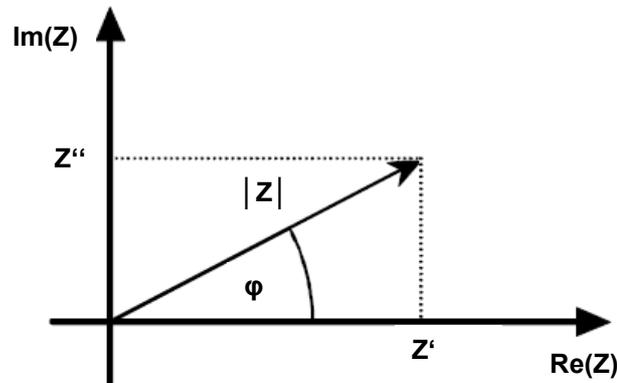
Die Impedanz ist definiert als Quotient aus Spannung und Stromstärke:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi)}} = \frac{U_0}{I_0} \cdot e^{i\varphi} = |Z| \cdot e^{i\varphi} . \quad \text{Gl. 3.8}$$

Die Darstellung im kartesischen Koordinatensystem ermöglicht die Aufteilung der komplexen Impedanz  $Z$  in einen Realteil  $Z'$ , auch Wirkwiderstand genannt, und den als Blindwiderstand bezeichneten Imaginärteil  $Z''$ .

$$Z = Z' + Z'' \quad \text{Gl. 3.9}$$

Der Zusammenhang von  $|Z|$ ,  $\varphi$ ,  $Z'$  und  $Z''$  kann in einer Gaußschen Zahlenebene graphisch dargestellt werden (**Abb. 3.8**).



**Abb. 3.8:** Darstellung der komplexen Impedanz  $|Z|$  in einer Gaußschen Zahlenebene.

Die Länge des Zeigers entspricht dabei dem Betrag der Impedanz  $|Z|$ , während sich die Phasenverschiebung  $\varphi$  in dem Winkel zwischen Zeiger und realer Achse widerspiegelt. Damit ergeben sich für den Betrag der Impedanz  $|Z|$  und die Phasenverschiebung  $\varphi$  folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad \text{Gl. 3.10}$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad \text{Gl. 3.11}$$

$|Z|$  und  $\varphi$  respektive  $Z'$  und  $Z''$  sind jeweils zwei voneinander unabhängige Messgrößen, die in der Impedanzspektroskopie als Funktion der Frequenz ermittelt werden. Dies gilt sowohl für die Gesamtimpedanz eines Systems als auch für die individuellen Beiträge einzelner auflösbarer Komponenten.

Zur Auswertung eines Impedanzspektrums wird ein Ersatzschaltbild erstellt, das mit Hilfe von klassischen elektrischen Bauteilen die elektrischen Eigenschaften des biologischen Systems zu beschreiben versucht. Das Ersatzschaltbild muss dabei die gleiche Frequenzabhängigkeit der Impedanz aufweisen wie das untersuchte System. Mittels einer Übertragungsfunktion und deren Anpassung an die gemessenen Impedanzspektren werden die Parameter des zu untersuchenden Systems quantifiziert.

Die Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten elektrischen Bauteile für Ersatzschaltbilder zeigt Tabelle 3.4. Es handelt sich hierbei vorwiegend um ideale, aus der Elektrotechnik bekannte Elemente. Eine solche Beschreibung von realen elektrochemischen Systemen mit ohmschen Widerständen und Kondensatoren ist unproblematisch, solange die Ionen als Ladungsträger in elektrochemischen Systemen ein ähnliches Impedanzverhalten

wie die Elektronen in den elektrischen Bauteilen zeigen (Ende und Mangold, 1993). Allerdings ist in dem hier betrachteten System mit Abweichungen zwischen gemessenem Spektrum und Übertragungsfunktion zu rechnen. In solchen Fällen wird häufig auf empirische Bauteile zurückgegriffen, die kein technisches Pendant besitzen. Beispiel für ein solches Element ist das so genannte Konstante Phasenelement (*Constant-Phase-Element*, CPE), das die Impedanz an der Grenzfläche zwischen der polarisierbaren Elektrode und dem Elektrolyten beschreibt. Dort kommt es durch lokale Unregelmäßigkeiten in der Topographie sowie der chemischen Zusammensetzung des Elektrolyten zu einer heterogenen Verteilung der elektrischen Eigenschaften. Beim CPE handelt es sich um ein empirisches Impedanzelement, das eine frequenzunabhängige (konstante) Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom bewirkt, die in Abhängigkeit vom Wert des Parameters  $n$  zwischen  $-\pi/2$  und 0 liegt. Für den Grenzfall  $n = 0$  verhält sich das CPE wie ein ohmscher Widerstand, bei  $n = 1$  entspricht das CPE einem idealen Kondensator. Für die Zwischenwerte besitzt das Konstante Phasenelement sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften. Neben  $n$  wird das Bauteil über den Parameter  $A$  charakterisiert.  $n$  kann unabhängig von dem Wert für  $A$  interpretiert werden, ein direkter Zusammenhang zwischen der Oberflächentopographie und  $n$  gilt als wahrscheinlich (McAdams, 1995; Kurtyrka und de Levie, 1992). Ein Vergleich des Parameters  $A$  ist nur sinnvoll, wenn  $n$  für alle Messungen gleich ist.

**Tab. 3.4:** Impedanz und Phasenverschiebung verschiedener elektrischer Bauteile.

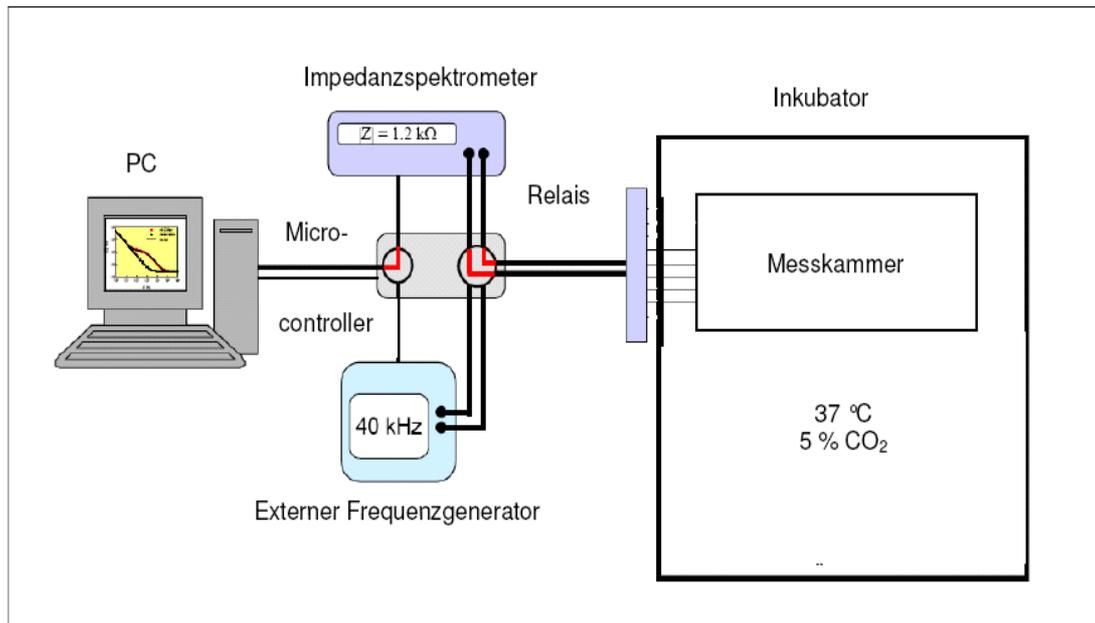
Bezeichnung	Parameter	Impedanz	Phasenverschiebung
<b>Ohmscher Widerstand</b>	$R$	$R$	$0$
<b>Kondensator</b>	$C$	$\frac{1}{i\omega C}$	$-\frac{\pi}{2}$
<b>Konstantes Phasenelement CPE</b>	$A, n$	$\frac{1}{(i\omega)^n A}$	$-n \frac{\pi}{2}, [0, 1] = n$

Die Berechnung der Gesamtimpedanz eines Netzwerkes verschiedener Bauteile erfolgt durch die Verknüpfung der Impedanzbeiträge der jeweiligen Bauteile in Abhängigkeit von ihrer Verschaltung nach den Kirchhoffschen Gesetzen. Daraus folgt für 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.

### 3.3.2 Experimentelle Durchführung von Impedanzmessungen

Alle Messungen wurden analog zu den üblichen Zellkulturbedingungen im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Anwesenheit von 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

Unabhängig vom verwendeten Messaufbau und Messsystem (TER oder ECIS) wurde soweit wie möglich unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Der verwendete Messaufbau ist in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt, die Messkammern wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst und sind dort entsprechend beschrieben.



**Abb. 3.9:** Schematische Darstellung des Messaufbaus. Dieser Aufbau ist grundsätzlich für alle ECIS- und TER-Messungen genutzt worden. Ein Relais ermöglicht ein Umschalten zwischen den einzelnen Elektroden. Die Bestimmung der Impedanz wird von einem Impedanzanalysator (Solatron SI-1260) durchgeführt. Die Steuerung sowie die Datenaufzeichnung erfolgten über einen handelsüblichen PC und über eine *Labview*-basierte Software. Der Messaufbau mit den Zellen befand sich unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und war über ein Relais mit dem Microcontroller verbunden.

Um eine automatisierte Messung mehrerer Elektroden bzw. unterschiedlicher Messanordnungen gewährleisten zu können, wurde ein Relais verwendet, das mit dem Impedanzanalysator (SI 1260, Solatron Instruments) verbunden war und die sequentielle Ansteuerung der einzelnen Elektroden regelte. Relais-Modul und Impedanz-Analysator wurden von einem handelsüblichen PC gesteuert, mit dem auch die Erfassung und Speicherung der Daten durchgeführt wurde. Zur Steuerung wurde eine *Labview*-basierte Software verwendet, die eine variable Vorgabe der Messparameter sowie einen automatisierten Ablauf von Messabfolgen und zeitabhängigen Messreihen ermöglichte.

Nach Einbau der Substrate in die entsprechenden Messkammern und –apparaturen wurden Impedanzspektren in einem festgelegten Frequenzbereich mit je 10 Messpunkten pro Dekade aufgenommen. Das Messfenster wurde den Substratgrößen angepasst. Für die nanoporösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten wurde grundsätzlich ein Frequenzbereich von  $0.1 - 10^6 \text{ Hz}$  gewählt, für die porösen Elektroden basierend auf Filtermembranen wurde in Abhängigkeit vom Experiment das Frequenzfenster zum Teil verkleinert auf  $1 - 10^6 \text{ Hz}$ . Im Falle von zeitabhängigen Messreihen wurden Einzelspektren im Abstand von

10 min (zuzüglich der Messzeit für parallele Elektroden/Messmodi) aufgenommen. Dabei wurde mit einer nicht-invasiven Wechselspannungsamplitude von 10 mV gearbeitet.

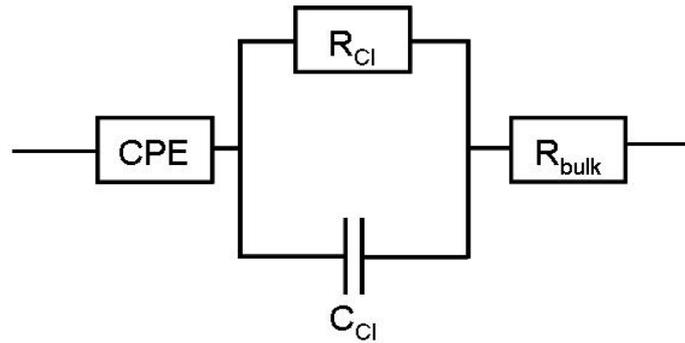
### 3.3.3 Impedanzspektroskopische Messungen im TER-Modus

In dieser Arbeit wird die im Folgenden genauer erläuterte Messanordnung TER-Messmodus oder kurz TER-Modus genannt. Dies soll eine eindeutige Abgrenzung zur zweiten impedanzspektroskopischen Methode (ECIS-Modus) erleichtern. Entsprechend werden eindeutige Parameter eingeführt. So entspricht  $R_{Cl}$  dem parazellulären Widerstand im TER-Modus (in der Literatur häufig als TER bezeichnet).

Die Impedanzspektroskopie ermöglicht es, aufgrund des frequenzabhängigen Impedanzsignals auf bestimmte Eigenschaften von biologischen Systemen rückzuschließen. Weit verbreitet ist die Messung des Transepithelialen Widerstandes (TER, *Transepithelial Electrical Resistance*) auf permeablen, filterähnlichen Substraten.  $R_{Cl}$  ist ein Maß für die Permeabilität einer Zellschicht für kleine Ionen (Schneeberger und Lynch, 1992). Die Permeabilität wiederum wird zu einem vom Zelltyp abhängigen Anteil durch die Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) bestimmt. Somit ermöglicht die Impedanzmessung eine direkte Korrelation der elektrischen Eigenschaften einer Zellschicht mit ihren Barriere-Eigenschaften gegenüber extrazellulären Substanzen. Als zweiter zellschichtspezifischer Parameter wird die Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  bestimmt, die Rückschlüsse auf die Zellmembran erlaubt. In dieser Arbeit wurde die Messung im TER-Modus sowohl an Zellen auf handelsüblichen Filtermembranen als auch auf goldbelegten porösen Membranen durchgeführt.

### Auswertung und Ersatzschaltbild

Wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, wird ein Ersatzschaltbild konstruiert, das das gleiche frequenzabhängige Impedanzverhalten wie das biologische System zeigt. Elektrisch wirksame Komponenten werden durch ideale oder empirische elektrische Bauteile ersetzt. Das zur Auswertung der Messdaten genutzte Ersatzschaltbild ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Darin entspricht der ohmsche Widerstand  $R_{bulk}$  dem Elektrolytwiderstand des Mediums, während das konstante Phasenelement (CPE) die Impedanz der Grenzfläche zwischen den zur Messung verwendeten Elektroden und dem Kulturmedium beschreibt. Der Transepitheliale Widerstand wird durch  $R_{Cl}$  repräsentiert, während der Kondensator  $C_{Cl}$  die Gesamtkapazität der Plasmamembranen widerspiegelt.



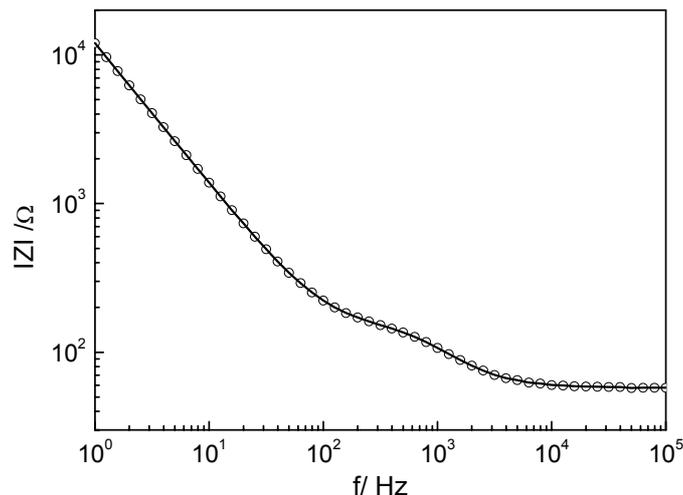
**Abb. 3.10:** Ersatzschaltbild zur Auswertung der Impedanzspektren von Zellschichten auf permeablen Substraten, CPE: konstantes Phasenelement,  $R_{Cl}$ : Ohmscher Widerstand der Zellschicht,  $C_{Cl}$ : Kapazität der Plasmamembranen,  $R_{bulk}$ : Elektrolytwiderstand des Mediums.

Durch rechnerische Anpassung der Parameter der Übertragungsfunktion (Gl. 3.12) an die experimentellen Daten lassen sich die numerischen Werte der einzelnen Parameter quantifizieren. Dies geschieht iterativ über einen *nonlinear least square fit* (Wegener, 1998).

$$|Z|(\omega) = \sqrt{\left( R_{bulk} + \frac{R_{Cl}}{1 + (\omega C_{Cl} R_{Cl})^2} + \frac{\cos(n\pi/2)}{A\omega^n} \right)^2 + \left( \frac{\omega C_{Cl} R_{Cl}^2}{1 + (\omega C_{Cl} R_{Cl})^2} + \frac{\sin(n\pi/2)}{A\omega^n} \right)^2} \quad \text{Gl. 3.12}$$

Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch ein gemessenes Impedanzspektrum ( $\circ$ ) eines MDCK II-Zellmonolayers auf einem permeablen Kultursubstrat.

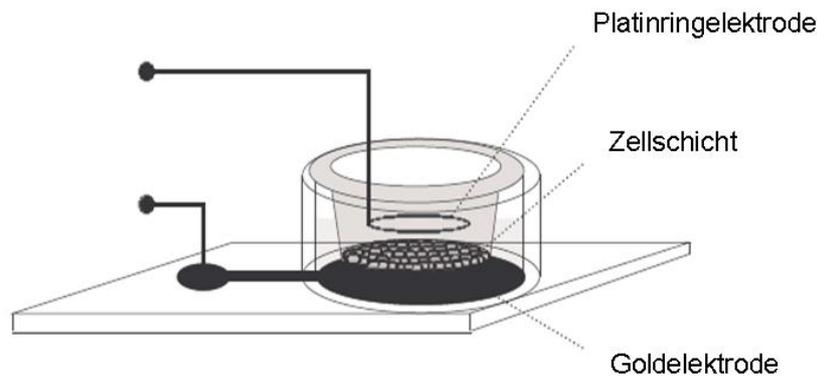
Das Ergebnis der Kurvenanpassung ist durch die durchgezogene Linie gezeigt. Der ermittelte Wert für  $R_{Cl}$  gibt Auskunft darüber, wie dicht die Zell-Zell-Verbindungen des Monolayers ausgeprägt sind.



**Abb. 3.11:** Impedanzspektrum eines konfluenten MDCK II-Monolayers auf einem permeablen Kultursubstrate (*Transwell Clear*,  $A = 1.12 \text{ cm}^2$ );  $\circ$  gemessene Werte, - Werte der Übertragungsfunktion mit  $R_{Cl} = 86.4 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl} = 2.11 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ ,  $A(\text{CPE}) = 13.14 \text{ } \mu\text{F/cm}^2\text{s}^{n-1}$ ,  $n(\text{CPE}) = 0.94$ ,  $R_{bulk} = 58.4 \text{ } \Omega$ .

### Experimentelle Durchführung

Grundlegend für eine verlässliche Messung im TER-Modus ist die Homogenität des Feldes, das durch die Elektrodenanordnung gewährleistet wird. Als basolaterale Elektrode diente ein herkömmlicher Glasobjektträger, der vollständig mit Gold bedampft war. Auf diesen Träger wurde ein Glasring mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Höhe von 20 mm mit einem nicht-zelltoxischen Silikonkleber (Henkel, Düsseldorf) aufgeklebt. Der Glasring fungierte sowohl als basolaterales Flüssigkeitskompartiment als auch als mechanische Fixierung des Filtereinsatzes ( $\varnothing = 12$  mm). Die permeable Membran des Filters dient als Wachstumsfläche für adhärente Zellen. Die apikale Gegenelektrode bestand aus einem ringförmig gebogenen Pt-Draht, der zur Vergrößerung der Oberfläche bzw. der Kapazität mit galvanisch abgeschiedenem, amorphem Platin (Platin-Schwarz) überzogen war. Der Durchmesser der Ringelektrode betrug etwa 8 mm, die Stärke des Drahtes etwa 1 mm. Dadurch wurde die Stromdichte über der Untersuchungsfläche konstant gehalten.



**Abb. 3.12:** Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Bestimmung des transepithelialen Widerstandes ( $R_C$ ) (nach Wegener et al., 1998). Durch die Goldelektrode parallel unterhalb der Zellschicht und die Platinringelektrode darüber wird ein gleichmäßiges elektrisches Feld über der Zellschicht erzeugt.

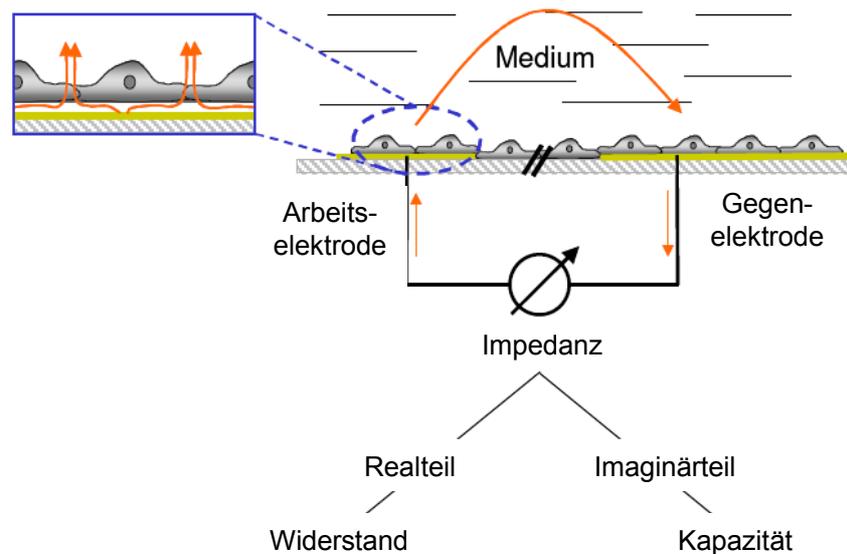
In den in Abbildung 3.12 gezeigten Messaufbau wurden handelsübliche Filter (Corning, Acton, USA) eingehängt, wobei sowohl Membranen mit einer Porenanzahl von  $1 \times 10^8$  als auch  $4 \times 10^6$  Poren/cm<sup>2</sup> bei gleichen Porendurchmessern (0.4  $\mu$ m) eingesetzt wurden. Zur Untersuchung des Einflusses einer Goldschicht (100 nm) parallel zur Membran und Zellschicht wurde mit den Substraten vollkommen analog verfahren. Durch den unsterilen Prozess zur Aufbringung der Goldschicht wurde vor der Zellaussaat eine Sterilisation für 20 s im Argonplasma durchgeführt. Grundsätzlich erfolgte keine Beschichtung der Membranen vor Aussaat, die Zellkulturarbeiten wurden routinemäßig durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor Messbeginn mit einer Dichte von 500.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Zunächst wurden die Filtereinsätze in ein Kunststoffarray eingehängt. Direkt vor der Messung erfolgte der Transfer in den Messaufbau, wobei auch das konditionierte Medium in das basolaterale Kompartiment überführt wurde. Die Messung fand in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C in einem herkömmlichen Brutschrank mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> statt. Die Impedanzmessung erfolgte mit

einem *Impedance Gain/Phase Analyzer* (Solatron Instruments, GB) bei 10 mV, einem Bereich der deutlich unterhalb natürlicher Membranpotentiale liegt, in einem Frequenzfenster von  $1 - 10^6$  Hertz. Die Frequenz wurde diskret variiert.

### 3.3.4 Impedanzspektroskopische Messungen im ECIS-Modus

Die ECIS-Technik (*Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*) erlaubt es, die passiven elektrischen Eigenschaften von adhärennten Zellschichten auf Metallfilmelektroden zu charakterisieren. In dieser Arbeit wird zur klaren Unterscheidung von anderen Messmodi von Messungen im ECIS-Modus gesprochen. Die Parameter des Ersatzschaltbildes können zur Charakterisierung des elektrischen Systems und zur Berechnung systemspezifischer Größen herangezogen werden, und ermöglichen so den Rückschluss auf spezifische morphologische Merkmale der Zellen. Die auf diese Weise durchgeführte objektive Quantifizierung kann mit hoher zeitlicher Auflösung nicht-invasiv durchgeführt werden, so dass die Methode zur Beobachtung und Dokumentation zellulärer Prozesse geeignet ist. 1984 wurde das Prinzip von *Giaever* und *Keese* zum ersten Mal beschrieben und danach kontinuierlich weiterentwickelt. Die zu untersuchenden Zellen werden direkt auf einer Goldelektrode kultiviert, die einerseits als Kultursubstrat dient, gleichzeitig aber auch als Elektrode für die elektrochemische Messung. In der dadurch erreichten unmittelbaren Nähe zwischen den Zellen und der Elektrode liegt der Grund für die Sensitivität des Verfahrens. Dieser Punkt stellt zu dem unter Kapitel 3.3.3 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung des transepithelialen Widerstandes im TER-Modus die entscheidende Veränderung dar.

Um einen geschlossenen Stromkreis zu gewährleisten, sind auch hier zwei Elektroden nötig, die über das Kulturmedium leitend miteinander verbunden sind. Man unterscheidet zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode (**Abb. 3.13**, Wegener, 2003). Wichtiger Bestandteil des Messkonzeptes ist, dass die Impedanz der Gegenelektrode deutlich kleiner ist (bzw. vernachlässigbar klein) als die der Arbeitselektrode, um die Impedanzantwort des Systems ausschließlich auf die Arbeitselektrode bzw. die Zellen beziehen zu können.



**Abb. 3.13:** Schematische Darstellung des ECIS-Prinzips, Arbeits- und Gegenelektrode sind zur Messung der Impedanz einer Zellschicht über das Medium leitend verbunden (nach Wegener, 2003).

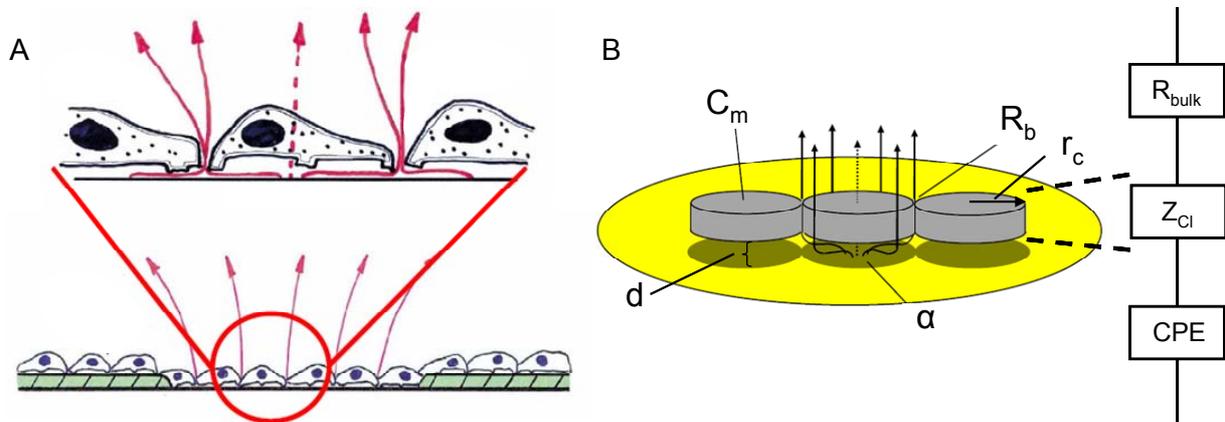
Die Zellen verhalten sich auf der Goldelektrode näherungsweise wie Isolatorpartikel, die den Strom zwingen, um die Zellkörper herumzulaufen. Dadurch erhöht sich der elektrische Wechselstromwiderstand (Impedanz) der Elektrode im Vergleich zu einer nicht mit Zellen bewachsenen Elektrode. Darüber hinaus lässt sich durch die Messung der frequenzabhängigen Impedanz zwischen Beiträgen des Zell-Substrat-Kontaktes und solchen aus dem Zell-Zell-Kontakt unterscheiden. Grund hierfür ist, dass der Strom bei unterschiedlichen Frequenzen auf unterschiedlichen Wegen durch den Zellschicht tritt. Wiederholte Messungen bei gleichem Frequenzfenster bieten dadurch die Möglichkeit, morphologische Änderungen der Zellen als Funktion der Zeit zu detektieren. Die eingesetzte Wechselspannung ist mit 10 mV für die Zellen nicht-invasiv (in Analogie zu den Messungen im TER-Modus).

### 3.3.4.1 Auswertung und Ersatzschaltbild der Impedanzspektren zellbedeckter Metallelektroden

Die zur Impedanzmessung verwendete Elektrode kann durch zwei Impedanzelemente beschrieben werden. Aus der Elektrolytlösung resultiert ein Widerstand ( $R_{bulk}$ ) der in Reihe mit einem konstanten Phasenelement geschaltet ist. Das empirische Impedanzelement CPE repräsentiert die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt. Die Zellen verursachen aufgrund ihres isolierenden Charakters eine Erhöhung der Gesamtimpedanz des Systems gegenüber einer zellfreien Elektrode. Der durch die Zellen zusätzliche Beitrag ( $Z_C$ ) kann in spektral voneinander getrennte Beiträge unterteilt werden (**Abb. 3.14 A**). Bei niedrigen und mittleren Frequenzen fließt der Hauptteil des Stromes parazellulär, indem zunächst der Spalt zwischen Elektrodenoberfläche und Zellunterseite passiert wird. Da dieser Spalt häufig (und speziell bei

den in dieser Arbeit verwendeten MDCK II-Zellen) weniger als 100 nm misst, liefert er einen der Hauptanteile zur gemessenen Gesamtimpedanz. Nach dem Modell von Giaever und Keese (1993) wird der Beitrag durch die Größe  $\alpha$  quantifiziert (**Abb. 3.14 B**). Ähnliche Dimensionen wie für den Zell-Substrat-Abstand gelten auch für die Zell-Zell-Abstände. Daher entsteht in den Interzellularräumen eine weitere Hauptkomponente der Gesamtimpedanz, die im Modell durch den Parameter  $R_b$  repräsentiert wird. Für barrierebildende Zellschichten entsteht der Hauptanteil von  $R_b$  durch die *tight junctions*. Diese nicht durchlässigen Zell-Zell-Verbindungen stellen dann quasi den Flaschenhals für den Weg des Stromes im Zell-Zell-Kontakt dar.

Bei hohen Frequenzen fließt ein kleiner Anteil des Stromes kapazitiv durch die Zellen. Dieser transzelluläre Impedanzanteil wird dominiert durch die spezifische Kapazität der Plasmamembran ( $C_m$ ). Der Beitrag von  $C_m$  wird durch die dielektrischen Eigenschaften und der Morphologie der Membran beeinflusst (Wegener, 2003) und gibt daher zum Beispiel Auskunft über die Größe der Zelloberfläche unter Berücksichtigung von Membranausstülpungen und -einfaltungen. Das auf den Parametern  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  bestehende Modell ist ausreichend zur qualitativen und quantitativen Auswertung der gemessenen Impedanzspektren. Im Abbildungsteil **B** ist zusätzlich das Ersatzschaltbild abgebildet, das die Verknüpfung der Impedanzelemente wiedergibt.



**Abb. 3.14: A:** Schematische Darstellung des Stromflusses auf einer zellbedeckten Arbeitselektrode. Die durchgezogenen Pfeile zeigen den Strom bei niedrigen und mittleren Frequenzen, der parazellulär durchtritt. Der gestrichelte Teil repräsentiert den transzellulären Strom, der bei hohen Frequenzen kapazitiv durch die Zelle fließt (<http://www.biophysics.com>).

**B:** Modell und Ersatzschaltbild einer zellbewachsenen Elektrode zur näherungsweisen Veranschaulichung (Giaever und Keese, 1993).  $R_{bulk}$  symbolisiert den ohmschen Widerstand der Elektrolytlösung. Die Zellen werden als kreisrunde Scheiben mit dem Radius  $r_c$  aufgefasst, die sich im Abstand  $d$  vom Substrat befinden.  $Z_{zs}$  setzt sich aus  $R_b$ , dem ohmschen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte,  $\alpha$ , der frequenzabhängigen Impedanz der Zell-Substrat-Kontakte und  $C_m$ , der Kapazität der Plasmamembran zusammen. CPE steht für die nicht-ideale Impedanz an der Grenzfläche der Elektrode zum Elektrolyt.

In dem bereits oben erwähnten physikalischen Modell werden die Zellen als Zylinder mit dem Radius  $r_c$  aufgefasst, die den Abstand  $d$  zum Substrat einhalten (**Abb. 3.14 B**). Die in dieser Arbeit für elektrische Messungen verwendeten Zellen erfüllen die Annahme einer runden Zellgrundfläche ausreichend.

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

$$\frac{1}{Z_{total}} = \frac{1}{Z_n} \left( \left[ \frac{Z_n}{(Z_n + Z_m)} \right] + \left[ \frac{Z_n}{(Z_n + Z_m)} \right] \times \left[ \frac{1}{2} \cdot \gamma r_c \left( \frac{I_0(\gamma r_c)}{I_1(\gamma r_c)} \right) + R_b \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right) \right]^{-1} \right) \quad \text{GI. 3.13}$$

mit 
$$\gamma = \frac{\alpha}{r_c} \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}}. \quad \text{GI. 3.14}$$

$Z_n$  ist die Impedanz der zellfreien Elektrode,  $Z_m$  die Summe der Impedanzbeiträge der apikalen und basolateralen Membranen:

$$Z_m = \frac{2}{i\omega C_m} \quad \text{GI. 3.15}$$

mit: 
$$Z_m = \frac{1}{i\omega C_{Cl}} \quad \text{GI. 3.16}$$

und 
$$C_m = 2C_{Cl}. \quad \text{GI. 3.17}$$

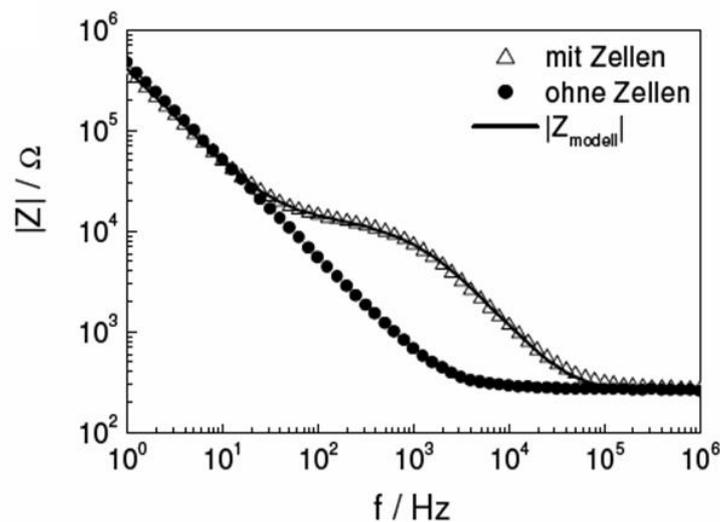
$C_m$  wird als die spezifische Membrankapazität bezeichnet während  $C_{Cl}$  die spezifische Zellschichtkapazität (vgl. TER-Modus) repräsentiert. Experimentell bestimmt werden kann ausschließlich  $C_{Cl}$  also die Kapazität der Gesamtmembranen (GI. 3.16). Für das ECIS-Modell wird allerdings nachträglich durch die Kombination von Gleichung 3.16 und 3.17 die Kapazität von nur einer Membrandomände angegeben. Dabei wird vernachlässigt, dass für viele Zellen die Annahme gleicher Flächenanteile respektive Kapazitätsanteile für die apikale und basolaterale Membran nicht zutreffend ist. Dieser Schritt wird in dieser Arbeit konsequent **rückgängig** gemacht. Daraus folgt, dass in dieser Arbeit **ausschließlich** die Werte der **Zellschichtkapazität**  $C_{Cl}$  angegeben werden. Das gilt auch für die zum Vergleich herangezogenen Literaturdaten, die bei Bedarf durch den in Gleichung 3.17 dargestellten Zusammenhang umgerechnet werden. Dieser Schritt gewährleistet, dass alle Angaben zur Gesamtmembrankapazität unabhängig davon durch welche Messmethode sie bestimmt wurden (ECIS- oder TER-Modus) miteinander verglichen werden können, weil beide Modelle für diesen Parameter die gleichen Grundannahmen treffen. Bei  $I_0$  und  $I_1$  handelt es sich um modifizierte Besselfunktionen erster Art der Ordnung 0 und 1. Für  $\alpha$  gilt:

$$\alpha = r_c \cdot \left( \frac{\rho_{sub}}{d} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad \text{GI. 3.18}$$

wobei  $r_c$  den Radius der Zelle,  $\rho_{sub}$  den spezifischen Elektrolytwiderstand im Zell-Substrat-Spalt (Adhäsionskontakt) und  $d$  den Abstand zwischen Zelle und Substrat berücksichtigt.

Neben einer Bestimmung der zellspezifischen Parameter werden die gemessenen Impedanzspektren darüber hinaus genutzt, um die verwendete Arbeitselektrode zu charakterisieren und die elektrodenspezifischen Parameter  $A$  und  $n$  zu bestimmen. Diese Parameter charakterisieren das empirische Impedanzelement CPE, das die Eigenschaften der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt repräsentiert.

Die iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die gemessenen Impedanzspektren zur Bestimmung der Parameter  $\alpha$ ,  $R_b$  und  $C_m$  zw.  $C_{Cl}$  sowie des CPEs erfolgte nach einem Verfahren von *Wegener et al.* (2000). Abbildung 3.15 zeigt exemplarisch ein typisches Impedanzspektrum einer zellbewachsenen ( $\Delta$ ) und einer zellfreien ( $\bullet$ ) Goldelektrode, wie es bei einer typischen Messung erhalten wird. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Graph der Übertragungsfunktion.



**Abb. 3.15:** Typisches Impedanzspektrum einer Goldelektrode ohne Zellen ( $\bullet$ ) und mit Zellen ( $\Delta$ ). Die durchgezogene Linie repräsentiert die angepasste Übertragungsfunktion des beschriebenen Modells.

### 3.3.4.2 Messung von biologischer *Micromotion*

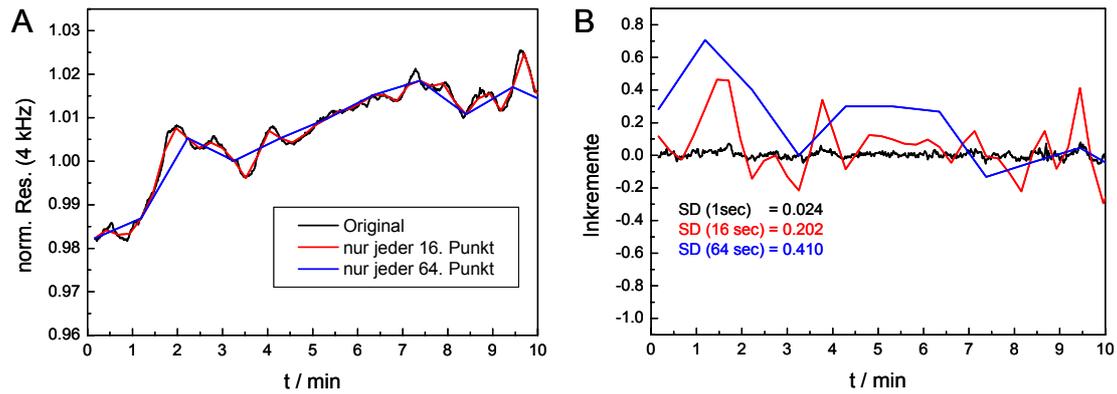
Lebende adhärenente Zellen in einer konfluenten Zellschicht sitzen nicht völlig starr auf ihrem Substrat, sondern führen metabolisch getriebene Bewegungen aus, die sich in ECIS-Experimenten als Fluktuation der elektrischen Impedanz bei einer konstanten Frequenz registrieren lassen (Giaever und Keese, 1991). Dieses biologische Rauschen ist charakteristisch für die Vitalität lebender Zellen, wobei entscheidend ist, dass ausschließlich biologisches Rauschen zur Auswertung herangezogen wird, das heißt eindeutig ein Ausschluss von technischem Rauschen gewährleistet ist. *Lo et al.* (1993) konnten zwischen der metabolischen Aktivität der Zellen und dem biologischen Rauschen eine Korrelation feststellen.

## Auswertung

Nach *Lo et al.* (1993) gibt es drei grundlegend unterschiedliche Möglichkeiten zur Auswertung von fluktuierenden Zeitserien, für die die *Micromotion*-Daten ein Beispiel darstellen. Bei der ersten Methode wird der Datensatz zunächst in gleich große Intervalle aufgeteilt, die Varianz der Messgröße für die einzelnen Beobachtungsintervalle berechnet und über alle Intervalle gemittelt. Die Auftragung der berechneten, mittleren Varianz gegen die Größe der Beobachtungsintervalle liefert eine aussagekräftige Charakterisierung der beobachteten Fluktuationen. Bei der zweiten Methode wird die Standardabweichung der Inkremente der Messgröße für verschiedene Abtastraten über den ganzen Datensatz berechnet und gegen die jeweilige Abtastrate aufgetragen. Die dritte Methode nutzt eine Fourier-Transformation zur Analyse der Daten.

Zur Analyse der Daten dieser Arbeit wurde die Methode der Varianz-Analyse der Inkremente genutzt. Die Datenverarbeitung kann am besten durch die Darstellung der Einzelschritte veranschaulicht werden. In **Abbildung 3.16 A** ist parallel dazu für einen exemplarischen Datensatz die Entwicklung des normierten Widerstandes abgebildet.

1. Die einzelnen Messwerte (der Impedanz-, Widerstands- oder Kapazitätsspektren) werden zunächst addiert und durch die Gesamtanzahl dividiert. Im Anschluss daran wird jeder Messpunkt durch diesen zeitlichen Mittelwert dividiert und dadurch normiert. Es resultieren dimensionslose Werte.
2. Aus dem Datensatz mit  $n$  Werten werden die Inkremente ( $n-1$ ) berechnet, das heißt es wird die jeweilige Differenz zum nächsten Messpunkt bestimmt. Von diesen Werten wird der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet, es resultiert die *Standardabweichung der Inkremente* (SDI). Starke Fluktuationen bewirken auf diese Weise große SDI.
3. Die zeitliche Auflösung kann in diesem Punkt nachträglich herabgesetzt werden, wodurch nur noch jeder vierte, 16. bzw. 64. Datenpunkte berücksichtigt wird (**Abb. 3.16 B**).
4. In Abhängigkeit von der Zellsorte bzw. von der zeitlichen Fluktuation, zeichnet sich eine dieser zeitlichen Auflösungen als am aussagekräftigsten heraus, und wird daraufhin zur Auswertung oder Gegenüberstellung bei unterschiedlichen Bedingungen genutzt.



**Abb. 3.16:** Inkrementanalyse von Zellmotilitäten (*Micromotion*). **A:** Abgebildet ist der normierte Widerstand bei 4 kHz von MDCK II-Zellen, zur besseren Übersicht wurde hier ein Datensatz von nur 10 min abgebildet. **B:** Zeitlicher Verlauf der Inkremente.

Durch dieses Verfahren wird gewährleistet, dass Trends, die über dem Spektrum liegen und z.B. durch thermischen Drift verursacht werden, die Aussage über das biologische Signal so gering wie möglich beeinflussen.

### 3.3.4.3 ECIS-Untersuchungen auf planaren und porösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten

Die nanoporösen Silizium-Substrate für die Messungen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gösele vom Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik in Halle im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Für die vergleichenden Messungen auf planaren Substraten wurden Deckgläschen verwendet.

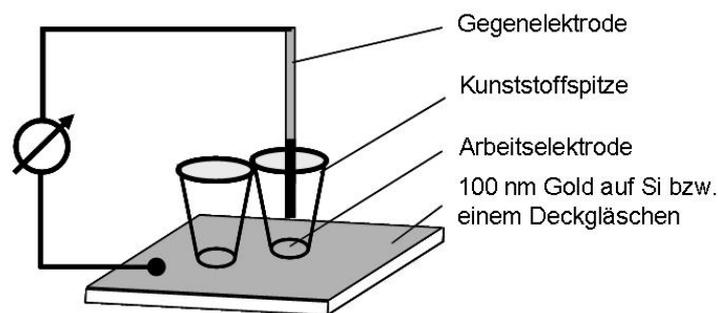
Zum Aufbringen der Goldschicht auf die Substrate wurde die Sputteranlage BalTec SCD 050 (Balzers, Lichtenstein) verwendet. Während des Sputterprozesses wurde der Rezipient bis auf einen Restdruck von 0.05 – 0.1 mbar evakuiert. Die Substrate wurden mit einer 100 nm dicken Goldschicht belegt, die dazu nötige Schichtdickenkontrolle erfolgte durch einen Schwingquarz im Bereich der Substrate, dessen Resonanzfrequenz während des Sputterprozesses kontinuierlich registriert wurde. Aus der Änderung der Resonanzfrequenz konnte die Schichtdicke des Goldfilms während der Messung bestimmt werden. Das Erreichen der gewünschten Schichtdicke führte zu einem automatischen Abschalten der Anlage.

Um den Beitrag zur Gesamtimpedanz vernachlässigen zu können, wurde eine ausreichend große Gegenelektrode (1000-fach größer als die Arbeitselektrode) eingesetzt. Alle Substrate wurden unmittelbar vor Aussaat der Zellen für 1 min im Argonplasma sterilisiert. Neben diesem Effekt wird eine effektive Reinigung der Goldoberfläche erreicht, die durch Lagerung an der Luft sehr schnell mit Adsorbaten belegt wird.

### Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1)

Um eine möglichst kleine und definierte Elektrodenfläche abzugrenzen und die Substrate gleichzeitig zur Anzucht der Zellen unter herkömmlichen Kulturbedingungen verwenden zu können, wurden Kunststoffumrandungen aufgeklebt. Dazu wurden die Spitzen von 5 ml Kunststoffpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg) auf ca. 10 mm gekürzt, wobei zunächst die Spitze gekappt wurde, um das Loch auf ca. 1 mm<sup>2</sup> zu erweitern. Anschließend wurden diese Spitzen an der engeren Seite dünn mit Silikon-Kleber (Henkel, Düsseldorf) bestrichen und auf die Substrate aufgesetzt. Im Innern der Spitze resultierte so eine abgeschlossene Elektrodenfläche von ca. 0.01 cm<sup>2</sup> (**Abb. 3.17**). Die genaue Fläche der Elektroden wurde jeweils im Anschluss an die elektrischen Messungen mit Hilfe eines mikroskopischen Reflexionsbildes im TRITC-Kanal an der Goldoberfläche der Elektroden am CLSM bestimmt.

Es wurden bis zu fünf Spitzen auf einem Si-Substrat befestigt. Obwohl die Kunststoffspitzen auch untereinander verklebt wurden, war dieser Aufbau nur für Einzelmessungen zu verwenden.



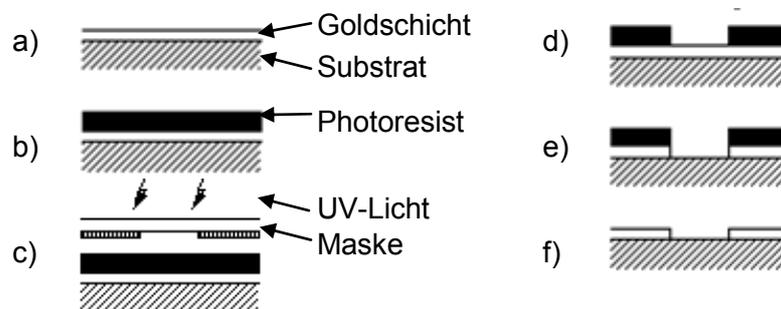
**Abb. 3.17:** Schematischer Aufbau für ECIS-Messungen auf porösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten des Typs 1 (Porendurchmesser 900 nm) bzw. einem Deckgläschen. Die Kunststoffspitze begrenzt die Elektrodenfläche, von oben taucht als Gegenelektrode ein platinierter Platin-Draht in den Elektrolyten.

Der Chip wurde zunächst zur Zellaussaat in einem Kunststoff-Zellkulturgefäß (*6-Well*, Corning, Acton, USA) gelagert. Vor Aussaat wurde eine Fibronectin-Beschichtung analog zu dem unter Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen Standardprotokoll durchgeführt, die Aussaat erfolgte mit 500.000 Zellen/cm<sup>2</sup>, wobei eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> angenommen wurde. Um ein zu starkes Verdunsten von Kulturmedium aus den Kunststoffspitzen zu verhindern, wurde in mindestens zwei der Vertiefungen des *6-Well*s destilliertes Wasser gefüllt. 24 h nach Aussaat wurde zur Messung der Chip entnommen, über eine Klammer kontaktiert und die Gegenelektrode in das Kulturmedium eingetaucht. Es wurden jeweils zwei Spektren pro Elektrode aufgenommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Triton X-100-Zugabe (0.2 % (v/v), in PBS<sup>++</sup>, 10 min, 37 °C) permeabilisiert und so Spektren der zellfreien Elektroden in Kontakt mit Kulturmedium aufgenommen.

### Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3 $\mu\text{m}$ und $\text{SiO}_2$ -Oberfläche (Typ 2)

Die Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3  $\mu\text{m}$  wurden durch einen oxidativen Prozess mit einer  $\text{SiO}_2$ -Schicht von etwa 30 nm an der Oberfläche (d.h. auch an den Porenwänden) geliefert. Dadurch konnte eine photolithographische Methode dazu verwendet werden, um eine kleine definierte Elektrodenfläche herzustellen. Dies hatte zum Vorteil, dass die Substrate nicht durch das Auftragen eines Klebers, der u.U. nur unvollständig entfernt werden kann, dauerhaft geschädigt wurden.

Die mit 100 nm Gold belegten Chips wurden nach einer Minute im Argonplasma gleichmäßig mit einem Photoresist-Lack (Positiv 20, CRC Industries, Iffezheim) besprüht und zur gleichmäßigen Trocknung bei 70 °C für 30 min in den Trockenofen gelegt. Anschließend wurde eine Folienmaske aufgelegt, auf der die Elektrodenfläche sowie die Zuleitung geschwärzt erschienen, es folgte eine Belichtung (2 min) mit UV-Licht. Der Lack wurde an den belichteten Bereichen entwickelt, indem das Substrat für 1 - 2 min in eine NaOH-Lösung (7 g/l (w/w)) gegeben wurde. Das dadurch an diesen Stellen freiliegende Gold konnte mit einer  $\text{KI/I}_2$ -Ätzlösung (4.7 g  $\text{I}_2$  und 5.8 g KI in 70 ml Wasser) leicht entfernt werden. Im Anschluss wurde der unbelichtet verbliebene Photoresist auf der Elektrodenfläche mit Aceton entfernt. Die einzelnen Schritte der Präparation sind in Abbildung 3.18 schematisch dargestellt.

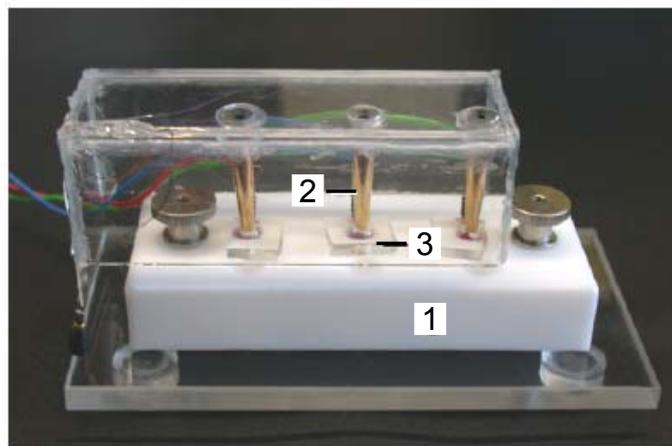


**Abb. 3.18:** Schematische Übersicht zu den Arbeitsschritten der Photolithographie. a): auf einem Substrat befinden sich 100 nm Gold, b): eine gleichmäßige Schicht Photoresist wird aufgetragen, c): eine Maske mit Elektrodenlayout in schwarz wird aufgelegt, das Substrat mit UV-Licht belichtet, d): an den belichteten Bereichen wird der Lack durch 1 M NaOH entfernt, e): das darunterliegende Gold wird mit einer  $\text{KI/I}_2$ -Ätzlösung abgelöst und f): die schützende Schicht Photoresist auf der Elektrodenfläche wird durch Aceton entfernt.

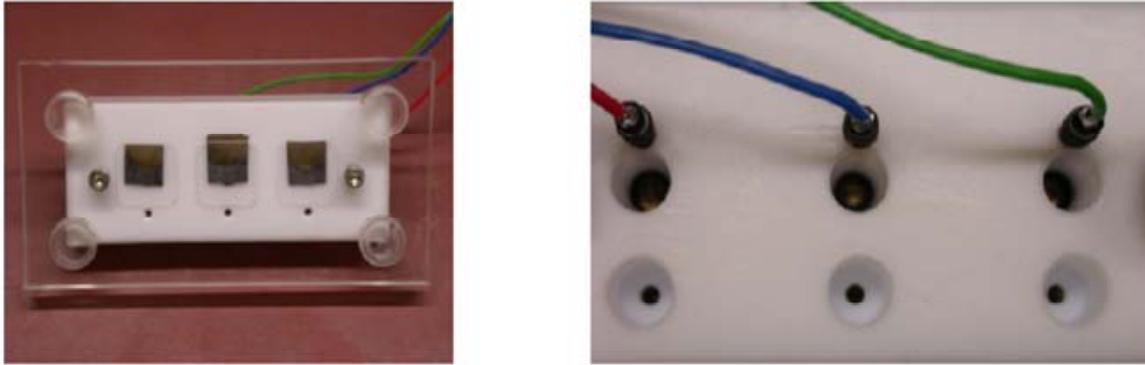
Durch die Abdichtung der elektrischen Zuleitung gegenüber der Elektrolytlösung während der ECIS-Messungen wurden Goldelektroden definierter Fläche erhalten. Dabei sind mehrere Eigenschaften für das Isolationsmaterial entscheidend: es darf keinerlei Beeinflussung des Zellverhaltens oder der Elektrodenparameter im Verlauf der Messung mit sich bringen. Als praktikabel hat sich in diesem Fall die Verwendung von Nagellack (Überlack, Manhattan) erwiesen. Mit einem sehr dünnen Pinsel wurden so die Zuleitungen zur Elektrode so weit abgedichtet, dass keine parasitären Stromflüsse zu beobachten waren. Entscheidend war hier außerdem, dass die Schicht im Bereich der Dichtringe der Messkammer (s.u.) möglichst

dünn war, um ein Auslaufen des Kulturmediums zu verhindern. Die Trocknungszeit für den Nagellack betrug mindestens 24 h. Nach dem Abdichten resultierten Elektrodenflächen von ca.  $0.03 \text{ cm}^2$ , die genaue Größe der Elektroden wurde jeweils im Anschluss an die Messungen mit Hilfe eines Reflexionsbildes an der Goldoberfläche der Elektroden am CLSM bestimmt.

Die Messkammer bestand aus einer Grundplatte und einem Teflonaufsatz, der drei individuelle Messkammern (*wells*) mit einer Kulturfläche von jeweils  $0.14 \text{ cm}^2$  beherbergt (**Abb. 3.19** und **Abb. 3.20**). Die Substrate sowie alle Dichtungen und der Aufsatz der Messkammer wurden im Argonplasma (1 min) sterilisiert und unter der Sterilbank in die Messkammer eingebaut, so dass sich die Elektrodenfläche im Zentrum der Kulturfläche befand. Die Gegenelektroden bestanden aus jeweils einer mit 100 nm Gold besputterten 200  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze pro *well*, die von oben in das Kulturmedium tauchten. Die drei Gegenelektroden wurden parallel geschaltet und waren an einem Aufsatz aus Lexanplatten mit Klebstoff im Abstand der *wells* befestigt. Der Aufsatz diente außerdem als Verdunstungsschutz. Die Fläche der Gegenelektrode war jeweils wesentlich größer als die der Arbeitselektrode, wodurch deren Beitrag zur Gesamtimpedanz vernachlässigt werden konnte. Dichtringe aus Gummi bzw. PDMS (Polydimethylsiloxan) verhinderten ein Auslaufen der *wells*, die Kontaktierung der Arbeitselektroden erfolgte einzeln über eingelassene, federnd gelagerte Kontaktstifte im Teflonblock. PDMS-Abdeckungen um die Gegenelektroden dienten als zusätzlicher Verdunstungsschutz.



**Abb. 3.19:** Messkammer (1) zur impedanzspektroskopischen Untersuchung adhärenter Zellen auf nanoporösen Substraten. Die Gegenelektroden (2) bestehen aus mit 100 nm Gold besputterten Pipettenspitzen und sind über Kupferdrähte parallel geschaltet. Der aus Kunststoff zusammengesetzte Aufsatz diente neben der Fixierung der Gegenelektroden als Verdunstungsschutz. Zusätzlich dazu wurden außerdem Abdichtungen aus PDMS (Polydimethylsiloxan) auf die einzelnen *wells* gelegt (3), durch die die Gegenelektroden in das Medium eintauchten.



**Abb. 3.20:** Aufnahme der Messkammer von unten bzw. oben. Zwischen Grundplatte und Teflonblock wurden die Substrate eingebracht, die Elektroden befinden sich im Zentrum der Kulturfläche.

Die Zellaussaat erfolgte bei komplett montiertem Teflonblock auf der Grundplatte, die suspendierten Zellen wurden in einer Dichte von 1 Mio. Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, das heißt ohne eine zusätzliche Zellteilung sollte die Elektrode nach Adhäsion der Zellen konfluent bedeckt sein. Der Beginn der Messungen erfolgte direkt nach Aussaat.

Um die porösen Elektroden im zellfreien Zustand zu charakterisieren wurden die zellbedeckten Proben nach der Messung mit einer Trypsinlösung (2.5 %ig in PBS<sup>++</sup>, 1 h, 37 °C) behandelt und anschließend gründlich mit Reinstwasser gespült. Die Messung wurde in frischem Medium durchgeführt.

### Reinigung und Regeneration der Silizium-Chips

Die Regeneration der unterschiedlichen Substrate wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt. Das Protokoll wurde ausschließlich für nanoporöse Substrate angewendet. Dazu wurden zunächst, wenn vorhanden, Kleberrückstände vorsichtig mechanisch entfernt. Abdichtungen mit Nagellack wurden mit Aceton (5 min) gelöst, anschließend wurde mit Reinstwasser gespült. Danach erfolgte eine etwa zehnminütige Inkubation in einer Lösung aus 96 %iger Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung im Verhältnis 3:1 („Piranha“), um sämtliche organische Bestandteile zu entfernen. Einem erneuten Waschschrift mit Reinstwasser folgte für 2 min ein Ätzschritt in KI/I<sub>2</sub>-Lösung (4.7 g I<sub>2</sub>, 5.8 g KI in 70 ml Wasser), um die Goldelektroden von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurden die Substrate fünfmal mit Reinstwasser gewaschen und in ein Ultraschallbad gegeben (40 °C, 15 min). Dieser Schritt wurde mit jeweils frischem Reinstwasser in zwei weiteren Zyklen wiederholt. Auf diese Weise sollte eine vollständige Entfernung der Säurereste gewährleistet werden. Vor erneuter Zellaussaat wurden die Substrate mindestens 24 h bei 37 °C getrocknet. Die Regeneration konnte über mehrere Zyklen erfolgreich und ohne Beschädigung der Substrate durchgeführt werden.

### 3.3.5 ECIS-Untersuchungen auf porösen Elektroden in Kombination mit Messungen im TER-Modus

Das Prinzip der ECIS-Messung wurde für leitende planare Oberflächen entwickelt. Dies hat den Nachteil, dass nur die Oberseite zur Stimulation der Zellen frei liegt, der basolaterale Zugang ist nicht möglich. Daneben ist das System nicht für Zellen anwendbar, die für eine korrekte Differenzierung ein System mit zwei Kompartimenten, getrennt durch eine permeable Membran, benötigen (z.B. Zellen des *Plexus chorioideus* aus dem Schweinehirn).

In dieser Arbeit wurde ein neues System aufgebaut, das ECIS-Messungen auf porösen Elektroden ermöglicht. Parallel dazu konnte durch die Integration einer weiteren Elektrode im TER-Modus gemessen werden. Durch diesen Messaufbau wurde somit erstmals ein direkter Vergleich beider Messmodi – angewandt auf ein- und dieselbe Zellschicht – möglich.

#### Messaufbau

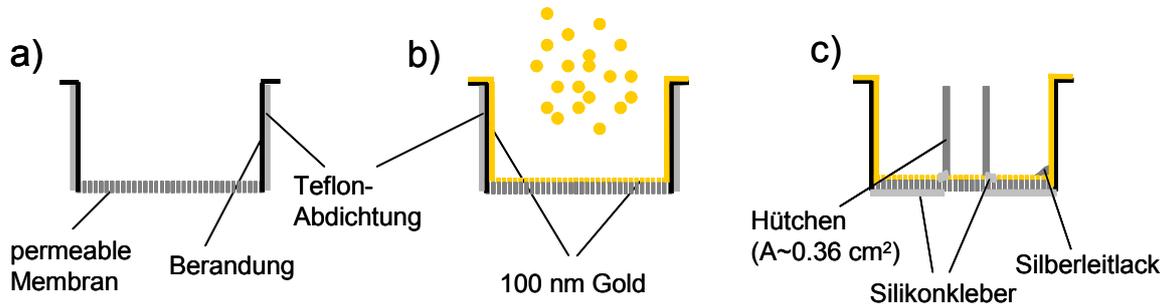
Für den Aufbau wurden handelsübliche Filtersubstrate mit unterschiedlichen Porendurchmessern und -dichten verwendet. Tabelle 3.5 gibt hierzu eine Übersicht. Es fanden ausschließlich Einsätze mit einem Durchmesser von 24 mm Verwendung. Die Membranen, auf denen die Zellen kultiviert wurden, bilden den Boden des Einsatzes.

Tab. 3.5: Übersicht über die verwendeten Filtermembranen.

Bezeichnung	Porendurchmesser [µm]	Porenanzahl (Poren/cm <sup>2</sup> )	Membranmaterial	Hersteller
Transwell Clear	0.4	4 x 10 <sup>6</sup>	Polyester	Corning, Acton, USA
Transwell 1.0	1.0	2 x 10 <sup>6</sup>	Polyester	Greiner, Bio-one, Frickenhausen
Transwell	0.4	1 x 10 <sup>8</sup>	Polycarbonat	Corning, Acton, USA
Transwell Clear 3.0	3.0	2 x 10 <sup>6</sup>	Polyester	Corning, Acton, USA

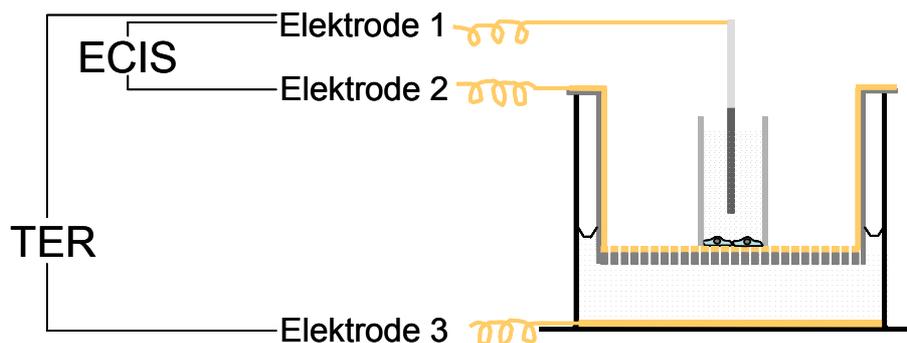
Auf die Filtermembranen wurden in einem ersten Schritt 100 nm Gold aufgebracht. Dazu wurden die Einsätze von außen mit Teflonband (Stärke: 100 nm) umwickelt, um zu verhindern, dass sich während des Sputtervorgangs ein dünner leitfähiger Goldfilm von außen am Kunststoff entlangzieht. Innen hingegen war eine leitfähige Goldschicht dringend erwünscht, da dadurch über die Berandung eine leitende Verbindung zu der Membran hergestellt werden konnte (**Abb. 3.21, a und b**). Im Anschluss daran wurde das Teflonband entfernt und ein Kunststoffhütchen (0.5 ml Eppendorfgefäß, Deckel und konisch zulaufende Spitze wurden entfernt) mit Silikonkleber (Henkel, Düsseldorf) als Begrenzung der Elektrodenfläche aufge-

klebt. Als elektrische Abdichtung von der Unterseite diente eine Schicht Silikonkleber. Silberleitlack, als einzelner Tropfen im Übergang zwischen Wandung und Membran aufgebracht, stellte die leitende Verbindung sicher (**Abb. 3.21, c**).



**Abb. 3.21:** Schematische Darstellung zur Herstellung von porösen Elektroden: a) ein handelsüblicher Zellkultureinsatz mit permeabler Membran wurde von außen mit Teflonband umwickelt; b) in einem Sputtervorgang wurden 100 nm Gold aufgebracht; c) ein Kunststoffhütchen wurde mit Hilfe von Silikonkleber (Henkel, Düsseldorf) auf die Membran aufgeklebt und die Membran von unten, den Elektrodenbereich aussparend, abisoliert; Silberleitlack stellte eine leitende Verbindung zwischen der Goldschicht an den Wänden und der Membran sicher.

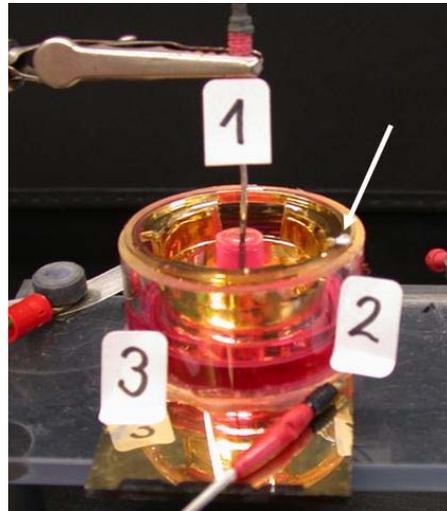
Die Elektrodenfläche wurde über einen Kupferdraht kontaktiert, der an der Goldschicht der Wandung befestigt wurde. Vor Einsatz in der Zellkultur wurde eine Sterilisation der Filter für 20 s im Argonplasma durchgeführt. Eine längere Anwendung führte zu Schmelzvorgängen am Kunststoff. Diese so gefertigten porösen Goldfilm-Elektroden konnten zur Impedanzmessung in ein handelsübliches 6-well der Firma Corning (Acton, USA) eingesetzt werden oder aber in eine spezielle Kammer mit einer zusätzlichen Elektrode überführt werden, die eine parallele Untersuchung im TER-Modus wie im ECIS-Modus ermöglicht (**Abb. 3.22**).



**Abb. 3.22:** Schematische Übersicht über den kombinierten Aufbau im ECIS- und TER-Modus. Elektrode 1 diente in beiden Messmodi als Gegenelektrode. Für den ECIS-Modus wurde Elektrode 2 dagegen geschaltet für den TER-Modus Elektrode 3, die auf der Bodenplatte aufgedampft war.

Die Kammer bestand aus einer Glasplatte, die ganzflächig mit Gold bedampft war, analog zum unter Kapitel 3.3.3 beschriebenen Messaufbau für TER-Messungen. Der Durchmesser des aufgetragenen Glasringes betrug 3.5 cm, Elektrode 1, ein platinierter Platindraht, diente in beiden Messmodi als Gegenelektrode. Durch Kontaktierung von Elektrode 1 und 2 wurde im ECIS-Modus gemessen. Alternativ dazu konnte durch Kombination von Elektrode 1 mit

Elektrode 3 im TER-Modus dieselbe Zellschicht untersucht werden. Abbildung 3.23 zeigt ein Foto des Messaufbaus. Der Glasträger mit der Elektrode 3 ist hier bereits auf einem Tisch fixiert und über Klammern kontaktiert. Elektrode 2 ist über einen Kupferdraht (weißer Pfeil) mit dem Impedanzanalysator kontaktiert.



**Abb. 3.23:** Foto des Messaufbaus: Der goldbedampfte Glasträger (3) wurde auf einem Messtisch befestigt und über Klammern kontaktiert. Von oben taucht der Platindraht in das Medium (1). Der Pfeil zeigt auf die Kontaktierungsstelle des Kupferdrahtes (2) für Elektrode 2 am Messaufbau.

Es wurde ein Frequenzbereich zwischen  $0.1 - 10^6$  Hz für die Impedanzuntersuchungen gewählt; bei ausschließlicher Messung im ECIS-Modus, wurde das Messfenster auf  $1 - 10^6$  Hz verkleinert.

### Durchführung und Auswertung

Standardmäßig wurden 200000 MDCK II-Zellen pro Substrat in Komplettmedium ausgesät, was etwa einer Dichte von  $500000$  Zellen/cm<sup>2</sup> entsprach. Vor Zellaussaat wurden die Filter mit einer 10 mM Cystein-Lösung (pH 7.3 in Reinstwasser) für 30 min bei RT inkubiert, um Kapazitätsveränderungen an der Elektrodengrenzfläche zu verhindern. Anschließend wurde viermal mit Reinstwasser gewaschen und vor Aussaat einmal mit Medium gespült. Das obere Kompartiment wurde mit einem Gesamtvolumen von 400 µl bzw. komplett befüllt, für das untere Kompartiment im *6-well* wurden 2.5 ml eingesetzt. Die Messungen starteten in der Regel 24 h nach Aussaat. Die Messkammer zur parallelen Messung im ECIS- und TER-Modus wurde durch Ethanol sterilisiert und mit Medium gespült. Der Mediumstand wurde dem im *6-well* angenähert, um einen zu starken hydrostatischen Druck auf die Zellen aufgrund der Flüssigkeitssäule im oberen Kompartiment zu vermeiden (3.5 - 4.0 ml).

Die Zellen des *Plexus Chorioideus* auf porösen Elektroden wurden zunächst völlig analog zu denen auf permeablen Filtersubstraten ohne Goldschicht behandelt (Kapitel 3.1.2). Bei einer Grundfläche von  $A \sim 0.38$  cm<sup>2</sup> wurde zunächst etwa 200 µl Medium ins apikale Kompartiment

gegeben. Dieses Volumen wurde im Laufe der nächsten Medienwechsel kontinuierlich erhöht, um eine ausreichend hohe Mediumssäule zur Kontaktierung der Gegenelektrode zur Verfügung zu stellen. Der Mediumstand im unteren Kompartiment wurde so weit wie möglich parallel erhöht, um den hydrostatischen Druck auf die Zellen möglichst niedrig zu halten. Zur Dokumentation des Differenzierungsprozesses nach Umstellung auf serumfreies Medium wurden die Substrate am Tag neun der Kultur in die Messkammer überführt und kontinuierlich vermessen.

### 3.3.5.1 Untersuchungen an Elektroden unterschiedlicher Porosität

Um den Einfluss der unterschiedlichen Porendurchmesser und -dichten (**Tab. 3.5**) sowohl auf die Elektrodendaten als auch auf die zellspezifischen Parameter zu untersuchen, wurden vergleichende Messungen von allen zur Verfügung stehenden Substraten im ECIS- und TER-Modus durchgeführt. Für die Zellparameter war ein Vergleich nur dann sinnvoll, wenn Zellen gleicher Passage und gleicher Kulturstadien genutzt wurden. Daher wurden hierfür auf jeweils drei Substrate eines Filtertyps (bzw. Elektrodentyps) MDCK II-Zellen ausgesät und nach 24 h mit jeweils zwei Einzelspektren vermessen. Da die natürliche Varianz der Zellparameter für die Elektrodendaten keine Relevanz hat, können auch Messungen unterschiedlicher Zellpassagen ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte nach dem jeweiligen Modell durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktionen (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4.1).

### 3.3.5.2 *Micromotion* auf porösen Elektroden

Die Untersuchungen wurden ausschließlich auf porösen Elektroden, basierend auf permeablen Filtermembranen, durchgeführt. Die Messung erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen. Da ausschließlich im ECIS-Modus gemessen wurde, wurden die porösen Elektroden im *6-well* belassen (Kapitel 3.3.5). Vor jeder Messung wurden Einzelimpedanzspektren im ECIS-Modus aufgenommen, um den Kulturstatus zu charakterisieren. Es wurden ausschließlich konfluente Zellschichten verwendet, die über einen Zeitraum von mindestens 30 min konstante Impedanzwerte zeigten. Um die Impedanzfluktuationen aufzuzeichnen, wurde die Impedanz der Zellschichten bei einer konstanten Frequenz von 500 Hz mit einer Amplitude von 20 mV für jeweils 20 min in äquidistanten Zeitabschnitten von 1 s registriert. Dies wurde für alle untersuchten Elektroden mit je zwei Wiederholungen durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über eine *Labview*-basierte Software.

Nach der Messung der vitalen Zellen wurde eine Fixierung mit Glutardialdehyd (2.5 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>, 20 min, RT) vorgenommen, um so eine anschließende Messung der Impedanzfluktuationen ohne den Einfluss vitaler Zellen aufzeichnen zu können.

### 3.3.5.3 Vergleichende Untersuchung im ECIS- und TER-Modus

Der in Abbildung vorgestellte kombinierte Messaufbau ermöglicht die Messung derselben Zellschicht in zwei unterschiedlichen Messmodi (ECIS- und TER-Modus). Dadurch können die unterschiedlichen Modellparameter miteinander verglichen werden. Während für die spezifische Membrankapazität in beiden Modellen die gleichen Annahmen gemacht werden gilt dies für die Parameter  $R_b$  (ECIS-Modell) und  $R_{Cl}$  (TER-Modell) nicht. Trotzdem soll durch beide Parameter eine Aussage zum parazellulären Widerstand der Zellschicht möglich sein. Untersuchungen *Lo et al.* (1999) legen jedoch nahe, dass  $R_{Cl}$  neben dem Einfluss der Zell-Zell-Kontakte auch durch andere Faktoren bestimmt wird.

MDCK II-Zellen wurden wie unter 3.3.5.1 beschrieben auf den unterschiedlichen Substraten ausgesät und nach 24 h in Kultur mit jeweils zwei Spektren in beiden Mess-Modi charakterisiert. In einigen Experimenten wurden die zellulären Proteine im Anschluss daran durch die Inkubation mit Paraformaldehyd (4 % (w/v) in PBS<sup>++</sup>) chemisch vernetzt. Dieser Zustand wurde erneut impedanzspektroskopisch dokumentiert. Die Auswertung erfolgte nach dem jeweiligen Modell durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktionen an die Daten.

### 3.3.5.4 Einsatz von Collagenase als Nachweis des basolateralen Zellzugangs auf porösen Elektroden (ECIS-Modus)

Die Kombination von ECIS-Messungen auf porösen Elektroden eröffnet die Möglichkeit zur gezielten chemischen Stimulation der Zellen von basolateraler Seite. Um dies zu dokumentieren wurde eine Collagenase/Dispase (1 mg/ml) eingesetzt, die einen Verdau der Collagene in der Extrazellulären Matrix (ECM) mediiert. Untersucht wurde der Unterschied zwischen apikaler und basolateraler Zugabe. Bei apikaler Zugabe sollte aufgrund der *tight junctions* die Diffusion unter die Zellen limitiert sein, weshalb kein Verdau der ECM auftritt. Für die Collagenase konnte auf eine 10-fach konzentrierte Stammlösung in serumfreiem M199-Medium zurückgegriffen werden (aus Endothelzellen-Präparation, PBCEC). Die Stammlösung wurde direkt in entsprechender Menge in das entsprechende Kompartiment gegeben und mit dem Medium vorsichtig vermischt. Die vergleichenden Untersuchungen wurden jeweils an zwei Substraten durchgeführt, die 24 h vor Messbeginn ausgesät wurden. Ein Substrat wurde zur apikalen Stimulation genutzt, das zweite zur basolateralen. Da nicht zwei Substrate zeitlich parallel vermessen werden konnten, schlossen sich die Experimente direkt aneinander an. Es wurden kontinuierlich Einzelspektren in einem Frequenzbereich von 1 - 10<sup>6</sup> Hz aufgenommen.

### 3.3.5.5 Untersuchungen zum spezifischen Widerstand im Zell-Substrat-Kontakt

Um den Einfluss von unterschiedlichen Leitfähigkeiten im umgebenen Medium auf den spezifischen Widerstand im Zell-Substrat-Kontakt zu untersuchen, wurden Messungen mit unterschiedlichen spezifischen Widerständen der Pufferlösungen durchgeführt. Dazu wurden zwei Grundpuffer hergestellt, aus denen durch Mischung weitere Lösungen unterschiedlicher spezifischer Widerstände erhalten wurden. Für die Herstellung der Grundpuffer wurde sich an *Gleixner* und *Fromherz* (2006) orientiert: Puffer 1 entsprach der physiologischen Leitfähigkeit von Kulturmedium, Puffer 4 zeichnete sich durch eine deutlich geringere Leitfähigkeit aus.

<u>Puffer 1</u>	5.4 mM	KCl
	135 mM	NaCl
	2.0 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1.0 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	D-(+)-Glucose
	5 mM	HEPES (pH 7.3)

<u>Puffer 4</u>	wie Puffer 1 allerdings <u>ohne</u> NaCl 240 mM D-(+)-Glucose (statt 10 mM)
-----------------	---

Daraus resultierten die in Tabelle 3.6 angegebenen Leitfähigkeiten, die mit einem Messgerät (WTW GmbH, Weilheim) bestimmt wurden. Daneben wurden die Osmolaritäten bestimmt (Osmomat 030, Gonotec, Berlin), um unterschiedliche osmotische Verhältnisse ausschließen zu können.

**Tab. 3.6:** Übersicht über die elektrischen Leitfähigkeiten bzw. spez. Widerstände der verwendeten Puffersysteme sowie die Osmolaritäten.

Lösung	Mischungsverhältnis Puffer 1:4	Leitfähigkeit (bei 25.5 °C) [mS/cm]	Spezifischer Widerstand [Ωcm]	Osmolarität [mOsmol/kg]
<b>Puffer 1</b>	1:0	15.11	66	283
<b>Puffer 2</b>	1:1	8.10	124	274
<b>Puffer 3</b>	1:2.3	5.51	182	271
<b>Puffer 4</b>	0:1	1.314	761	268

Die Zellen wurden 24 h vor Messbeginn auf poröse Elektroden, basierend auf einem *Transwell Clear*-Filtereinsatz, ausgesät. Sowohl im apikalen als auch im basolateralen Kompartiment wurde das Medium gegen Puffer 1 ausgetauscht und die Zellen für etwa 1 h äqui-

libriert, bis die Impedanz bei 400 Hz konstante Werte zeigte. Im Anschluss daran wurde entweder parallel in beiden Kompartimenten ein Komplettaustausch gegen Pufferlösungen gleicher Leitfähigkeit oder aber ein Austausch in nur einem Kompartiment durchgeführt. Im Fall eines Komplettaustausches wurde Puffer 1 gegen den Puffer 2 gewechselt. Es wurden kontinuierlich Spektren aufgenommen, wobei jeweils das Spektrum 20 min nach erfolgter Umstellung für die Auswertungen herangezogen wurde. Nach 30 min erfolgte die erneute Umstellung auf den nächsten Puffer (Puffer 3). Nach Erreichen des Puffers mit der niedrigsten Leitfähigkeit (Puffer 4) wurde der Austausch in der umgekehrten Reihenfolge betrieben. Das Frequenzfenster der Messung wurde auf 0.1 - 10<sup>6</sup> Hz festgelegt, unter physiologischen Bedingungen (Puffer 1) konnte es allerdings ohne Informationsverlust auf 1 – 10<sup>6</sup> Hz verkleinert werden. Für den Austausch der Pufferlösungen in nur einem Kompartiment wurden ausschließlich Puffer 1 und 4 genutzt. Die Dokumentation erfolgte ebenfalls durch die Aufnahme von Impedanzspektren, ausgewertet wurde jeweils ein Spektrum nach einer Inkubationszeit von etwa 30 min.

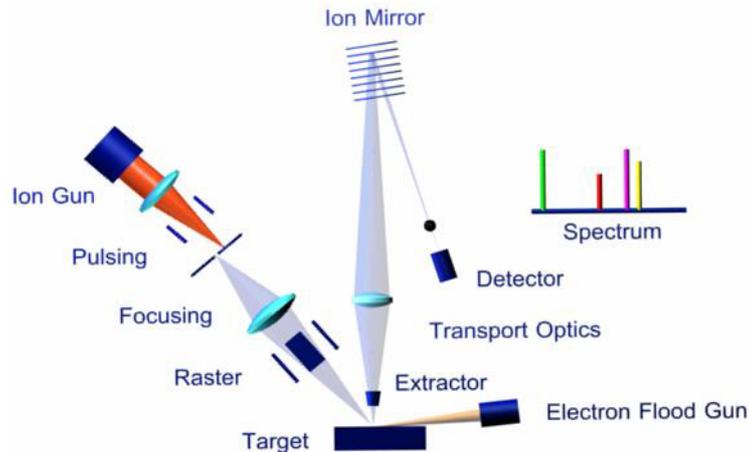
### 3.4 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie ToF-SIMS (*Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) ermöglicht sowohl die massenspektrometrische Identifizierung als auch die orts aufgelöste Betrachtung einzelner Moleküle auf einer Oberfläche. Detektiert werden Ionen, und im Gegensatz zu optischen Methoden ist hierfür keine Markierung der Moleküle notwendig. Entscheidend sind eine ausreichende Ionisierbarkeit und das Auftreten charakteristischer Fragmente. Da biologische Proben sehr komplex sind, und die Methode hierfür noch nicht ausreichend etabliert ist, ist eine Korrelation der Daten mit optischen Untersuchungen häufig sinnvoll. In dieser Arbeit wurden die Proben daher häufig, parallel zur ToF-SIMS, mit dem CLSM untersucht.

#### 3.4.1 Messprinzip und Messaufbau

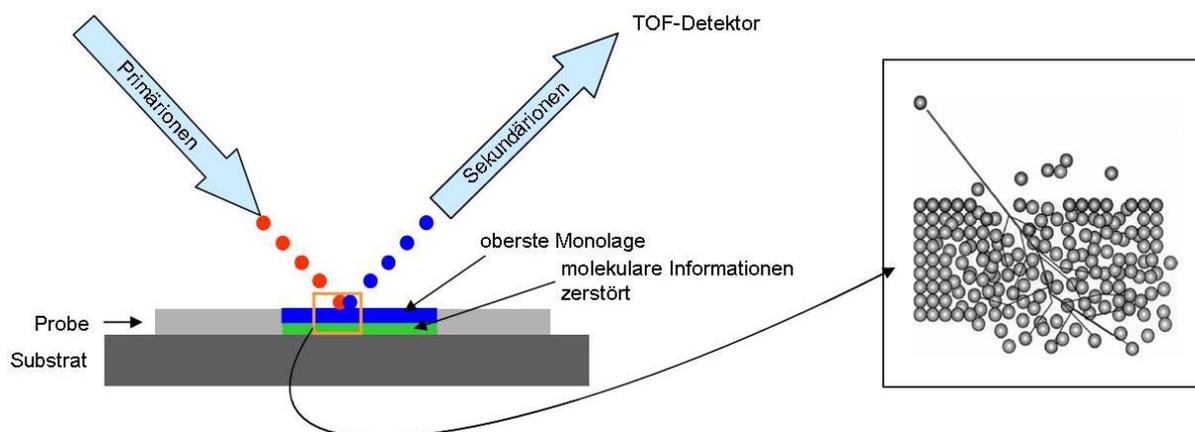
Das grundlegende Prinzip der ToF-SIMS soll hier kurz dargestellt werden (**Abb. 3.24**): Ein Primärionenstrahl wird über ein elektrisches Linsensystem gebündelt und trifft auf die Probe. Beim Auftreffen der Ionen auf eine feste Oberfläche dringen diese in die Oberfläche in einem bestimmten Maße ein. Durch das Aufschlagen oder Eindringen transferiert das Ion (Primärion) seine kinetische Energie an die Moleküle der Oberfläche und löst so eine Stoß-Kaskade aus. Durch die Ausbreitung der Stoß-Kaskade kann die Energie auch an oberflächennahe Atome und Moleküle zurückgelangen und diese dadurch von der Oberfläche ablösen. Etwa 10 % der desorbierten Teilchen liegen geladen vor (Sekundärionen) (Hagenhoff, 2000, **Abb. 3.25**). Auch Elektronen und Photonen werden durch diesen Prozess emittiert, diese

können jedoch bei der hier verwendeten Methode zur Detektion von Ionen nicht berücksichtigt werden.



**Abb. 3.24:** Schematische Darstellung eines Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometers. Der gepulste Primärionenstrahl rastert die Probenoberfläche ab, wobei beim Auftreffen Sekundärionen desorbiert werden. Im Flugzeitanalysator werden die Sekundärionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses getrennt und detektiert. (Quelle: <http://www.iontof.de>)

Neben diesem Herauslösen der obersten Monolage verursacht der Beschuss mit Primärionen allerdings auch Zerstörungen in der Umgebung des Aufpralls, Kristallstrukturen aber auch molekulare Informationen können dadurch verändert werden (**Abb. 3.25**). Das beschleunigende Feld für die Sekundärionen kann in unterschiedlicher Polarität betrieben werden, sodass sowohl positive als auch negative Sekundärionen detektiert werden können. Dies ist allerdings nicht gleichzeitig sondern nur hintereinander möglich.



**Abb. 3.25:** Schematische Darstellung zur Oberflächenanalyse mit der ToF-SIMS. Der Bildausschnitt rechts veranschaulicht die Desorption der Sekundärteilchen nach Beschuss mit einem Primärion.

An diesem Prozess der Generierung und Analyse der Sekundärionen sind mehrere Bauteile beteiligt. Entscheidend, vor allem da hier eine entscheidende Randbedingung für die Probenpräparation geschaffen wird, ist, dass die gesamte Apparatur während der Messungen unter Hochvakuum ( $4 \cdot 10^{-7}$  bis  $1 \cdot 10^{-8}$  mbar Restdruck) gehalten werden muss, um störende

Kollisionen der Ionen mit Bestandteilen der Luft zu vermeiden. Die weitere technische Umsetzung soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter dargestellt werden. Im Folgenden werden lediglich der ToF-Analysator und die Primärionenquelle als wesentliche Komponenten der Technik beschrieben.

### *Flugzeit-Analysator*

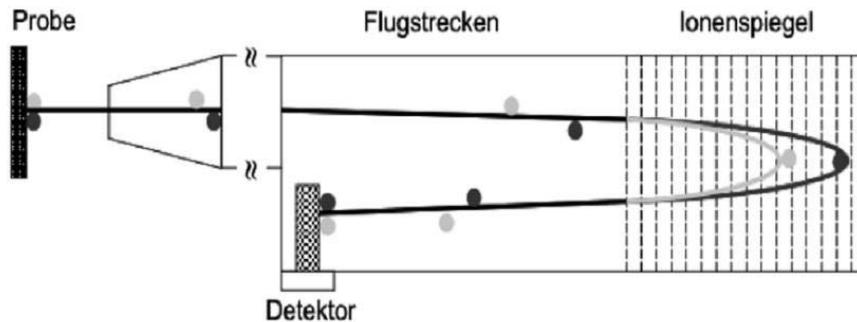
Zur Bestimmung der Massen der desorbierten und beschleunigten Sekundärionen wird ein Flugzeit-Analysator (ToF-Analysator) eingesetzt. Dabei wird ausgenutzt, dass die Driftzeit der Ionen im feldfreien Raum bei gleicher Ladung von ihrer Masse abhängig ist. Der Aufbau des ToF-Analysators gliedert sich in den Extraktor, die elektrische Linse, den Ionenspiegel und den Detektor (**Abb. 3.24**). Der Extraktor dient der Beschleunigung der Sekundärionen, indem eine Spannung ( $U$ ) von  $\pm 2$  kV zwischen Probe und Extraktor angelegt wird, die die Ionen in Richtung Extraktor beschleunigt. Dadurch nehmen die Ionen in Abhängigkeit von ihrer Ladung ( $z$ ) kinetische Energie auf. Die Geschwindigkeit, die aus dieser Beschleunigung resultiert, ist neben der Ladung von der Masse ( $m$ ) des beschleunigten Ions abhängig. Da sich die Geschwindigkeit des beschleunigten Ions im feldfreien Raum des ToF-Analysators nicht mehr verändert und die Strecke ( $s$ ) für alle Ionen gleich ist, kann von der Flugzeit ( $t$ ) auf die Masse in Abhängigkeit von der Ladung eines Teilchens geschlossen werden (**Gl. 3.19**). Da in der Regel einfach geladene Ionen entstehen, ist die Masse des Ions proportional zum Quadrat seiner Driftzeit im Analysator (**Gl. 3.19**).

$$\frac{m}{z} = 2U \frac{t^2}{s^2} \quad \text{Gl. 3.19}$$

$$m \propto t^2 \quad \text{Gl. 3.20}$$

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Detektor handelt es sich um eine Kombination aus *channelplate* und Szintillator mit nachfolgendem Photomultiplier.

Abbildung 3.26 zeigt den schematischen Aufbau des Flugzeit-Analysators. Auftreffende Sekundärionen werden in der *channelplate* in Elektronen umgewandelt und das Signal durch Vervielfältigung verstärkt. Diese lösen dann im Szintillator Photonen aus, die im Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt werden. Diese optische Auskopplung ist nötig, um Hochspannungsüberschläge zu vermeiden.



**Abb. 3.26:** Aufbau eines Flugzeit-Analysators. Die desorbierten Sekundärionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und über eine elektrische Linse auf den Ionenspiegel fokussiert (nach Breitenstein, 2004).

Reflektor (auch Ionenspiegel genannt) und elektrische Linse (**Abb. 3.24**) optimieren das System. Dazu werden mit Hilfe der elektrischen Linse die aus unterschiedlichen Bereichen der Probe desorbierten Sekundärionen auf den Detektor fokussiert. Der Ionenspiegel dient dazu, unterschiedliche Geschwindigkeiten einer Ionenspezies auszugleichen, denn schnellere Ionen dringen tiefer in das elektrische Feld des Spiegels ein und haben somit eine längere Strecke zurückzulegen. Durch Regulation des Feldes wird es möglich, dass alle Ionen einer Spezies zeitgleich auf den Detektor treffen, was im direkten Zusammenhang zur Massenauflösung des Gerätes steht.

#### *Primärionenquelle*

Für die ToF-SIMS ist es essentiell, dass die zu analysierenden Sekundärionen den Flugzeit-Analysator simultan erreichen. Die erste Voraussetzung dafür wird bereits mit dem Beschuss durch den Primärionenstrahl erbracht, der gepulst und nicht dauerhaft auf die Probe gelangt. Der in dieser Arbeit verwendete Primärionenstrahl zur Analyse (z.B. Bismut-Aggregate unterschiedlicher Masse;  $\text{Bi}^+$  und  $\text{Bi}_3^+$ ) wurde mit Hilfe einer Flüssigmetallionenquelle erzeugt. Aus dem Flüssigmetall werden die Primärionen durch das Anlegen einer hohen Spannung (25 keV) extrahiert und über eine Linse fokussiert und gepulst, indem einzelne Ionenpakete herausgeschnitten werden. Die für den Sputtermodus verwendete  $\text{C}_{60}^+$ -Quelle wurde mit 10 keV betrieben, der Sputterstrom wurde zwischen 0.6 - 2.5 pA gehalten.

#### *Messmodi*

Die Ionenquelle zur Analyse wurde in zwei grundsätzlich verschiedenen Betriebsarten verwendet, grundsätzlich ist auch eine Kombination der Betriebsmodi möglich.

##### a) *bunched* Modus zur Massenspektrometrie

Kennzeichnend für diese Betriebsart ist die hohe Massenauflösung, während die laterale Auflösung eine eher untergeordnete Bedeutung besitzt. Die Massenauflösung gibt wieder, in

welchem Bereich das Gerät in der Lage ist, unterschiedliche Massen zu differenzieren. Die maximale Massenauflösung wird über einen möglichst kleinen Zeitbedarf für die Desorption der Sekundärionen, verursacht durch eine möglichst fokussierte Auftreffzeit der Primärionen, erreicht. Die Auftreffzeit wird durch den Einsatz des so genannten *bunchers* reduziert, der die Ionen eines „Paketes“ aus der Quelle durch Beschleunigung der langsameren Anteile auf eine Geschwindigkeit fokussiert. Die Auftreffzeit der Ionen auf die Probe wird dadurch in den Bereich von 600 ps gedrückt. Dadurch sind Massenauflösungen erreichbar, die ein einfach geladenes Ion der Masse 100.00 Da unterscheidbar macht von dem der Masse 100.03 Da (Breitenstein, 2004). Zur Darstellung der Messergebnisse werden meist Spektren gewählt, die die Intensität gegen das Masse/Ladungs-Verhältnis abbilden.

#### b) *burst alignment* Modus zur Oberflächenabbildung

Für die Oberflächenabbildung spielt die laterale Auflösung die entscheidende Rolle. Eine hohe Ortsauflösung setzt einen lateral scharf fokussierten Primärionenstrahl voraus, der wiederum durch den Einsatz des *bunchers* im *bunched* Modus behindert wird. Daher wird zur Oberflächenabbildung auf den Einsatz des *bunchers* verzichtet, was eine maximale Massenauflösung im Nominalmassenbereich ermöglicht. Ein Molekül der Masse 100 Da kann lediglich von dem der Masse 101 Da unterschieden werden. Physikalisch ist die erreichbare Lateralauflösung über die Ausdehnung der Stoßkaskade auf der Probe begrenzt. Ein fokussierter Primärionenstrahl führt nicht nur im Bereich des Beschusses zur Desorption von Sekundärionen, sondern auch im Umkreis des Einschlagpunktes. Die physikalisch erreichbare laterale Auflösung liegt daher bei der ToF-SIMS bei etwa 2 - 10 nm (Hagenhoff, 2000). Aus technischen Gründen kann dieser Wert allerdings zur Zeit noch nicht erreicht werden, für organische Moleküle wird eine Auflösung von 150 - 400 nm erreicht (Belu et al., 2003 und Hagenhoff, 2000). Dieser relativ weite Bereich ist dabei allerdings nicht nur Spiegelbild der technischen Umsetzung, sondern berücksichtigt zum Teil den Einfluss der untersuchten Probe selbst. Dies liegt im unterschiedlichen Ionisierungsverhalten der Proben begründet. Während sich etwa aus Salzen sehr leicht Ionen desorbieren lassen, ist dies bei ungeladenen organischen Molekülen weitaus schwieriger.

Zu jedem Einschlagpunkt des Primärionenstrahls wird ein vollständiges Spektrum mit Nominalmassenauflösung aufgenommen, wobei die entsprechende Anzahl an Wiederholungen des Scanvorgangs in dieser Arbeit probenabhängig war. Sie werden deshalb bei den Ergebnissen der Experimente angegeben. Die aufaddierten Intensitäten eines Rasterpunktes jeder nominellen Masse können einer Farbskala zugeordnet und abgebildet werden, was zu einem zweidimensionalen Bild der Ionenverteilung auf der Probe führt. Die Farbskala ist dazu in 256 unterschiedliche Farben bzw. Farbintensitäten unterteilt. Je heller ein Punkt dargestellt wird, desto höher war die Intensität des detektierten Ions an dieser Position. In diesem Zu-

sammenhang kommt der Angabe der *maximum counts* (*mc*) eine große Bedeutung zu, die die Anzahl der detektierten Ionen im Bereich maximaler Intensität wiedergibt. Auf die *mc* wird die hellste Farbnuance normiert. Ist dieser Wert kleiner als 256, werden nicht alle Farben der Farbskala vergeben, was in der Abbildung zum Eindruck von überzeichneten Kontrasten führt. Neben der Angabe der *maximum counts* wird zu jedem Ionenbild die Angabe der Masse (*m*) und der *total counts* (*tc*), also der insgesamt im Bereich der betrachteten Fläche detektierten Ionen, gestellt.

Da zu jedem Bildpunkt ein gesamtes Spektrum aufgenommen wurde, ist es neben der Abbildung der Intensitätsverteilung eines einzelnen Ions auch möglich, gleichzeitig unterschiedliche Massen abzubilden. So konnten zum Beispiel einzelne Bestandteile der Zellmembran zusammen abgebildet werden. Darüber hinaus ist eine Darstellung im *overlay*-Verfahren möglich, wodurch die Abbildungen einzelner oder gesammelter Ionenintensitäten mit unterschiedlichen Grundfarben (in der Regel rot, gelb und blau) übereinander gelegt werden. Mit Hilfe dieser Bilder ist die unterschiedliche Verteilung von Ionen auf der Oberfläche sehr anschaulich visualisierbar.

#### *Dreidimensionale Tiefenprofilierung an Zellen*

Zur dreidimensionalen Analyse der Zellproben wurde die laterale Analyse mit einem Sputterprozess verknüpft. Dazu wird das ToF-SIMS-Gerät mit einer zweiten Primärionenquelle ausgestattet. Diese Quelle dient dem Erzeugen von  $C_{60}^+$ -*Buckminster*-Fullerenen, die auf der Probe zu einem Abtrag von Material führen. Dieser Sputtervorgang kommt dem Ausheben eines Kraters gleich, wodurch eine neue Oberfläche zur Analyse freigelegt wird. Die Verwendung der  $C_{60}^+$ -Ionen hat sich bewährt, da hier im Gegensatz zu den traditionellen Sputterionen  $O_2^+$  und  $Cs^+$  geringere Zerstörungen in den darunter liegenden Molekülschichten verursacht werden (Weibel et al., 2004). Die sequentielle Abtragung von Material mit anschließender Analyse der Oberfläche eröffnet die Möglichkeit zur dreidimensionalen Tiefenprofilierung von Proben. Grundsätzlich sind dabei vertikale Auflösungen für organische Materialien von bis zu 10 nm möglich (Wagner, 2005). Allerdings beträgt die axiale Auflösung bei den in dieser Arbeit untersuchten zellulären Systemen lediglich 350 nm. Analog zur lateralen Auflösung muss auch hier die Ausbreitung der Stoßkaskade in der Probe sowie das Ionisierungsverhalten der Moleküle berücksichtigt werden. Hierüber gibt es allerdings zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine gesicherten Erkenntnisse, wobei eine Vorhersage aufgrund der unterschiedlichen Komponenten in zellulären Systemen sicherlich zunächst schwierig bleiben wird.

### 3.4.2 Probenpräparation

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Tascon GmbH in Münster durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden sowohl die nanoporösen und planaren Substrate mit Reinstoffproben untersucht, als auch Zellen auf nanoporösen sowie planaren Substraten. Bestimmend für jede Probenpräparation war, dass die Messungen unter Hochvakuum stattfanden. Daher mussten Wege gefunden werden, die eine stabile Probe während der Messung garantierten. Außerdem war entscheidend, dass die für die Untersuchung vorgesehene Oberfläche nicht durch präparationsbedingte Ablagerungen überdeckt wurde.

Für die Aufnahme der Spektren von Reinsubstanzen auf planaren oder porösen Substraten wurden die Substanzen in Puffer oder Reinstwasser gelöst, auf die Substrate aufgebracht und eingetrocknet. Sollten ausschließlich Spektren von Reinsubstanzen aufgenommen werden, wurden diese in Reinstwasser gelöst. Als planare Oberflächen wurden Deckgläschen sowie Indiumzinnoxid-beschichtete (ITO) Glasträger genutzt. MDCK II-Zellen wurden zur Abbildung der Oberfläche und NRK-Zellen zur Tiefenprofilierung eingesetzt.

Im Falle der Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Fixierungsprotokolle wurden die Zellen zunächst nach dem Standardprotokoll für das entsprechende Substrat (Kapitel 3.2.3.1) kultiviert. Unabhängig vom Kulturstatus und Substrat wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Im Anschluss daran wurde das Fixanz zugegeben. Für die Methanol/Eisessig Fixierung (97:3 (v/v)) wurde die Lösung auf -20 °C vorgekühlt. Auch die Inkubation für 20 min fand bei -20 °C statt. Sowohl mit Paraformaldehyd (4 % (w/v) in PBS<sup>++</sup>) als auch mit Glutardialdehyd (2.5 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>) wurde jeweils für 20 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Fixierungsreagenzien entfernt und die Zellen zweimal mit PBS<sup>++</sup> gespült. Im Falle einer Färbung mit Ethidiumhomodimer wurde in Abhängigkeit vom Fixanz eine Permeabilisierung durch Triton X-100 (0.2 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>, 5 min) angeschlossen. Für Methanol/Eisessig-fixierte Zellen entfiel dieser Schritt, für Glutardialdehyd wurde er (außer in Einzelfällen) grundsätzlich durchgeführt. Die Färbeprotokolle wurden wie in Kapitel 3.2.3.4 angegeben verwendet. Das Färbereagenz wurde anschließend abgenommen und die Zellen mindestens zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Als entscheidend für eine Zugänglichkeit der Zellschicht für die ToF-SIMS zeigte sich der folgende Schritt des Austausches des Puffers gegen Reinstwasser. Nach fünfmaligem Spülen wurde das Wasser komplett entfernt und die Proben bei 37 °C eingetrocknet. Durch diesen Schritt wurde eine störende Salzsicht auf der Oberfläche der Zellen, die sich während des Eintrocknens von PBS<sup>++</sup> bilden könnte, vermieden. Zur unabhängigen Dokumentation wurden bei fluoreszierenden Proben Aufnahmen am CLSM durchgeführt. Dies geschah in der Regel vor dem Trocknungsschritt (63er Tauchobjektiv), nach dem Trocknen (20er Trockenobjektiv) sowie in Einzelfällen auch nach der ToF-SIMS-Untersuchung.

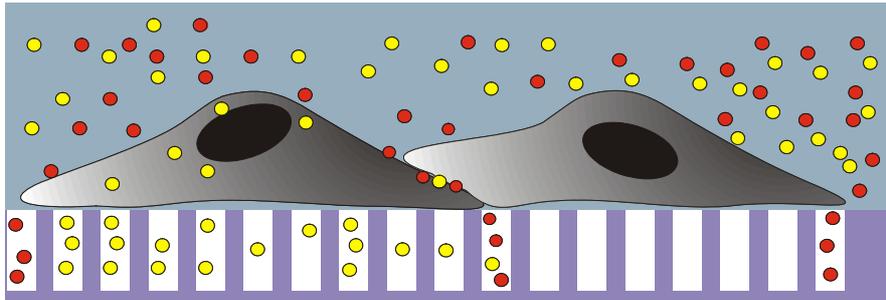
Für die dreidimensionale Tiefenprofilierung wurde die Präparation analog durchgeführt, hier wurden allerdings keine Proben auf nanoporösen Substraten vorbereitet und es wurde ausschließlich mit Glutardialdehyd fixiert.

## 4 Lateral aufgelöste Permeationsstudien auf Basis nanoporöser Substrate

Der Einsatz nanoporöser Silizium-Substrate hat in der vorliegenden Arbeit zum Ziel, ein Analyseverfahren zu entwickeln, das eine detaillierte und orts aufgelöste Untersuchung des Metabolit- und Pharmakatransportes über eine zelluläre Barriere erlaubt. Unter den bestehenden Konzepten zur Untersuchung von Transportprozessen über epitheliale und endotheliale Zellschichten hat die Verwendung von porösen Filtersubstraten enorme Bedeutung erlangt, da sie es ermöglichen, räumlich getrennte Kompartimente zu beiden Seiten der Zellschicht zu erzeugen (Pitt und Gabriels, 1987). Dadurch können experimentelle Bedingungen aufgebaut werden, durch die es möglich ist, die Permeationsrate einer Testsubstanz über die Zellschicht zu untersuchen. Die Kultur von Zellen auf Filtersubstrate ermöglicht außerdem die Bestimmung des transepithelialen und transendothelialen elektrischen Widerstandes. Dazu werden in den durch die Zellen getrennten Flüssigkeitsräumen Messelektroden platziert und die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellschicht bestimmt. Die ermittelten Widerstände korrelieren mit der parazellulären Permeabilität der Zellschicht für geladene Moleküle (Schneeberger und Lynch, 2004). Alle bislang verfügbaren Verfahren zur Durchführung von Transport- und Permeationsstudien sind jedoch integraler Natur und erlauben somit weder eine Aussage über die laterale Verteilung der Transport- und Permeationsaktivität noch eine Aussage über den Transportweg (trans- oder parazellulär). „hotspots“ der Permeation etwa in Folge einzelner apoptotischer Zellen können auf diese Weise nicht als solche erkannt werden und verfälschen das Ergebnis.

Das hier vorgestellte Konzept sieht vor, dass Zellen zunächst auf einem nanoporösen Silizium-Substrat kultiviert werden. Die hochgeordneten Nanoporen in der Substratoberfläche dienen als eine laterale Anordnung von „Nano-Küvetten“, die die apikal angebotenen Testsubstanzen nach einem Transfer über die Zellschicht aufnehmen und eine anschließende laterale Diffusion unterbinden (**Abb. 4.1**). Die laterale Verteilung der Substanzen in den Poren spiegelt dann den jeweiligen Permeationsweg über die Zellschicht wider. Auf diese Weise sollte sich der parazelluläre Fluss mit differenzierter Verteilung (rote  $\circ$ ) deutlich von einem transzellulären Weg unterscheiden (gelbe  $\circ$ ), der eine gleichmäßige Verteilung der Sonde in den Poren zur Folge hätte. Für Fluoreszenz-markierte Sondenmoleküle ist der Nachweis in den Poren mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie angestrebt. Zum Ziel dieses Konzeptes gehört darüber hinaus der Nachweis labelfreier Substanzen, deren qualitativer und quantitativer Nachweis in den Poren über eine orts aufgelöste Sekundärionen-Massenspektrometrie erreicht werden soll. Zur impedanzspektroskopischen Bestimmung der passiven elektrischen Eigenschaften des Gesamtsystems bzw. der Zellschichten, wird eine

Funktionalisierung der porösen Oberflächen angestrebt, die eine Analyse der Daten nach dem von *Giaever* und *Keese* (1984) vorgestellten und durch *Wegener et al.* (2000) weiterentwickelten ECIS-Modell zulassen. Dazu muss eine leitende Oberfläche auf die Substrate aufgebracht werden, die als Elektrode für die Impedanzmessungen dient. Die impedanzspektroskopische Charakterisierung eines epithelialen Zellmodells erlaubt unter anderem Rückschlüsse auf die parazelluläre Barrierefunktion der Zellen, die in diesem Fall möglicherweise durch die Struktur des Substrates beeinflusst wird.



**Abb. 4.1:** Prinzip des ortsaufgelösten Transport- und Permeationsassays auf Basis geordneter Nanoporen. Gelbe Symbole: transzellulärer Permeationsweg, rote Symbole: parazellulärer Permeationsweg.

Im vorliegenden Ergebniskapitel steht zunächst die Charakterisierung der Substrate sowie die Untersuchungen zum Einsatz der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie in Verbindung mit einer fluoreszierenden Sonde im Vordergrund. Daran schließt sich die Funktionalisierung zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung der Oberflächen sowie die Etablierung nanoporöser Silizium-Substrate für die Zellkultur an. Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen folgt die Entwicklung eines lateral aufgelösten Permeationsassays mit optischem Analyseverfahren. Der anschließende analytische Nachweis der transportierten labelfreien Substanzen in den Nanoporen soll durch ortsaufgelöste Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) erfolgen.

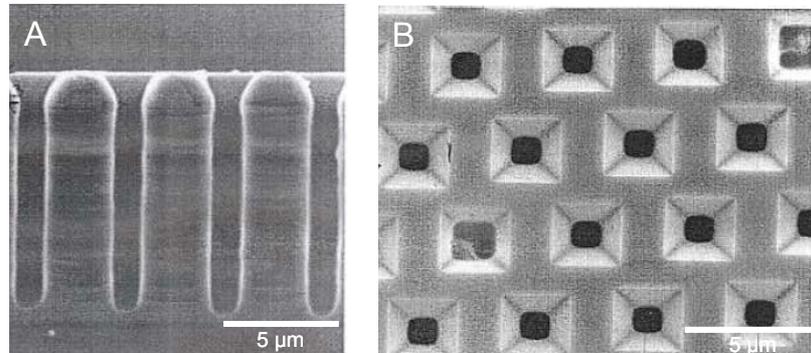
## 4.1 Charakterisierung der nanoporösen Oberflächen

Die verwendeten Silizium-Substrate wurden mir freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gösele am Max-Planck-Institut (MPI) für Mikrostrukturphysik in Halle im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

### 4.1.1 Untersuchungen zur Oberflächentopographie

Grundsätzlich basieren die Substrate auf Silizium, das durch ein photolithographisch/nasschemisches Verfahren mit einer Porenstrukturierung versehen wurde. In dem für die Zellkultur genutzten Bereich sind diese in einem hexagonalen Gitter angeordnet und be-

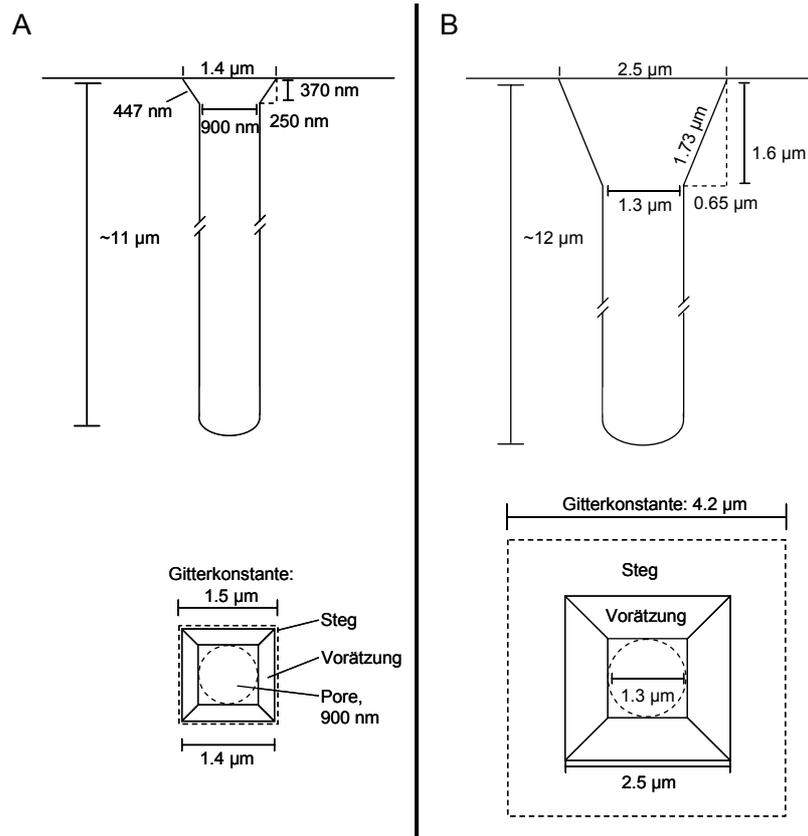
sitzen eine Tiefe von 10  $\mu\text{m}$ . Durch Variation der Gitterkonstante und des Porendurchmessers ergeben sich jeweils unterschiedliche Oberflächentopographien, deren Charakterisierung zunächst mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt wurde. Abbildung 4.2 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des porösen Substrates in Seitenansicht (A) und Aufsicht (B).



**Abb. 4.2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Göring, MPI/Halle) der Porenstruktur auf Silizium-Substraten. **A:** Seitenaufnahme, **B:** Aufsicht. Die pyramidenförmigen Vorätzstrukturen bilden eine Vertiefung, die in eine Pore mündet. An der Oberfläche resultieren planare Stege. Die Dimensionen variieren in Abhängigkeit von der Gitterkonstante und der Porengröße; hier: Gitterkonstante = 4.2  $\mu\text{m}$ , Porendurchmesser = 1.3  $\mu\text{m}$ .

Die durch den Herstellungsprozess bedingten pyramidenförmigen Vorätzstrukturen münden in Poren mit einer Tiefe von 10  $\mu\text{m}$ . An der Oberfläche des Substrates verbleiben dadurch planare Stege.

Trotz dieser strukturellen Gemeinsamkeiten ergeben sich für die in dieser Arbeit verwendeten nanoporösen Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm bzw. 1.3  $\mu\text{m}$  ganz unterschiedliche Detailtopographien für den Einsatz als Kultursubstrat in der Zellkultur. Abbildung 4.3 zeigt schematische Seitenansichten und Aufsichten der Silizium-Substrate, die angegebenen Dimensionen wurden zum Teil aus REM-Bildern bestimmt.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung einer Einzelpore aus dem hexagonalen Gitter. **A** Maße für ein Substrat mit einem Porendurchmesser von 900 nm; mit flachen Vorätzbereichen und einem resultierenden Steg von insgesamt 100 nm Breite. **B** Maße für ein Substrat mit einem Porendurchmesser von 1.3 µm und tieferen Vorätzbereichen; aufgrund der Gitterkonstante resultieren Stege von 1.7 µm Breite.

In Abbildung **4.3 A** ist ein Substrat mit einem Porendurchmesser von 900 nm dargestellt. Die Vorätzungsgebiete fallen in einem Winkel von  $56^\circ$  zur Oberfläche ab, aus einer Kantenlänge von 1.4 µm bei einer Gitterkonstante von 1.5 µm resultieren nur sehr schmale Stegbreiten von 100 nm. Der Anteil der zur Verfügung stehenden planaren Wachstumsfläche beträgt dadurch nur 13 %, verglichen mit einer komplett planaren Oberfläche. Abbildung **4.3 B** zeigt ein Substrat mit einer Gitterkonstanten von 4.2 µm und einem Porendurchmesser von 1.3 µm. Es ist ein tieferer Vorätzbereich mit einer Kantenlänge von 2.5 µm vorhanden, der eine Neigung von  $68^\circ$  besitzt. Aus den Werten resultiert, dass die Stege zwischen den Porenkanten etwa 1.7 µm breit sind. Der Anteil der planaren Wachstumsfläche in Bezug zu einer planaren Vergleichsfläche gleicher Grundfläche schrumpft auf 65 %.

Ein Teil der Substrate wurde mit einer 100 - 120 nm dicken Schicht aus Siliziumdioxid am MPI in Halle beschichtet, um die Oberfläche elektrisch zu isolieren. Grundlage ist ein thermischer Oxidationsprozess, der bei  $900^\circ\text{C}$  unter normalen atmosphärischen Bedingungen stattfindet. Die Oxidschicht wird so gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche (auch an den Porenwänden) gebildet. Diese Funktionalisierung wurde ausschließlich für Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3 µm durchgeführt, wäre aber grundsätzlich auch auf Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm applizierbar.

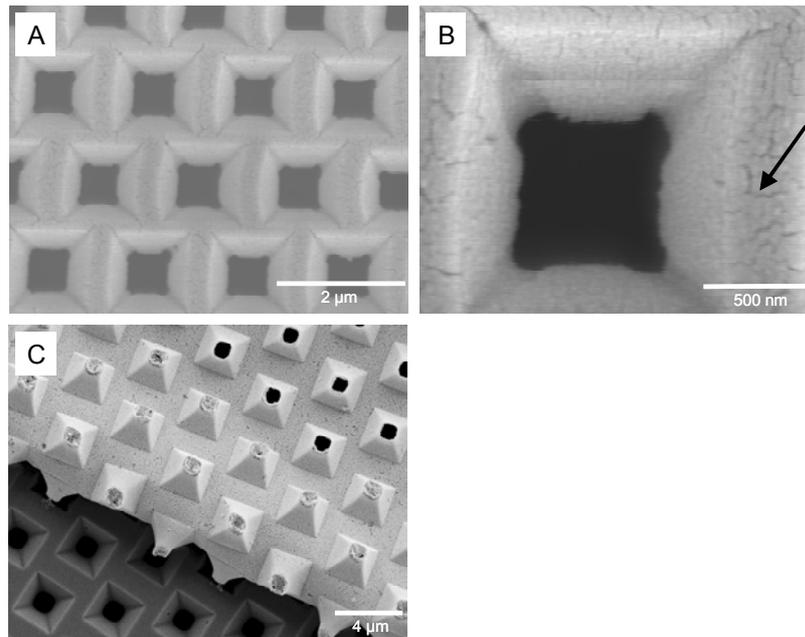
Zur eindeutigen Unterscheidung der Substrate werden an dieser Stelle Bezeichnungen eingeführt, die im Folgenden konsequent verwendet werden:

Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von

900 nm: Typ 1-Substrat,

1.3  $\mu\text{m}$ : Typ 2-Substrat.

Für alle durchgeführten elektrischen Messungen werden die Substrate mit einer Schicht von 100 nm Gold belegt, die dann photolithographisch modifiziert wird bzw. auf der durch Aufkleben einer Abgrenzung eine Elektrodenfläche definiert wird (Kapitel 2.3.4.3). Entscheidend für die Vergleichbarkeit mit Untersuchungen auf Substraten ohne Gold und die Interpretation der elektrischen Messungen ist eine genaue Vorstellung davon, wie sich das aufgesputterte Gold der Topographie anpasst. Zur Visualisierung wurden Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop (Göring, MPI/Halle, sowie durch Stefanie Michaelis im Rahmen ihrer Diplomarbeit) durchgeführt (**Abb. 4.4**). Die Aufnahmen zeigen, dass sowohl die Stege als auch die Vorätzstrukturen mit Gold belegt sind (Abbildungsteil **A**, Typ 1). Die Ausschnittsvergrößerung (**B**) verdeutlicht, dass die Goldoberfläche eine deutlich erkennbare Rauigkeit aufweist, die unter Umständen zu einer Oberflächenvergrößerung führt. Abbildung **4.4 C** (Typ 2) deutet an, dass während des Sputter-Prozesses zum Teil auch im obersten Bereich der röhrenförmigen Poren Gold abgeschieden wird. Dargestellt ist ein Substrat, von dem sich ein Teil der aufgetragenen Goldschicht abgelöst hat. Inwieweit tatsächlich in der darunter liegenden Pore eine leitende Beschichtung der Porenwand erzielt wird, ist auch mit elektronen-optischen Methoden nicht zu beantworten.



**Abb. 4.4:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen (nanoAnalytics GmbH, Münster) goldbedeckter Substrate. **A-B:** Typ 1-Substrat. **A** verdeutlicht die komplette Bedeckung; **B:** Rauigkeit und Fissuren im aufgetragenen Goldfilm (Pfeil); **C:** abgelöste Goldschicht (Typ 2), die pyramidenförmigen Vorätzbereiche sind komplett mit Gold ausgekleidet.

Grundsätzlich dokumentieren die Aufnahmen, dass ein aufgesputterter Goldfilm die Oberfläche inklusive der Vorätzstrukturen durchgehend belegt, das Porenmuster aber erhalten bleibt. Damit kann für impedanzspektroskopische Messungen davon ausgegangen werden, dass neben den planaren Stegbereichen auch die pyramidalen Vorätzstrukturen elektrisch zugänglich sind. Dies bedeutet, dass sich die elektrisch aktive Fläche zumindest aus den Steganteilen sowie den Vorätzstrukturen ergibt. Rein rechnerisch resultiert daraus für Typ 1-Substrate eine Flächenvergrößerung gegenüber einer planaren Vergleichsfläche gleicher Kantenlänge von etwa 4 %, trotz der vorhandenen Poren. Für Substrate des Typs 2 ist dieser Wert aufgrund der höheren Steganteile und der tieferen Vorätzstrukturen deutlich größer und liegt bei etwa 37 %. Ausgegangen wurde in beiden Fällen von den in Abbildung 3.3 dargestellten Größenverhältnissen, nicht berücksichtigt wurde eine Oberflächenveränderung durch das aufliegende Gold.

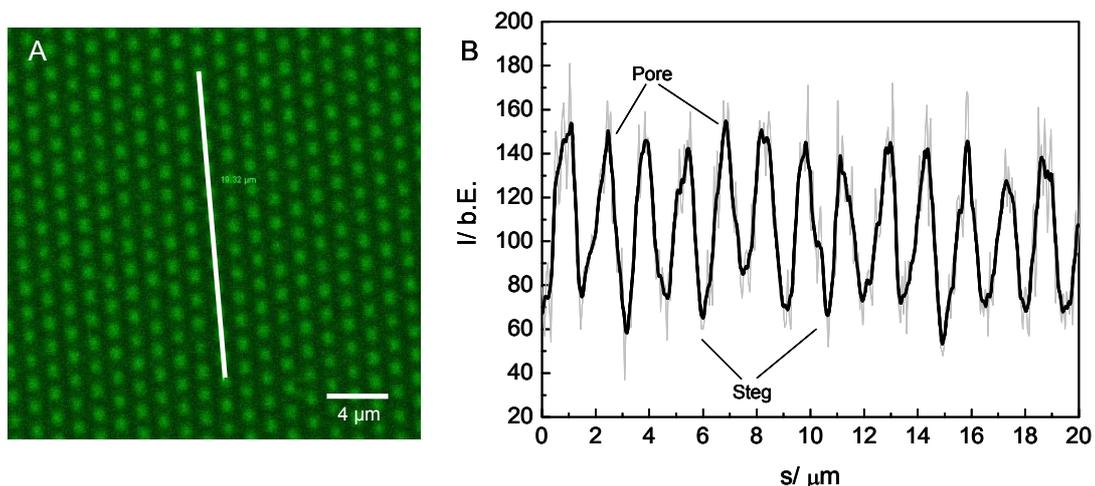
#### 4.1.2 Oberflächenbenetzung und Befüllung der Poren

Für den Einsatz der nanoporösen Substrate in der Zellkultur und für Experimente in wässrigen Medien ist es essentiell, dass die Oberflächen aus Si bzw.  $\text{SiO}_2$  zellkompatibel sind. Die problemlose und instantane Befüllung der Poren ist darüber hinaus von elementarer Bedeutung für die Experimente im Rahmen des Permeationsassays. Entscheidend für die Befüllung der Poren ist die Benetzbarkeit der Oberfläche mit einer wässrigen Lösung. Der daraus resultierende Kapillareffekt in den Poren unterstützt unter Umständen das Eindringen der

Lösung. Die Verwendung der Fluoreszenzsonde FITC-Dextran in einer wässrigen Lösung ermöglicht die Untersuchung der Effekte mit einem konfokalen Mikroskop (CLSM).

### Laterale Farbstoffverteilung in Höhe der Poren

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bzw. bis zu 24 h mit einer FITC-Dextran-Lösung (4 kDa, 0.5 mM, in PBS<sup>++</sup>) wird der Verlauf der Fluoreszenzintensität in xy-Richtung in Höhe der Poren untersucht. Abbildung 4.5 zeigt einen optischen xy-Schnitt in Höhe der Poren bei konfokaler Abbildung für ein Typ 1-Substrat. Der Intensitätsverlauf entlang der Linie (Abbildungsteil **A**) spiegelt die Struktur des Substrates wider: in regelmäßigen Abständen wiederholen sich befüllte Poren mit einer hohen und Stege mit einer niedrigen Intensität (Abbildungsteil **B**). Die Restintensität im Bereich der Stege kann auf Streulicht zurückgeführt werden, auch muss eine Spiegelung des im Puffer gelösten Fluorophors an der planaren Substratoberfläche in Erwägung gezogen werden. Dieser Effekt wird im Anschluss speziell untersucht.

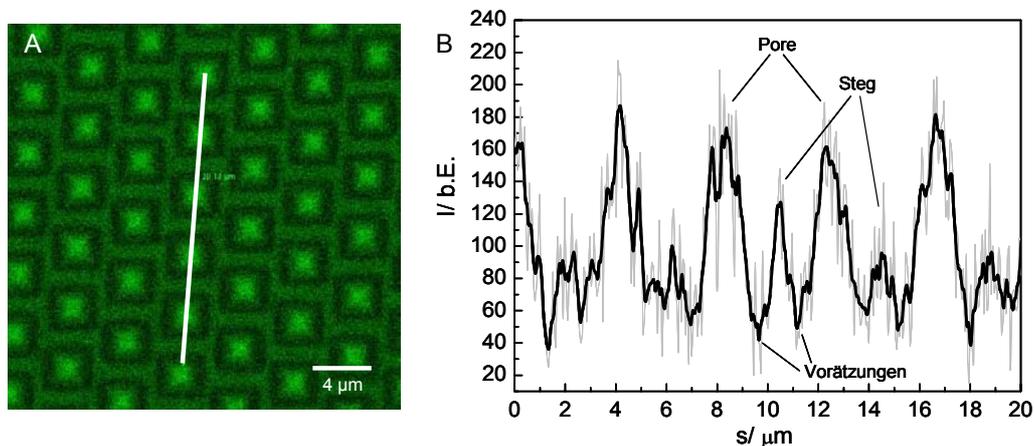


**Abb. 4.5:** Dokumentation der lateralen Farbstoffverteilung nach 5 min Inkubation eines Silizium-Substrates (Typ 1) mit einer wässrigen FITC-Dextran-Lösung. Bild **A**: optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren bei konfokaler Abbildung; entlang der eingezeichneten Linie (s) wurden die Fluoreszenzintensitäten bestimmt. **B**: Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität (grau: Rohdaten, schwarz: geglättet über 20 Punkte), die Poren heben sich durch erhöhte Intensität von den Stegen ab.

Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf bis zu 19 bzw. 24 h zeigt, dass sich der Verlauf der Intensität nicht ändert (hier nicht gezeigt). Die Relativwerte der Fluoreszenzintensität schwanken bei Kontrolluntersuchungen innerhalb der Inkubationszeit leicht (Maxima zwischen 130 und 170, Minima zwischen 50 und 90), jedoch ohne erkennbaren Trend. Auch über einen längeren Zeitraum kann daher von einer hohen Fluoreszenzstabilität in den Poren ausgegangen werden.

Für die Typ 2-Substrate muss die Beschreibung des Intensitätsprofils erweitert werden. Ausgangspunkt ist die CLSM-Aufnahme eines optischen xy-Schnittes in Höhe der Vorätzstrukturen (**Abb. 4.6**). Entlang der Geraden lassen sich zunächst analog zu den Substraten mit dem

kleineren Porendurchmesser zwei Bereiche unterscheiden: ein Bereich hoher Fluoreszenzintensität, der den Poren zugeordnet werden kann und ein Bereich mit deutlich niedrigerem Fluoreszenzsignal, der aus dem Stegbereich resultiert. Für die Interpretation der Abbildung ist es wichtig, zwischen zwei Effekten zu unterscheiden: der tatsächlichen Detektion von Fluoreszenz in der Fokusebene und der Reflexion von Fluoreszenzlicht an der Siliziumoberfläche, das von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene stammt. Das im Bereich der Stege detektierte Fluoreszenzsignal ist eindeutig dem zweiten Effekt zuzuschreiben. Unterstrichen wird dies durch die periodisch auftretenden niedrigen Intensitäten im Bereich der Vorätzungen. Hier ist aufgrund des Winkels der Trapezflächen zum einfallenden Licht keine Reflexion in Richtung des Strahlenganges möglich, die Bereiche erscheinen dunkel. Dies unterstreicht, dass sich die Fokusebene tatsächlich auf Höhe der Poren befindet, denn wäre die Fluoreszenz im Bereich der Stege real und damit die Fokusebene höher als angenommen, so müsste sich auch im Bereich der Vorätzstrukturen ein Signal detektieren lassen.



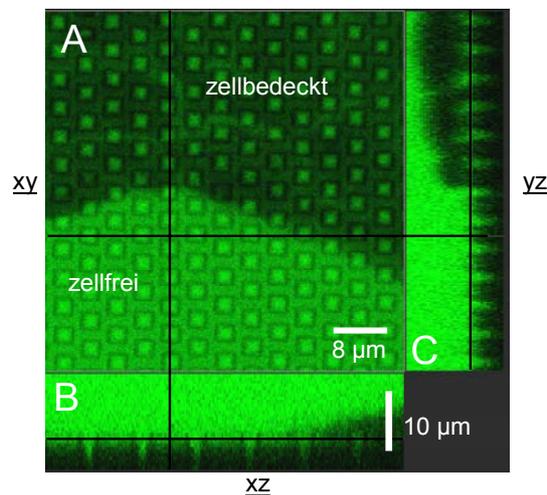
**Abb. 4.6:** Dokumentation der lateralen Farbstoffverteilung nach 24 h Inkubation eines Silizium-Substrates (Typ 2) mit einer wässrigen FITC-Dextran-Lösung. **A:** optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren bei konfokaler Abbildung; entlang der eingezeichneten Linie wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten bestimmt. **B:** Verlauf der Fluoreszenzintensität (grau: Rohdaten, schwarz: geglättet über 20 Punkte), die Poren heben sich durch erhöhte Intensität von den Stegen und den Vorätzbereichen ab.

Sowohl für Substrate des Typs 1 als auch für Substrate des Typs 2 ist es mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie möglich, zwischen den Poren und dem Stegbereich eindeutig zu differenzieren. Die instantane und stabile Befüllung der Poren mit einer wässrigen Lösung lässt auf eine gute Benetzbarkeit der Oberfläche schließen.

### Reflexion an der Substratoberfläche

Das oben gezeigte Phänomen, dass auch unterhalb der Stegoberfläche Fluoreszenzintensität detektiert wird, bedarf weiterer Untersuchungen. Zur Aufklärung wurde eine Abdeckung der fluorophorgefüllten Poren durchgeführt. Nach sechsständiger Vorinkubation der Substrate (Typ 2) mit einer FITC-Dextran-Lösung (4 kDa, 0.5 mM, in Medium) wurden MDCK II-

Zellen so ausgesät, dass nach Adhäsion nur Teile der Oberfläche mit Zellen bedeckt waren. Die Dokumentation am CLSM nach 12 h zeigt in weiten Bereichen einen gespreiteten Zell-layer auf dem Substrat mit einzelnen Lücken. Die Vorinkubation mit dem Fluorophor hat zu einer vollständigen und homogenen Befüllung der Poren geführt (**Abb. 4.7**). Obwohl die Schnittebene über den gesamten Bereich gleichmäßig etwa 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Stegoberfläche liegt, erscheinen die Stege im zellbelegten Substratbereich deutlich dunkler. Abbildungsteil **B** zeigt die Verteilung des Fluorophors in xz-Richtung, die Schnittebene geht fast ausschließlich durch den zellfreien Bereich: Oberhalb des Substrates wird ein homogenes Fluoreszenzsignal detektiert. Auf Höhe des Substrates heben sich keilförmig die fluorophorgefüllten Poren ab. Im Abbildungsteil **C** ist die Verteilung in yz-Richtung dargestellt, hier werden sowohl zellfreie als auch zellbedeckte Bereiche angeschnitten. Im zellfreien Bereich zeigt sich ein analoges Bild zu **B**, im zellbedeckten Areal zeichnen sich die Poren allerdings bereits in einer optisch höheren Ebene ab.



**Abb. 4.7:** CLSM-Aufnahmen zur Dokumentation der Spiegelung an der Silizium/Siliziumdioxid-Grenzfläche. **A:** optischer xy-Schnitt auf Höhe der Poren, d.h. ca. 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche. **B:** optischer xz-Schnitt entlang der horizontalen Linie in **A**, **C:** optischer yz-Schnitt entlang der vertikalen Markierung. Die Zellbedeckung führt zu einer wirksamen Unterdrückung der Spiegelungsartefakte.

Der optische Eindruck einer tieferliegenden Substratoberfläche entsteht also dadurch, dass das Fluoreszenzsignal aus der *bulk*-Phase an der Grenzfläche Silizium/Siliziumdioxid gespiegelt wird und die Spiegelbilder der *bulk*-Phasen-Fluorophore zum Gesamtbild beitragen. Die Oberfläche kann nicht eindeutig identifiziert werden. Die Zellen unterbinden diesen Spiegeleffekt, indem sie den Farbstoff weitgehend verdrängen. Begünstigend wirkt sich dabei aus, dass MDCK II-Zellen einen kleinen Zell-Substrat-Abstand von unter 30 nm einhalten (Reiß, 2004).

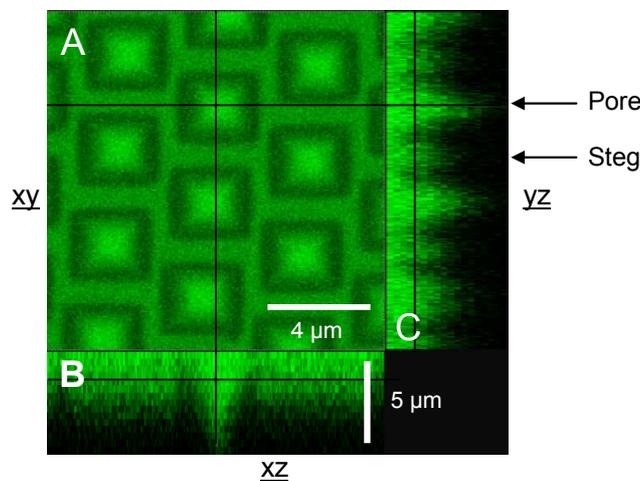
Grundsätzlich ist dieser Effekt auch bei den Typ 1-Substraten zu erwarten. Es wurde zwar keine Siliziumdioxidschicht nachträglich erzeugt, es kann aber davon ausgegangen werden, dass sich durch Reaktion mit dem Luftsauerstoff eine dünne Siliziumdioxidschicht ausgebil-

det hat. Aufgrund der sehr schmalen Stege (100 nm) wird das Phänomen hier aber weniger deutlich detektiert.

### Axiale Farbstoffverteilung in den Poren

Analog zur lateralen wurde die axiale Verteilung einer wässrigen Fluorophorlösung in den Poren untersucht. Die Substrate werden durch Serien von optischen  $xy$ -Schnitten in  $z$ -Richtung am CLSM charakterisiert.

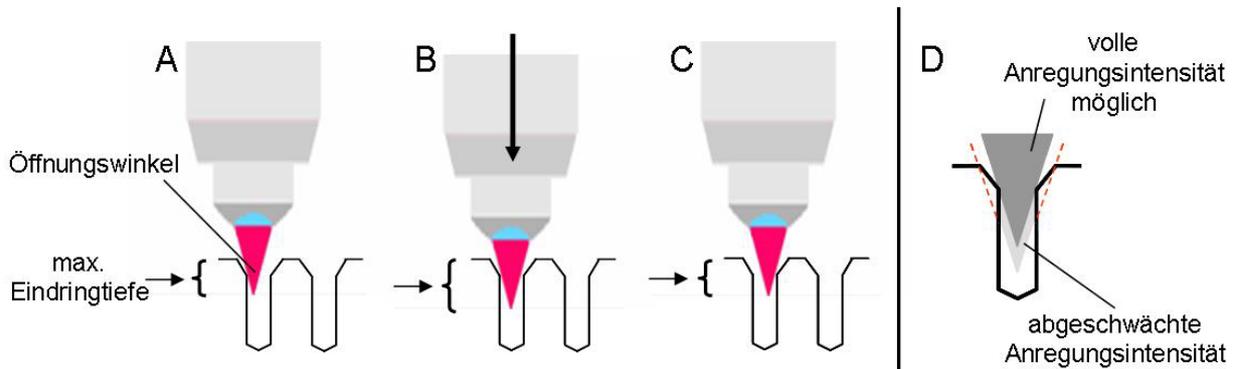
Abbildung 4.8 **A** zeigt beispielhaft die vergrößerte Abbildung eines Substrates (Typ 2) etwa 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Stegoberfläche. Entlang der horizontalen und vertikalen Linie werden Seitenansichten in  $z$ -Richtung (**B**, **C**) dargestellt. Die gefüllten Poren heben sich deutlich als keilförmig zulaufend erscheinende Strukturen ab.



**Abb. 4.8:** CLSM-Aufnahmen FITC-Dextran gefüllter Poren (Durchmesser 1.3  $\mu\text{m}$ ). **A:** Optischer  $xy$ -Schnitt etwa 1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Stegoberfläche. **B:** Seitenansicht  $xz$ -Richtung (entlang der horizontalen Linie in **A**), **C:**  $yz$ -Ansicht. Die Poren heben sich keilförmig zulaufend ab, die Reflexion an der Siliziumoberfläche führt im Bereich der Stege ebenfalls zu einem Signal.

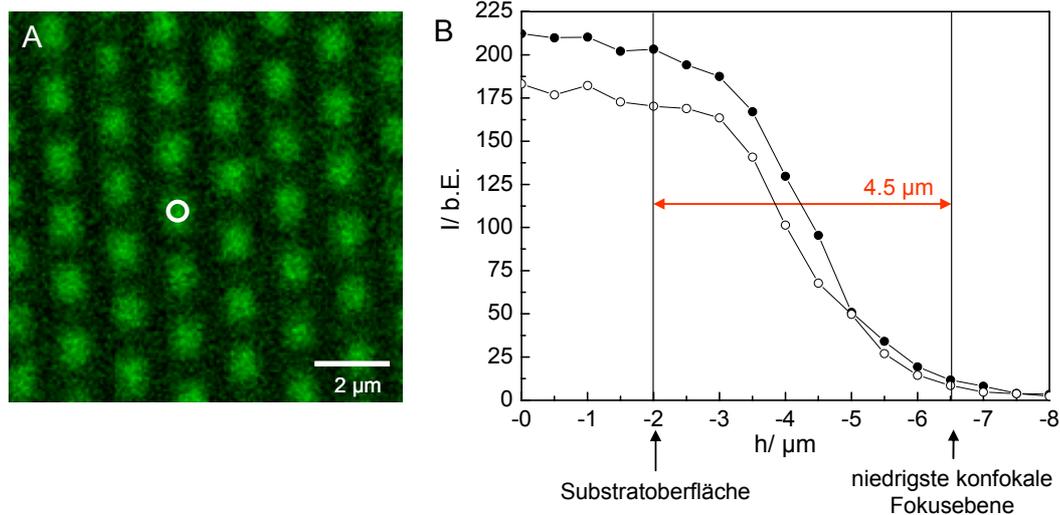
Die Form des Fluoreszenzbildes stimmt nicht mit der zylindrischen Form der Pore (**Abb. 4.2**) überein. Die kegelartige Struktur resultiert aus einer methodischen Besonderheit. In Abhängigkeit von der Numerischen Apertur (NA) des verwendeten Objektivs (hier: 63er, NA: 0.90) entsteht ein Lichtkegel des Anregungslichtes mit dem Öffnungswinkel  $2\alpha$  (Kapitel 3.2.1.1). Die maximale Anregungsintensität in der Fokusebene wird dann erreicht, wenn das gesamte Licht ungehindert dorthin gelangen kann. Wie Abbildung 3.9 verdeutlicht, führt dies dazu, dass in der zentralen Position über einer Pore (**B**) eine tiefer liegende Fokusebene erreicht werden kann, als in den Randbereichen (**A** und **C**), die Eindringtiefe ändert sich. Das bedeutet allerdings nicht, dass es sich dabei um die am tiefsten in den Poren liegende konfokale Fokusebene der jeweiligen Position handelt. Auch aus tieferen Ebenen kann letztendlich Fluoreszenz angeregt werden, allerdings steht dazu nur eine abgeschwächte Anregungsintensität zur Verfügung, da Teile des Beleuchtungslichtkegels durch das Substrat verdeckt werden. Die sich daraus ergebende Abnahme in der detektierten Fluoreszenzintensität

spiegelt sich im kegelförmigen Bild der Poren (**Abb. 4.8**) wider und ist in **Abbildung 4.9 D** schematisch dargestellt.



**Abb. 4.9:** Schematische Darstellung zur Eindringtiefe der konfokalen Abbildung in Abhängigkeit von der Position des Objektivs über der Pore. Aus der Bündelung des Anregungslichts in der Fokusebene resultiert ein Lichtkegel, der ohne Abschwächung im Randbereich einer Pore (**A**, **C**) weniger tief eindringen kann als im Zentrum (**B**). **D**: Mit abgeschwächter Anregungsintensität kann allerdings auch in tieferen konfokalen Fokusebenen Fluoreszenz angeregt werden (Erklärung im Text).

Es wurde eine semiquantitative Abschätzung der maximalen Eindringtiefe bei typischen Mikroskopeinstellungen vorgenommen (Geräteinstellungen: Intensität (488 nm): 100 %, Verstärker 550.0 V, Schwellenwert -15.0, Zoom-Faktor: 4). **Abbildung 4.10 A** zeigt dazu einen optischen *xy*-Schnitt bei konfokaler Abbildung eines für 5 min mit FITC-Dextran inkubierten Substrates (Typ 1). Beginnend 2  $\mu\text{m}$  oberhalb der Substratoberfläche wurden von dieser Position aus optische *xy*-Schnitte in unterschiedlichen *z*-Positionen aufgenommen ( $\Delta z = 0.5 \mu\text{m}$ ). Innerhalb der Markierung (Pore) wurde für alle Schnitte die Intensität über 66 Pixel ( $0.22 \mu\text{m}^2$ ) gemittelt und bestimmt. **Abbildungsteil B** zeigt diese Werte ( $\bullet$ ) in Abhängigkeit von der *z*-Position. Die Identifizierung der Substratoberfläche wurde durch die Bestimmung der *xy*-Ansicht möglich, in der sich die gefüllten Poren von der Stegfläche abzeichnen. Nach gleichmäßiger relativer Fluoreszenzintensität in der *bulk*-Phase fällt im weiteren Verlauf die Intensität stark ab. Nach Absenkung der Fokusebene um weitere 4.5  $\mu\text{m}$  fällt die relative Fluoreszenzintensität auf ein Minimum ( $\sim 10$ ), das die maximale Eindringtiefe der konfokalen Abbildung markiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde eine analoge Untersuchung durchgeführt ( $\circ$ ). Ausgehend von einer schwächeren relativen Fluoreszenzintensität in der *bulk*-Phase ( $\sim 180$ ) wurde ein zu der Untersuchung nach 5 min analoges Ergebnis erhalten. Auch nach 3 h liegt die maximale Eindringtiefe der konfokalen Abbildung im Porenzentrum etwa 4.5  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche. Für Substrate des Typs 2 wurden die Untersuchungen ebenfalls durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Hier liegt die maximale Eindringtiefe in Abhängigkeit von den Mikroskopeinstellungen etwa 6.5  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche. (Durch nachträgliche Bildbearbeitung können in beiden Fällen zum Teil auch aus tieferen Ebenen Informationen gewonnen werden.)



**Abb. 4.10:** Dokumentation der axialen Farbstoffverteilung nach 5 min bzw. 3 h Inkubation eines Silizium-Substrates (Typ 1) mit einer wässrigen FITC-Dextran-Lösung. **A:** optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren bei konfokaler Abbildung aus einer Serie von xy-Schnitten an gleicher Position ( $\Delta z = 0.5 \mu\text{m}$ ); an der dargestellten Position wurde die Fluoreszenzintensität über 66 Pixel ( $0.22 \mu\text{m}^2$ ) gemittelt und bestimmt. **B:** Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der z-Position ( $h$ ) nach 5 min (●) und nach 3 h (○). Erklärung im Text.

Für die beiden verwendeten Substrattypen wird keine zeitliche Abhängigkeit für die Porenbefüllung detektiert. Bereits nach 5 min Inkubation mit der Sonde wird Fluoreszenz in den Poren detektiert und das Signal ist im Anschluss für mindestens 24 h stabil. Damit kann davon ausgegangen werden, dass der Einstrom der wässrigen Lösung in die unbedeckten Poren schneller verläuft als mit dieser fluoreszenzmikroskopischen Methode feststellbar ist. Damit stellt dies keinerlei Limitierung für nachfolgende Experimente dar.

## 4.2 Zelldifferenzierung auf porösen Silizium-Substraten

Für den Einsatz von porösen Silizium-Substraten unterschiedlicher Porenstruktur in der Zellkultur soll deren Cytokompatibilität sowohl für unterschiedliche Zelllinien wie auch primärkultivierte Zellen getestet werden. Zunächst werden die grundlegenden Untersuchungen mit der Epithelzelllinie MDCK II durchgeführt, einem weit verbreiteten Modell für adhärente, barrierebildende Zellen. Ob und wie unter dem Einfluss der Oberflächentopographie das Zellwachstum beeinflusst wird, ist grundlegend für den weiterführenden Einsatz der Substrate. Dass eine Beeinflussung des Zellwachstums aufgrund unterschiedlicher Topographien möglich ist, konnten *Petronis et al.* (2003) am Beispiel von Fibroblasten auf titanbeschichtetem Silizium zeigen. Zum semi-quantitativen Vergleich des Differenzierungszustandes der Zellen wurden Untersuchungen unter identischen experimentellen Bedingungen auf planaren Glassubstraten bzw. in Petrischalen durchgeführt. Als Differenzierungsmarker wurden ausgewählte Proteine herangezogen und ihre zelluläre Verteilung verglichen. Im Hinblick auf die große physiologische Relevanz der Blut-Liquor-Schranke wurden die primärkultivierten Epithelzellen

des *Plexus chorioideus* untersucht, und der experimentelle Vergleich der Differenzierung um permeable Filtersubstrate erweitert. Neben den immunocytochemischen Untersuchungen werden die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellen (MDCK II) auf nanoporösen Oberflächen ermittelt. Dazu werden nicht-invasive impedanzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt und mit den Ergebnissen für Zellen auf planaren Elektroden verglichen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit Hilfe des ECIS-Modells und ermöglicht daher den detaillierten Vergleich für die einzelnen Modellparameter.

#### 4.2.1 Immuncytochemische Charakterisierung der Epithelzelllinie MDCK II

Die Epithelzelllinie MDCK II wurde sowohl auf porösen Silizium-Substraten mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1) als auch 1.3  $\mu\text{m}$  (Typ 2) eingesetzt und immunocytochemisch sowie impedanzspektroskopisch im Vergleich zu planaren Substraten charakterisiert. Für die Substrate mit kleinem Porendurchmesser wurden unterschiedliche Proteinbeschichtungen aufgebracht, um das Zellwachstum zu unterstützen. Aufgrund der unter Kapitel 4.1.2 gezeigten Ergebnisse kann von einer guten Benetzbarkeit der Oberfläche und problemloser Porenbefüllung durch Zellkulturmedien ausgegangen werden. Die immunocytochemische Charakterisierung der Zellen auf porösen Substraten sowie die vergleichenden Untersuchungen an Zellen auf planaren Substraten wurden zum Teil im Rahmen von Diplomarbeiten<sup>1</sup> durchgeführt.

#### Planare Kulturoberflächen

Die Zellen bilden auf planaren Kultursubstraten (wie Petrischalen oder Deckgläschen) einen konfluenten Monolayer aus polygonalen, hohen, schmalen Zellen von 10-20  $\mu\text{m}$  Durchmesser aus (*cobblestone*-Morphologie). Bereiche hoher Zelldichten zeichnen sich dabei durch niedrigere Zelldurchmesser und höhere Zellkörper aus. Bei konfluentem Kulturstadium ist die Ausbildung sogenannter *blister* lichtmikroskopisch deutlich zu erkennen. Dabei handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Hohlräume unterhalb der Zellen, die durch den Transport von Ionen in den Zell-Substrat-Kontakt und den passiven Nachstrom von Wasser entstehen. Dies ist ein Vitalitätsmarker konfluenter MDCK II-Zellen auf planaren Substraten und führt zur punktuellen Ablösung und Anhebung des Zelllayers vom Substrat.

Als Differenzierungsmarker wurden, neben den *tight junction* (tj)-assoziierten Proteinen ZO-1 (*Zonula occludens*), Occludin und Claudin-1, auch das Aktin-Cytoskelett, das Adhäsionsprotein Vinkulin und die Natrium/Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) ausgewählt. Die jeweiligen charakteristischen Merkmale auf planaren Substraten, anhand derer anschließend der Ver-

---

<sup>1</sup> Die Daten für die porösen Substrate des Typs 1 sowie Vergleichsdaten an Zellen auf planaren Substraten wurden zum Teil von Jan Endell (Diplomarbeit, 2002) erstellt, die Untersuchungen an Zellen auf Substraten des Typs 2 wurden von Stefanie Michaelis (Diplomarbeit, 2005) durchgeführt.

gleich zu nanoporösen Substraten geführt wird, sollen nun kurz beschrieben werden. Die Kontrolle des Zweitantikörpers erfolgte routinemäßig, wird hier aber nur im Falle eines nicht eindeutig negativen Ergebnisses erwähnt.

**ZO-1:**

Die immunocytochemische ZO-1-Färbung zeigt eine räumlich scharf begrenzte Fluoreszenz, die praktisch ausschließlich entlang des Zellperimeters an den tj lokalisiert ist. Dadurch ist die Fluoreszenz auf eine schmale Ebene nahe der apikalen Zelloberfläche konzentriert. An Kontaktstellen zwischen drei oder mehr Zellen kommt es zu einer Anreicherung des Proteins.

**Occludin:**

Occludin zeigt ein dem ZO-1-Nachweis sehr ähnliches Bild. Auch hier folgt das Fluoreszenzsignal den Zellperimetern und bildet so eine netzartige Struktur mit hell erleuchteten Kontaktstellen mehrerer Zellen. Im Gegensatz dazu tritt allerdings zusätzlich eine deutliche Hintergrundfluoreszenz auf, die unterschiedlich intensiv aber ohne erkennbares Muster bleibt.

**Claudin-1:**

Es konnte für MDCK II-Zellen nur eine sehr schwache Kontrastierung gegenüber der Hintergrundfluoreszenz erreicht werden. Aus diesem Grund heben sich die Zellgrenzen schwächer als im Fall von ZO-1 und Occludin ab. Die Kontrolle des Zweitantikörpers (Anti-Kaninchen-TRITC) ergab eine schwache homogene Fluoreszenzverteilung ohne spezifisch angefärbte Strukturen. Dieses Ergebnis kann also nur zum Teil für die schwache Kontrastierung verantwortlich gemacht werden.

**Vinkulin:**

Vinkulin sorgt in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran für die zelluläre Verbindung der Integrine mit dem Aktincytoskelett. Die punktuellen Anfärbungen entstehen durch die Bündelung von einzelnen Integrinen zu Fokalkontakten. Die Färbung legt nahe, dass das Protein nicht statistisch verteilt ist, sondern eine Tendenz zu den Zellperimetern aufweist. Der Zweitantikörper führt zu einer leichten unspezifischen Hintergrundfluoreszenz.

**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase:**

MDCK II-Zellen besitzen als Epithelzelllinie eine polare Verteilung einzelner Proteine in der Plasmamembran. Beispiel für ein solches Protein ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Die ungleiche Verteilung wird besonders deutlich, wenn ein optischer xz-Schnitt angefertigt wird. Die höchste Fluoreszenzintensität wird auf der basolateralen Zellseite beobachtet, während die apikale

Seite deutlich schwächer fluoresziert. Die Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass diese polare Verteilung nicht bei allen Zellen gleich ausgeprägt ist. Eine schwache Fluoreszenz ist auf eine unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen.

### Aktin-Cytoskelett:

Durch Anfärbung des filamentösen Aktins durch TRITC-Phalloidin kann das Aktin-Cytoskelett spezifisch fluoreszenzmikroskopisch abgebildet werden. Es lassen sich drei Teilstrukturen deutlich unterscheiden: der Aktin Gürtel, die Stressfasern und die Mikrovilli. Der Aktin Gürtel zeigt eine sehr ähnliche Verteilung wie das ZO-1-Protein, da dieser ebenfalls an den Zell-Zell-Kontakten (*adherens junctions*) lokalisiert ist. Die Stressfasern einer Zelle verlaufen häufig gebündelt und parallel zueinander. Diese Bündel sind mit den Fokalkontakten als Start- und Endpunkte verbunden und dort leicht zu erkennen. Auf der apikalen Seite sind die mit Aktinfilamenten durchzogenen Mikrovilli als punktförmige Fluoreszenzsignale auf Höhe der Plasmamembran zu detektieren.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an MDCK II-Zellen auf planaren Substraten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tab. 4.1:** Expression der Differenzierungsmarker für die Epithelzelllinie MDCK II auf planarem Substrat. Legende: ++: sehr gut, +: gut, +/-: schwach.

	ZO-1	Occludin	Claudin-1	Vinkulin	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Aktin-Gürtel	Stressfasern	Mikrovilli
<b>Expressionsniveau</b>	++	++	+/-	++	++	++	++	++

### Nanoporöse Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1)

Analog zu den Untersuchungen auf planaren Substraten wurden die Zellen auf Typ 1-Substraten fünf Tage nach der Aussaat hinsichtlich der Ausprägung der Differenzierungsmarker mit dem CLSM untersucht. Es konnte im Gegensatz zu planaren Substraten kein konfluenter Zelllayer auf der porösen Oberfläche gefunden werden, sondern lediglich kleine Zellverbände von 20 bis 30 Zellen. Darüber hinaus lagen die Zellen innerhalb dieser Verbände abgeflacht vor.

Daher wurde versucht, durch die Beschichtung mit adhäsionsvermittelnden Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM) die Ausbildung eines konfluenten Layers zu unterstützen. Wie in Kapitel 4.1.2 bereits in anderem Zusammenhang beschrieben, erfolgt die Adhäsion von Zellen nicht direkt auf dem Substrat sondern über Proteine, die vorher daran adsorbiert haben (ECM). Untersucht wurden Beschichtungen mit Rattenschwanzkollagen, Fibronectin, Laminin, Gelatine und fötalem Kälberserum. Hinsichtlich des Bedeckungsgrades der Substrate mit Zellen zeigte sich die Beschichtung mit Fibronectin und Rattenschwanzkollagen als sehr erfolgreich, gefolgt von Gelatine und Serumproteinen. Lediglich die Lamininbeschich-

tung führte nicht direkt zu einem konfluenten Layer, obwohl hier letztendlich die höchste Zelldichte gefunden wurde. Die Untersuchung zur Ausprägung der Differenzierungsmarker wurde daher nur für die sehr gut geeigneten Beschichtungen mit Rattenschwanzkollagen sowie in Teilen auch für Fibronectin durchgeführt. Tabelle 4.2 zeigt dazu die Übersicht.

**Tab. 4.2:** Expression der Differenzierungsmarker für die Epithelzelllinie MDCK II auf porösem Silizium (Typ 1) mit Rattenschwanzkollagen- bzw. Fibronectinbeschichtung (100 mg/ml) im Vergleich zu Zellen auf planarem Substrat. Expressionsniveau: ++: sehr gut, +: gut, +/-: schwach, k.A.: keine Angabe.

	ZO-1	Occludin	Claudin-1	Vinkulin	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Aktin-Gürtel	Stressfasern	Mikrovilli
<b>Rattenschwanzkollagen</b>	++	++	-	+/-	++	++	+	++
<b>Fibronectin</b>	++	k.A.	k.A.	k.A.	++	++	+	++

Ein Vergleich der Tabellen 4.1 und 4.2 zeigt, dass der Differenzierungszustand der MDCK II-Zellen sich bezüglich der untersuchten Proteine nicht von dem auf einem planaren Substrat unterscheidet. Daher wird für alle folgenden Versuche von vollständig ausdifferenzierten Grenzflächengeweben ausgegangen. Da sich die Beschichtung mit Fibronectin im Laufe der Arbeit als reproduzierbarer herausgestellt hat, wurde für die Untersuchungen im Rahmen des Permeationsassays und der Impedanzspektroskopie mit Fibronectin beschichtet.

### **Nanoporöse Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3 µm (Typ 2)**

Aufbauend auf den Untersuchungen für Substrate des Typs 1, wurden MDCK II-Zellen auch auf Typ 2-Substraten hinsichtlich der Verteilung von Differenzierungsmarkern untersucht. Dazu erfolgte die Aussaat sowohl auf unbeschichtete als auch auf beschichtete Substrate (Fibronectin). Die mikroskopische Dokumentation erfolgt nach 24 h in Kultur. Hierbei zeigte sich zunächst eindeutig, dass im Gegensatz zu den Typ 1-Substraten für ein konfluentes Zellwachstum eine Beschichtung mit adhäsionsvermittelnden Proteinen nicht zwingend notwendig ist. Die anschließenden Anfärbungen des Aktin-Cytoskeletts sowie des peripheren Membranproteins ZO-1 zeigen darüber hinaus, dass kein signifikanter Unterschied in der jeweiligen Ausprägung des Merkmals zu Zellen auf Typ 1 und auf planaren Substraten nachgewiesen werden kann. Als schwierig erwies sich die Detektion von Fluoreszenz in unmittelbarer Nähe zur Substratoberfläche, da hier die Unterscheidung zwischen realem Objektpunkt und Spiegelung nicht eindeutig möglich ist (Kapitel 4.1.2). Dieser Effekt ist aufgrund der breiteren Stege für die hier untersuchten Substrate stärker zu beachten als bei den zuvor eingesetzten Substraten (Typ 1) mit einer Stegbreite von nur 100 nm. Vor allem für die Detektion der Stressfasern ergaben sich dadurch Probleme. Eine Minimierung dieses Störeffektes lies sich teilweise durch Reduzierung des Durchmessers der konfokalen Blende errei-

chen, eine vollständige Unterdrückung gelang jedoch nicht. Dadurch sind Untersuchungen, die eine mikroskopische Dokumentation in substratnahen Bereichen erfordern, nicht sinnvoll. Von einer spezifischen Anfärbung der Fokalkontakte (Vinkulin) oder der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde daher abgesehen.

Da das Aktin-Cytoskelett eine große Bedeutung für die mechanische Stabilität der Zellkörper aber auch für physiologische Prozesse besitzt (Rotsch und Radmacher, 2000; A-Hassan et al., 1998), wird eine ähnliche Ausprägung gegenüber Zellen auf planarem Substrat als ausreichendes Indiz für vitale, ausdifferenzierte Zellen gewertet. Weiterhin kann durch die Anfärbung des tj-assoziierten Proteins ZO-1 gezeigt werden, dass das Protein entlang der Zellgrenzen im gesamten Layer exprimiert ist. *Tight junctions* sind für ein barrierebildendes Grenzflächenepithel charakteristisch.

Tabelle 4.3 gibt die Ergebnisse in einer Übersicht wieder.

**Tab. 4.3:** Expression der Differenzierungsmarker für die Epithelzelllinie MDCK II auf porösem Silizium (Typ 2) ohne Beschichtung sowie mit Fibronectinbeschichtung im Vergleich zu Zellen auf planarem Substrat. Expressionsniveau: ++: sehr gut, +: gut, k.A.: keine Angabe.

Beschichtung	ZO-1	Aktin-Gürtel	Stressfasern	Mikrovilli
unbeschichtet	++	++	+(+)	++
Fibronectin	k.A.	++	++	++

Die Ergebnisse zeigen, dass Zellschichten auf Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von 1.3  $\mu\text{m}$  ohne Proteinbeschichtung vollständig ausdifferenzieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wird für Permeationsexperimente und für impedanzspektroskopische Untersuchungen auf Typ 2-Substraten keine Beschichtung der Oberflächen vorgenommen.

#### 4.2.2 Immunocytochemische Charakterisierung der Primärkultur des porcinen *Plexus chorioideus* Epithels

Die primärkultivierten Epithelzellen des porcinen *Plexus Chorioideus* wurden ebenfalls als Modellsystem auf nanoporösen Substraten untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst in serumhaltigem Medium ausgesät. In diesem Kulturschritt steht die Proliferation im Vordergrund. Zur vollständigen Ausdifferenzierung der Zellen *in vitro* sind im Anschluss zwei Voraussetzungen unerlässlich: Die Zellen benötigen ein permeables Substrat, das den Aufbau chemischer Gradienten über die Zellschicht ermöglicht, und der Differenzierungsprozess muss durch den Entzug des Serums („Serumentzug“) induziert werden (Haselbach et al., 2001). Der Entzug des Serums aus dem Kulturmedium wurde standardmäßig am Kulturtag 9 durchgeführt. Die dadurch induzierten Prozesse bzw. die daraus resultierenden Merkmale charakterisieren ein ausdifferenziertes Epithel. So wird auf permeablem Substrat eine Ab-

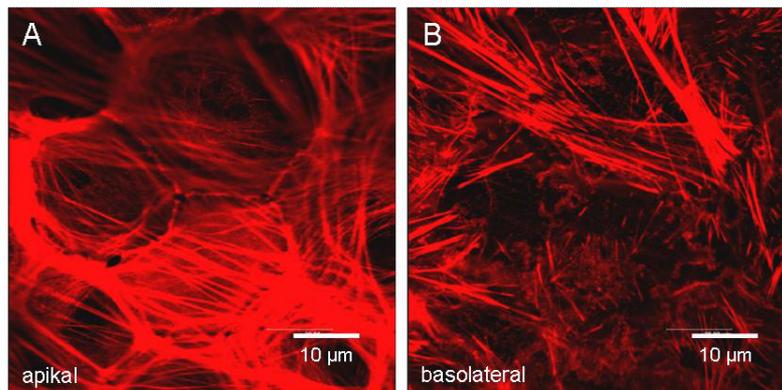
nahme der Permeabilität für kleine Moleküle bzw. zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstandes ( $R_{cl}$ ) beobachtet (Angelow et al., 2004). Da parallel zur Modulation des transepithelialen Widerstandes Veränderungen in der Ausprägung des Cytoskeletts beobachtet werden, wird ein regulatorischer Einfluss des Cytosketts auf die Zell-Zell-Verbindungen vermutet (Angelow, 2004). Charakteristisch für ein ausdifferenziertes Aktin-Cytoskelett ist ein Aktinürtel im apikalen Bereich der Zellen sowie (schwach) ausgeprägte Stressfasern im basolateralen Bereich. Zusätzlich stabilisiert das Aktingerüst die Mikrovilli der apikalen Membran. Ein ausgeprägter Mikrovillisaum ist charakteristisch für ausdifferenzierte Zellen (Hakvoort et al., 1998). Mikroskopisch sichtbar wird der Differenzierungsprozess außerdem durch die Ausbildung einer deutlichen epitheltypischen Polarität für die Verteilung einzelner Membranproteine. So ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase am apikalen Pol der Zellen lokalisiert (Gath et al., 1997). Angelow (2004) hat darüber hinaus das Aktin-Cytoskelett für den Zustand untersucht, wenn vollständig ausdifferenzierte Zellen durch Serumzugabe stimuliert wurden. Für diesen Fall verändert sich die Verteilung, sowohl basolateral als auch apikal wird ein ausgeprägtes Geflecht von Stressfasern beobachtet. Untersuchungen des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1 zeigen unter diesen Bedingungen Ein- und Ausstülpungen der Membran, so dass kein einheitliches Bild einer netzartigen Verteilung für das Protein entlang der Zellgrenzen in Höhe der *tight junctions* entsteht. Dies lässt wiederum einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der *tight junctions* und dem Aktin-Cytoskelett vermuten. Der transepitheliale Widerstand sinkt nach Zugabe des Serums.

Um eine Einordnung des Differenzierungszustandes der Epithelzellen des *Plexus Chorioideus* auf nanoporösen Substraten zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen auch an Zellen auf planaren Substraten durchgeführt, die die Voraussetzung eines permeablen Substrates zur Differenzierung nicht erfüllen. Dadurch sollte eine Einordnung dahingehend möglich sein, ob die Strukturierung der verwendeten nanoporösen Substrate für die Zellen eher die Merkmale eines planaren oder permeablen Substrates besitzen. Die Zellen werden also nicht ausschließlich aufgrund der hohen physiologischen Relevanz eingesetzt, darüber hinaus ist von Interesse, ob ein poröses Silizium-Substrat diese vollständige Ausdifferenzierung analog zu einem permeablen Substrat unterstützen kann.

Sowohl für die Aussaat und Kultur der Zellen auf nanoporösen (Typ 1) als auch auf planaren Substraten galt, dass sämtliche Kulturschritte analog zu dem von Haselbach et al. (2001) vorgestellten Protokoll für permeable Filtermembranen durchgeführt wurden. Alle Substrate wurden 24 h vor Zellaussaat mit Laminin beschichtet.

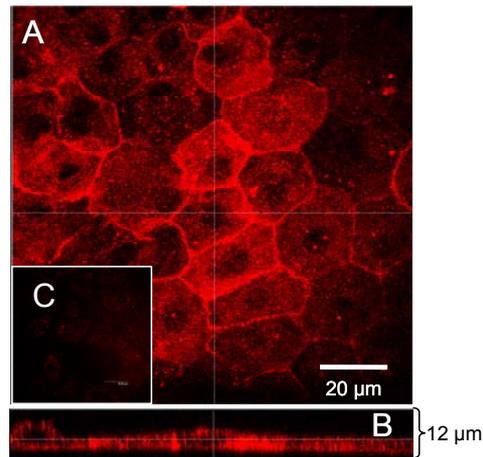
### Charakterisierung des Differenzierungszustandes des *Plexus chorioideus* auf planaren Substraten

Die Ausprägung des Cytoskeletts auf planaren Substraten, bei denen standardmäßig das Serum entzogen wurde, ähnelt in den charakteristischen Punkten nicht der beschriebenen Verteilung auf permeablen Substraten. Abbildung 4.11 **A** zeigt einen optischen xy-Schnitt direkt unterhalb der apikalen Zellmembran. Es sind deutlich ausgeprägte Stressfasern und zum Teil der Aktinürtel sichtbar. Es konnte keine optische Ebene gefunden werden, in der Anzeichen für Mikrovilli erkennbar waren. Im basolateralen Bereich (Abbildungsteil **B**) sind ebenfalls ausgeprägte Stressfasern zu erkennen, die in Fokalkontakten gebündelt sind. Insgesamt ähnelt die Situation stark der Ausprägung des Cytoskeletts auf permeablen Substraten unter Serumeinfluss (Angelow, 2004).



**Abb. 4.11:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primär kultivierter Zellen des *Plexus chorioideus* auf planarem Substrat nach einer Aktin-Markierung mit TRITC-Phalloidin. **A:** apikale Schnitt Ebene: es sind stark ausgeprägte Stressfasern sowie der Aktinürtel zu erkennen, jedoch keine Mikrovilli. **B:** basolaterale Schnitt Ebene: es sind Stressfasern sichtbar, die in Fokalkontakten zusammenlaufen.

Abbildung 4.12 **B** zeigt einen optischen xy-Schnitt in Höhe der apikalen Membran mit homogener Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der Membran. Durch Abbildungsteil **B** wird allerdings deutlich, dass die ATPase über die gesamte Membran verteilt ist und keinerlei Polarität für die Verteilung gefunden werden kann. Somit kann für die Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase keine Polarität mit verstärkter Lokalisation am apikalen Pol der Zellen festgestellt werden. Abbildungsteil **C** zeigt die Kontrolle des Zweitantikörpers, es wird wenig unspezifische Fluoreszenz beobachtet.

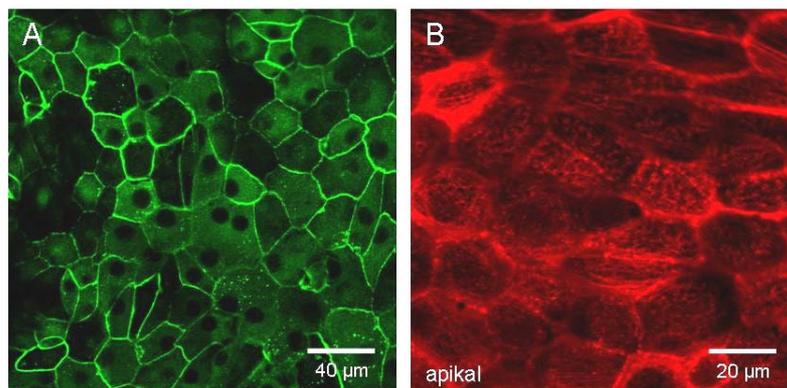


**Abb. 4.12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf planarem Substrat. **A:** Aufsicht in Höhe der apikalen Zellmembran, **B:** xz-Schnitt: die Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zeigt keine Polarität. **C:** Kontrolle des Zweitantikörpers.

Sowohl die Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als auch das Cytoskelett zeigen auf planaren Substraten nicht die Polarität bzw. Verteilung eines voll ausdifferenzierten *Plexus*-Epithels.

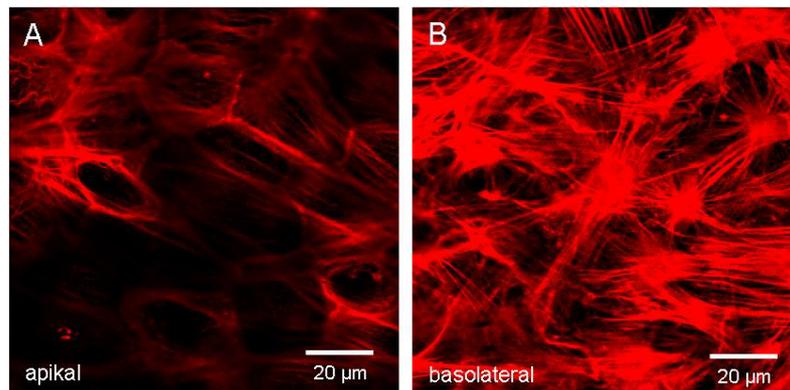
#### Charakterisierung des Differenzierungszustandes der primärkultivierten Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf porösen Silizium-Substraten (Typ 1)

Die Zellen wurden auf nanoporöse Substrate ausgesät und immuncytochemisch untersucht. Abbildung 4.13 **A** zeigt zunächst die Anfärbung des *tight junctions*-assoziierten Proteins ZO-1 in einer konfluenten Zellschicht. Ein Teil der Zellgrenzen wurde homogen angefärbt, was der Erwartung für ein barrierebildendes Epithel entspricht. Darüber hinaus sind aber in der Abbildung auch Bereiche zu erkennen, in denen die netzartige Struktur unterbrochen ist, so dass von keiner eindeutig einheitlichen Ausprägung gesprochen werden kann.



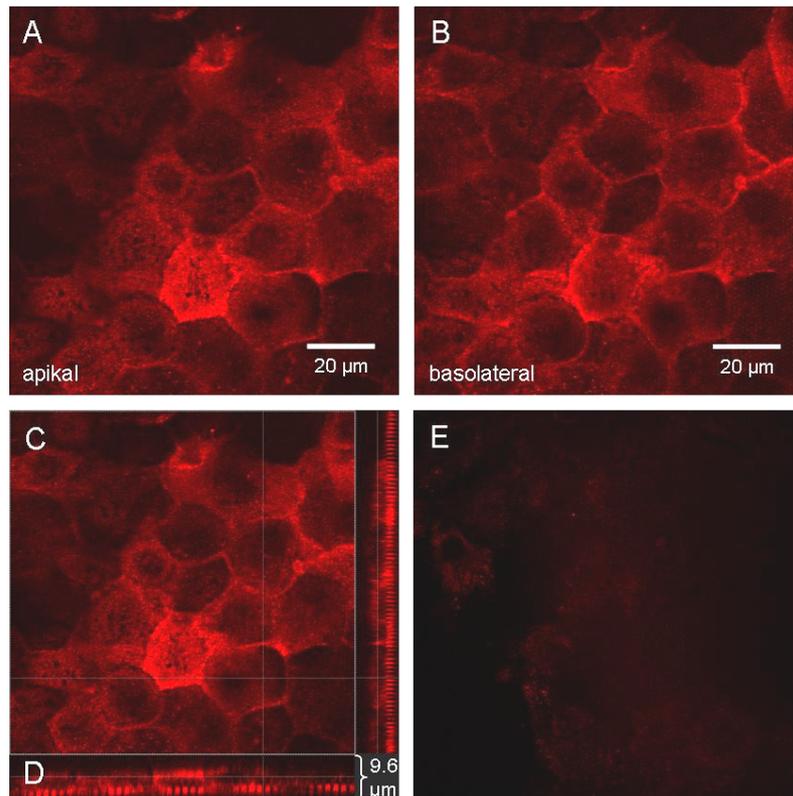
**Abb. 4.13:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärkultivierter Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf porösem Substrat (Typ 1). **A:** Immuncytochemische Markierung und Färbung des *tight junction*-assoziierten Proteins ZO-1. Die Zellgrenzen treten netzartig hervor. **B:** Färbung des filamentösen Aktins mit TRITC-Phalloidin im Bereich der apikalen Zellmembran.

Abbildungsteil **B** zeigt die Anfärbung des filamentösen Aktins in Höhe der apikalen Zellmembran. Die punktförmig detektierte Fluoreszenz im gezeigten Ausschnitt lässt vermuten, dass die Zellen Mikrovilli ausbilden. In anderen Bereichen der Färbung lassen sich aber keine ähnlichen Strukturen finden, so dass insgesamt in Bezug auf die Mikrovilli ein heterogenes Bild entsteht. Abbildung **4.14** veranschaulicht diese Situation. Im Bereich der apikalen Zellmembran (**A**) können Stressfasern angefärbt werden, allerdings werden kaum bzw. keine punktförmigen Fluoreszenzsignale detektiert. Im Bereich der basalen Zellmembran (**B**) werden kräftige Stressfaserbündel abgebildet, die in Fokalkontakte münden.



**Abb. 4.14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärkultivierter Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf porösem Substrat (Typ 1) nach der Aktin-Markierung mit TRITC-Phalloidin. **A:** in Höhe der apikalen Zellmembran, Stressfasern werden detektiert, jedoch keine Mikrovilli. **B:** nahe der basolateralen Membran, kräftige Stressfaserbündel durchziehen die Zellen und münden in Fokalkontakten.

Für die Aktin-Anfärbung ergab sich ein uneinheitliches Bild. Daher sollte die spezifische Anfärbung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einen weiteren Hinweis auf den Differenzierungszustand liefern. Abbildung **4.15 A-E** zeigt die Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der Membran. Deutlich wird, dass sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran Fluoreszenzsignale detektiert werden. Aufgrund der Reflexion an der Substratoberfläche ist die basolaterale Membran in der z-Ansicht (**D**) nicht eindeutig zu identifizieren. Abbildungsteil **B** verdeutlicht allerdings zweifelsfrei, dass auch in Höhe der basolateralen Membran Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Kontrolle des Zweitantikörpers (**E**) zeigt kein spezifisches Signal.



**Abb. 4.15:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der Membran primärkultivierter Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf porösem Silizium (Typ 1). **A:** apikale Membran, **B:** basolaterale Membran. **D:** xz-Ansicht; die Reflexion an der Oberfläche des Substrates erschwert die Abbildung der basolateralen Membran. **E:** Kontrolle des Zweitantikörpers.

Die immunocytochemische Charakterisierung von Epithelzellen des *Plexus chorioideus* auf nanoporösen Substraten ergab kein einheitliches Bild. Es kann ein konfluenter Zelllayer auf der porösen Oberfläche etabliert werden, allerdings weist die Ausbildung des Aktin-Cytoskeletts deutliche Ähnlichkeiten zu Zellen auf Filtersubstraten unter Serumeinfluss oder auf planaren Substraten auf. Darüber hinaus wird keine polare Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als wichtiges Merkmal nachgewiesen. Im Gegensatz zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Epithelzelllinie MDCK II auf Typ 1-Substraten zeigen diese Untersuchungen, dass die Epithelzellen des *Plexus chorioideus* nicht vollständig ausdifferenzieren.

#### 4.2.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung von MDCK II-Zellen auf nanoporösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten

Das Aufbringen einer leitfähigen Schicht auf die Oberfläche der porösen Silizium-Substrate ist für die Anwendung des von *Giaever* und *Keese* (1984) vorgestellten ECIS-Modells unabdingbar. Dies soll dazu genutzt werden, sowohl die Substratoberfläche als auch die Zellschicht impedanzspektroskopisch zu charakterisieren. Das Modell ist allerdings für planare Goldfilmelektroden entwickelt worden, die Anwendung auf porösen Elektroden ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Daher steht zunächst eine impedanzspektroskopische

Untersuchung zellfreier Substrate im Vordergrund, um die Einflussnahme der Oberflächentopographie auf die Spektren zu charakterisieren.

In Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass das Aufbringen eines 100 nm dicken Goldfilmes zu einer kompletten Belegung der Oberfläche der porösen Substrate führt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen, dass auch die Vorätzstrukturen mit Gold ausgekleidet werden, was zu einer Oberflächenvergrößerung nicht nur gegenüber der reinen Stegfläche sondern auch gegenüber einer planaren Vergleichsfläche gleicher Kantenlänge führen sollte. Inwieweit allerdings diese Oberflächenbereiche tatsächlich leitend mit der Stegfläche in Verbindung stehen, kann optisch nur unzureichend geklärt werden (Kapitel 4.1.1).

#### 4.2.3.1 Impedanzspektroskopische Charakterisierung zellfreier planarer und poröser Goldelektroden

Aufgrund der halbleitenden Eigenschaften von Silizium wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Elektrodenpräparation eingesetzt. Für die Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1) wurde nach Aufbringen eines Goldfilmes eine Abgrenzung des verwendeten Elektrodenbereiches durch das Aufkleben eines Kunststoffhütchens erreicht. Analog dazu wurde ein goldbesputtertes Deckglas präpariert. Für Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3  $\mu\text{m}$  (Typ 2) konnte aufgrund der isolierenden  $\text{SiO}_2$ -Zwischenschicht auf ein photolithographisches Verfahren zur Elektrodenbegrenzung zurückgegriffen werden. Abbildung 4.16 A zeigt beispielhaft die Impedanzspektren zweier Goldelektroden (planar und Typ 1) sehr ähnlicher geometrischer Größe<sup>2</sup> ( $A \sim 0.009 \text{ cm}^2$ ) in Kontakt mit Kulturmedium. Der typische Kurvenverlauf einer Goldelektrode zeichnet sich im hochfrequenten Bereich ( $f > 2 \text{ kHz}$ ) durch einen annähernd frequenzunabhängigen Verlauf aus, hier wird die Gesamtimpedanz des Systems vom Elektrolytwiderstand der *bulk*-Phase bestimmt. Bei niedrigeren Frequenzen ( $f < 100 \text{ Hz}$ ) dominiert die Kapazität der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt. In der doppellogarithmischen Darstellung resultiert daraus der lineare Anstieg der Messgröße mit abnehmender Frequenz. Es zeigt sich ein analoger Kurvenverlauf für das planare und das poröse Substrat, wobei die Kurve für das poröse Substrat zu niedrigen Frequenzen verschoben ist.

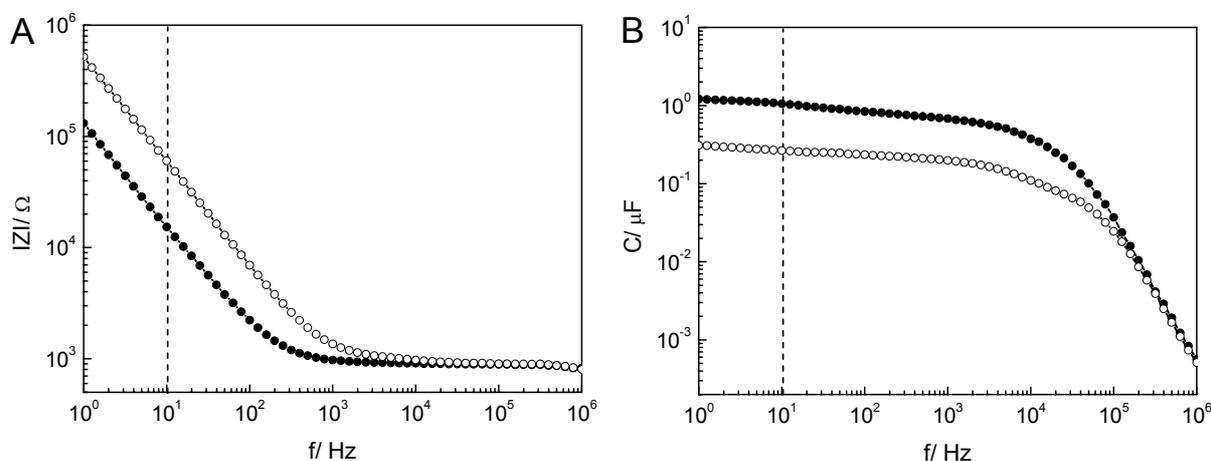
Die Kapazität der Elektroden ist bei gleichem Elektrodenmaterial rein flächenabhängig, wenn ansonsten von gleichen Bedingungen ausgegangen werden kann. Dadurch kann die Kapazität zur Flächenbestimmung herangezogen werden. Da sich die Oberflächen allerdings aufgrund lokaler Unterschiede in der Grenzflächentopographie und der chemischen Zusam-

---

<sup>2</sup> Die geometrische Größe bezieht sich hier und im Folgenden auf die Kreisfläche, die aus der Begrenzung der Elektrodenfläche resultiert. Die Angabe berücksichtigt daher keine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche.

menetzung elektrisch nicht ideal verhalten (Wegener, 1998), wird zur Beschreibung der Grenzflächenimpedanz ein rein empirisches Impedanzelement herangezogen, das sogenannte konstante Phasenelement (CPE). Entsprechend der Heterogenität der Oberfläche vereinigt dieses Element sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften, weshalb eine nachträgliche Trennung zur Bestimmung der Kapazität nicht möglich ist.

Die gemessene Gesamtimpedanz des Systems setzt sich aus einem Realteil, der die ohmschen Anteile widerspiegelt und einem Imaginärteil, der sich aus den kapazitiven Beiträgen ergibt, zusammen. Wie für das Impedanzspektrum erläutert, dominiert die Kapazität der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt die Impedanz im Frequenzbereich  $f < 10^2$  Hz. Entsprechend gilt dies für die beiden Komponenten der Impedanz, so dass der kapazitive Anteil in diesem Frequenzbereich die Kapazität der Arbeitselektrode widerspiegelt. Durch den Vergleich der Kapazität bei 10 Hz sollte somit ein Rückschluss auf eine Flächenveränderung aufgrund der Porosität möglich sein. Abbildung 4.16 B zeigt die Entwicklung der Gesamtkapazität in Abhängigkeit von der Frequenz. Der starke Abfall bei hohen Frequenzen ( $f > 10^4$  Hz) spiegelt parasitäre Einflüsse des Messaufbaus wider, die im Spektrum der Gesamtimpedanz (A) durch den *bulk*-Widerstand überlagert werden. Da sich die Gesamtkapazität des Systems frequenzabhängig verhält, muss eine Referenzfrequenz ( $f < 10^2$  Hz) gewählt werden, auf die sich die Angaben der Kapazität für die einzelnen Oberflächen beziehen. Die gestrichelte Linie markiert dazu 10 Hz.



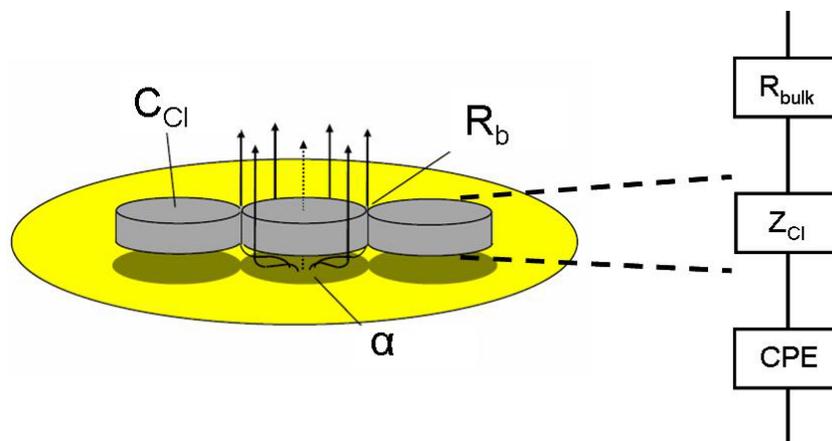
**Abb. 4.16:** **A:** Impedanzspektrum einer planaren ( $\circ$ ) Goldelektrode und einer Goldelektrode auf einem nanoporösen Siliziumsubstrat ( $\bullet$ ) (Typ 1) ähnlicher geometrischer Flächen ( $A = 0.0091 \text{ cm}^2$  und  $0.0087 \text{ cm}^2$ ). **B:** Entwicklung der Gesamtkapazität der Impedanz als Funktion der Frequenz.

Durch Bestimmung der Kapazität bei 10 Hz und Division durch die geometrische Fläche<sup>2</sup> äußert sich eine Oberflächenzunahme der elektrisch zugänglichen Fläche in einem Anstieg der elektrodenspezifischen Gesamtkapazität. Für planare Goldelektroden auf Deckgläschen wird eine Gesamtkapazität von  $(29.1 \pm 1.4) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ermittelt ( $n = 10, \pm \text{SDM}$ ), für Elektroden des Typs 1 ein Wert von  $(95.3 \pm 6.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 4, \pm \text{SDM}$ ). Das entspricht einer Zunahme um den Faktor 3.3. Für photolithographisch hergestellte Elektroden auf Siliziumdioxid (Typ 2)

liegt der Wert bei  $(32.3 \pm 1.6) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Der Wert ist im Vergleich zur Gesamtkapazität der Typ 1-Substrate mit kleinerem Porendurchmesser überraschend niedrig. Aufgrund der rechnerisch möglichen Oberflächenvergrößerung durch die Vorätzstrukturen wurde ein höherer Wert erwartet.

#### 4.2.3.2 Impedanzspektroskopische Charakterisierung von MDCK II-Zellen auf planaren und porösen Elektroden mit Hilfe des ECIS-Modells

Durch Messung der frequenzabhängigen Zellschichtimpedanz  $Z_{Cl}$  und Analyse der Daten nach dem ECIS-Modell werden die Zellen hinsichtlich der Dichtigkeit ihrer Zell-Zell-Verbindungen, der Güte des Zell-Substrat-Kontaktes und der Zellschichtkapazität untersucht. Die Aussagen bezüglich der parazellulären Impedanzbeiträge, die auf die Barrierefunktion schließen lassen, werden durch den Parameter  $R_b$  quantifiziert, die Zell-Substrat-Interaktionen werden durch  $\alpha$  wiedergegeben. Zusammen mit der spezifischen Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  wird so eine umfassende Charakterisierung der Zellen möglich und die Methode ist damit geeignet, morphologische Veränderungen der Zellen als Reaktion auf die Substratopographie zu detektieren (**Abb. 4.17**). Die Spektren zellbewachsener Elektroden werden nach einem Verfahren von *Wegener et al.* (2000) ausgewertet. Das CPE repräsentiert die Grenzflächenimpedanz Elektrode/Elektrolyt und wird durch die Parameter  $A$  und  $n$  beschrieben.



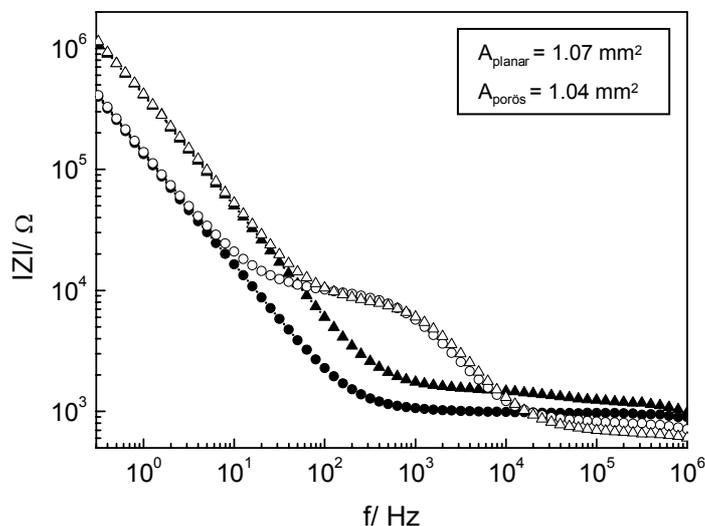
**Abb. 4.17:** Ersatzschaltbild einer zellbewachsenen Elektrode zur Veranschaulichung des Modells von *Giaever und Keese* (1993).  $R_{bulk}$  symbolisiert den ohmschen Widerstand der Elektrolytlösung.  $Z_{Cl}$  setzt sich aus  $R_b$ , dem ohmschen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte,  $\alpha$  dem frequenzabhängigen Impedanzbeitrag der Zell-Substrat-Kontakte und  $C_{Cl}$ , der Zellschichtkapazität zusammen. Das konstante Phasenelement (CPE) steht für die nicht-ideale Grenzflächenimpedanz Elektrode/Elektrolyt.

#### Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1)

Wie eingangs des Kapitels beschrieben, wird die Fläche der Arbeitselektrode durch das Aufkleben eines Kunststoffhütchens definiert. Dieser Aufbau wird auch für die Vergleichssubstrate auf planaren, goldbesputterten Deckgläschen eingesetzt. Daraus resultiert ein sehr kleines Kompartiment oberhalb des Zelllayers. Das kleine Volumen macht das System allerdings

extrem anfällig für die Verdunstung von Medium und ist daher nicht für kontinuierliche Messungen geeignet. Der Adhäsionsprozess der Zellen konnte daher nicht dokumentiert werden. Für die Flächennormierung wird die geometrische Fläche der Elektrode genutzt.

Abbildung 4.18 zeigt die typischen Impedanzspektren zellfreier (gefüllte Symbole) sowie zellbedeckter (offene Symbole) Goldfilmelektroden ähnlicher geometrischer Flächen. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Beide Oberflächen zeigen grundsätzlich das gleiche frequenzabhängige Impedanzverhalten, deutlich tritt jedoch die Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen ( $f < 10$  Hz) für die poröse Elektrode ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) im Vergleich zur der planaren ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) hervor. Wie bereits im Rahmen der Untersuchungen der zellfreien Elektroden vermutet wurde (Kapitel 4.2.3.1), wird als Grund hierfür eine Kapazitätzunahme aufgrund der durch die Porosität verursachten Vergrößerung der Oberfläche bei ähnlicher geometrischer Größe der Arbeitselektroden angenommen. Im Bereich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz zeigen die Impedanzspektren zellbedeckter Elektroden ( $\Delta$ ,  $\circ$ ) einen annähernd deckungsgleichen Verlauf, ein paralleler Versatz zu niedrigeren Frequenzen wird hier nicht bestimmt. Dieser visuelle Eindruck lässt auf sehr ähnliche Beiträge der einzelnen Zellparameter zur Gesamtimpedanz schließen. Im Bereich von Frequenzen ( $f > 3 \cdot 10^4$  Hz) werden die Spektren vom Elektrolytwiderstand dominiert, die unterschiedlichen Impedanzwerte sind Resultat unterschiedlicher Eintauchtiefen der Gegenelektrode ins Medium.

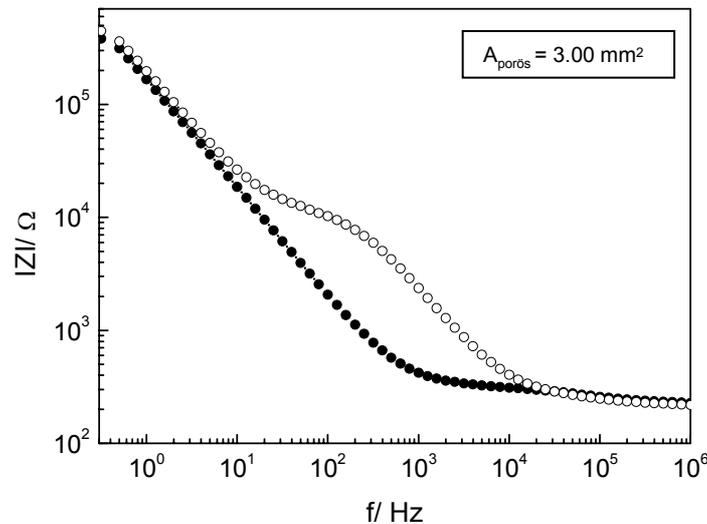


**Abb. 4.18:** Typische Impedanzspektren zellfreier (gefüllte Symbole) sowie zellbedeckter (offene Symbole) poröser (Typ 1) und planarer Elektroden ähnlicher geometrischer Größe bei 37 °C. Bei Frequenzen  $f < 10$  Hz ist das Spektrum für das nanoporöse Substrat ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) gegenüber dem planaren ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) zu niedrigeren Frequenzen verschoben. Im Bereich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz zeigen die Impedanzspektren zellbedeckter Elektroden einen annähernd deckungsgleichen Verlauf.

### Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3 $\mu\text{m}$ (Typ 2)

Das in Abbildung 4.19 dargestellte Impedanzspektrum zeigt, dass auch auf dieser porösen Oberfläche grundsätzlich ein zu Zellen auf planarem Substrat analoges frequenzabhängiges

Impedanzverhalten detektiert wird. Deutlich spiegelt sich der Einfluss der Zellen ( $\circ$ ) im Bereich von  $10$ - $10^4$  Hz im Vergleich zur leeren Elektrode wider ( $\bullet$ ).



**Abb. 4.19:** Typische Impedanzspektren einer porösen, zellfreien ( $\bullet$ ) und zellbedeckten ( $\circ$ ) Elektrode (Typ 2) bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Spektren zeigen die charakteristische Frequenzabhängigkeit der Impedanz für Goldfilmelektroden, im Bereich zwischen  $10^1$  und  $10^4$  Hz spiegelt sich der Beitrag der Zellen zur Gesamtimpedanz wider.

#### Analyse der Impedanzspektren nach dem ECIS-Modell

Die Übertragungsfunktion wurde an die Rohdaten angepasst. Durch Normierung der Zell- und Elektrodenparameter auf die geometrischen Elektrodengrößen wird ein Vergleich der einzelnen Parameter für die unterschiedlichen Oberflächen möglich. Tabelle 4.4 zeigt die Mittelwerte ( $\pm$  SDM) für die einzelnen Parameter. Für den spezifischen parazellulären Widerstand  $R_b$ , der ein Maß für die Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte ( $t_j$ ) ist, ergibt sich eine Tendenz zu höheren Widerständen auf porösen Substraten, wobei der Wert für Zellen auf Typ 2-Substraten mit  $(148 \pm 14) \Omega\text{cm}^2$  deutlich über dem auf Substraten des Typs 1 ( $(63 \pm 8) \Omega\text{cm}^2$ ) und dem für Zellen auf planaren Substraten ( $(48 \pm 7) \Omega\text{cm}^2$ ) liegt. Ein Rückschluss auf die Ausprägung der *tight junctions* bzw. der Vergleich der Barrierefunktion ist allerdings nur dann zulässig, wenn im Mittel von gleichen Zellgrößen ausgegangen werden kann. Für barrierebildende Zellen entsteht der Hauptteil an  $R_b$  aus den Zell-Zell-Kontakten und speziell den *tight junctions* der Zellschicht (Wegener et al. 2000). Neben der Spaltgeometrie nimmt allerdings die Zellgröße und damit die durchschnittliche Länge der Zellumfänge Einfluss auf den Wert von  $R_b$ . Kleinere Zellen erzeugen auf der gleichen geometrischen Fläche durchschnittlich eine höhere Anzahl an Zell-Zell-Kontakten, d.h. die Anzahl der parallelgeschalteten Einzelwiderstände pro Fläche wird erhöht. Diese gehen in den Gesamtbetrag von  $R_b$  durch Addition der reziproken Werte ein und verursachen so dessen Erniedrigung. Um den Einfluss der Zellgrößen zu ermitteln, wird anhand mikroskopischer Bilder der mittlere Zellradius  $r_c$  von Einzelzellen bestimmt und die Standardabweichung des Mittelwertes errechnet. Die individuellen Werte unterliegen einer breiten Streuung, durch eine große Stich-

probe an Einzelzellen kann ein repräsentativer Mittelwert bestimmt werden. Für die MDCK II-Zellen auf planaren Substrat wird ein mittlerer Zellradius von  $(7.9 \pm 0.3) \mu\text{m}$  bestimmt ( $n = 43$ ). Für MDCK II-Zellen auf nanoporösen Substraten des Typs 1 werden Radien von  $(7.6 \pm 0.3) \mu\text{m}$  ( $n = 49$ ) ermittelt, es zeigt sich also kein signifikanter Unterschied zu Zellen auf planaren Substraten. Auf Substraten des Typs 2 dagegen wird ein signifikant höherer Wert gefunden. Hier zeigen MDCK II-Zellen Radien von  $(10.5 \pm 0.2) \mu\text{m}$  ( $n = 86$ ). Die Zellen sind also im Mittel deutlich größer. Für den spezifischen parazellulären Widerstand bedeuten diese Untersuchungen, dass aufgrund der Zellradien eine Erhöhung der parazellulären Widerstände um etwa 30 % gegenüber Zellen auf planarem Substrat resultieren könnte. Die gemessene Erhöhung entspricht allerdings einer Erhöhung um etwa 300 %.

Der Impedanzbeitrag  $\alpha$  ermöglicht eine elektrische Charakterisierung des Adhäsionskontaktes zwischen Zelle und Substrat. Aus der Definition von  $\alpha$  ergibt sich, dass der Radius der Zellen als Faktor in die Berechnung eingeht und so eine erhebliche Rolle spielt. Für MDCK II-Zellen auf planarem Substrat wird für  $\alpha$  ein Wert von  $(11.6 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$  ermittelt, für Zellen auf porösen Oberflächen des Typs 1 ein Wert von  $(16.6 \pm 1.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$ . Auf Oberflächen des Typs 2 wird  $\alpha$  mit  $(26.2 \pm 1.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$  bestimmt, und ist damit um mehr als das zweifache größer als für planare Substrate ermittelt wurde. Diese Entwicklung kann also nicht ausschließlich durch die Zellradien, die gegenüber einem planaren Substrat um den Faktor 1.3 erhöht sind, erklärt werden.

Die flächenspezifische Kapazität  $C_{Cl}$  liefert Informationen über die Topographie der Zellmembran und ist unabhängig von den Zellradien. Das ECIS-Modell ermöglicht allerdings keine Unterscheidung zwischen apikaler und basolateraler Membran. Häufig wird jedoch eine Erhöhung der Zellschichtkapazität auf Flächenvergrößerungen durch Membranaufwerfungen der apikalen Membran zurückgeführt. Beispiel hierfür ist die Ausbildung von Mikrovilli. Für MDCK II-Zellen auf Deckgläschen wird  $C_{Cl}$  zu  $(1.73 \pm 0.06) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt. Auf porösen Substraten des Typs 1 zeigt sich ein erhöhter Wert von  $(2.15 \pm 0.10) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Die Erhöhung spiegelt eine nur leichte Flächenzunahme der Membran wider. Das steht in guter Übereinstimmung zu dem visuellen Eindruck für die oben gezeigten Spektren gleicher Elektrodengröße, die kaum Unterschiede im Frequenzbereich  $10^3$ - $10^4$  Hz zeigen (**Abb. 4.18**). Für MDCK II-Zellen auf Oberflächen des Typs 2 wird eine deutliche Erhöhung für die Zellschichtkapazität auf  $(2.69 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ermittelt.

Die einzelnen Parameter sind in Abhängigkeit von den Substraten in Tabelle **4.4** zusammengestellt.

**Tab. 4.4:** ECIS-Parameter von MDCK II-Zellen auf planaren und porösen Oberflächen unterschiedlicher Porendurchmesser (Mittelwert  $\pm$  SDM).

Oberfläche	ECIS-Parameter			CPE	
	$R_b$ [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	$\alpha$ [ $\Omega^{0.5}\text{ cm}$ ]	$C_{cl}$ [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]	$A$ [ $\mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ]	$n$
planar (n = 9)	48.4 $\pm$ 6.5	11.6 $\pm$ 0.8	1.73 $\pm$ 0.06	47 $\pm$ 6	0.92 $\pm$ 0.01
Typ 1 (n = 4)	62.8 $\pm$ 7.7	16.6 $\pm$ 1.4	2.15 $\pm$ 0.10	132 $\pm$ 6	0.94 $\pm$ 0.00
Typ 2 (n = 6)	148.2 $\pm$ 13.8	26.2 $\pm$ 1.4	2.69 $\pm$ 0.05	39 $\pm$ 2	0.95 $\pm$ 0.01

Neben den ECIS-Parametern der Zellschichten wurde das CPE näher bestimmt, um die Grenzfläche zwischen der Elektrode und dem Elektrolyten zu charakterisieren. Durch die Variation der Parameter  $A$  und  $n$  wird eine Anpassung an die Rohdaten erreicht. Für  $n$  gilt ein Zusammenhang zur Oberflächentopographie als wahrscheinlich (McAdams, 1995; Kurtyrka und de Levie, 1992), für den Grenzfall von  $n = 1$  entspricht  $A$  der Kapazität der Elektrode. Auf planaren Substraten wird  $A$  zu  $(47 \pm 6) \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ,  $n$  zu  $(0.92 \pm 0.01)$  bestimmt, auf porösen Typ 1-Substraten liegt  $A$  bei  $(132 \pm 6) \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$  und  $n$  bei  $(0.94 \pm 0.00)$ . Für poröse Typ 2-Substrate hat  $A$  einen Wert von  $(39 \pm 2) \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ,  $n$  von  $(0.95 \pm 0.01)$ . Das CPE vereint sowohl ohmsche als auch kapazitive Eigenschaften, und ist sensitiv für Veränderungen der elektrischen Eigenschaften der Arbeitselektrode. Ein direkter Rückschluss auf die Kapazität der Arbeitselektrode ist daher nicht möglich, allerdings korreliert die Entwicklung für den Parameter  $A$  mit der Entwicklung für die Gesamtkapazität des Systems bei 10 Hz (Kapitel 4.2.3.1). In beiden Fällen wird eine deutliche Zunahme des jeweiligen Parameters für Elektroden des Typs 1 gegenüber einer planaren Elektrode beobachtet, während für nanoporöse Elektroden des Typs 2 keine signifikanten Unterschiede bestimmt werden.

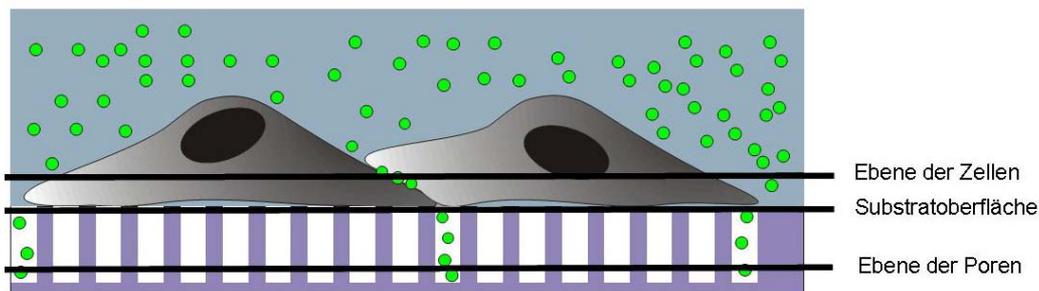
### 4.3 Lateral aufgelöste Permeationsstudien

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben, wie eingangs erwähnt, die Entwicklung eines Analyseverfahrens zur orts aufgelösten Bestimmung der Permeationswege von Molekülen über eine zelluläre Barriere zum Ziel. Das Konzept sieht vor, dass ein Sondenmolekül auf der apikalen Seite des Zelllayers angeboten wird und dieses dann entsprechend der molekularen Eigenschaften der Sonde den Zelllayer passiert. In den Poren des nanoporösen Substrates werden die Moleküle ortsfest unterhalb der Durchtrittsposition gesammelt. Die laterale Verteilung der Sonde in den Poren spiegelt dadurch den jeweiligen Permeationsweg über die Zellschicht wider. Im Fall der parazellulären Diffusion sollten vornehmlich Poren unterhalb der

Interzellularspalten Sondenmoleküle enthalten, während bei transzellulärem Durchtritt eine homogene Verteilung erwartet wird. Zunächst wurde die Möglichkeit des Einsatzes eines fluoreszenzmarkierten Sondenmoleküls genutzt und die Verteilung der Sonde mittels der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie untersucht. Da es sich hierbei um eine nicht-invasive und in der Anwendung einfache Methode handelt, die ohne vorherige Präparationsschritte an lebenden Zellen durchgeführt werden kann, wurde die Validierung des Konzeptes auf unterschiedlichen Substraten und unter unterschiedlichen Bedingungen mit dieser Methode durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Übertragung des Assays auf den analytischen Nachweis von unmarkierten Substanzen durch die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie überprüft.

#### 4.3.1 Optische Analyse mit der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie

Zur Überprüfung des Konzepts anhand eines optischen *readouts* wird eine FITC-Dextran-Sonde (4.0 kDa) eingesetzt. Aufgrund der hydrophilen molekularen Natur wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass der parazelluläre Permeationsweg deutlich bevorzugt ist. Die Detektion erfolgt mit Hilfe des CLSM durch xy-Aufnahmen in unterschiedlichen optischen Ebenen in z-Richtung (**Abb. 4.20**). Durch Bilder in Höhe der Zellebene wird dokumentiert, ob die Sonde in die Zellen aufgenommen wird, Bilder an der Substratoberfläche sollen zeigen, ob die zelluläre Barriere tatsächlich überwunden werden kann. Aufnahmen in der Fokusebene der Poren konservieren die laterale Verteilung der Sonde unterhalb der Zellen und dokumentieren den Permeationsweg.



**Abb. 4.20:** Schema zur Verdeutlichung des optischen Nachweises der Permeationsroute. Zur Dokumentation des Permeationsweges von FITC-Dextran (grüne  $\circ$ ) werden mit Hilfe des CLSM Aufnahmen in Höhe der Zellen, der Substratoberfläche und in der Ebene der Poren gemacht.

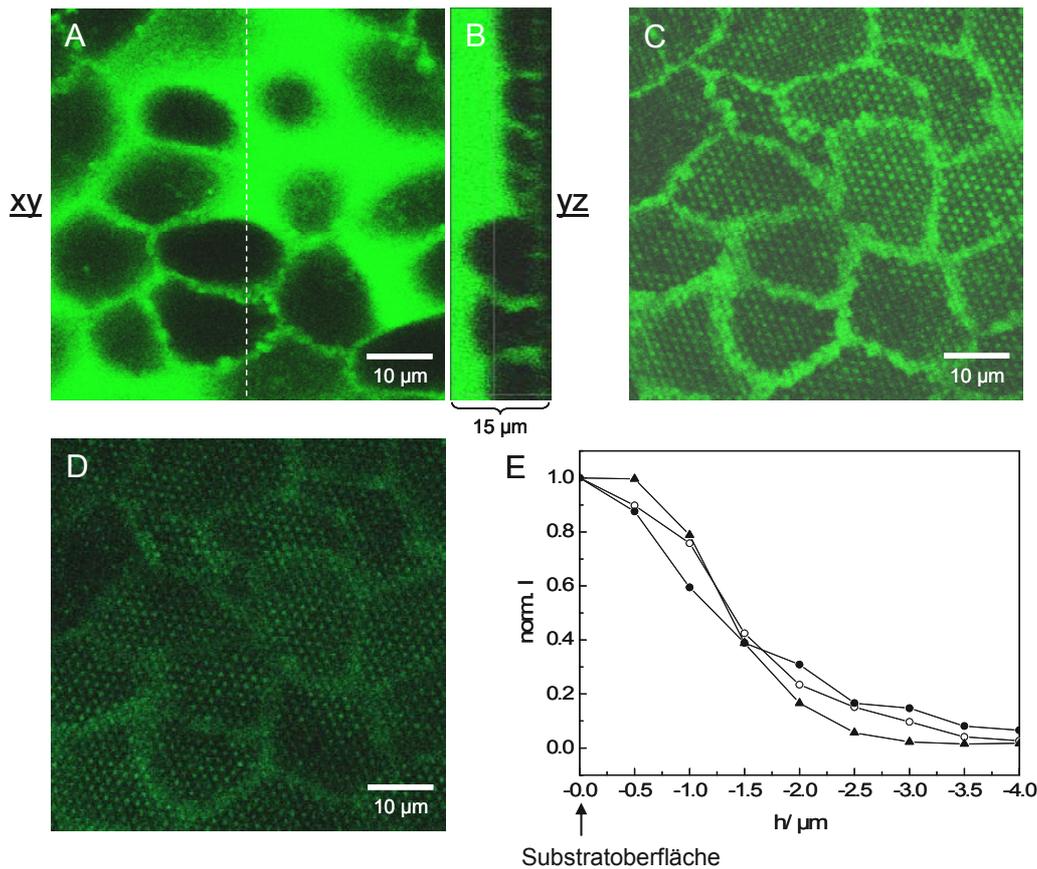
Grundlegende Untersuchungen zur Etablierung des optischen *readouts* werden zunächst an der barrierebildenden Epithelzelllinie MDCK II durchgeführt. Um den Einfluss der Porenstruktur auf das Ergebnis zu untersuchen werden sowohl Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm als auch 1.3  $\mu\text{m}$  eingesetzt.

#### 4.3.1.1 Einsatz der Epithelzelllinie MDCK II im Permeationsassay

Durch die Verwendung der Fluoreszenzsonde im extrazellulären Puffer heben sich ausdifferenzierte MDCK II-Zellen als dunkle Bereiche niedriger Fluoreszenzintensität ab. In der Regel wurden komplette Serien von Aufnahmen in unterschiedlichen z-Positionen einer Beobachtungsstelle angefertigt und im Anschluss daran die entsprechenden Ebenenschnitte ausgewählt. Um die zeitliche Stabilität des Assays zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inkubationszeiträume dokumentiert.

#### Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1)

Zunächst muss die Sonde durch die Barriere der *tight junctions* sowie den Spalt zwischen den Zellen diffundieren. Daher wurden die ersten Bilder erst eine Stunde nach Zugabe der FITC-Dextran-Lösung aufgenommen (anschließend mindestens in einem Intervall von zwei Stunden). Abbildung **4.21 A** zeigt eine xy-Aufnahme in Höhe der Zellkörper drei Stunden nach Beginn der Inkubation mit der FITC-Dextran-Lösung (Inkubation bei 37 °C, Messung bei RT), die Schnittebene befindet sich etwa 5.5 µm oberhalb der Substratoberfläche. Obwohl alle Zellen die charakteristische epitheltypische Morphologie aufweisen, zeigen sich lokal deutliche Unterschiede in der Zellhöhe, was durch die yz-Abbildung (**B**) verdeutlicht wird. Im Bereich großer Zellhöhen treten die Interzellularspalten (IZS) als schmale Fluoreszenzbänder hervor. In Bereichen mit niedrigeren Zellhöhen dagegen, wird ein breiteres Fluoreszenzsignal erzeugt. Die Kernregion dieser Zellen befindet sich bereits in der Fokusebene, die Zellperipherie befindet sich noch darunter. Das Cytoplasma der Zellen ist bei intakter Zellmembran frei von Fluoreszenz.



**Abb. 4.21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MDCK II-Zellen auf einem Silizium-Substrat (Typ 1). **A:** optischer xy-Schnitt, die Schnittebene befindet sich etwa 5.5 μm oberhalb der Substratoberfläche. Die Kontrastierung entsteht durch eine Fluoreszenzsonde (FITC-Dextran, 4.0 kDa, 0.5 mM in PBS<sup>++</sup>) in der extrazellulären Flüssigkeit (Inkubationszeit 3 h). **B:** yz-Aufnahme zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Zellhöhen (Abbildung entlang der Linie in **A**). **C:** optischer xy-Schnitt in Höhe der Substratoberfläche. **D:** optischer xy-Schnitt 2 μm unterhalb der Substratoberfläche. **E:** Axiale Farbstoffverteilung innerhalb einer Pore unterhalb der Interzellulargasse; Dokumentation der Eindringtiefe des Fluorophors nach einer Inkubationszeit von: 3.25 h (●), 5.25 h (○) und 7.5 h (▲); (gemittelt über 32 Pixel).

Durch Herabsetzen der Fokusebene auf die Höhe der Poren verändert sich das Bild (**Abb. 4.21 C**). Die fluorophorgefüllten Poren des Substrates treten als helle Punkte hervor. Die Zellgrenzen sind durch intensivere Fluoreszenzsignale zu erkennen, wobei sich, bedingt durch die Schnittebene, zwei Effekte ergänzen: Sowohl Fluoreszenz aus den IZS als auch aus den Poren wird angeregt und detektiert. Die konfokale Auflösung ist nicht ausreichend, um beide Effekte zu diskriminieren. Allerdings sind nicht ausschließlich Poren unterhalb der IZS mit Fluorophor gefüllt. Insbesondere im Fall von Zellen, die zuvor eine flachere Morphologie zeigten, wird eine starke Fluoreszenz auch unterhalb der Zellkörper detektiert. Diese Beobachtung kann durch mehrere Effekte bedingt sein: möglich wäre eine erleichterte Permeation durch die IZS aufgrund einer flacheren Morphologie der Zwischenräume mit anschließender lateraler Diffusion unterhalb der Zelle, oder aber transcytotische Prozesse (Kapitel 4.3.1.2).

Abbildung **4.21 D** zeigt denselben Bildausschnitt  $2\ \mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche. Eindeutig ist auch hier das Muster der IZS durch eine höhere Fluoreszenzintensität in den Poren unterhalb des Zellperimeters zu erkennen. Durch eine höhere Fluoreszenzintensität in den Poren unterhalb der IZS im Verhältnis zu denen unterhalb der Zellkörper können die Zellumrisse in allen Bereichen zugeordnet werden. Dennoch ist das Ergebnis heterogen. Ein ausschließliches Befüllen der Poren unterhalb der Zell-Zell-Kontakte mit der Fluoreszenzsonde gelang nicht in allen Fällen. Die zeitabhängigen Untersuchungen mit Dokumentationen nach 1, 3, 5 und 8 h Verweilzeit der fluoreszierenden Lösung auf der Zellschicht zeigen keine signifikanten Unterschiede zu der Abbildung nach 3 h. Das Zelllumen verbleibt ohne Fluoreszenz, was für eine intakte Membran und vitale Zellen spricht. Der Kontrast zwischen den Poren unterhalb der Zellmitte und den Poren unterhalb der IZS wird allerdings nach 8 h zunehmend schwächer. Nach drei Stunden konnte der Fluorophor tiefer in den Poren detektiert werden als nach einer Stunde, im Anschluss wurde aber keine Veränderung beobachtet. Um dies zu veranschaulichen, wurde der axiale Intensitätsverlauf innerhalb der Poren unterhalb der Interzellularspalte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Durch das Auftragen der normierten Intensität ( $I$ ) gegen die Höhe ( $h$ ) (**Abb. 4.21 E**) wird deutlich, dass sich die maximale Eindringtiefe nach 3.25 h ( $\bullet$ ), 5.25 h ( $\circ$ ) und 7.5 h ( $\blacktriangle$ ) nicht entscheidend ändert. In allen Fällen sinkt die Intensität etwa  $3.5\ \mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche auf einen Minimalwert.

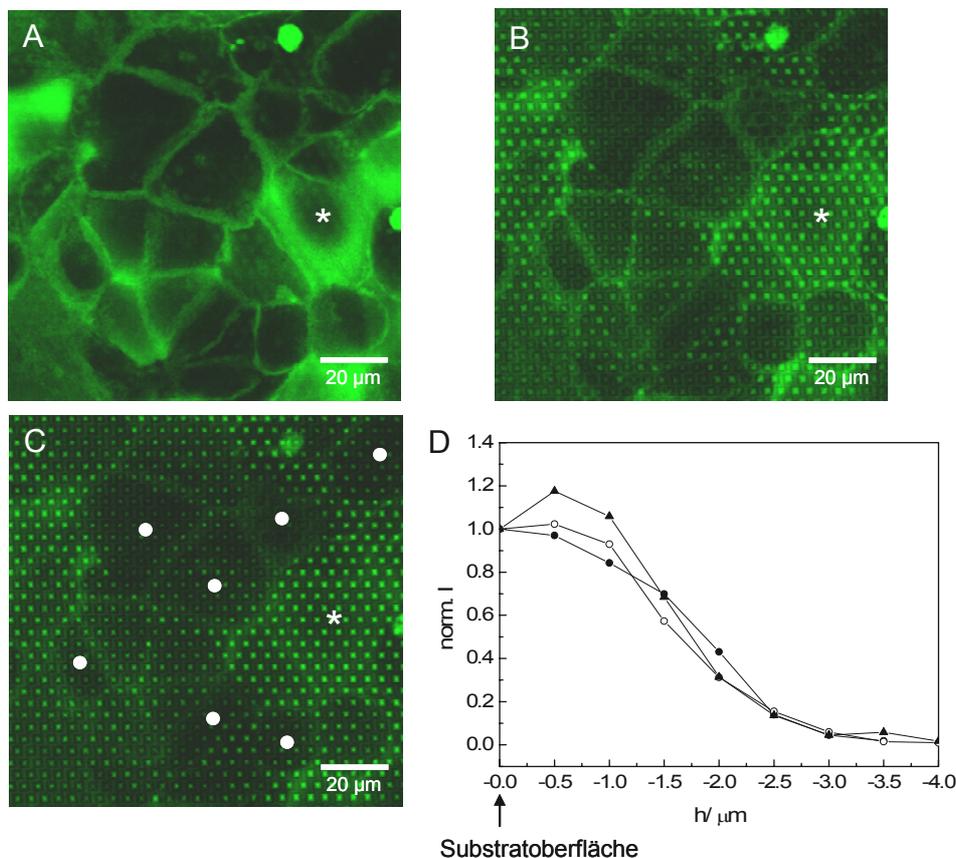
Die beschriebenen Untersuchungen belegen, dass das als Sonde eingesetzte FITC-Dextran entlang der Interzellularspalte über die Zellschicht permeiert.

### **Silizium-Substrate mit einem Porendurchmesser von $1.3\ \mu\text{m}$ (Typ 2)**

Analog zu den Siliziumsubstraten mit einem Porendurchmesser von  $900\ \text{nm}$  wurden die Untersuchungen auf Substraten des Typs 2 durchgeführt. Aufnahmen zur Dokumentation der Sondenverteilung wurden ab einer Inkubationszeit von einer Stunde durchgeführt, hier sollen exemplarisch die Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden besprochen werden.

Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen in unterschiedlichen xy-Ebenen des Objektes (**Abb. 4.22**). **A** zeigt einen optischen xy-Schnitt in Höhe der Zellkerne bzw. des Zelllumens. Die Fluoreszenz wird in den Interzellularspalten detektiert. Der Eindruck unterschiedlich breiter IZS entsteht, weil einzelne Zellen eine flachere Morphologie aufweisen (s.o.). Die Membran der gekennzeichneten Zelle (\*) ist nicht mehr intakt, so dass der Fluorophor in das Zelllumen eindringen konnte und sich eine lokale Defektstelle im ansonsten konfluenten Zellschicht befindet. In Höhe der Substratoberfläche (**Abb. 4.22 B**) kann in einem schmalen Bereich sowohl die Fluoreszenz aus den Interzellularspalten bzw. deren Reflexion (Kapitel 4.1.2) als auch aus den Poren des Substrates abgebildet werden. Unterhalb der Sub-

stratoberfläche heben sich die fluorophorgefüllten Poren deutlich als helle Punkte vom Hintergrund ab. Die Zellgrenzen sind analog zum Schnitt in der höheren optischen Ebene durch helle Fluoreszenz gekennzeichnet. Unterhalb der Defektstelle (\*) wird ein diffuser Fluoreszenzbereich detektiert. Abbildung 4.22 C zeigt eine Aufnahme der gleichen Position unterhalb der Substratoberfläche. Es zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Im Fall von großen und eher hohen Zellen sind die Poren unterhalb der Zellkörper deutlich schwächer gefüllt als unter den IZS (○). Der parazelluläre Permeationsweg der Sondenmoleküle wird hier nachgezeichnet und konserviert. Poren allerdings, die sich unterhalb der bereits angesprochenen Zellen am rechten Bildrand (\*) befinden, sind fast einheitlich gefüllt und markieren dadurch die Defektstelle des Zelllayers.



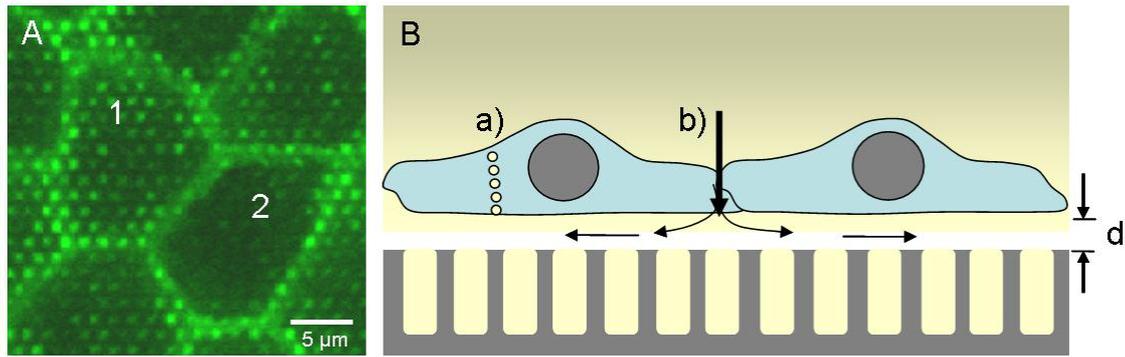
**Abb. 4.22:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCK II-Zellen auf einem Silizium-Substrat (Typ 2) nach Inkubation mit einer FITC-Dextran-Lösung. **A:** Schnittebene auf Höhe der Zellkerne, **B:** Substratoberfläche, **C:** unterhalb der Substratoberfläche in Höhe der Poren (Inkubationszeit: 5 h). **C:** Axiale Farbstoffverteilung innerhalb einer Pore unterhalb der Interzellulargapen; Dokumentation der Eindringtiefe des Fluorophors nach einer Inkubationszeit von: 3.00 h (●), 4.25 h (○) und 5.25 h (▲) (gemittelt über 24 Pixel).

Die zeitabhängigen Untersuchungen ergeben analog zu den Ergebnissen auf Typ 1-Substraten, dass die Zellintegrität auch über einen Zeitraum von bis zu 5 h nicht bzw. nur in Einzelfällen zerstört wird. Die Intensität der Porenbefüllung in z-Richtung unterhalb der IZS nimmt zunächst zu, nach 2 h wird aber keine weitere Intensitätszunahme detektiert. Abbildung 4.22 D zeigt dazu den Verlauf der Intensität innerhalb einer Pore (gemittelt über 24

Pixel) unterhalb der Interzellularspalte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Abbildung zeigt die Werte der normierten Intensität ( $I$ ) aufgetragen gegen die Höhe ( $h$ ). Die maximale Eindringtiefe nach 3.00 h (●), 4.25 h (○) und 5.25 h (▲) unterscheidet sich nicht deutlich, in allen Fällen sinkt die Intensität etwa 3.5  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche auf einen Minimalwert. Unterhalb der Zellen nimmt die Intensität innerhalb der Poren langsam aber kontinuierlich von der Zellmitte zur Peripherie hin zu, aufgrund der Intensitätsunterschiede zeichnet sich der parazelluläre Permeationsweg der Sonde auch nach einer Inkubationszeit von 5 h ab.

#### 4.3.1.2 Untersuchungen zur Porenbefüllung unterhalb von Zellkörpern bei parazellulärem Permeationsweg

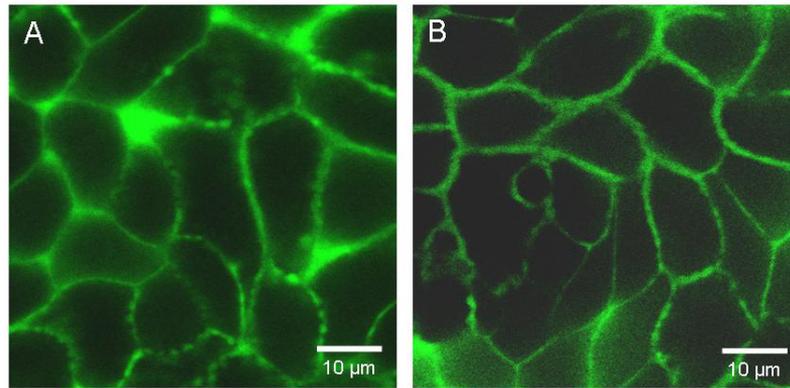
Das in Kapitel 4.3.1.1 beschriebene Phänomen, dass trotz Einsatz einer parazellulär diffundierenden Sonde auch in den Poren unterhalb der Zellkörper Fluoreszenz detektiert werden kann, soll in diesem Teil näher untersucht werden. Grundsätzlich lässt sich beobachten, dass sich die Sonde FITC-Dextran in den Poren unterhalb der Interzellularspalte (IZS) aufkonzentriert. Abbildung **4.23 A** zeigt MDCK II-Zellen auf einem nanoporösen Substrat (Typ 1) nach der Inkubation mit einer FITC-Dextran-Lösung (4 kDa, 0.5 mM) für 8 h. Im Fall von Zelle 2 sind die Poren ausschließlich entlang der IZS gefüllt, wohingegen im Fall von Zelle 1 auch Poren unterhalb des Zellkörpers fluoreszieren. Abbildungsteil **B** verdeutlicht, welche Möglichkeiten von passiven Transportwegen für die Sonde zur Überwindung der zellulären Barriere bestehen. Fall a) zeigt den transzellulären Weg: durch Endocytose wird der Farbstoff auf der apikalen Seite in Vesikel aufgenommen, zur basolateralen Membran transferiert und dort in den Zell-Substrat-Spalt entlassen. Dies entspräche einem physiologischen Transportweg, die Aussage des Permeationsassays wäre somit korrekt. Fall b) skizziert die Möglichkeit der lateralen Diffusion unterhalb der Zellen nach Permeation über die Zellkontakte. Der Zell-Substrat-Abstand ( $d$ ) für die in diesen Experimenten verwendeten MDCK II-Zellen wurde auf planarem Substrat zu  $(26.8 \pm 1.4)$  nm bestimmt und ist vergleichsweise gering (Reiß, 2004). Im Folgenden wurden Untersuchungen durchgeführt, um beide möglichen Mechanismen zu überprüfen.



**Abb. 4.23:** **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MDCK II-Zellen auf nanoporösem Silizium (Typ 1), optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren nach Inkubation mit einer FITC-Dextran-Lösung (8 h). **2:** der parazelluläre Permeationsweg wird durch die Porenfüllung im Bereich der IZS dokumentiert; **1:** auch Poren unterhalb der Zellkörper sind mit der Sonde gefüllt. **B:** Schema zu möglichen Transportwegen der Sonde über die zelluläre Barriere: a) Transcytose, b) laterale Diffusion unter den Zellen.

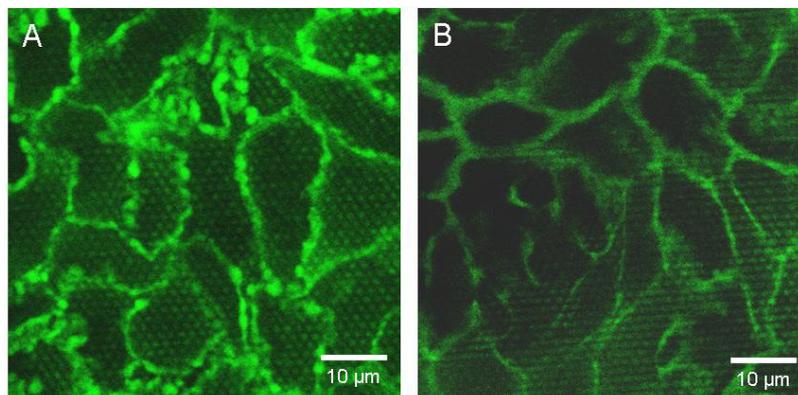
#### Untersuchungen zur Transcytoserate von MDCK II-Zellen auf porösem Silizium (Typ 1)

Zunächst sollte untersucht werden, ob Indizien vorhanden sind, die für einen transcytotischen Prozess als Erklärung für die Porenfüllung unterhalb der Zellkörper sprechen. Dazu wurde der Permeationsassay bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. *Romagnoli* und *Herzog* (1991) konnten zeigen, dass die Transcytoserate mit sinkender Temperatur abnimmt. Grundsätzlich sollten die Sondenmoleküle im extrazellulären Puffer zur Markierung von Transcytosevesikeln im Zelllumen führen. Daher wurden parallel zwei MDCK II-Zelllayer auf Silizium-Substraten (Typ 1) kultiviert und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C und 37 °C) mit der FITC-Dextran-Lösung inkubiert. Drei bzw. dreieinhalb Stunden nach Beginn der Inkubation wurden die Zellschichten bezüglich der Verteilung des Fluorophors in den Ebenen der Zellkörper, der Substratoberfläche und der Poren mit Hilfe des CLSM untersucht. Beide Experimente wurden, abgesehen von der Temperatur, unter identischen Bedingungen durchgeführt und dokumentiert. FITC-Dextran permeierte entlang der Interzellularspalten, so dass sich die Zellen deutlich vom Cytoplasma abheben (**Abb. 4.24**). Im Bereich ab 2 μm oberhalb der Substratoberfläche verbreitert sich der Fluoreszenzbereich in den IZS bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C (**A**) deutlich stärker als bei 20 °C (**B**). In beiden Fällen werden keine punktuellen Fluoreszenzsignale im Zelllumen detektiert, die Transcytosevesikel anzeigen würden. Der Kontrast zwischen dem Lumen und den erleuchteten IZS erscheint aber bei 20 °C stärker.



**Abb. 4.24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCK II-Zellen auf Silizium-Substraten (Typ 1). Optischer xy-Schnitt 2 µm oberhalb der Substratoberfläche. **A:** Inkubationstemperatur 37 °C **B:** Inkubationstemperatur 20 °C. Für **A** wird ein stärkeres Auffächern der IZS oberhalb der Substratoberfläche beobachtet.

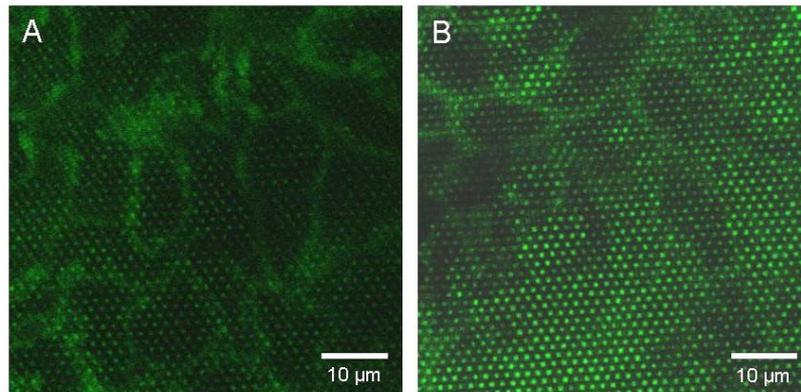
Die Aufnahmen in Höhe der Substratoberfläche (**Abb. 4.25**) zeigen die fluorophorgefüllte IZS, die Poren sind durch punktförmige Fluoreszenz zu erkennen. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C (**A**) werden knöllchenartige fluorophorgefüllte Hohlräume entlang der IZS abgebildet, während sich bei einer Inkubation bei 20 °C (**B**) die Spalten gleichmäßiger verbreitern. Weiterführende Untersuchungen zu diesem Phänomen wurden allerdings nicht durchgeführt. Auch in dieser optischen Schnittebene werden keine eindeutigen Anzeichen für Transcytosevesikel gefunden.



**Abb. 4.25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCK II-Zellen auf Silizium-Substraten (Typ 1). Optischer xy-Schnitt in Höhe der Substratoberfläche. **A:** Inkubationstemperatur 37 °C; in Höhe der Oberfläche treten knöllchenartige fluorophorgefüllte Räume entlang der IZS hervor. **B:** Inkubationstemperatur 20 °C; die IZS verbreitern sich zur Oberfläche gleichmäßiger als in **A**.

In den Poren (2 µm unterhalb der Oberfläche) ergibt sich grundsätzlich ein zu erwartendes Bild mit punktförmiger Fluoreszenz bei fluorophorgefüllten Poren (Kapitel 4.3.1.1). In Abbildung 4.26 **A** (37 °C) treten diese deutlich hervor, die Intensität in den Poren unterhalb der IZS ist stärker als unterhalb der Zellkörper. Dennoch sind viele Poren unterhalb der Zellkörper mit der Sonde gefüllt. Abbildungsteil **B** zeigt die Aufnahme bei 20 °C. Das Bild zeigt stellenweise Ähnlichkeiten zu **A**. Zum Teil ist eine gute Unterscheidung zwischen den Bereichen unterhalb der Zellkörper und der Interzellularspalten möglich. An anderen Stellen hingegen

ist dies schwierig. Die Fluoreszenz in den Poren ist intensiver als in Abbildungsteil **A**, was möglicherweise auf einen erhöhten Eintrag von Sondenmolekülen schließen lässt.

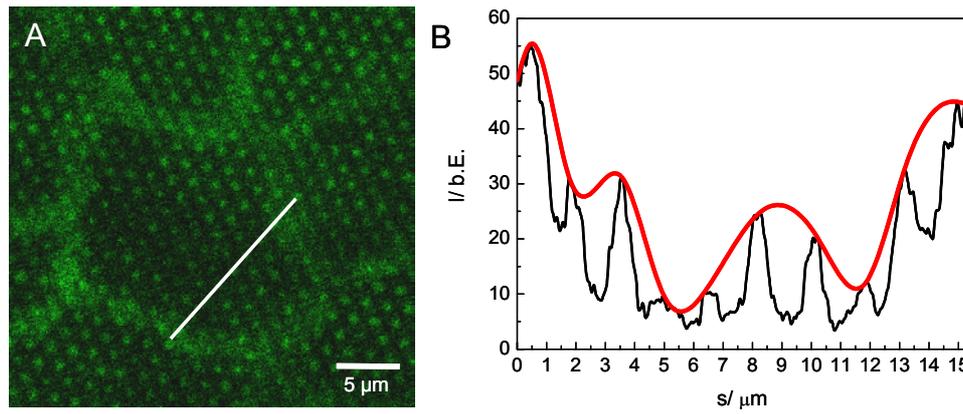


**Abb. 4.26:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MDCK II-Zellen auf Silizium-Substraten (Typ 1). Optischer xy-Schnitt 2 µm unterhalb der Substratoberfläche. **A:** Inkubationstemperatur 37 °C; die Poren unterhalb der IZS sind stärker mit FITC-Dextran gefüllt als unterhalb der Zellkörper. **B:** 20 °C; grundsätzlich zeigt sich ein ähnliches Bild, allerdings ist die Porenbefüllung gleichmäßiger.

Unabhängig von der Inkubationstemperatur wurden in beiden Fällen keine Transcytosevesikel detektiert. Auf eine Untersuchung von Zellen auf Substraten mit einer Porengröße von 1.3 µm wurde aufgrund dieser Ergebnisse verzichtet.

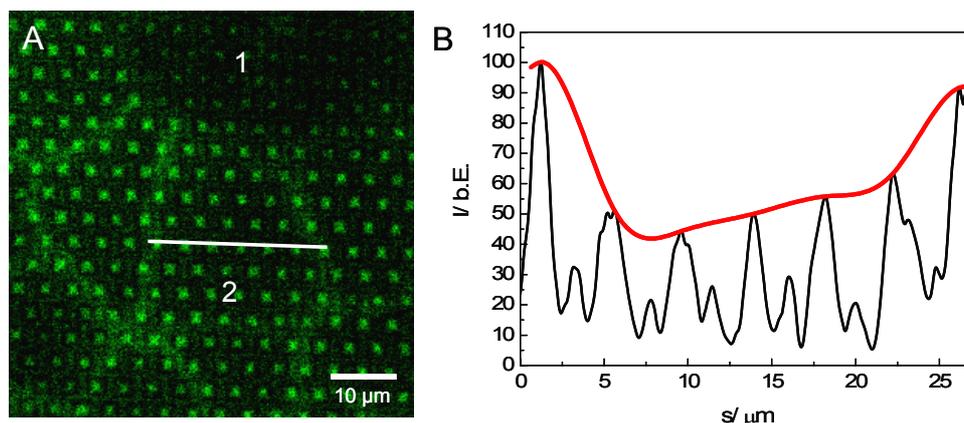
#### Untersuchungen zur lateralen Diffusion im Adhäsionskontakt

Um die zweite Möglichkeit zur Porenbefüllung unterhalb von Zellen zu untersuchen, wurden die Daten des Permeationsassays in Hinblick auf Anzeichen für laterale Diffusion unterhalb der Zellkörper untersucht. Grundsätzlich wird aufgrund der Arbeiten von *Reiß* (2004) davon ausgegangen, dass der Zell-Substrat-Abstand für MDCK II-Zellen auf planaren Substraten etwa eine Dimension von 20 - 30 nm hat. Dieser Spalt stünde prinzipiell für die laterale Diffusion unterhalb der Zellen zur Verfügung. Darüber hinaus wird der Diffusionsraum unter Umständen um die Beiträge der Vorätzstrukturen erweitert. Anhand der Verteilung der Intensitäten entlang einer Linie in einem optischen xy-Schnitt können Intensitätsunterschiede zwischen den Poren quantifiziert werden. Abbildung 4.27 **A** zeigt eine Aufnahme aus dem Permeationsassay mit MDCK II-Zellen nach dreistündiger Inkubation mit einer FITC-Dextran-Lösung (Substrattyp 1). Die Poren sind (etwa 2 µm unterhalb der Substratoberfläche) als fluoreszierende Punkte zu erkennen. Unterhalb der Zellkörper sind die Poren trotz parazellulärem Permeationsweg zum Teil gefüllt. Entlang der in der Abbildung **A** eingezeichneten Linie wird die relative Fluoreszenzintensität ermittelt. Diese wird gegen die Position auf der Profilgeraden aufgetragen (**B**). Das Porenmuster ist anhand der oszillierenden Intensitätsmaxima zu erkennen. Die rote Linie zeichnet den Verlauf der Intensitätsmaxima nach und verdeutlicht, dass die Intensitätswerte der einzelnen Poren zur Zellmitte hin abnehmen. Das legt den Schluss nahe, dass die fluoreszierende Sonden-Lösung aus dem Bereich der Zellgrenzen in Richtung Zellmitte diffundiert.



**Abb. 4.27:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Durchführung des Permeationsassay auf nanoporösem Silizium (Typ 1) mit einer FITC-Dextran-Sonde; Analyse der lateralen Farbstoffverteilung in den Poren unterhalb eines Zellkörpers. **A:** Optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren mit Profilgerade. **B:** Auftragung der geglätteten Fluoreszenzintensität (über 50 Punkte) gegen die Position auf der Profilgeraden. Die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenfüllung repräsentieren.

Abbildung 4.28 zeigt eine analoge Situation für ein Typ 2-Substrat. In unmittelbarer Nachbarschaft liegen zwei im Hinblick auf die laterale Intensitätsverteilung sehr unterschiedliche Bereiche. Während unter einer Zelle (2) die Poren gefüllt sind, zeigt sich unter der angrenzenden Zelle (1) nur eine sehr geringe Befüllung der Poren. Grundsätzlich zeigt die relative Fluoreszenzintensität entlang der Profilgeraden aber auch hier eine Abnahme der Maxima in den Poren von der Zellperipherie zur Zellmitte. Auch bei dieser Substratgeometrie ist eine laterale Diffusion der Sondenmoleküle unterhalb der Zellkörper für die limitierte Auflösung des Assays verantwortlich.



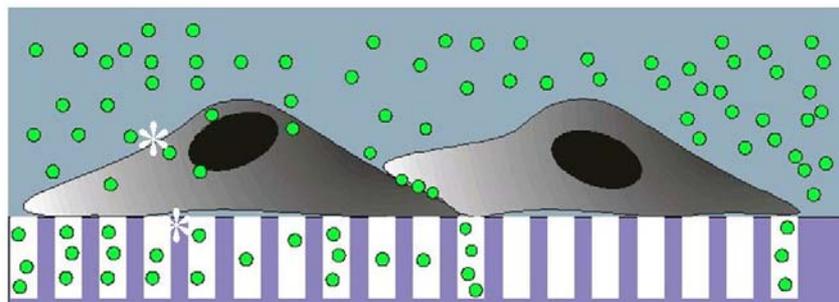
**Abb. 4.28:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Durchführung des Permeationsassay auf nanoporösem Silizium (Typ 2) mit einer FITC-Dextran-Sonde; Analyse der lateralen Farbstoffverteilung in den Poren unterhalb eines Zellkörpers. **A:** Optischer xy-Schnitt in Höhe der Poren mit Profilgerade. **B:** Auftragung der geglätteten Fluoreszenzintensität (über 15 Punkte) gegen die Position auf der Profilgeraden. Die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenfüllung repräsentieren.

#### 4.3.1.3 Simulation von Defektstellen im Permeationsassay

Der vorgestellte Permeationsassay bietet aufgrund der lateralen Auflösung des Permeationsweges entscheidende Vorteile gegenüber Messverfahren, die ausschließlich einen integralen *readout* ermöglichen. Beispiel hierfür sind die weitverbreiteten und in hohem Durchsatz durchgeführten Untersuchungen, bei denen die Zellen auf permeablen Filtermembranen kultiviert werden und die permeierten Substanzen in einem Kompartiment aufgefangen werden. Diese Systeme sind anfällig für Fehleinschätzungen, die aufgrund von lokalen Defektstellen im Zelllayer entstehen und zu punktuellen „*hotspots*“ der Permeation führen. Im Folgenden wird untersucht, inwieweit sich lokale Defekte mit dem ortsaufgelösten Permeationsassay detektieren lassen.

#### Simulation von Einzelzelldefekten

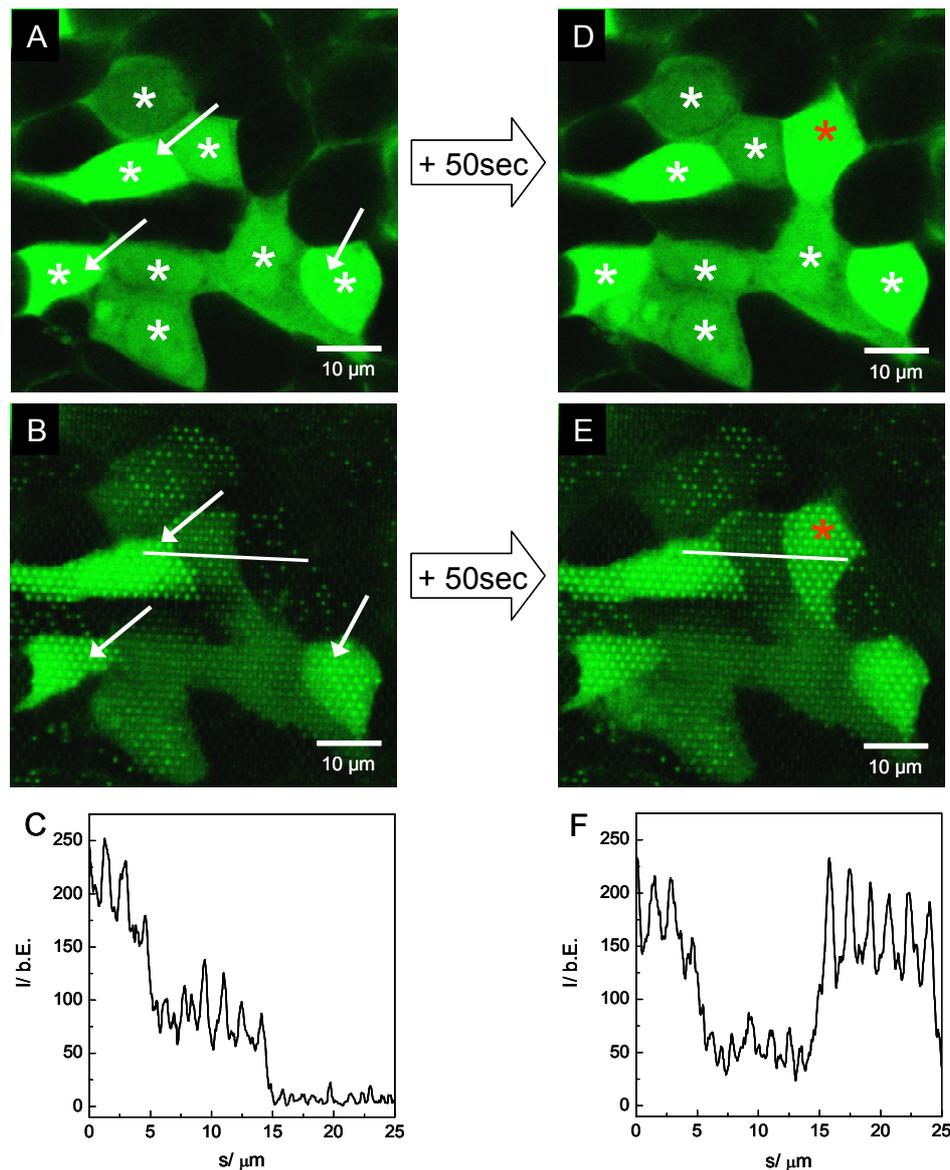
Die konfluenten MDCK II-Zellschichten wurden zunächst bei RT über mehrere Stunden mit der FITC-Dextranlösung (4 kDa, 0.5mM) inkubiert und mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich das bekannte Bild aus dem Permeationsassay (Kapitel 4.3.1.1), das eine parazelluläre Diffusion der Sonde dokumentiert. Anschließend wurden durch Zugabe einer geringen Menge des Detergenzes Triton X-100 lokale Defektstellen im Zelllayer induziert, ohne eine massive großflächige Schädigung der umgebenden Zellen hervorzurufen. Unter den gewählten Bedingungen befinden sich vereinzelt Triton X-100-Mizellen in der Lösung, die sich durch Diffusion verteilen und statistisch auf die Zellen treffen. Dort wird durch Interaktion der Triton-Moleküle mit der Membran eine Permeabilisierung hervorgerufen. Abbildung 4.29 stellt dies schematisch in einer Übersicht dar. Aufgrund der zerstörten Membranintegrität kann die Barriere für die Fluoreszenzsonde nicht aufrechterhalten werden, der Farbstoff gelangt zunächst in die verletzten Zellen und schließlich in die darunter liegenden Poren. Benachbarte Zellen bleiben jedoch unbeeinflusst. Eine lange Inkubation erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Zellen betroffen sein werden.



**Abb. 4.29:** Schematische Übersicht zur Simulation lokaler Defektstellen im Zellmonolayer. Die Detergenz-Mizellen (\*) treffen mit statistischer Wahrscheinlichkeit auf die Zellen und führen dort zur Permeabilisierung der Membran. Benachbarte Zellen werden dadurch zunächst nicht beeinflusst.

In Abbildung 4.30 A sind einzelne Zellen bereits permeabilisiert (\*), was sich durch das Eindringen des Fluorophors in den Zellkörper äußert, während benachbarte Zellen den Fluorophor

rophor nicht aufnehmen. Als sehr schmales fluoreszierendes Band sind hier die Interzellularspalten sichtbar. Bemerkenswert ist, dass sich die permeabilisierten Zellen in der Fluoreszenzintensität unterscheiden. Die durch einen Pfeil gekennzeichneten Zellen scheinen in ihrer Membranintegrität stärker geschädigt zu sein als in den übrigen Fällen, so dass eine höhere Konzentration an Fluorophor in die Zellen resultiert. Offensichtlich ist in diesem Fall neben der apikalen auch die basolaterale Membran in erheblichem Maß geschädigt, denn in Höhe der Substratoberfläche (**B**) sind die Poren unterhalb dieser Zellkörper homogen und intensiv mit der Fluoreszenzsonde gefüllt. Für die übrigen weniger stark permeabilisierten Zellen gilt, dass die Membranen offensichtlich zum Teil noch als Diffusionsbarriere wirken kann, woraus eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität in den Poren resultiert. Unterhalb intakter Zellen wird keine bzw. ausschließlich unspezifische Fluoreszenz detektiert, so dass die Defektstellen im Zelllayer eindeutig identifiziert werden können. Entlang der eingezeichneten Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt, Abbildungsteil **C** zeigt die Entwicklung der Intensität in Abhängigkeit von der Position. Der oszillierende Verlauf bestätigt, dass die Poren den Farbstoff aufgenommen haben, wobei einzelne geschädigte Zellen als Diffusionsbarriere wirken. Hier wird eine niedrigere Intensität erreicht. Unterhalb unverletzter Zellen ist nahezu keine Fluoreszenzintensität bestimmbar. Die durch die Interzellularspalten der intakten Zellen permeierten Sondenmoleküle scheinen allerdings in einer zu geringen Konzentration vorzuliegen als dass eine Porenfüllung entlang der IZS detektiert werden könnte. Möglicherweise wäre eine längere Inkubationszeit (von mehr als 1.25 h) sinnvoll. 50 Sekunden nach der Aufnahme von Bild **A** wurde an der gleichen Beobachtungsstelle die Permeabilisierung einer weiteren Zelle durch das Eindringen des Fluorophors detektiert (**C**, \*). Diese veränderte Situation zeigte sich auch instantan in der Füllung der Poren unterhalb dieses Zellkörpers (**D**, \*) und dokumentiert auf diese Weise die Lokalisation einer weiteren Defektstelle im Zelllayer. Der Intensitätsverlauf entlang der Linie (**F**) verdeutlicht, dass die Permeabilisierung der gekennzeichneten Zelle keinen Einfluss auf die Intensität in den Poren unterhalb bereits verletzter Zellen nimmt. Nach wie vor wirken dort die Membranen der freien Diffusion der Sondenmoleküle entgegen. Für die Poren unterhalb intakter Zellen wurde keine Veränderung der Fluoreszenzintensität dokumentiert. Auch Poren unterhalb von Zellen, die fast komplett von permeabilisierten Zellen umgeben sind (Bildmitte), verblieben ungefüllt.



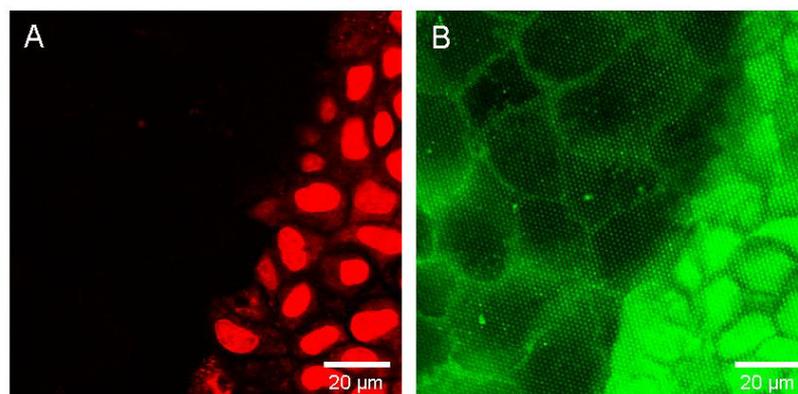
**Abb. 4.30:** Fluoreszenzmikroskopische xy-Aufnahmen lokaler Defektstellen (\*) in einem konfluenten MDCK II-Monolayer; die optische Schnittebene befindet sich in Höhe der Zellen (**A** und **D**) sowie in Höhe der Substratoberfläche (**B** und **E**). **C** und **F** zeigen jeweils den Verlauf der Intensität gegen die Position ( $s$ ) auf der Profilgeraden. Zwischen den einzelnen Aufnahmen in einer Ebene liegt ein zeitlicher Abstand von 50 Sekunden, in dem eine weitere Einzelzelle permeabilisiert wurde (\*).

### Simulation eines großflächigen Defektes im Zelllayer

Auf Silizium-Substraten (Typ 1) wurden konfluente MDCK II-Zellen mit einem Photosensibilisator beladen. Dazu wird der membrangängige Farbstoffvorläufer Calcein AM extrazellulär angeboten, der aufgrund des unpolaren Molekülcharakters in die Zellen diffundieren kann. Dort wird das Molekül intrazellulär durch aktive Esterasen hydrolysiert. Durch diesen Schritt wird ein geladenes Molekül (Calcein) erzeugt, das die Membran nicht mehr passieren kann. Darüber hinaus fluoresziert Calcein, so dass die Sonde als Vitalitätsmarker für den Nachweis einer intakten Membran und aktive Esterasen eingesetzt wird. Das Bestrahlen der beladenen Zellen mit Licht der Wellenlänge 494 nm (5 min) führte wie durch *Knight et al.* (2003) be-

schrieben zu einer irreparablen Zellschädigung. (Wiemann, 2003, Diplomarbeit). Die Bestrahlung wurde mit Hilfe des CLSMs durchgeführt, indem die Zellschicht fokussiert wurde. Auf diese Weise konnte ein definierter Bereich gezielt geschädigt werden. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde von der Pufferlösung auf Kulturmedium gewechselt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Die Effizienz der Verwundung konnte durch fluoreszenzmikroskopische Markierung der toten Zellen mit Ethidiumhomodimer gezeigt werden. Ethidiumhomodimer kann die intakte Zellmembran nicht überwinden, im Falle einer gestörten Membranintegrität gelangt es in die Zelle und interagiert selektiv mit der DNA des Zellkerns. Nur in dieser Konstellation kann eine leuchtend rote Fluoreszenz bei entsprechender Anregung erhalten werden. Abbildung 4.31 A zeigt den Randbereich der kreisförmigen Verwundung in Höhe der Zellkerne. Zellkerne toter Zellen fluoreszieren rot, während die Membran ungeschädigter Zellen ein Eindringen des EthD-Moleküls verhindert hat. Der Vitalitätsnachweis der nicht durch EthD gefärbten Zellen wurde indirekt mit der Durchführung des orts aufgelösten Permeationsassays erbracht. Während der Inkubation mit der FITC-Dextran Sonde (4 kDa, 0.5 mM) (B) wirkten die Zellen als Barriere gegenüber der freien Diffusion der Sonde in die Poren. In den Poren unterhalb der Interzellularspalten bzw. der Peripherie der Zellen war eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität nachweisbar. Im Bereich der Verwundung ist dagegen eine intensive und homogene Porenbefüllung zu beobachten. Der Eindruck eines zellschichtähnlichen Musters im Bereich der toten Zellen entsteht durch die gleichzeitige Anregung und Detektion von Resten der Fluoreszenzsonde Calcein, die zum Teil in den toten Zellkörpern verblieben ist.



**Abb. 4.31:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer konfluenten MDCK II-Zellschicht im Randbereich einer phototoxisch induzierten Verwundung. **A:** Anfärbung der durch den Photosensibilisator geschädigten Zellen mit EthD. **B:** Optischer xy-Schnitt in Höhe der Substratoberfläche nach Durchführung des Permeationsassays mit einer parazellulär permeierenden Sonde (FITC-Dextran) in der extrazellulären Puffer-Lösung.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines orts aufgelösten Permeationsassays zeigen beide Untersuchungen, dass lokale Defektstellen in einem konfluenten MDCK II-Zelllayer durch die gleichmäßige Porenbefüllung identifiziert werden können. „hotspots“ der Permeation werden eindeutig und instantan als solche detektiert. Darüber hinaus kann in direkter Nachbarschaft

zu diesen Defektstellen der physiologische Permeationsweg der Sondenmoleküle nachgewiesen werden. Einzelne Defektstellen bis hin zu größeren verwundeten Arealen gefährden die Aussage der ortsaufgelösten Permeationsstudie nicht.

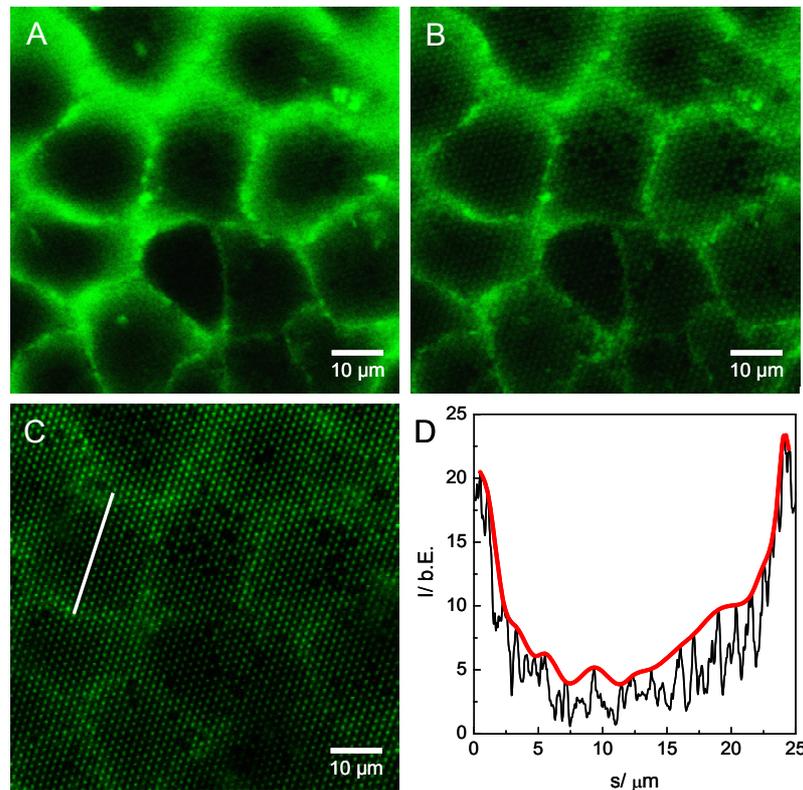
### 4.3.2 Ortsaufgelöster Permeationsassay an anderen Grenzflächengeweben

Im Anschluss an die Untersuchungen an der Epithelzelllinie MDCK II wurde der ortsaufgelöste Permeationsassay auf andere Grenzflächengewebe übertragen. Eingesetzt wurden Zellen, die verschiedene Aspekte der bisherigen Untersuchungen verstärkt in den Fokus rücken. So bilden die epithelähnlichen NRK-Zellen wenige *tight junctions* aus, die Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 sogar gar keine. Durch den Einsatz primärkultivierter Kapillarendothelzellen aus dem Schweinehirn konnten sehr flache Zellen mit schmaler Morphologie aber hoher Barrierefunktion untersucht werden. Die Untersuchungen wurden an konfluenten Zelllayern durchgeführt, wobei eine Untersuchung des Differenzierungszustandes nicht gesondert vorgenommen wurde.

#### 4.3.2.1 Die epithel-ähnlichen Zelllinie NRK im Permeationsassay

Die epithel-ähnliche NRK-Zelllinie zeichnet sich durch eine *cobblestone*-Zellmorphologie aus, besitzt im Vergleich zu MDCK II-Zellen allerdings eine deutlich schwächere Barrierefunktion. Auf nanoporösen Substraten (Typ 1) konnte ohne vorherige Beschichtung ein konfluenter Monolayer etabliert werden. Die mikroskopisch detektierbare Morphologie scheint sich von der der auf planaren Substraten kultivierten Zellen nicht zu unterscheiden. Genauere Studien zum Differenzierungszustand wurden allerdings nicht durchgeführt. Aus der schwächer ausgeprägten Barrierefunktion resultiert, dass die Dokumentation der Permeation der Fluoreszenzsonde FITC-Dextran (4 kDa, 0.5 mM) bereits nach einer kurzen Inkubationszeit erfolgen sollte (hier: 6 min nach Zugabe). Die entsprechenden optischen xy-Schnitte in Höhe der Zellen, der Substratoberfläche und ca. 2  $\mu\text{m}$  unterhalb in Höhe der Poren sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Durch die Anfärbung der extrazellulären Flüssigkeit und Diffusion in die Interzellularspalte erscheinen die Zellen als dunkle Bereiche. Bild **A** dokumentiert den Zustand etwa 600 nm oberhalb der Substratoberfläche. Die Interzellularspalten fluoreszierten hell, zum Teil wurde parallel Fluoreszenz aus dem Zell-Substrat-Kontakt angeregt. Abbildung 4.32 **B** stellt die Verteilung der Fluoreszenz in Höhe der Substratoberfläche dar, von der Peripherie zum Zentrum der Zellen nimmt die Intensität der Fluoreszenz aus den Poren ab. **C** dokumentiert die Situation etwa 2  $\mu\text{m}$  unterhalb der Zellen. Nahezu in jeder Pore kann Fluoreszenzintensität detektiert werden, von der Peripherie zur Zellmitte wird als allgemeiner Trend eine Intensitätsabnahme beobachtet. Der in Abbildungsteil **D** dargestellte Intensitätsverlauf entlang der Profilgeraden (in **C**) verdeutlicht diese Beobachtung. Die rote Linie verbindet die relativen

Maxima der Fluoreszenzintensität, die die Porenfüllung repräsentieren. Auch bei geringen Unterschieden in der relativen Fluoreszenzintensität wird deutlich, dass die Intensität zur Zellmitte hin deutlich abnimmt und die Sonde offensichtlich den parazellulären Diffusionsweg bevorzugt nimmt. Zum Teil werden einzelne gänzlich ungefüllte in den Bildern schwarz erscheinende Poren abgebildet. Dieses statistische Auftreten ohne erkennbare Tendenz zur Zellmitte bzw. -peripherie wurde ausschließlich bei NRK-Zellen beobachtet.

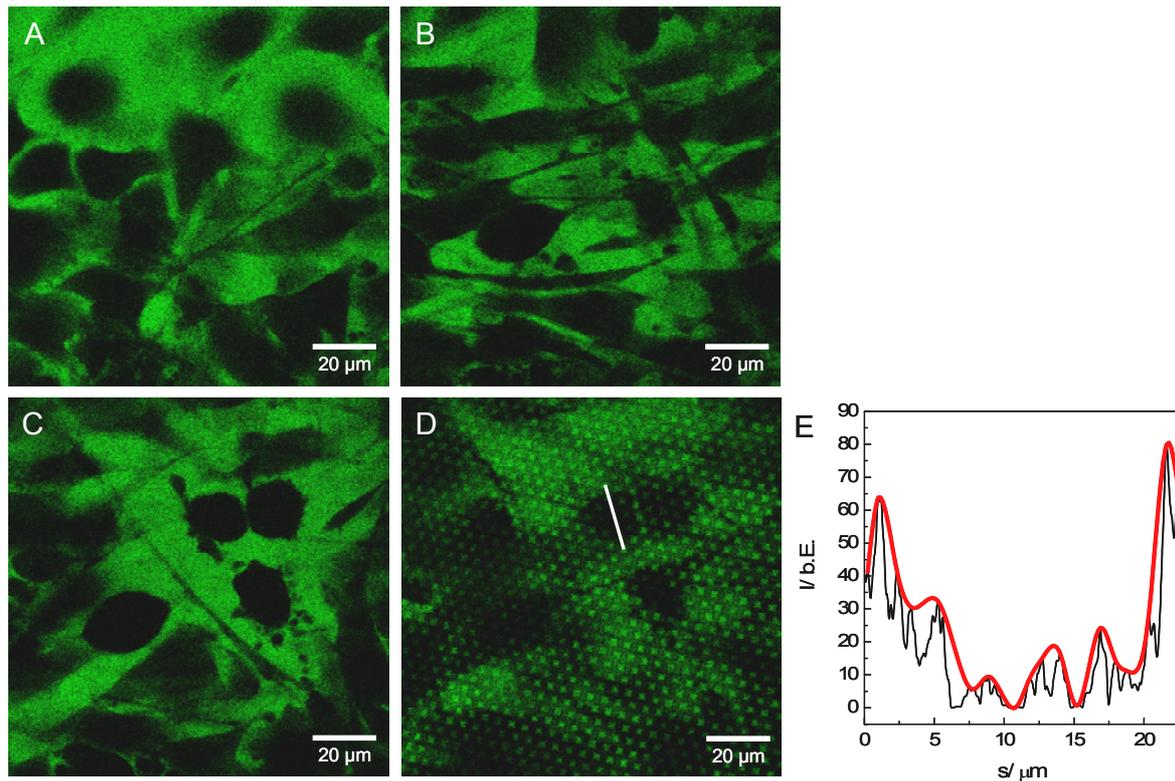


**Abb. 4.32:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines konfluenten NRK-Zelllayers auf nanoporösem Substrat (Typ 1). Optische xy-Schnitte nach sechsminütiger Inkubation mit einer FITC-Dextran Sonde (4 kDa, 0.5 mM). **A:** optische Ebene in Höhe der Zellkörper, **B:** Substratoberfläche, **C:** Poren, etwa 2  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche. **D:** Auftragung der geglätteten Fluoreszenzintensität (über 25 Punkte) gegen die Position ( $s$ ) auf der Profilgeraden in **C**. Die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenfüllung repräsentieren.

#### 4.3.2.2 Die Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 im Permeationsassay

Die murinen Fibroblasten wachsen in adhärennten Zellschichten mit der Tendenz zu Multilayern im Fall hoher Zelldichten. Durch Verwendung einer Beschichtung mit Gelatine (0.5 % in Reinstwasser) lassen sich NIH 3T3-Fibroblasten auf nanoporösen Substraten (Typ 1 und Typ 2) kultivieren. Die Zellen bilden grundsätzlich keine *tight junctions* aus. Diesen Bedingungen wird Rechnung getragen, indem ein FITC-Dextran mit einem deutlich höheren Molekulargewicht (2.5 MDa) genutzt wird. Auf diese Weise sollte die Permeationsgeschwindigkeit durch die Interzellularspalten sowie den Spalt zwischen Zellen und Substrat etwas reduziert werden. Dennoch erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit dem CLSM direkt nach Zugabe des Fluorophors. Dabei stellte sich heraus, dass eine klare Zellabgrenzung

auch nach Zugabe des extrazellulären Fluorophors nur eingeschränkt möglich ist. Abbildung 4.33 zeigt exemplarisch eine Position in einem Zelllayer in vier unterschiedlichen optischen Ebenen (Typ 2-Substrat). Die Aufnahmen erfolgten in Höhe des Zelllayers, beginnend mit **A** wurden die optischen Ebenen der Aufnahmen jeweils um 3.5  $\mu\text{m}$  gesenkt. Auf jedem einzelnen Bild sind die Zellkerne deutlich als dunkle Bereiche zu erkennen. Die Zellzwischenräume sind durch die Fluoreszenzsonde angefärbt. Es entsteht ein uneinheitliches Bild schmaler und breiterer Zwischenräume (**A**), was wahrscheinlich auf unterschiedliche Zellhöhen zurückzuführen ist. Breite Fluoreszenzbereiche entstehen demnach durch eine optische Ebene, die die Zellen im Bereich der Zellkerne schneidet. In tieferen Ebenen zeigte sich ein analoges Bild, allerdings kann zwischen Abbildungsteil **A** und **B** nur schwer eine Zuordnung zur selben Zelle getroffen werden. Wiederum wurden abgerundete dunkle Bereiche angeschnitten, die Zellkernen zugeordnet werden, daneben werden längliche Strukturen ohne Fluoreszenzsignal abgebildet. In Abbildung **C** wird die unterste Zelllage geschnitten, erneut verändert sich das Bild, so dass von einem Multilayer der Zellen ausgegangen wurde. Die Zelllage, die direkt auf dem Substrat aufsitzt, bewirkt offensichtlich eine selektive Porenbefüllung, wobei nur unterhalb der Zellkerne ungefüllte Poren gefunden wurden (**D**). Die Position der dunklen Bereiche stimmt mit der Position der Zellkerne in Bild **C** überein. Möglicherweise resultiert die Porenbefüllung unterhalb der peripheren Zellbereiche aus der lateralen Diffusion im Zell-Substrat-Kontakt, den Reiß auf planaren Substrate zu ( $87 \pm 5$ ) nm bestimmt hat (2004). Abbildungsteil **E** zeigt, dass die Intensität zur Mitte des Zellkerns hin abnimmt, was die These zur Diffusion von der Zellperipherie aus unterstützt. Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenzintensität entlang der Profilverraden in **D**, die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenbefüllung repräsentieren. Die verringerte Porenbefüllung unterhalb der Zellkerne würde im Umkehrschluss aus einer Reduktion der lateralen Diffusion resultieren. Außerdem ist es möglich, dass das axiale Auflösungsvermögen des CLSM nicht ausreicht, um in der Zellperipherie zwischen Fluoreszenzsignalen aus der optischen Ebene der Poren und den Zellzwischenräumen zu differenzieren. Dieses Problem würde in Regionen mit besonders flachen Zellbereichen verstärkt auftreten und wird im Anschluss am Beispiel der Endothelzellen im Permeationassay genauer untersucht. Das hier beschriebene Bild wurde analog auch auf Substraten des Typs 1 erhalten.

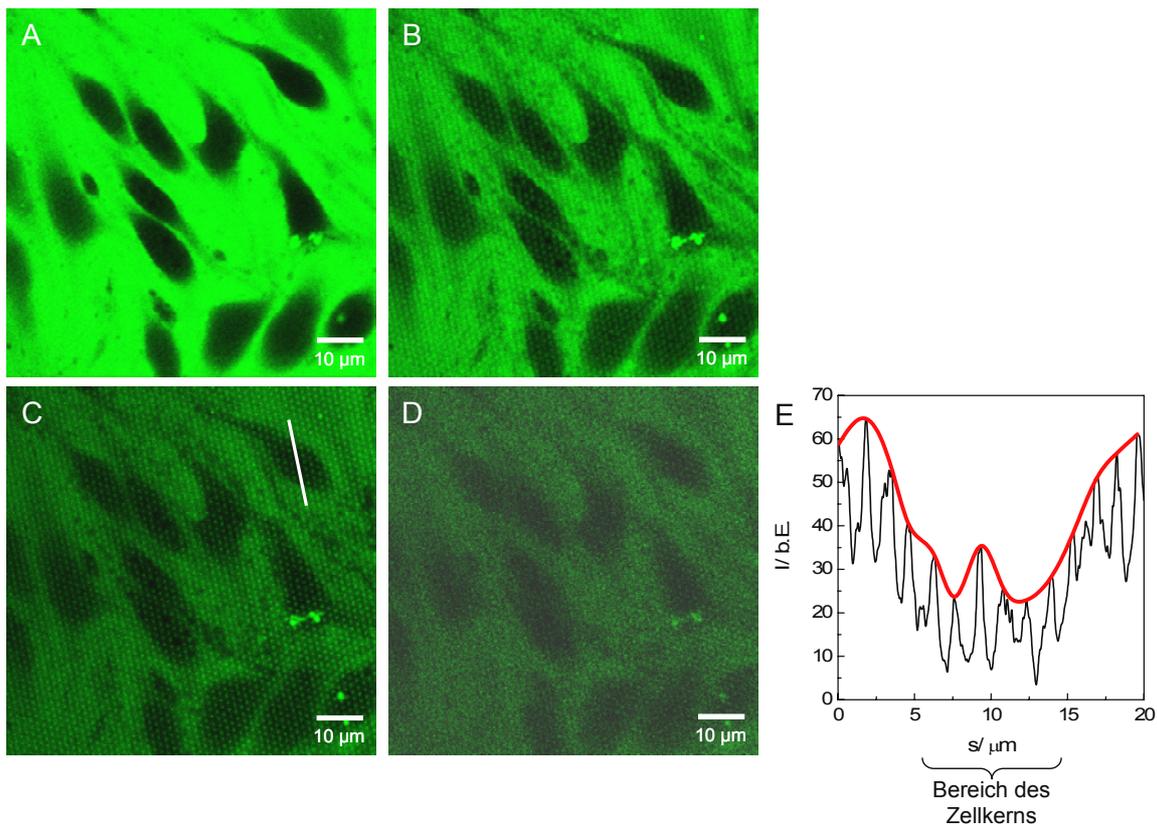


**Abb. 4.33:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines konfluenten NIH 3T3-Zelllayers nach zehnmütiger Inkubation mit einer FITC-Dextran Sonde (2.5 MDa) auf porösem Silizium (Typ 2). Die Aufnahmen zeigen optische xy-Schnitte derselben Position in unterschiedlichen Ebenen, die sich jeweils um 3.5 μm unterscheiden. **A:** 10.5 μm oberhalb der Substratoberfläche, **B:** 7 μm oberhalb, **C:** 3.5 μm oberhalb, **D:** Substratoberfläche. **E:** Auftragung der geglätteten Fluoreszenzintensität (über 25 Punkte) gegen die Position ( $s$ ) auf der Profilgeraden (in **D**). Die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenfüllung repräsentieren.

#### 4.3.2.3 Primärkultivierte Endothelzellen aus dem Schweinehirn (PBCEC) im lateral aufgelösten Permeationsassay

Die primärkultivierten Endothelzellen aus dem Schweinehirn bieten sich aufgrund ihrer hohen Barrierefunktion als Untersuchungsobjekt im Permeationsassay an. *In vivo* kleiden diese Zellen die Kapillaren des Schweinehirnes aus und etablieren so eine wirksame und physiologisch sehr bedeutsame Barriere zwischen dem Blut und dem Hirngewebe. Die Morphologie der Zellen ist spindelförmig, ausgehend vom Bereich des Zellkerns flachen die Zellen sehr stark ab. Die Zellen differenzieren *in vitro* unter idealen Bedingungen zu einem Zelllayer mit hoher Barrierefunktion aus, die durch die Zugabe von Hydrocortison gesteigert werden kann. Im Vergleich zu lichtmikroskopischen Aufnahmen auf planaren Substraten zeigten die Zellen auf porösen Substraten (Typ 1) keine morphologischen Besonderheiten. Abbildung 4.34 zeigt optische xy-Schnitte nach 1.5 h Inkubation mit der FITC-Dextran Sonde (4 kDa, 0,5 mM) in unterschiedlichen Ebenen. Die Zellkerne treten 1 μm oberhalb der Substratoberfläche dunkel hervor (**A**), **B** zeigt ein ähnliches Bild in Höhe der Substratoberfläche. Aufgrund der sehr flachen Morphologie von Endothelzellen gelingt es nicht, eine Schnittebene abzubil-

den, in der sich das Zelllumen schwarz abhebt. In Höhe der Poren (**C**) ist die Lage der Zellkerne nach wie vor zu erkennen, Abbildungsteil **E** verdeutlicht dazu den Intensitätsverlauf entlang der eingezeichneten Profilgeraden. Die Poren unterhalb der Zellperipherie erscheinen gefüllt, während im Bereich des Zellkerns die Intensitätsmaxima deutlich absinken. Dass es sich hierbei ausschließlich um einen Reflexionsartefakt handelt, kann ausgeschlossen werden, da die Porenstruktur zu erkennen ist und in diesem Bereich keine Spiegelebene vorhanden ist. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Fluoreszenzlicht handelt, das in einer höheren optischen Ebene angeregt wurde, wurde eine Aufnahme 3  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche elektronisch nachbearbeitet (**D**). Durch Erhöhung der Gesamthelligkeit und des Kontrastes können auch hier Intensitätsunterschiede detektiert werden, die die Lage der Kerne widerspiegeln. Daher wird davon ausgegangen, dass die Poren unterhalb der Zellperipherie mit der Fluoreszenzsonde gefüllt sind. Daraus folgt, dass die Sondenmoleküle die zelluläre Barriere überwinden konnten. Da nicht ausschließlich unterhalb der Interzellularspalten gefüllte Poren auftreten, tritt wahrscheinlich im Anschluss an die Permeation laterale Diffusion der Sondenmoleküle unterhalb der Zellperipherie und nur in reduziertem Maße unterhalb der Zellkerne auf.



**Abb. 4.34:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines konfluenten PBCEC-Zelllayers nach 1.5 h Inkubation mit einer FITC-Dextran Sonde (4 kDa, 0.5 mM) auf porösem Silizium (Typ 1). Optische xz-Schnitte in unterschiedlichen Ebenen. **A:** Aufnahme in Höhe der Zellkerne 1  $\mu\text{m}$  oberhalb der Substratoberfläche; **B:** Substratoberfläche; **C:** Aufnahme in Höhe der Poren (1  $\mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche), **D:** ebenfalls in Höhe der Poren (-3  $\mu\text{m}$ ) hier wurde nachträglich eine elektronische Kontrastverstärkung durchgeführt. **E:** Auftragung der geglätteten Fluoreszenzintensität (über 25 Punkte) gegen die Position auf der Profilgeraden. Die rote Linie verbindet die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenfüllung repräsentieren.

### 4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der Porenfüllung

Durch die Verwendung massenspektrometrischer Methoden<sup>3</sup> zur Analyse der Porenfüllung im Rahmen lateral aufgelöster Permeationsstudien bietet sich die Möglichkeit, Substanzen zu detektieren, ohne diese im Vorfeld etwa durch Fluorophore oder Isotope markieren zu müssen. Allerdings müssen dafür einige Rahmenbedingungen erfüllt sein, die in diesem Teil der Arbeit untersucht werden sollen. Grundsätzlich muss die Technik in der Lage sein, eine laterale Auflösung zu erreichen, die eine Detektion von Molekülen in den Poren der nanoporösen Substrate erlaubt. Gleichzeitig wird die Detektion von (Sonden)molekülen umso schwieriger, je komplexer ein Gemisch ist, in dem sie sich befinden, und je schlechter die Sekundärionenausbeute des Moleküls ist. Daher ist die Bestimmung charakteristischer Fragmentierungsmuster an Reinstoffproben der Substanz in Vorexperimenten häufig sinnvoll. Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) ist eine oberflächensensitive Analysemethode. Das heißt, nur die obersten Monolagen können analysiert werden und die zu untersuchende Fläche muss frei zugänglich sein. Daneben wird methodenbedingt im Hochvakuum gearbeitet. Gerade für biologische Proben stellt damit die Präparation eine Herausforderung dar. Für orts aufgelöste Untersuchungen werden die Massenspektren mit Nominalmassenauflösung und hoher Lateralauflösung von 150 - 400 nm (Belu et al., 2003 und Hagenhoff, 2000) im *burst alignment* Modus aufgenommen. Steht die hohe Massenauflösung im Vordergrund, die die Differenzierung innerhalb einer Nominalmasse erlaubt, wird im *bunched* Modus gemessen. Auch der letztgenannte Modus ist, da die Sekundärionen aus einem fokussierten Primärionenstrahl resultieren, orts aufgelöst, die laterale Auflösung liegt aber unterhalb von der im *burst alignment* Modus (1.2 – 5 µm, Belu et al., 2003).

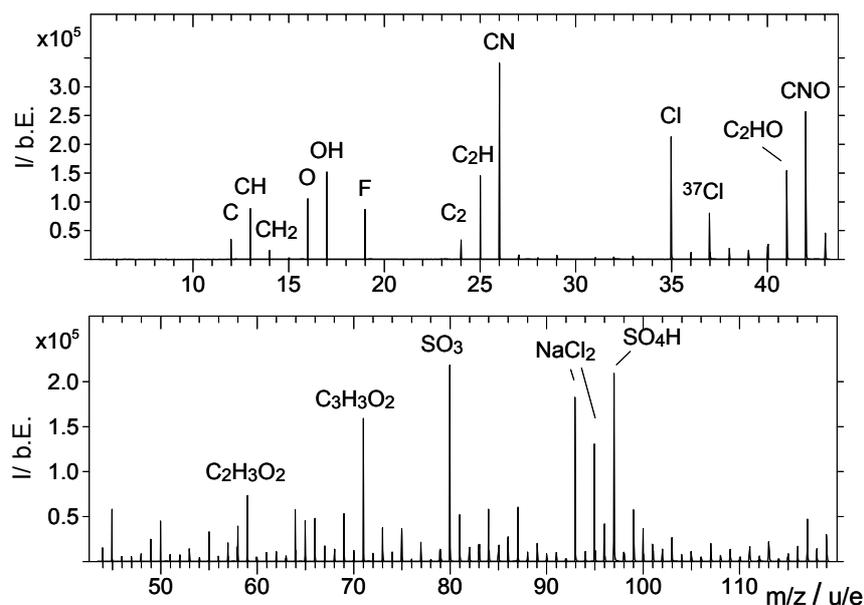
#### 4.3.3.1 Oberflächenanalyse der zellfreien porösen Substrate im *burst alignment* Modus

Zunächst stand eine Überprüfung im Vordergrund, inwieweit die orts aufgelöste ToF-SIMS-Technik dazu in der Lage ist, individuelle Poren der nanoporösen Substrate abzubilden und darin enthaltene Ionen und Moleküle zu detektieren. Es wurden nanoporöse Substrate (Typ 2) nach der Inkubation mit Natriumchloridlösung (etwa 1 M in Reinstwasser) untersucht. Dazu wurde die Oberfläche benetzt und bei RT getrocknet. Danach wurden von diesem Substrat Massenspektren mit hoher Massenauflösung aufgenommen (*bunched* Modus, Primärion: Bi<sup>+</sup>, 25 keV), die es erlauben, die charakteristischen massenspektrometrischen Signale von geladenen NaCl-Clustern eindeutig zuzuordnen (Daten nicht gezeigt). Daran schlossen sich Oberflächenabbildungen mit hoher Lateralauflösung und Nominalmassenauf-

---

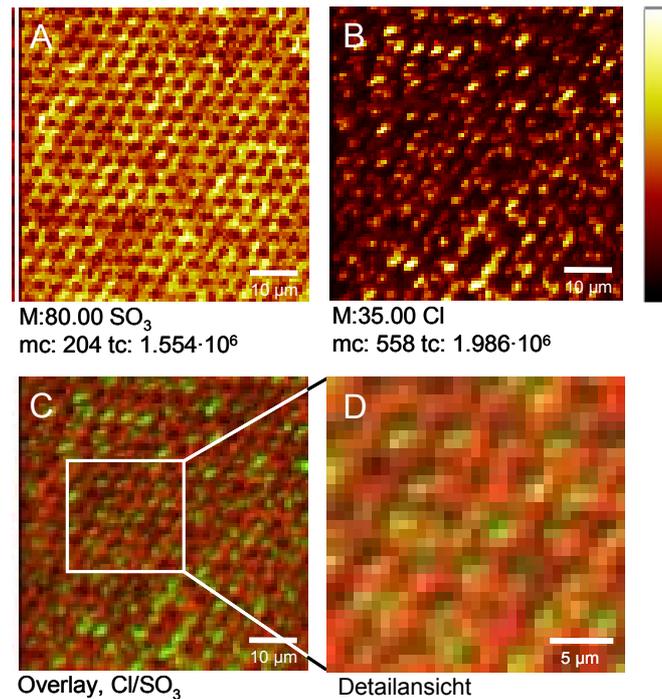
<sup>3</sup> Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in einer Kooperation mit der Tascon GmbH in Münster durchgeführt.

lösung an (*burst alignment* Modus, Primärion:  $\text{Bi}_3^+$ , 25 keV). Das in Abbildung 4.35 gezeigte Massenspektrum gibt eine Übersicht über die detektierten Sekundärionen in einem Bereich bis  $m/z = 120$  u/e, die für eine Messposition erhalten wurden. Die Angabe der Intensität spiegelt die aufsummierten *counts*, das heißt die Anzahl der Sekundärionen einer bestimmten Masse, wider. Für jede Messposition wurde solch ein charakteristisches Spektrum erhalten. Die gesamte untersuchte Fläche betrug  $90.8 \times 90.8 \mu\text{m}$ . Trotz der geringen Komplexität der untersuchten Probe können nicht alle Nominalmassen sofort einem Probenbestandteil zugeordnet werden. Nach Inkubation mit der Natriumchlorid-Lösung treten erwartungsgemäß Chlorid-Ionen ( $35$  u/e) sowie negativ geladenen NaCl-Cluster ( $93$  und  $95$  u/e) im Spektrum auf. Darüber hinaus treten allerdings auch Verbindungen auf, die weder Natriumchlorid noch dem Silizium-Substrat zugeordnet werden können. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen, die in geringem Maße im Lösungsmittel (Wasser) vorhanden waren bzw. durch die Luft auf die Oberfläche aufgetragen wurden. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode werden diese ebenfalls detektiert. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Intensität für ein Ion nicht ausschließlich von der Konzentration auf der Oberfläche abhängt. Darüber hinaus spielt das Ionisierungsverhalten bzw. die Ionenausbeute eine entscheidende Rolle, welche wiederum von verschiedenen Faktoren wie dem Primärion oder der molekularen Umgebung auf der Probe beeinflusst wird (Guerquin-Kern et al., 2005). Daher ist eine quantifizierende Betrachtung der Ionen aufgrund der Spektren nicht sinnvoll. Ein Signal für Silizium konnte weder in der negativen noch in der positiven (nicht gezeigt) Sekundärionenpolarität mit hoher Intensität erhalten werden, wahrscheinlich ist die Oberfläche durch die detektierten Ionen maskiert.



**Abb. 4.35:** Massenspektrum in negativer Sekundärionenpolarität eines mit NaCl-Lösung inkubierten Silizium-Substrates; Gesamtmessfeldgröße:  $90.8 \times 90.8 \mu\text{m}$ , Aufnahme im *burst alignment* Modus.

Die Intensität der Ionen kann gegen die Position auf dem Messfeld aufgetragen und zur Erzeugung eines zweidimensionalen Bildes genutzt werden. Die Intensität wird durch die Verwendung einer Farbskala wiedergegeben, die in 256 unterschiedliche Farbtintensitäten unterteilt ist. Grundsätzlich korrelieren helle Punkte mit einer hohen Intensität, dunkle mit einer niedrigen. In diesem Zusammenhang ist die Angabe der *maximum counts* (mc) von hoher Bedeutung: Der Wert gibt die maximale Anzahl der Ionen der betrachteten Masse in einem Punkt wieder, und steht daher auch für die höchste erreichte Intensität für das Ion. Ist dieser Wert kleiner als 256, werden nicht alle Farben der Farbskala vergeben. Allerdings wird trotzdem Positionen mit der höchsten Intensität (mc) der hellste Wert zugeordnet, was zu einem Eindruck von überzeichneten Kontrasten führen kann. Die zur Verfügung stehenden Farbtönen werden in einer Farbskala dargestellt. Aus dem beschriebenen Zusammenhang heraus ist allerdings ausschließlich eine relative Betrachtung innerhalb einer Abbildung sinnvoll. Die *total counts* (tc) geben die Anzahl aller detektierten Ionen der betrachteten Masse in diesem Bildausschnitt an. Potentiell kann für jedes der in Abbildung **4.35** gezeigten Ionen die Intensitätsverteilung auf der Gesamtmessfläche abgebildet werden. Da die Untersuchungen an dieser Stelle dazu dienen, die Lateralauflösung der Methode sowie die Möglichkeit zur Detektion eines Analyten in den Poren zu überprüfen, wurden Ionen ausgewählt, die eine Aussage dahingehend erlauben. Abbildung **4.36 A** und **B** zeigen die laterale Verteilung für  $\text{SO}_3^-$ -Ionen und  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Die  $\text{SO}_3^-$ -Ionen zeigen die höchste Intensität in einer regelmäßigen, netzartigen Verteilung mit hexagonal angeordneten Intensitätsminima, die den Poren des Substrates zugeordnet werden. Damit entsteht ein Bild, das eindeutig in Übereinstimmung mit der Substratoberfläche zu bringen ist. Im Stegbereich des Substrates werden höhere Ionenausbeuten erreicht als in den Poren. Die Verteilung der  $\text{SO}_3^-$ -Ionen wurde betrachtet, da in der negativen Sekundärionenpolarität kein charakteristisches Siliziumsignal erhalten wurde (s.o.). Die Verteilung der Chloridionen ist punktförmig und in ihrer Intensität leicht inhomogen. Es wird jeweils eine Aufkonzentration in einem begrenzten Bereich detektiert. Der *overlay* (**C**) beider Massen zeigt, dass die Verteilung der Chloridionen nicht statistisch ist, sondern mit den Porenpositionen korreliert. Die Ausschnittsvergrößerung **D** verdeutlicht zusätzlich ein technikbedingtes Artefakt, durch das eine Verschattung jeweils am linken Rand einer Pore auftritt. Der Beschuss durch die Primärionenquelle erfolgte im  $45^\circ$  Winkel von links oberhalb der Probe, so dass eine vollständige „Ausleuchtung“ der vertieften Pore nicht gewährleistet werden kann.



**Abb. 4.36:** Intensitätsverteilungen einzelner negativer Sekundärionen auf dem Messfeld (90.8 x 90.8 μm), Probe: Silizium-Substrat (Typ 2, eingetrocknete NaCl-Lösung). Analysebedingungen: *burst alignment* Modus, Primärion: Bi<sub>3</sub><sup>+</sup>, 25 keV. **A:** SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, m/z = 80 u/e; **B:** Cl<sup>-</sup> m/z = 35 u/e, **C:** Overlay der beiden Massen, grün: Cl<sup>-</sup>, rot: SO<sub>3</sub><sup>-</sup>; **D:** Detailansicht.

In Bezug auf die Lateralauflösung und die Möglichkeit zur Detektion von Ionen innerhalb der Poren zeigen die Untersuchungen, dass es mit Hilfe der ToF-SIMS-Technik möglich ist, einzelne Poren zu adressieren. Das charakteristische Muster der Stege konnte am Beispiel der Intensitätsverteilung für SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen gezeigt werden. Auf den Stegen wird erhöhte Intensität für die Ionen gemessen, im Bereich der Poren Intensitätsminima. Innerhalb der Poren konnte eine erhöhte Ionenausbeute für Chloridionen detektiert werden. Auf eine Untersuchung in positiver Sekundärionenpolarität wurde in diesem Fall verzichtet.

#### 4.3.3.2 Untersuchungen zur Stabilität der Proben im Hochvakuum und zur massenspektrometrischen Analyse in Abhängigkeit von der Probenpräparation

Die ToF-SIMS wurde unter anderem zur orts aufgelösten massenspektrometrischen Analyse von Oberflächen entwickelt. Das bedeutet, dass für eine routinemäßige Analyse die Oberfläche frei zugänglich sein muss. Im Fall des orts aufgelösten Permeationsassays sind die Poren, die die Analysesubstanz enthalten, allerdings noch von der Zellschicht bedeckt. Was eine Analyse der Porenbefüllung auf der einen Seite unmöglich macht, gewährleistet auf der anderen Seite aber unter Umständen zunächst eine Art Verschluss der Poren, der eine freie Diffusion eines Stoffes zwischen den Poren erschwert. Damit ergibt sich für die Präparation die Herausforderung, dass die Oberfläche einerseits frei zugänglich sein und andererseits der Analyt in den Poren immobilisiert vorliegen muss. Zudem muss eine ausreichende Stabi-

lität der Probe im Hochvakuum gewährleistet sein. Insbesondere der Wassergehalt der Proben muss, bevor sie in das Hochvakuum der Messkammer geschleust werden, so weit erniedrigt sein, dass eine Zerstörung der Probe durch den plötzlichen Wasserentzug vermieden wird. Grundsätzlich ergeben sich dadurch in Bezug auf die Probenpräparation Parallelen zur Elektronenmikroskopie. Neben der Kryofixierung finden hier vor allem chemische Fixierungsmethoden Anwendung, um Schrumpfungsprozesse zu vermeiden (Dykstra, 1992). Eine Studie verschiedener Fixierungsmethoden in Bezug auf ihre Wirkung und Stabilität in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen *Hoetelmans et al.* (2001). Sowohl die Methanol- als auch eine Aldehyd-basierte Fixierung führen im Fall dieser Untersuchungen zu einer ausreichenden Stabilität im Hochvakuum. Grundsätzlich handelt es sich hierbei um Fixierungsprotokolle, die auch in der Immunocytochemie routinemäßig Anwendung finden und deren Übertragbarkeit für die ToF-SIMS-Untersuchungen untersucht wurde.

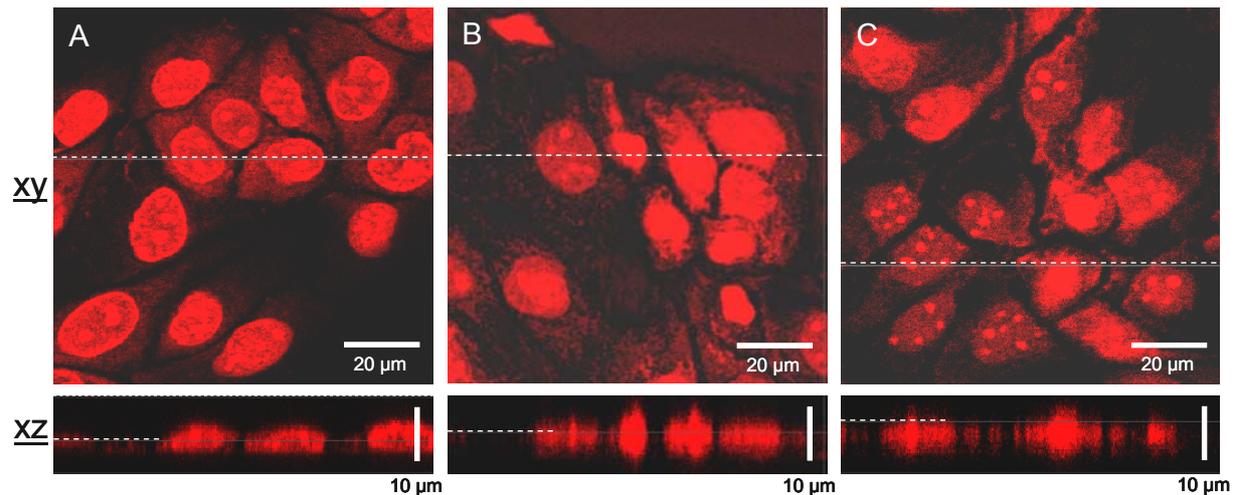
In ersten Pilotuntersuchungen wurden MDCK II-Zellen genutzt und drei verschiedene Fixierungsprotokolle untersucht: die Quervernetzung der zellulären Proteine durch Glutardialdehyd mit und ohne anschließender partieller detergentenvermittelter Permeabilisierung der Membran, sowie die Fixierung durch ein Methanol/Eisessig-Gemisch (97:3). Im Anschluss daran wurden alle Proben mit Reinstwasser gespült, um Salzreste zu entfernen und bei Raumtemperatur getrocknet. Um die Interpretation der massenspektrometrischen Analyse zu erleichtern, wurde zusätzlich eine spezifische Markierung des Zellkerns durch Ethidiumhomodimer vorgenommen. Ethidiumhomodimer zeigt charakteristische Fragmentensignale bei  $m/z = 284$  u/e,  $298$  u/e und  $326$  u/e in der positiven Sekundärionenpolarität der Spektren, die zu einem EthD-Gesamt signal aufaddiert werden können. Zusätzlich ergibt sich dadurch die Möglichkeit zu fluoreszenzmikroskopischen Kontrollaufnahmen am CLSM. Dadurch ist es möglich, die Proben sowohl vor als auch nach der ToF-SIMS-Untersuchung mikroskopisch zu untersuchen und so einen möglichen Einfluss des Hochvakuums auf die Probe festzustellen. Auf diese Weise soll abgeschätzt werden, ob und inwieweit die Probenpräparation bzw. das Hochvakuum zu einer Veränderung der Probe in Bezug auf die markierten Bereiche führt.

### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Stabilität der Proben im Hochvakuum**

Für die fluoreszenzmikroskopischen Kontrolluntersuchungen mit dem CLSM wurden die Zellen analog zu den ToF-SIMS-Proben behandelt und auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden durch Fluoreszenzaufnahmen hinsichtlich der Verteilung des Farbstoffs in lateraler und axialer Richtung untersucht. Sowohl vor als auch nach dem Eintrocknen wurden fluoreszenzmikroskopische Kontrollen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben ins Hochvakuum eingeschleust, auf diese Weise eine ToF-SIMS-Messung simuliert und erneut am

CLSM untersucht. Auf gleiche Weise wurden alle Fixierungsprotokolle, die für die ToF-SIMS Untersuchungen in Frage kamen, überprüft. Die Aufnahmen, die sich direkt an die Fixierung anschließen, wurden mit einem Tauchobjektiv (63er, NA: 0.90) durchgeführt, während alle weiteren Aufnahmen mit einem Trockenobjektiv (20er, NA: 0.50) erfolgten.

Beispielhaft sollen an dieser Stelle die Untersuchungen zur Methanol/Eisessig-Fixierung detailliert vorgestellt werden. Obwohl nicht genau bekannt ist, wie die Methanol/Eisessig-Fixierung auf molekularer Ebene wirkt, kann von einem Koagulieren der Proteine sowie dem teilweisen bis völligem Auflösen der Lipidmembran ausgegangen werden (Luttmann et al., 2006). Inwieweit darüber hinaus Reaktionen des Methanols bzw. Eisessigs mit zellulären Komponenten zu berücksichtigen sind, ist bisher nicht beschrieben. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass eine intensive Markierung der Kerne durch EthD erreicht wurde (**Abb. 4.37 A**). Im optischen xy-Schnitt heben sich die Kerne von den peripheren Bereichen der Zellen deutlich ab und zum Teil sind die Kernkörperchen als helle, fluoreszierende Punkte zu erkennen. Im Bereich der Zellperipherie tritt eine leichte unspezifische Hintergrundfluoreszenz auf. Die xz-Ansicht ermöglicht eine Einschätzung der Zellhöhe im Bereich des Zellkerns, die auf 6 - 7  $\mu\text{m}$  bestimmt wird. Nach dem Eintrocknen der Probe wird ein ähnliches Bild erhalten, es treten sowohl die Kerne als auch einzelne Kernkörperchen deutlich hervor (**Abb. 4.37 B**). Auch im Bereich des Cytoplasmas wird zum Teil Fluoreszenz angeregt, im Bereich der basolateralen Membran scheint dies verstärkt aufzutreten. Da EthD seine fluoreszierenden Eigenschaften ausschließlich durch Interaktion mit DNA erhält, ist auszuschließen, dass es sich um spezifische Fluoreszenz handelt. Insbesondere in der xz-Ansicht wird deutlich, dass die Auflösung durch die Verwendung des Trockenobjektives etwas leidet, wobei trotzdem eindeutig vom Erhalt der dreidimensionalen Struktur gesprochen werden kann. Die Zellhöhen werden anhand des Fluoreszenzsignals der Zellkerne zu 6 - 8  $\mu\text{m}$  bestimmt. Nach der Simulation der Messung und Inkubation im Hochvakuum werden keine optisch erkennbaren Veränderungen der Zellen festgestellt. Im optischen xy-Schnitt heben sich deutlich die Zellkerne und die Kernkörperchen ab (**Abb. 4.37 C**). Auch in Bezug auf die Zellhöhen wird keine Veränderung detektiert. Offensichtlich stabilisiert die Fixierung die dreidimensionale Struktur des Zellkerns hinreichend. Die unspezifische Fluoreszenz in der Zellperipherie deutet an, dass auch in diesem Bereich von einem weitestgehenden Erhalt der Bedingungen ausgegangen werden kann.

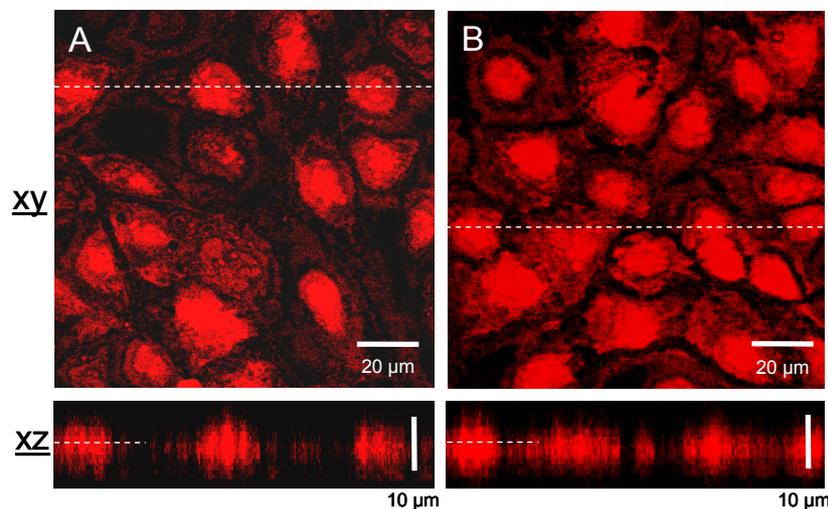


**Abb. 4.37:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Methanol/Eisessig-fixierter subkonfluenter MDCK II-Zellen auf Deckgläschen. Die Zellkerne wurden durch EthD markiert. Die xy-Ansichten zeigen jeweils optische Schnitte in Höhe der Zellkerne. **A:** nach der Fixierung unter Flüssigkeit (Tauchobjektiv, 63er, NA: 0.90), **B:** nach Lufttrocknung (Trockenobjektiv, 20er, NA: 0.50), **C:** nach Simulation einer ToF-SIMS-Messung im Hochvakuum (Trockenobjektiv, 20er, NA: 0.50). Entlang der eingezeichneten Linien wurden jeweils die optischen xz-Schnitte im unteren Abbildungsteil angefertigt, die zur Ermittlung der Zellhöhen im Bereich der Zellkerne dienen. Die dort abgebildete Linie zeigt wiederum die optische Ebene der xy-Schnitte an.

Sowohl für die reine Glutardialdehyd-Fixierung als auch für die Fixierung mit Glutardialdehyd in Verbindung mit einer detergenzvermittelten Permeabilisierung wurde eine analoge Untersuchung wie sie für Methanol/Eisessig-Fixierung vorgestellt wurde, durchgeführt. Diese sollen hier insofern verkürzt dargestellt werden, als dass nur die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Simulation der ToF-SIMS-Messung gezeigt werden.

Im Fall der Glutardialdehyd-Fixierung ist das rote Fluoreszenzsignal nicht eindeutig einer spezifischen Markierung der Zellkerne zuordbar. Obwohl nach der Fixierung davon auszugehen war, dass die Zellen tot waren, weil die zellulären Proteine chemisch vernetzt sind, wurde keine homogene Anfärbung der Kerne erhalten. Die Membranen wirkten nach wie vor als Diffusionsbarriere für den Farbstoff. Ein weiteres Problem entstand dadurch, dass bei Glutardialdehyd eine rote Autofluoreszenz auftritt, was die Qualität der Aufnahmen mindert (Tagliaferro et al., 1997). Nach dem Eintrocknen der Proben tritt die Autofluoreszenz besonders deutlich hervor. Neben der roten Fluoreszenz im Kern erscheint das Cytoplasma dadurch unspezifisch angefärbt. Nach dem Eintrocknen bzw. der Behandlung im Hochvakuum zur Simulation der ToF-SIMS Messung lassen sich keine Veränderungen der Zellen in Bezug auf die Verteilung des Fluoreszenzsignals feststellen. Auch für die Zellhöhen in der z-Ansicht werden keine Auswirkungen beobachtet, es können weiterhin Zellkerne (bzw. die diffuse Fluoreszenz der Zellkörper) mit einer Höhe von ca. 7 µm abgebildet werden (**Abb. 4.38 A**). In Bezug auf die Stabilität der Proben nach dem Eintrocknen und im Hochvakuum kann also trotz der unspezifischen Fluoreszenzsignale von einem weitgehenden Erhalt der dreidimensionalen Struktur der Zellen ausgegangen werden.

Eine Vernetzung der zellulären Proteine mit Glutardialdehyd mit anschließender Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton X-100 zeigt für die EthD-Färbung sehr ähnliche Ergebnisse. Durch die Wahl einer niedrigen Triton X-100-Konzentration und einer kurzen Inkubationszeit wurde nur eine unvollständige Permeabilisierung erwartet. Allerdings reicht dies aus, um ein deutlich verbessertes Färbeergebnis für die Kerne zu erzielen. Die Kerne treten durch erhöhte Fluoreszenzintensität hervor, es sind sogar einzelne Kernkörperchen zu erkennen. Der Bereich des Cytoplasmas weist die angesprochene Glutardialdehyd-Autofluoreszenz auf. Morphologischen Veränderungen in Folge des Hochvakuums lassen sich in Bezug auf die Zellkerne nicht beobachten. Für die Zellhöhen, detektiert über die diffuse Glutardialdehyd Eigenfluoreszenz in den Zellkörpern und die Höhe der Zellkerne, wurde ebenfalls kein Einfluss festgestellt. Im Bereich der Zellkerne sind die fixierten Zellen 6 - 8  $\mu\text{m}$  hoch (**Abb. 4.38 B**).



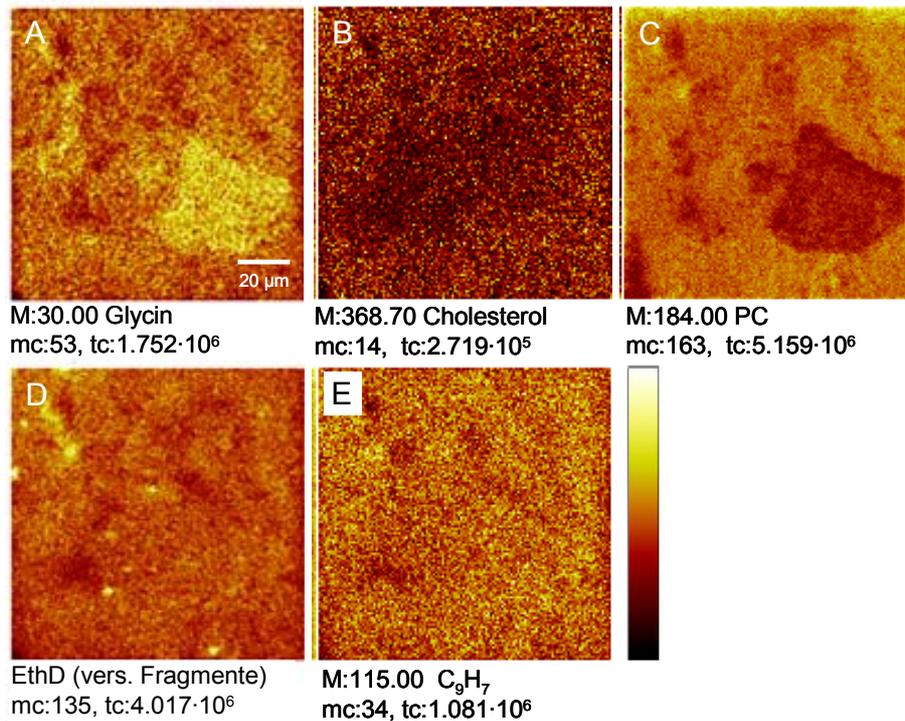
**Abb. 4.38:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Glutardialdehyd-fixierter subkonfluenter MDCK II-Zellen auf Deckgläschen. Die Zellkerne wurden durch EthD markiert. Die xy-Ansichten zeigen jeweils optische Schnitte in Höhe der Zellkerne nach der Fixierung, Lufttrocknung und Simulation einer ToF-SIMS-Messung im Hochvakuum. **A:** nach GA-Fixierung (Trockenobjektiv, 20er, NA: 0.50), **B:** GA-Fixierung und Permeabilisierung durch Triton X-100 (Trockenobjektiv, 20er, NA: 0.50). Entlang der eingezeichneten Linien wurden jeweils die optischen xz-Schnitte im unteren Abbildungsteil angefertigt, die zur Ermittlung der Zellhöhen im Bereich der Zellkerne dienen. Die dort abgebildete Linie zeigt wiederum die optische Ebene der xy-Schnitte an.

### ToF-SIMS-Analyse Glutardialdehyd-fixierter Zellen

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die Zellen auf planaren Indiumzinnoxid (ITO)-Substraten kultiviert. Im Hinblick auf den Einsatz der ToF-SIMS in lateralaufgelösten Permeationsstudien ist es entscheidend, auch in den Vorversuchen auf planaren Substraten eindeutig die Substratoberfläche identifizieren zu können. ITO kann als Indium bzw. Indiumcluster nachgewiesen werden. Das Hauptisotop des Indiums ( $^{115}\text{In}$ ) zeigte in der positiven Sekundärionenpolarität ein Signal bei  $m/z = 115$  u/e. Dieses Signal ist allerdings in der Nominalmassenauflösung des *burst alignment* Modus nicht eindeutig, da auch das Molekülfragment  $\text{C}_9\text{H}_7$  (115.05 u/e) ein Signal der Nominalmasse 115 u/e erzeugt. Zur Eindeuti-

gen Identifizierung wurden daher Spektren im *bunched* Modus aufgenommen und zur Interpretation der Nominalmassen genutzt.

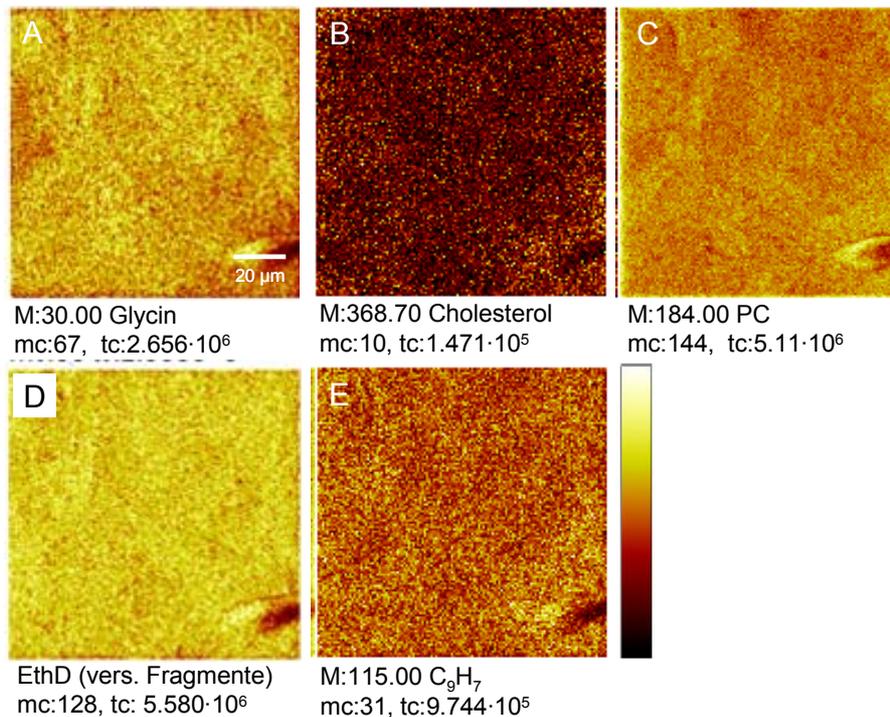
Die Präparation der Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die Massenspektren im *burst alignment* Modus (hohe Lateralauflösung) sowie im *bunched* Modus (hohe Massenauflösung) aufgenommen. Als Primärionen wurden  $\text{Bi}^+$  bei 25 keV im *bunched* Modus und  $\text{Bi}_3^+$  bei 25 keV im *burst alignment* Modus eingesetzt. Abbildung 4.39 gibt eine Übersicht zur lateralen Verteilung charakteristischer Sekundärionen. Grundsätzlich gilt für alle Sekundärionen, dass die *maximum counts* deutlich unterhalb von 256 liegen, so dass nicht alle Farbnuancen vergeben werden. Aminosäuren (**A**, am Beispiel von Glycin) und Lipid-Fragmente (**B**: Cholesterin-Fragmente, **C**: Phosphatidylcholin-Fragmente) sind in hoher Intensität zu detektieren. Für Ethidiumhomodimer (**D**) werden punktförmige Bereiche hoher Intensität abgebildet, wahrscheinlich handelt es sich um Aggregate auf der Zelloberfläche. Nicht in Einklang zu bringen ist die Verteilung mit dem Bild einer Kernfärbung, wie sie mit dem CLSM erhalten wird, was darauf hindeutet, dass die Kerne durch die Zellmembran verdeckt sind. Das Sekundärion des Massen/Ladungsverhältnisses  $m/z = 115$  u/e ist in geringer Intensität nachweisbar (**E**). Zusammenfassend wird festgehalten, dass Membranbestandteile und Proteine detektiert werden, aber keine Sekundärionen aus dem Zellkern (EthD) freigesetzt werden können. Anhand von Spektren mit hoher Massenauflösung (*bunched* Modus) kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Signal  $m/z = 115$  u/e um Indium handelt. Aufgrund dessen wird diese Masse nicht Indium sondern einem Kohlenwasserstoff zugeordnet, spezifische Sekundärionen des Substrates können also nicht erzeugt bzw. detektiert werden. Weitere, hier nicht abgebildete detektierte Sekundärionen positiver Polarität: Natrium, aliphatische und stickstoffhaltige Kohlenwasserstoffe, Fettsäurereste, Phosphat, POPC. Es wurden keine Spektren der negativen Sekundärionen aufgezeichnet.



**Abb. 4.39:** ToF-SIMS: Laterale Verteilung charakteristischer Sekundärionen ( $[u/e]$ ) GA-fixierter MDCK II-Zellen im *burst alignment* Modus ( $Bi_3^+$ , 25 keV, pos. Polarität). **A:** Glycin, **B:** Cholesterol, **C:** Phosphatidylcholin-Kopfgruppenfragmente, **D:** Ethidiumhomodimer ( $m/z = 284$  u/e, 298 u/e, 324 u/e), **E:** Kohlenwasserstoff-Fragment. Es werden keine spezifischen Ionen des Indium-Substrates erzeugt bzw. detektiert.

#### ToF-SIMS-Analyse Glutardialdehyd-fixierter Zellen nach Inkubation mit Triton X-100

Analog zu der Untersuchung von Zellen ohne Permeabilisierung wurden Spektren im *burst alignment* (hohe Lateralauflösung,  $Bi_3^+$  bei 25 keV) sowie im *bunched* Modus (hohe Massenauflösung,  $Bi^+$  bei 25 keV) aufgenommen. Die massenspektrometrischen Aufnahmen zeigten keinerlei Unterschiede zur reinen GA-Fixierung. Die *maximum counts* sind ebenfalls niedrig. Es werden Aminosäure- (**A**, am Beispiel von Glycin) und Lipidfragment-Signale (**B:** Cholesterol-Fragmente, **C:** Phosphatidylcholin-Fragmente) in hoher Intensität erhalten. EthD (**D**) zeigt keine Intensitätsunterschiede, die eine Lokalisation der Zellkerne erlauben. Das Sekundärion mit dem Massenverhältnis  $m/z = 115$  u/e (**E**) wird in ausreichender Intensität erhalten. Analog zu den Untersuchungen der Zellen ohne Triton X-100 wurden auch für diese Proben Spektren mit hoher Massenauflösung aufgenommen, so dass ausgeschlossen werden kann, dass Indium das Signal bei  $m/z = 115$  u/e dominiert. Es handelt sich um das Signal eines Kohlenwasserstoffes ( $C_9H_7$ ). Die Substratoberfläche wird offensichtlich nicht durch das Primärion erreicht bzw. es können keine spezifischen Signale für das Substrat detektiert werden. Weiterhin werden Signale für Natrium, aliphatische und stickstoffhaltige Kohlenwasserstoffe, Fettsäurereste, Phosphat und POPC ohne nennenswerte Kontrastierung erhalten. Alle Ergebnisse beruhen auf Sekundärionen positiver Polarität.

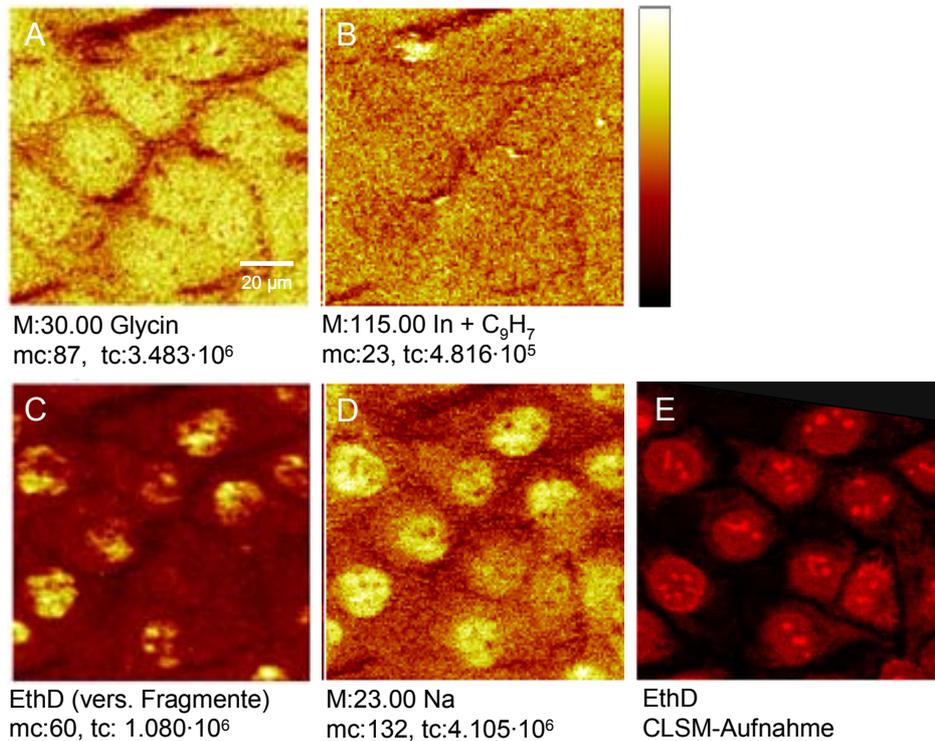


**Abb. 4.40:** ToF-SIMS: Laterale Verteilung charakteristischer Sekundärionen ( $[u/e]$ ) GA-fixierter und permeabilisierter MDCK II-Zellen im *burst alignment* Modus ( $Bi_3^+$ , 25 keV, pos. Polarität). **A:** Glycin, **B:** Cholesterol, **C:** Phosphatidylcholin-Kopfgruppenfragmente, **D:** Ethidiumhomodimer ( $m/z = 284 u/e$ ,  $298 u/e$ ,  $324 u/e$ ), **E:** Kohlenwasserstoff-Fragment. Es können keine spezifischen Ionen des Indium-Substrates erzeugt bzw. detektiert werden.

#### ToF-SIMS-Analyse Methanol/Eisessig-fixierter Zellen

Im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen wurde ein gänzlich anderes Bild erhalten, wenn die Zellen durch Methanol/Eisessig fixiert wurden. Die Übersicht (**Abb. 4.41**) gibt die Intensitätsverteilungen charakteristischer Sekundärionen wieder. Auch hier gilt, dass die *maximum counts* für die Sekundärionen deutlich unterhalb von 256 liegen, so dass nicht alle Farbnuancen vergeben werden können. Für Aminosäuren (**A**, am Beispiel von Glycin) werden hohe Intensitäten erhalten, die Einzelzellen und subzelluläre Strukturen erkennen lassen. Von der Peripherie zur Mitte einzelner Zellkörper nimmt die Intensität des detektierten Ions zu. Für das Nominalmassenverhältnis  $m/z = 115 u/e$  (**B**) werden Sekundärionen erhalten, die nun allerdings nicht mehr ausschließlich einem Kohlenwasserstofffragment zugeordnet werden können. Dieser Punkt wird daher im Anschluss anhand von Experimenten mit hoher Massenauflösung erneut besprochen. Ethidiumhomodimer-Fragmente (**C**) werden in hohen Intensitäten nachgewiesen, die Verteilung zeigt eine zellkerntypische Anreicherung. Die Verteilung deckt sich mit den in Bild **A** erhaltenen Intensitätsverteilungen für Glycin insofern, als das eindeutig zelluläre Strukturen erhalten werden. Einen analogen Kontrast wie EthD bilden die detektierten Natriumionen (**D**). Bemerkenswert ist, dass in den Massenspektren keine Membrankomponenten wie Phosphatidylcholin, Cholesterol oder Fettsäuren detektiert werden können. Neben den in Abbildung **4.41** abgebildeten Sekundärionen werden Signale für Fluor, aliphatische, aromatische und stickstoffhaltige Kohlenwasserstoffe, Phosphate, Sulfate

und Vitamin E erhalten. Abbildungsteil **E** zeigt das ToF-SIMS-Messfeld, das im Anschluss an die Messung im TRITC-Kanal fluoreszenzmikroskopisch am CLSM untersucht wurde. Aufgrund der Interaktion des Farbstoffs Ethidiumhomodimer mit der DNA fluoreszieren die Zellkerne rot. Die Verteilung lässt sich mit massenspektrometrisch erhaltenen Intensitätsverteilungen für EthD und Natrium zur Deckung bringen. Diese Aufnahme unterstreicht außerdem, dass weder das Hochvakuum noch die Messung an exakt dieser Stelle zu einer mikroskopisch detektierbaren Zerstörung der Probe führen.

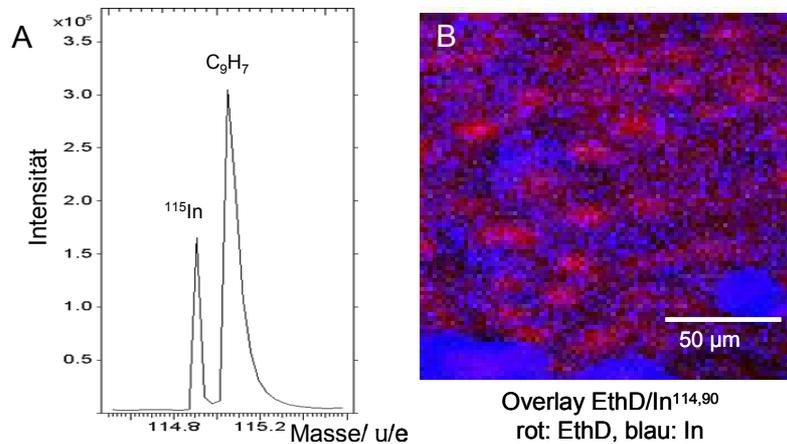


**Abb. 4.41:** ToF-SIMS: Laterale Verteilung charakteristischer Sekundärionen Methanol/Eisessig-fixierter MDCK II-Zellen im *burst alignment* Modus ( $\text{Bi}_3^+$ , 25 keV, pos. Polarität). **A:** Glycin, **B:** Indium und Kohlenwasserstoff-Fragment. **C:** Ethidiumhomodimer ( $m/z = 284$  u/e, 298 u/e, 324 u/e), **D:** Natrium, **E:** CLSM-Aufnahme im Anschluss an die ToF-SIMS-Messung.

### ToF-SIMS-Analyse Methanol/Eisessig-fixierter Zellen im *bunched* Modus

Da die im *burst alignment* Modus erhaltenen Nominalmassen kein eindeutiges Ergebnis für Sekundärionen der Masse  $m/z = 115$  u/e ergeben, wird eine Untersuchung im *bunched* Modus mit  $\text{Bi}_3^+$ -Primärionenclustern angeschlossen. Aufgrund der erhöhten Massenauflösung können in diesem Modus im Bereich der Masse  $m/z = 115$  u/e zwei Signale voneinander unterschieden werden: Ein Indiumsignal der Masse  $m/z = 114.90$  u/e und ein Signal des Kohlenwasserstofffragmentes  $\text{C}_9\text{H}_7$  mit der Masse  $m/z = 115.05$  u/e (**Abb. 4.42 A**). Gerätetechnisch geht die erhöhte Massenauflösung jedoch mit einem Verlust der Lateralaufklärung einher: kann bei Nominalmassenaufklärung standardmäßig eine Lateralaufklärung von 300 nm erreicht werden, so beträgt diese im *bunched* Modus etwa 1200 nm (Belu et al., 2003). Dadurch erscheinen die Oberflächenabbildungen unschärfer als die zuvor gezeigten ToF-SIMS-

Ergebnisse (**Abb. 4.42 B**). Im Gegensatz zur reinen chemischen Vernetzung der zellulären Proteine durch Glutardialdehyd und auch im Gegensatz zu einer Permeabilisierung dieser Zellen durch Triton X-100, wird durch die Methanol/Eisessig-Fixierung sowohl der Zellkern (EthD, rot) als auch das darunter liegende Substrat (blau) durch die Primärionen erreicht. Aus beiden Bereichen können spezifische Sekundärionen erzeugt und detektiert werden.

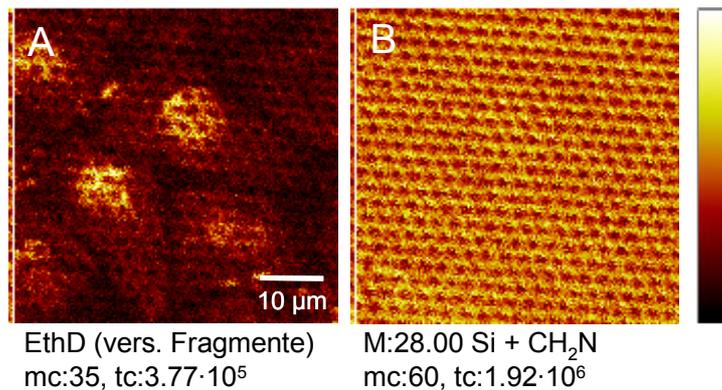


**Abb. 4.42:** ToF-SIMS im *bunched* Modus: **A:** Peakliste für die Nominalmasse  $m/z = 115$  u/e; ( $\text{Bi}_3^+$ , 25 keV, pos. Polarität). **B:** Overlay für EthD (rot) und Indium (blau, bei  $m/z = 114.90$  u/e).

#### 4.3.3.3 ToF-SIMS-Untersuchungen Methanol/Eisessig-fixierter Zellen auf nanoporösem Silizium

Im Hinblick auf die Anwendung eines massenspektrometrischen *readouts* für Permeationsstudien auf nanoporösen Substraten, wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf poröses Silizium als Kultursubstrat für Methanol/Eisessig-fixierte MDCK II-Zellen untersucht. Es wurde im *burst alignment* Modus gearbeitet, wodurch eine hohe Lateralauflösung bei Nominalmassenauflösung erreicht wird. Für die Sekundärionen gilt, dass die *maximum counts* deutlich unterhalb von 256 liegen, so dass nicht alle Farbnuancen vergeben werden. Die Massenspektren zeigen sauerstoffhaltige, stickstoffhaltige, aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe. So lässt das Auftreten der Signale  $m/z = 30$  u/e, 44 u/e und 70 u/e auf die Aminosäuren Glycin, Alanin und Prolin schließen. Im Unterschied zu den Untersuchungen auf ITO-Substraten wurden außerdem Phosphatidylcholin-Kopfgruppenfragmente ( $m/z = 182.00$  u/e) in der positiven Polarität sowie Fettsäurereste ( $m/z = 256.00$  u/e, 281.00 u/e, 282.00 u/e) in der negativen Polarität detektiert, Fragmente des Cholesterols ( $m/z = 368.70$  u/e) sind nicht nachweisbar. Die laterale Verteilung für die Zellmembran-Fragmente zeigt nur eine sehr schwache Kontrastierung, zur Zellperipherie kann allenfalls eine leichte Abnahme der Signalintensität abgebildet werden (Abbildung nicht gezeigt). Trotz der offensichtlich nicht vollständigen Auflösung der Zellmembran werden charakteristische Fragmentensignale für EthD erhalten, dessen laterale Verteilung eindeutig die spezifische Markierung der Zellkerne widerspiegelt (**Abb. 4.43 A**). In der lateralen Verteilung des EthD-Signals zeichnet sich außerdem die Struktur des Substrates ab. Dass es sich hierbei tat-

sächlich um eine lokale Konzentration der Fragmente handelt, ist eher unwahrscheinlich. Die Desorption resultiert aus einer Stoßkaskade, die durch den Primärionenaufschlag erzeugt wurde und die möglicherweise durch die festere Basis auf den Stegen erleichtert wird. Die Intensitätsverteilung für das Ion der Masse  $m/z = 28$  u/e bildet die Struktur des nanoporösen Siliziums ab (Abbildungsteil **B**). Der Verbleib der Zellkerne nimmt offensichtlich keinen Einfluss auf die Erzeugung bzw. Detektion der Sekundärionen. Die Masse wird aufgrund von analog durchgeführten Untersuchungen im *bunched* Modus hauptsächlich den Sekundärionen des Siliziums zugeordnet. In der Abbildung im *burst alignment* Modus wird ein Teil der Intensität aber auch durch ein stickstoffhaltiges Kohlenwasserstofffragment ( $\text{CH}_2\text{N}$ ) hervorgerufen.



**Abb. 4.43:** ToF-SIMS, *burst alignment* Modus: Methanol/Eisessig-fixierte MDCK II-Zellen auf nanoporösem Silizium (Porendurchmesser 1.3  $\mu\text{m}$ ) ( $\text{Bi}^+$ , 25 keV, pos. Polarität). **A:** EthD ( $m/z = 284$  u/e, 298 u/e, 324 u/e), **B:** Silizium und  $\text{CH}_2\text{N}$  ( $m/z = 28$  u/e).

## 4.4 Diskussion

Die in diesem Teil der Arbeit vorgestellten nanoporösen Silizium-Substrate wurden als funktionalisierte Kulturoberflächen für tierische Zellen eingesetzt. Die Arbeiten hatten zum Ziel, ein Analyseverfahren zu entwickeln, das eine detaillierte und ortsaufgelöste Untersuchung des Transportes über die zelluläre Barriere erlaubt. Dies setzt voraus, dass ausdifferenzierte Grenzflächengewebe auf den porösen Substraten kultiviert werden können und der Differenzierungszustand ähnlich dem von Zellen auf etablierten Zellkulturoberflächen ist. Bisher wurden strukturierte Substrate dieser Art nicht für Zellkulturexperimente verwendet, auch fluoreszenzmikroskopische und impedanzspektroskopische Charakterisierungen im Zusammenhang mit tierischen Zellen sind nicht beschrieben. *Drexler* und *Steinem* (2003) nutzen goldbelegte nanoporöse Aluminiumsubstrate mit einem Porendurchmesser von  $(50 \pm 5)$  nm in impedanzspektroskopischen Untersuchungen. Die porösen Elektroden werden eingesetzt, um Lipidmembranen über die Poren zu spannen, und die passiven elektrischen Eigenschaften zu untersuchen. Allerdings unterscheidet sich das System im Material, Porendurchmesser und der Oberflächentopographie deutlich von den in dieser Arbeit eingesetzten nanoporösen Substraten, so dass zunächst eine grundlegende Charakterisierung der Oberflächen im Vordergrund stand. Im Anschluss wurde die Eignung der Oberflächen für die Zellkultur überprüft, und durch das Aufbringen einer Goldschicht eine poröse Elektrode für die impedanzspektroskopischen Untersuchungen erzeugt. Die Untersuchungen sind daher aus zweierlei Hinsicht von Bedeutung: sie dienen einerseits der Etablierung einer geeigneten impedanzspektroskopischen Messmethodik auf den strukturierten Oberflächen und werden gleichzeitig eingesetzt, um die Zelldifferenzierung zu charakterisieren.

Die Poren der Substrate dienen als ortsfeste Auffangbehälter unterhalb der Zellen für permeierende Substanzen bzw. Sondenmoleküle. Da der Permeationsweg über die Zellschicht dokumentiert werden soll, sollte das Substrat im Idealfall keinen zusätzlichen Einfluss auf die laterale Verteilung der Moleküle haben. Dies setzt voraus, dass die Poren instantan befüllt werden können, bzw. eine freie Diffusion der Moleküle in der wässrigen Phase erlauben. Der analytische Nachweis der Porenfüllung erfolgte zur Etablierung des Konzeptes fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe eines markierten Dextranmoleküls. Dazu wurde die konfokale Laser-Raster Mikroskopie eingesetzt, wobei zunächst geklärt werden musste, inwieweit das optische Auflösungsvermögen für diese Fragestellung geeignet ist. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Umsetzung eines Nachweises unmarkierter Substanzen in den Poren mit Hilfe der lateral aufgelösten Sekundärionenmassenspektrometrie durchgeführt.

#### 4.4.1 Allgemeine und mikroskopische Charakterisierung der nanoporösen Oberflächenstrukturen

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Silizium-Substrate besitzen eine ähnliche Oberflächenstruktur. Von einer planaren Oberfläche fallen pyramidenförmige Vorätzbereiche ab, die in eine Pore münden. Durch Variation der Gitterkonstante, Porendurchmesser und Gestaltung der Vorätzstrukturen resultieren unterschiedliche Oberflächentopographien, die vor einer weiterführenden Verwendung charakterisiert werden müssen.

Durch die Strukturierung sinkt der Anteil der planaren Oberfläche im Verhältnis zu einer Vergleichsfläche gleicher Kantenlänge auf einen Anteil von 13 % für Substrate mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1) und auf 65 % für Substrate mit einem Porendurchmesser von 1.3  $\mu\text{m}$  (Typ 2). Zur Erzeugung der porösen Elektrode kann durch das Aufbringen einer Goldschicht allerdings nicht selektiv der Stegbereich mit Gold belegt werden. Die trapezförmigen Vorätzstrukturen, die in einem Winkel von 56 ° bzw. 68 ° gegenüber der Stegoberfläche abfallen, werden, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, ebenfalls mit einer Goldschicht überzogen. Erfolgt rein rechnerisch eine Addition dieser Flächen zu den planaren Stegen, so vergrößern sich die elektrisch zugänglichen Oberflächen um 4 % im Fall der Typ 1-Substrate und um 37 % für Substrate des Typs 2 gegenüber einem planaren Vergleichssubstrat. Nicht berücksichtigt sind elektronenmikroskopisch sichtbare Mikro- und Submikrostrukturierungen der Goldoberfläche sowie die Benetzung der Porenninnenwände mit Gold, die ebenfalls zu einer Oberflächenvergrößerung führen.

#### Mikroskopische Untersuchungen zellfreier Substrate am CLSM

Die Untersuchungen zur Benetzbarkeit der Substratoberfläche mit einer wässrigen Lösung hat aus zweierlei Gründen Bedeutung: Zunächst ist eine gute Benetzbarkeit ein wichtiges Indiz für die Biokompatibilität der Oberfläche, darüber hinaus kann durch die Befüllung der Poren mit einer Fluoreszenzsonde untersucht werden, inwieweit die konfokale Laser-Raster Mikroskopie (CLSM) für den Nachweis einer Fluoreszenzsonde in den Poren einsetzbar ist. Außerdem ist die schnelle Befüllung der Poren Grundlage für die Verwendung der Substrate im Permeationsassay. Der erstgenannte Punkt erlangt Bedeutung, da Zellen nicht direkt mit der Substratoberfläche interagieren, sondern mit den dort adsorbierten Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Die Zell-Substrat-Interaktion beinhaltet somit die Adsorption dieser Proteine an das Substrat und die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und den oberflächenassoziierten Proteinen (Kasemo, 2002). Die ECM wird durch hochspezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt, und es entstehen Zell-Substrat-Kontakte. Die größte Klasse dieser Rezeptoren sind die sogenannten *Integrine*,  $\alpha$ ,  $\beta$ -heterodimere Transmembranproteine, die über extrazelluläre Domänen mit den immobilisierten Proteinen wechselwirken und intrazellulär mit dem Cytoskelett assoziiert sind (Tirrell, 2002).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Benetzung der Oberfläche, die anhand der Befüllbarkeit der Substratporen untersucht wurde, zeigen zunächst, dass das optische Auflösungsvermögen des CLSM ausreicht, um sowohl in axialer als auch in lateraler Dimension einzelne Poren abzubilden und zwischen Pore und Stegbereich zu differenzieren. Aus der Benetzbarkeit der Poreinnenwände mit einer wässrigen Lösung resultiert ein Kapillareffekt, der sich unterstützend auf die Porenbefüllung auswirken sollte. Da sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung eine homogene Fluoreszenzverteilung ohne erkennbare Zeitabhängigkeit detektiert wurde, kann für die folgenden Untersuchungen ein limitierender Effekt der Oberfläche oder der Topographie des Substrates bezüglich der Porenbefüllung mit einer wässrigen Lösung ausgeschlossen werden. Die Abbildung der Porenstruktur in z-Richtung mit Hilfe des CLSM ist aufgrund der Porendurchmesser und des Öffnungswinkels des Objektivs eingeschränkt (Kapitel 4.1.1). Daraus folgt, dass auf Substraten des Typs 2 eine optische Ebene bis etwa  $6.5 \mu\text{m}$  unterhalb der Substratoberfläche untersucht werden kann, auf Substraten des Typs 1 bis etwa  $4.5 \mu\text{m}$  (die Angaben gelten unter den genannten Geräteeinstellungen). Bei gleicher Anregungsintensität ist es also bei größerem Porendurchmesser möglich, in tieferen Ebenen Fluoreszenz anzuregen und zu detektieren. Setzt man die semiquantitativ ermittelten Eindringtiefen zueinander ins Verhältnis, so erhält man das gleiche Ergebnis wie für das Verhältnis der Porendurchmesser (1.4), was den beschriebenen Zusammenhang zur Porengröße untermauert. Für die Porenbefüllung wurde für die betrachteten Zeiträume keine Zeitabhängigkeit bestimmt. Aus methodischer Sicht ist die Grundlage für eine optische Auswertung lateral aufgelöster Permeationsstudien erbracht. Die biologisch aktive Form von Proteinen der ECM ist gekennzeichnet durch ein kompliziertes Wechselspiel von hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen. Um die Tertiärstruktur der Proteine aufrecht zu erhalten, werden hydrophobe Bereiche in das Molekülinnere verlagert und so nicht der wässrigen Umgebung ausgesetzt (Strecher, 1999). Treffen Proteine nun auf hydrophobe Oberflächen, wird durch Wechselwirkung mit diesen Bereichen die Konformation des Moleküls verändert. Daher binden hydrophobe Oberflächen mehr Proteine, verändern allerdings die aktive Form. Hydrophile Oberflächen dagegen unterstützen die aktive Form der Proteine eher und sind daher besser für die Zellkultur geeignet (Kasemo, 2002). Die Hydrophilie und damit die Zellkompatibilität einer Oberfläche kann daher über ihre Benetzbarkeit mit Wasser abgeschätzt werden (Vogler, 1998). Die mikroskopischen Aufnahmen belegen, dass die Oberfläche instantan und komplett von der Lösung bedeckt wird. Eine weitere Quantifizierung, etwa die Bestimmung der Kontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens, wurde nicht vorgenommen. Das Ergebnis kann aber als starkes Indiz für eine hydrophile Oberfläche angesehen werden.

Die eindeutige mikroskopische Identifizierung der Oberfläche der Substrate wird dadurch erschwert, dass das eingestrahelte Licht am Silizium bzw. an der Grenzfläche Silizi-

um/Siliziumdioxid gespiegelt wird. Eine Unterscheidung von gefüllten und ungefüllten Poren ist aufgrund der Detektion des Farbstoffes in tieferen Ebenen trotzdem eindeutig möglich. Die Reflexion an der Substratoberfläche tritt stärker bei blauem Anregungslicht auf (Ergebnisse nicht gezeigt), eine Beobachtung, die sich mit der Eigenschaft der Substrate als „*long-pass*-Filter“, die den Durchtritt längerwelligen Lichtes begünstigt, deckt (Prof. Dr. Wehrspohn, Universität Paderborn, persönliche Mitteilung).

#### **4.4.2 Untersuchungen zur Zelldifferenzierung auf porösen Silizium-Substraten**

Silizium- bzw. Siliziumdioxidoberflächen finden bereits häufige Anwendung in der Zellkultur (Petronis et al., 2003, Fromherz und Stett, 1995). Für verwendeten Oberflächen wurde daher nicht damit gerechnet, dass grundsätzliche Probleme bezüglich der Cytokompatibilität entstehen. Das chemisch weitgehend inerte, leicht zu sterilisierende Silizium bietet die Möglichkeit, durch nasschemische Ätzprozesse die Oberfläche in Nanometer- bis Mikrometerdimension definiert zu strukturieren. Dies wird vielfältig genutzt und lehnt sich zum Teil an Methoden aus der industriellen Computerchip-Technologie an (Sandison et al., 2002.). *Braun und Fromherz* (1997, 2001) nutzen strukturierte Siliziumdioxidoberflächen sowohl für die Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie als auch zur Messung der Aktionspotentiale von Neuronen durch in die Oberfläche integrierte Feldeffekttransistoren. Für diese Anwendungen werden allerdings nicht poröse Oberflächen genutzt. Dass die Substrattopographie das Zellwachstum beeinflusst, konnten *Petronis et al.* (2003) am Beispiel von Fibroblasten auf titanbeschichtetem Silizium zeigen. Die Autoren finden einen Zusammenhang zwischen verringerter planarer Adhäsionsfläche und niedrigerer Zelldichte. *Curtis und Wilkinson* (2001) geben eine Übersicht über die Entwicklung der Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächentopographie auf das Zellwachstum. Die technischen Möglichkeiten zur Strukturierung der Oberflächen im Submikrometerbereich wurden seit den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts extrem weiterentwickelt, so dass Erkenntnisse zur Zelladhäsion und Zelldifferenzierung in Abhängigkeit von der Oberflächentopographie gewonnen werden konnten. So wurden für regelmäßig strukturierte Silizium-Oberflächen mit 50 nm breiten Furchen eine verringerte Zelladhäsion für epitheliale Zellschichten festgestellt. Die grundlegenden Untersuchungen zur Zelldifferenzierung wurden in dieser Arbeit zunächst am Beispiel der MDCK II-Zellen durchgeführt.

##### **4.4.2.1 Immuncytochemische Untersuchungen zum Differenzierungszustand der Epithelzelllinie MDCK II**

MDCK II-Zellen werden häufig verwendet, um die typischen Eigenschaften wie Polarität und Barriereigenschaften eines Grenzflächenepithels zu modellieren (Cereijido et al., 1980).

*Contreras et al.* (1999) konnten für die Zellen die typischen Verteilungen und Strukturen der *tight junction* Proteine ZO-1 und Occludin im Bereich der lateralen Membran nachweisen. Die *tight junctions* haben nicht nur entscheidende Bedeutung für die Barriereigenschaften der Zellen, darüber hinaus fungieren sie als Diffusionsgrenze für Membranbestandteile zwischen dem apikalen und basolateralen Membrankompartiment. Auf diese Weise wird die Polarität der Membranen aufrecht erhalten (Cereijido et al., 1993). Daneben konnten die Autoren für Zellen auf planaren Substraten zeigen, dass Vinkulin, ein Protein charakteristisch für Fokalkontakte, im Bereich der basolateralen Membran in Form von punktuellen Anreicherungen nachgewiesen werden kann. Allerdings belegen frühere Studien, dass die Polarität der Zellen auf planaren Substraten nicht vollständig ausgeprägt ist. Empfohlen wird die Kultur der Zellen auf permeablen Substraten, da auf diese Weise der Kontakt zum Zellkulturmedium nicht nur auf die apikale Zellmembran beschränkt ist. Auf planaren Substraten dagegen müssen Teile der Transportsysteme, die *in vivo* auf der basolateralen, Blut zugewandten Seite, etabliert sind, auf die apikale Seite ausweichen (Butor und Davoust, 1992; Fuller und Simons, 1986; Simons und Fuller, 1985; Balcarova-Ständer et al., 1984). Grundsätzlich gilt die MDCK II-Zelllinie jedoch als unproblematisch in der Kultivierung, außerdem werden auf planaren Substraten für die Kultur keine adhäsionsvermittelnden Proteine benötigt. Die einfache Übertragung des Kultursystems auf nanoporöse Substrate des Typs 1 war in dieser Arbeit allerdings nicht möglich. Eine zu planaren Substraten analoge Adhäsion konnte trotz erhöhter Aussaatdichte nicht festgestellt werden, die Zellschichten verbleiben auf einem subkonfluenten Kulturstand. Da die Silizium bzw. Siliziumdioxidoberfläche nicht grundsätzlich als proliferationshemmend oder cytotoxisch angesehen wird (s.o.), nimmt offensichtlich die Topographie Einfluss auf die Adhäsion bzw. die Zellproliferation.

Inwieweit eine definierte Porenstruktur im Mikrometermaßstab das Zellwachstum beeinflusst ist in der Literatur nur für Einzelbeispiele beschrieben. So beschreiben *Richter et al.* (1996), dass einzelne murine Fibroblasten (NIH 3T3 und L929) Poren in porösen Silizium-Substraten mit einer Kantenlänge von bis zu 10  $\mu\text{m}$  überbrücken. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit verwendeten Silizium-Substraten werden in den beschriebenen Untersuchungen allerdings Substrate verwendet, die sich durch einen wesentlich höheren Steganteil, also eine größere planare Adhäsionsfläche, auszeichnen. Der Porengröße von 10 x 10  $\mu\text{m}$  gegenüber erscheinen die in dieser Arbeit eingesetzten Porendurchmesser relativ klein; geht man allerdings davon aus, dass die Zellen zunächst nur auf den planaren Bereichen adhären, müssen die quadratischen Vorätzbereiche mit einer Kantenlänge von 1.4  $\mu\text{m}$  (Typ 1) bzw. 2.5  $\mu\text{m}$  (Typ 2) überbrückt werden. Darüber hinaus sind die hier untersuchten MDCK II-Zellen nur etwa halb so groß wie die in der Studie von *Richter et al.* eingesetzten Fibroblasten mit einem durchschnittlichen Zellradius von  $(16 \pm 2) \mu\text{m}$  (Reiß, 2004). In einer weiteren Studie wurde untersucht, inwieweit kanalähnliche Strukturen einen richtungsgebenden Einfluss auf das Zell-

wachstum haben. Häufig werden für diese Untersuchungen ebenfalls Fibroblasten eingesetzt. *Walboomers et al.* (1998) konnten zum Beispiel zeigen, dass 1 - 2  $\mu\text{m}$  breite Kanäle die Ausrichtung von RDF-Zellen (*rat dermal fibroblasts*) auf dem Substrat entlang der Kanäle beeinflussen. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, berichten *Curtis* und *Wilkinson* (2001) davon, dass die Adhäsion von Epithelzellen auf nanostrukturierten Siliziumoberflächen verändert ist. Allerdings machen die Autoren ausschließlich Angaben zu den Furchen (50 nm), nicht aber zu der Dichte und damit der verbleibenden planaren Adhäsionsfläche. Ein Einfluss der Topographie auf das Wachstumsverhalten scheint also durchaus auch auf den hier verwendeten Silizium-Substraten denkbar.

Durch die Beschichtung der Typ 1-Substrate mit Rattenschwanzkollagen bzw. Fibronectin konnte die Adhäsion der MDCK II-Zellen so weit unterstützt werden, dass konfluente Zellschichten erhalten wurden. Da auf allen Substraten die Aussaat in serumhaltigem Medium erfolgte, ist von weiterer Proteinadsorption auszugehen. Die Fibronectinbeschichtung ist also quasi additiv. *Schoenenberger et al.* (1994) beschreiben, dass MDCK II-Zellen in der Lage sind, auf Fibronectin-beschichteten Substraten zu adhären (Aussaat in serumfreiem Medium). Das Adhäsionsverhalten ist zwar schlechter als zum Beispiel auf Lamin-beschichteten Substraten, zeigt aber, dass MDCK II-Zellen Integrine besitzen, die mit den spezifischen Bindungssequenzen von Fibronectin interagieren können. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wirkt sich eine Kombination aus Beschichtung und serumhaltigem Kulturmedium auf nanoporösen Typ 1-Substraten adhäsionsfördernd aus. Die Expression der für diese Art von barrierebildenden Zellen typischen Differenzierungsmarker ZO-1, Occludin,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowie des Aktin-Cytoskeletts wies keine Unterschiede zu Zellen auf planarem Substrat auf. Für Substrate des Typs 2 wurde bei gleicher Aussaatdichte keine Beschichtung mit adhäsionsvermittelnden Proteinen benötigt, es wurden konfluente Zelllayer mit charakteristischer Struktur des Aktin-Cytoskeletts erhalten.

Neben den Differenzierungsmarkern wurden die Zellradien bestimmt. *Petronis et al.* (2003) beschreiben für Fibroblasten auf strukturierten Siliziumoberflächen einen Zusammenhang zwischen der zur Verfügung stehenden planaren Adhäsionsfläche und der Zelldichte. Bei gleicher Aussaatdichte wurde auf Substraten mit geringem Steganteil (planarer Wachstumsfläche) eine niedrigere Anzahl adhärerter Zellen bestimmt. In dieser Arbeit wurde für Zellen, die auf einem planaren Substrat kultiviert wurden, ein mittlerer Zellradius von  $(7.9 \pm 0.3) \mu\text{m}$  bestimmt. Dieser Wert zeigt eine gute Übereinstimmung zu dem von *Reiß* (2004) ( $(8.6 \pm 0.2) \mu\text{m}$  ( $n = 50$ )) und *Cerrejido* (1983) ( $7 \mu\text{m}$ ) ermittelten Werten. Verglichen mit Zellen auf planaren Substraten, betragen die Zellradien auf Substraten des Typs 1  $(7.6 \pm 0.3) \mu\text{m}$ , die Zelldichten sind entsprechend ähnlich. Dagegen werden signifikant höhere Zellradien für Zellen auf Typ 2-Substraten ( $(10.5 \pm 0.2) \mu\text{m}$ ) bestimmt. Obwohl für diese Substrate der Anteil der planaren Wachstumsfläche nur auf 65 % gegenüber einer planaren

Vergleichsfläche sinkt, während für Typ 1-Substrate nur 13 % errechnet wurden, wird der Effekt auf die Zellgröße ausschließlich in diesem Fall hervorgerufen. Eine generelle Tendenz zu niedrigeren Zelldichten auf nanoporös-strukturierten Oberflächen wird für Zellen auf Substraten des Typs 1 allerdings möglicherweise durch die Fibronectin-Beschichtung überschrieben. Indiz für diesen Zusammenhang ist, dass für Zellen auf Typ 2-Substraten durch eine Fibronectinbeschichtung der mittlere Zellradius auf  $(9.3 \pm 0.1) \mu\text{m}$  sinkt (Ergebnisse nicht gezeigt;  $n = 131$ ,  $\pm$  SDM). Da eine ähnliche Studie auf Typ 1-Substraten nicht möglich war, konnten weitere Untersuchungen zu diesem Phänomen innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Im Zusammenhang mit der chemischen Modifizierung von strukturierten Oberflächen konnten *Britland et al.* (1996) für BHK-Zellen zeigen, dass es möglich ist, den Effekt der Topographie auf das Zellwachstum durch chemische Modifikationen (Variation der Hydrophilie) der Oberfläche zu unterdrücken.

#### **4.4.2.2 Immuncytochemische Untersuchungen zum Differenzierungszustand der Primärkultur des porcinen *Plexus chorioideus* Epithels**

Die Epithelzellen des *Plexus chorioideus* bilden zusammen mit den Endothelzellen in den Kapillargefäßen des Hirnes die beiden anatomischen Schranken, die die Aufrechterhaltung der Homöostase im Zentralnervensystem gewährleisten. Neben der Produktion und Reinigung des Liquors gewährleistet das *Plexus*-Epithel den spezifischen Transport von verschiedenen essentiellen Substanzen. Aufgrund der hohen physiologischen Relevanz und der spezifischen Barriere bzw. der Transportaktivität sind die Zellen des *Plexus chorioideus* für den Einsatz auf den nanoporösen Substraten im Hinblick auf eine spätere Anwendung in lateral aufgelösten Transportstudien ein anspruchsvolles Testsystem. Eine Besonderheit des *Plexus chorioideus* ist, dass sich an eine Proliferationsphase nach der Isolierung der Zellen aus dem Frischgewebe eine Differenzierungsphase anschließt. Diese führt allerdings nur dann zu einem vollständig ausdifferenzierten Epithel, wenn die Zellen auf einem permeablen Substrat kultiviert werden und dem Medium das Serum entzogen wird. Grundsätzlich wurden alle Kulturschritte analog zu dem von *Haselbach et al.* (2001) vorgestellten Protokoll durchgeführt und es wurden konfluente Zellschichten auf nanoporösen Typ 1-Substraten erhalten. Die Immuncytochemischen Vergleichsstudien zeigten aber wesentliche Unterschiede des Differenzierungszustandes im Vergleich zu Zellen, die auf Filtermembranen kultiviert wurden. Für die Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde nicht die von *Angelow* (2004) beschriebene charakteristische Lokalisation und eindeutige Polarisierung zur apikalen Membran gefunden. Ein Nachweis von Microvilli durch die Anfärbung des Actin-Cytoskeletts gelang nur sporadisch, wobei diese nach *Hakvoort* (1998) für ein ausdifferenziertes *Plexus* Epithel charakteristisch sind. Der Differenzierungszustand der Zellen ähnelt in der Ausprägung des Cytoskeletts und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase den Vergleichsproben auf planaren Substraten. Da die Kulturbedingun-

gen analog zu denen auf permeablen Filtermembranen durchgeführt wurden, wird davon ausgegangen, dass das Substrat Einfluss auf das Zellverhalten nimmt. Obwohl die Topographie und die Porenstruktur ein „Quasi-Zweitkompartiment“ unterhalb der Zellen aufbauen, ist die Differenzierung des *Plexus chorioideus* nicht vollständig. Ausgehend von den permeablen Filtermembranen ergeben sich zwei grundlegende Unterschiede für das poröse Silizium. Das etablierte System (*Transwell*-Filtermembranen) zeichnet sich durch kleinere zylindrische Poren von 400 nm aus. Aus der Porenanzahl ( $1 \times 10^8$  Poren/cm<sup>2</sup>) resultiert gegenüber einem rein planaren Substrat eine planare Adhäsionsfläche von 87 %. Außerdem werden durch den konfluenten Zellrasen zwei reale Kompartimente mit einem großen Flüssigkeitsvolumen voneinander abgetrennt. Die hier verwendeten nanoporösen Substrate besitzen dagegen wesentlich größere Poren (900 nm), und abzüglich Poren und der Vorätzstrukturen resultiert eine planare Wachstumsfläche von nur 13 %. Trotzdem führen diese Voraussetzungen nicht dazu, dass die Adhäsion und Proliferation verhindert wird. Daher ist es wahrscheinlich, dass das durch die Porenstruktur aufgebaute basolaterale Kompartiment nicht ausreichend die Voraussetzungen zur Differenzierung erfüllen kann. Aus dem basolateralen Kompartiment wird im ausdifferenzierten Zustand der Zellen auf Filtermembranen Flüssigkeit osmotisch ins apikale Kompartiment gepumpt. Möglicherweise ist dafür das Porenvolumen nicht ausreichend. Während im Fall der Filtersubstrate etwa 1.25 ml Flüssigkeit pro Quadratzentimeter Wachstumsfläche im basolateralen Kompartiment zur Verfügung stehen, beträgt das Volumen innerhalb der Poren bei gleicher Fläche nur etwa  $0.3 \mu\text{l}^4$ . Zwar wurde zur Berechnung dieses Volumens ausschließlich der zylindrische Poreninnenraum sowie der Bereich der Vorätzstrukturen berücksichtigt und nicht der Spalt zwischen Zellen und Substrat, nichts desto trotz verbleibt eine erhebliche Differenz zum Filtersubstrat. Darüber hinaus deckt der konfluente Zelllayer die Poren ab, so dass vermutlich kein freier Austausch zwischen der Flüssigkeit in den Poren und oberhalb der Zellen stattfinden kann. Inwieweit tatsächlich das verringerte Volumen die Differenzierung einschränkt oder aber ein mangelnder Austausch des Porenhaltes dafür verantwortlich ist, kann abschließend nicht geklärt werden.

Aufgrund dieser Untersuchungen ist ein weiterer Einsatz von *Plexus chorioideus* auf porösen Silizium-Substraten des Typs 1 nicht sinnvoll. Für Substrate des Typs 2 beträgt der Anteil der planaren Adhäsionsfläche 65 % im Vergleich zu einer planaren Adhäsionsfläche. Das Porenvolumen wird zu  $0.15 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  errechnet und ist damit nur halb so groß wie für die Substrate des Typs 1. Weitere Untersuchungen auf Substraten des Typs 2 wurden nicht durchgeführt.

---

<sup>4</sup> Für das Volumen innerhalb der Pore ( $V_{\text{Pore}}$ ) wurde eine zylindrische Pore ( $V_{\text{Zyl}}$ ) mit einem Durchmesser von 900 nm und einer Tiefe von 10  $\mu\text{m}$  angenommen. Außerdem wurde der Bereich der Vorätzstruktur durch einen Pyramidenstumpf ( $V_{\text{Pyr}}$ ) (Grundfläche:  $1.96 \mu\text{m}^2$  Deckfläche:  $0.81 \mu\text{m}^2$ , Höhe 0.37  $\mu\text{m}$ ) berücksichtigt;  $V_{\text{Pore}} = V_{\text{Zyl}} + V_{\text{Pyr}}$ .

#### 4.4.2.3 Impedanzspektroskopische Untersuchungen von MDCK II-Zellen auf porösen Elektroden

Die Bestimmung der passiven, elektrischen Eigenschaften einer Zellschicht und die Analyse der Impedanzspektren nach dem ECIS-Modell (Giaever und Keese, 1993) ermöglicht Rückschlüsse auf die Morphologie adhärenter Zellen. Neben den Barriereigenschaften können durch die Auswertung der Spektren nach der Methode von *Wegener et al.* (2000) auch der Adhäsionskontakt sowie die Zellschichtkapazität quantitativ charakterisiert werden. Für Zellen auf unterschiedlichen Oberflächen sollen dadurch objektive Vergleichsparameter erhalten werden. Für nanoporöse Elektroden basierend auf Silizium-Substraten, wurde diese Methode allerdings bisher noch nicht genutzt.

Die Charakterisierung der auf die Substrate aufgebrachten Goldelektroden im zellfreien Zustand stellt die Grundlage für eine weitere Verwendung des Messsystems in Verbindung mit Zellen dar. Für die Anwendung des ECIS-Modells ist es essentiell, dass ein frequenzabhängiges Impedanzverhalten erhalten wird, das mit empirischen Impedanzelementen beschreibbar ist. Für reine Metallfilmelektroden auf planarem Substrat in Kontakt zu Kulturmedium reduziert sich das Ersatzschaltbild zunächst auf einen Widerstand ( $R_{bulk}$ ), der durch den Elektrolytwiderstand und die Größe der Elektrode bestimmt wird und auf das Konstante Phasenelement (CPE), das die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt beschreibt. Das entsprechende Impedanzspektrum ist bei doppellogarithmischer Auftragung bei hohen Frequenzen (für die hier betrachtete Elektrodengröße  $f > 10^3$  Hz) durch  $R_{bulk}$  bestimmt (frequenzunabhängig). Die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt vereint entsprechend dem heterogenen mikroskopischen Aufbau der Grenzfläche sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften. Daraus resultiert ein linearer Anstieg des Spektrums bei abnehmender Frequenz. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch für poröse Goldelektroden basierend auf Substraten des Typs 1 und 2 die für planare Elektroden beschriebene frequenzabhängige Impedanzentwicklung gilt. Das Impedanzverhalten ähnelt dem, welches *Wegener* (1998) für planare Goldelektroden beschreibt, die für Messungen im ECIS-Modus genutzt wurden. Auch *Drexler und Steinem* (2003) stellen für poröse Goldelektroden mit einem Porendurchmesser von etwa 50 nm ein ähnliches Impedanzverhalten vor. Daher wird davon ausgegangen, dass die Elektroden analog zu planaren Elektroden verwendet und zur Untersuchung adhärenter Zellschichten genutzt werden können.

### **Oberflächenspezifische Unterschiede der elektrischen Eigenschaften von planaren und porösen Elektroden**

Der Vergleich der Impedanzspektren von Elektroden gleicher geometrischer Größe auf planarer bzw. poröser Oberfläche zeigt für nanoporöse Elektroden (Typ 1) eine Verschiebung des Spektrums zu niedrigeren Frequenzen. Dies ist aufgrund der grundsätzlich gleichen Messanordnung von Metallschicht, Elektrolyt und Gegenelektrode auf eine Flächenvergrößerung der metallischen Kondensatorfläche bei gleichem geometrischen Umfang der Elektrode zurückzuführen. Diese Verlagerung ist von besonderem Interesse, da daraus für die impedanzspektroskopische Charakterisierung von Zellschichten eine Sensitivitätserhöhung resultieren kann. Der Beitrag, der durch die Zellen im Impedanzspektrum geleistet wird, ist spezifisch und für eine Zellart charakteristisch (eine Reaktion der Zellen auf unterschiedliche Oberflächen wird hier zunächst bewusst für die messmethodische Betrachtung ausgeschlossen). Durch eine Verlagerung des Bereiches, der die Eigenschaften der Arbeitselektrode (CPE) widerspiegelt, zu niedrigeren Frequenzen, verbleibt ein breiteres Frequenzfenster, das durch den Impedanzbeitrag der Zellen dominiert werden kann. Dieser Effekt könnte für Zellen, die durch sehr niedrige Beiträge zur Gesamtimpedanz auf planaren Goldelektroden gekennzeichnet sind, genutzt werden.

Der Hintergrund dieser elektrodenspezifischen Veränderungen gegenüber einer planaren Elektrode wurde genauer untersucht: Bei ansonsten gleichen experimentellen Bedingungen verhält sich die Kapazität proportional zur Elektrodenfläche. Allerdings kann die Grenzfläche nicht ausschließlich durch eine Kapazität beschrieben werden, weil auch ohmsche Eigenschaften zu berücksichtigen sind. Daher wird das empirische Impedanzelement CPE verwendet (Näheres weiter unten). Wie für das Impedanzspektrum erläutert, dominiert die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt das Impedanzverhalten bei  $f < 10^2$  Hz. Entsprechend gilt dies für die Gesamtkapazität des Systems. Daher ist durch die Bestimmung der Gesamtkapazität des Systems bei 10 Hz eine relative Einordnung der Elektrodeneigenschaften zueinander möglich. Der Vergleich der flächennormierten<sup>5</sup> Gesamtkapazitäten zeigt eine Zunahme um den Faktor 3.3 für poröse Elektroden (Typ 1) gegenüber einer planaren Vergleichsfläche. Diese Zunahme ist allerdings nicht ausschließlich über den beschriebenen Flächenzuwachs durch die Vorätzbereiche zu erklären (Zunahme um 4 % gegenüber einer planaren Vergleichsfläche, Kapitel 4.4.1). Dieses auf der Struktur der Substrate basierende Merkmal wird im Folgenden als Mikro-Topographie bezeichnet. Der Wert der Gesamtkapazität für Elektroden basierend auf Substraten des Typs 2 lässt vermuten, dass weitere Effekte zu berücksichtigen sind: Obwohl hier ein höherer Flächenzuwachs errechnet wurde (37 %), wird kein eindeutig erhöhter Wert für die Gesamtkapazität ermittelt. Möglicher Weise ist also nicht al-

---

<sup>5</sup> Normiert wurde auf die geometrische Größe, die sich aus der Begrenzung der Elektrodenfläche ergibt. Die Angabe berücksichtigt daher keine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche.

lein die Struktur der Silizium- bzw. Siliziumdioxidoberfläche entscheidend, sondern zusätzlich die Nano-Topographie<sup>6</sup> der Körnung der aufgetragenen Goldschicht.

Der Prozess zur Deposition einer 100 nm dicken Goldauflage durch einen *Sputter*-Prozess ist mehrschrittig und soll hier nur in den Grundzügen wiedergegeben werden: Der Probenraum der Anlage wird zunächst evakuiert und im Anschluss mit Argon gefüllt (Arbeitsdruck: 0.05 - 0.1 mbar). Um den Prozess zu starten, wird eine hohe Spannung zwischen dem *Goldtarget* (Kathode) und dem Probenteller (Anode) erzeugt. Nach Feldionisation der Argonatome werden die Argon-Ionen in Richtung des *targets* beschleunigt. Durch den Aufschlag der Ionen werden Goldatome herausgelöst, die sich daraufhin in der Gasphase des Probenraumes befinden. Goldatome, die die Oberfläche des Substrates erreichen, kondensieren dort und führen eine Art Zufallsbewegung (*random walk*) durch (Faupel, 2005). Durch zufällige Begegnung mit weiteren Goldpartikeln entstehen Goldinseln. Erst nach Erreichen einer Schichtdicke von mindestens 10 nm kann von einer durchgehend leitenden Goldschicht ausgegangen werden. Aus dem Prozess resultiert eine feine Körnung auf der Oberfläche, die in Abhängigkeit von *target*-Material, dem Arbeitsabstand zum *target*, dem Gasdruck, dem *Sputter*-Strom sowie der Dauer variiert (Bal-Tec GmbH, 1999). Darüber hinaus kann ein Einfluss des Substratmaterials auf die resultierende Goldoberfläche nicht ausgeschlossen werden, wie *Zaporojtchenko et al.* (2000) anhand von polymeren Verbindungen zeigen konnten. Somit sind unterschiedliche Strukturierungen unter Umständen auch auf einen Einfluss der unterschiedlichen Oberflächen (Si bzw. SiO<sub>2</sub>) zurückzuführen. Über die Dimension der daraus jeweils resultierenden topographischen Unterschiede können keine konkreten Angaben gemacht werden. Lediglich, dass die „Inselbildung“ zu einer Strukturierung im Submikrometerbereich führt, konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden. Darüber hinaus könnte möglicherweise der ausschließlich für Substrate des Typs 2 durchgeführte photolithographische Prozess zur Formung der kreisförmigen Elektrode zu einer Veränderung der Goldoberfläche geführt haben. Ebenso können Verunreinigungen auf der Goldschicht (wie Rückstände des verwendeten Photopolymers) zu einer Veränderung der Kapazität führen. So beschreibt *Ulrich* (1995) für Goldelektroden Kapazitätsunterschiede von mehr als 80  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . In Abhängigkeit von der Behandlung der Elektrodenfläche schwanken die Kapazitätswerte<sup>7</sup> zwischen  $(11.4 \pm 0.3) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $(95.5 \pm 1.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

---

<sup>6</sup> Die Nomenklatur wurde lediglich eingeführt, um zwischen Oberflächenphänomenen unterscheiden zu können, die auf der Struktur der Silizium-Substrate basieren (Mikro-Topographie) und solchen, die aus Inhomogenitäten der Goldoberfläche resultieren (Nano-Topographie). Es handelt sich nicht um eine Einteilung aufgrund bestimmter Höhendifferenzen.

<sup>7</sup> Für diese Untersuchungen wurde die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt durch einen Kondensator modelliert und nicht durch ein CPE, so dass ein direkter Vergleich mit den Werten dieser Arbeit nicht möglich ist.

Zur Charakterisierung des Impedanzbeitrages der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt in dieser Arbeit wird im Ersatzschaltbild des ECIS-Modells ein Konstantes Phasenelement (CPE) verwendet, das sich anhand der Parameter  $A$  und  $n$  beschreiben lässt. Der Parameter  $n$  gibt einen Anhaltspunkt dafür, inwieweit die Eigenschaften der Grenzfläche vom idealen Verhalten eines Kondensators ( $n = 1$ ) abweichen. Daher gilt ein Zusammenhang von  $n$  zur Oberflächentopographie als wahrscheinlich (McAdams, 1995, Kurtyrka und de Levie, 1992). Ulrich (1995) bestimmt, dass die Kapazität unterschiedlich behandelte und damit topographisch verschiedener Goldelektroden mit  $n$  korreliert ist, kann aber keinen eindeutigen Zusammenhang zur Rauigkeit der Oberfläche nachweisen. Als Beispiel für die untersuchten Oberflächen gibt der Autor die Dimensionen einer ungetemperten Goldfläche mit einer mittleren Ausdehnung der Erhebungen von 100 nm bei einer mittleren Höhe von 10 nm an. Demnach handelt es sich nach der Nomenklatur der vorliegende Arbeit um eine Nano-Strukturierung. Bates und Chu (1988) schlagen durch ihre Untersuchungen vor, dass  $n$  maßgeblich von der Form der lokalen Erhebungen auf der Oberfläche abhängt. Danach führen scharfe Spitzen zu kleineren und gerundete Formen zu größeren Werten für  $n$ . Aufgrund der wenigen Angaben kann über die Strukturierung der Oberfläche nur die vage Angabe über Einkerbungen im Bereich von 80 – 240 nm gemacht werden. Leider machen die Autoren an dieser Stelle außerdem keinerlei Angaben zur Kapazität der Oberflächen. In der vorliegenden Arbeit werden für den Parameter  $n$  für alle Elektroden sehr ähnliche Werte bestimmt. Dies lässt auf eine sehr ähnliche Nano-Topographie der Oberflächen schließen. Die ähnlichen Werte für  $n$  erlauben gleichzeitig den Vergleich für den Parameter  $A$ . Das CPE vereint kapazitive und ohmsche Eigenschaften, wodurch eine einfache physikalische Interpretation nicht möglich ist. Auf nanoporösen Elektroden basierend auf Typ 1-Substraten wird ein deutlich erhöhter Wert bestimmt als auf planaren Elektroden. Für Elektroden basierend auf Typ 2-Substraten wird kein signifikanter Unterschied gegenüber planaren Elektroden ermittelt. Sehr ähnliche Verhältnisse wurden bereits für die Entwicklung der Gesamtkapazitäten des Systems bei 10 Hz festgestellt. Fasst man die beiden Indizien zu der These zusammen, dass die Kapazität der Goldelektrode basierend auf Typ 1-Substraten größer ist, als die der planaren und porösen Typ 2-Elektrode, so kann keine Korrelation zwischen der Kapazität und  $n$  für unterschiedliche Elektroden bestätigt werden. Allerdings ist an dieser Stelle wahrscheinlich die Differenzierung zwischen dem Einfluss der Mikro- und der Nano-Topographie nötig. Ein möglicher Erklärungsansatz besagt, dass der Parameter  $n$  ausschließlich von der Nano-Topographie bestimmt wird und darüber hinaus flächenunabhängig ist. Dagegen unterliegen der Parameter  $A$  und die Kapazität bei 10 Hz zusätzlich dem Einfluss der Mikro-Topographie. Aus der Mikrostrukturierung entsteht ein zusätzlicher Flächengewinn, der zur Analyse der Daten nicht berücksichtigt werden kann. Das heißt aus der Diskrepanz zwischen elektrisch wirksamer Fläche und geometrischer Fläche resultiert eine Überbestimmung der Kapazität.

Ulrich (1995) verwendet dagegen Substrate, die ausschließlich nanostrukturiert sind. Aufgrund des zusätzlichen Beitrages durch die Mikro-Topographie ist eine Aussage zum Bezug zwischen  $n$  und der Kapazität der nanoporösen Elektroden nicht sinnvoll.

### Charakterisierung der MDCK II-Zellschichten auf planaren und porösen Elektroden

Der spezifische Widerstand ( $R_b$ ) hängt im Fall barrierebildender Zellen im Wesentlichen von den Zell-Zell-Kontakten und speziell den *tight junctions* ab. Unter der Annahme, dass der Kontakt zwischen zwei Zellen zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten führt, ist die Anzahl der *tight junctions* und damit schließlich der Wert für den spezifischen Widerstand ( $R_b$ ) abhängig von der Summe der Kontaktbereiche. In einem konfluenten Grenzflächengewebe steht jede Zelle in Höhe der *Zonula occludens* mit den umgebenden Zellen in Kontakt, so dass die Summe der Zellumfänge in dieser Ebene pro Flächeneinheit als Maß für den Einfluss auf  $R_b$  gelten kann. Geht man von einem spezifischen, parazellulären Widerstand pro Mikrometer Zellumfang aus, so resultiert aus einer hohen Summe der Zellumfänge eine hohe Anzahl an parallel geschalteten Einzelwiderständen. Die Addition von parallel geschalteten Einzelwiderständen im Wechselstromkreis sieht nach den Kirchhoffschen Regeln eine Addition der reziproken Einzelwiderstände vor (Gl. 4.1), so dass aus einer hohen Anzahl von gleich großen Einzelwiderständen ein kleinerer Gesamtwiderstand resultiert als bei einer niedrigen Anzahl.

$$\frac{1}{R_{ges}} = \sum_i \frac{1}{R_i} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Ein direkter Vergleich des spezifischen parazellulären Widerstandes ist daher nur dann sinnvoll, wenn von einer ähnlichen Summe der Zellumfänge ausgegangen werden kann. Der Zellumfang der Einzelzelle ( $U_{EZ}$ ) kann aus dem mittleren Zellradius ( $r$ ) berechnet werden, der anhand fluoreszenzmikroskopischer Bilder bestimmt wurde. Vereinfachend wird für die Zellen eine zylindrische Form angenommen. Für die Angabe der Summe der Zellumfänge (SZU) ist die Anzahl der Zellen pro Fläche zu berücksichtigen. Darüber hinaus muss dieser Wert durch zwei dividiert werden, da der Kontakt zwar jeweils zwischen zwei Zellen stattfindet, daraus aber nur ein Kontaktbereich mit Zell-Zell-Kontakten resultiert. Die Anzahl der Zellen pro Fläche wird durch die Division der betrachteten Fläche ( $A$ , hier  $1 \text{ cm}^2$ ) durch die mittlere Zellfläche ( $A_{EZ} = \pi r^2$ ) erhalten. Daraus folgt:

$$SZU = \frac{A}{A_{EZ}} \cdot \frac{U_{EZ}}{2} = \frac{1}{\pi r^2} \left[ \frac{\text{cm}^2}{\text{cm}^2} \right] \cdot \frac{2\pi r}{2} [\text{cm}] = \frac{1}{r} [\text{cm}^2] \quad \text{Gl. 4.2}$$

Gleichung 4.2 verdeutlicht, dass die Summe der Zellumfänge pro Fläche ausschließlich vom mittleren Zellradius der Zellen abhängt. Aufgrund des reziproken Verhältnisses resultiert aus großen Zellradien eine niedrigere Summe an Zellumfängen als aus kleineren Zellradien. Aufgrund des oben formulierten Zusammenhanges zwischen der Anzahl der Einzelwiderstände

pro Kontaktfläche zwischen zwei Zellen und dem Gesamtwiderstand ergibt sich daher, dass für große Zellradien ein höherer Gesamtwiderstand zu erwarten ist als für kleine.

In dieser Arbeit wurde für MDCK II-Zellen auf einer planaren Elektrode ein durchschnittlicher Zellradius von  $(7.9 \pm 0.3) \mu\text{m}$  bestimmt. Für Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf Typ 1-Substraten, wurden im Vergleich dazu keine signifikant unterschiedlichen Zellradien gemessen. Für MDCK II-Zellen auf Elektroden, basierend auf Typ 2-Substraten, konnte dagegen eine Erhöhung der mittleren Radien auf  $(10.5 \pm 0.2) \mu\text{m}$  also etwa um den Faktor 1.3 ermittelt werden.

Auf planarem Substrat wurde  $R_b$  zu  $(48 \pm 7) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt, dies steht in guter Übereinstimmung zu dem von *Lo et al.* (1999) ermittelten Wert auf planarer Goldelektrode von etwa  $60 \Omega\text{cm}^2$ . Auf Typ 1-Elektroden kann kein signifikanter Einfluss auf  $R_b$  gezeigt werden, tendenziell wurden leicht höhere Werte ermittelt ( $(63 \pm 8) \Omega\text{cm}^2$ ), wobei nach wie vor eine gute Übereinstimmung zu den Literaturdaten besteht. Wird der Einfluss unterschiedlicher Zellradien berücksichtigt, so sollte für MDCK II-Zellen auf porösen Elektroden (Typ 2) ein 1.3-fach erhöhter Wert von  $R_b = 70 - 80 \Omega\text{cm}^2$  bestimmt werden. Tatsächlich wird aber eine Erhöhung um etwa das dreifache auf  $(148 \pm 14) \Omega\text{cm}^2$  ermittelt. Die erhöhten Werte für  $R_b$  können also nicht ausschließlich über die vergrößerten Zellradien erklärt werden, sondern spiegeln signifikante Auswirkungen des porösen Substrates auf die Barrierenfunktion wider.

Der Adhäsionsbereich zwischen Zellen und Substrat wird durch den Parameter  $\alpha$  elektrisch charakterisiert. *Lo et al.* (1999) bestimmen für MDCK II-Zellen auf planaren Goldelektroden  $\alpha$  zu  $18 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (1999), *Reiß* (2004) gibt einen mittleren Wert von  $(16.0 \pm 0.6) \Omega^{0.5}\text{cm}$  an. Im Vergleich dazu erscheinen die in dieser Arbeit bestimmten Werte von  $(11.6 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$  auf planaren Elektroden etwas niedrig (Kapitel 4.1.3). Auf porösen Elektroden (Typ 1) nehmen die Werte für  $\alpha$  zu  $(16.6 \pm 1.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$ , der höchste Wert wird für Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf Substraten des Typs 2,  $(26.2 \pm 1.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$  erhalten. Für  $\alpha$  gilt:

$$\alpha = \sqrt{\frac{\rho_{sub}}{d}} \cdot r_c \quad \text{Gl. 4.3}$$

Wie Gleichung 4.3 verdeutlicht, ist  $\alpha$  von verschiedenen Variablen abhängig, woraus sich unterschiedliche Interpretationsansätze ableiten lassen. Während durch die Wurzel aus dem spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt ( $\rho_{sub}$ ) und durch den Zellradius ( $r_c$ ) ein proportionaler Einfluss auf  $\alpha$  besteht, geht der Zellsubstratabstand ( $d$ ) als Kehrwert unter der Wurzel ein. Daraus folgt, dass für größere Abstände  $d$  ein kleinerer Wert für  $\alpha$  erwartet werden kann. Auf Basis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Kapitel 4.1) kann nicht entschieden werden, inwieweit in den Poren eine leitende Goldschicht vorhanden ist. Gleichzeitig kann nicht abschließend geklärt werden, ob und wie stark die Zellen mit ihrer basolateralen Membran der Oberfläche der Elektroden folgen (dieser Gesichtspunkt wird im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Zellschichtkapazität (s.u.) genauer diskutiert). Es wird

aber davon ausgegangen, dass nicht die gesamte elektrisch zugängliche Oberfläche der nanoporösen Elektroden durch die Zellen belegt ist, bzw. dass kein gleichmäßiger Zell-Substrat-Abstand eingehalten werden kann. Insbesondere in den unteren Vorätz- bzw. Porenstrukturen könnte ein größerer Abstand zwischen Elektrodenoberfläche und Membran eingehalten werden als auf den Stegen. Aus dieser „Mischkalkulation“ würde ein größerer Wert für den mittleren Zellsubstratabstand resultieren, und dies hätte kleinere Werte für  $\alpha$  zur Folge. Diese Tendenz kann allerdings durch eine gleichzeitige Änderung der spezifischen Leitfähigkeit im Spalt überlagert werden. Vermutlich wird die Leitfähigkeit dort durch den Elektrolyten der *bulk*-Phase, der Spaltgeometrie sowie durch die Komponenten der Extrazellulären Matrix beeinflusst. Einzig der Einfluss größerer Zellen wirkt sich direkt erhöhend auf  $\alpha$  aus. Aus der Steigerung der Zellradien würde so für Zellen auf porösen Elektroden des Typs 1 eine 1.3-fache Erhöhung gegenüber planaren Substraten ( $(11.6 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$ ) erklärbar. Die tatsächlich bestimmte Zunahme auf  $(26.2 \pm 1.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$  liegt allerdings deutlich höher (Faktor 2.2).

Die flächennormierte Kapazität der Zellschicht  $C_{Cl}$  charakterisiert die Zellmembran, indem Rückschlüsse auf die Oberflächentopographie gezogen werden können. Im Gegensatz zu den Parametern  $R_b$  und  $\alpha$  ist der Parameter  $C_{Cl}$  unabhängig von den Zellradien. Ausgehend von der Kapazität einer reinen Lipiddoppelschicht wird die Kapazität durch die Zusammensetzung und die Topographie der Membran beeinflusst. Für eine ideal glatte Lipiddoppelschicht ( $\epsilon_r \approx 2$ ;  $d \approx 4 \text{ nm}$ ) geben *Adam et al.* (2003) ein Wert von etwa  $0.44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  an. Für die spezifische Membrankapazität einer ideal flachen Zellmembran ist unabhängig vom Zelltyp ein Wert von etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt worden. Für die Interpretation der Werte, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, ist es in diesem Zusammenhang entscheidend, dass in dieser Arbeit nicht die Kapazität für eine einzelne Membran angegeben wird, sondern die Zellschichtkapazität, resultierend aus den Einzelkapazitäten der basalen und apikalen Membran. Da sich in Serie geschaltete Kapazitäten durch Addition der reziproken Werte zu einer reziproken Gesamtkapazität verrechnen lassen, verringern sich die Werte für zwei Zellmembranen. Der impedanzspektroskopische Messaufbau lässt außerdem keine Differenzierung zwischen dem Beitrag der apikalen und basolateralen Membran zu. Alle folgenden Angaben dieser Arbeit beziehen sich also auf die Gesamtmembran, auch die zur Interpretation herangezogenen Daten wurden dahingehend umgerechnet. Folglich beträgt die Kapazität für Zellen mit ideal glatten Membranen  $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (*Adam et al.*, 2003).

Der in dieser Arbeit bestimmte Wert ( $(1.73 \pm 0.06) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) für die spezifische Zellschichtkapazität auf planaren Substraten zeigt eine epitheltypisch vergrößerte Membranoberfläche gegenüber einer ideal glatten Membran an, und steht in guter Übereinstimmung mit dem durch *Reiß* (2004) angegebenen Wert von  $1.52 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Die Erhöhung im Vergleich zu einer ideal glatten Zellmembran wird durch die Ausbildung eines Mikrovillisaumes an der apikalen

Membran erklärt. Häufig wird eine Erhöhung der Zellschichtkapazität ausschließlich auf Flächenvergrößerungen durch Membranaufwerfungen der apikalen Membran zurückgeführt. In diesem Zusammenhang wurde die Korrelation zwischen morphologischen Veränderungen der apikalen Membran und erhöhten Zellschichtkapazitäten für Zellen des porcinen *Plexus Chorioideus* gezeigt (Wegener et al., 2004). Grundsätzlich erfährt dieser Ansatz für Untersuchungen auf planaren Substraten dadurch weitere Berechtigung, dass für konfluente Zellrasen auf planaren Elektroden die Möglichkeit zu Flächenveränderungen der basolateralen Membran limitiert ist. Diese Vereinfachung ist auf strukturierte Elektroden allerdings nicht direkt übertragbar. Für MDCK II-Zellen auf nanoporösen Elektroden, basierend auf Substraten des Typs 1, wurde  $C_{Cl}$  zu  $(2.15 \pm 0.10) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt, auf Substraten des Typs 2 zu  $(2.69 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Denkbar wäre, dass die basolaterale Membran zumindest in Teilen der Oberflächentopographie folgt, und auf diese Weise eine Oberflächenvergrößerung resultiert. *Petronis et al.* (2003) konnte zeigen, dass Fibroblasten in der Lage sind, Kanäle von  $1.8 \mu\text{m}$  Breite zu überbrücken, dabei aber mit ihrer Membran bis zu einer Tiefe von  $3 \mu\text{m}$  in sie eindringen. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit verwendeten Substraten fallen in diesem Beispiel die Kanäle sogar senkrecht zur planaren Oberfläche ab. *Butor und Davoust* (1992) wiesen anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen nach, dass MDCK II-Zellen die Poren einer Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von  $3 \mu\text{m}$  in erheblichem Maß penetrieren. In den daraus entstandenen Membranausstülpungen wurden Zellorganellen wie Mitochondrien nachgewiesen. Überträgt man dieses Ergebnis auf das in dieser Arbeit verwendete System, so ist ein teilweises Eindringen der MDCK II-Zellen in die Poren bzw. die Vorätzstrukturen durchaus vorstellbar, wenn nicht wahrscheinlich. Gleichzeitig ist es jedoch ebenfalls möglich, dass die Zellen auf die Topographie des Substrates reagieren, indem verstärkt Mikrovilli ausgebildet werden. Damit würde durch die nanoporösen Oberflächentopographie ein ähnlicher Effekt zur verstärkten Polarisierung der Membran erzielt, wie er für permeable Substrate beschrieben wird (*Butor und Davoust*, 1992). Genauerem Aufschluss darüber könnten elektronenmikroskopische Bilder erbringen.

#### 4.4.3 Lateral aufgelöste Permeationsstudien

Die Untersuchungen zur Zelldifferenzierung von Grenzflächengeweben auf den nanoporösen Silizium-Substraten dienten als Grundlage für die Entwicklung eines orts aufgelösten Permeationsassays. Das Konzept sieht vor, dass die Poren als Nanobehälter dienen, die den Permeationsweg von Sondenmolekülen durch Ansammlung in den entsprechenden Poren konservieren. Auf diese Weise sollten bei transzellulärem Transport eine gleichmäßige, bei parazellulärem Transport eine Füllung der Poren unterhalb der Interzellularspalte detektiert werden. Diese Differenzierung zwischen unterschiedlichen Transportwegen ist im Rahmen üblicher Permeationsassays nicht möglich. Fast alle genutzten Methoden beruhen auf der

integralen Bestimmung der Durchtrittsraten. Für diese Untersuchungen werden hochpermeable Filtermembranen als Kultursubstrate verwendet, wobei die konfluenten epithelialen oder endothelialen Zellschichten als permeations-limitierende Barriere zwei Kompartimente ober- und unterhalb der Zellschicht abtrennen. Der zu untersuchende Wirkstoff wird auf der einen Seite des Epithels angeboten, und im jeweils anderen Kompartiment kann die Konzentration des Stoffes als Funktion der Zeit detektiert werden. Dadurch wird die flächenabhängige Transferrate eines Stoffes über die Zellschicht bestimmt (Pitt et al., 1987; Lohmann et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für einen solchen integralen Ansatz ist die Bestimmung der parazellulären Barriereigenschaften durch Messung der transepithelialen bzw. transendothelialen Widerstände. Über den spezifischen Widerstand der Zellschichten wird auf die parazelluläre Permeationrate geschlossen, da die gemessenen Widerstände mit der Barriereeigenschaft für größere Moleküle korrelieren. Sowohl bei der Anwendung der ECIS-Methode (Giaever und Keese, 1991) als auch bei der Messung im TER-Modus (Schneeberger und Lynch, 1992) werden die Eigenschaften der Einzelzellen über die Elektrodenfläche bzw. Filterfläche gemittelt, und Defekte im Zelllayer werden nicht als solche erkannt. Eine aufwendige Methode, die eine orts aufgelöste Untersuchung der Ionenpermeabilität einer Zellschicht erlaubt, ist die SICM-Methode (*Scanning Ion-Conductance Microscopy*), bei der durch orts aufgelöste Leitfähigkeitsmessungen eine Unterscheidung von trans- und parazellulärem Stromfluss möglich ist. Auf diese Weise können einzelne apoptotische Zellen erkannt werden (Bojarski et al., 2001). Allerdings kann durch keine der drei letztgenannten Methoden eine Angabe zur Permeabilität eines Zelllayers für eine konkrete Testsubstanz gemacht werden. Grundlegende Bedingung für die Differenzierbarkeit zwischen parazellulärem und transzellulärem Transport eines auf porösem Silizium basierenden Assays ist ein adäquates „Auflösungsvermögen“, das heißt eine ausreichende Porendichte der Substrate. Für das Beispiel der MDCK II-Zellen befinden sich im Fall von Typ 1-Substraten durchschnittlich 81 Poren unterhalb einer Zelle, für Substrate des Typs 2 sind es lediglich 20. Grundlage für diese Angaben sind die in Kapitel 4.4.2.1 diskutierten Zellradien auf den entsprechenden Substraten. Durch eine regelmäßige Anordnung der Poren ist für beide Substrattypen gewährleistet, dass sich Poren sowohl unterhalb der Zellmitte als auch an der Peripherie und unterhalb der Interzellularspalte befinden. Daher sollte eine Unterscheidung zwischen parazellulärem und transzellulärem Permeationsweg grundsätzlich möglich sein.

Die grundlegenden Untersuchungen wurden an MDCK II-Zellen durchgeführt, im Anschluss daran wurden diese um weitere Zelllinien sowie primär kultivierte Zellen der porcinen Blut-Hirn-Schranke erweitert. Die Detektion der Permeationssonde erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie. Für die Übertragbarkeit des Konzepts auf unmarkierte Sondenmoleküle wurden die Einsatzmöglichkeiten der orts aufgelösten Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie untersucht.

#### 4.4.3.1 Der optische Nachweis mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie am Beispiel der Epithelzelllinie MDCK II

Durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde kann der Permeationsweg des Moleküls über eine Zellschicht mit Hilfe mikroskopischer Methoden verfolgt werden. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften von FITC-Dextran ist der parazelluläre Permeationsweg bevorzugt, was sich in Form netzartiger Strukturen der farbstoffgefüllten Interzellularspalte widerspiegelt. Auf Höhe der Substratoberfläche wird im Fall beider Substrate häufig eine selektive Befüllung der Poren detektiert, Poren unterhalb der Interzellularspalte zeigen intensivere Fluoreszenzintensität, was auf eine Akkumulation der Sonde rückschließen lässt. Da für das verwendete Sondenmolekül ein parazellulärer Transportweg angenommen wird, ist der Assay funktionell. Der Auslesevorgang mit entsprechendem Ergebnis konnte bereits nach etwa einer Stunde gestartet, und die Stabilität des Signals in den Poren für beide Substrat-Typen bis zu einem Zeitraum von 7.5 h (Typ 1) bzw. 5.25 h (Typ 2) bestätigt werden. Damit steht ein sehr breites zeitliches Fenster zum Auslesen zur Verfügung. Dieses Ergebnis wurde allerdings nicht unter jeder einzelnen Zelle so bestätigt. Am Beispiel von Zellen auf Typ 2-Substraten wurde vorgestellt, dass lokale Defektstellen, das heißt einzelne geschädigte Zellen innerhalb eines konfluenten Zelllayers, als solche durch eine homogene Befüllung der Poren unterhalb dieser Zelle identifiziert werden können. Im Gegensatz zu den vorgestellten Permeationsassays führt dies allerdings nur zu einer lokalen Veränderung der Porenfüllung, ohne das Ergebnis für die umliegenden Zellen zu verändern. Im Fall eines herkömmlichen Permeationsexperimentes auf permeablen Filtermembranen würde solch ein „hotspot“ der Permeation das Gesamtergebnis signifikant verändern.

#### Laterale Diffusion im Adhäsionskontakt und Transcytose im Permeationsassay

Neben der Detektion von eindeutig defekten Zellen durch homogene Porenbefüllung werden allerdings auf beiden Substrattypen auch Bereiche detektiert, in denen trotz intakter Membranintegrität die Poren unterhalb der Zellen mit der Fluoreszenzsonde gefüllt sind. Dieses Phänomen wurde eher unterhalb von kleinen Zellen gefunden, und tritt verstärkt auf Substraten des Typs 2 auf. Prinzipiell sind mindestens zwei Erklärungsansätze möglich: Zusätzlich zur parazellulären Permeation könnte eine vesikelvermittelte Transcytose stattfinden. Damit würde das Ergebnis des Assays die tatsächlichen physiologischen Transportwege korrekt abbilden. Daneben ist aber auch die Verteilung der Sonde durch laterale Diffusion der Moleküle unterhalb der Zellen von der Peripherie zur Zellmitte hin denkbar. Grundsätzlich wird das hier verwendete Makromolekül FITC-Dextran häufig als Sonde in der extrazellulären Phase eingesetzt, um Transcytoseraten und -wege zu untersuchen. So nutzen *Shurety et al.* (1998) ein 10 kDa großes FITC-Dextran-Molekül, um den Einfluss des Aktin-Cytoskeletts auf die Endocytose bei MDCK-Zellen zu zeigen. Um eine unspezifische Pinocytose bzw. Trans-

cytose in dieser Arbeit verifizieren zu können, wurde das Vorhandensein von Trancytosevesikeln im Cytosol genauer untersucht. *De Figueiredo* und *Soares* (2000) beschreiben für die unspezifische Pinocytoserate bei Protozoen eine Erniedrigung bei sinkender Temperatur. Daher wurden die Untersuchungen parallel bei 37 °C und bei erniedrigter Temperatur durchgeführt. Die Untersuchungen konnten allerdings weder bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C eindeutige Anzeichen für sondengefüllte Vesikel zeigen, noch hat eine Erniedrigung der Temperatur auf 20 °C eine Verbesserung der selektiven Porenbefüllung unterhalb der Interzellularspalte ergeben. Das legt bereits nahe, dass die Sondenmoleküle nach der Passage durch den Interzellularspalt durch laterale Diffusion in die Poren, die ventral unter dem Zellkörper liegen, gelangen. Die relative Fluoreszenzintensität entlang einer Linie in der optischen Ebene der Poren zeigt dazu zunächst einen oszillierenden Verlauf. Die Maxima, die mit der Position der Poren korrelieren und die die Porenbefüllung repräsentieren, nehmen von der Zellperipherie zur Zellmitte hin ab. Dies ist ein entscheidendes Indiz dafür, dass die laterale Diffusion im Adhäsionskontakt hauptsächlich für die Porenbefüllung unterhalb der Zellen verantwortlich ist. Aufgrund des parazellulären Permeationsweges liegt unterhalb der Interzellularspalten eine hohe Konzentration für die Sonde FITC-Dextran vor, unterhalb der Zellkörper eine niedrige. Der aus dem Gefälle resultierende Stofftransfer ( $J$ ) ist abhängig von der Konzentrationsdifferenz ( $\Delta c_v$ ) für das betrachtete Molekül, der Wegstrecke (radial unterhalb der Zellen, entspricht daher dem Radius,  $\Delta x_r = r_c$ ), dem Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) und der Austauschfläche ( $A$ ). Das 1. Ficksche Gesetz beschreibt diesen Zusammenhang:

$$J \left[ \frac{\text{mol}}{\text{s}} \right] = -D \left[ \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right] \frac{\Delta c_v}{\Delta x_r} \left[ \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \cdot \text{m}} \right] \cdot A \left[ \text{m}^2 \right] \quad \text{Gl. 4.4}$$

Der Diffusionskoeffizient ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Diffusion und hängt von der Größe der diffundierenden Moleküle und der Viskosität des Mediums ab.  $D$  liegt für biologisch wichtige Moleküle im Bereich von  $10^{-11}$  -  $10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s (Gonsior, 1994). Die Austauschfläche  $A$  hängt von der Spalthöhe ( $d$ ) sowie vom Umfang der Zellen ab. Berücksichtigt man dies für Gleichung 4.4, ergibt sich (die Einheiten wurden der erleichterten Übersicht wegen nicht angegeben):

$$J = -D \frac{\Delta c_v}{r_c} \cdot 2\pi r_c \cdot d. \quad \text{Gl. 4.5}$$

Daraus folgt:

$$J \propto d. \quad \text{Gl. 4.6}$$

Der Stofftransfer  $J$  für ein Molekül ist, wie Gleichung 4.5 bzw. 4.6 zeigt, unabhängig vom Zellradius bzw. der Zellgröße, aber proportional zur Spaltbreite  $d$  unterhalb der Zellen. Unter der Annahme von ansonsten konstanten Bedingungen verursacht ein breiter Spalt einen hohen Transfer, ein schmaler Spalt behindert den Austausch im Vergleich dazu. Da die Zellradien nicht zu berücksichtigen sind, ist die Beobachtung, dass unter kleineren Zellen ver-

mehrt eine homogene Porenbefüllung gefunden wird, also eher auf einen lokal weiteren Zell-Substrat-Abstand zurückzuführen. Auch die Beobachtungen, dass die homogene Porenbefüllung verstärkt auf Substraten des Typs 2 auftritt und eine höhere Intensitätsdifferenz zwischen Poren unterhalb des Zellzentrums und der Interzellularspalte auf Typ 1-Substraten gefunden wird, lassen sich vor diesem Hintergrund als Diffusions-Phänomene deuten. Aus einem breiteren Zell-Substrat-Abstand der MDCK II-Zellen auf Typ 2-Substraten resultiert demnach ein höherer Stofftransfer von der Zellperipherie zum Zellzentrum als auf Substraten des ersten Typs. Leider lassen diesbezüglich die ECIS-Untersuchungen dieser Arbeit keine eindeutige Interpretation zu (Kapitel 4.4.2.3). Auch die von Reiß (2004) durchgeführten FLIC-Untersuchungen können nicht herangezogen werden, da der Zell-Substrat-Abstand methodenbedingt auf einem nicht-porösen Substrat bestimmt werden musste. Wie bereits erwähnt, wird als Grund für die Porenbefüllung unterhalb einzelner Zellkörper eine erleichterte Diffusion aufgrund eines breiteren Zell-Substrat-Abstandes angenommen. Obwohl nicht angestrebt, ermöglicht der Permeationsassay somit möglicherweise Aussagen über lokal unterschiedliche Zell-Substrat-Abstände. Im Hinblick auf die Entwicklung eines ortsaufgelösten Permeationsassays wäre dagegen eine gleichmäßige und eingeschränkte Diffusion durch einen engen Zell-Substrat-Kontakt bzw. eine hohe Viskosität im Spalt wünschenswert, um ein möglichst eindeutiges Ergebnis für die Porenbefüllung zu erhalten. Dennoch ist es aber auch über die gezeigten Intensitätsprofile möglich, den parazellulären Permeationsweg eines Moleküls trotz lateraler Diffusion nachzuvollziehen und als solchen zu bestimmen.

### **Simulation von Defektstellen im Zelllayer**

Schwachpunkt der integralen Ansätze zur Permeabilitätsbestimmung ist, dass lokale Defektstellen im Zelllayer nicht als solche erkannt werden können, und dass Ergebnisse einer Studie auf diese Weise leicht verfälscht werden. Im Fall von ortsaufgelösten Studien wie der SICM-Technik (s.o.) ist dagegen die Erkennung einzelner apoptotischer Zellen möglich (Bjarski et al., 2001). Durch eine Kombination dieser Technik mit konventionellen Permeationsstudien auf permeablen Filtermembranen wäre also die Identifikation einer Defektstelle möglich. Nichts desto trotz müsste daraufhin das gesamte Substrat verworfen werden, da die Defektstelle quasi als Leck wirken und die Permeationsrate verfälschen würde.

Durch Verwendung einer niedrig konzentrierten Triton X-100-Lösung, in der die kritische Mizellarkonzentration nur schwach überschritten wurde, konnten Einzelzelldefekte in einem konfluenten Zelllayer auf nanoporösen Substraten simuliert werden. Die Experimente zeigen, dass durch den ortsaufgelösten Permeationsassay die Dokumentation einer lokalen Defektstelle im Zelllayer möglich ist, ohne die Aussagekraft des Assays in direkter Umgebung dazu zu behindern. Die Intensitätsdifferenzen, die zwischen Poren unterhalb unterschiedlicher permeabilisierter Zellen durch die Intensitätsprofile gezeigt werden konnten, resultieren of-

fensichtlich aus einem unterschiedlichen Grad der Schädigung der Membranintegrität. Aus dem statistischen Auftreffen der Triton-Micellen resultiert demnach der unterschiedliche Grad der Schädigung, und die Membranreste wirken entsprechend nach wie vor als Diffusionsbarriere für die Sondenmoleküle. Da die Triton-Micellen zunächst ausschließlich auf die apikale Membran treffen können, und die *tight junctions* innerhalb der Membran als Diffusionsgrenze für Membranbestandteile zwischen dem apikalen und basolateralen Membrankompartiment wirken (*fence*-Funktion, Wegener, 2001), hält die basolaterale Membran einzelner Zellen vermutlich länger der vollständigen Zerstörung stand. Durch Kontakt zu weiteren Detergenz-Micellen wird im weiteren Verlauf des Experimentes für alle Poren eine gleichmäßig hohe Fluoreszenzintensität detektiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die in einer zweiten experimentellen Anordnung erzeugte großflächige Verwundung des konfluenten Zelllayers bedient sich einer Methode, bei der die durch *Knight et al.* (2003) beschriebene Phototoxizität von internalisiertem Calcein genutzt wird. Inwieweit der erzielte Effekt auf einen nekrotischen oder apoptotischen Mechanismus zurückzuführen ist, ist noch nicht abschließend geklärt (Wiemann, 2004). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder dieser Arbeit zeigen, dass die Zellen zwar irreparabel geschädigt werden, aber auf dem Substrat verbleiben. Die homogene Porenbefüllung mit FITC-Dextran unterhalb dieser Zellen demonstriert die Permeabilisierung der Zellmembranen. In unmittelbarer Nähe zum Wundrand kann jedoch unterhalb des intakten Teils der Zellschicht das erwartete Bild der parazellulär permeierenden Sonde detektiert werden.

Die ortsaufgelösten Permeationsstudien auf nanoporösen Silizium-Substraten ermöglichen daher sowohl die Detektion von einzelnen als auch flächigen Defektstellen im Zelllayer, ohne die Aussagekraft für vitale Zellbereiche zum physiologischen Permeationsweg einer Sonde zu verlieren.

#### **4.4.3.2 Untersuchungen zum ortsaufgelösten Permeationsassay an anderen Grenzflächengeweben**

Die Übertragung des Permeationsassays auf weitere Zellsysteme ist von Interesse, um eine breite Anwendbarkeit des Konzepts zu untersuchen. Darüber hinaus konnten durch den Einsatz von Zelllinien mit charakteristischen morphologischen Merkmalen bestimmte Aspekte verstärkt untersucht werden, die am Beispiel der MDCK II-Zelllinie weniger deutlich hervorgetreten sind. In Bezug auf das Konzept und insbesondere auf die optische Auswertung werden auf diese Weise zum Beispiel Limitierungen hinsichtlich der optischen Auflösung in der z-Richtung aufgezeigt.

**Die epithel-ähnliche Zelllinie NRK (Klon 52E)**

Die NRK-Zellen konnten auf Substraten mit einem Porendurchmesser von 900 nm (Typ 1) ohne adhäsionsvermittelnde Beschichtung kultiviert werden. Dadurch stand ein Modell zur Verfügung, dass eine deutlich schwächere parazelluläre Barriere als MDCK II-Zellen ausgebildet. Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen wurde eine wesentlich kürzere Inkubationszeit gewählt. Die Untersuchungen zeigen, dass NRK-Zellen einen konfluenten Monolayer ausbilden und die extrazelluläre Sonde FITC-Dextran in den Interzellularspalten der Zellen detektiert werden kann. Dieser parazelluläre Diffusionsweg wird durch ein intensiveres Fluoreszenzsignal in den Poren unterhalb der Zell-Zell-Kontakte dokumentiert. Allerdings ist das Kontrastverhältnis zwischen der Porenbefüllung unterhalb der Zellkörper und unterhalb der Interzellularspalten deutlich schwächer, als es für MDCK II-Zellen gezeigt werden konnte. *Reiß* (2004) beschreibt für NRK-Zellen einen fast dreifach breiteren Zell-Substrat-Abstand ( $(73 \pm 3)$  nm) als für MDCK II-Zellen ( $(26.8 \pm 1.4)$  nm). In Kapitel 4.4.3.1 wurde die Abhängigkeit des Stofftransfers von der Austauschfläche, die zum Konzentrationsausgleich zur Verfügung steht, bereits ausführlich beschrieben. Unter der Annahme, dass sich die Dimension des auf nicht-porösen Substraten festgestellten Zell-Substrat-Abstandes auch auf porösen Substraten wiederfindet, ist ein großer diffusiver Stofftransport unterhalb der NRK-Zellen zu vermuten. In Höhe der Zellkörper sind darüber hinaus keine Anzeichen für sondengefüllte Transcytosevesikel erkennbar. Indem die Fluoreszenzintensität innerhalb der Poren unter einer Zelle bestimmt wird, wird deutlich, dass die relativen Intensitätsmaxima, die die Porenbefüllung repräsentieren deutlich vom Bereich unterhalb der Zellperipherie zum Zellzentrum hin abnimmt. Der visuelle Eindruck der parazellulär diffundierenden Sonde wird objektiv unterstützt. Aufgrund der geringen Intensitätsdifferenzen wird davon ausgegangen, dass die zeitliche Stabilität wie sie für MDCK II-Zellen im Permeationsassay mit dem gleichen Sondenmolekül gezeigt werden konnte, nicht erwartet werden kann. Dazu wurden jedoch keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt.

Das Phänomen von unterhalb der Zellen auftretenden Poren, die keinerlei Fluoreszenzintensität zeigten, wurde ausschließlich für NRK-Zellen beobachtet. Es wurde vermutet, dass die basolaterale Membran zu einem Verschluss der Poren führt, indem sie der Topographie der Oberfläche folgt. Um dies zweifelsfrei festzustellen wären elektronenmikroskopische Aufnahmen unter Umständen sinnvoll. Allerdings wäre dazu eine Aufnahme der lateralen Ansicht nötig, die eine Zerstörung der Substrate zur Folge hätte. Möglicherweise wurde das Phänomen der Porenverschlüsse durch die Osmolarität der FITC-Dextran-Lösung unterstützt. Da der Versuchsaufbau zur Mikroskopie offen stehen muss, wäre eine Osmolaritätserhöhung wegen der Verdunstung von Wasser denkbar. Allerdings konnte durch den gezielten Einsatz von hyperosmolaren Medien kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Einfluss unterschiedlicher Osmolaritäten auf die Zellform und die

Mikromechanik wurde detailliert in einer separaten Studie untersucht (Kapitel 7). Aufgrund der Ergebnisse wird nicht ausgeschlossen, dass sich hyperosmolare Bedingungen unterstützend darauf auswirken, dass die basolaterale Membran der Oberfläche der Substrate folgt (Näheres siehe dort). Abschließend geklärt werden konnte das Phänomen jedoch nicht.

### **Die Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3**

Die Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 bildet im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zelltypen keine *tight junctions* aus. Der Zell-Substrat-Abstand wurde durch Reiß (2004) zu  $(87 \pm 5)$  nm bestimmt. Es wurden also, ähnlich wie im Fall der NRK-Zellen, Zellen mit der Eigenschaftskombination niedriger parazellulärer Barriere und weitem Adhäsionsbereich eingesetzt. Im Fall der murinen Fibroblasten wurde die Interpretation der optischen Auswertung durch die für diesen Zelltyp typische Ausbildung von Multilayern erschwert. Die Zellen zeigen zudem häufig einzelne schmale Zellausläufer. Diese sind zum Teil als dunkle Bereiche vor fluoreszierendem Hintergrund zu erkennen, die Multilayerstruktur erschwert aber eine eindeutige Zuordnung zu einzelnen Zellen. Einfacher sind dagegen die Zellkerne zu identifizieren. Durch die Zellen, die direkt auf dem Substrat aufsitzen, wird eine selektive Porenbefüllung erzeugt. Allerdings gilt dies nur für den Bereich unterhalb der Zellkerne, dort sinkt die Fluoreszenzintensität in den Poren auf ein Minimum. Für die schmalen Zellausläufer kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Auflösungsvermögen der Substrate (das heißt die Porendichte) nicht ausreichend ist. Die Untersuchungen konnten allerdings keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Ergebnissen auf Substraten des Typ 1 (höhere Porendichte, nicht gezeigt) und des Typs 2 feststellen. Vermutlich findet außerdem der bereits für die NRK- und MDCK II-Zellen festgestellte diffusive Stofftransport unterhalb und zwischen den Zellausläufern statt. Der Einsatz von NIH 3T3-Fibroblasten im Permeationsassay wird daher als nicht sinnvoll angesehen.

### **Primärkultivierte porcine Endothelzellen (PBCEC)**

Diese Endothelzellen kleiden *in vivo* die Kapillaren des Schweinehirnes aus, und etablieren so eine wirksame und physiologisch sehr bedeutsame Barriere zwischen dem Blut und dem Hirngewebe. Die Morphologie der Zellen ist spindelförmig, ausgehend vom Bereich des Zellkerns flachen die Zellen sehr stark ab. Grundsätzlich konnte auf nanoporösen Substraten (Typ 1) ein konfluenter Zelllayer kultiviert werden. Als limitierend für den Einsatz im Permeationsassay mit optischem Auslesevorgang wirkt sich jedoch die geringe Zellhöhe im Bereich der Zellperipherie bzw. im gesamten Bereich der Zellen mit Ausnahme der Kernregion aus. Aufgrund der physikalischen Grenze der Auflösung, resultierend aus der numerischen Apertur des Objektivs (0.90) und der Wellenlänge des Anregungslichtes (488 nm), kann hier nicht eindeutig unterschieden werden, ob das Fluoreszenzsignal tatsächlich oder nur schein-

bar aus der optischen Ebene der Substratoberfläche stammt. Aufgrund der geringen Zellhöhe fehlt außerdem die abschirmende Wirkung der Zellen, die eine Reflexion des Fluorophors der *bulk*-Phase an der Substratoberfläche wirksam unterdrücken könnte (Kapitel 4.4.1). Die Tatsache, dass auch 3  $\mu\text{m}$  unterhalb der Zellen nach 4 h die Lage der Zellkerne anhand weniger starker Fluoreszenzintensität abgebildet werden kann, ist ein Indiz dafür, dass die Sondenmoleküle die zelluläre Barriere überwinden konnten und sich in den Poren unterhalb der Zellen angesammelt haben. Eine Reflexion der *bulk*-Phasenfluorophore an der Substratoberfläche und Detektin des Lichtes in dieser Ebene wird als unwahrscheinlich angesehen. Dass die Poren im Bereich unterhalb der Zellkerne ungefüllt verbleiben, könnte auf lokal eingeschränkte laterale Diffusion hindeuten. *Reiß* bestimmt den Zell-Substrat-Abstand der Endothelzellen auf nicht-porösen Substraten zu  $(94 \pm 3) \text{ nm}$  (2004). Für NRK-Zellen wurde aufgrund eines ähnlich großen Abstandes davon ausgegangen, dass laterale Diffusion stattfindet. Obwohl es grundsätzlich möglich wäre, dass im Fall der Endothelzellen eine erhöhte Viskosität unterhalb der Zellen die Diffusion erschwert (etwa durch eine dichtere extrazelluläre Matrix), so erklärt dies nicht, weshalb dies vorzugsweise unterhalb der Kerne auftritt. Möglicherweise ist allerdings eine engere Zell-Substrat-Interaktion unterhalb der Zellkerne als unterhalb der Zellperipherie dafür verantwortlich. Es ist nicht auszuschließen, dass der Zell-Substrat-Abstand für die peripheren Bereiche von dem oben genannten Wert abweicht. Für die zur Bestimmung verwendete Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie werden terrassierte Strukturierungen benötigt, die komplett von einer Zelle bedeckt sein müssen. Die Strukturierung besteht aus 4 Bereichen, wodurch eine Gesamtfläche von etwa  $10 \times 10 \mu\text{m}$  entsteht (Braun und Fromherz, 1997). Aufgrund der spindelförmigen Zellmorphologie und einer maximalen Breite, die im Bereich der Zellkerne erreicht wird, war es daher nur im Bereich des Zellkerns möglich, den Abstand der Membran zur Oberfläche zu bestimmen (Reiß, persönliche Mitteilung). Die Untersuchungen der Endothelzellen zeigen daher eine grundsätzliche Limitierung des optischen *readouts* bei sehr flachen Zellen. Die Anwendung ist nur eingeschränkt möglich.

#### **4.4.3.3 Massenspektrometrische Analyse der Porenfüllung im Permeationsassay am Beispiel der Epithelzelllinie MDCK II**

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie ermöglicht sowohl die massenspektrometrische Identifizierung als auch die orts aufgelöste Abbildung chemischer Spezies auf einer Oberfläche. Die Sensitivität der ToF-SIMS ist auf die oberste chemische Monolage begrenzt und wird unter Bedingungen durchgeführt, die nicht ohne weiteres mit biologischen Proben vereinbar sind. Speziell das Hochvakuum ( $4 \cdot 10^{-7}$  bis  $1 \cdot 10^{-8}$  mbar Restdruck) kann die Zellproben artifiziell verändern. Darüber hinaus sind die meisten intrazellulären Bestandteile für die ToF-SIMS „unsichtbar“, weil sie durch die Membran verdeckt werden. Nichts desto trotz

eröffnet die orts aufgelöste Massenspektrometrie viele interessante Anwendungsmöglichkeiten für biologische Proben, da diese Technik nicht auf eine spezifische Markierung ausgewählter Zellstrukturen (zum Beispiel durch Antikörper) angewiesen ist, die ebenfalls artifizielle Veränderungen hervorrufen kann. Ein erfolgreicher Einsatz der massenspektrometrischen Analytik für die Untersuchungen im Permeationsassay muss allerdings mehrere Kriterien erfüllen: Es muss eine ausreichende Lateralauflösung erreicht werden und die Sekundärionenausbeute muss sowohl in den Poren als auch auf den Stegen hinreichend hoch sein. Die tatsächliche Molekülverteilung muss korrekt wiedergegeben werden, wobei dazu der Analyt unter Umständen in den Poren fixiert werden muss, um das Ergebnis des Permeationassays zunächst zu konservieren und um anschließend eine ausreichende Stabilität im Hochvakuum zu gewährleisten. Dabei ist die präparative Herausforderung, dass die Analysefläche gleichzeitig für den Primärionenstrahl sowie die Sekundärionenemission freigelegt wird.

In Abhängigkeit vom Betriebsmodus ist es mit Hilfe der ToF-SIMS-Technik möglich, für organische Moleküle eine laterale Auflösung von 150 - 400 nm zu erreichen (Belu et al., 2003; Hagenhoff, 2000). Die tatsächliche in einem Experiment erreichte Auflösung wird aber entscheidend durch das Ionisierungsverhalten der Probe beeinflusst. Für die in dieser Arbeit eingesetzten nanoporösen Substrate konnte gezeigt werden, dass das Auflösungsvermögen grundsätzlich ausreicht, um sowohl die Substratoberfläche als auch Ionen in den Poren lateral aufgelöst abzubilden. Als problematisch wirken sich allerdings Molekül- bzw. Salzkrusten auf der zu untersuchenden Oberfläche aus, die durch den Trocknungsprozess entstehen. Außerdem muss bei einer strukturierten Oberfläche mit Topographieeffekten gerechnet werden, die aus dem Winkel der auftreffenden Primärionen zur Oberfläche resultieren. So entsteht hinter einem höher gelegenen Substratbereich oder aber auch im Schatten eines Zellkernes für die Primärionen ein „blinder Punkt“ bzw. es resultiert eine lokal geringere Ausbeute an Sekundärionen. Auf nanoporösen Substraten wird eine derartige Verschattung jeweils am linken Rand einer Pore beobachtet, da der Beschuss durch die Primärionenquelle von links oberhalb der Probe in einem  $45^\circ$ -Winkel erfolgte. Im Prinzip ist eine Verschattung auch vor einer topographischen Erhebung zu erwarten, da hier die Sekundärionenfreisetzung behindert sein kann. Die durchgeführten Experimente zeigen diesen Effekt aber weniger deutlich. Aus dem Eintrittswinkel von  $45^\circ$  sowie der Porengeometrie resultiert, dass Sekundärionen nur im begrenzten Maß aus dem Poreninnenraum desorbiert werden können. Rein rechnerisch ist in Poren der Typ 1-Substraten eine Eindringtiefe von etwa  $1.2 \mu\text{m}$  möglich, in Poren der Typ 2-Substrate eine Eindringtiefe von etwa  $2.0 \mu\text{m}$ . Die maximale Eindringtiefe wird dabei jeweils an der der Primärionenquelle gegenüberliegenden Poreninnenwand erreicht. Vorteilhaft für die massenspektrometrische Analyse sollte sich daher entweder eine vollständig und homogen gefüllte Pore erweisen oder aber eine Adsorption des Analyten an der Poreninnenwand. Da im Hinblick auf die Anwendung in lateral aufgelösten Permea-

tionsstudien davon auszugehen ist, dass in wässrigen Lösungen mit geringen Analytkonzentrationen gearbeitet wird, ist die Realisierung einer vollständigen und homogenen Porenfüllung wenig wahrscheinlich. Sollte die Adhäsion der Analytmoleküle an den Porenwänden nicht zu einer ausreichenden Konzentration führen, ist es denkbar, die Fixierung durch gezielte Immobilisierung des Analyten zu unterstützen. Möglich wäre in diesem Zusammenhang die Verwendung von Cyclodextrinderivaten. Diese cyclischen Oligosaccharide bilden im Inneren des Moleküls einen Hohlraum, der zur Aufnahme von kleinen geladenen Gastmolekülen geeignet ist (Henke et al., 1996; Michalke et al., 1999, Janshoff et al., 2000). Die Anbindung an das Substrat könnte nach einer Goldbeschichtung durch Chemisorption realisiert werden. Im Fokus dieser Arbeit stand allerdings die grundlegende Entwicklung des massenspektrometrischen Nachweises. In Bezug auf die laterale Auflösung und die Nachweisbarkeit eines Analyten aus den Poren konnte durch die Detektion der Chloridionen ein ausreichender Nachweis erbracht werden.

Inwieweit Störeffekte wie Matrixeffekte für die Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen zu berücksichtigen sind, ist nicht eindeutig zu sagen. Matrixeffekte bezeichnen Störungen, die aufgrund der molekularen Umgebung von Ionen zu einem unterschiedlichen Ionisierungsverhalten führen. In einem sehr deutlichen Fall kann daraus eine Kontrastumkehr für die detektierten Ionen resultieren (Breitenstein, 2004; Guerquin-Kern et al., 2005). Jones et al. (2006) festigen durch ihre Arbeiten an Hirngewebeschnitten die Vorstellung, dass die Sekundärionenausbeute für eine Substanz davon abhängig ist, ob die Umgebung die Ionisierung eines Moleküls behindert oder unterstützt. Unterstützend wirkt sich zum Beispiel eine protonenreiche, ungeladene Umgebung aus. Speziell in Bezug auf quantitative Aussagen ist die Interpretation der Ergebnisse daher nur eingeschränkt sinnvoll.

### **Untersuchungen zur Stabilität der Proben im Hochvakuum in Abhängigkeit von der Probenpräparation**

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angesprochen, stellt die Probenpräparation eine entscheidende Voraussetzung für den massenspektrometrischen Nachweis von Analyten in den Poren dar. Der Analyt gelangt in die Poren, nachdem die Zellschicht passiert wurde. Insbesondere im Fall einer ungleichmäßigen Verteilung in Folge von parazellulärem Transport muss dieses Ergebnis in den Poren konserviert werden. Die Zellen wirken, wie die zeitabhängigen Untersuchungen für MDCK II-Zellen mit einer FITC-Dextran-Sonde zeigen konnten (Kapitel 4.4.3.1), der gleichmäßigen Verteilung über alle Poren wirksam entgegen. Um die Poren allerdings im Anschluss daran der massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen, müssen die Zellkörper entfernt werden. Zu diesem Zeitpunkt sollte auch die Fixierung des Analyten in den Poren erfolgt sein, da die Zellen als Diffusionsbarriere wegfallen. Es wurden unterschiedliche Fixierungsmethoden dahingehend erprobt, ob sie dazu geeignet

sind, die Oberfläche der Substrate für die ToF-SIMS-Analyse zu öffnen. Ob parallel dazu dadurch eine Fixierung eines Analyten in den Poren möglich ist, stand zunächst nicht im Fokus.

Die zur Stabilisierung der Proben genutzte chemische Fixierung ist eine in der Biologie weit verbreitete Technik. Allen Protokollen gemein ist, dass die Verteilung zellulärer Bestandteile konserviert wird, sofern sie durch das Fixanz gebunden werden können. In Abhängigkeit von den eingesetzten Reagenzien ergeben sich allerdings Unterschiede. *Hoetelmans et al.* (2001) haben die Effekte chemischer Fixanzien elektronenmikroskopisch untersucht und verglichen. Durch die chemische Vernetzung zellulärer Proteine mit Hilfe von Aldehyden bleibt bei weitgehendem Erhalt der Membran die Integrität der Zellstruktur erhalten. Auch Zellorganellen bleiben optisch unversehrt. Durch die Verwendung von Detergenzien wie Triton X-100 können die Membranlipide nachträglich herausgelöst werden. Dagegen wird durch Methanol eine Koagulation zellulärer Proteine bei gleichzeitiger Auflösung der Plasmamembran verursacht (Luttmann, 2006). Zurück bleiben in erster Linie der Zellkern sowie zelluläre Proteine wie etwa das Aktin-Cytoskelett. Inwieweit dabei die Struktur der Proteine verändert wird, wurde bisher nicht untersucht, laut *Luttmann* unterstützt die Methanol/Eisessig-Fixierung zum Teil die spezifische Antikörperbindung für eine immunocytochemische Markierung, was für einen Strukturerhalt spricht.

Die mikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit, die zunächst an Zellen auf planaren Substraten durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass alle verwendeten Fixierungs- bzw. Permeabilisierungsmethoden zu einem Verbleib von zellulärem Material auf der Oberfläche der Substrate führten. Die zellulären Strukturen werden durch das Hochvakuum in Bezug auf die Verteilung von Ethidiumhomodimer nicht sichtbar verändert, wodurch auf hinreichende Stabilität der Proben geschlossen wird. Im Hinblick auf die Fragestellung, ob eine Fixierungsmethode für die massenspektroskopische Analyse im Permeationsassays eingesetzt werden kann, die die Analysefläche, also die Oberfläche des Substrates unter den Zellen für die ToF-SIMS zugänglich macht, war die Möglichkeit zur eindeutigen Identifizierung der Oberfläche wünschenswert. Die Indiumzinnoxid-Oberflächen wurden gewählt, da Indium weder Bestandteil der Zellkulturreagenzien ist, noch in den Zellen vorkommt.

Die ToF-SIMS-Untersuchungen bestätigen durch die detektierten Ionen die beschriebene Wirkung der Fixanzien. Die Glutardialdehyd-Fixierung erhält die Membranen, dementsprechend konnten charakteristische Fragmente der Membran, nicht aber der im Kern lokalisierten Sonde (EthD) detektiert werden. Ein Signal der Nominalmasse  $m/z = 115$  u/e, welches auf Indium hindeuten könnte, wurde durch die Untersuchungen mit hoher Massenauflösung ausschließlich einem unspezifischen Kohlenwasserstofffragment zugeordnet. Die Permeabilisierung von Glutardialdehyd fixierten Zellen führt, wie die mikroskopischen Untersuchungen zeigen konnten, zu einem erhöhten Eintrag der Fluoreszenzsonde in das Zellumen. Dies hat

jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen. Es werden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten wie für Zellen, die ausschließlich fixiert wurden. Es kann weder ein Signal dem Zellkern oder anderen Organellen zugeordnet werden, und es wird kein Signal des Substrates erhalten. Das bedeutet, dass es entweder nicht möglich ist, mit dem Primärionenstrahl in die Zellen einzudringen, um Sekundärionen zu erzeugen, oder aber dass die Sekundärionen den Zellkörper nicht verlassen können. In beiden Fällen wäre die Öffnung der Membran nicht ausreichend. Untersuchungen mit einer erhöhten Triton X-100-Konzentration und deutlicher Verlängerung der Inkubationszeit (Ergebnisse nicht gezeigt) konnten die Ergebnisse der ToF-SIMS-Untersuchungen nicht entscheidend verändern. Unabhängig von einer Permeabilisierung der Membran durch Triton X-100 verbleiben die Zellen bei Fixierung mit Glutardialdehyd auf dem Substrat. Im Hinblick auf die Entwicklung einer Präparationsmethode für den massenspektrometrischen Nachweis im Permeationsassay sind daher beide Fixierungsmethoden nicht geeignet.

Ein anderes Bild wurde für die Untersuchungen der mit Methanol/Eisessig-fixierten Proben erhalten. Es werden keine Membranbestandteile detektiert, wohl aber die Kern-assoziierte Sonde EthD, deren laterale Intensitätsverteilung exakt mit den parallel durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen übereinstimmt. Im Zellkernbereich wird massenspektrometrisch eine erhöhte Proteinkonzentration detektiert. Im Zellkern liegt die DNA eng vergesellschaftet mit Proteinen vor. Insbesondere die Histone bilden mit der DNA über Wechselwirkungen zwischen basischen Aminogruppen und den Phosphatgruppen der DNA während der Interphase eine dichte Packung (Koolmann und Röhm, 1998). Das Ergebnis steht in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen von *Arlinghaus et al.* (2004), die an kryokonserverten Proben stickstoffreiche Bereiche im Zentrum der Zellen detektiert haben. Die ToF-SIMS Untersuchung bei hoher Massenauflösung konnten zeigen, dass das Signal der Nominalmasse  $m/z = 115$  u/e durch das Indiumsignal dominiert wird. Indium ist, wie oben beschrieben, ausschließlich in der Substratoberfläche unterhalb der Zellen vorhanden. Durch diese Fixierungsmethode ist es also möglich, sowohl zelluläre Bestandteile auf der Oberfläche zu detektieren, als auch die Oberfläche selbst zu untersuchen.

Durch die Übertragung dieser Präparationsbedingungen auf nanoporöses Silizium sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Porenfüllung massenspektrometrisch analysiert werden kann, wenn Zellen zuvor die Poren verdeckt haben. Von besonderem Interesse war demnach die Verteilung der spezifischen Sekundärionen der Substratoberfläche. Für die Verteilung der Siliziumionen wurde ein ähnliches Bild erhalten, wie für  $\text{SO}_3^-$ -Ionen auf zellfreien Substraten (s.o.) gezeigt wurde. Die Substratporen sind durch eine deutlich herabgesetzte Signalintensität identifizierbar, das Signal erreicht in diesem Bereich etwa ein Fünftel der maximalen Signalintensität. Es wird daher davon ausgegangen, dass spezifische Ionen in den Poren nachgewiesen werden könnten. Im Gegensatz zu den Untersuchungen auf plana-

rem Substrat werden für charakteristische Membranbestandteile wie Fettsäurereste zum Teil Signale erhalten. Diese stören die Analyse der Substratoberfläche allerdings nicht. Die Zellrückstände können idealerweise die Interpretation der Porenbefüllung durch eine Korrelationsanalyse sogar erleichtern. Indem die Information über die Position des Kerns und der Interzellularspalte erhalten bleibt, könnte dies in weniger eindeutigen Fällen zur Klärung eines trans- oder parazellulären Permeationsweges der Sondenmoleküle eingesetzt werden. Grundsätzlich wäre es für einen ungehinderten fokussierten Einschlag des Primärions und in Folge dessen für die Ausbeute und Detektion der Sekundärionen aber sicherlich sinnvoll, keine Rückstände auf der Substratoberfläche zurückzubehalten. Von größerem Interesse ist allerdings ob es durch die Methanol/Eisessigfixierung gelingen kann, die Substratoberfläche freizulegen und einen Analyten in den Poren zu fixieren. Während durch die Glutardialdehydfixierung eine chemische Bindung zu primären Aminen aufgebaut wird, führt die Methanolfixierung nach *Luttmann (2006)* nicht zu kovalenten Bindungen sondern zur Koagulation der zellulären Proteine. Daher ist das Methanol/Eisessig-Gemisch zur Fixierung eines Analyten möglicherweise weniger geeignet als etwa Glutardialdehyd. Eine Kombination von proteinvernetzender Vorinkubation mit Glutardialdehyd und anschließender Entfernung der Membran durch Methanol/Eisessig wie sie *Hoetelmans et al. (2001)* in anderem Zusammenhang vorschlägt, könnte ein Ansatz sein, beide Ziele miteinander zu verbinden. Innerhalb dieser Arbeit konnte dieser Ansatz allerdings nicht mehr verfolgt werden.

## 5 Impedanzspektroskopische Untersuchungen barrierebildender Zellschichten auf porösen Goldfilm-Elektroden

Die ECIS-Technik ist bisher auf planare, impermeable Elektroden beschränkt, woraus verschiedene Limitierungen resultieren. Die planare, impermeable Elektrode unterhalb der Zellen verhindert die Möglichkeit des basolateralen Zellzugangs und beschränkt die Anwendbarkeit auf Zellsysteme, die auf planaren Substraten kultiviert werden können (Wegener et al., 2000). Gleichzeitig bieten impedanzspektroskopische Untersuchungen von Zellen, die auf Filtermembranen kultiviert werden, keine vergleichbare Möglichkeit zur detaillierten Analyse. Es können keine Informationen zu den Bedingungen im Zell-Substrat-Kontakt ermittelt werden. Vor dem Hintergrund der Entwicklung und Anwendung sensorisch nutzbarer Oberflächen für kultivierte Zellen stellt die Übertragung impedanzspektroskopischer Methoden auf poröse Elektroden daher eine Herausforderung und entscheidende Weiterentwicklung dar. In diesem Teil der Arbeit sollen poröse Filtermembranen als Basis für die Entwicklung poröser (Arbeits-)Elektroden für den Einsatz in impedanzspektroskopischen Messungen adhärenter Zellen untersucht werden. Aus unterschiedlichen Porendurchmessern und -dichten resultieren allerdings unterschiedliche Oberflächenbedingungen gegenüber einer planaren Elektrode, die möglicherweise Einfluss auf die Messung und im Anschluss auf die Analyse der Daten nehmen. Daher ist die impedanzspektroskopische Charakterisierung zellfreier Substrate zunächst genauso von Interesse wie die Untersuchungen zum Impedanzverhalten adhärenter Zellen auf diesen Oberflächen. Im Anschluss an grundlegende Untersuchungen folgt die Erprobung des Messaufbaus in Anwendungsbeispielen zum basolateralen Zellzugang. Die primärkultivierten Zellen des porcinen *Plexus chorioideus* dienen als Modell für Zellsysteme, die zur vollständigen Differenzierung ein permeables Substrat benötigen.

Die verwendeten Filtermembranen sind kommerziell für die Zellkultur erhältlich und werden vielfach in der Zellkultur eingesetzt. Der komplette Filtereinsatz besteht aus einem Kunststoffeinsatz, an dessen Boden eine poröse Membran fixiert ist. Dadurch ist es möglich, sowohl von apikaler als auch von basolateraler Seite aus, die Zellen zu stimulieren. Klassische Anwendung finden die Substrate außerdem in Permeationsexperimenten, bei denen, durch die Zellen getrennt, ein apikales und ein basolaterales Kompartiment genutzt werden kann. Durch Zugabe einer Sonde in das eine Kompartiment kann durch dessen Detektion im anderen auf die jeweilige Permeationsrate über die Zellschicht geschlossen werden. Außerdem werden mit Hilfe dieser Substrate impedanzspektroskopische Messungen durchgeführt, die der Bestimmung des transzellulären Widerstandes sowie der Zellschichtkapazität dienen. Dazu tauchen sowohl in das apikale als auch in das basolaterale Kompartiment Elektroden

ein und die Impedanz der Zellschicht wird als Funktion der Frequenz bestimmt. Der transzelluläre Widerstand ist mit der parazellulären Permeationsrate für Ionen und geladene Moleküle korreliert (Schneeberger und Lynch, 1992 und 2004), weshalb diese Untersuchung häufig zur Bestimmung der transzellulären Barriere genutzt wird. Die Methode erlaubt jedoch keine Charakterisierung des Zell-Substrat-Kontaktes.

## 5.1 Charakterisierung zellfreier poröser Goldelektroden mit durchgehenden Poren

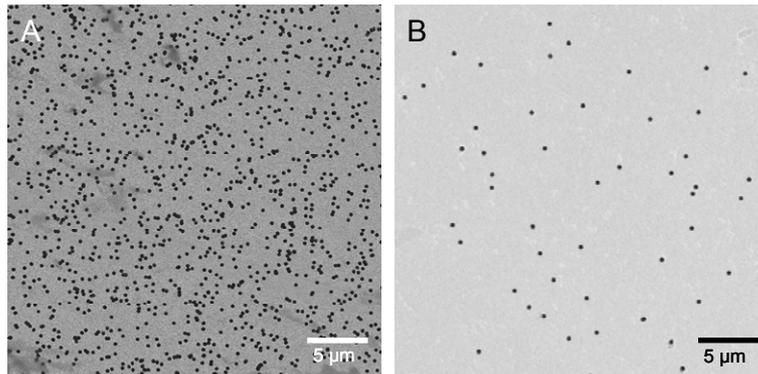
Bei allen in dieser Arbeit als Basis für die Goldfilm-Elektroden verwendeten porösen Oberflächen handelt es sich um Kunststoffmembranen, die sich hinsichtlich der Porendurchmesser und der Porenanzahl unterscheiden und mit einem 100 nm Goldfilm beschichtet werden. Aus den Topographieunterschieden resultieren unter Umständen unterschiedliche Ausgangsbedingungen für die elektrischen Messungen, die zunächst zusammengestellt werden sollen. In Modellrechnungen werden Untersuchungen zum Einfluss der Gegenelektrode auf die Spektren durchgeführt, und im Anschluss die in dieser Arbeit verwendete Platindraht-Gegenelektrode charakterisiert.

### 5.1.1 Eigenschaften der Elektroden auf Basis permeabler Membranen

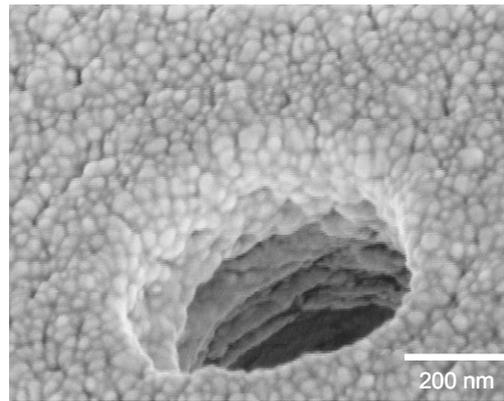
Die als Basismaterial verwendeten Filtermembranen unterscheiden sich sowohl in den Porendurchmessern als auch in der Porendichte. Tabelle 5.1 gibt dazu eine Übersicht. Die Dicke der Membranen wird für alle Varianten mit 10  $\mu\text{m}$  angegeben (Costar GmbH, Greiner Bio-one GmbH), die Poren sind statistisch verteilt. Abbildung 5.1 unterstreicht die daraus resultierenden unterschiedlichen Oberflächen am Beispiel von elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer *Transwell*- (TW, **A**) sowie einer *Transwell Clear*- (TWC, **B**) Membran. Die Poren sind grundsätzlich zylindrisch und vereinzelt, durchlaufen die Membran aber nicht zwingend senkrecht zur Oberfläche. Aus der Kombination der beiden Parameter Porendurchmesser und -dichte ergeben sich unterschiedliche Porositätsgrade. Die Porosität wird definiert als Quotient aus der Porenfläche und der Gesamtfläche. Die Filtermembranen können darüber hinaus in zwei Merkmalsgruppen eingeordnet werden. TW und TWC, unterscheiden sich in ihrer Porenanzahl, nicht jedoch in dem Porendurchmesser. TW1.0 und TWC3.0 besitzen Poren mit stark unterschiedlichen Durchmessern, aber in der gleichen Porendichte.

**Tab. 5.1:** Übersicht über die verwendeten Filtermembranen.

Bezeichnung	Porendurchmesser [µm]	Porendichte (Poren/cm <sup>2</sup> )	Membranmaterial	Porosität [%]
<i>Transwell Clear</i>	0.4	$4 \times 10^6$	Polyester	0.5
<i>Transwell</i>	0.4	$1 \times 10^8$	Polycarbonat	12.6
<i>Transwell 1.0</i>	1.0	$2 \times 10^6$	Polyester	1.6
<i>Transwell Clear 3.0</i>	3.0	$2 \times 10^6$	Polyester	14.1

**Abb. 5.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen (nanoAnalytics GmbH, Münster) einer *Transwell*- (A) und einer *Transwell Clear*- (B) Filtermembran.

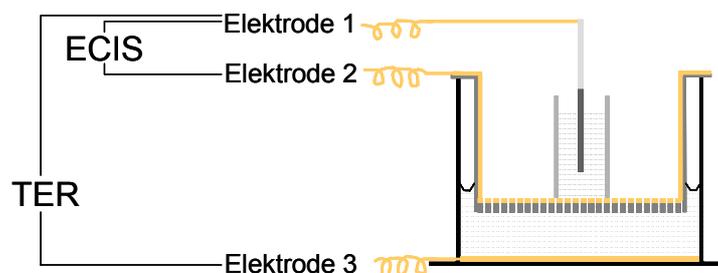
Um die Oberflächen elektrisch zu funktionalisieren, wurde eine 100 nm dicke Schicht Gold in einem Sputterprozess aufgetragen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen legen nahe, dass zumindest im oberen Bereich der Pore auch die Innenwände mit Gold belegt sind. Da die Eindringtiefe der Goldpartikel nicht eindeutig bestimmt werden kann, ist eine Vorhersage über eine Veränderung der elektrisch zugänglichen Fläche nicht möglich. Deutlich wird jedoch, dass davon ausgegangen werden kann, dass poröse Elektrodenoberflächen erzeugt werden können, die der Topographie der Membranoberfläche folgen. Im Gegensatz zu den in Kapitel 4 verwendeten porösen Elektroden auf Silizium-Substraten resultieren aus dem Basismaterial der permeablen Filtermembranen durchgehende Poren und daher poröse, permeable Elektroden. Abbildung 5.2 verdeutlicht außerdem, dass die durch den Sputterprozess erhaltene Goldschicht nicht ideal glatt ist, sondern eine nicht näher untersuchte Rauigkeit aufweist. Inwieweit dies zu einer Flächenvergrößerung führt, ist mit Hilfe elektronen-optischer Aufnahmen ebenfalls nicht zu beantworten.



**Abb. 5.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (nanoAnalytics GmbH, Münster) einer mit 100 nm Gold belegten Filtermembran (TWC). Im Zentrum ist eine 0.4  $\mu\text{m}$  große Pore abgebildet. Auch der obere Bereich des 10  $\mu\text{m}$  tiefen Zylinders ist mit Gold belegt.

### 5.1.2 Vorstellung des kombinierten Messaufbaus für die Impedanzspektroskopie und Charakterisierung der Gegenelektrode

Der hier verwendete Messaufbau (**Abb. 5.3**) ermöglicht sowohl eine ECIS-analoge Kontaktierung der Elektroden (Elektrode 1 gegen Elektrode 2), als auch parallel dazu eine Messanordnung, die der Kontaktierung TER-Modus entspricht (Elektrode 1 gegen Elektrode 3). Bei letzterer verbleibt Elektrode 2 passiv zwischen den Messelektroden. Es werden die gleichen Bezeichnungen für die Auswertungsparameter genutzt, die für die Messung von Zellschichten auf nanoporösem Silizium etabliert wurden, um in der vorliegenden Arbeit eine stringente Benennung zu erzielen. Obwohl selten im Fokus einer Untersuchung, muss zunächst geklärt werden, ob die Eigenschaften der Gegenelektrode (Elektrode 1) eine Anwendung des ECIS-Modells für die mit diesem experimentellen Aufbau erzielten Daten erlauben. Voraussetzung dafür ist, dass die Impedanz der Gegenelektrode vernachlässigbar gering ist. Da die Impedanz reziprok von der Kapazität der Elektrode abhängt, kann im Fall einer ideal polarisierbaren Elektrode auch die Kapazität als entscheidendes Merkmal eingeführt werden. Eine deutlich höhere Kapazität der Gegenelektrode gegenüber der Arbeitselektrode erlaubt demnach, deren Einfluss auf die Impedanz zu vernachlässigen.

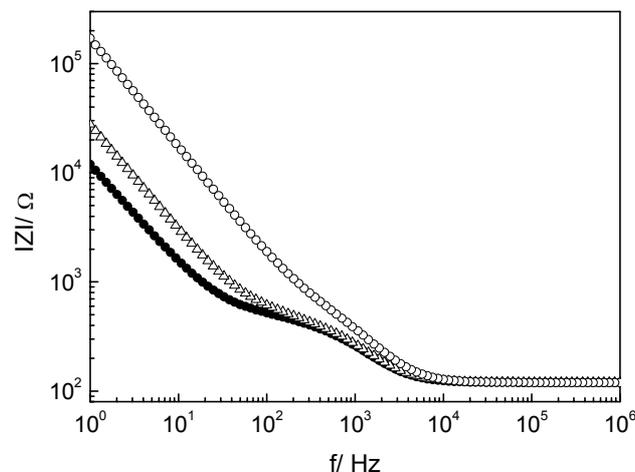


**Abb. 5.3:** Schemazeichnung des verwendeten Messaufbaus. Die beiden Messmodi mit der jeweils entsprechenden Verschaltung sind gekennzeichnet.

### 5.1.2.1 Modellrechnungen zum Einfluss der Impedanz der Gegenelektrode

Für die Anwendung des ECIS-Modells ist es essentiell, dass die Impedanz der Gegenelektrode im Vergleich zu allen anderen Impedanzbeiträgen des Systems vernachlässigbar ist. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass das Impedanzspektrum durch die Verhältnisse an der Arbeitselektrode dominiert wird. Ideal polarisierbare Elektroden (wie im Fall einer Platin-Gegenelektrode) liefern im Wesentlichen kapazitive Beiträge zur Impedanz, so dass hohe Kapazitäten mit niedriger Impedanz korrelieren. Simuliert wurde, wie groß die Kapazität der verwendeten Gegenelektrode für eine Goldfilm-Arbeitselektrode vorgegebener Größe mindestens sein muss, um das ECIS-Modell artefaktfrei anwenden zu können. Dazu wurden verschiedene Kapazitäten für die Gegenelektrode  $C_{CE}$  (10000  $\mu\text{F}$  - 1  $\mu\text{F}$ ) in ein Simulationsmodell mit ECIS-analoger Anordnung eingesetzt und die entsprechenden Impedanzspektren einer zellbedeckten Elektrode berechnet (**Abb. 5.4**). Die Größe der Arbeitselektrode orientiert sich an der experimentell eingesetzten Elektrodenfläche auf den permeablen Membranen und wurde für alle Simulationen auf 0.33  $\text{cm}^2$  festgelegt. Die Zellparameter lehnten sich eng an charakteristische Messdaten für MDCK II-Zellen an, die in dieser Arbeit bestimmt wurden ( $R_b = 70 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{0.5}\text{cm}$ ,  $C_{Cl} = 2.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Für die Parameter der Arbeitselektrode wurden experimentell ermittelte Werte genutzt, für ein planares Substrat wurden  $A = 47.0 \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$  und  $n = 0.92$  angenommen (Kapitel 4.2.3.2). Der Einsatz der Parameter für eine poröse Elektrode diente dazu, einen möglichen Einfluss der Porosität im Vergleich zu einer planaren Goldfläche zu untersuchen ( $A = 66.0 \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ,  $n = 0.92$ ).

Abbildung 5.4 unterstreicht, dass  $C_{CE}$  Einfluss auf die Spektren hat. Je kleiner  $C_{CE}$  wird, desto stärker verlagert sich der Graph im Bereich kleiner Frequenzen zu höheren Impedanzwerten. Darüber hinaus verändert sich das Zellplateau, im Frequenzbereich zwischen  $10^2$  und  $10^3$  Hz, bei  $C_{CE} = 1 \mu\text{F}$  verschwindet es praktisch ganz.



**Abb. 5.4:** Einfluss der Kapazität der Gegenelektrode  $C_{CE}$  auf die Impedanzspektren einer zellbewachsenen planaren Goldelektrode; ●:  $C_{CE} = 10000 \mu\text{F}$ , △:  $C_{CE} = 10 \mu\text{F}$ , ○:  $C_{CE} = 1 \mu\text{F}$ . Arbeitselektrodenfläche: 0.33  $\text{cm}^2$ , zur Simulation genutzte Zell- und Elektrodenparameter:  $R_b = 70 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha = 20 \Omega^{0.5}\text{cm}$ ,  $C_{Cl} = 2.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $A = 47.0 \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$  und  $n = 0.92$ .

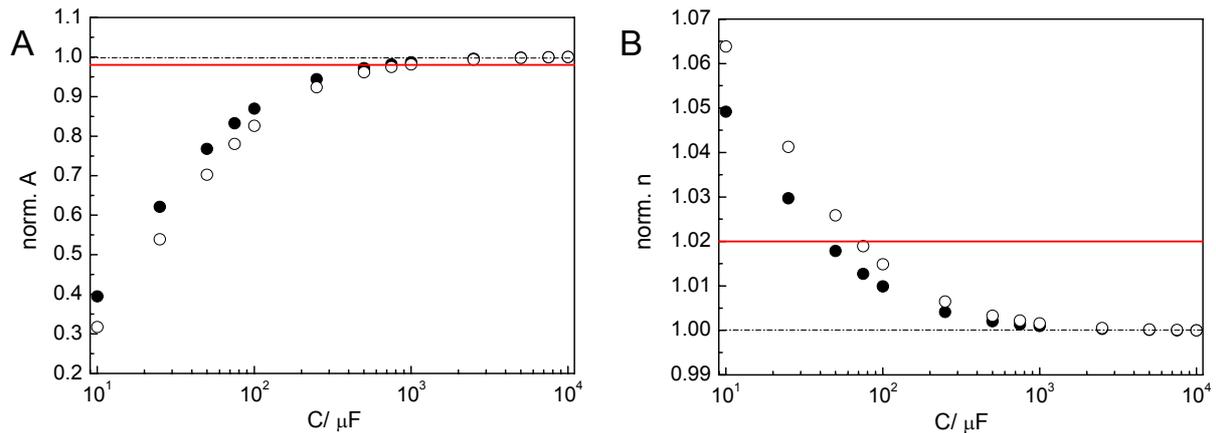
Welchen Einfluss die Kapazität der Gegenelektrode auf die einzelnen Zell- bzw. Elektrodenparameter nimmt, lässt sich nach Auswertung der simulierten Impedanzspektren mit dem ECIS-Modell zeigen. Dabei werden durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktion die Zell- und Elektrodenparameter bestimmt. Auf diese Weise wird der Einfluss der Gegenelektrode dann deutlich, wenn eine Differenz zwischen den eingesetzten und den durch die Auswertungen erhaltenen Werten festgestellt wird.

### **Einfluss auf die Elektrodenparameter $A$ und $n$**

Das Konstante Phasenelement ist im Gegensatz zu allen anderen elektronischen Bauteilen des Ersatzschaltbildes ein empirisches Impedanzelement, das benötigt wird, um die Impedanz an der Grenzfläche zwischen der polarisierbaren Elektrode und dem angrenzenden Elektrolyten zu beschreiben. In Abhängigkeit vom Parameter  $n$  liegen die impedanzspektroskopischen Eigenschaften zwischen denen eines Ohmschen Widerstandes ( $n = 0$ ,  $R = 1/A$ ) und eines idealen Kondensators ( $n = 1$ ,  $C = A$ ). Abbildung 5.5 zeigt die Analyse der Impedanzspektren für die Elektrodenparameter  $A$  und  $n$  in Abhängigkeit von der Kapazität der Gegenelektrode für die planare Arbeitselektrode sowie für TWC3.0. Für die größte Kapazität der Gegenelektrode, das heißt bei vernachlässigbarer Elektrodenimpedanz  $Z_{CE}$ , konnten jeweils die für die Simulation eingesetzten Werte ermittelt werden (planar:  $A = 47.0 \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ,  $n = 0.92$ ; TWC3.0:  $A = 66.0 \mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ,  $n = 0.91$ ). Von diesen Ausgangswerten bei einer Kapazität der Gegenelektrode von  $10^4 \mu\text{F}$  entwickeln sich die Werte bei Erniedrigung von  $C_{CE}$  zu kleineren Werten im Fall von  $A$  (**A**) und zu größeren Werten im Fall von  $n$  <sup>8</sup> (**B**). Unter Berücksichtigung von messtechnisch bedingten Schwankungen und Rundungsartefakten, die während der iterativen Anpassung der Übertragungsfunktion an die Messdaten entstanden sein können, wurde ein Grenzwert formuliert. Schwankungen innerhalb eines Bereiches von 2 % vom Ausgangswert werden daher toleriert. Daraus ergibt sich, dass der Parameter  $A$  deutlich sensitiver auf eine Erniedrigung der Kapazität ( $C_{CE}$ ) reagiert als der Parameter  $n$ . Im Fall von  $A$  wird der Toleranzgrenzwert für die poröse Arbeitselektrode bei  $C_{CE} < 10^3 \mu\text{F}$  überschritten, im Fall einer planaren Elektrode bei  $C_{CE} < 7.5 \cdot 10^2 \mu\text{F}$ . Für  $n$  ist eine Kapazität von  $C_{CE} < 7.5 \cdot 10^1 \mu\text{F}$  (porös) und  $C_{CE} < 5 \cdot 10^1 \mu\text{F}$  (planar) tolerierbar, ohne dass der Grenzwert von 2 % überschritten wird. Offensichtlich führt also für beide Parameter die poröse Struktur zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Veränderungen der Kapazität der Gegenelektrode. Bei weiterem Herabsetzen der Kapazität auf  $C_{CE} = 10 \mu\text{F}$  fällt der Wert für  $A$  auf 40 % (planar) bzw. 32 % (porös) des Ausgangswertes,  $n$  steigt unter gleichen Bedingungen um 5 % (planar) bzw. 6 % (porös) an.

---

<sup>8</sup> Diese Aussage bezieht sich auf die normierten Werte für  $A$  und  $n$ . Selbstverständlich gilt für den Parameter  $n$  nach wie vor:  $0 < n < 1$ .



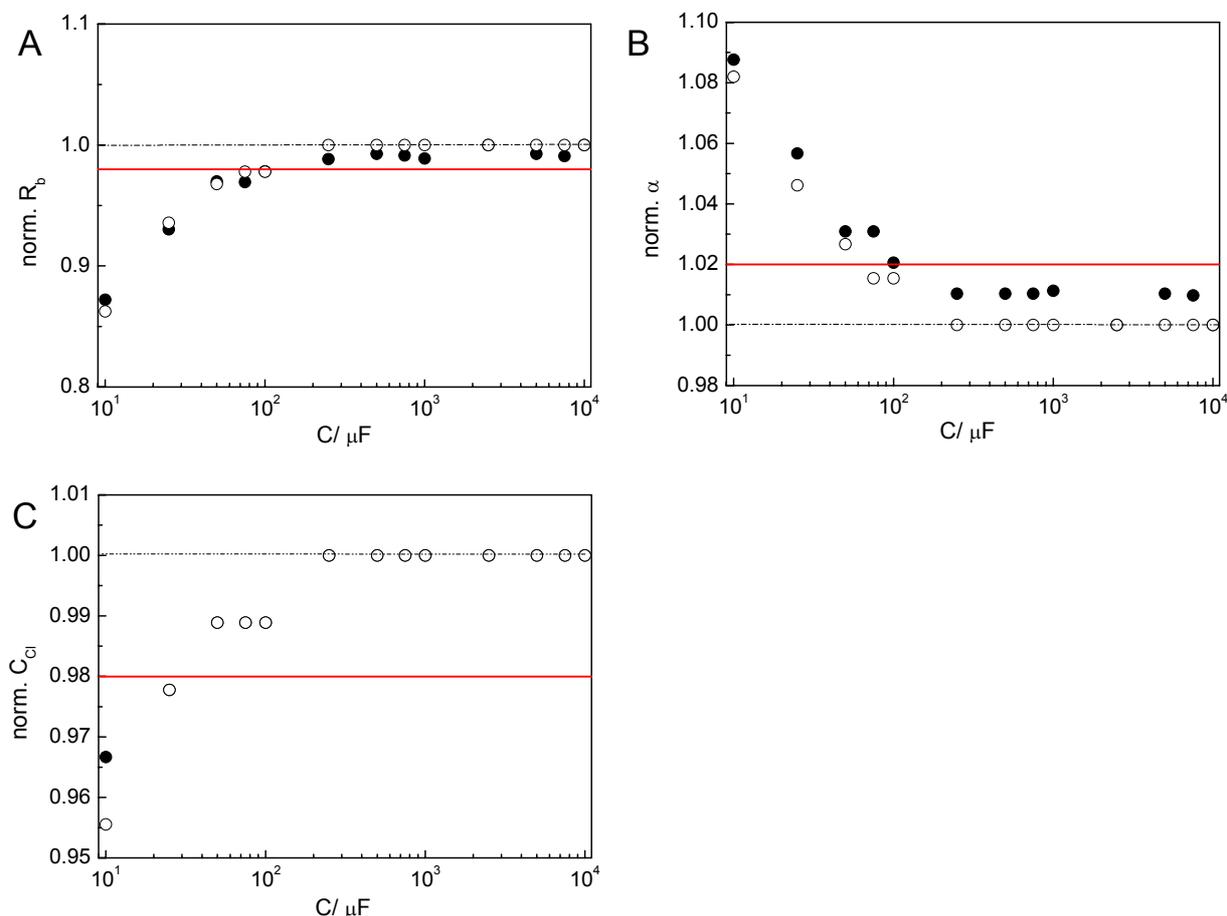
**Abb. 5.5:** Analyse der simulierten Spektren für die Elektrodenparameter  $A$  (**A**) und  $n$  (**B**) in Abhängigkeit von der Kapazität der Gegenelektrode für ein planares Substrat ( $\bullet$ ) und ein poröses (TWC3.0,  $\circ$ ). Die gestrichelte horizontale Linie markiert den Ausgangswert, die rote Linie markiert einen Grenzwert, der 2 % des Ausgangswertes entspricht<sup>9</sup>.

### Einfluss auf die Zellparameter $R_b$ , $\alpha$ und $C_{Cl}$

Die durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktion an die simulierten Spektren bestimmten Zellparameter werden ebenfalls in Abhängigkeit von der Kapazität der Gegenelektrode  $C_{GE}$  dargestellt (**Abb. 5.6**). Die angepassten Parameter zeigen bei hoher Kapazität der Gegenelektrode gute Übereinstimmung zu den zur Simulation eingesetzten Werten. Eine Ausnahme bildet dabei der Parameter  $R_b$ , bei dem eine Abweichung von 3 % (porös) bzw. 1 % (planar) gegenüber dem Ausgangswert auftritt ( $R_b = 68 \Omega\text{cm}^2$  (porös) bzw.  $R_b = 69 \Omega\text{cm}^2$  (planar),  $\alpha = 20 \Omega^{0.5}\text{cm}$ ,  $C_{Cl} = 2.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Analog zu der Betrachtung der Elektrodenparameter wurde ein Grenzwert von 2 % als Toleranz für die Abweichungen vom Ausgangswert festgelegt. Es wird zunächst deutlich, dass eine Begrenzung auf zwei signifikante Nachkommastellen, wie sie durch die verwendete Auswertungs-Software durchgeführt wird, zu einer diskontinuierlichen Entwicklung der Parameter führt. Insbesondere im Fall des Parameters für die Zellschichtkapazität ( $C_{Cl}$ ) und den Zell-Substrat-Kontakt ( $\alpha$ ) wird dies deutlich (**Abb. 5.6 B** und **C**). Sowohl für das planare als auch für das poröse Elektrodenmaterial gilt im Fall des Parameters  $R_b$ , dass ab einer Kapazität von  $C_{CE} \leq 10^2 \mu\text{F}$  der Toleranzbereich überschritten wird (**Abb. 5.6 A**). Bei weiter abnehmender Kapazität der Gegenelektrode sinkt der Wert dieses Parameters auf 86 % (planar) bzw. 87 % (porös, TWC 3.0) des Ausgangswertes. Für den Parameter des Zell-Substrat-Kontaktes  $\alpha$  wird bei sinkender Kapazität der Gegenelektrode eine Zunahme festgestellt. Der Grenzwert wird ebenfalls bei  $C_{CE} \leq 10^2 \mu\text{F}$  überschritten (**Abb. 5.6 B**). Bei der kleinsten simulierten Kapazität wird  $\alpha$  zu 108 % (planar) bzw. 109 % des Ausgangswertes bestimmt. Für die Zellschichtkapazität wird aus den bereits

<sup>9</sup> Der Grenzwert berücksichtigt messtechnisch bedingte Schwankungen sowie Rundungsartefakte, die während der iterativen Anpassung der Übertragungsfunktion an die Messdaten entstanden sein können.

angesprochenen Gründen eine sehr sprunghafte Entwicklung detektiert, weshalb von einer eindeutigen Bestimmung zum Grenzwert abgesehen wird (**Abb. 5.6 C**). Grundsätzlich führt eine abnehmende Kapazität der Gegenelektrode zu einer Abnahme im Parameter  $C_{cl}$ . Als allgemeine Tendenz kann festgehalten werden, dass die Gegenelektrode ab einer Kapazität von  $C_{CE} \leq 10^2 \mu\text{F}$  signifikant Einfluss auf die Auswertung nimmt, die ermittelten Parameter weichen deutlich von den Ausgangswerten ab.

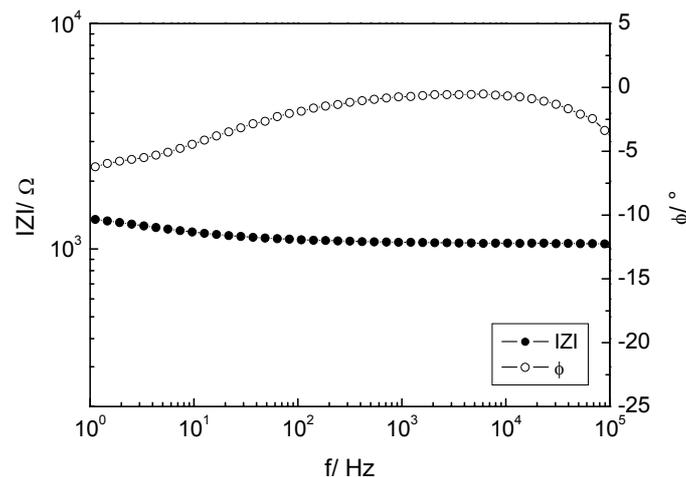


**Abb. 5.6:** Analyse der simulierten Spektren für die Zellparameter  $R_b$  (A),  $\alpha$  (B) und  $C_m$  (C) in Abhängigkeit von der Kapazität der Gegenelektrode für ein planares Substrat ( $\bullet$ ) und ein poröses (TWC3.0,  $\circ$ ). Die gestrichelte horizontale Linie markiert den Ausgangswert, die rote Linie markiert eine Toleranzgrenzwert, der 2 % des Ausgangswertes entspricht.

### 5.1.2.2 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Gegenelektrode

Die im vorherigen Kapitel durchgeführten Modellrechnungen zum Einfluss der Kapazität der Gegenelektrode auf die Gesamtimpedanz des Systems sind zu berücksichtigen, wenn ein Messplatz neu aufgebaut werden soll. Grundsätzlich ist es praktikabel, eine Elektrode zu nutzen, die in einem weiten Bereich sicherstellt, dass durch die Impedanz der Gegenelektrode keine Beeinflussung des Systems zu befürchten ist. Wie bereits erwähnt, liefert eine ideal polarisierbare Elektrode im Wesentlichen kapazitive Beiträge zur Impedanz. Hohe Kapazitäten sind daher mit einer niedrigen Impedanz korreliert. Die effektive Kapazität einer Elektrode in Kontakt mit Kulturmedium wird durch ihre spezifische Kapazität und ihre Fläche bestimmt.

Je größer die Fläche, desto höher die effektive Kapazität. Daher werden Platinelektroden, deren Oberfläche durch amorphes Platin (Platinschwarz) vergrößert wurden, häufig als Gegenelektroden eingesetzt. Um sicherzugehen, dass die Kapazität der Gegenelektrode im betrachteten Frequenzfenster keinen entscheidenden Einfluss auf das Impedanzspektrum nimmt, weil die Kapazität sehr groß ist, wird die Platindrahtelektrode in einer Elektrolytlösung gegen eine Silber/Silberchlorid-Elektrode impedanzspektroskopisch vermessen. Die Frequenz wurde im für die ECIS-Messungen genutzten Frequenzfenster diskret variiert. Die Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode zeichnet sich durch eine sehr geringe Polarisierbarkeit aus, aus der eine nahezu unendlich hohe Kapazität resultiert. Gegenüber dieser Referenz wird die Platindrahtelektrode kapazitätsbestimmend, so dass deren Kapazität experimentell messbar wird. Abbildung 5.7 stellt die frequenzabhängige Impedanz (●) der in allen weiteren Experimenten eingesetzten Platinelektrode gegen die Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid) dar. Als Elektrolyt wurde  $\text{PBS}^{++}$  genutzt, die hohe Impedanz resultiert aus dem hohen Innenwiderstand der Referenzelektrode. Daneben wird die Phasenverschiebung gegen die Frequenz des Erregersignals abgebildet. In einem Wechselstromkreis sind Strom und Spannung in Anwesenheit nicht-ohmscher Elemente in der Phase verschoben. Ohmsche Widerstände verursachen keine Phasenverschiebung ( $\varphi = 0$ ), während ein Kondensator eine Phasenverschiebung von  $-90^\circ$  ( $\varphi = -\pi/2$ ) verursacht. Kombinationen von ohmschen und kapazitiven Bauteilen verursachen entsprechend charakteristische frequenzabhängige Phasenverschiebungen, die als Phasenverschiebungswinkel  $\varphi$  angegeben werden. Im betrachteten Frequenzfenster wird für Frequenzen  $f > 40$  Hz kein signifikanter Einfluss auf die Impedanz festgestellt. Eine Phasenverschiebung nahe  $0^\circ$  zeigt, dass die Impedanz vom Einfluss ohmscher Bauteile dominiert wird. Im Frequenzbereich  $f < 40$  Hz wird für die Impedanz ein leichter Anstieg mit abnehmender Frequenz dokumentiert. Im gleichen Frequenzfenster zeigt die Phasenverschiebung eine Entwicklung zu niedrigeren Phasenwinkeln. Ein Wert von  $\varphi = -6^\circ$  steht aber nach wie vor für ein System, bei der die ohmschen Komponenten eindeutig dominieren. Das heißt, die Kapazität der Platindrahtelektrode nimmt in dem betrachteten Frequenzfenster von  $1 - 10^5$  Hz keinen Einfluss auf die Impedanz. Überträgt man dieses Ergebnis auf den Messaufbau, in dem die Platinelektrode als Gegenelektrode fungiert, bedeutet dies, dass auch hier der Einfluss auf die Impedanz vernachlässigbar klein ist.



**Abb. 5.7:** Impedanz (●)- und Phasen (○)-spektrum einer platinieren Platindrahtelektrode gegen eine Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid), gemessen in  $\text{PBS}^{++}$ .

## 5.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen epithelialer Zellschichten auf porösen Goldelektroden

Die sich in ihrer Strukturierung deutlich unterscheidenden Filtermembranen bieten Zellen eine entsprechend unterschiedliche Substratoberfläche zur Adhäsion und Differenzierung. Fraglich ist, wieweit die Strukturierungen zu Veränderungen im Impedanzverhalten der Elektroden führen und ob eine Übertragung des ECIS- bzw. TER-Modells zur Auswertung möglich ist. In diesem Fall ist es ein Ziel zu untersuchen, ob es für die Zellen einen Unterschied macht, wenn einzelne große, oder viele kleine Poren das Substrat durchziehen. Daher wird eine Gegenüberstellung der Elektroden in „Merkmalspaaren“ zum Teil sinnvoll: TW- und TWC-Filtermembranen unterscheiden sich in ihrer Porenanzahl, nicht jedoch in dem Porendurchmesser. TW1.0 und TWC3.0 besitzen Poren mit stark unterschiedlichen Durchmessern, diese sind aber in der gleichen Dichte auf der Oberfläche verteilt. Die impedanzspektroskopische Charakterisierung sowie die Untersuchungen zur Motilität werden für MDCK II-Zellschichten im ECIS-Modus auf den unterschiedlichen porösen Goldelektroden durchgeführt. Im Anschluss daran werden die Zellschichten parallel zum ECIS-Modus im TER-Modus gemessen, um spezifische Besonderheiten und Informationsgehalte der Messmodi zu untersuchen.

### 5.2.1 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der zellfreien porösen Goldelektroden

Zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung der porösen Arbeitselektroden wurden die unterschiedlichen Oberflächen über eine Elektrolytlösung mit der Platingegenoelektrode leitend verbunden. Abbildung 5.8 A zeigt exemplarisch das frequenzabhängige Impedanz-

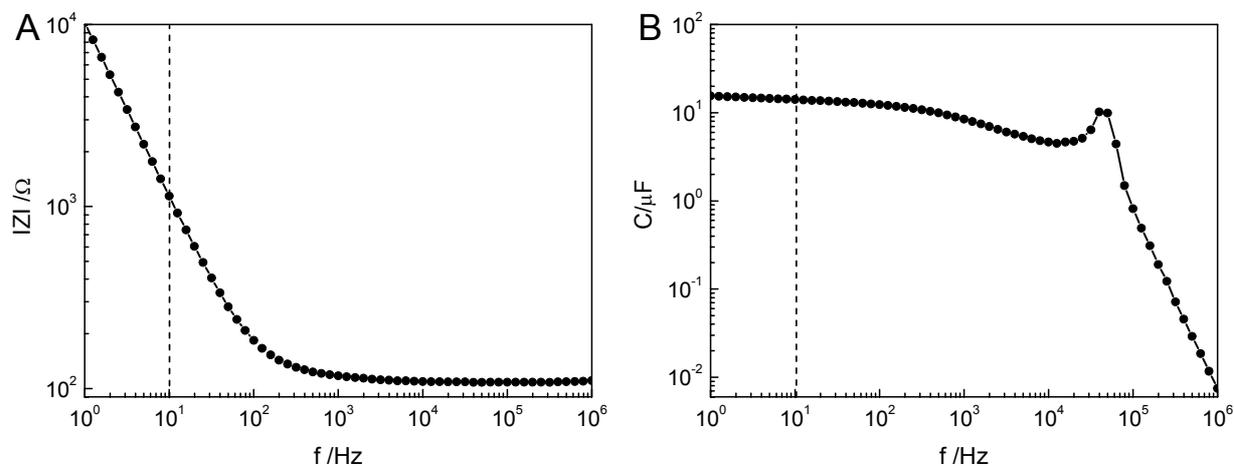
spektrum einer typischen, nanoporösen Goldelektrode, basierend auf einem TWC-Filter. Die Messung wurde im ECIS-Modus durchgeführt, die Elektrodengröße durch Reflexionsaufnahmen mit dem CLSM zu  $0.38 \text{ cm}^2$  bestimmt. Das Spektrum zeigt das charakteristische Impedanzverhalten einer leeren Goldelektrode mit einem ähnlichen Verlauf, wie er in Kapitel 4.2.3.1 für planare Goldfilmelektroden gezeigt werden konnte. Im hochfrequenten Bereich ( $f > 1 \text{ kHz}$ ) zeigt sich ein frequenzunabhängiger Verlauf, hier wird die Gesamtimpedanz des Systems hauptsächlich vom Elektrolytwiderstand der *bulk*-Phase dominiert. Bei niedrigen Frequenzen ( $f < 10^2 \text{ Hz}$ ) dominiert die Kapazität der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt die Gesamtimpedanz. In der doppeltlogarithmischen Darstellung resultiert in diesem Frequenzbereich ein linearer Abfall mit steigender Frequenz.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächen (Kapitel 5.1.1) lassen den Schluss zu, dass zum Teil auch die Poreninnenwände mit Gold belegt sind. Inwieweit dadurch der Flächenverlust durch die Poren ausgeglichen werden kann bzw. überkompensiert wird, soll durch den flächennormierten<sup>10</sup> Vergleich der Kapazitäten bei 10 Hz untersucht werden. Grundsätzlich wäre es in diesem Zusammenhang wünschenswert, die Kapazität der Elektroden direkt bestimmen zu können. Wie bereits für nanoporöse Elektroden auf Silizium-Substraten beschrieben wurde (Kapitel 4.2.3.1), verhalten sich die Elektrodenoberflächen allerdings aufgrund lokaler Unterschiede in der Grenzflächentopographie und der chemischen Zusammensetzung elektrisch nicht ideal (Wegener, 1998). Daher wird zur Beschreibung der Grenzflächenimpedanz ein rein empirisches Impedanzelement herangezogen, das sogenannte konstante Phasenelement (CPE). Entsprechend der Heterogenität der Oberfläche vereinigt dieses Element sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften, weshalb eine nachträgliche Trennung zur Bestimmung der Kapazität nicht möglich ist. Die gemessene Gesamtimpedanz des Systems setzt sich aus einem Realteil, der die ohmschen Anteile widerspiegelt und einem Imaginärteil, der sich aus den kapazitiven Beiträgen ergibt, zusammen. Wie für das Impedanzspektrum erläutert, dominiert die Kapazität der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt die Impedanz im Frequenzbereich  $f < 10^2 \text{ Hz}$ . Entsprechend gilt für die beiden Komponenten der Impedanz, dass der kapazitive Anteil in diesem Frequenzbereich die Kapazität der Arbeitselektrode widerspiegelt. Durch den Vergleich der gemessenen Gesamtkapazität bei 10 Hz sollte somit ein Rückschluss auf eine Flächenveränderung aufgrund der Porosität möglich sein. Abbildung 5.8 B stellt den Verlauf der Gesamtkapazität in Abhängigkeit von der Frequenz für das in A gezeigte Impedanzspektrum dar. Der starke Abfall der Kapazität ab einer Frequenz von etwa  $10^4 \text{ Hz}$  inklusive des kurzen Anstiegs spie-

---

<sup>10</sup> Normiert wurde auf die geometrische Fläche, die sich hier und im Folgenden auf die Kreisfläche, die aus der Begrenzung der Elektrodenfläche resultiert, bezieht. Die Angabe berücksichtigt daher keine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche.

gelt parasitäre Einflüsse des Messaufbaus wider, die in der Gesamtimpedanz durch den *bulk*-Widerstand überlagert werden.

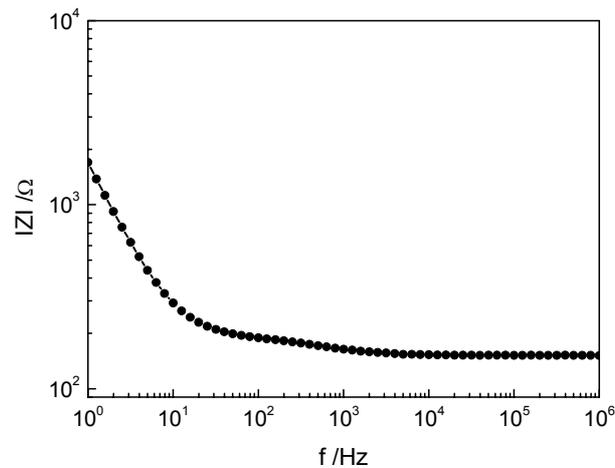


**Abb. 5.8:** Impedanzspektrum einer nanoporösen Goldelektrode auf Basis einer TWC-Filtermembran. **A:** exemplarischer Verlauf der Gesamtimpedanz in Abhängigkeit von der Frequenz. **B:** Gesamtkapazität des Systems gegen die Frequenz.

Mit Hilfe des in Kapitel 4.2.3.1 ermittelten Kapazitätswertes bei 10 Hz für planare Goldelektroden von  $(29.1 \pm 1.4) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  soll beurteilt werden, ob eine Flächenveränderung aus der Porosität der Goldelektrode resultiert. Für den *Transwell* Filter mit einem Porendurchmesser von  $1 \mu\text{m}$  (TW1.0) wird ein Wert von  $(29.5 \pm 2.2) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 9, \pm \text{SDM}$ ) bestimmt. Die elektrisch zugängliche Fläche unterscheidet sich somit trotz der Poren nicht signifikant von der einer planaren Elektrode. *Transwell Clear* Filter (Porendurchmesser  $0.4 \mu\text{m}$ ) zeigen im Mittel eine Kapazität von  $(36.2 \pm 1.1) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 6, \pm \text{SDM}$ ), was einer Zunahme gegenüber der planaren Fläche um 24 % entspricht. Für *Transwell* Filter (Porendurchmesser  $0.4 \mu\text{m}$ ) wird nochmals ein höherer Wert von  $(40.0 \pm 1.4) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 9, \pm \text{SDM}$ ) ermittelt, eine Erhöhung um 37 % gegenüber der planaren Oberfläche. Der höchste Wert wird für einen *Transwell Clear* Filtereinsatz mit einem Porendurchmesser von  $3 \mu\text{m}$  (TWC3.0) erhalten. Mit  $(45.4 \pm 1.0) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 6, \pm \text{SDM}$ ) liegt der Wert um mehr als die Hälfte (56 %) über dem Wert für planare Oberflächen. Die unterschiedlichen Porendurchmesser und Porendichten bzw. Membranmaterialien nehmen also Einfluss auf die elektrisch zugängliche Fläche. Aus den Kapazitätswerten bei 10 Hz ergibt sich eine aufsteigende Reihe, beginnend mit  $\text{TW1.0} < \text{TWC} < \text{TW} < \text{TWC3.0}$ .

Parallel wurde überprüft, ob die porösen, goldbedeckten Membranen für Messungen im TER-Modus grundsätzlich geeignet sind. Die goldbelegte Filtermembran (bzw. Elektrode 2, **Abb. 5.3**) verblieb passiv zwischen den Messelektroden. Abbildung 5.9 bildet ein Spektrum, das im TER-Modus aufgenommen wurde, ab. Der Verlauf spiegelt im niedrigfrequenten Bereich den Einfluss der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt (bzw. Elektrode 3, **Abb. 5.3**) wider, im Bereich hoher Frequenzen den des *bulk*-Widerstandes. Bei 100 Hz wird eine leichte Impedanzerhöhung detektiert, möglicherweise wirken sich Silikonreste impedanzerhöhend aus,

die während des Herstellungsprozesses am Rand der Elektrodenfläche (Elektrode 2) verblieben sind.



**Abb. 5.9:** Exemplarisches Impedanzspektrum einer im TER-Modus gemessenen goldbelegten leeren TWC-Filtermembran ( $A = 0.38 \text{ cm}^2$ ).

### 5.2.2 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Epithelzelllinie MDCK II auf nanoporösen Goldelektroden im ECIS-Modus

Ob aus den unterschiedlichen Oberflächenstrukturen Veränderungen der passiven elektrischen Eigenschaften der Zellen resultieren, soll anhand der ECIS-Messungen und ihrer quantitativen Auswertung untersucht werden. Die Messungen wurden, 24 h nach konfluenter Aussaat der Zellen, durchgeführt. In diesem Stadium war es aufgrund der ausgeprägten Barrierefunktion der Zellen möglich, bei allen Filtermembranen eine konstante Mediumssäule im apikalen Kompartiment zu erzeugen, was Voraussetzung für eine ausreichende Eintauchtiefe der Platindrahtelektrode war.

Der spezifische parazelluläre Widerstand  $R_b$  ist ein Maß für die Stärke der Zell-Zell-Kontakte unter der Annahme, dass die untersuchten Zellen alle die Form eines Zylinders mit dem mittleren Zellradius ( $r_c$ ) besitzen. Tabelle 5.2 zeigt eine Übersicht über die ermittelten Werte für  $R_b$  auf den unterschiedlichen Substraten. Es wird nur eine signifikante Aussage gefunden: Zellen auf Elektroden, basierend auf TWC-Membranen, ( $R_b = (81.9 \pm 7.2) \Omega\text{cm}^2$ ) zeigen gegenüber Elektroden, basierend auf TW-Membranen ( $R_b = (67.3 \pm 5.8) \Omega\text{cm}^2$ ), also bei gleichem Porendurchmesser aber geringerer -dichte, eine Tendenz zu höheren spezifischen parazellulären Widerständen. Darüber hinaus können innerhalb der Merkmalspaare keine signifikanten Differenzen beschrieben werden. Für TWC3.0-Elektroden wird der  $R_b$ -Wert zu  $(61.3 \pm 11.3) \Omega\text{cm}^2$  für TW1.0-Elektroden zu  $(74.7 \pm 4.1) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt. Die folgende Spalte der Tabelle stellt die entsprechenden Werte für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  zusammen. TW zeigt die niedrigsten Werte für  $\alpha$  ( $(14.1 \pm 0.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$ ) und unterscheidet sich von TWC (gleicher Porendurchmesser) signifikant ( $(18.1 \pm 1.2) \Omega^{0.5}\text{cm}$ ). Auch für TWC3.0

und TW1.0 werden im Vergleich zu TW höhere Werte für  $\alpha$  gefunden. Beide Filtertypen liegen in den Werten für  $\alpha$  mit  $(16.5 \pm 0.8) \Omega^{0.5} \text{cm}$  (TW1.0) und  $(15.5 \pm 0.4) \Omega^{0.5} \text{cm}$  (TWC3.0) leicht über dem für TW. TWC, TW1.0 und TWC3.0 zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede.

Die spezifische Kapazität  $C_{Cl}$  liefert Informationen über die Topographie der Zellmembran. Das ECIS-Modell ist allerdings nicht in der Lage, zwischen basaler und apikaler Membran zu differenzieren. Für die spezifische Gesamtmembran Kapazität  $C_{Cl}$  wird lediglich innerhalb der Merkmalsgruppe TWC ( $(2.21 \pm 0.08) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) und TW ( $(2.56 \pm 0.07) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) ein signifikanter Unterschied gefunden (Tab. 5.2)..

**Tab. 5.2:** ECIS-Parameter von MDCK II-Zellen auf porösen Goldelektroden (Mittelwert  $\pm$  SDM).

Oberfläche	ECIS-Parameter			CPE	
	$R_b [\Omega \text{cm}^2]$	$\alpha [\Omega^{0.5} \text{cm}]$	$C_{Cl} [\mu\text{F}/\text{cm}^2]$	$A [\mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2]$	$n$
TWC (n = 5)	$81.9 \pm 7.2$	$18.1 \pm 1.2$	$2.21 \pm 0.08$	$47.3 \pm 1.4$	$0.93 \pm 0.01$
TW (n = 4)	$67.3 \pm 5.8$	$14.1 \pm 0.4$	$2.56 \pm 0.07$	$55.4 \pm 2.9$	$0.92 \pm 0.01$
TW1.0 (n = 6)	$74.7 \pm 4.1$	$16.5 \pm 0.8$	$2.36 \pm 0.09$	$44.8 \pm 5.8$	$0.89 \pm 0.01$
TWC3.0 (n = 6)	$61.3 \pm 11.3$	$15.5 \pm 0.4$	$2.47 \pm 0.10$	$66.0 \pm 2.7$	$0.91 \pm 0.01$

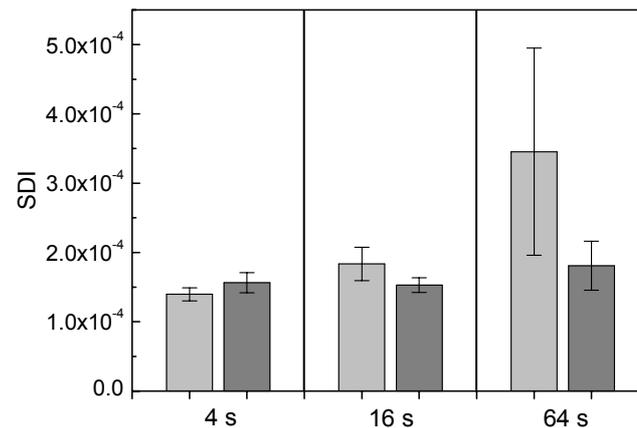
Das die Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt beschreibende Konstante Phasenelement (CPE) wird durch die Parameter  $A$  und  $n$  beschrieben. Wie bereits in Kapitel 4.2.3.2 für die nanoporösen Silizium-Substrate dargestellt, ist es nur sinnvoll, Zusammenhänge zwischen dem CPE und der Topographie der Elektrodenoberfläche zu beschreiben, wenn der Parameter  $n$  annähernd konstant ist. Die Werte für den Parameter  $n$  unterscheiden sich nicht signifikant. Veränderungen in  $A$  bei konstantem  $n$  resultieren aus einer Parallelverschiebung des Impedanzverlaufes im Bereich des CPEs ( $10^0 \text{ Hz} > f < 10^2 \text{ Hz}$ ) zu niedrigeren oder höheren Impedanzen. Für den Grenzfall  $n = 1$  entspräche  $A$  der Kapazität, für den hier erhaltenen Wert allerdings vereinigt  $A$  sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften, so dass eine einfache Interpretation nicht möglich ist. Nichts desto trotz wird eine ähnliche Tendenz für  $A$  für die unterschiedlichen Membranen gefunden, wie sie für die Kapazität des Messaufbaus bei 10 Hz bestimmt werden konnte (Kapitel 5.2.1). Für Elektroden, basierend auf TW1.0-Membranen, wird der niedrigste Wert bestimmt, der sich allerdings nicht signifikant von dem auf TWC-Membranen unterscheidet. Ein höherer Wert wird für poröse Elektroden auf TW-Membranen erhalten, der höchste Wert von Elektroden auf TWC3.0-

Filtermembranen erreicht. Somit gilt die Reihenfolge für den Parameter A:  $TW1.0 \leq TWC < TW < TWC3.0$ .

### 5.2.3 Untersuchungen zur Motilität von MDCK II-Zellen auf porösen Goldelektroden

Ausdifferenzierte, vitale Zellen in einem konfluenten Monolayer sitzen nicht völlig starr auf ihrem Substrat, sondern zeigen eine permanente, metabolisch getriebene Motilität. *Giaever* und *Keese* (1991) konnten zeigen, dass die in einer ECIS-analogen Messung bei einer konstanten Frequenz aufgenommenen, zeitlichen Änderungen der Impedanz auf Fluktuationen im Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakt zurückzuführen sind. Durch Analyse der Impedanzfluktuationen vitaler Zellen sowie von Zellen, deren Proteine chemisch vernetzt wurden, ist es möglich, das biologische Rauschen nativer Zellen vom technischen Hintergrundrauschen zu differenzieren und mit der Zellmotilität zu korrelieren.

Zur Analyse der Daten wird die Methode der Standardabweichung der Inkremente (SDI) genutzt (Kapitel 3.3.4.2; Lo et al., 1993). Eine a priori Vorhersage darüber, welche Inkrement- und welche Messgröße zur Auswertung genutzt werden kann, ist schwierig und zelltypabhängig. Daher wurde experimentell ermittelt, welche Parameter am sensitivsten die biologische Motilität vom technischen Rauschen unterscheidet. In Betracht kommen potentiell sowohl die Fluktuationen der normierten Impedanz, des normierten Widerstandes als auch der normierten Kapazität bei unterschiedlichen Inkrementgrößen (SDI ist daher dimensionslos). Exemplarisch wird hier die Auswertung der Impedanzfluktuationen von Zellen auf TWC-Filtermembranen gezeigt. Zunächst wird der Einfluss auf die Impedanz bei 500 Hz untersucht (**Abb. 5.10**). Für das 4 s-Inkrement wird ein Wert von  $(1.40 \pm 0.09) \cdot 10^{-4}$  für native Zellen ermittelt. Nach Vernetzung der Proteine durch Glutardialdehyd steigt der Wert auf  $(1.56 \pm 0.14) \cdot 10^{-4}$ . Die gegenteilige Entwicklung wird für das 16 s-Inkrement beobachtet, hier fällt der Wert von  $(1.83 \pm 0.24) \cdot 10^{-4}$  auf  $(1.53 \pm 0.11) \cdot 10^{-4}$ . Die gleiche Tendenz wird für das 64 s-Inkrement bestimmt, die Abnahme erfolgt von  $(3.45 \pm 1.50) \cdot 10^{-4}$  auf  $(1.81 \pm 0.36) \cdot 10^{-4}$ . Für keine Inkrementgröße wird ein signifikanter Unterschied für die zeitliche Änderung der Impedanz vor und nach Vernetzung der Proteine detektiert.



**Abb. 5.10:** Untersuchungen zur Motilität von MDCK II-Zellen auf porösen Goldelektroden vor (hellgrau) und nach der chemischen Vernetzung der zellulären Proteine (grau). Dargestellt ist die Analyse für die normierte Impedanz bei 500 Hz als Standardabweichung der Inkremente (SDI) vom Mittelwert für 4 s-, 16 s-, und 64 s-Inkremente. Die Elektrodenfläche betrug  $\sim 0.38 \text{ cm}^2$ , (Mittelwert  $\pm$  SDM,  $n = 3$ ).

Analog zu dieser Auswertung werden auch der Widerstand und die Kapazität untersucht. Die hier verwendeten porösen Elektroden erlauben allerdings offensichtlich nicht die korrekte Messung der biologischen Mikromotion. Unabhängig davon, welcher Parameter betrachtet wird, kann keine signifikante Differenz zwischen lebenden und toten Zellen gefunden werden. Für TW, TWC3.0 und TW1.0 wurden analoge Ergebnisse gefunden, auf eine Darstellung wird daher verzichtet.

## 5.2.4 ECIS- und TER-Modus: Vergleichende Untersuchungen am Beispiel epithelialer Zellschichten

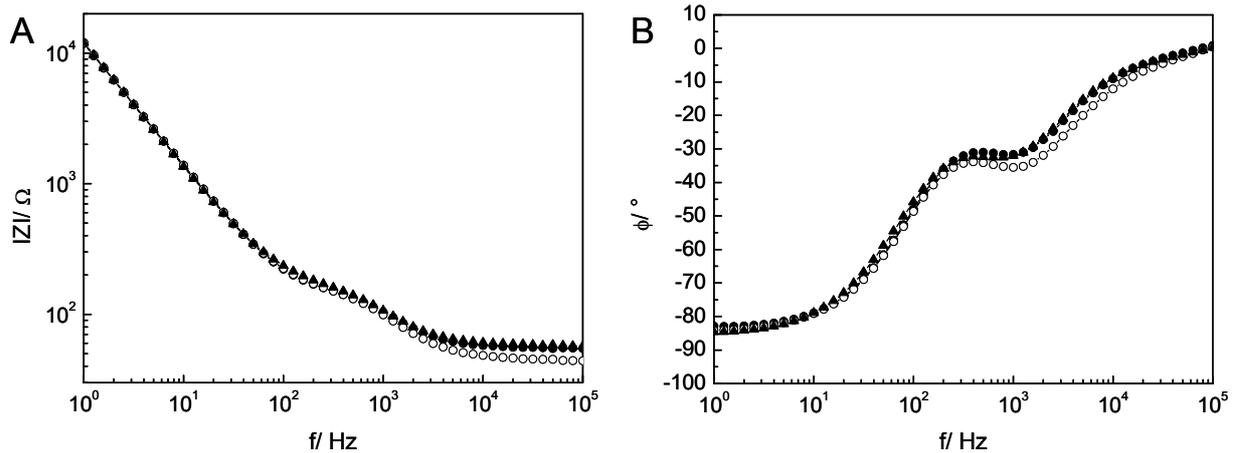
Der in Kapitel 5.1.2 vorgestellte Messaufbau erlaubt es, dieselbe Zellschicht im gleichen Messaufbau und zeitlich unmittelbar hintereinander sowohl mit der ECIS-Methode als auch im TER-Modus impedanzspektroskopisch zu untersuchen. Beide Modelle nehmen für sich in Anspruch, die Zell-Zell-Kontakte sowie die Kapazität der Zellmembran zu charakterisieren. Die ECIS-Methode ist dabei zusätzlich in der Lage, zwischen Beiträgen aus dem Zell-Substrat-Kontakt und solchen aus dem Interzellularspalt zu differenzieren. Um die spezifischen Besonderheiten und Informationsgehalte der Messmodi untersuchen zu können, muss zunächst geklärt werden, ob die Goldschicht auf der Membran im TER-Modus Auswirkungen auf die Messung bzw. die Auswertung hat.

### 5.2.4.1 Untersuchungen zum Einfluss einer passiven Goldschicht auf impedanzspektroskopische Messungen im TER-Modus

Im Unterschied zum etablierten Aufbau für den TER-Modus (Kapitel 3.3.3.1) verbleibt durch die poröse Goldelektrode (Elektrode 2, **Abb. 5.3**) eine passive Goldschicht zwischen den

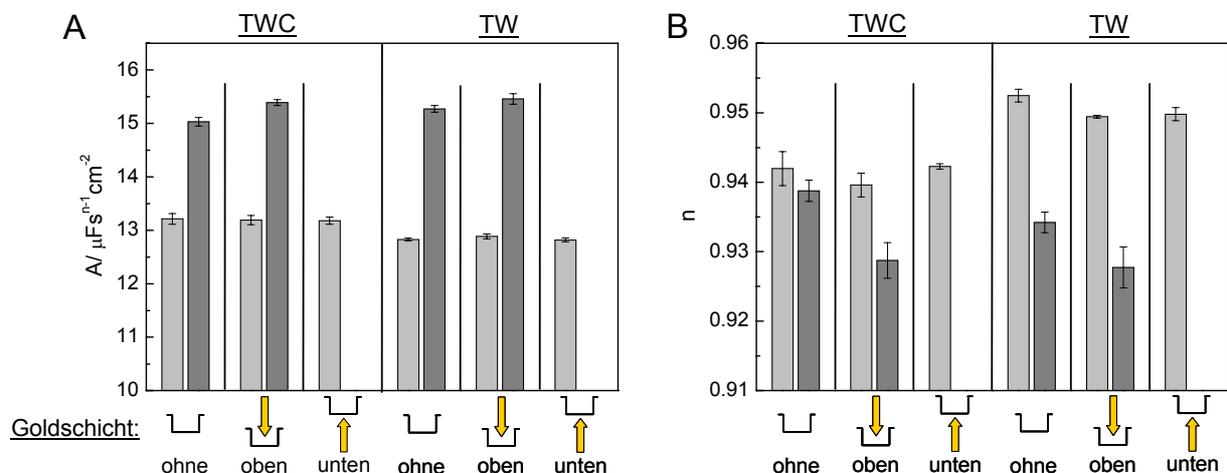
beiden Messelektroden. Dadurch könnten elektromagnetische Interferenzen während der Messung auftreten, die Auswirkung auf die Anwendbarkeit des Ersatzschaltbildes haben könnten. Außerdem könnte die Goldschicht auf der porösen Membran Einfluss auf das Zellwachstum nehmen. Dies hätte zwar keine Auswirkung für den Vergleich der Messmodi, denn es wird dieselbe Zellschicht impedanzspektroskopisch charakterisiert, würde aber den Vergleich zu Literaturdaten, die auf Kunststoffmembranen bestimmt wurden, erschweren.

Filter des Typs TW und TWC ( $\varnothing = 1.2$  cm) wurden entweder ober- oder unterhalb der Membran mit einer Schicht aus 100 nm Gold belegt. Daneben verbleiben unmodifizierte Filter als Kontrolle. Auf alle Substrate wurden MDCK II-Zellen konfluent ausgesät und nach 24 h im TER-Modus untersucht. Es wurden Zellen unterschiedlicher Passagen (Charge 1 und Charge 2) genutzt. Abbildung 5.11 zeigt beispielhaft die Impedanz- und Phasenverschiebungsspektren für Zellen auf TWC-Filtermembranen (Charge 1). Die Impedanzspektren (**A**) verlaufen im gesamten Bereich annähernd deckungsgleich, die Differenzen im Frequenzbereich  $f > 10^4$  Hz resultieren aus unterschiedlichen Eintauchtiefen der Gegenelektrode in das Kulturmedium. Die Kombination von ohmschen und kapazitiven Beiträgen des Gesamtsystems zur Impedanz kann auch als Phasenverschiebung in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt werden. Wie bereits in Kapitel 5.1.2.2 beschrieben wurde, sind in einem Wechselstromkreis in Abhängigkeit von den Bauteilen der Strom und die Spannung phasenverschoben. Rein ohmsche Komponenten verursachen keine Phasenverschiebung ( $\varphi = 0$ ), während aus einem Kondensator eine Phasenverschiebung von  $-90^\circ$  ( $\varphi = -\pi/2$ ) resultiert. Sollten aufgrund der Goldschicht auf- bzw. unterhalb der Membran weitere Bauteile für die Auswertung der Messung im TER-Modus zu berücksichtigen sein, sollte sich dies in Form eines veränderten Phasenwinkels bemerkbar machen. Für den Einfluss der Goldschicht auf die Phasenverschiebung sollte es dabei irrelevant sein, ob sich die Goldschicht ober- oder unterhalb der Membran befindet. Abbildung 5.11 B zeigt die Phasenspektren für die unterschiedlichen Bedingungen. Im Bereich hoher Frequenzen ( $f > 10^4$  Hz) dominieren die ohmschen Widerstände der *bulk*-Phase das System, die Phasenverschiebung ist nahe  $0^\circ$ . Der Frequenzbereich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz wird durch den Beitrag der Zellschicht dominiert, aus dem kapazitiven Beitrag der Zellmembran resultiert eine stärkere Phasenverschiebung. Die Unterschiede in den Spektren resultieren aus leicht unterschiedlichen Beiträgen der jeweiligen Zellschichten und der Eintauchtiefe. Im Bereich  $f < 10^2$  Hz resultiert eine deutliche Abnahme des Phasenwinkels aus den kapazitiven Beiträgen der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt. Die Spektren verlaufen in diesem Bereich annähernd deckungsgleich. Insbesondere dadurch, dass für die Spektren der Messungen mit einer Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Membran gegenüber dem Spektrum der Messung ohne Goldschicht kein eindeutiger Unterschied gezeigt werden kann, wird davon ausgegangen, dass die Goldschicht nicht für die Auswertung der Spektren zu berücksichtigen ist.



**Abb. 5.11:** Impedanz- und Phasenverschiebungsspektren konfluenter MDCK II-Zellen auf porösen TWC-Membranen im TER-Modus; ●: ohne Goldschicht; ○: Goldschicht (100 nm) auf der Membran; ▲: Goldschicht (100 nm) unterhalb der Membran. **A:** Impedanz ( $|Z|$ ); **B:** Phasenverschiebung ( $\phi$ ).

Im Anschluss an die Messungen wurden die Spektren der unterschiedlichen Bedingungen ausgewertet. Abbildung 5.12 zeigt die Übersicht für die erhaltenen Elektrodenparameter  $A$  und  $n$  der unterschiedlichen Zellchargen, die gemittelten Werte sind Tabelle 5.3 zu entnehmen. Für  $A$  wird weder für TWC noch für TW ein signifikanter Einfluss einer Goldschicht im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe beobachtet. Eine Tendenz zu einem höheren Wert in  $A$  durch eine Goldschicht auf der Membran für Zellcharge 2 (grau) wird durch Zellcharge 1 nicht bestätigt. Die Varianzen, die sich im Vergleich der Zellchargen ergeben, sind deutlich größer als ein Einfluss der Goldschicht. Es spielt außerdem wie zu erwarten war keine Rolle, ob die Metallschicht oberhalb oder unterhalb der Membran aufgebracht ist. Für  $n$  lässt sich für Zellcharge 2 eine signifikante Abnahme gegenüber der Kontrollgruppe ermitteln. In Zellcharge 1 dagegen wurden analog zu den konstanten Werten für  $A$  konstant ähnliche Werte für  $n$  gefunden.

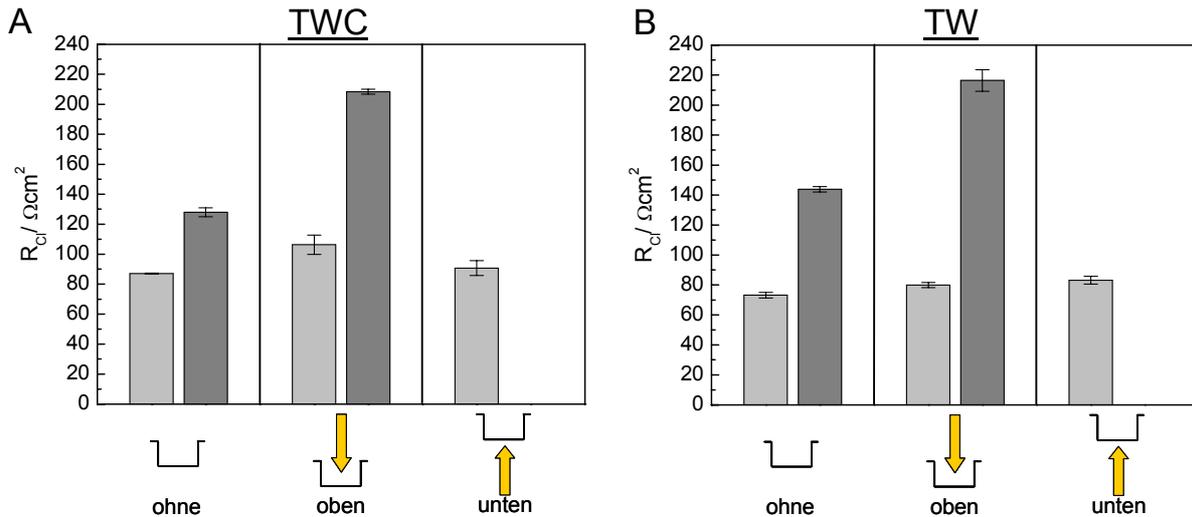


**Abb. 5.12:** Einfluss einer 100 nm dicken Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Filtermembran (TWC und TW) auf die passiven elektrischen Eigenschaften der Messelektroden im Vergleich zu Membranen ohne Gold. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Zellchargen; 1: hellgrau, 2: grau. **A:** Parameter  $A$ , **B:** Parameter  $n$ . Die Mittelwerte sind Tab. 5.3 zu entnehmen ( $n = 3$ ,  $\pm$  SDM).

**Tab. 5.3:** Einfluss einer 100 nm dicken Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Filtermembranen (TWC und TW) im Vergleich zu Membranen ohne Gold auf die passiven elektrischen Eigenschaften der Messelektroden (charakterisiert durch die Parameter  $A$  und  $n$  ( $n = 3, \pm \text{SDM}$ )).

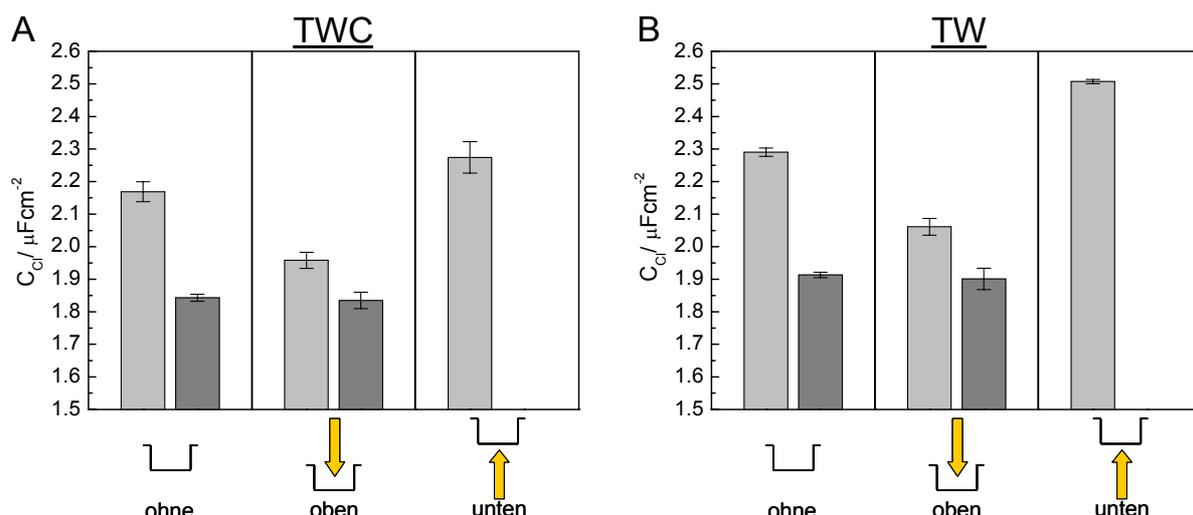
	Goldschicht	$A$ [ $\mu\text{Fs}^{n-1}/\text{cm}^2$ ]			$N$		
		ohne	oberhalb	unterhalb	ohne	Oberhalb	unterhalb
TWC	Zellcharge 1	13.21 $\pm 0.10$	13.19 $\pm 0.09$	13.18 $\pm 0.07$	0.942 $\pm 0.002$	0.940 $\pm 0.002$	0.952 $\pm 0.001$
	Zellcharge 2	15.03 $\pm 0.08$	15.39 $\pm 0.06$	-	0.939 $\pm 0.002$	0.929 $\pm 0.06$	-
TW	Zellcharge 1	12.83 $\pm 0.02$	12.89 $\pm 0.05$	12.82 $\pm 0.04$	0.952 $\pm 0.001$	0.949 $\pm 0.000$	0.950 $\pm 0.001$
	Zellcharge 2	15.27 $\pm 0.06$	15.46 $\pm 0.10$	-	0.934 $\pm 0.001$	0.928 $\pm 0.003$	-

Aus den gemessenen Impedanzspektren wurden auch die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellen mit Hilfe des TER-Modells ermittelt. Der spezifische Widerstand  $R_{Cl}$  ist dabei ein Maß für die Permeabilität der Zell-Zell-Kontakte für kleine Ionen. Hohe Widerstände korrelieren mit niedriger Permeabilität. Innerhalb der Zellcharge 1 (hellgrau) auf TWC-Elektroden führt die Goldschicht oberhalb der Membran zu einer Erhöhung von  $R_{Cl}$  gegenüber der Kontrollgruppe von  $(87.0 \pm 0.3) \Omega\text{cm}^2$  auf  $(106.3 \pm 6.5) \Omega\text{cm}^2$ . Die Goldschicht unterhalb der Membran verursacht dagegen keine signifikante Erhöhung ( $R_{Cl} = (90.7 \pm 4.9) \Omega\text{cm}^2$ ). Zellcharge 2 (grau) zeigt diese Tendenz bei einer Goldschicht auf der Membran deutlicher,  $R_{Cl}$  steigt von  $(127.9 \pm 2.9) \Omega\text{cm}^2$  auf  $(208.4 \pm 1.7) \Omega\text{cm}^2$ . Die Untersuchungen auf TW-Elektroden bestätigen den Effekt für Zellcharge 2, durch eine Erhöhung von  $R_{Cl} = (143.8 \pm 1.8) \Omega\text{cm}^2$  auf  $(216.4 \pm 7.2) \Omega\text{cm}^2$ . Innerhalb der ersten Zellcharge wird allerdings kein Einfluss auf den spezifischen Widerstand festgestellt. Der Wert steigt zwar zum Vergleichssubstrat ohne Beschichtung im Fall einer Goldschicht leicht an (von  $R_{Cl} = (73.2 \pm 1.8) \Omega\text{cm}^2$  auf  $(79.9 \pm 1.6) \Omega\text{cm}^2$ ), allerdings wird diese Tendenz zu höheren Werten auch fortgeführt, wenn kein direkter Kontakt der Zellen zur Goldschicht möglich ist. Für die Substrate mit einer Goldschicht unterhalb der Membran wird  $R_{Cl}$  zu  $(83.2 \pm 2.6) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt.



**Abb. 5.13:** Einfluss einer 100 nm dicken Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Filtermembran (TWC und TW) auf den Parameter  $R_{Ci}$  im Vergleich zu Membranen ohne Gold. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Zellchargen; 1: hellgrau, 2: grau. **A:** TWC, **B:** TW. Die Mittelwerte sind **Tab. 5.4** zu entnehmen ( $n = 3$ ,  $\pm$  SDM).

Für die spezifische Zellschichtkapazität  $C_{Ci}$  zeigen beide Zellchargen auf den unterschiedlichen Filtertypen ähnliche Tendenzen (**Abb. 5.14**). Für die Filter der ersten Zellcharge (hellgrau) wird jeweils ein signifikanter Abfall der Zellschichtkapazität für Zellen, die auf einer Goldschicht kultiviert wurden, gefunden. Für TWC fällt  $C_{Ci}$  von  $(2.17 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  auf  $(1.96 \pm 0.02) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , im Fall von TW von  $(2.29 \pm 0.01) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  auf  $(2.06 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Befindet sich die Goldschicht unterhalb der Membran, wird dagegen eine Zunahme der Kapazität auf  $(2.27 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TWC) und  $(2.51 \pm 0.01) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TW) gegenüber der Kontrollgruppe ohne Beschichtung detektiert. Durch Vergleich mit der zweiten Zellcharge (grau) kann eine generelle Tendenz zu einer kleineren Zellschichtkapazität bei Kontakt zu einer Goldschicht nicht bestätigt werden, es wird kein signifikanter Abfall der Kapazität gefunden. Der deutliche Kapazitätsunterschied zwischen Zellen auf Filtern ohne Gold aber unterschiedlicher Zellcharge zeigt, dass durch die natürliche Varianz der Zellpopulationen bereits breite Schwankungen auftreten können (TWC, Zellcharge 1:  $(2.17 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , Zellcharge 2:  $(1.84 \pm 0.01) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Diese Differenzen sind zum Teil deutlich größer als jene, die unter den Bedingungen eines direkten Kontaktes der Zellen zur Goldschicht auf der Filtermembran gezeigt werden können.



**Abb. 5.14:** Einfluss einer 100 nm dicken Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Filtermembran (TWC und TW) auf den Parameter  $C_{Ci}$  im Vergleich zu Membranen ohne Gold. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Zellchargen; 1: hellgrau, 2: grau. **A:** TWC, **B:** TW. Die Mittelwerte sind **Tab. 5.4** zu entnehmen ( $n = 3, \pm \text{SDM}$ ).

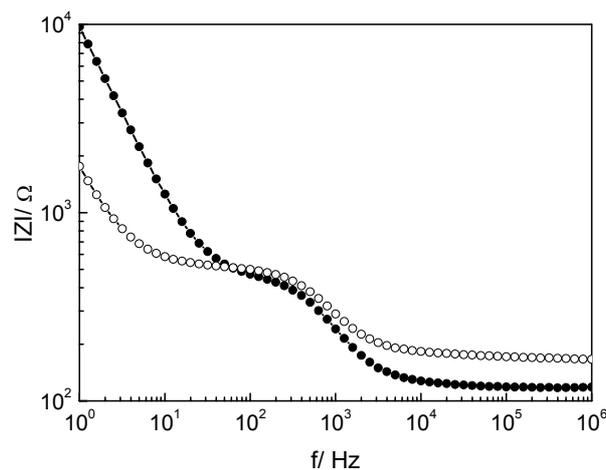
**Tab. 5.4:** Einfluss einer 100 nm dicken Goldschicht ober- bzw. unterhalb der Filtermembranen (TWC und TW) im Vergleich zu Membranen ohne Gold auf die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellschichten (charakterisiert durch die Parameter  $R_{Ci}$  und  $C_{Ci}$ ) ( $n = 3, \pm \text{SDM}$ ).

	Goldschicht	$R_{Ci}$ [ $\Omega\text{cm}^2$ ]			$C_{Ci}$ [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]		
		ohne	oberhalb	unterhalb	ohne	Oberhalb	unterhalb
TWC	Zellcharge 1	87.0 $\pm 0.3$	106.3 $\pm 6.5$	90.7 $\pm 4.9$	2.17 $\pm 0.03$	1.96 $\pm 0.02$	2.27 $\pm 0.05$
	Zellcharge 2	127.9 $\pm 2.9$	208.4 $\pm 1.7$	-	1.84 $\pm 0.01$	1.83 $\pm 0.03$	-
TW	Zellcharge 1	73.2 $\pm 1.8$	79.9 $\pm 1.6$	83.2 $\pm 2.6$	2.29 $\pm 0.01$	2.06 $\pm 0.03$	2.51 $\pm 0.01$
	Zellcharge 2	143.8 $\pm 1.8$	216.4 $\pm 7.2$	-	1.91 $\pm 0.01$	1.90 $\pm 0.03$	-

#### 5.2.4.2 Charakterisierung derselben Zellschicht durch Messungen im ECIS- und TER-Modus

Beide Messmodi werden dazu genutzt, adhärente Zellschichten elektrisch zu charakterisieren. Die einzelnen Parameter werden durch iterative Anpassung der jeweiligen Übertragungsfunktionen an die Messdaten bestimmt. Inwieweit die Aussagen beider Modi auf Ebene der einzelnen Parameter wie dem spezifischen parazellulären Widerstand und der spezifischen Zellschichtkapazität identisch sind, soll in diesem Kapitel untersucht werden. Konfluente MDCK II-Zelllayer wurden parallel im ECIS- sowie TER-Modus vermessen. In einem zeitlichen Abstand von ca. einer Minute kann dadurch dieselbe Zellschicht im gleichen experimentellen Aufbau untersucht werden. Daher können mögliche Unterschiede der Parameter direkt in Bezug zu dem jeweiligen Messmodus gesetzt werden. Abbildung 5.15 zeigt exem-

plarisch die Spektren für MDCK II-Zellen 24 h nach konfluenter Aussaat. Eine detaillierte Beschreibung der Impedanzspektren soll an dieser Stelle nicht vorgestellt werden, eine allgemeine Besprechung des Impedanzverhaltens eines konfluenten MDCK II-Zelllayers wurde in Kapitel 5.2.2 bzw. bereits unter Kapitel 4.2.3.2. für nanoporöse Silizium-Substrate vorgestellt. Für die Impedanzspektren im TER-Modus dominiert bei niedrigen Frequenzen ( $f < 2$  Hz) die Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt, bei hohen Frequenzen ( $f > 10^4$  Hz) der *bulk*-Widerstand. Dazwischen dominiert die konfluente Zellschicht das Impedanzspektrum, es kann zwischen dem spezifischen Widerstand der Zellschicht  $R_{Cl}$  und der spezifischen Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  differenziert werden.  $R_{Cl}$  dominiert in einem Frequenzbereich von  $10^1$  Hz- $3 \cdot 10^2$  Hz,  $C_{Cl}$  ist bestimmend zwischen  $3 \cdot 10^2$  Hz und  $3 \cdot 10^3$  Hz. Eine Differenzierung zwischen den Beiträgen der Zell-Zell-Kontakte und dem Zell-Substrat-Kontakt kann durch die Elektrodenanordnung im TER-Modus nicht geleistet werden. Vermutlich sind beide Beiträge im Parameter  $R_{Cl}$  vereint. Die einzelnen Parameter werden durch iterative Anpassung der jeweiligen Übertragungsfunktion an die Messdaten bestimmt. In diesem Teil soll ausschließlich ein Vergleich der ermittelten Parameter beider Messmodi durchgeführt werden.

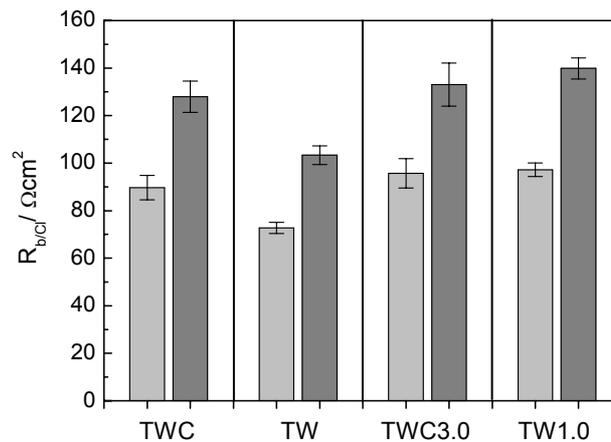


**Abb. 5.15:** Darstellung exemplarischer Impedanzspektren konfluenter MDCK II-Zellen auf einer porösen Goldelektrode, basierend auf einer TWC-Filtermembran, im ECIS-Modus (●) und TER-Modus (○).

Es wurden mehrere Messreihen durchgeführt, bei denen auf unterschiedlichen Filtermembranen jeweils derselbe Zelltyp untersucht wurde.

Abbildung 5.16 zeigt die für die verschiedenen goldbelegten Filtermembrantypen ermittelten Werte für  $R_b$  (ECIS, hellgrau) bzw.  $R_{Cl}$  (TER, grau). Für den parazellulären Widerstand  $R_b$  werden im ECIS-Modus Werte zwischen  $(73 \pm 2) \Omega\text{cm}^2$  (TW) und  $(97 \pm 3) \Omega\text{cm}^2$  (TW1.0) ermittelt. Während für TWC, TWC3.0 und TW1.0 keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, zeigt sich für TW eine Tendenz zu insgesamt niedrigeren  $R_b$ -Werten. Die Werte für den spezifischen parazellulären Widerstand  $R_{Cl}$  aus dem TER-Modus liegen deutlich über denen von  $R_b$  in einem Bereich zwischen  $(103 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$  (TW) und  $(140 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$  (TW1.0). Wie für  $R_b$  wird für Zellen auf porösen, goldbelegten Membranen, basierend auf TWC-,

TWC3.0- und TW1.0-Filtersubstraten, kein signifikanter Unterschied für den spezifischen parazellulären Widerstand gefunden, während für Zellen auf TW-Filtermembranen ein deutlich niedrigerer Wert bestimmt wird. Für die gezeigte Entwicklung auf TW-Filtermembranen haben die Untersuchungen in Kapitel 5.2.2 gezeigt, dass dies allerdings kein Trend ist, der über mehrere Untersuchungsreihen hinweg eindeutig auftritt. Eindeutig ist jedoch, dass unabhängig von der Porenstruktur der Elektrode bzw. der Membran ein höherer Wert für den parazellulären Widerstand im TER-Modus ( $R_{Cl}$ ) bestimmt wird als im ECIS-Modus ( $R_b$ ). Der Faktor dieser Höherbestimmung verhält sich dabei ebenfalls unabhängig von der Porenstruktur, und wird im Mittel zu 1.4 bestimmt.

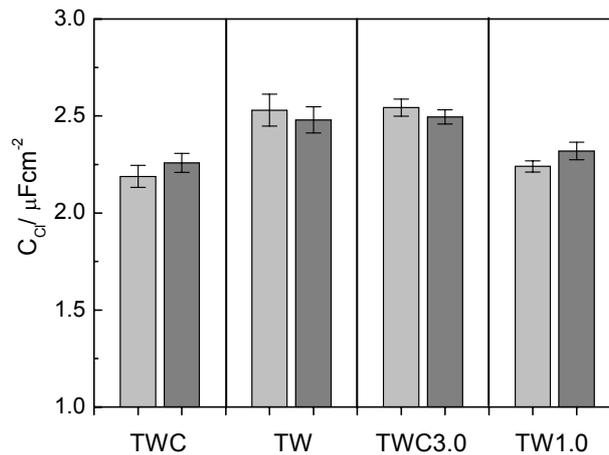


**Abb. 5.16:** Spezifischer parazellulärer Widerstand konfluenter MDCK II-Zellen bestimmt im ECIS-Modus ( $R_b$ , hellgrau) und TER-Modus ( $R_{Cl}$ , grau) auf unterschiedlichen Filtermembranen. Es wurden Zellen gleicher Passage kultiviert. TWC:  $R_b = (90 \pm 5) \Omega\text{cm}^2$ ,  $R_{Cl} = (128 \pm 7) \Omega\text{cm}^2$ ; TW:  $R_b = (73 \pm 2) \Omega\text{cm}^2$ ,  $R_{Cl} = (103 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$ ; TWC3.0:  $R_b = (96 \pm 6) \Omega\text{cm}^2$ ,  $R_{Cl} = (133 \pm 9) \Omega\text{cm}^2$ ; TW1.0:  $R_b = (97 \pm 3) \Omega\text{cm}^2$ ,  $R_{Cl} = (140 \pm 4) \Omega\text{cm}^2$ ; ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SDM).

Für den Zell-Substrat-Kontakt Parameter  $\alpha$  gibt es keine direkte Entsprechung im TER-Modell. Daher können hier lediglich die nach Anpassung der Übertragungsfunktion für das ECIS-Modell ermittelten Ergebnisse angegeben werden. Für Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf TWC-Filtermembranen, wird ein Wert von  $(16.9 \pm 0.3) \Omega^{0.5}\text{cm}$  ermittelt, für Zellen auf TW-Membranen ein Wert von  $(13.2 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$ , auf TWC3.0-Membranen von  $(15.3 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$  und für TW1.0-Membranen von  $(17.6 \pm 0.7) \Omega^{0.5}\text{cm}$  bestimmt. Es werden ähnliche Werte gefunden wie in Kapitel 5.2.2 für  $\alpha$  in unabhängigen Messungen bestimmt werden. Auch dort wurde für Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf TW-Filtermembranen, ein signifikant niedrigerer Wert gegenüber Zellen auf Elektroden aller anderen Filtertypen bestimmt.

Die spezifische Zellschichtkapazität wird in der betrachteten Messreihe in beiden Messmodi für Zellen auf TW- und TWC3.0-Filtermembranen signifikant höher bestimmt als für Zellen auf TWC und TW1.0-Filtermembranen. In Kapitel 5.2.2 wurde jedoch kein signifikanter Einfluss der Filtermembranen gefunden, der sich stabil über mehrere Messreihen zeigt. Das deutet an, dass die in dieser Messung an einer Zellpassage gefundenen Differenzen inner-

halb der natürlichen Streubreite nativer Zellen liegen (**Abb. 5.17**). Für Zellen auf einem Membrantyp wurden durch die Analyse der Daten aus unterschiedlichen Messmodi keine signifikant unterschiedlichen Werte für  $C_{Cl}$  ermittelt. Obwohl jeweils identische Zelllayer gemessen wurde, können nicht exakt die gleichen Werte bestimmt werden, was in erster Linie dadurch bedingt ist, dass die Anpassung der Übertragungsfunktionen durch eine interaktive Ausgleichsrechnung geleistet wird. Entscheidend ist jedoch, dass keine signifikanten Differenzen mit den unterschiedlichen Messmodi in Zusammenhang gebracht werden können.



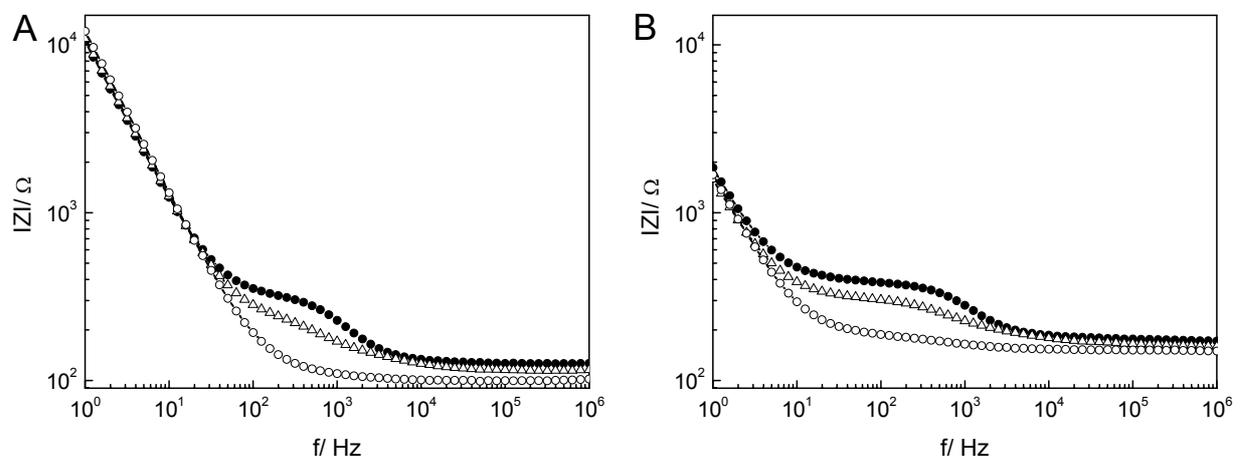
**Abb. 5.17:** Spezifische Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  bestimmt im ECIS-Modus (hellgrau) und TER-Modus (grau) konfluenter MDCK II-Zellen auf unterschiedlichen Filtermembranen. Es wurden Zellen gleicher Passage eingesetzt. TWC:  $C_{Cl,ECIS} = (2.19 \pm 0.06) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl,TER} = (2.26 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ; TW:  $C_{Cl,ECIS} = (2.53 \pm 0.08) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl,TER} = (2.48 \pm 0.07) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ; TWC3.0:  $C_{Cl,ECIS} = (2.54 \pm 0.04) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl,TER} = (2.50 \pm 0.04) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ; TW1.0:  $C_{Cl,ECIS} = (2.24 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl,TER} = (2.32 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ; ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SDM).

Zusammenfassend kann daher für den Vergleich der Parameter aus beiden Messmodi festgehalten werden, dass der spezifische parazelluläre Widerstand im TER-Messmodus deutlich höher bestimmt wird als im ECIS-Modus, während für die spezifische Zellschichtkapazität kein signifikanter Einfluss festgestellt wird. Der Zell-Substrat-Kontakt kann ausschließlich im ECIS-Messmodus charakterisiert werden. Möglicherweise leistet dieser Adhäsionskontakt den zusätzlichen Beitrag zum parazellulären Widerstand im TER-Modus.

#### 5.2.4.3 Charakterisierung derselben Zellschicht nach Vernetzung der zellulären Proteine durch Messungen im ECIS- und TER-Modus

Im vorangegangenen Kapitel wurde der spezifische parazelluläre Widerstand derselben Zellschicht im TER-Modus ( $R_{Cl}$ ) signifikant zu höheren Werten bestimmt als im ECIS-Modus ( $R_b$ ). Möglicherweise leistet der Adhäsionskontakt (Parameter  $\alpha$  im ECIS-Modell) einen Beitrag zu  $R_{Cl}$ . Unterhalb der Zellen wird der Strom gezwungen, einen ähnlich engen Spalt zu passieren wie im Zell-Zell-Spalt. Der Anteil des Adhäsionskontaktes am Wert für  $R_{Cl}$  sollte daher bei ansonsten gleichen Bedingungen umso höher sein, je niedriger der tatsächliche

Beitrag des Zell-Zell-Kontaktes ist (Lo et al., 1999). Die Vernetzung der zellulären Proteine durch Paraformaldehyd ist eine Möglichkeit, weitgehend selektiv die zelluläre Barriere zu schwächen, während der Zell-Substrat-Kontakt und die spezifische Zellschichtkapazität annähernd unbeeinflusst bleiben (Reiß, 2004). Daher wurden konfluente MDCK II-Zelllayer auf den unterschiedlichen, goldbelegten Filtermembranen zunächst analog zu den Untersuchungen des vorangehenden Kapitels charakterisiert und im Anschluss daran durch Vernetzung der zellulären Proteine fixiert. In diesem Zustand wurden erneut Messungen im ECIS- und TER-Modus durchgeführt. Abbildung 5.18 zeigt jeweils ein exemplarisches Impedanzspektrum im ECIS-Modus (A) und im TER-Modus (B) von nativen, fixierten und permeabilisierten MDCK II-Zellen auf einer Elektrode, basierend auf einer TWC-Filtermembran. Der Bereich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz ist bei nativen barrierebildenden Zellschichten im ECIS-Modus geprägt durch ein Plateau, dessen Höhe den Parameter  $R_b$ , also den spezifischen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte, widerspiegelt. Die chemische Fixierung führt zu einer Abnahme der Impedanz zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Hz. Es resultiert ein annähernd linearer Bereich, der sich durch die Steigung aber eindeutig von dem Spektrum einer leeren Elektrode unterscheidet. Nach Zugabe der Triton-Lösung wird kein Plateaubereich mehr im Spektrum detektiert, das Spektrum entspricht dem einer leeren Elektrode. Die permeabilisierten Zellkörper tragen nach der Permeabilisierung keinen Beitrag mehr zur Impedanz bei, da der Strom ungehindert durch die Elektrodenfläche ins Medium durchtreten kann. Die unterschiedlichen Impedanzwerte im hochfrequenten Bereich, der durch den *bulk*-Widerstand ( $R_{bulk}$ ) dominiert wird, resultiert aus leicht variierten Eintauchtiefen der Gegenelektrode in den Elektrolyten. Die Elektrode/Elektrolyt-Grenzfläche ( $f < 10$  Hz) verbleibt unbeeinflusst, sowohl bei chemischer Fixierung als auch nach der Permeabilisierung des Zelllayers. Grundsätzlich sind diese Beobachtungen auch für die Spektren im TER-Modus zutreffend. Die Fixierung führte zu einer Absenkung der Impedanz zwischen 10 und  $3 \cdot 10^3$  Hz, allerdings bleibt im Gegensatz zu dem Impedanzspektrum im ECIS-Modus die Struktur des Spektrums weitestgehend erhalten.

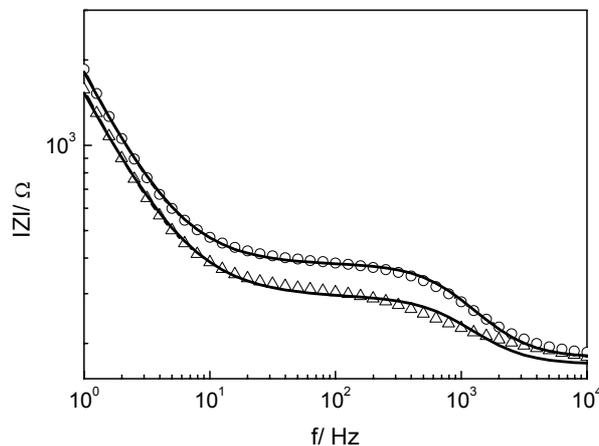


**Abb. 5.18:** Impedanzspektren konfluenter MDCK II-Zellen im ECIS-Modus (A) und im TER-Modus (B) unter nativen Bedingungen (●), nach Fixierung mit PFA (Δ, 4 % in PBS<sup>++</sup>) sowie nach anschließender

Behandlung mit einer Triton X-100-Lösung ( $\circ$ , 0.2 % in PBS<sup>++</sup>). Exemplarisch sind hier die Spektren für Zellen auf einer Elektrode, basierend auf einer TWC-Membran, abgebildet.

Die Untersuchungen wurden parallel auf unterschiedlichen Filtermembranen durchgeführt. Durch Anpassung der jeweiligen Übertragungsfunktionen an die Rohdaten, wurden die einzelnen Parameter bestimmt. Eine Auswertung für Spektren der mit Triton X-100 permeabilisierten Zellen ist durch die Modelle nicht möglich. Zunächst soll der Einfluss der Fixierung auf die Modellparameter quantifiziert werden, im Anschluss daran folgt jeweils, in Anlehnung zu den Untersuchungen des vorangegangenen Kapitels, der Vergleich der Parameter für dieselbe Zellschicht in den unterschiedlichen Messmodi.

Für die Auswertung der Spektren im TER-Modus ergaben sich allerdings Schwierigkeiten. Nach Fixierung der Zellen wurden die Abweichungen zwischen den experimentellen Daten ( $\Delta$ ) und dem Modell (Linie) größer als vor der Fixierung ( $\circ$ ), wodurch die Spektren an den Grenzbereich der Auswertbarkeit stoßen (**Abb. 5.19**).

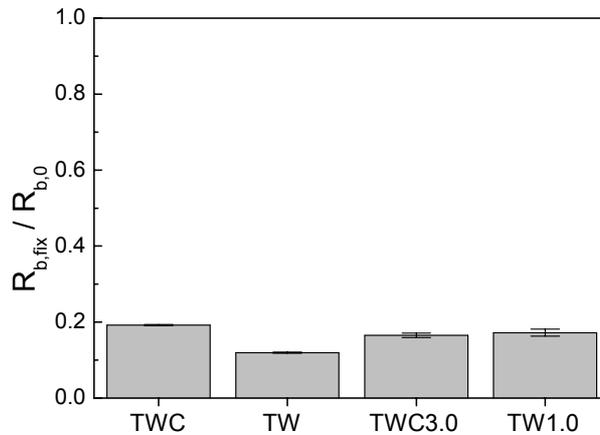


**Abb. 5.19:** Ausschnittsvergrößerung der in Abbildung 5.18 gezeigten Impedanzspektren nativer Zellen ( $\circ$ ) und Zellen nach PFA-Fixierung ( $\Delta$ ) gemessen im TER-Modus. Die durchgezogenen Linien repräsentieren das Ergebnis der Übertragungsfunktion. Parameter der Übertragungsfunktionen: ( $\circ$ ):  $R_{Cl} = 76.2 \Omega\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl} = 2.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $R_{bulk} = 178.3 \Omega$ ,  $A = 299 \mu\text{F}/\text{cm}^2\text{s}^{n-1}$ ,  $n = 0.88$ ; ( $\Delta$ ):  $R_{Cl} = 46.1 \Omega\text{cm}^2$ ,  $C_{Cl} = 3.69 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $R_{bulk} = 168.8 \Omega$ ,  $A = 373 \mu\text{F}/\text{cm}^2\text{s}^{n-1}$ ,  $n = 0.86$ .

### Einfluss auf den Parameter $R_b$ (ECIS-Modus)

Mit Hilfe des Verhältnisses zwischen den Werten für die fixierten und die jeweiligen nativen Zelllayer ( $R_{b,fix}/R_{b,o}$ ) kann der Einfluss der Fixierung auf die Zell-Zell-Kontakte normalisiert werden. Abbildung 5.20 zeigt eine Übersicht der relativen Werte für die verschiedenen porösen Elektroden. Unter allen Bedingungen wurde ein drastischer Rückgang von  $R_b$  nach der Fixierung detektiert. Für Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf TWC-Membranen, wurde ein Wert von  $R_b = (9.6 \pm 0.1) \Omega\text{cm}^2$ , auf TW-Membranen von  $R_b = (4.8 \pm 0.2) \Omega\text{cm}^2$ , auf TWC3.0-Membranen von  $R_b = (9.3 \pm 0.5) \Omega\text{cm}^2$  und auf TW1.0-Membranen ein Wert von  $R_b = (9.1 \pm 0.3) \Omega\text{cm}^2$  bestimmt. Daraus resultiert für TWC-Membranen eine Abnahme des spezifischen Widerstandes auf 19 %, für TW auf 12 %, für TWC3.0 auf 17 % und für TW1.0 auf 17 % des Ausgangswertes. Dieses Ergebnis deckt sich mit den oben beschriebenen

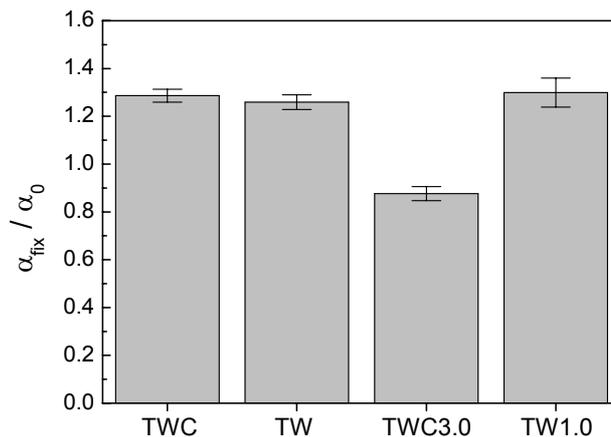
Veränderungen der Impedanzspektren, die einen Abfall der Impedanz in dem für  $R_b$  charakteristischen Frequenzfenster abbilden (**Abb. 5.18**).



**Abb. 5.20:** Normierte parazelluläre Widerstände ( $R_{b,fix} / R_{b,0}$ ) von MDCK II-Zellen.  $R_{b,0}$  beschreibt den Widerstand der nativen Zellen,  $R_{b,fix}$  den nach der Fixierung desselben Zelllayers mit Paraformaldehyd. Die Messungen der MDCK II-Zellen auf den unterschiedlichen porösen Elektroden wurden parallel durchgeführt. TWC: (0.192 ± 0.002), TW: (0.120 ± 0.001), TWC3.0 (0.165 ± 0.006), TW1.0 (0.172 ± 0.009); (n = 3, außer TW: n = 2; Mittelwert ± SDM).

#### Einfluss auf den Zell-Substrat-Parameter $\alpha$ (ECIS-Modus)

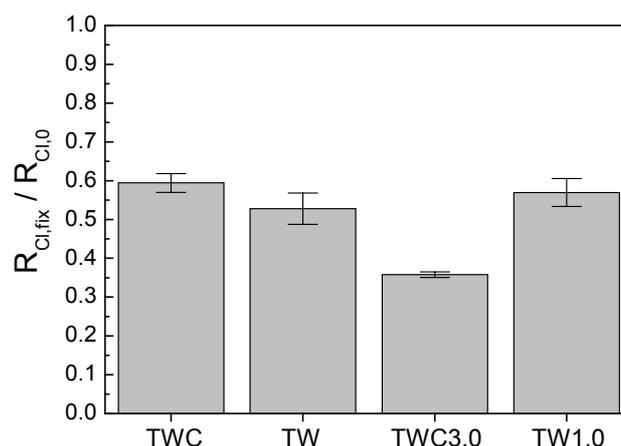
In Abbildung 5.21 ist das Verhältnis ( $\alpha_{fix} / \alpha_0$ ) für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  dargestellt. Die Fixierung zeigt für TWC, TW und TW1.0 eine Erhöhung zwischen 26 und 30 %, wohingegen für TWC3.0 eine Abnahme um 13 % detektiert wurde. Obwohl sich kein einheitliches Bild zeigt, kann dennoch grundsätzlich beobachtet werden, dass  $\alpha$  durch die chemische Vernetzung der zellulären Proteine in einem deutlich geringeren Maße beeinflusst wird, als dies für  $R_b$  gezeigt werden kann. Im Vergleich dazu verbleibt  $\alpha$  relativ konstant.



**Abb. 5.21:** Normierter Zell-Substrat-Parameter ( $\alpha_{fix} / \alpha_0$ ) von MDCK II-Zellen.  $\alpha_0$  beschreibt den Zell-Substrat-Kontakt der nativen Zellen,  $\alpha_{fix}$  den nach der Fixierung desselben Zelllayers mit Paraformaldehyd. Die Messungen der MDCK II-Zellen auf den unterschiedlichen porösen Elektroden wurden parallel durchgeführt. TWC: (1.29 ± 0.03), TW: (1.26 ± 0.03), TWC3.0 (0.87 ± 0.03), TW1.0 (1.30 ± 0.06); (n = 3, außer TW: n = 2; Mittelwert ± SDM).

### Einfluss auf den Parameter $R_{Cl}$ (TER-Modus)

Analog zur Auswertung der Daten aus den Messungen im ECIS-Modus wurde das Verhältnis der spezifischen Widerstände für die fixierten und nativen Zellschichten ( $R_{Cl,fix}/R_{Cl,0}$ ) als Maß für die Veränderung der Barrierefunktion herangezogen. Abbildung 5.22 zeigt die Übersicht für die unterschiedlichen porösen Elektroden. Für alle Bedingungen wird nach der Fixierung ein Rückgang des Parameters  $R_{Cl}$  beobachtet. Die Mittelwerte für den Parameter  $R_{Cl}$  nach Fixierung betragen: TWC:  $R_b = (44 \pm 2) \Omega\text{cm}^2$ , TW:  $R_b = (33 \pm 2) \Omega\text{cm}^2$ , TWC3.0:  $R_b = (19 \pm 1) \Omega\text{cm}^2$  und TW1.0:  $R_b = (44 \pm 2) \Omega\text{cm}^2$ . Der parazelluläre Widerstand fällt für TWC auf 59 %, für TW auf 53 % und für TW1.0 auf 57 % des Wertes der unbehandelten Zellschichten. Innerhalb dieser Gruppe werden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Für TWC3.0 nimmt der Widerstand auf 36 % des Ausgangswertes ab. Der für alle Bedingungen beobachtete Rückgang für  $R_{Cl}$  steht in Übereinstimmung mit dem Verlauf der Impedanzspektren (Abb. 5.18), die eine Absenkung der Impedanzwerte in dem durch  $R_{Cl}$  dominierten Frequenzfenster zwischen 10 und  $3 \cdot 10^3$  Hz zeigen. Grundsätzlich spiegeln sich die Tendenzen, die für  $R_b$  gezeigt werden konnten, auch in der Entwicklung von  $R_{Cl}$  wider. Im ECIS-Modus wurde allerdings eine stärkere Abnahme der parazellulären Widerstände nach der Fixierung der Proteine durch Paraformaldehyd beobachtet.  $R_{Cl}$  wird gegenüber  $R_b$  mindestens um den Faktor 3.1 (TWC3.0) höher bestimmt, im Fall von Zellen auf porösen Oberflächen, basierend auf TW-Membranen, wird sogar ein 6.8-fach höherer Wert erhalten. Wie bereits in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben, wird vermutet, dass der Parameter  $R_{Cl}$  neben den Beiträgen der Zell-Zell-Kontakte durch Beiträge aus dem Zell-Substrat-Kontakt beeinflusst wird.

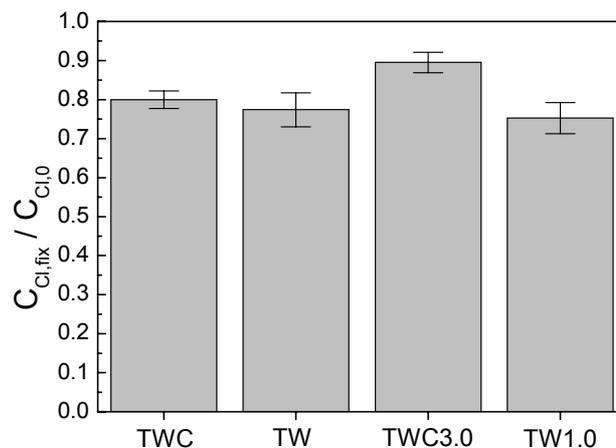


**Abb. 5.22:** Normierter parazellulärer Widerstand ( $R_{Cl,fix}/R_{Cl,0}$ ) von MDCK II-Zellen.  $R_{Cl,0}$  beschreibt den Widerstand der nativen Zellen,  $R_{Cl,fix}$  den nach der Fixierung desselben Zellschichten mit Paraformaldehyd. Die Messungen der MDCK II-Zellen auf den unterschiedlichen porösen Elektroden wurden parallel durchgeführt. TWC:  $0.59 \pm 0.02$ , TW:  $0.53 \pm 0.04$ , TWC3.0:  $0.36 \pm 0.01$ , TW1.0:  $0.57 \pm 0.04$ ; (n = 3, außer TW: n = 2; Mittelwert ± SDM).

### Einfluss auf die Kapazität der Zellmembran $C_{Cl}$ (ECIS-Modus)

Obwohl die Zellmembran zuallererst mit Lipiden in Verbindung gebracht wird, besitzt sie einen erheblichen Proteingehalt von etwa 50 %. *Guidotti* (1972) hat für Leberzellen aus der

Maus einen Proteingehalt von 44 % festgestellt, für HeLa-Zellen einen Anteil von 60 %. Daher ist ein Einfluss auf den Parameter der spezifischen Zellschichtkapazität durch die chemische Vernetzung der zellulären Proteine möglich. Abbildung 5.23 zeigt die relative Änderung der Zellschichtkapazität nach der Fixierung von MDCK II-Zellschichten mit PFA. Auf allen porösen Elektroden resultiert aus der Fixierung eine Absenkung der spezifischen Zellschichtkapazität der Zellschicht. Für TWC, TW und TW1.0 ist der Rückgang ähnlich und liegt bei etwa 20 - 25 %. TWC3.0 zeigt einen signifikant geringeren Rückgang um etwa 10 %. Die normierten Werte lassen auf einen Einfluss des Fixierungsreagenzes auf die Gesamtfläche der Zellmembran schließen. Die Absolutwerte für die Zellmembranen nach der Fixierung liegen aber nach wie vor in einer Größenordnung, welche auch für native Zellen beobachtet werden. So schwanken die Werte für TWC vor der Fixierung zwischen  $1.98 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $2.30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , nach Fixierung resultieren Werte im Bereich zwischen  $1.67 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $1.81 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Da unter nativen Bedingungen ein großer Teil der Flächenvergrößerung gegenüber einer ideal glatten Membran aus dem Beitrag der Mikrovilli der apikalen Membran stammen und diese durch ein Aktingerüst stabilisiert werden, ist es möglich, dass ein Teil dieser Membranauffaltungen beeinträchtigt wurde. Die Kapazität der Zellmembran wird also durch die Vernetzung der Proteine verringert, bricht jedoch nicht dramatisch zusammen.



**Abb. 5.23:** Normierte spezifische Zellschichtkapazität ( $C_{C_i,fix} / C_{C_i,0}$ ) von MDCK II-Zellen.  $C_{C_i,0}$  beschreibt die Kapazität der nativen Zellen,  $C_{C_i,fix}$  den nach der Fixierung desselben Zelllayers mit Paraformaldehyd. Die Messungen der MDCK II-Zellen auf den unterschiedlichen porösen Elektroden wurden parallel durchgeführt. TWC:  $0.80 \pm 0.02$ , TW:  $0.77 \pm 0.04$ , TWC3.0:  $0.90 \pm 0.03$ , TW1.0:  $0.75 \pm 0.04$ ; (n = 3, außer TW: n = 2; Mittelwert  $\pm$  SDM).

### Einfluss auf die Kapazität der Zellmembran $C_{C_i}$ (TER-Modus)

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels angesprochen wurde, führt die Anpassung der Übertragungsfunktion im Fall der TER-Messung nicht für alle Bereiche des Spektrums zu einer zufriedenstellenden Übereinstimmung. Insbesondere für den Bereich, der auf charakteristische Weise durch den Beitrag der spezifischen Zellschichtkapazität geprägt wird ( $3 \cdot 10^2 - 2 \cdot 10^3$  Hz), werden starke Abweichungen erhalten. Während die Untersuchungen in Kapitel 5.2.4.2 zeigen konnten, dass für den Parameter der spezifischen Zellschichtkapazität der-

selben Zellschicht sehr ähnliche Werte in beiden Messmodi erhalten werden, unterscheiden sich für den speziellen Fall nach der Fixierung die Werte für  $C_{Cl}$  im TER-Modus deutlich von denen im ECIS-Modus. So wird für Zellen auf porösen TWC-Elektroden im ECIS-Modus ein Wert von  $C_{Cl} = (1.74 \pm 0.04) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt, während im TER-Modus  $C_{Cl} = (3.5 \pm 0.1) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  erhalten wird. Diese deutliche Differenz setzt sich für Zellen auf den weiteren porösen Elektroden fort. Daher wird auf den Vergleich zum Einfluss der Messmodi fixierter Zellen im Fall der spezifischen Zellschichtkapazitäten verzichtet.

### 5.3 Anwendungen für ECIS-Messungen auf porösen Goldelektroden

Tierische Zellen können auf vielfältige Weise mit ihrer Umwelt interagieren. Auf viele dieser Reize reagieren die Zellen durch Veränderung ihrer Zellmorphologie. Dies lässt sich mit Hilfe der ECIS-Technik mit hoher Zeitauflösung und Sensitivität erfassen. Bisher war die Anwendung der ECIS-Methode allerdings auf planare impermeable Elektroden begrenzt. Die Erweiterung um poröse und permeable Oberflächen ermöglicht die Untersuchung zellulärer Systeme, die zur Differenzierung auf ein permeables Substrat angewiesen sind. In einem anderen Beispiel wird der basolaterale Zellzugang dazu genutzt, die Zellen gezielt von der basolateralen Seite zu stimulieren, und den Effekt zeitaufgelöst zu verfolgen. Des Weiteren soll das System dazu dienen, die spezifische Leitfähigkeit im Zell-Substrat-Kontakt experimentell zu modulieren.

#### 5.3.1 Impedanzspektroskopische Untersuchungen zur Zelldifferenzierung von *Plexus Chorioideus* auf porösen Goldelektroden

Die in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu spezifischen Markerproteinen (Kapitel 4.2.2) haben für die Zellen des porcinen *Plexus chorioideus* bestätigt, dass zwei Voraussetzungen zur vollständigen Differenzierung erfüllt sein müssen. Die Zellen benötigen einerseits ein permeables Kultursubstrat, und daneben wird, um die Proliferationsphase zu beenden und die Differenzierung zu induzieren, dem Kulturmedium der Serumanteil entzogen. Dadurch ist in allen bisherigen Studien die impedanzspektroskopische Untersuchung auf Messungen im TER-Modus beschränkt worden, wodurch allerdings Aussagen bezüglich des Zell-Substrat-Kontaktes nicht möglich sind. Alternativ mussten Kompromisse bezüglich des Differenzierungszustandes eingegangen werden, um ECIS-Messungen durchführen zu können (Wegener et al., 2000).

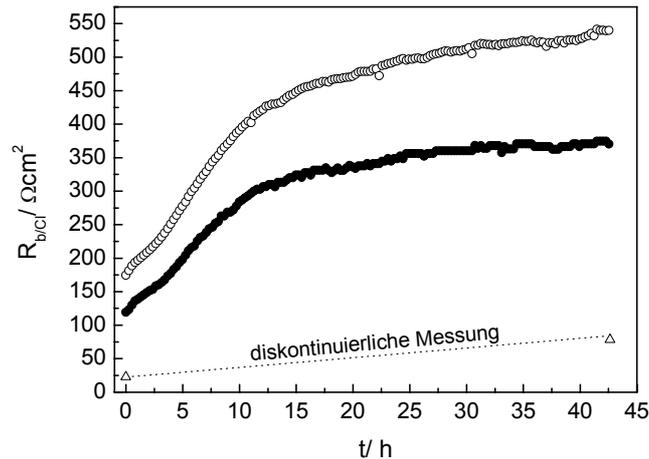
Um mögliche Unterschiede der Zelldifferenzierung des *Plexus*-Epithels auf einem permeablen Substrat (TW) im Vergleich zu einem planaren Substrat elektrisch zu untersuchen, wur-

den zunächst beide Substrate bis zum Tag 9 der Kultur völlig gleich behandelt. Nach Umstellung auf serumfreies Medium wurden Impedanzspektren der Zellen auf dem planaren Substrat aufgenommen. Hier konnte aufgrund der Messplatzausstattung keine kontinuierliche Messung durchgeführt werden, der Kulturstatus wurde darum anhand von Einzelmessungen dokumentiert.

Beginnend etwa zwei Stunden nach Umstellung auf serumfreies Medium, wurden die Zellen auf der porösen Elektrode, basierend auf einer TW-Filtermembran, parallel im ECIS- und TER-Modus kontinuierlich untersucht. Die Messungen im TER-Modus ermöglichen einen direkten Vergleich mit einer Kontrollgruppe von Zellen auf permeablen Filtern, ohne Goldschicht, die bis zum Kulturtag 14 unter idealen Bedingungen kultiviert wurden. Für diese Zellen wurden routinemäßig Impedanzspektren im TER-Modus aufgenommen. Alle erhaltenen Impedanzspektren wurden im Anschluss an die Messungen mit Hilfe der jeweiligen Modelle ausgewertet. Die Untersuchungen wurden für einen Mediumwechsel nach 43 h unterbrochen und im Anschluss daran fortgesetzt. Für das erste Messfenster werden exemplarisch die Analysen für die einzelnen Modellparameter dargestellt. Grundsätzlich muss bei allen hier beschriebenen Ergebnissen berücksichtigt werden, dass es aus zeitlichen Gründen nicht möglich war, die Effekte an mehreren Zellschichten zu untersuchen.

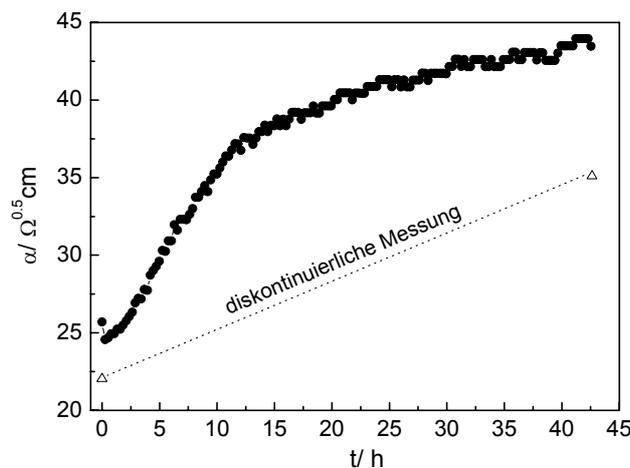
### Entzug des Serums aus dem Kulturmedium

Abbildung 5.24 zeigt die Entwicklung der Parameter  $R_b$  (●) und  $R_{Cl}$  (○) der Zellen auf porösen Goldelektroden, und dokumentiert die Veränderungen für den spezifischen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte. Dass  $R_{Cl}$  zwar durch den Zell-Zell-Kontakt dominiert wird, darüber hinaus aber weitere Faktoren wie der Zell-Substrat-Kontakt Einfluss nehmen können, wurde in Kapitel 5.2.4.2 untersucht und soll hier nicht im Fokus stehen. Für beide Graphen gilt, dass der Widerstand ansteigt. Innerhalb von 43 h steigt  $R_b$ , von  $118 \Omega\text{cm}^2$  um 320 % auf  $379 \Omega\text{cm}^2$ . Im gleichen Zeitraum wird für  $R_{Cl}$  eine Erhöhung um 325 % beobachtet, die aus einer Steigerung von  $175 \Omega\text{cm}^2$  auf  $540 \Omega\text{cm}^2$  resultiert. Auf planarem Substrat liegt der Ausgangswert bei  $23 \Omega\text{cm}^2$  ( $t = 0$  h), nach 43 h wird  $R_b$  zu  $78 \Omega\text{cm}^2$  bestimmt. Auch hier wird also eine deutliche Steigerung um 295 % beobachtet, wobei die Absolutwerte deutlich unter denen auf einer porösen Elektrode liegen und über die zeitliche Entwicklung des Wertes keine Aussage gemacht werden kann. Die Zunahme der spezifischen Widerstände gilt neben der Zunahme der Zellschichtkapazität als Merkmal für den Differenzierungsprozess der Epithelzellen des *Plexus chorioideus* (Hakvoort et al, 1998).



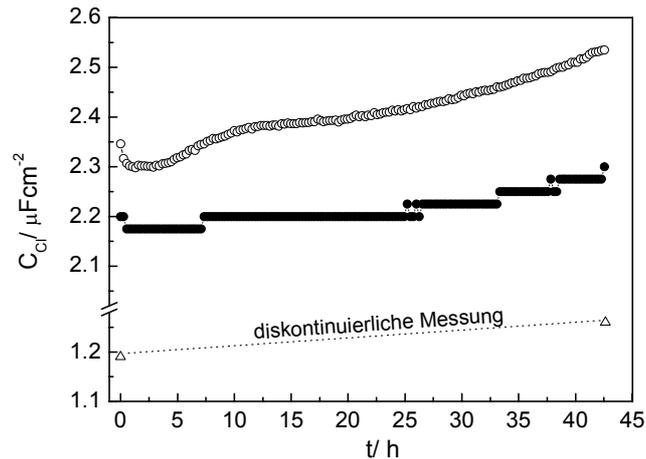
**Abb. 5.24:** Exemplarischer Verlauf der spezifischen Widerstände  $R_b$  bzw.  $R_{Cj}$  für Zellen des porcinen *Plexus chorioideus* auf einer porösen Elektrode, basierend auf einer TW-Filtermembran. ●: ECIS-Modus, ○: TER-Modus. Δ: Zellen auf einem planarem Vergleichssubstrat (diskontinuierliche Messung, (·····): Hilfslinie). Messbeginn: Kulturtag 9, 2 h nach Umstellung auf serumfreies Medium.  $R_{b(●)}(t = 0 \text{ h})$ :  $118 \Omega\text{cm}^2$ , ( $t = 43 \text{ h}$ ):  $379 \Omega\text{cm}^2$ ;  $R_{Cj(○)}(t = 0 \text{ h})$ :  $175 \Omega\text{cm}^2$ , ( $t = 43 \text{ h}$ ):  $540 \Omega\text{cm}^2$ ;  $R_{b(\Delta)}(t = 0 \text{ h})$ :  $23 \Omega\text{cm}^2$ , ( $t = 43 \text{ h}$ ):  $78 \Omega\text{cm}^2$ .

Für den Verlauf von  $\alpha$  (**Abb. 5.25**) zeigen die Zellen auf der porösen Elektrode (●) einen Anstieg von  $25.7 \Omega^{0.5}\text{cm}$  auf  $43.5 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (+ 41 %), auf planarer von  $22.0 \Omega^{0.5}\text{cm}$  auf  $35.1 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (+ 37 %). Damit liegen sowohl die Absolutwerte als auch der Anstieg in einer ähnlichen Größenordnung. Inwiefern die Entwicklung für den Adhäsionskontakt auf beiden Substraten parallel verläuft, kann aufgrund der diskontinuierlichen Messung nicht bestimmt werden. Für den Adhäsionskontakt gilt, dass sowohl auf der porösen Elektrode als auch auf der planaren eine Entwicklung zu höheren Werten induziert werden kann. Im Gegensatz zum spezifischen Widerstand  $R_b$  differieren die Absolutwerte weniger stark. Die Messungen im TER-Modus ermöglichen keine Aussage über den Zell-Substrat-Kontakt.



**Abb. 5.25:** Exemplarischer Verlauf des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  für Zellen des porcinen *Plexus chorioideus*, ●: auf einer porösen Elektrode, basierend auf einer TW-Filtermembran. Δ: Zellen auf einem planaren Vergleichssubstrat (diskontinuierliche Messung, (·····): Hilfslinie). Messbeginn: Kulturtag 9, 2 h nach Umstellung auf serumfreies Medium.  $\alpha_{(●)}(t = 0 \text{ h})$ :  $25.7 \Omega^{0.5}\text{cm}$ , ( $t = 43 \text{ h}$ ):  $43.5 \Omega^{0.5}\text{cm}$ ;  $\alpha_{(\Delta)}(t = 0 \text{ h})$ :  $22.0 \Omega^{0.5}\text{cm}$ , ( $t = 43 \text{ h}$ ):  $35.1 \Omega^{0.5}\text{cm}$ .

Für die spezifische Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  (**Abb. 5.26**) der Zellschicht auf der porösen Elektrode wurden zu Beginn im ECIS- und TER-Modus leicht erhöhte Werte gefunden, die innerhalb von 1 h auf ein zunächst konstantes Niveau von  $2.18 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (ECIS-Modus (●)) und  $2.30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TER-Modus (○)) absanken. Für  $C_{Cl}$  im ECIS-Modus wurde eine Steigerung von 6 % auf  $2.30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  nach 43 h beobachtet, für  $C_{Cl}$  im TER-Modus ein Wert von  $2.54 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (+ 10%) bestimmt. Auf dem planaren Vergleichssubstrat wurden deutlich niedrigere Werte von  $1.19 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  mit einer Zunahme auf  $1.26 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  nach 43 h ermittelt (+ 6 %).



**Abb. 5.26:** Exemplarischer Verlauf der spezifische Kapazität der Zellmembran  $C_{Cl}$  für Zellen des porösen *Plexus chorioideus* auf einer porösen Elektrode, basierend auf einer TW-Filtermembran. ●: ECIS-Modus, ○: TER-Modus. Δ: Zellen auf einem planaren Vergleichssubstrat (diskontinuierliche Messung, (·····): Hilfslinie). Messbeginn: Kulturtag 9, 2 h nach Umstellung auf serumfreies Medium.

Für den Mediumspiegel im apikalen Kompartiment des Filtersubstrates konnte ein Anstieg der Mediumssäule beobachtet werden, bis sich eine Flüssigkeitskuppel ausbildet und im Anschluss über den gesamten Messzeitraum stabil bleibt. Die Zellen pumpen gegen den hydrostatischen Druck der Mediumssäule Flüssigkeit nach oben. Diese Reaktion der Zellen entspricht der physiologischen Sekretion des Liquors im Hirn, und ist kennzeichnend für ausdifferenzierte, primärkultivierte Zellen des *Plexus chorioideus*.

Die Messungen wurden nach 43 h unterbrochen, um den routinemäßigen Mediumwechsel am Kulturtag 11 durchzuführen. Im Anschluss daran wurde die impedanzspektroskopische Charakterisierung der Zellschichten fortgesetzt. Nach einer anfänglichen Abnahme für die einzelnen Parameter, die als Reaktion auf das frische, unkonditionierte Medium angesehen wird, sind alle Werte innerhalb von 16 h auf den Ausgangswert am Ende des ersten Beobachtungszeitraumes zurückgekehrt und bilden eine Plateauphase. Einzig für die spezifische Zellschichtkapazität  $C_{Cl}$  wird zu diesem Zeitpunkt noch ein kontinuierlicher Anstieg beobachtet. Am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 65 h (Kulturtag 14) werden Werte für die Zellschicht auf der porösen Elektrode von  $C_{Cl} = 2.51 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (ECIS-Modus) bzw.  $2.77 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TER-Modus) gemessen. Für Zellen derselben Präparation auf handelsüblichen Filtersubstraten konnten parallel sehr ähnliche Kapazitätswerte von  $C_{Cl} (2.69 \pm 0.03) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt

werden<sup>11</sup>. Auf planarem Substrat wird nach gleicher Kulturzeit lediglich ein Maximalwert von  $1.28 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  erreicht. Für die genannten Vergleichssubstrate auf handelsüblichen Filtersubstraten wurde am Kulturtag 14 durch impedanzspektroskopische Messungen im TER-Modus ein Wert für  $R_{Cl}$  von  $(1200 \pm 29) \Omega\text{cm}^2$  ausgewertet<sup>11</sup>. Dieser steht in guter Übereinstimmung zu den Angaben von *Hakvoort et al.* (1998). Zum gleichen Zeitpunkt ist die Entwicklung für  $R_b$ ,  $R_{Cl}$  und  $\alpha$  der in dieser Arbeit untersuchten Zellschichten allerdings wieder rückläufig. Die Plateauphase, in der diese Parameter konstant bleiben, dauert etwa 20 h an (Kulturtag 12) danach sinken die Werte kontinuierlich ab. Am Kulturtag 14 wird für den spezifischen Widerstand der Zell-Zell-Kontakte im ECIS-Modus ein Wert für  $R_b = 255 \Omega\text{cm}^2$ , im TER-Modus  $R_{Cl} = 371 \Omega\text{cm}^2$  bestimmt. Die Werte liegen also deutlich unterhalb des Wertes der Vergleichsgruppe. Der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  erreicht am Ende der Messzeit einen Wert von  $\alpha = 35.5 \Omega^{0.5}\text{cm}$ . Nach wie vor bleibt die Flüssigkeitskuppel als äußeres Zeichen der Differenzierung auf dem apikalen Kompartiment bestehen.

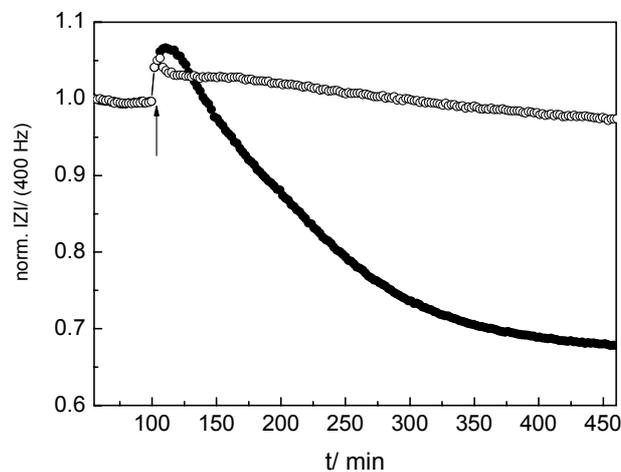
### 5.3.2 Untersuchungen zur apikalen bzw. basolateralen Zugabe einer Protease am Beispiel von MDCK II-Zellen

Die Protease Collagenase ist ein Enzym, das selektiv Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) insbesondere die Collagene abbaut. Die ECM ist eine immobilisierte Schicht, die von den Zellen auf dem Substrat gebildet wird und im wesentlichen aus zwei Komponenten besteht: einer gelartigen Grundsubstanz, die hauptsächlich aus Hyaluronsäure und Proteoglykanen besteht, sowie verschiedenen Proteinen, die die spezifische Anbindung der Zellen an das Substrat vermitteln. Die spezifischen Rezeptoren der Zellen sind die Integrine, die intrazellulär mit dem Cytoskelett der Zellen verknüpft sind und so eine stabilisierende Verankerung der Zellen mit dem Substrat bewirken. Die folgende Untersuchung sollte zeigen, ob die Zugabe von Collagenase in das Medium eines konfluenten MDCK II-Zellschichten Veränderungen der passiven elektrischen Eigenschaften hervorruft. Im Fokus steht, ob aus der apikalen oder basolateralen Zugabe des Enzyms ein Unterschied entsteht. Da das Substrat der Collagenase im Adhäsionskontakt lokalisiert ist, bietet die Untersuchung im ECIS-Modus die Möglichkeit, genau diesen Bereich elektrisch zu charakterisieren. Dies ist im TER-Modus nicht möglich. Es werden konfluente MDCK II-Zellschichten auf porösen Elektroden (basierend auf TWC-Filtermembranen) kontinuierlich im ECIS-Modus untersucht. Nach einer Äquilibrierungsphase von etwa 100 min wurde die Collagenase entweder in das apikale oder in das basolaterale Kompartiment gegeben. Abbildung 5.27 zeigt den Verlauf der normierten Impedanz bei 400 Hz. Ausgangswert zur Normierung war im Fall der apikalen Zugabe  $378 \Omega$

---

<sup>11</sup> Die Daten wurden mir freundlicherweise von Frau Magdalena von Wedel-Parlow zur Verfügung gestellt.

(Elektrodenfläche:  $A = 0.37 \text{ cm}^2$ ), im Fall der basolateralen Zugabe  $418 \Omega$  ( $A = 0.34 \text{ cm}^2$ ). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe der Collagenase in das Kulturmedium. Die Impedanz steigt bei beiden Bedingungen sprunghaft um etwa 5 - 7 % an, was wahrscheinlich durch eine leichte Abkühlung des Messaufbaus bei der Zugabe verursacht wird. Im Anschluss daran kehrt bei apikaler Zugabe ( $\circ$ ) die Impedanz langsam zu ihrem Ausgangswert zurück, es wird kein signifikanter Abfall der Impedanz bei 400 Hz beobachtet. Bei basolateraler Zugabe ( $\bullet$ ) dagegen fällt die Impedanz kontinuierlich auf unter 70 % des Ausgangswertes ab. Die apikale bzw. basolaterale Zugabe verursacht also unterschiedliche Effekte. Während bei apikaler Zugabe keine Veränderung detektiert wird, die auf die proteolytische Aktivität des Enzyms zurückzuführen ist, gelangt die Collagenase bei basolateraler Zugabe durch die poröse Elektrode hindurch an die Komponenten der ECM, deren Abbau eine Abnahme der Impedanz verursacht.



**Abb. 5.27:** Verlauf der normierten Impedanz bei 400 Hz für MDCK II-Zellen auf poröser Goldelektrode nach apikaler ( $\circ$ ) bzw. basolateraler ( $\bullet$ ) Zugabe von Collagenase (1 mg/ml). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe. Ausgangswerte zur Normierung: apikal:  $378 \Omega$  (Elektrodenfläche:  $A = 0.37 \text{ cm}^2$ ), basolateral:  $418 \Omega$  ( $A = 0.34 \text{ cm}^2$ ).

### 5.3.3 Modulation des spezifischen Elektrolytwiderstandes $\rho_{sub}$ im Adhäsionskontakt

Die Zellmembran ist für die Zelle nicht nur eine Barriere, die den Übertritt von Stoffen regelt und limitiert. Durch den gezielten Transport von Ionen werden zum Beispiel Membranpotentiale aufgebaut. Ein konstanter spezifischer Widerstand im Interzellularraum ist daher integrale Voraussetzung für den Aufbau von elektrischen Gradienten über die Zellmembran. Überträgt man diese Situation auf die *in vitro*-Kultivierung von Grenzflächengeweben, so entsteht unterhalb der Zellen im Zell-Substrat-Kontakt ein Kompartiment mit einem spezifischen Elektrolytwiderstand ( $\rho_{sub}$ ), das sich von den Bedingungen im äußeren, apikalen Kompartiment möglicherweise unterscheidet. Auch die zelltypspezifische Ausgestaltung des Zell-Substrat-Kontaktes durch die ECM sowie die Integrine drückt sich möglicher Weise in  $\rho_{sub}$  aus. Im umgekehrten Sinne wäre  $\rho_{sub}$  somit ein sensibler Parameter für Veränderungen der

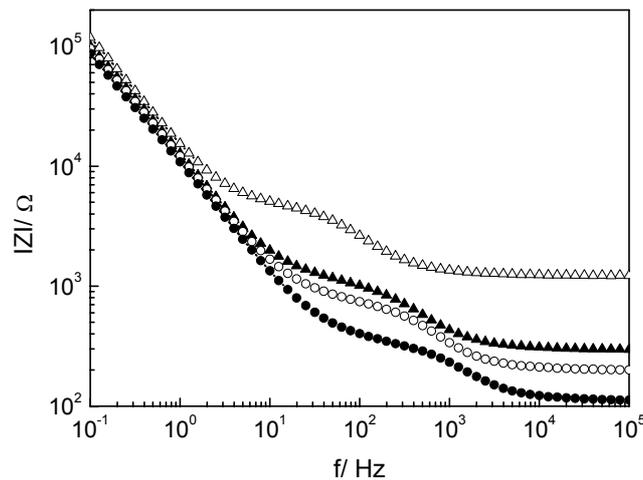
Interaktionen zwischen Zelle und Substrat. Trotzdem ist wenig über den spezifischen Elektrolytwiderstand bekannt, da die direkte Messung nicht oder nur mit großem experimentellem Aufwand möglich ist. Aus Mangel an Daten wurde daher häufig davon ausgegangen, dass der spezifische Elektrolytwiderstand im Spalt dem der *bulk*-Phase entspricht. Gleixner und Formherz (2006) belegen diese Annahme an adhärennten Einzelzellen. Die experimentelle Bestimmung des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  ermöglicht über die Definition einen Zugang zum spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt:  $\alpha = (\rho_{sub}/d)^{0.5} \cdot r_c$ . Allerdings setzt das voraus, dass sowohl der Zell-Substrat-Abstand  $d$ , als auch der Zellradius  $r_c$  bekannt bzw. konstant sind.

Durch die Verwendung der porösen Goldelektroden ist es möglich, die Leitfähigkeit sowohl im apikalen als auch im basolateralen Kompartiment gezielt und unabhängig voneinander zu verändern. Im Unterschied zu planaren Elektroden kann durch die Poren hindurch ein Austausch mit dem Adhäsionskontakt erfolgen, der nicht von der Diffusion über die Zell-Zell-Kontakte abhängig ist. Daher soll durch gezielte Modulation der Leitfähigkeit im Medium untersucht werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Widerstand des Mediums  $\rho_{bulk}$  und dem spezifischen Elektrolytwiderstand  $\rho_{sub}$  im Zell-Substrat-Kontakt besteht. Dazu werden bei unterschiedlichen Bedingungen ECIS-Spektren aufgenommen und der Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  bestimmt.

Alle Messungen wurden mit MDCK II-Zellen auf porösen Elektroden, basierend auf TWC-Filtermembranen, durchgeführt, der Austausch der jeweiligen Puffer erfolgte zunächst gleichzeitig im apikalen und basolateralen Kompartiment. Die zellkompatibeln Pufferlösungen wurden im Vorfeld hinsichtlich einer konstanten Osmolarität bei unterschiedlichen Leitfähigkeiten untersucht. Begonnen wurde mit Pufferlösung 1, die einen spezifischen Elektrolytwiderstand  $\rho_{bulk}$  von 66  $\Omega\text{cm}$  aufweist. Dies entspricht der Leitfähigkeit von Zellkulturmedium. Nach einer Äquilibrierungsphase wurden die Zellen impedanzspektroskopisch untersucht. Im Anschluss wurde auf Pufferlösung 2 mit einem spezifischen Widerstand  $\rho_{bulk}$  von 124  $\Omega\text{cm}$  gewechselt. Analog dazu erfolgte die Umstellung auf die Pufferlösung 3 mit einem spezifischen Widerstand von 182  $\Omega\text{cm}$ . Der höchste spezifische Widerstand wurde mit 761  $\Omega\text{cm}$  bei Puffer 4 erreicht. Direkt im Anschluss erfolgte die Rückstellung in umgekehrter Reihenfolge, bei jeder Leitfähigkeit wurden ca. 25 min nach Umstellung Impedanzspektren im ECIS-Modus aufgenommen, wobei sich die Beiträge von  $\alpha$ , wie die anschließende Analyse zeigte bereits nach wenigen Minuten bei sehr konstanten Werten einpendelten.

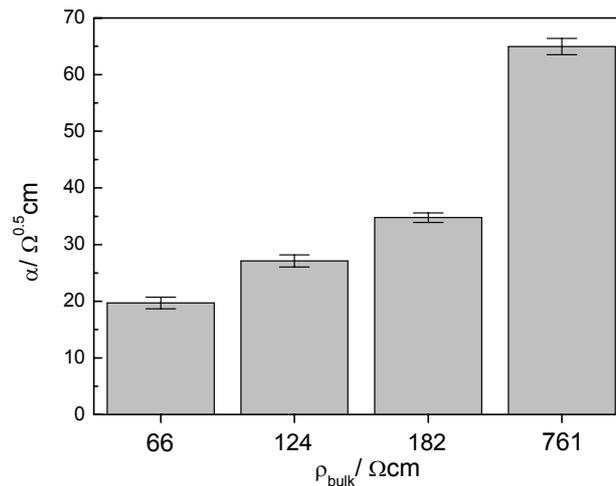
Abbildung 5.28 zeigt exemplarische Impedanzspektren eines MDCK II-Zelllayers für unterschiedliche, spezifische Elektrolytwiderstände. Für alle Bedingungen werden typische frequenzabhängige Impedanzspektren erhalten. Deutlich ist im für den Widerstand des Mediums ( $R_{bulk}$ ) charakteristischen Frequenzbereich  $f > 10^4$  Hz mit steigendem spezifischen Elektrolytwiderstand eine Verschiebung zu höheren Impedanzwerten zu erkennen. Pufferlösung 1

(●) zeigt die niedrigsten Impedanzwerte, gefolgt von Pufferlösung 2 (○) und Pufferlösung 3 (▲). Der höchste Wert wird im Fall von Pufferlösung 4 (Δ) erhalten, dem Puffer mit dem höchsten spezifischen Widerstand. Die Erhöhung des spezifischen Widerstandes im umgebenden Medium spiegelt sich außerdem in der Höhe der Zellplateaus wider. Aus der verringerten Ionenkonzentration auch in den Zell-Zell-Kontakten resultiert ein höherer spezifischer Widerstand. Der lineare Anstieg der Impedanz im Bereich des CPEs ( $f < 1$  Hz) verbleibt dagegen weitgehend unbeeinflusst.



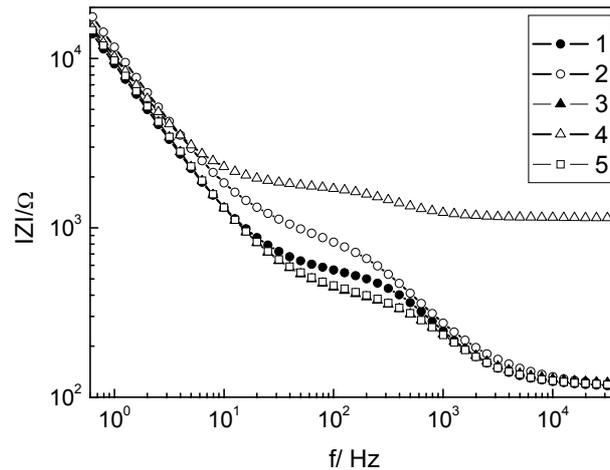
**Abb. 5.28:** Exemplarische Impedanzspektren von konfluenten MDCK II-Zellen die bei verschiedenen spezifischen Widerständen der *bulk*-Phase aufgenommen wurden. Die Zellen wurden auf einer porösen Goldelektrode (basierend auf einer TWC-Filtermembran) kultiviert. ●: Puffer 1, 66 Ωcm (physiologisch); ○: Puffer 2: 124 Ωcm; ▲: Puffer 3: 182 Ωcm; Δ: Puffer 4: 761 Ωcm.

Die auf diese Weise erhaltenen Daten wurden nach dem ECIS-Modell ausgewertet und der Parameter  $\alpha$  durch iterative Anpassung der Übertragungsfunktion ermittelt. Unter der Annahme, dass sowohl der Zellradius  $r_c$  als auch der Zell-Substrat-Abstand  $d$  unter den Versuchsbedingungen konstant bleiben, ist der Parameter  $\alpha$  sensitiv für Veränderungen des spezifischen Elektrolytwiderstandes im Spalt. Ein Einfluss der Osmolarität der Pufferlösungen kann ausgeschlossen werden. Abbildung 5.29 zeigt die für unterschiedliche Elektrolytwiderstände ermittelten Werte von  $\alpha$ . Für  $\rho_{bulk} = 66 \text{ Ωcm}$  wird  $\alpha$  zu  $(19.3 \pm 0.9) \text{ Ω}^{0.5}\text{cm}$  bestimmt. Ausgehend von diesem Wert steigt  $\alpha$  bei einem Elektrolytwiderstand von 124 Ωcm auf  $(27.1 \pm 1.1) \text{ Ω}^{0.5}\text{cm}$ , die Erhöhung von  $\rho_{bulk}$  führt zu einer weiteren Erhöhung von  $\alpha$  auf  $(34.8 \pm 0.8) \text{ Ω}^{0.5}\text{cm}$ . Der höchste Wert für den Zell-Substrat-Parameter wird für  $\rho_{bulk} = 761 \text{ Ωcm}$  gemessen,  $\alpha$  steigt auf  $(65.0 \pm 1.4) \text{ Ω}^{0.5}\text{cm}$ .



**Abb. 5.29:** Entwicklung des Zell-Substrat-Parameters  $\alpha$  in Abhängigkeit vom spezifischen Elektrolytwiderstand  $\rho_{\text{bulk}}$ . 66  $\Omega\text{cm}$ :  $n = 5$ ; 124  $\Omega\text{cm}$ :  $n = 4$ ; 182  $\Omega\text{cm}$ :  $n = 5$ ; 761  $\Omega\text{cm}$ :  $n = 3$ ; (Mittelwert  $\pm$  SDM).

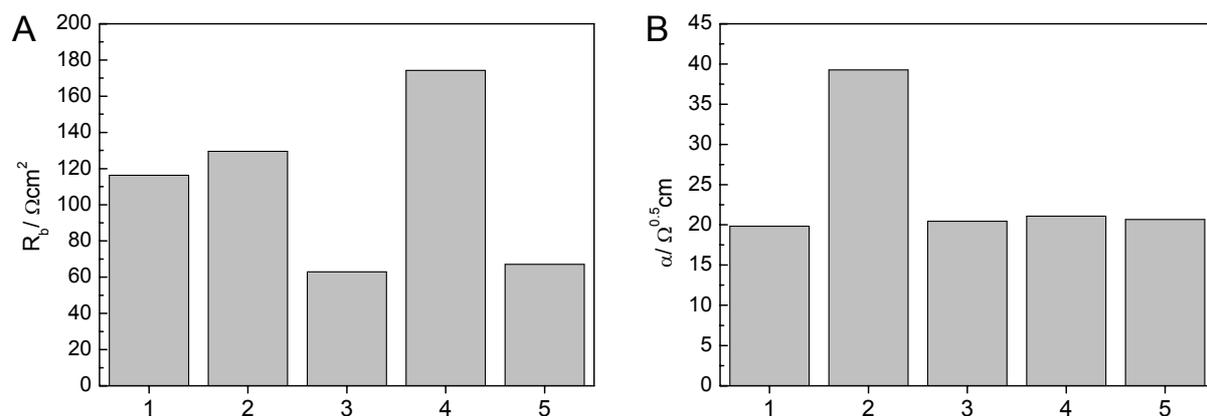
Durch die Zellen auf der porösen Elektrode werden zwei getrennte Kompartimente aufgebaut. Im Anschluss an die Untersuchungen wurde die Möglichkeit genutzt, die Pufferlösungen in den beiden Kompartimenten getrennt auswechseln zu können, und so unterschiedliche Bedingungen einzustellen. Wie die Untersuchungen zur Zugabe der Collagenase gezeigt haben (Kapitel 5.3.2), ist der Zugang zum Adhäsionskontakt der Zellen von basolateraler Seite auf porösen Elektroden möglich. Nach einer Äquilibrationsphase von 25 - 30 min wurden unter jeder Bedingung Impedanzspektren im ECIS-Modus aufgenommen. Abbildung 5.30 zeigt exemplarisch diese Spektren. Ausgehend von einem spezifischen Widerstand im Puffer von 66  $\Omega\text{cm}$  in beiden Kompartimenten (1) wurde zunächst der spezifische Widerstand im basolateralen Kompartiment auf 761  $\Omega\text{cm}$  erhöht (2). Dies macht sich direkt durch eine Erhöhung des Zellplateaus sowie durch eine Veränderung der Steigung im Plateaubereich bemerkbar. Durch die anschließende Rückstellung auf einen spezifischen Widerstand von 66  $\Omega\text{cm}$  in beiden Kompartimenten werden für den Plateaubereich wieder niedrigere Impedanzwerte erhalten (3). Das Impedanzspektrum verläuft im Frequenzbereich von  $3 \cdot 10^1$  -  $1 \cdot 10^3$  Hz gegenüber den Ausgangsbedingungen (1) zu niedrigeren Impedanzen verschoben. Die Umstellung auf die Pufferlösung mit einem spezifischen Widerstand von 761  $\Omega\text{cm}$  im apikalen Kompartiment (4) verursacht einen starken Anstieg der Impedanz im Frequenzbereich von  $f > 10^4$  Hz (*bulk*-Widerstand). Ein Plateaubereich ist ausgeprägt, erscheint allerdings flacher. Durch Rückstellung der spezifischen Widerstände in beiden Kompartimenten auf 66  $\Omega\text{cm}$  wird ein Spektrum erhalten (5), das annähernd deckungsgleich zu Spektrum 3 unter gleichen Bedingungen verläuft. Der Bereich  $f < 10^1$  Hz, der von der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt geprägt ist, verläuft für alle Bedingungen sehr ähnlich.



**Abb. 5.30:** Exemplarische Impedanzspektren von konfluenten MDCK II-Zellen auf einer porösen Goldelektrode (basierend auf einer TWC-Filtermembran). Der spezifische Widerstand der *bulk*-Phase wurde im apikalen und basolateralen Kompartiment getrennt voneinander verändert: apikal/basolateral: 1: 66 /66  $\Omega\text{cm}$  (physiologisch); 2: 66/ 761  $\Omega\text{cm}$ ; 3: 66/ 66  $\Omega\text{cm}$ ; 4: 761/ 66  $\Omega\text{cm}$ ; 5: 66/ 66  $\Omega\text{cm}$ .

Im Anschluss an die Messungen wurden die Spektren durch Anpassung der Übertragungsfunktion für das ECIS-Modell ausgewertet. Das ECIS-Modell ist in der Lage, zwischen Beiträgen aus dem Adhäsionskontakt (Parameter  $\alpha$ ), den Zell-Zell-Kontakten ( $R_b$ ) und der Zellschichtkapazität ( $C_{cl}$ ) zur Impedanz zu differenzieren. Im Fokus dieser Untersuchungen steht, ob insbesondere  $R_b$  und  $\alpha$  tatsächlich unabhängig voneinander bestimmt werden können. Eine Veränderung der spezifischen Leitfähigkeit im basolateralen Kompartiment sollte sich demnach deutlich in einer Veränderung in  $\alpha$  ausdrücken, während eine Änderung der Elektrolytzusammensetzung im apikalen Kompartiment aufgrund der Abschirmung durch die Zellschicht keinen direkten Einfluss nehmen sollte. Abbildung 5.31 zeigt exemplarisch die Auswertungen für eine Messreihe unter den oben genannten Bedingungen. Abbildungsteil **A** zeigt die Entwicklung von  $R_b$ , Abbildungsteil **B** die von  $\alpha$ . Bei physiologischer Leitfähigkeit (**1**) wird  $R_b$  zu 116  $\Omega\text{cm}^2$  bestimmt,  $\alpha$  zu 19.8  $\Omega^{0.5}\text{cm}$ . Die Parameter zeigen gute Übereinstimmung zu den in Kapitel 5.2.2 ermittelten Werten für MDCK II-Zellen auf porösen Membranen. Durch Erhöhung des spezifischen Widerstandes im basolateralen Kompartiment (**2**) erhöht sich  $R_b$  nur unwesentlich auf 130  $\Omega\text{cm}^2$ , während sich  $\alpha$  auf 39.3  $\Omega^{0.5}\text{cm}$  verdoppelt. Es werden allerdings nicht ganz die Werte erreicht, wie sie für die komplette Umstellung auf 761  $\Omega\text{cm}$  in beiden Kompartimenten gezeigt werden konnte (**Abb. 5.29**). Wahrscheinlich verbleiben bei geteiltem Austausch Pufferreste mit hoher Leitfähigkeit im basolateralen Kompartiment bzw. ein eingeschränkter Austausch der Lösungen über die Zell-Zell-Kontakte findet statt. Bedingung **3** (physiologische Leitfähigkeit) zeigt, dass diese Entwicklung für  $\alpha$  komplett reversibel ist, der Wert wird zu 20.5  $\Omega^{0.5}\text{cm}$  bestimmt.  $R_b$  fällt unter diesen Bedingungen unter den Ausgangswert auf 63  $\Omega\text{cm}^2$ . Dieser Wert liegt nach wie vor innerhalb einer für MDCK II-Zellen natürlichen Varianz (Kapitel 5.2.2), wahrscheinlich wurden die Zellen

durch den wiederholten Wechsel der Pufferlösungen leicht gestresst. Durch Erhöhung des spezifischen Widerstandes im apikalen Kompartiment (**4**) steigt  $R_b$  auf  $174 \Omega\text{cm}^2$  an, während die Bedingungen im Adhäsionskontakt konstant verbleiben ( $\alpha = 21.1 \Omega^{0.5}\text{cm}$ ). Die Abnahme der Ladungsträgerdichte im apikalen Kompartiment bzw. im Bereich der Zell-Zell-Kontakte führt also nicht zu einer Veränderung im Adhäsionskontakt. Die Zell-Zell-Kontakte wirken als Diffusionsbarriere und die Bedingungen im Zell-Substrat-Kontakt werden unabhängig von  $R_b$  konstant bestimmt. Die komplette Rückstellung der Pufferlösungen auf physiologische Bedingungen (**5**) führt zu einer Rückkehr der Werte für  $R_b$  auf  $67 \Omega\text{cm}^2$ ,  $\alpha$  verbleibt konstant bei  $20.7 \Omega^{0.5}\text{cm}$ .



**Abb. 5.31:** Auswertung einer exemplarischen Messreihe von konfluenten MDCK II-Zellen auf einer porösen Goldelektrode (basierend auf einer TWC-Filtermembran) für die Parameter  $R_b$  und  $\alpha$ . Der spezifische Widerstand der *bulk*-Phase wurde im apikalen und basolateralen Kompartiment getrennt voneinander verändert: apikal/basolateral: 1: 66/ 66  $\Omega\text{cm}$  (physiologisch); 2: 66/ 761  $\Omega\text{cm}$ ; 3: 66/ 66  $\Omega\text{cm}$ ; 4: 761/ 66  $\Omega\text{cm}$ ; 5: 66/ 66  $\Omega\text{cm}$ .

Für die spezifische Zellschichtkapazität wurden unter allen Bedingungen sehr ähnliche Werte bestimmt. Einzig für Bedingung **2** wird ein leicht erniedrigter Wert von  $C_{Cl} = 1.62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt, für alle anderen Bedingungen liegen die Werte zwischen 2.01 und 2.15  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Insgesamt zeigen die Werte eine gute Übereinstimmung zu den in Kapitel 5.2.2 bestimmten Werten von  $C_{Cl} = (2.21 \pm 0.08) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Abschließend kann damit formuliert werden, dass die Modulation des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt zu einer reversiblen Veränderung des Parameters  $\alpha$  führt. Durch den getrennten Austausch der Lösungen im apikalen und basolateralen Kompartiment konnte außerdem gezeigt werden, dass der Parameter für die Zell-Zell-Kontakte unabhängig von  $\alpha$  bestimmt wird. Eine Erhöhung in  $R_b$  beeinflusst die Bestimmung von  $\alpha$  nicht.

## 5.4 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorgestellten Ergebnisse stand die Entwicklung von porösen Goldfilm-Elektroden zum Einsatz in impedanzspektroskopischen Messungen. Die porösen Goldschichten dienen dabei gleichzeitig als Kultursubstrat und Messelektrode für adhärenzte Zel-

len. Zur Auswertung der Impedanzspektren wurde eine Anwendung des Modells von *Wege-ner et al.* (2000) angestrebt, das auf dem von *Giaever* und *Keese* 1984 vorgestellten und in weiteren Arbeiten (1991, 1993) etablierten ECIS-Modell basiert. Dadurch ist es möglich, die passiven elektrischen Eigenschaften von Zellschichten auf morphologische Merkmale der Zellschichten wie die Barriereeigenschaft oder den Zell-Substrat-Abstand zu beziehen. Die Methode ermöglicht es Änderungen der elektrischen Eigenschaften mit hoher Zeitauflösung zu quantifizieren und ist nicht invasiv. Bisher war diese ECIS-Methode allerdings auf planare Elektroden limitiert. Dadurch wurde die Anwendung auf Zellsysteme beschränkt, die auf planaren Substraten kultiviert werden können und die Möglichkeit zur Stimulation von basolateraler Zellseite ist nicht möglich. In diesen Fällen, in denen die ECIS-Technik bisher nicht verwendet werden kann, werden die Zellen häufig auf permeablen Filtermembranen kultiviert und die passiven elektrischen Eigenschaften ebenfalls durch impedanzspektroskopische Messungen bestimmt. Allerdings erlaubt diese Methode (TER-Modus) zur Bestimmung der transzellulären Widerstände keine Differenzierung zwischen Beiträgen aus den Zell-Zell-Kontakten und dem Adhäsionskontakt und ist daher weniger sensitiv. Der transzelluläre Widerstand ist mit der parazellulären Permeationsrate für Ionen und geladene Moleküle korreliert (Schneeberger und Lynch, 1992 und 2004), gleichzeitig ist es mit Hilfe der Filtersubstrate aber auch möglich, durch Permeationsexperimente die zelluläre Barriere für konkrete Testsubstanzen zu bestimmen. Die Hersteller bieten verschiedene Membranvarianten in Bezug auf Material, Porendichte und Porendurchmesser für unterschiedlichste Anwendungsbereiche an. Basierend auf diesen Membranen wurden in dieser Arbeit poröse Gold-elektroden hergestellt und für die Verwendung als Kultursubstrat und Messelektrode für adhärenzte Grenzflächengewebe getestet. Die in dieser Arbeit eingesetzten permeablen Membranen wurden unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, dass ein möglichst breiter Anwendungsbereich erschlossen werden kann. Gleichzeitig wurde versucht, durch die Untersuchung extremer Kombinationen wie im Fall der hohen Dichte kleiner Poren (*Transwell*-Filtereinsatz) oder der niedrigen Dichte großer Poren (*Transwell Clear 3.0*-Filtereinsatz), allgemeingültige Tendenzen für Mess- und Zellverhalten auf permeablen Elektroden herauszuarbeiten. Als Zellmodell wurde zunächst die gut etablierte MDCK II-Zelllinie gewählt. Im Anschluss an die grundlegenden Untersuchungen werden in konkreten Anwendungen Untersuchungen angeschlossen, die die Möglichkeiten zur Nutzung des basolateralen Zugangs zum Adhäsionskontakt auf porösen Elektroden vorstellen.

#### **5.4.1 Der kombinierte Messaufbau und Modellrechnungen zum Einfluss der Gegenelektrode auf impedanzspektroskopische Untersuchungen**

Die Filtermembranen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Porendurchmesser und Porenanzahl, woraus der jeweilige Grad der Porosität errechnet wurde. Aus der Porenanzahl und den

Porendurchmessern ergibt sich die Möglichkeit eines Vergleiches innerhalb von Merkmalspaaren, das heißt, Elektroden, basierend auf *Transwell Clear-* (TWC) und *Transwell-* (TW) Filtermembranen, bilden ein Paar, das sich bei gleichem Porendurchmesser durch die Porendichte unterscheidet und Elektroden, basierend auf *Transwell 1.0-* (TW1.0) und *Transwell Clear 3.0-* (TWC3.0) Filtermembranen eines, das durch unterschiedliche Porendurchmesser bei gleicher Porendichte charakterisiert ist.

Der vorgestellte Messaufbau ermöglicht die impedanzspektroskopische Untersuchung der porösen Elektroden parallel im ECIS- und im TER-Messmodus. Vor einer Anwendung zur Untersuchung adhärenter Zellschichten wurden die verschiedenen Komponenten des Messaufbaus sowie deren Einfluss auf das Messergebnis untersucht. Die Modellrechnungen untersuchen den Einfluss der Gegenelektrode auf impedanzspektroskopische Messungen im ECIS-Messmodus.

### **Modellrechnungen zum Einfluss der Impedanz der Gegenelektrode**

Integrale Voraussetzung für die Anwendung des ECIS-Modells nach *Giaever* und *Keese* ist, dass die Impedanz der Gegenelektrode für die Auswertung nicht berücksichtigt werden muss. Dies ist der Fall, wenn die Impedanz vernachlässigbar klein ist. Im Fall idealpolarisierbarer Metallelektroden wird der Impedanzbeitrag im Wesentlichen durch kapazitive Beiträge geliefert, daher korrelieren hohe Kapazitäten mit niedriger Impedanz. Nur unter diesen Bedingungen kann eine Veränderung des Impedanzverhaltens ausschließlich auf die Zellschicht auf der Arbeitselektrode zurückgeführt werden. In Modellrechnungen, in denen konstante charakteristische Parameter für die Arbeitselektroden sowie die Zellschicht berücksichtigt, die Kapazität der Gegenelektrode aber sukzessive verringert wurde, wurden Impedanzspektren erzeugt. Im Anschluss daran wurden diese Spektren mit Hilfe des ECIS-Modells ausgewertet und die erhaltenen Parameter mit den Ausgangsparametern verglichen. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob die Impedanz der Gegenelektrode zu Veränderungen im Impedanzspektrum führt, die sich im Anschluss in den Modellparametern widerspiegeln. Der formulierte Toleranzbereich von 2 % Abweichung für die Modellparameter von den Ursprungswerten berücksichtigt messtechnisch bedingte Schwankungen sowie Rundungsartefakte, die während der iterativen Anpassung der Übertragungsfunktion an die Spektren entstanden sein können. Für die das CPE-charakterisierenden Parameter wurde ermittelt, dass der Parameter  $A$  sensitiver auf die Erniedrigung der Kapazität der Gegenelektrode reagiert als der Parameter  $n$ . Indem sowohl Modellrechnungen für das Beispiel einer planaren Elektrode als auch für eine poröse Elektrode (TWC3.0) durchgeführt wurden, konnte ermittelt werden, dass die Modellparameter im Fall der porösen Elektrode bereits bei einer höheren Kapazität der Gegenelektrode den Toleranzbereich verlassen, als im Fall der planaren Elektrode. Für die planare Elektrode führt eine Kapazität der Gegenelektrode von

$C_{CE} < 10^3 \mu\text{F}$  zu signifikanten Abweichungen der ermittelten Modellparameter zu den Ausgangswerten, für die poröse Elektrode bereits eine Kapazität von  $C_{CE} < 7.5 \cdot 10^2 \mu\text{F}$ . Vermutlich resultiert dies aus einer höheren Kapazität der porösen gegenüber der planaren Elektrode, die aus einer Flächenvergrößerung aufgrund der porösen Struktur entsteht. Hintergrund für diese Aussage bilden die Untersuchungen zur elektrischen Charakterisierung der porösen Elektroden mit und ohne Zellen, die in Kapitel 5.4.2 detaillierter diskutiert werden. Die Zellschicht-charakterisierenden Parameter  $R_b$ ,  $\alpha$  und  $C_{Cl}$  reagieren weniger sensitiv auf die Erniedrigung der Kapazität der Gegenelektrode als die Parameter des CPEs. Unabhängig von der Elektrodenoberfläche gilt für alle drei Parameter der Zellschicht, dass eine 2 %-Abweichung vom Ausgangswert bei einer Kapazität der Gegenelektrode von  $C_{CE} < 10^2 \mu\text{F}$  überschritten wird. Für sämtliche Modellparameter gilt, dass sich die Abweichungen vom Ausgangswert nicht linear sondern exponentiell entwickeln. Daher führen im Bereich der Grenzwerte bereits kleine Veränderungen zu erheblichen Abweichungen in den Modellparametern. Insbesondere wenn es darum geht unterschiedliche Elektrodenoberflächen zu charakterisieren, muss gewährleistet sein, dass für alle Untersuchungen der Beitrag der Gegenelektrode zu vernachlässigen ist und die Parameter fehlerfrei bestimmt werden können.

### **Impedanzspektroskopische Charakterisierung der Gegenelektrode**

Die kommerziell erhältlichen ECIS-Arrays (Applied BioPhysics, Inc.) besitzen sowohl eine Arbeits- als auch eine Gegenelektrode aus Gold. Allerdings ist die Fläche der Arbeitselektroden mit einer Größenordnung von  $5 \cdot 10^{-4}$  bzw.  $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$  deutlich kleiner als die in dieser Arbeit verwendeten porösen Elektroden ( $0.36 - 0.04 \text{ cm}^2$ ). Die in diesem Aufbau verwendete Gegenelektrode ist etwa 1000fach größer (Wegener, 2003), um den Einfluss der Impedanz vernachlässigen zu können. Ein analoger Messaufbau mit einer coplanar angeordneten Gegenelektrode aus Gold ist unter Berücksichtigung eines möglichen Einflusses der Impedanz der Gegenelektrode auf die Parameter der Messung nicht umsetzbar. Die dazu benötigte Fläche wäre zu groß. In der Praxis haben sich daher Platinelektroden bewährt, die von oben ins Medium getaucht werden und deren Fläche durch das galvanische Abscheiden von amorphem Platin unspezifisch vergrößert wird. Die Kapazität dieser Elektroden kann bestimmt werden, indem das Impedanzverhalten gegen eine Referenzelektrode gemessen wird. Die eingesetzte Silber/Silberchloridelektrode zeigt aufgrund der sehr schwachen Polarisierbarkeit eine quasi unendlich hohe Kapazität, weshalb die Kapazität der Platinelektrode für das frequenzabhängige Impedanzverhalten bestimmend wird. Für die spätere Verwendung der Platinelektrode als Gegenelektrode ist es als Bedingung ausreichend, wenn für das betrachtete Messfenster zwischen  $1 - 10^5 \text{ Hz}$  kein Einfluss der Elektrode auf die Impedanz festgestellt werden kann. Eine ideal polarisierbare Platinelektrode liefert im Wesentlichen kapazitive Beiträge zur Impedanz. Das Impedanzspektrum wird, wie die Entwicklung des

Phasenwinkels zeigt, über den gesamten Frequenzbereich allerdings von ohmschen Komponenten dominiert. Daraus folgt, dass die Platinelektrode im benötigten Frequenzfenster keinen entscheidenden Einfluss auf die Impedanz nehmen kann und damit für den Einsatz als Gegenelektrode zur Charakterisierung der porösen Elektroden geeignet ist.

#### **5.4.2 Impedanzspektroskopische Untersuchungen epithelialer Zellschichten auf porösen Elektroden**

Die Untersuchung der passiven elektrischen Eigenschaften von Zellschichten auf Goldfilmelektroden mit Hilfe der Impedanzspektroskopie ermöglicht eine Differenzierung zwischen den Einzelbeiträgen aus den Zell-Zell-Kontakten, dem Zell-Substrat-Kontakt und der spezifischen Zellschichtkapazität zur Impedanz. Durch die Quantifizierbarkeit der Parameter werden objektive Kriterien geschaffen, die eine Zellschicht charakterisieren. Daher sollten sich Veränderungen der Zellen, die in Abhängigkeit von der Elektrodenoberfläche auftreten könnten, in veränderten Parametern widerspiegeln. Für MDCK II-Zellen konnten Unterschiede in der Zellmorphologie und den Barriereigenschaften in Abhängigkeit von der Substratoberfläche und dem Substratmaterial beschrieben, allerdings nicht impedanzspektroskopisch mit Hilfe der ECIS-Methode analysiert werden (Butor und Davoust, 1992). Die Autoren zeigen in Abhängigkeit von dem Substrat (Nitrozellulose-, Polycarbonat- und Polyester-Membranen im Gegensatz zu planaren Elektroden) eine ausgeprägtere epitheltypische Polarisierung der Zellen.

In diesem Teil der Arbeit wurde durch impedanzspektroskopische Untersuchungen festgestellt, wie die Zellen auf die unterschiedlich porösen Elektrodenoberflächen reagieren und ob messmethodische Besonderheiten zu berücksichtigen sind. Analog zu den Untersuchungen der nanoporösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten soll die elektrische Charakterisierung der Elektrodeneigenschaften getrennt von Charakterisierung der Zellschicht durchgeführt werden.

#### **Oberflächenspezifische Unterschiede im Impedanzverhalten der porösen Goldfilmelektroden**

Die porösen Arbeitselektroden basieren auf permeablen Filtermembranen und wurden durch das Aufbringen einer Goldschicht hergestellt. Für alle Oberflächen wurde ein frequenzabhängiges Impedanzverhalten beobachtet, das bei hohen Frequenzen durch den Widerstand des Mediums und bei niedrigen Frequenzen durch das Verhalten an der Grenzschicht Elektrode/Elektrolyt dominiert wird. Analog zu den Untersuchungen poröser Elektroden, basierend auf nanoporösem Silizium, wurden die Impedanzspektren dazu genutzt, über die Gesamtkapazität des Systems auf die Kapazität der Elektroden rückzuschließen. Eine Kapazitätsänderung gegenüber einer planaren Goldelektrode ist bei ansonsten gleichen Ausgangs-

bedingungen auf eine Flächenzu- oder abnahme der Elektrode zurückzuführen. Aus der Porenfläche resultiert zunächst eine Verkleinerung des planaren Flächenanteils der Elektrode. Dieser Verlust kann potentiell dadurch ausgeglichen werden, dass die Innenwände des Zylinders mit Gold belegt sind und zu der Elektrodenfläche beitragen. Aus diesem Grenzfall der Flächenkompensation (Gl. 6.7) kann berechnet werden, wie tief das Gold dazu in die Pore eindringen muss. Unter der Annahme einer ideal glatten Goldoberfläche und zylindrischer Porengeometrie gilt für die Flächenkompensation:

$$A_{Pore} = A_{Zyl} \cdot \quad \text{Gl. 5.1}$$

Mit  $A_{Pore} = \pi r_{Pore}^2 \quad \text{Gl. 5.2}$

und  $A_{Zyl} = 2\pi r_{Pore} \cdot h \quad \text{Gl. 5.3}$

daraus folgt: 
$$h = \frac{\pi r_{Pore}^2}{2\pi r_{Pore}} = \frac{r_{Pore}}{2} \quad \text{Gl. 5.4}$$

Aus Gleichung 5.4 folgt, dass zur Kompensation des Flächenverlustes durch die Porenfläche für Elektroden, basierend auf TWC- und TW-Filtermembranen (gleicher Porendurchmesser), eine Eindringtiefe des Goldes von 0.1  $\mu\text{m}$  nötig ist, für Elektroden, basierend auf TWC3.0-Filtermembranen, von 1.5  $\mu\text{m}$  und für solche auf TW1.0-Filtermembranen von 0.5  $\mu\text{m}$ . Da alle Membranen, die mit einer Goldschicht belegt werden, 10  $\mu\text{m}$  dick sind, ist ein Ausgleich der Flächen für alle Elektroden mindestens möglich. Wie weit das Gold allerdings tatsächlich in die Poren eindringt und inwieweit durch den Sputterprozess tatsächlich eine ideal glatte Oberfläche erhalten wird, kann durch diese Modellrechnung nicht vorhergesagt werden.

Analog zu den bereits untersuchten porösen Elektroden, basierend auf Silizium-Substraten, können die Eigenschaften der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt durch das Bauteil eines Kondensators nicht korrekt wiedergeben werden. Das empirische Impedanzelement CPE wird durch die Parameter  $A$  und  $n$  charakterisiert und vereint sowohl kapazitive als auch ohmsche Eigenschaften. Nur für den Grenzfall  $n = 1$  kann die Kapazität  $C$  der Elektrode bestimmt werden ( $A = C$ ). Allerdings kann durch Betrachtung der Gesamtimpedanz des Systems und speziell des Imaginärteils der Impedanz in einem Frequenzbereich, der von den Elektroden-eigenschaften dominiert wird, ein Eindruck davon gewonnen werden, wie sich die Kapazität der Elektrodenflächen relativ zueinander verhalten. Als Vergleichsgrundlage wurden die Werte genutzt, die in Kapitel 4.2.3.1 für planare Goldelektroden bestimmt wurden. Da die unspezifische Anlagerung von thiolhaltigen Komponenten im Medium zu einer Kapazitätsabnahme während der Messung führen kann (Ulrich, 1995), wurden alle Elektroden mit L-Cystein im Vorfeld der Messung inkubiert. Dadurch sollte eine weitere unspezifische Anlagerung thiolhaltiger Komponenten weitestgehend vernachlässigbar sein (Wegener, 1998).

Der Vergleich der flächennormierten<sup>12</sup> Gesamtkapazitäten bei 10 Hz zeigt, dass die Porosität der Elektroden nicht in allen Fällen zu einer Kapazitätsänderung führt. Für Elektroden, basierend auf TW1.0-Filtermembranen, wird im Vergleich zu planaren Elektroden keine Kapazitätserhöhung bestimmt. In allen anderen Fällen wird jedoch eine höhere Gesamtkapazität ermittelt. Inwieweit dafür tatsächlich die Porenstruktur verantwortlich ist, kann durch den Vergleich innerhalb der Merkmalsgruppen untersucht werden. Elektroden, basierend auf TWC- und TW-Filtermembranen, besitzen die gleichen Porendurchmesser aber unterschiedliche Porendichten. Die Porendichten sollten sich unter der Annahme einer durchschnittlich gleichen Flächenveränderung pro Pore in der Gesamtkapazität widerspiegeln. Für Elektroden, basierend auf TWC-Membranen, wurde ein Wert von  $(36.2 \pm 1.1) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bei 10 Hz bestimmt, was einer Erhöhung um 24 % gegenüber der planaren Vergleichsfläche entspricht. Für Elektroden, basierend auf TW-Membranen, wird eine Kapazitätserhöhung auf  $(40.0 \pm 1.4) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  festgestellt. Da sich die Porenanzahl 25-fach erhöht, erscheint die Zunahme um den Faktor 1.1 allerdings gering. Möglicherweise wirkt sich das unterschiedliche Filtermaterial (Polycarbonat (TW) und Polyester (TWC)) auf die Struktur des aufgetragenen Goldfilms aus. Der Prozess zur Deposition eines Goldfilmes wurde bereits in Kapitel 4.4.2.3 detailliert vorgestellt, und wird daher hier nicht erneut erläutert. Dass das Basismaterial neben weiteren Faktoren auf diesen Prozess Einfluss nehmen kann, konnte von *Zaporozhchenko et al.* (2000) gezeigt werden. Inwieweit ein veränderter Porendurchmesser bei gleicher Porenanzahl und gleichem Filtermaterial eine Veränderung der elektrisch zugänglichen Fläche und damit der Kapazität verursacht, wurde am Beispiel von Elektroden basierend auf TW1.0- und TWC3.0-Filtermembranen untersucht. Für Elektroden, basierend auf TWC3.0-Filtermembranen, wurde eine Erhöhung der Gesamtkapazität um den Faktor 1.6 gegenüber den porösen Elektroden mit kleineren Poren (TW1.0) errechnet. Da kein Einfluss unterschiedlicher Filtermaterialien für den Sputterprozess zu berücksichtigen ist (beide Membranen bestehen aus Polyester) kann das Gold im Fall der größeren Poren in der Filterbasis offensichtlich tiefer in die zylindrische Pore eindringen, kompensiert dadurch den Flächenverlust gegenüber einer planaren Elektrode und führt darüber hinaus zu einer Flächenvergrößerung. Grundsätzlich dienten diese Untersuchungen dazu, einen Eindruck über die elektrisch nutzbare Fläche auf porösen Elektroden im Vergleich zu einer planaren Oberfläche zu erhalten. Eine Verschiebung der Spektren zu niedrigeren Frequenzen in einer Größenordnung wie es für poröse Elektroden (Typ 1) gezeigt wurde, konnte nicht festgestellt werden.

Wie bereits erwähnt werden die Eigenschaften der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt durch ein konstantes Phasenelement repräsentiert. Die Analyse der Parameter  $n$  und  $A$  hat ergeben, dass für alle nanoporösen Elektroden basierend auf Filtermembranen sowie für planare

---

<sup>12</sup> Normiert wurde auf die geometrische Größe, die sich aus der Begrenzung der Elektrodenfläche ergibt. Die Angabe berücksichtigt daher keine dreidimensionale Strukturierung der Oberfläche.

Elektroden auf Deckgläschen ein ähnliches  $n$  bestimmt werden kann. Folgt man der Argumentationslinie, die im Zusammenhang mit nanoporösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten aufgestellt wurde (Kapitel 4.4.2.3), so resultieren die ähnlichen Werte für  $n$  aus einer ähnlichen Nanostrukturierung der Goldoberfläche. Für den Parameter  $A$  werden dagegen unterschiedliche Werte bestimmt. Die Tendenz, die für die Gesamtkapazität des Systems bei 10 Hz gezeigt wurde, wird bestätigt. In Analogie zu den Untersuchungen der Elektroden auf porösem Silizium wird davon ausgegangen, dass ein Zusammenspiel zwischen der Nano-Topographie der Goldoberfläche und der Mikro-Topographie, resultierend aus der Porenstruktur, den Parameter  $A$  sowie die Gesamtkapazität des Systems bei 10 Hz beeinflussen. Der flächenunabhängige Parameter  $n$  ist dagegen von der Mikro-Topographie weitgehend unabhängig.

### **Charakterisierung der MDCK II-Zellschichten auf porösen Elektroden, basierend auf permeablen Filtermembranen**

Für die in dieser Arbeit untersuchten MDCK II-Zellen werden in Bezug auf die Zell-Zell-Kontakte (Parameter  $R_b$ ) keine signifikanten Änderungen in Abhängigkeit von der Elektrodenoberfläche beobachtet. Die Mittelwerte für Zellen auf unterschiedlichen Oberflächentopographien bewegen sich mit  $(61 \pm 11) \Omega\text{cm}^2$  (TWC3.0) und  $(82 \pm 7) \Omega\text{cm}^2$  (TWC) in einem Bereich, der innerhalb der normalen Schwankungsbreite für MDCK II-Zellen liegt. So berichten *Lo et al.* (1999) von Widerständen in einem Bereich von  $60 \Omega\text{cm}^2$ , *Reiß* (2004) ermittelt einen Wert von  $88 \Omega\text{cm}^2$ . Die Messungen auf planaren Substraten in dieser Arbeit lieferten allerdings einen Wert von  $(48 \pm 7) \Omega\text{cm}^2$ , liegen also insgesamt niedriger (Kapitel 4.4.2.3). Für den Zell-Substrat-Kontakt kann ebenfalls keine eindeutige Tendenz ermittelt werden. Grundsätzlich liegen die Mittelwerte für  $\alpha$  mit  $(14.1 \pm 0.4) \Omega^{0.5}\text{cm}$  (TW) und  $(18.1 \pm 1.2) \Omega^{0.5}\text{cm}$  (TWC) innerhalb einer Spanne, die mit den Literaturdaten gute Übereinstimmung zeigt. So wird  $\alpha$  für MDCK II-Zellen auf planaren Elektroden zu  $18 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (*Lo et al.*, 1999) bzw.  $16 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (*Reiß*, 2004) bestimmt. Durch die eigenen Untersuchungen auf planaren Glasträgern wurden aber auch niedrigere Werte von  $(11.6 \pm 0.8) \Omega^{0.5}\text{cm}$  gezeigt. Wie unter Kapitel 4.4.2.3 ausführlich diskutiert, ist dieser Parameter von drei Komponenten abhängig: dem spezifischen Elektrolytwiderstand im Adhäsionskontakt, dem Abstand der Zellen zum Substrat und den Zellradien. Unter der Annahme gleicher Zellradien verbleiben zwei Parameter, die für die beobachteten Unterschiede der gemessenen  $\alpha$ -Werte verantwortlich sein können. Wie für die porösen Silizium-Substrate beschrieben, bewirkt eine Goldschicht in den Poren unter Umständen eine Vergrößerung des mittleren Zellsubstratabstandes, indem die Zellen der Topographie der Elektrodenoberfläche nicht vollständig folgen können. Dies würde über einen erhöhten durchschnittlichen Zell-Substrat-Abstand zu einer Erniedrigung von  $\alpha$  führen. Gleichzeitig ist allerdings auch ein Einfluss auf die Leitfähigkeit im

Spalt zwischen Zelle und Elektrodenoberfläche nicht auszuschließen. Inwieweit daher die Werte eine spezifische Reaktion der Zellen auf das Substrat widerspiegeln oder aber durch die Strukturierung bzw. Topographie der Elektrodenfläche beeinflusst werden, bleibt unklar. Ein Vergleich der Parameter des Zell-Substrat-Kontakts ist daher für Zellen auf gleichen Elektroden sinnvoll, nicht jedoch auf unterschiedlichen Oberflächen.

Die flächennormierte Kapazität der Zellschicht erlaubt Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Plasmamembran. Alle für  $C_{Cl}$  ermittelten Werte zwischen  $(2.21 \pm 0.08) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TWC) und  $(2.56 \pm 0.07) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (TW) zeigen eine eindeutige Tendenz zu höheren Werten als in dieser Arbeit für Zellschichten auf planaren Substraten ermittelt wurde. Auch *Reiß* (2004) bestimmt  $C_{Cl}$  deutlich niedriger ( $1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ), *Wegener* (1998) gibt einen Mittelwert von  $1.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  an, wobei alle Referenzwerte auf planaren Goldfilmelektroden gemessen wurden. Offensichtlich führt die Kultivierung von MDCK II-Zellen auf porösen Elektroden zu einer Erhöhung der Zellschichtkapazität, was auf zusätzliche Membranaus- bzw. -einstülpungen schließen lässt. Obwohl das ECIS-Modell nicht in der Lage ist, zwischen basolateraler und apikaler Membran zu differenzieren, wird häufig ausschließlich ein Zusammenhang zwischen der apikalen Zellmembran und  $C_{Cl}$  unterstellt. Inwieweit das für Zellen auf porösen Substraten zutrifft, für die prinzipiell auch Topographieveränderungen der basolateralen Membran möglich sind, kann nicht abschließend entschieden werden. Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass die basolaterale Membran von MDCK II-Zellen im erheblichen Maße in die Filterporen (Durchmesser:  $3 \mu\text{m}$ ) eindringen kann (Butor und Davoust, 1992). Die Autoren geben allerdings nach wie vor für das Verhältnis der apikalen und basolateralen Membranfläche den Wert 8:1 auf Polycarbonat-Filtern mit einem Porendurchmesser von  $0.4 \mu\text{m}$  an. Überträgt man diese Situation, kann auch für Zellen auf porösen Elektroden davon ausgegangen werden, dass die basolateralen Membranen aufgrund der Anordnung der Einzelkapazitäten in Serie durch die kleinere Einzelkapazität den Wert der spezifischen Zellschichtkapazität dominiert. Da für die unterschiedlichen Oberflächen kein eindeutiger Einfluss auf die Zellschichtkapazität der Zellen gefunden wird, scheint allein die Permeabilität des Substrates das Kriterium zu sein, dass eine verstärkte Ausbildung von Membranauffaltungen unterstützt. Der tatsächliche Porendurchmesser sowie die Porendichte scheinen keine spezifische morphologische Zellreaktion hervorzurufen. Dies deckt sich mit Untersuchungen der oben genannten Studie (Butor und Davoust, 1992), die einen generellen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von MDCK II-Zellen durch die Verwendung permeabler Substrate zeigen konnte.

### **Untersuchungen zur Motilität von MDCK II-Zellen auf porösen Goldfilmelektroden**

Die Kultivierung adhärenter Zellen auf Goldelektroden ermöglicht mit Hilfe der ECIS-Technik die Bestimmung der Zellparameter und erlaubt so Rückschlüsse auf die Morphologie. Da-

rüber hinaus kann durch die Messung der Impedanzfluktuationen bei einer konstanten Frequenz und hoher Zeitauflösung auf die Motilität der Zellen rückgeschlossen werden. Diese als *micromotion* bezeichneten vertikalen Zellbewegungen werden in konfluenten Zelllayern beobachtet und stammen somit nicht von lateralen Bewegungen der Zellen vergleichbar mit Bewegungen während Wundheilungsprozessen (Giaever und Keese, 1991). Daher ist dieser Parameter dazu geeignet, vitale Zelllayer zu charakterisieren, bzw. Veränderungen dieses Parameters können auf Temperaturänderungen, Veränderungen des Cytoskeletts oder in der Metabolitzusammensetzung des Mediums zurückgeführt werden (Lo et al., 1993). Damit ermöglicht diese Technik die integrale Quantifizierung von Bewegungen, die auf das Lösen und Aufbauen von Fokalkontakten zurückgeführt werden. Daneben führen auch Änderungen des parazellulären Widerstandes zu Impedanzfluktuationen. Die Zellformänderungen liegen im Nanometerbereich und damit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen.

Die Impedanzfluktuationen werden bei konstanter Frequenz über die gesamte Fläche der Arbeitselektrode integriert, so dass unter Berücksichtigung einer durchschnittlichen Elektrodenfläche von  $0.36 \text{ cm}^2$  und einem mittleren Zellradius von  $7.9 \text{ }\mu\text{m}$  (unter Kapitel 4.2.3.2 auf planaren Oberflächen ermittelt) etwa 180.000 Zellen dazu beitragen. Wie *Giaever* und *Keese* am Beispiel von Fibroblasten zeigen konnten, verändert sich die Fluktuationsintensität deutlich, wenn die Zellen durch Zugabe von PFA fixiert werden und kein vitales Verhalten mehr zeigen. Diese Beobachtung des Einbruchs der Motilität konnte *Reiß* (2004) bestätigen. Da diese Methode bisher weder auf porösen Elektroden noch auf planaren Elektroden dieser Größe durchgeführt wurde, wurde eben diese Vernetzung der Proteine als eine interne Kontrolle angesehen, die es erlaubt, den biologischen Ursprung des Signals für vitale Zellen im Vergleich zu einer fixierten Zellschicht nachzuweisen. Allerdings konnte für keine Zellschicht unabhängig von der Elektrodentopographie eine Abnahme der Impedanzfluktuation nach Vernetzung der zellulären Proteine festgestellt werden. Durch die große Anzahl an Zellen, die zu dem Signal beitragen, mitteln sich die individuellen Fluktuationen raus. Das gemittelte Zellrauschen liegt dadurch unterhalb des elektronischen Rauschens. Da das biologische Rauschen der Zellen nicht entscheidend erhöht werden kann (dies schließt eine Stimulation nicht aus), muss die Sensitivität der Messanordnung erhöht werden, indem das elektrische Rauschen erniedrigt wird. *Suter* (1997) konnte an Stahloberflächen zeigen, dass das Rauschen linear mit der Elektrodenfläche abnimmt. Tatsächlich wurden die von *Giaever* und *Keese* sowie *Reiß* vorgestellten ECIS-Studien ausnahmslos auf deutlich kleineren Elektroden von höchstens  $1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$  durchgeführt. Für diese Arbeit bedeuten diese Ergebnisse, dass aufgrund der Elektrodengröße keine Untersuchungen zur Motilität der Zellen auf unterschiedlichen Elektrodenoberflächen durchgeführt werden können.

### 5.4.3 ECIS- und TER-Modus: Vergleichende Betrachtung am Beispiel derselben epithelialen Zellschicht

Die in dieser Arbeit vorgestellte Messplatzkombination ermöglicht die sequentielle Untersuchung derselben Zellschicht mit zwei unterschiedlichen Elektrodenkonfigurationen. Die Steuerung durch einen Computer erlaubt das automatisierte, nicht invasive Wechseln zwischen beiden Messmodi. Im Fokus der vergleichenden Untersuchungen stand, inwieweit die messmethodischen Unterschiede zwischen dem TER- und dem ECIS-Modus sich in den jeweiligen Parametern widerspiegeln. Beide Methoden nehmen für sich in Anspruch, die Morphologie der Zellen charakterisieren zu können. Dazu wird allerdings jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Parametern verwendet. So differenzieren beide Modelle zwischen den Beiträgen des parazellulären Widerstandes sowie der Zellschichtkapazität an der Gesamtimpedanz. Im Unterschied zum TER-Modell ermöglicht das ECIS-Modell aber zusätzlich die Differenzierung zwischen Impedanzbeiträgen der Zell-Zell-Kontakte und des Zell-Substrat-Kontaktes.

Für den ECIS-Modus konnte gezeigt werden (Kapitel 5.4.2), dass für poröse Elektroden eine Anwendung des Ersatzschaltbildes bzw. eine gute Anpassung der Übertragungsfunktion an die Messdaten möglich ist.

Im Unterschied zum herkömmlichen TER-Messaufbau allerdings, in dem die Zellen auf einer Kunststoffiltermembran die beiden Elektroden separieren, verbleibt durch den kombinierten Messaufbau zwangsläufig eine Goldschicht unterhalb der Zellen im elektrischen Feld zwischen den Elektroden. Inwieweit diese Goldschicht für die Analyse der Daten zu berücksichtigen ist, musste daher zunächst untersucht werden.

#### 5.4.3.1 Einfluss einer passiven Goldschicht auf die Modellparameter im TER-Modus

Der klassische Aufbau eines Messplatzes zur Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von Zellen auf permeablen Filtermembranen sieht eine *sandwich*-Anordnung von zwei Elektroden vor. Zwischen diese Elektroden wird ein Filtereinsatz fixiert, auf dem die Zellen kultiviert werden. Der Messaufbau dieser Arbeit sieht vor, dass eine zusätzliche Goldschicht während der Messung auf der Membran zugegen ist. Diese wird über ein Relais passiv geschaltet, das heißt sie verbleibt ohne elektrisch wirksame Verbindung. Aufgrund von elektromagnetischen Interferenzen mit dem Feld zwischen den Messelektroden könnte es zu einer Beeinflussung der Messung kommen, die eine Anwendung des Ersatzschaltbildes als Basis für die Auswertungsfunktion erschweren oder verhindern könnte. Es ist davon auszugehen, dass in der Goldschicht durch Influenz ein elektrisches Feld erzeugt wird. Die Feldlinien zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode werden also unterbrochen, allerdings auf der jeweils anderen Seite der Goldschicht mit gleicher Dichte fortgesetzt (Tippler, 2000). Ob und inwieweit sich dies im Impedanzspektrum bemerkbar macht, wurde experimentell am

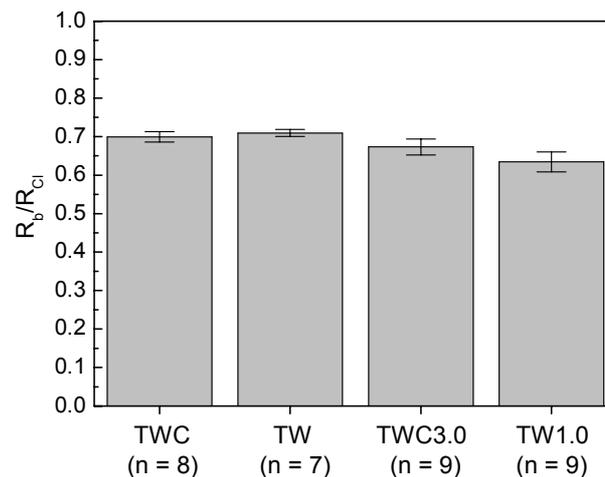
Beispiel von *Transwell*- und *Transwell Clear*-Filtermembranen untersucht. Die Abbildung der Impedanz- und Phasenspektren für Filtermembranen mit und ohne Goldschicht zeigt sich überlagernde Verläufe. Daraus folgt, dass für die Goldschicht keine zusätzlichen Impedanz-elemente zu berücksichtigen sind. Die Auswertungen der Rohdaten zeigen ebenfalls, dass trotz der Goldschicht eine gute Anpassung der Übertragungsfunktion an die Messdaten möglich ist. Es wird keine signifikante Beeinflussung der Elektrodenparameter durch eine Goldschicht auf einer TWC bzw. TW-Filtermembran hervorgerufen. Das gleiche gilt für die Parameter der Zellschicht. Es kann keine Tendenz ermittelt werden, die eindeutig mit einer Goldschicht ober- oder unterhalb der Membran in Zusammenhang gebracht werden kann. Die Werte für die Zellschicht stehen grundsätzlich in guter Übereinstimmung zu Literaturdaten (Lo et al., 1999; Schneeberger und Lynch, 2004) sowie zu den eigenen Untersuchungen dieser Arbeit.

#### 5.4.3.2 Der Einfluss unterschiedlicher Messmodi auf die Modellparameter

Beide Elektrodenkonfigurationen erlauben die Bestimmung der spezifischen Zellschichtkapazität und des parazellulären Widerstandes für dieselbe Zellschicht. Die Vergleichbarkeit des letztgenannten Parameters soll direkt ausführlich diskutiert werden, denn die spezifische Zellschichtkapazität kommt in beiden Modellen mit gleichen Grundannahmen vor, und sollte demnach zu ähnlichen Werten bestimmt werden. Während sich die Beiträge aus den Zell-Zell-Kontakten und dem Adhäsionskontakt im Impedanzspektrum möglicherweise überlagern (s.u.), erfolgt der Beitrag der Zellschichtkapazität zur Gesamtimpedanz in einem höheren Frequenzbereich ( $f > 10^3$  Hz). Die Untersuchungen dieser Arbeit liefern für dieselbe Zellschicht in beiden Messmodi sehr ähnliche Werte für den spezifischen Kapazitätsparameter. So wird zum Beispiel für poröse Elektroden, basierend auf TWC-Filtermembranen, im ECIS-Messmodus die spezifische Zellschichtkapazität zu  $(2.19 \pm 0.06) \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt im TER-Modus zu  $(2.26 \pm 0.05) \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Für die weiteren Elektrodenvarianten wurden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten, die spezifische Zellschichtkapazität wird durch beide Messmodi bzw. durch die Übertragungsfunktionen gleich bestimmt.

In Bezug auf die Werte der modellspezifischen parazellulären Widerstände  $R_b$  und  $R_{Cl}$  werden allerdings signifikante Unterschiede festgestellt. Daher soll der Beitrag zu den jeweiligen Parametern genauer beleuchtet werden: Die Barriere-Eigenschaften der untersuchten epithelialen Zellschichten spiegeln sich im spezifischen elektrischen Widerstand der Zellschicht wider, da der Strom im Zell-Zell-Kontakt die Engstelle der *tight junctions* passieren muss (Schneeberger und Lynch, 2004). Dies ist für Zellschichten mit dichten Zell-Zell-Kontakten weitestgehend zutreffend, da diese Engstelle den Flaschenhals für den Strom entlang des Interzellularspaltes darstellt. Nicht erklären lässt sich auf diesem Weg, weshalb für Fibroblasten, die keine *tight junctions* exprimieren, der gleiche Wert für den spezifischen Wi-

derstand im TER-Modus bestimmt wird wie für Endothelien, die im Gegensatz dazu *tight junctions* ausbilden (Lo et al., 1999). Offensichtlich leistet neben den Zell-Zell-Kontakten ein weiterer Bereich einen Anteil zum Widerstand, der durch das TER-Modell bzw. die Elektrodenkonfiguration nicht genauer spezifiziert werden kann. Quantifiziert man diesen Beitrag, indem die Modell-Parameter  $R_b$  und  $R_{Cl}$  zueinander in Relation gesetzt werden (**Abb. 5.32**), so wird deutlich, dass unter 70 % des spezifischen Widerstandes im TER-Modus tatsächlich aus den Beiträgen der Zell-Zell-Kontakte stammen.



**Abb. 5.32:** Anteil des spezifischen Zell-Zell-Kontakt-Widerstandes  $R_b$  (ECIS-Modus) an  $R_{Cl}$  (TER-Modus) von MDCK II-Zellen auf unterschiedlichen Filtermembranen. TWC:  $(0.70 \pm 0.01)$ , TW:  $(0.71 \pm 0.01)$ , TWC3.0:  $(0.67 \pm 0.02)$  und TW1.0:  $(0.63 \pm 0.03)$ , (Mittelwert  $\pm$  SDM; die Berechnung des jeweiligen Anteils erfolgte auf Ebene der Einzelmessungen eines Zelllayers; es wurde eine größere Anzahl an Messungen ausgewertet, als in den Ergebnissen dargestellt wurden).

Lo et al. (1999) geben für MDCK II-Zellen einen noch niedrigeren Anteil von weniger als 50 % an. Die Autoren setzen allerdings die Ergebnisse für Zellen auf planaren Goldfilmelektroden zu filterkultivierten Zellen in Relation, können also im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit keine Aussagen über das Verhältnis für dieselbe Zellschicht machen. Ein substratspezifisch verändertes Differenzierungsverhalten mag der Grund für die noch deutlichere Überbestimmung im TER-Modus sein. Lo et al. vermuten, dass die Erhöhung der Werte für  $R_{Cl}$  aus einem Beitrag des Zell-Substrat-Kontaktes zur Impedanz resultiert. Ein enger Adhäsionskontakt (der mit einem hohen Wert für  $\alpha$  korreliert) führt zu einer stärkeren Überbestimmung von  $R_{Cl}$ . Im Gegensatz nimmt der Einfluss des Zell-Substrat-Kontaktes ab, je stärker der tatsächliche Beitrag der Zell-Zell-Kontakte ist. Stark verallgemeinert bedeutet das: Sinkt der Quotient aus  $R_b$  und  $\alpha$  steigt die Differenz zwischen dem tatsächlichen Beitrag der Zell-Zell-Kontakte zum parazellulären Widerstand im TER-Modus.

Die Werte für den Parameter  $\alpha$  der vorliegenden Untersuchungen schwanken in Abhängigkeit von der Elektrodenporosität. Allerdings wurde bereits in Kapitel 5.4.2 diskutiert, dass nicht eindeutig feststellbar ist, ob tatsächlich ein größerer Zell-Substrat-Abstand für die signifikant niedrigeren Werte des Parameters  $\alpha$  verantwortlich ist. Am Beispiel der Zellen auf

Elektroden, basierend auf TW-Membranen wird deutlich, dass ein signifikant niedrigerer Parameter  $\alpha$  nicht dazu führt, dass sich die Überbestimmung von  $R_{Cl}$  verringert. Folgt man der Argumentation von *Lo et al.* im umgekehrten Sinne, könnte dies ein Indiz für sehr ähnliche Zell-Substrat-Abstände auf den unterschiedlichen Oberflächen sein. Gleichzeitig gehen die Autoren davon aus, dass das Filtermaterial sowie der Porendurchmesser und die Porendichte einen Einfluss auf die Werte des parazellulären Widerstandes im TER-Modus nehmen. Während das Filtermaterial in allen Messungen der vorliegend Arbeit vollständig durch den Goldfilm der Elektrode überdeckt ist und somit nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte, kann ein Einfluss der unterschiedlichen Porosität untersucht werden. Anhand von Modellrechnungen für den Grenzfall einer einzelnen großen Pore unterhalb einer Zelle im Gegensatz zu vielen kleinen Poren gleicher Fläche bestimmen *Lo et al.*: Je höher die Porendichte und je größer der Porendurchmesser, desto niedriger ist der zusätzlich zu berücksichtigende Anteil am parazellulären Widerstand. Daraus folgt, dass auf Elektroden basierend auf TW-Filtermembranen ein niedrigerer zusätzlicher Anteil bestimmt werden sollte als auf Elektroden die auf TWC-Filtermembranen aufbauen, denn diese besitzen eine deutlich geringere Porendichte. Diese Annahme kann nicht durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Auch die Verdreifachung des Porendurchmessers bei gleicher Anzahl (Elektroden basierend auf TWC3.0- und TW1.0-Membranen) führt zu keiner signifikanten Entwicklung. Berücksichtigt man abschließend die Gesamtporosität<sup>13</sup> (Kapitel 5.1.1) einer Elektrode kann auch hier keine Korrelation zum Beitrag aus dem Zell-Substrat-Kontakt am parazellulären Widerstand bestimmt werden. Für TWC-Filtermembranen wurde die niedrigste Porosität von 0.5 % bestimmt, für TWC3.0-Membranen die höchste (14.1 %). Das Verhältnis von  $R_b$  zu  $R_{Cl}$  bleibt jedoch konstant. Daraus folgt, dass die von *Lo et al.* prognostizierte Entwicklung für das Verhältnis von  $R_b$  zu  $R_{Cl}$  aufgrund unterschiedlicher Porendurchmesser und -dichten des Substrates in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

Inwieweit der Parameter  $\alpha$  mit dem Anteil der Überbestimmung korreliert ist, kann nicht mit Hilfe eines Vergleiches auf unterschiedlichen porösen Elektroden bestimmt werden. Daher wurde als Vergleich zu den MDCK II-Zellen ein künstliches System mit konstant hohen Werten für den Parameter  $\alpha$  aber deutlich niedrigeren parazellulären Widerständen geschaffen. *Reiß* (2004) hat für MDCK II-Zellen gezeigt, dass durch die Inkubation mit Paraformaldehyd der spezifische parazelluläre Widerstand sinkt, während sich die Verhältnisse im Adhäsionskontakt nicht signifikant ändern (das Verhältnis von  $R_b$  zu  $\alpha$  wird kleiner).

In dieser Arbeit wurde im ECIS-Modus nach der chemischen Quervernetzung der zellulären Proteine mit Paraformaldehyd eine drastische Abnahme der parazellulären Widerstände auf maximal 20 % des Ausgangswertes gezeigt. Gleichzeitig wurde für den Zell-Substrat-Kontakt sowie für die spezifische Zellschichtkapazität eine weitestgehende Konservierung der elektri-

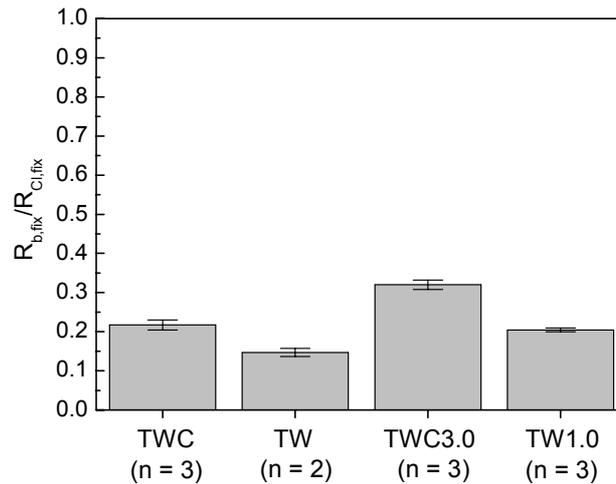
---

<sup>13</sup> Die Porosität wurde definiert als Quotient aus der Porenfläche und der Gesamtfläche.

schen Eigenschaften bestimmt. Möglicherweise führt die Vernetzung der Proteine zu einer Inaktivierung des Proteinkomplexes der *tight junctions* und in Folge dessen zu einer erhöhten Permeabilität. Dies zeigt sich bereits semiquantitativ im Verlauf der Spektren, die Höhe des Plateaus im Bereich von 400 Hz sinkt, die Steigung bleibt erhalten. Reiß konnte darüber hinaus mit Hilfe der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie bestätigen, dass der Zell-Substrat-Abstand durch die Fixierung nicht beeinflusst wird. Die geringe Abnahme der Zellschichtkapazität wurde auf eine Oberflächenverkleinerung durch die Vernetzung der Proteine und den eventuellen Rückzug der Mikrovilli in der Membran zurückgeführt. Der Einfluss der chemischen Fixierung auf die Membran ist dadurch möglich, da die Zellmembran einen erheblichen Proteingehalt von etwa 50 % aufweist (Guidotti, 1972). Nach wie vor liegen die Werte für die spezifische Zellschichtkapazität aber in einem Bereich zwischen  $1.67 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und  $1.73 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

In Bezug auf den Vergleich der beiden Messmodi zeigt die Eigenschaftskombination der fixierten Zellen Ähnlichkeiten zu den von Lo *et al.* (1999) in ihrer Studie eingesetzten Fibroblasten, die aufgrund der fehlenden *tight junctions* nur eine sehr niedrige parazelluläre Barriere ausbilden. Wenn die Überbestimmung des parazellulären Widerstandes im TER-Modus durch den Beitrag aus dem Zell-Substrat-Kontakt verstärkt dann auftritt, wenn der reale Einfluss der Zell-Zell-Kontakte auf die Impedanz sinkt, sollte sich dies am Beispiel der fixierten Zellen eindeutig zeigen.

Wie der Verlauf der Impedanzspektren nach Vernetzung der Proteine bereits vermuten ließ, nehmen auch die für  $R_{Cl}$  erhaltenen Werte deutlich ab. Allerdings fällt die Abnahme weniger deutlich aus als für den Parameter  $R_b$  im ECIS-Modus. Mit Ausnahme von TWC3.0, bei dem  $R_{Cl}$  auf 36 % sinkt, bleibt mindestens 50 % des parazellulären Widerstandes nach der Fixierung erhalten. Daraus resultiert eine größere Differenz zwischen  $R_{Cl}$  und  $R_b$  als für vitale Zellen gezeigt wurde. Abbildung 5.33 gibt analog zu der Übersicht für vitale Zellen den Anteil von  $R_b$  an  $R_{Cl}$  nach der Vernetzung der zellulären Proteine wieder. Erwartungsgemäß sinkt der reale Anteil des parazellulären Widerstandes  $R_b$  am Wert für  $R_{Cl}$ . Mindestens 68 % (TWC3.0) resultiert demnach nach aus einem Beitrag des Zell-Substrat-Kontaktes ( $\alpha$ ).



**Abb. 5.33:** Anteil des spezifischen Zell-Zell-Kontakt-Widerstandes  $R_b$  (ECIS-Modus) am  $R_{C_i}$  (TER-Modus) von MDCK II-Zellen auf unterschiedlichen Filtermembranen nach Vernetzung der Proteine durch PFA. TWC:  $(0.217 \pm 0.012)$ , TW:  $(0.147 \pm 0.011)$ , TWC3.0:  $(0.320 \pm 0.012)$  und TW1.0:  $(0.205 \pm 0.005)$ , (Mittelwert  $\pm$  SDM).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Untersuchungen von *Lo et al.* (1999) in der wesentlichen Aussage, dass der parazelluläre Widerstand von Zellschichten im TER-Modus neben den Zell-Zell-Kontakten von weiteren Faktoren abhängig ist. Eindeutig konnte gezeigt werden, dass bei sinkendem Quotienten von  $R_b$  und  $\alpha$  der Einfluss des Adhäsionskontaktes auf den parazellulären Widerstand im TER-Modus steigt. Aus der Elektrodenanordnung im TER-Modus resultiert, dass nicht zwischen den Beiträgen der Zell-Zell-Kontakte und dem Adhäsionskontakt zu Impedanz differenziert werden kann. Vereinfacht kann damit gesagt werden, dass sich der Parameter  $R_{C_i}$  im TER-Modus aus den Impedanzbeiträgen der Parameter  $\alpha$  und  $R_b$  im ECIS-Modus zusammensetzt. Dass  $R_{C_i}$  durch beide Einzelbeiträge beeinflusst werden kann, ist zu berücksichtigen, wenn  $R_{C_i}$  als sensitiver Parameter für die Quantifizierung morphologischer Veränderungen im Zell-Zell-Kontakt herangezogen wird (Wegeener, 2000). Diese Aussage ist allerdings auch für herkömmliche Permeationsstudien von Bedeutung: Auch eine Permeationssonde muss den Spalt zwischen der Zelle und dem Substrat überwinden, woraus eine wesentliche Beschränkung der Permeationsrate insbesondere bei engem Kontaktbereich entstehen kann. Eine Studie von *Yu und Sinko* (1997) konnte zeigen, dass zusätzlich das Material und die Porosität der Substrate Einfluss auf die Permeationsrate sowie den transepithelialen Widerstand nehmen. Auch *Lo et al.* zeigen anhand von Simulationen, dass die Porendichte und der Porendurchmesser für den spezifischen parazellulären Widerstand zu berücksichtigen ist. Ein signifikanter Einfluss unterschiedlicher Porendurchmesser und Porendichten sowie der Gesamtporosität auf die Überbestimmung von  $R_{C_i}$  konnte in dieser Arbeit hingegen nicht festgestellt werden.

#### 5.4.4 Anwendungsbeispiele für den ECIS-Messaufbau auf porösen und gleichzeitig permeablen Elektroden

Die ECIS-Technik ist in der Lage, morphologische Veränderungen von Zellen mit hoher Sensitivität und Zeitauflösung zu detektieren. Die von *Giaever* und *Keese* (1984) entwickelte Methode blieb jedoch trotz einiger Weiterentwicklungen bisher auf planare Metallfilmelektroden beschränkt. Dadurch sind die Messungen mit dieser Methode auf Zellsysteme limitiert, die auf planaren Elektroden kultiviert werden können. Die Übertragung der Technik auf poröse permeable Elektroden ermöglicht nun die Anwendung der ECIS-Technik auch unter den Bedingungen für Zellmodelle, die permeable Substrate zur spezifischen Differenzierung benötigen. Im Fall der planaren Elektroden ist die Möglichkeit zur chemischen Stimulation der Zellen auf die apikale Zellseite beschränkt. Dagegen kann am Beispiel zur Wirkung einer Collagenase auf MDCK II-Zelllayer gezeigt werden, dass poröse Elektroden den basolateralen Zellzugang ermöglichen. Dieser basolaterale Zugang wurde außerdem dazu genutzt, die spezifische Leitfähigkeit im Adhäsionskontakt zwischen Zellen und Substrat zu modellieren.

##### 5.4.4.1 Zeitaufgelöste Beobachtung der Zellmorphologie auf permeablen Membranen mit der ECIS-Methode

Das Differenzierungsverhalten der Zellen des porcinen *Plexus chorioideus* konnte bisher ausschließlich im TER-Modus untersucht werden, da diese Zellen nur auf permeablen Substraten vollständig ausdifferenzieren (Kapitel 4.4.2.2). Charakteristisch ist, dass nach dem Entzug des Serums aus dem Medium auf permeablen Filtermembranen (TW) ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes sowie eine Zunahme der Zellschichtkapazität in Folge verstärkter Mikrovilli-Ausbildung beobachtet wird (Angelow, 2004; Wegener et al., 2004; Hakvoort, 1998). Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass sich die Veränderungen während der Differenzierung auch auf porösen Goldfilmelektroden in einer Zunahme der parazellulären Widerstände und der Zellschichtkapazität zeigen. Darüber hinaus verändern sich die elektrischen Eigenschaften des Adhäsionskontaktes. Im Gegensatz zum parazellulären Widerstand und zur spezifischen Zellschichtkapazität wird die Veränderung im Parameter  $\alpha$  nicht ausschließlich für Zellen auf permeablem Substrat beobachtet, sondern auch für Zellen auf planarer Vergleichselektrode festgestellt. Der Wert steigt von  $22.0 \Omega^{0.5}\text{cm}$  auf  $35.1 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (+ 37 %).

Für  $R_b$  und  $R_{Cl}$  werden zeitlich parallele Entwicklungen in Form einer Steigerung um 320-325 % bestimmt, die Differenz der Werte bleibt gleich (Anteil von  $R_b$  an  $R_{Cl}$  etwa 70 %). Aufgrund des unter Kapitel 5.4.3.2 diskutierten Zusammenhangs zwischen der Überbestimmung des parazellulären Widerstandes  $R_{Cl}$  im TER-Modus gegenüber  $R_b$  im ECIS-Modus sollte sich allerdings bei steigendem Widerstand der Einfluss des Adhäsionskontaktes auf den Parameter  $R_{Cl}$  verringern. Dies hätte eine Abnahme des Quotienten  $R_b/R_{Cl}$  zu Folge (Lo et al.,

1999). Möglicherweise kompensiert aber die parallele Zunahme von  $\alpha$  von  $25.7 \Omega^{0.5}\text{cm}$  auf  $43.5 \Omega^{0.5}\text{cm}$  (+ 41 %) diesen Effekt. Der Abfall der Messparameter nach Wechsel des Kulturmediums wird auf den damit verbundenen Stress für die Zelle zurückgeführt und stellt keine spezifische Reaktion der Zellen auf das Substrat dar. Im Vergleich der transepithelialen Widerstände zu den Werten für die Kontrollpopulation am Kulturtag 14 wird ein deutlich niedrigerer Wert bestimmt. Ein Wert von  $R_{Cl} = 371 \Omega\text{cm}^2$  im Vergleich zu  $1200 \Omega\text{cm}^2$  lässt auf eine geschwächte Barrierefunktion schließen, die unter Umständen auf die unsterilen Messbedingungen zurückzuführen ist.

Die von *Wegener et al.* (2004) beschriebene Verdoppelung der Zellschichtkapazität innerhalb von 20 h konnte nur in einem geringeren Maße beobachtet werden. 43 h nach Messbeginn unter serumfreien Bedingungen wird eine spezifische Zellschichtkapazität von  $2.30 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmt. Dieser Wert zeigt gute Übereinstimmung zur Kontrollpopulation (Messzeitpunkt etwa 120 h nach Umstellung auf serumfreies Medium) auf herkömmlichen Filtersubstraten. Möglicherweise fand ein Teil der von *Wegener et al.* beschriebenen Entwicklung bereits direkt nach Umstellung auf serumfreies Medium statt und wurde so aufgrund des Messbeginns (3 h nach Umstellung) nicht dokumentiert. Die Werte für die Zellschichtkapazität liegen auf der planaren Elektrode nach 43 h deutlich niedriger ( $1.26 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ), was mit den in Kapitel 4.4.2.2 diskutierten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur eingeschränkten Membranpolarität für Zellen des *Plexus chorioideus* korreliert.

Am Beispiel des porcinen *Plexus chorioideus* konnte demonstriert werden, dass es durch die entwickelten porösen Goldfilmelektroden möglich ist, die Differenzierung des Epithels detailliert mit Hilfe der ECIS-Methode zu untersuchen. Da dazu ein permeables Substrat Voraussetzung ist, konnte dies bisher ausschließlich auf permeablen Filtermembranen ohne Möglichkeit zur Untersuchung des Adhäsionskontaktes durchgeführt werden. Zu berücksichtigen ist in diesem besonderen Fall, dass die Untersuchungen aus labortechnischen Gründen nicht mehrfach durchgeführt werden konnten.

#### **5.4.4.2 Untersuchungen zur apikalen bzw. basolateralen Zugabe einer Protease am Beispiel von MDCK II-Zellen**

Die eingesetzte Collagenase ist *in vivo* eine lysosomale Protease (Karlson et al., 1994), deren Substrat die Collagene sind. Die Collagene bilden Fasern, Fibrillen und Netze, wodurch sowohl hohe Zugfestigkeit als auch Flexibilität erreicht wird. Sie sind Komponenten der Extrazellulären Matrix, über die die Zellen durch spezifische Integrine an das Substrat gebunden sind. Die verwendeten MDCK II-Zellen trennen auf der porösen Elektrode durch einen ausdifferenzierten konfluenten Monolayer ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Im Fall der Zugabe der Collagenase in das apikale Kompartiment wird kein signifikan-

ter Effekt auf die Impedanz bei 400 Hz erzielt. Die Collagenase wird durch das Grenzflächengewebe mit ausgeprägter Barrierefunktion daran gehindert, in den Adhäsionskontakt und damit zur Extrazellulären Matrix vorzudringen. Im Gegensatz dazu verursacht die basolaterale Zugabe eine instantane und deutliche Abnahme der Impedanz auf 70 % des Ausgangswertes. Die Hydrolyse der Collagene führt also nicht zu einem vollständigen Ablösen der Zellkörper innerhalb der Messzeit von etwa acht Stunden. *Schoenenberger et al.* (1994) konnten für MDCK-Zellen zeigen, dass sowohl spezifische Rezeptoren für die Collagene IV und I vorhanden sind, als auch für weitere Komponenten der Extrazellulären Matrix wie Laminin, Vitronektin und Fibronektin. Auch nach Hydrolyse der Collagene verbleiben also durchaus Möglichkeiten für die Zellen, mit der ECM zu interagieren und damit auf dem Substrat zu verbleiben. Der instantane Abfall der Impedanz dokumentiert einen weitgehend ungehinderten Zugang zur Zellunterseite durch die poröse Elektrode. Für die Charakterisierung des Systems wurde es in diesem Fall als ausreichend erachtet, eine Quantifizierung des Effekts bei 400 Hz darzustellen.

#### **5.4.4.3 Elektrische Charakterisierung des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt am barrierebildenden Epithel**

Die Untersuchungen zum Adhäsionskontakt der Zellen sind von großem Interesse, da hier die Verbindung zwischen der lebenden Zelle und technischen Oberflächen hergestellt wird. Insbesondere im Zusammenhang mit elektrischen Methoden wie etwa der Impedanzspektroskopie oder aber den Untersuchungen zur Vernetzung von Neuronen auf Halbleiterchips (u.a.: Fromherz und Stett, 1995; Fromherz, 2001) ist die spezifische Leitfähigkeit im Adhäsionskontakt für die Signalübertragung von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Dimension und des erschwerten Zugangs unterhalb der Zellen sind Untersuchungen in diesem Bereich aber ausgesprochen schwierig umzusetzen. Dementsprechend liegen wenig Erkenntnisse vor. Die FLIC-Mikroskopie (Braun und Fromherz, 1998) ermöglicht die Untersuchung der geometrischen Eigenschaften des Spaltes. Für die eingesetzten MDCK II-Zellen bestimmt *Reiß* (2004) diesen Abstand zu  $(26.8 \pm 1.4)$  nm, was einen vergleichsweise geringen Abstand gegenüber den von *Gleixner* und *Fromherz* untersuchten HEK293-Zellen ( $(76 \pm 1)$  nm) darstellt (2006). Die Interaktion zwischen den Zellen *in vivo* bzw. zwischen den Zellen und dem Substrat *in vitro* ist abhängig von der Ausgestaltung der Extrazellulären Matrix bzw. den Verbindungen der Komponenten mit spezifischen zellulären Rezeptoren (u. a. Integrine). Über die daraus resultierenden elektrischen Eigenschaften im Adhäsionskontakt ist bisher wenig bekannt, die impedanzspektroskopischen Untersuchungen von *Lo et al.* (1995) sowie *Wegener et al.* (2000) ergaben Werte für den Zell-Substrat-Parameter  $\alpha$  von MDCK II-Zellen auf planaren Goldelektroden, die auf einen erhöhten Elektrolytwiderstand im Spalt schließen lassen. *Kiessling et al.* (2000) bestimmen den Schicht- oder Kontaktwider-

stand ( $r_j$ ) im Spalt zwischen Erythrocyten-Einzelzellen und dem Substrat, und stellen einen dem umgebenden Medium um den Faktor vier erhöhten Wert fest. Eine Kombination von FLIC-Mikroskopie und ECIS-Untersuchungen für verschiedene Zellmodelle stellt *Reiß* (2004) vor. Eine annähernde Übereinstimmung der elektrischen Verhältnisse im Adhäsionskontakt und in der *bulk*-Phase wurde von *Reiß* für Zellschichten ohne wesentliche Barriereigenschaften gefunden. In diesem Fall wird von einem freien Austausch von Ionen ausgegangen. Barrierebildende konfluente Zellschichten, wie etwa MDCK II-Zellen, zeichnen sich dagegen durch eine Erhöhung des spezifischen Widerstandes im Spalt gegenüber dem umgebenden Medium aus. *Braun* und *Fromherz* (2004) wiederum konnten mit Hilfe eines spannungsabhängigen Farbstoffs in der Zellmembran den Widerstand im Spalt von MDCK II-Einzelzellen bestimmen und über den Zell-Substrat-Abstand auf den Widerstand des Elektrolyten schließen. Sie finden keine wesentlichen Unterschiede zum Widerstand in der *bulk*-Phase. *Gleixner* und *Fromherz* (2006) beschreiben einen allgemeinen Zusammenhang am Beispiel von HEK293-Zellen, indem sie die Leitfähigkeit im umgebenden Medium variieren und zeigen konnten, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem spezifischen Elektrolytwiderstand im Spalt von Einzelzellen und dem umgebenen Medium der *bulk*-Phase besteht. Eine Erhöhung des Widerstandes im Medium führt zu einer entsprechenden Erhöhung im Adhäsionskontakt. Die Autoren formulieren auf dieser Grundlage das so genannte BRICA-Modell<sup>14</sup>, wonach der Kontaktwiderstand im Spalt ( $r_{sub}$ ) ausschließlich vom spezifischen Widerstand der *bulk*-Phase ( $\rho_{bulk}$ ) und dem Zell-Substrat-Abstand ( $d$ ) abhängt.

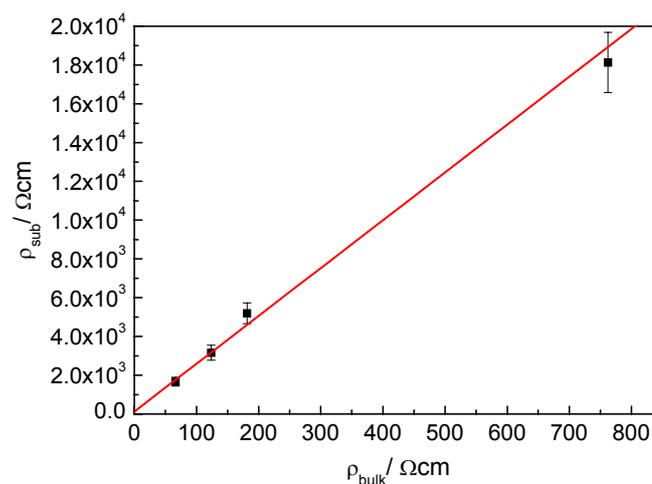
Die vorliegende Arbeit kombiniert die Untersuchungen, indem die spezifische Leitfähigkeit des Adhäsionskontaktes mit Hilfe des ECIS-Parameters  $\alpha$  bestimmt und die Leitfähigkeit des Mediums gezielt variiert wurde. Über den basolateralen Zellzugang auf permeablen Filtermembranen (TWC) konnte gewährleistet werden, dass ein direkter Zugang der unterschiedlichen Pufferlösungen zum Adhäsionskontakt bestand. Das System ist dadurch nicht von einer Diffusion der Ladungsträger über die *tight junctions* abhängig.

Im ersten Versuchsteil wurde der Widerstand in beiden Kompartimenten parallel modifiziert. Bei einem spezifischen Widerstand von ( $66.2 \Omega\text{cm}$ ) in der *bulk*-Phase werden für  $\alpha$  Werte erhalten ( $(19.3 \pm 0.9) \Omega^{0.5}\text{cm}$ ), die in guter Übereinstimmung zu den Werten stehen, die für MDCK II-Zellen auf TWC-Filtermembranen in Medium bestimmt wurden (Kapitel 5.4.2). Unter der Annahme konstanter Zell-Substrat-Abstände, wie sie *Gleixner* und *Fromherz* (2006) für unterschiedliche Leitfähigkeiten am Beispiel für HEK293-Zellen bestimmen konnten sowie konstanter Zellradien, ist der Parameter  $\alpha$  nur noch abhängig vom spezifischen Elektrolytwiderstand. Aus den ermittelten Werten für  $\alpha$  sowie einem Zell-Substrat-Abstand von ( $26.8 \pm 1.4$ ) nm (*Reiß*, 2004) und einem Zellradius von ( $7.9 \pm 0.3$ )  $\mu\text{m}$  (Kapitel 4.2.3.2) wurde  $\rho_{sub}$  errechnet und in Abhängigkeit vom spezifischen Widerstand der *bulk*-Phase dargestellt

<sup>14</sup> BRICA (*Bulk Resistivity In Cell Adhesion*)-Modell:  $r_{sub} = \rho_{bulk}/d$ .

(**Abb. 5.34**). Der spezifische Widerstand im Spalt hängt demnach linear von der spezifischen Leitfähigkeit des umgebenden Mediums ab. Im Gegensatz zu *Gleixner* und *Fromherz* und in Übereinstimmung zu *Reiß* wurden allerdings erhöhte Werte für den spezifischen Widerstand im Adhäsionskontakt im Vergleich zum spezifischen Elektrolytwiderstand der *bulk*-Phase gefunden. Durch die lineare Anpassung an die Messwerte (bzw. errechneten Werte) konnte folgender Zusammenhang bestimmt werden:

$$\rho_{sub} [\Omega cm] = (24.7 \pm 2.1) \cdot \rho_{bulk} [\Omega cm] + (120 \pm 283) [\Omega cm]. \quad \text{Gl. 5.5}$$



**Abb. 5.34:** Mittlerer spezifischer Elektrolytwiderstand im Spalt  $\rho_{sub}$  in Abhängigkeit vom spezifischen Elektrolytwiderstand der *bulk*-Phase ( $\rho_{bulk}$ ).  $\rho_{sub}(66.2 \Omega cm)$ :  $(1700 \pm 200) \Omega cm$  ( $n = 5$ );  $\rho_{sub}(123.5 \Omega cm)$ :  $3200 \pm 400 \Omega cm$  ( $n = 4$ );  $\rho_{sub}(181.5 \Omega cm)$ :  $5200 \pm 500 \Omega cm$  ( $n = 5$ );  $\rho_{sub}(761.0 \Omega cm)$ :  $(18000 \pm 2000) \Omega cm$  ( $n = 3$ ); (Mittelwert  $\pm$  SDM, die Bestimmung der Standardabweichung erfolgt nach dem Gauß'schen Gesetz zu Fehlerfortpflanzung). Die Linie repräsentiert die lineare Anpassung, die Formel befindet sich im Text.

Der spezifische Widerstand im Adhäsionskontakt hängt für das hier untersuchte barrierebildende Grenzflächengewebe (MDCK II-Zellen) linear von dem spezifischen Widerstand der *bulk*-Phase ab. Die errechneten Werte liegen allerdings um das fünfundzwanzigfache über dem Wert für die *bulk*-Phase. Vermutlich nimmt die Extrazelluläre Matrix inklusive der zellulären Rezeptoren sowie die Glykokalix der Zellmembran große Teile des Raumes im Adhäsionskontakt ein. Wechselwirkungen zwischen den Ladungsträgern des Puffers mit diesen Komponenten könnten dadurch die freie Ionenbeweglichkeit so sehr einschränken, dass daraus die beobachtete Widerstandserhöhung resultiert. Weniger wahrscheinlich ist, dass ein zellvermittelter Ionentransport aus dem basolateralen Kompartiment dafür verantwortlich ist. Über die Poren der Elektrode steht der Adhäsionskontakt mit einem Reservoir von etwa 4 ml Puffer direkt in Kontakt, und eine Modifikation dieses Volumens innerhalb der Inkubationszeit erscheint unwahrscheinlich. Dieser Faktor könnte allerdings durchaus eine Rolle spielen, wenn die Zellen auf planaren Substraten untersucht werden, und dadurch ein durch die Zell-Zell-Kontakte weitgehend abgeschlossenes Kompartiment entsteht. Den freien Austausch von Ladungsträgern im Adhäsionskontakt mit der *bulk*-Phase oberhalb der Zellen

macht *Reiß* dafür verantwortlich, dass für Zellen ohne wesentliche Barriereigenschaften eine annähernde Übereinstimmung der elektrische Verhältnisse im Adhäsionskontakt und der *bulk*-Phase bestimmt wurde. Dagegen wird ein Grund für die Korrelation zwischen hohen spezifischen parazellulären Widerständen ( $R_b$ ) und einem hohen Impedanzbeitrag von  $\alpha$  in dem eingeschränkten Austausch der Ladungsträger gesehen (Reiß, 2004).

In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung, dass die Parameter  $R_b$  und  $\alpha$  unabhängig voneinander bestimmt werden können. Die unabhängige Modifikation des spezifischen Widerstandes der *bulk*-Phase im apikalen und basolateralen Kompartiment ermöglicht die gezielte Erhöhung des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt, die sich in einer Verdoppelung der Werte für den Parameter  $\alpha$  widerspiegelt. Gleichzeitig verbleibt der Parameter  $R_b$  weitgehend unverändert. Durch die Erhöhung des spezifischen Widerstandes im apikalen Kompartiment stehen im Zell-Zell-Kontakt weniger Ladungsträger zur Verfügung, woraus ein Anstieg des parazellulären Widerstandes ( $R_b$ ) resultiert. Da für  $\alpha$  ein konstanter Wert bestimmt werden kann, wird aus zellulärer Sicht von einer intakten Barriere zum apikalen Kompartiment ausgegangen. Wichtiger ist jedoch, dass aus messmethodischer Sicht keine Beeinflussung des Parameter  $\alpha$  aus einer Erhöhung von  $R_b$  entsteht. Daraus resultiert, dass durch die impedanzspektroskopischen Messungen im ECIS-Modus eindeutig zwischen den Beiträgen aus dem Zell-Substrat-Kontakt und den Zell-Zell-Kontakten zur Gesamtimpedanz differenziert werden kann.

## 6 Massenspektrometrische 3D-Tiefenprofilierung von tierischen Zellen

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) ist eine Methode, die in erster Linie zur Analyse von Oberflächen entwickelt wurde. Mittels ToF-SIMS gelingt die Detektion einzelner geladener Ionen, geladener Molekülfragmente und von Molekülionen ohne vorherige spezifische Markierung nach Desorption von der untersuchten Oberfläche. Die Methode ermöglicht darüber hinaus, die laterale Verteilung der Ionen auf der Oberfläche der Probe abzubilden. Die Anwendung der ToF-SIMS für biologische Proben stellt allerdings aus mehreren Gründen eine Herausforderung dar. Die meisten Stoffwechselprozesse finden im Zellinneren im wasserreichen Cytosol bzw. in den Membranen statt, und bleiben daher für eine oberflächensensitive Methode verborgen. Zudem können die Zellen nicht lebend untersucht werden. Sowohl die Vakuumbedingungen im Messgerät als auch die hohe Oberflächensensitivität des Verfahrens erfordern eine aufwändige Probenpräparation. Dem gegenüber steht, dass der erfolgreiche Einsatz der ToF-SIMS für Untersuchungen von Zellen und Geweben ein weites Spektrum an Möglichkeiten für die Grundlagenforschung sowie für die Anwendung in biomedizinischen Fragestellungen eröffnen würde.

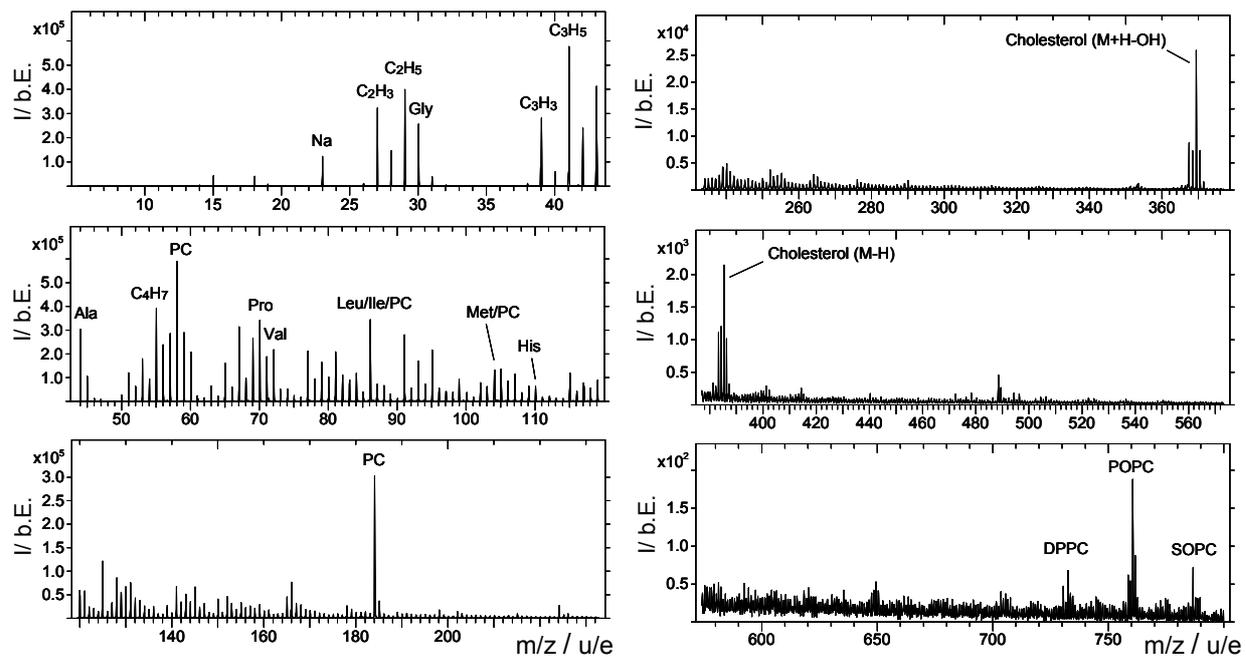
### 6.1 Dreidimensionale Tiefenprofilierung von NRK-Zellen

Zur Analyse der lateralen Verteilung von Molekülen und Ionen werden  $\text{Bi}_3^+$ -Ionen (25 keV) genutzt, analog zu den Untersuchungen in Kapitel 4.3.3. Für die dreidimensionale Untersuchung von Zellen wird dieser Messvorgang um einen Sputterprozess erweitert, welcher dazu dient, die jeweils oberste Monolage der Probe abzutragen, und damit die Zellen schichtweise zugänglich zu machen. Der Sputtervorgang führt zur Ausbildung eines Kraters, wodurch eine neue Oberfläche zur Analyse freigelegt wird. Analyseprozess und Sputterprozess werden alternierend eingesetzt, so dass Oberflächenabbildungen aus verschiedenen Probenebenen aufgenommen werden. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden im sogenannten *dual beam mode* durchgeführt, bei dem Analyseion und Sputterion in unterschiedlichen Ionenquellen generiert werden. Dieses Vorgehen hat gegenüber dem konkurrierenden *single beam mode* – bei dem Analyse- und Sputterquelle identisch sind – zum einen den Vorteil einer höheren zeitlichen Effizienz, zum anderen müssen in diesem Ansatz Analyseion und Sputterion nicht einer identischen Spezies angehören. Somit können die beiden Ionenspezies auf ihren jeweiligen Zweck optimiert gewählt werden. Die auf die laterale Auflösung optimierte  $\text{Bi}_3^+$ -Analysequelle wird im vorliegenden Fall zusammen mit einer  $\text{C}_{60}^+$ -Buckminsterfulleren-Sputterquelle verwendet. Der Sputterprozess (10 kV, 0.6 – 2.5 nA, Sputterstrom auf

der Oberfläche) wurde auf einer Fläche von 300 x 300 µm durchgeführt, die anschließende Analyse ( $\text{Bi}_3^+$ , 25 keV, 0.1 pA auf der Oberfläche) auf einer Scanfeldgröße von 90 x 90 µm. Diese Kombination gewährleistet nach dem derzeitigen Stand der Technik eine minimale Fragmentierung bei der organischen Tiefenprofilierung. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden auf Sekundärionen unterhalb  $m/z = 800$  u/e begrenzt. Diese Begrenzung ergibt sich aus der Kombination einer lateralen Fokussierung des Ionenstrahls auf 300 nm und einer Zykluszeit von 100 µs.

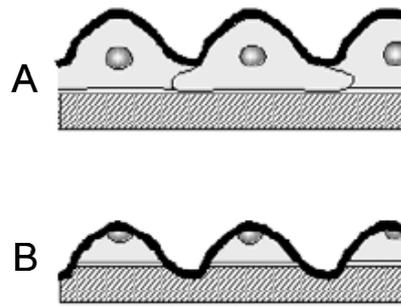
### Massenspektroskopische 3D-Analyse von NRK-Zellen

Die epithel-ähnlichen NRK-Zellen (Klon 52E) wurden auf Deckgläschen kultiviert und fixiert. Im Anschluss daran wurde mit Wasser gespült und durch Eintrocknen dehydratisiert. Durch die Fixierung durch Glutardialdehyd erfolgt durch die Vernetzung der primären Aminogruppen durch den Aldehyd. Auf diese Weise wird die Position der Moleküle (in erster Linie die Proteine sowie die damit verbundenen Strukturen, z. B. die Zellemembran) in den Zellen konserviert (Hoetelmans et al., 2001). Die Untersuchungen am Beispiel von MDCK II-Zellen in Kapitel 4.3.3.2 konnten zeigen, dass durch die chemische Fixierung die grundlegende Struktur der Zellen für das Hochvakuum während einer ToF-SIMS-Messung stabilisiert werden kann. In der Regel wurden die Analyseprozesse mit sieben *scans* im *burst alignment* Modus durchgeführt. Zwischen Sputter- und Analyseprozess wurde eine Pause von zwei Sekunden eingehalten um die Aufladung der Probe durch den Ionenbeschuss zu kompensieren. Die Zuordnung der Sekundärionen im *burst alignment* Modus (hohe Lateralauflösung) wurden durch analoge Untersuchungen im *bunched* Modus mit hoher Massenauflösung bestätigt. Abbildung 6.1 zeigt dazu ein charakteristisches Spektrum, das nach 45 Sputterzyklen mit hoher Massenauflösung aufgenommen wurde. Die Zuordnung der einzelnen Massen wurde durch Referenzspektren von Reinstoffproben durchgeführt. Für die Massenverhältnisse  $m/z < 120$  u/e dominieren Aminosäuren und Kohlenwasserstofffragmente. Einzelne Signale können auch bereits den Fragmenten von Phosphatidylcholin zugeordnet werden. Im Bereich höherer Massen werden ausschließlich Membranbestandteile detektiert. Das Phospholipid Palmitoyl-oleyl-Phosphatidylcholin (POPC) sowie Cholesterol können sogar als intakte Moleküle nachgewiesen werden. Das verdeutlicht, dass auch für relativ hohe Massen die molekulare Information nach dem Sputterprozess erhalten bleibt und intakte Moleküle als Sekundärion freigesetzt werden können.



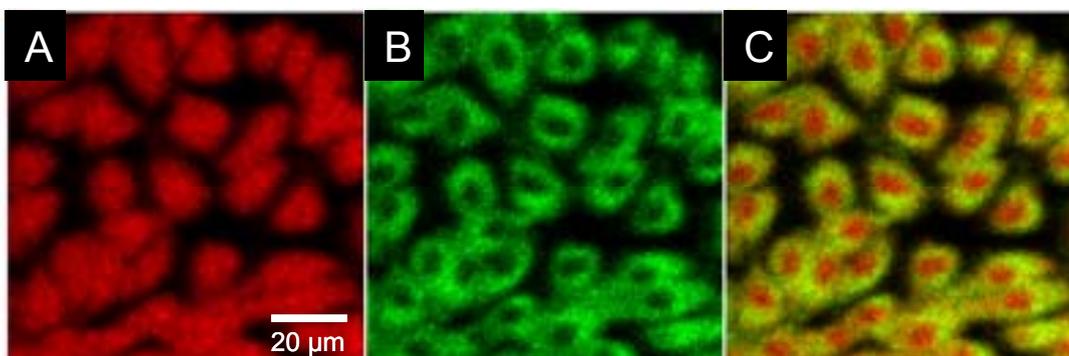
**Abb. 6.1:** Exemplarisches Sekundärionenspektrum, aufgenommen im *bunched*-Modus nach 45 Sputterzyklen ( $\text{Bi}_3^+$ , 25 keV, pos. Polarität). Gly: Glycin; Ala: Alanin; PC: Phosphatidylcholin-Fragmente; Pro: Prolin; Val: Valin; Leu: Leucin; Ile: Isoleucin; Met: Methionin; His: Histidine; DPPC: Dipamitoyl-Phosphatidylcholine; POPC: Palmitoyloleyl-Phosphatidylcholin; SOPC: Stearyloleyl-Phosphatidylcholin.

Für jedes detektierte Ion kann potentiell die Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Position dargestellt werden. Die Aufnahme von Spektren im *bunched* Modus, das heißt mit hoher Massenauflösung, ermöglicht eine eindeutige Zuordnung der Signale zu Molekülfragmenten. In dieser Studie wurde eine Massenauflösung von  $m/\Delta m = 5000$  im *bunched* Modus erreicht. Allerdings ist für diese Messungen die laterale Auflösung eingeschränkt auf einen Bereich von etwa  $1 \mu\text{m}$  (Belu et al., 2003), und Abbildungen der Intensitäten gegen die Probenposition erscheinen daher unscharf. Für die Interpretation der lateralen Intensitätsverteilung im Scanfeld muss berücksichtigt werden, dass jeweils nur die freiliegende Oberfläche untersucht und abgebildet werden kann. Diese sinkt bei jedem Sputterzyklus gleichmäßig im gesamten Scanfeld. Daher wird das Substrat in Abhängigkeit von der Zellhöhe nach einer unterschiedlichen Anzahl von Sputtervorgängen freigelegt. In der charakteristischerweise flacheren Zellperipherie wird das Substrat nach weniger Zyklen erreicht als im Zellzentrum (**Abb. 6.2**). Nicht berücksichtigt werden bei dieser Betrachtung potentiell unterschiedliche Sputterraten aufgrund unterschiedlicher molekularer Zusammensetzungen innerhalb der Zellen.



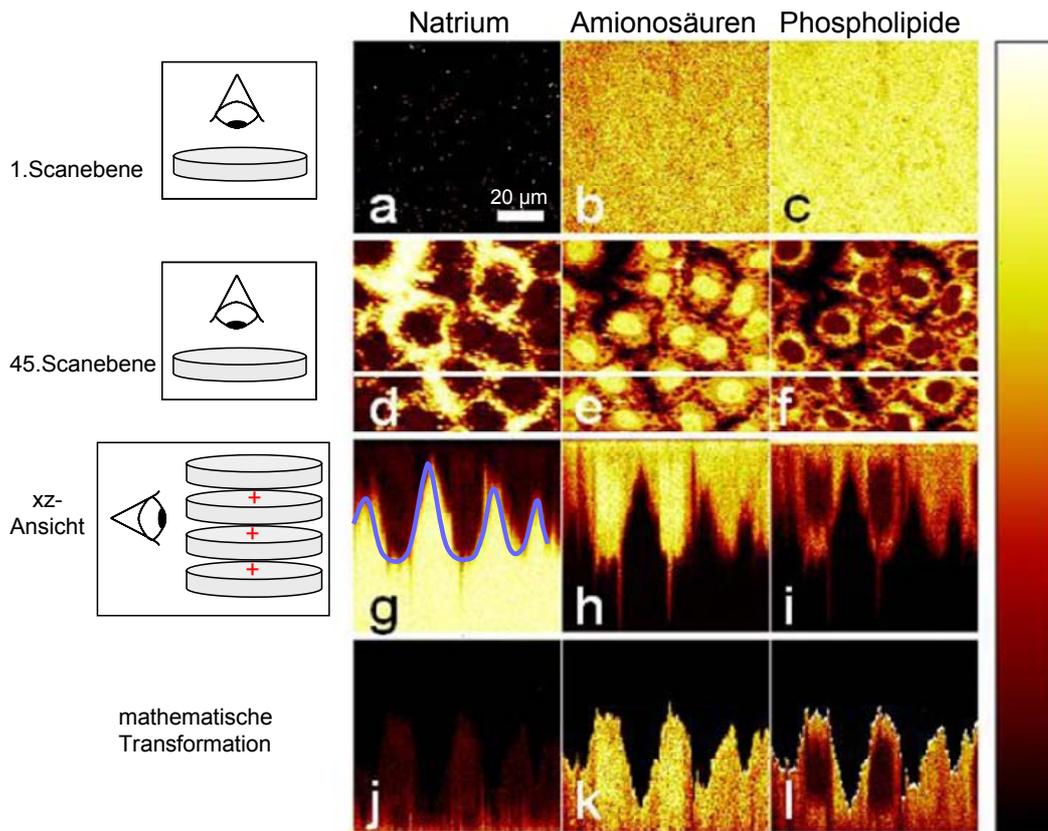
**Abb. 6.2:** Schematische Abbildung eines konfluenten Zellschichtes zu Beginn (**A**) und nach mehreren Sputterzyklen (**B**)

Abbildung 6.3 zeigt die laterale Verteilung der detektierten Ionen am Beispiel der aufaddierten Signale der Aminosäuren und der Fragmente des Phosphatidylcholins an einer Glutaraldehyd-fixierten NRK-Zellprobe nach 40 Sputterzyklen (*bunched* Modus). Die Verteilung der Signale der Aminosäuren (**A**) ist auf einzelne ellipsoide Bereiche konzentriert, während die Phosphatidylcholin-Fragmente (**B**) eher ringförmige Verteilung besitzen. Die unterschiedliche Einfärbung ermöglicht eine Überlagerung der Signale, die die laterale Verteilung der Ionen auf der Oberfläche bzw. die Verteilung relativ zueinander verdeutlicht. Dieser *overlay* (**C**) verdeutlicht, dass die laterale Verteilung der Signale teilweise korreliert. Parallel zu den Phosphatidylcholin-Fragmenten werden Aminosäuren detektiert, was in der Überlagerung durch die Mischfarbe gelb deutlich wird. In der Mitte dieser Ringe verbleibt allein das Aminosäuresignal. Vermutlich wurde durch die Sputterzyklen die apikale Membran abgetragen, so dass das proteinreiche Cytosol bzw. der Zellkern frei liegen. Die Phosphatidylcholin-Signale entstammen demnach der Zellmembran und den Membranen der Zellkompartimente. Der Nachweis der Aminosäuren im Bereich der Membranen könnte möglicherweise auf deren Proteinanteil zurückzuführen sein, der bis zu 50 % betragen kann (Guidotti, 1972). Zwischen den detektierten Signalen verbleiben weite Bereiche der Probe schwarz, das heißt, in diesen Positionen wurde kein Signal für die betrachteten Ionen erhalten.



**Abb. 6.3:** Laterale Verteilung charakteristischer Sekundärionen Glutaraldehyd-fixierter NRK-Zellen im *bunched* Modus ( $\text{Bi}^+$ , 25 keV, pos. Polarität). Im Vorfeld wurden mehrere Sputterzyklen durchlaufen. **A:** aufaddierte Aminosäure-Fragmente, **B:** aufaddierte Phosphatidylcholin-Fragmente. **C:** *overlay* der Signale.

Insbesondere zur Untersuchung von subzellulären Strukturen ist eine höhere Lateralaufklärung als im *bunched* Modus erreicht wird wünschenswert. Daher wurde die dreidimensionale Tiefenprofilierung zum überwiegenden Teil im *burst alignment* Modus durchgeführt. Die Daten mit hoher Massenaufklärung wurden dazu genutzt, die Hauptsignale eines Massenpeaks zu identifizieren. Diese Vorgehensweise wurde in Kapitel 4.3.3.2 bereits für die Masse  $m/z = 115$  u/e vorgestellt, die auf diese Weise dem Indium zugeordnet werden konnte. Abbildung 6.4 gibt eine Übersicht über erhaltene charakteristische Fragmentsignale in Abhängigkeit von der Sputterebene in der positiven Sekundärionenpolarität. Das Natrium-Signal wird als Marker für das natriumhaltige Glas-Substrat genutzt. Dass Natriumionen in der ersten Scanebene nur in geringer Intensität detektiert werden können, zeigt, dass die gesamte Oberfläche konfluent mit Zellen bedeckt ist (a). Sowohl die aufaddierten Signalintensitäten der Aminosäurefragmente ( $m/z = 30$  u/e, 44 u/e, 70 u/e, 101 u/e, 110 u/e, 136 u/e) (b) als auch die Signale der Phospholipide ( $m/z = 58$  u/e, 166 u/e, 184 u/e, 760 u/e) (c) zeigen für die Zelloberfläche eine hohe Intensität ohne eindeutige Kontrastierungen. Durch Referenzspektren konnte die Zuordnung der Nominalmassen zu den Aminosäuren verifiziert werden. Eine kontrastreichere Intensitätsverteilung zeigt sich, wenn 45 Sputterzyklen durchlaufen wurden. Das Natriumsignal tritt in ringförmiger Verteilung sehr hoher Intensität hervor, in dessen Mitte jeweils ein Bereich sehr niedriger Intensität verbleibt (d). Der letztgenannte Bereich deckt sich mit Signalen sehr hoher Intensität für die Aminosäuren (e) und wird aufgrund der Position und der Größe dem Zellkernen zugeordnet. In der Zellperipherie wurde bereits das gesamte Zellmaterial abgetragen. Für die Phospholipide (f) werden ebenfalls ringförmige Verteilungen detektiert, allerdings mit deutlich kleinerem Durchmesser als für die Natriumsignale. Die Signale der Aminosäuren und Phospholipide überlagern sich teilweise, so dass von einer phospholipiddominierten Ringstruktur und einem stark mit Proteinen angeereicherten Kernbereich ausgegangen werden kann. In der darunter abgebildeten xz-Ansicht aller Scans (entlang der in d-f eingezeichneten Linie) für die ausgewählten Signale (g-j) wird der Eindruck der ringförmigen Verteilung für die Phospholipide auch in z-Richtung bestätigt, während für die Aminosäuren die höchste Intensität im Zentrum ermittelt wird. In den Abbildungsteilen j-l werden diese xz-Ansichten nach Koordinatentransformation dargestellt. Die blaue Linie im Abbildungsteil g soll die Ebene der Substratoberfläche, auf die normiert wurde, verdeutlichen. Die xz-Ansicht nach mathematischer Koordinatentransformation gibt allerdings keine realen z-Positionen wieder, denn potentiell unterschiedliche Sputterraten können nicht berücksichtigt werden.



**Abb. 6.4:** ToF-SIMS, 3D-Tiefenprofilierung. Verteilung charakteristischer Sekundärionen GA-fixierter NRK-Zellen. Intensitätsverteilung für Natrium-Ionen, Aminosäure-Fragmente ( $m/z = 30$  u/e, 44 u/e, 70 u/e, 101 u/e, 110 u/e, 136 u/e) und Phospholipid-Fragmente ( $m/z = 58$  u/e, 166 u/e, 184 u/e, 760 u/e) für die 1. Scanebene (**a-c**), die 45. Scanebene (**d-f**) und nach Rekonstruktion in der xz-Ansicht (**g-h**). Die horizontale Linie (**d-f**) zeigt die Ebene der xz-Ansicht. **j-l**: nach mathematischer Koordinatentransformation.

Abschließend kann festgehalten werden, dass es mit Hilfe der massenspektrometrischen Tiefenprofilierung möglich ist, die dreidimensionale, chemische Zusammensetzung der Zellen anhand ausgewählter Fragmentationen grob zu rekonstruieren. Dazu ist keine Markierung einzelner Moleküle notwendig. Die dreidimensionale Rekonstruktion ermöglicht die Zuordnung der Phospholipid-Fragmente zu den Endo- und Exozellmembranen sowie der Aminosäure-Signale zu der proteinreichen Kernregion der Zellen. Die Rekonstruktion unterstreicht, dass die chemische Fixierung zu einem grundlegenden Strukturerehalt der Zellen geführt hat.

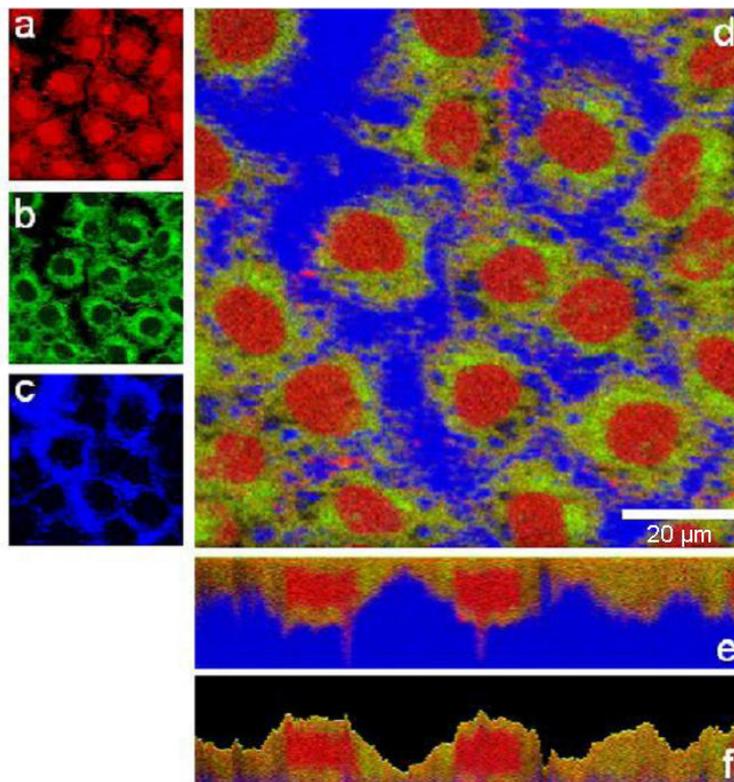
## 6.2 Diskussion

Die dreidimensionale Analyse biologischer Proben kann mit Hilfe unterschiedlicher Techniken untersucht werden. Ein Beispiel, das auch in dieser Arbeit vorgestellt wurde, ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Allerdings kann bei dieser Technik nicht auf eine spezifische Markierung von Zellkomponenten verzichtet werden. Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie ist dagegen eine Methode, die auf dem Beschuss der Probe mit Primärionen und der Desorption sowie anschließender Analyse der Sekundärionen basiert und

ohne eine spezifische Markierung von Molekülen auskommt (Kapitel 4.3.3). Allerdings ist diese Methode auf die Analyse von Oberflächen beschränkt und somit nicht direkt zur dreidimensionalen Untersuchung biologischer Proben geeignet. Die größte Herausforderung für die Abbildung dreidimensionaler Objekte bestand also darin, die verdeckten inneren Bereiche für eine oberflächensensitive Analysemethode zu erschließen. Dies schließt die Wahl einer Präparationsmethode der Proben ein, die zur einem dreidimensionalen Erhalt der Struktur führt und die Verteilung charakteristischer Bestandteile innerhalb der Zellen konserviert. Die Stabilität und Strukturerhaltung im Hochvakuum ( $4 \cdot 10^{-7}$  bis  $1 \cdot 10^{-8}$  mbar Restdruck) Glutardialdehyd-fixierter Zellen wurden am Beispiel von MDCK II-Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Kapitel 4.3.3.2). Mit Hilfe der Fluoreszenzsonde Ethidiumhomodimer konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Komponente im Zellkern ortsfest gebunden bleibt.

Neben den Primärionen zur Analyse, die zu einer Zerstörung der darunter liegenden molekularen Strukturen führen, können auch Primärionen erzeugt werden, die einen Abtrag der Probenoberfläche unter Erhalt der darunter liegenden Molekülschichten erlauben (Benninghoven et al., 1987). Dies wurde zum sequentiellen Abtrag der Probenoberfläche genutzt. In dieser Arbeit wurde eine  $C_{60}^+$ -Quelle eingesetzt. Die Verwendung der  $C_{60}^+$ -Ionen hat sich bewährt, da hier im Gegensatz zu den traditionellen Sputterionen  $O_2^+$  und  $Cs^+$  geringere Zerstörungen in den darunter liegenden Molekülschichten verursacht werden (Weibel et al., 2004). Sogar intakte organische Moleküle überstehen den Prozess (Cheng und Winograd, 2005). Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die für das Phospholipid Palmitoyloleoyl-Phosphatidylcholin (POPC) sowie Cholesterol die intakten Moleküle detektieren konnten. Grundsätzlich sind axiale Auflösungen für organische Materialien von bis zu 10 nm möglich (Wagner, 2005). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beträgt die vertikale Auflösung etwa 100 nm, wobei diese Schätzung aus den Sputterzyklen und einer angenommenen Zellhöhe von 6  $\mu m$  (CLSM-Untersuchungen, Ergebnisse nicht gezeigt) resultiert. Die Lateralauflösung ist vom verwendeten Primärion abhängig, wird darüber hinaus aber entscheidend durch den Messmodus beeinflusst. Im *burst alignment* Modus, der auf eine hohe Lateralauflösung spezialisiert ist, wurde in dieser Arbeit eine Lateralauflösung von 350 nm erreicht (150 - 400 nm; Belu et al., 2003 und Hagenhoff, 2000). Diese hohe Lateralauflösung liegt im Bereich eines optischen Mikroskops und ist für die ortsaufgelöste Massenspektrometrie an biologischen Proben Voraussetzung zur Lokalisation zellulärer Bestandteile. Allerdings wird die Identifikation der detektierten Massen durch die Nominalmassenauflösung im *burst alignment* Modus erschwert. Insbesondere im Fall biologischer Proben deren Komponenten von Kohlenwasserstoffen dominiert sind, ist die Identifikation ohne Vergleichsuntersuchungen mit hoher Massenauflösung nicht eindeutig. Zur hohen Massenauflösung werden die Primärionen durch ein zusätzliches Bau-

teil (*buncher*) auf eine gleichmäßige Geschwindigkeit fokussiert. Dadurch wird die Auftreffzeit der Primärionen in den Bereich von 600 ps reduziert. Aus dieser kurzen Auftreffzeit resultiert eine kleine Zeitspanne zur Desorption der Sekundärionen, woraus ein sehr definierter Startpunkt für die Flugzeitanalyse entsteht. Auf diese Weise konnten die Massen charakteristischen Ionen zugeordnet werden. Abbildung 6.5 verdeutlicht die unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der zugeordneten Ionen bzw. Fragmente im *burst alignment* Modus auf der Oberfläche nach 45 Sputterzyklen. Jeder Bereich eines erhöhten Aminosäuresignals kann einer Zelle im konfluenten Layer zugeordnet werden. Durch eine Korrelationsanalyse (**d** und **e**) wird deutlich, dass das Aminosäuresignal von der Zellmitte zur Peripherie hin abnimmt, während für Phospholipide die gegenteilige Entwicklung beobachtet wird. In dieser Analyse spiegelt sich die charakteristische Verteilung dieser Komponenten in vitalen Zellen wider. Das proteinreiche Areal im Zentrum wird jeweils einem Zellkern, das Signal der Phospholipide den Exo- und Endomembran zugeordnet. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung zu Untersuchungen von *Arlinghaus et al.* (2004), die an kryokonservierten Proben stickstoffreiche Bereiche im Zentrum der Zellen detektiert haben. *Guerquin-Kern et al.* (2005) finden in der Kernregion eine hohe Konzentration von stickstoffhaltigen Kohlenwasserstoffen. Durch die xz-Ansicht (**e**) wird diese Verteilung in der dritten Dimension bestätigt und die Zuordnung untermauert, **f** zeigt die Ansicht nach mathematischer Koordinatentransformation.



**Abb. 6.5:** ToF-SIMS, 3D-Tiefenprofilierung: **d**: Korrelationsanalyse für die Signale der Aminosäuren (**a**, rot), Phospholipide (**b**, grün) und des Substrats (**c**, blau) nach 45 Sputterzyklen **e**: xz-Ansicht, **f**: xz-Ansicht nach mathematische Transformation.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass es möglich ist, mit Hilfe der 3D-ToF-SIMS die dreidimensionale Struktur von adhären Zellen nach chemischer Fixierung abzubilden. Es wird ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von bis zu 800 u/e erreicht. Die Detektion höherer Massen ist aufgrund der Flugzeit bei gleicher Scanfeldgröße nicht sinnvoll. Allerdings könnten dadurch höhermolekulare Verbindungen nicht detektiert werden. Für diese Anwendungen ist die MALDI-MS (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation*-MS) der ToF-SIMS grundsätzlich weit überlegen (Chaurand et al., 1999 und 2004; Stoeckli et al., 2001). Dennoch kann die ToF-SIMS aufgrund des hohen lateralen und vertikalen Auflösungsvermögens wertvolle Informationen über den subzellulären Bereich liefern. Die axiale Auflösung in der MALDI-MS wird durch die Schichtdicke der Proben bestimmt und ist zur Zeit auf 12 µm limitiert (Crecelius et al., 2005). Für die Abbildung der grundlegenden Zellarchitektur hat sich die chemische Fixierung in fluoreszenzmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bewährt (Hoetelmans et al., 2004). Kryofixierte Proben mögen die Verteilung von beweglichen Komponenten, die nicht über das Fixanz erfasst werden können, besser konservieren, benötigen allerdings auch einen deutlich aufwendigeren Versuchsaufbau (Guerquin-Kern et al., 2005). Die Untersuchungen in dieser Arbeit legen nahe, dass zur Detektion der grundlegenden zellulären Strukturen mit Hilfe der ToF-SIMS eine aldehydbasierte chemische Fixierung der Komponenten ausreichend ist. Insbesondere das sequenzielle Sputtern birgt im Fall der komplexen biologischen Proben jedoch die Gefahr eines ungleichen Abtrages auf der Oberfläche. Aus der Komplexität könnten veränderte Sputteraten resultieren. *Guerquin-Kern et al.* (2005) favorisieren daher Einbettungspräparationen in Kunstharz gegenüber dem Eintrocknen von Proben aufgrund geringerer Matrix-Effekte während des Sputtervorgangs. Eine Vorhersage über das Sputterverhalten von biologischen Proben wird aufgrund der Komplexität des Systems dennoch schwierig bleiben.

## **7 Mikromechanik adhärenter Zellen unter osmotischem Stress**

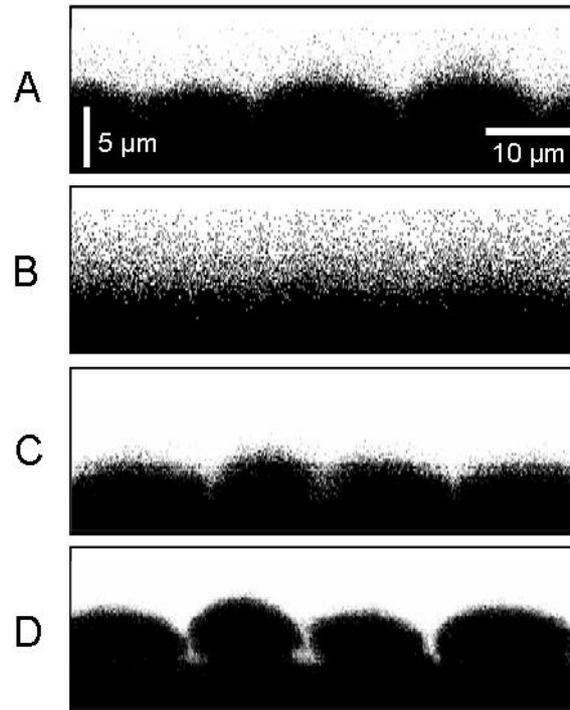
In diesem Teil der Arbeit sollen die morphologischen und mikromechanischen Auswirkungen von osmotischem Stress auf adhärenente Zellen systematisch am CLSM und mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (SFM) untersucht werden. Die Untersuchungen wurden auf planaren Substraten durchgeführt. Auf diesem Wege sollen Interpretationsansätze für das Zellverhalten auf nanoporösen Substraten im Permeationsassay gewonnen werden. Speziell der Einfluss von hyperosmolaren Pufferlösungen, die durch Verdunstung von Wasser während eines Experimentes entstehen könnten, ist von Interesse.

Parallel zu den Untersuchungen am SFM wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am CLSM durchgeführt, um die morphologische Reaktion von Zell-Ensembles zu beobachten. Dazu wurden die konfluenten Zellschichten (MDCK II) zunächst mit isoosmolarem Puffer inkubiert und äquilibriert. Erwartet wurde ein Anschwellen bzw. Schrumpfen der Zellen nach Umstellung auf hypo- bzw. hyperosmolare Pufferlösungen. Um die Effekte fluoreszenzmikroskopisch zeigen zu können, wurde die Fluoreszenzsonde FITC-Dextran (4 kDa, 0.5 mM) in den Pufferlösungen gelöst. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters ist diese Sonde nicht membrangängig. Durch die Verwendung des extrazellulären Fluorophors wird im Gegensatz zur Fluoreszenzmarkierung des Cytoplasmas oder intrazellulärer Zellbestandteile kein direkter Einfluss auf die Zelle genommen. Die Zellen zeichneten sich wie bei den mikroskopischen Aufnahmen zum Permeationsassay (Kapitel 3.3) als dunkle Bereiche gegenüber dem fluoreszenzmarkierten Puffer deutlich ab. Kontrollmessungen zur Bestimmung der Osmolarität zeigen, dass der Einfluss des Fluorophors auf die Gesamtosmolarität der Lösung vernachlässigbar ist. Die Umstellung auf einen Puffer anderer Osmolarität wird jeweils in Form eines Komplettaustausches vorgenommen.

### **7.1 Untersuchung der Zellhöhenänderung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie**

*Kimelberg et al.* (1991) haben vorgestellt, dass sich eine Volumenänderung von Zellen, die über die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte einen konfluenten Layer bilden, im Wesentlichen durch die Änderung der Zellhöhe bemerkbar macht. Die Aufnahmen mit dem CLSM dokumentierten in Übereinstimmung dazu, dass die Zellen auf die unterschiedlichen Osmolaritäten mit Zellhöhenänderungen reagieren. Abbildung 7.1 zeigt exemplarisch anhand von Ansichten in der optischen xz-Ebene der Zellschicht die Zellhöhenänderungen in Abhängigkeit von der Osmolarität. Dargestellt ist hier ausgehend von isoosmolaren Bedingungen

(**A**: 330 mOsm/kg) die Umstellung auf eine hyperosmolare Puffer-Lösung (**B**: 920 mOsm/kg). Die Erhöhung der Osmolarität verursacht eine deutliche Abnahme der mittleren Zellhöhen. Während bei **A** sich die apikalen Bereiche kugelähnlich hervorheben, sind im Abbildungsteil **B** kaum Abrundungen einzelner Zellen zu erkennen. Abbildungsteil **C** und **D** zeigen die Umstellung von isoosmolaren auf hypoosmolare Bedingungen (170 mOsm/kg). Deutlich wirkt sich die Volumenzunahme in der Zellhöhe aus.



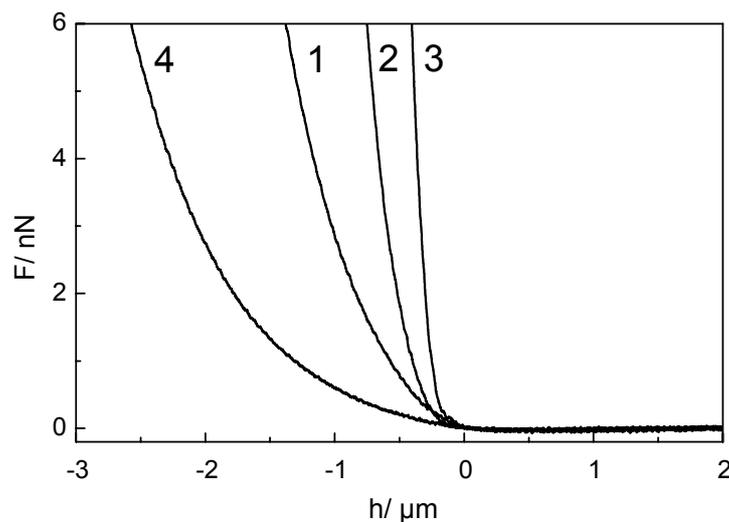
**Abb. 7.1:** Optische xz-Schnitte eines konfluenten MDCK II-Zelllayers bei unterschiedlichen osmotischen Bedingungen. **A**: isoosmolare Bedingungen (330 mOsm/kg); **B**: hyperosmolare Bedingungen (920 mOsm/kg); **C**: isoosmolare Bedingungen; **D**: hypoosmolare Bedingungen (170 mOsm/kg).

## 7.2 Mikromechanik adhärenter Zellen unter osmotischem Stress

Die osmotisch-gestressten Zellen wurden parallel zu den Untersuchungen am CLSM mikromechanisch durch die Aufnahme von sogenannten Kraft-Abstands-Kurven mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht und quantifiziert. Aus diesen Messungen kann ein Wert für den Elastizitätsmodulus errechnet werden, ein Maß dafür, wie stark sich ein Material in Abhängigkeit von einer applizierten Kraft deformieren lässt. Es wurden Elastizitätsmessungen an konfluenten MDCK II-Zellen unter isoosmotischen, hyperosmolaren und hypoosmolaren Bedingungen durchgeführt. Vergleichend dazu wurden Untersuchungen aldehyd-fixierter Zellen durchgeführt. Für diese Aufnahmen wurde ein Kugel-*cantilever* mit einem Kugeldurchmesser von 9 µm genutzt. Im Gegensatz zu einem herkömmlichen SFM-*cantilever*, der aufgrund seiner spitzen Geometrie nur eine sehr kleine Kontaktfläche zur der Oberfläche erzeugt (Öffnungswinkel von  $\alpha = 20 \pm 5^\circ$ ), wird durch die Kugelgeometrie eine große Auflagefläche erhalten. Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass die Membran der Zellen unverletzt

bleibt. Allerdings ist die breite Auflagefläche ungeeignet zur Abbildung der Zelloberfläche. Darüber hinaus kann nicht eindeutig zwischen einem Kontakt in der Region des Zellkerns oder der Peripherie der Zellen unterschieden werden. Für diese Untersuchungen, für die eine präzise Positionierung nötig ist, wurden zusätzlich Messungen, mit einem herkömmlichen *cantilever* mit spitzer Geometrie durchgeführt.

Abbildung 7.2 zeigt exemplarisch Kraft-Abstandskurven konfluenter MDCK II-Zellschichten für die verschiedenen osmotischen Bedingungen aufgenommen mit einem Kugel-*cantilever*. Dargestellt ist die Kraft  $F$  in Abhängigkeit von der Piezo-Auslenkung  $h$ . Kurve 1 zeigt den Verlauf von  $F$  unter isoosmotischen Bedingungen. Nach einer Annäherungsphase mit konstanter Kraft steigt nach der Kontaktaufnahme zur Oberfläche die Kraft bei weiterer Annäherung stark an. Die schrittweise Erhöhung der Osmolarität auf zunächst 660 mOsm/kg (Kurve 2) dann 920 mOsm/kg (Kurve 3) führte zu einer Zunahme der Steigung und damit zu einer Steigerung der Steifigkeit der Zellkörper. Die Steifigkeit ist als Ableitung der Kurve im Kontaktbereich definiert. Das gegenteilige Ergebnis wurde erhalten, wenn unter hypoosmolaren Bedingungen der *cantilever* an die Zelloberfläche angenähert wurde (Kurve 4).



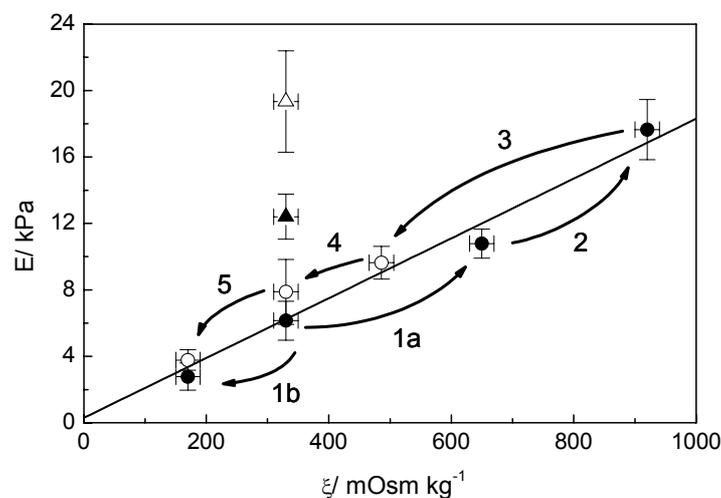
**Abb. 7.2:** Kraft-Abstands-Kurven konfluenter MDCK II-Zellen bei unterschiedlichen Osmolaritäten des umgebenden Mediums. 1: isoosmolar, 330 mOsm/kg; 2: hyperosmolar, 660 mOsm/kg; 3: hyperosmolar, 920 mOsm/kg; 4: hypoosmolar, 170 mOsm/kg. Die Messungen wurden mit einem Kugel-*cantilever* durchgeführt.

Aus diesen Rohdaten kann der Young-Modulus durch Anwendung des Modells von *Hertz* und *Sneddon* (Hertz, 1882; Sneddon, 1965) als quantitatives Maß für die Elastizität errechnet werden. Der Einfluss unterschiedlicher Viskositäten der Lösungen (Janovjak et al., 2005) sowie die Geschwindigkeit der Annäherung des *cantilevers* werden berücksichtigt (A-Hassan et al., 1998, Hoh und Schoeneberger, 1994), hier aber nicht näher betrachtet (s. dazu: Stellenkamp, 2006). Abbildung 7.3 fasst die Ergebnisse zusammen, indem der Elastizitätsmodulus  $E$  in Abhängigkeit von der Osmolarität  $\xi$  des Puffers dargestellt wird. Die Osmolarität wurde schrittweise erhöht (●, 1a - 2) und im Anschluss daran wieder erniedrigt (○, 3 - 5 und

1b). Den einzelnen Punkten liegen jeweils mehr als 70 individuelle Kraftkurven zugrunde. Die Messwerte zeigen, dass die Reaktion der Zellen vollständig reversibel ist, es wird keine unmittelbare Schädigung hervorgerufen. Die Zu- bzw. Abnahme der Elastizitätsmoduli zeigt einen linearen Zusammenhang zur Osmolarität der Lösung. Die lineare Regression ergibt:

$$E = (0.3 \pm 0.8) [kPa] + (18 \pm 2) \cdot 10^{-3} \left[ \frac{kPa}{mOsm/kg} \right] \cdot \xi \left[ \frac{mOsm}{kg} \right]. \quad \text{Gl. 7.1}$$

Unter isoosmotischen Bedingungen zeigen vitale MDCK II-Zellen einen Wert von  $(6.2 \pm 1.2)$  kPa für den Young-Modulus, dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Mathur et al.* (2001), die einen Wert von 5 - 7 kPa für MDCK II-Zellen fanden.



**Abb. 7.3:** Elastizitätsmodul (Youngs-Modulus)  $E$  als Funktion der Osmolarität  $\xi$  für native und aldehydfixierte MDCK II-Zellen gemessen mit einem Kugel-*cantilever*. Die Osmolarität wurde schrittweise erhöht ( $\bullet$ , 1a - 2) und im Anschluss daran erniedrigt ( $\circ$ , 3 - 5 und 1b). Die Linie zeigt die lineare Regression (Gleichung 7.1). Zum Vergleich wurden fixierte Zellen ( $\Delta$ : GA,  $\blacktriangle$ : PFA) unter isoosmotischen Bedingungen vermessen ( $n$  für alle Messungen  $> 70$ , Mittelwert  $\pm$  SDM).

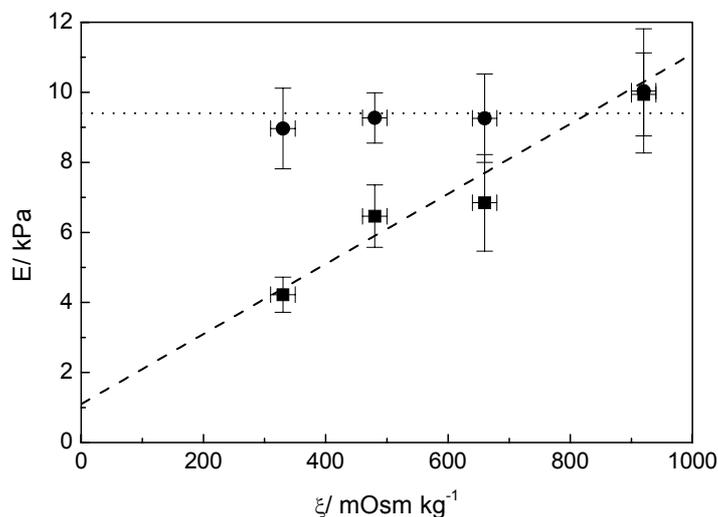
Die Zunahme der Elastizitätsmoduli unter hypertonen Bedingungen spiegelt die zunehmende Steifigkeit der Zellkörper wider, unter hypotonen Bedingungen sind die Zellen weicher. Zum Vergleich wurden unter isotonen Bedingungen aldehydfixierte Zellen gemessen. Für Paraformaldehyd ( $\blacktriangle$ , 4 % (w/v) in PBS<sup>++</sup>) wurde ein mittlerer Elastizitätsmodulus von  $(12.4 \pm 1.4)$  kPa ermittelt, für Glutardialdehyd ( $\Delta$ , 2.5 % (v/v) in PBS<sup>++</sup>) ein Wert von  $(19.3 \pm 3.0)$  kPa. Beide Werte zeigen also eine deutliche Versteifung der Zellen an. Es werden ähnliche Änderungen erreicht wie unter hyperosmolaren Bedingungen ( $\xi > 660$  mOsm/kg), wobei durch die Fixierung der Zellen mit Glutardialdehyd der höchste Wert der gesamten Untersuchungen ermittelt wurde. Dies wird mit der Ausbildung eines festen Netzwerkes erklärt, dass sich durch die Quervernetzung der zellulären Proteine durch den Aldehyd bildet.

Ergänzend zu den Messungen mit einem Kugel-*cantilever* wurde der Einfluss unterschiedlicher Osmolaritäten auch mit einem *cantilever* der herkömmlichen Spitzengeometrie unter-

sucht. Durch die veränderte Geometrie der Auflagefläche ist es möglich, die Position auf der Probe genau zu bestimmen, birgt allerdings die Gefahr des Eindringens der Spitze in die Membran. Es lässt sich dadurch zwischen Kraft-Abstands-Kurven, die aus der zentralen Region der Zelle (oberhalb des Kernes) stammen und solchen aus der Peripherie unterscheiden. Die Elastizitätsmoduli als Funktion der Osmolarität in der Region des Zellkerns (●) und der Peripherie (■) sind in Abbildung 7.4 dargestellt. Jeder Messpunkt repräsentiert mindestens 60 Einzelkurven. Der Young-Modulus der zentralen Region der Zellen ist offensichtlich unabhängig von der Osmolarität des umgebenden Mediums, während in der Peripherie ein linearer Zusammenhang zwischen der Elastizität  $E$  der Probe und der Osmolarität der Lösung gefunden wird. Die lineare Regression ergibt:

$$E = (1.1 \pm 1.5) [kPa] + (10 \pm 4) 10^{-3} \left[ \frac{kPa}{mOsm/kg} \right] \cdot \xi \left[ \frac{mOsm}{kg} \right]. \quad \text{Gl. 7.2}$$

Im Bereich des Zellkernes werden unter hyperosmolaren Bedingungen keine mikromechanischen Veränderungen erzeugt. Das lässt auf eine im Vergleich zur Peripherie bereits recht komprimierte Struktur schließen, die von einem Wasserentzug in Bezug auf die Elastizität unbeeinflusst bleibt. Auch unter isotonen Bedingungen werden für die Kernregion bereits Werte erreicht, die in der Peripherie in hyperosmolaren Pufferlösungen mit einer Osmolarität von etwa 920 mOsm/kg erreicht wurden. Im Vergleich zu den Messungen mit einem Kugelcantilever wird eine leichte Verringerung in der Steigung der Regressionsgeraden für den peripheren Zellbereich errechnet.



**Abb. 7.4:** Elastizitätsmodulus (Young-Modulus)  $E$  als Funktion der Osmolarität  $\xi$  nativer MDCK II-Zellen gemessen mit einem herkömmlichen, spitzen *cantilever*. ● Messungen des Elastizitätsmodulus oberhalb des Zellkerns, ■ Messungen in der Zellperipherie (lineare Regression, Gleichung 7.2); ( $n > 60$ , Mittelwert  $\pm$  SDM).

### 7.3 Diskussion

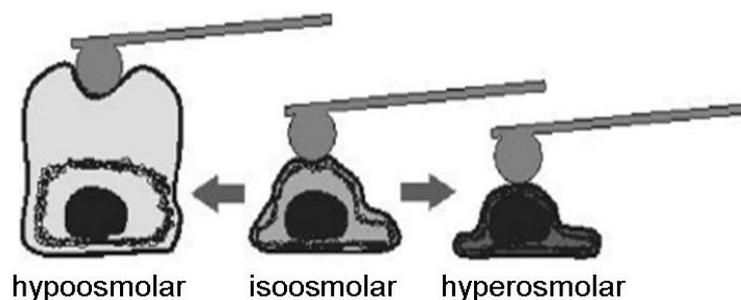
In diesem Kapitel wurden die Auswirkungen von osmotischem Stress auf die Mikromechanik von adhärenten Grenzflächengeweben untersucht. Parallel dazu wurden unter gleichen Bedingungen die Zellhöhenänderungen beobachtet. Den Hintergrund für diese Untersuchungen lieferten ursprünglich die Untersuchungen zum lateral aufgelösten Permeationsassay. Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau des Permeationsassays am CLSM muss aufgrund der Verwendung eines Tauchobjektives über längere Zeit offen stehen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Osmolarität der Pufferlösungen durch die Verdunstung von Wasser mit zunehmender Experimentierzeit erhöht wird. Neben den vielfältigen physiologischen Konsequenzen für die Zellen würde eine Veränderung der Morphologie auch Auswirkungen auf die Spaltgeometrie zwischen und unter den Zellen nehmen (Kimmelberg et al., 1991). Das wiederum würde zu einer Veränderung der Barrierefunktion der Zellen führen, wodurch die Aussagekraft des Assays geschwächt würde.

Grundsätzlich stellt die Zellmembran für Wasser keine Barriere dar (Alberts et al., 1995). Daraus folgt, dass Wasser quasi ungehindert durch die Membran diffundieren kann. Die hier untersuchten tierischen Zellen besitzen im Gegensatz zu pflanzlichen Zellen keine Zellwand, so dass kein „Exoskelett“ vor osmotischem Stress bzw. unkontrolliertem Anschwellen und Schrumpfen schützt. Auch tierische Zellen können *in vivo* jedoch innerhalb enger Grenzen durchaus Veränderungen der osmotisch wirksamen Teilchenkonzentration tolerieren, extreme Bedingungen etwa aufgrund von Wassermangel über längere Zeit führen jedoch zum Zelltod (O'Neill, 1999). *Guilak et al.* (2002) untersuchen den Einfluss von osmotischem Stress auf vitale Knorpelzellen und verwenden z. B. Osmolaritäten zwischen 550 und 460 mOsm. Auch unter physiologischen Bedingungen müssen jedoch Mechanismen ablaufen, die der Osmoregulation der Zellen dienen (O'Neill, 1999). Aus einer Osmolarität von ca. 300 mOsm/kg im Extrazellularraum resultiert zusammen mit dem hohen Proteingehalt in den Zellen ein osmotischer Druck, der zu einem Wassereinstrom in die Zelle führen würde. Die Zellen reagieren darauf, indem sie anorganische Ionen wie z.B. Natrium aktiv nach außen pumpen und so den Überschuss an gelösten organischen Substanzen in der Zelle ausgleichen. Durch den aktiven Transport und dem daraus resultierenden Ungleichgewicht für Teilchen und Ladungen pendelt sich ein Gleichgewicht ein (Gibbs-Donnan-Effekt, Alberts et al., 1995). Unter Stressbedingungen sind einige Zellen in begrenztem Maße zusätzlich zu dem sogenannten *Regulatory Volume Decrease* (RVD) unter hypoosmolaren Bedingungen und in selteneren Fällen zum *Regulatory Volume Increase* (RVI) in hyperosmoaler Umgebung in der Lage (O'Neill, 1999). Der RVD basiert auf Prozessen, die in der Folge zu einem passiven Wasserstrom aus der Zelle führen. Darunter ist der gezielte Ausstrom von organischen Ionen sowie Kalium- und Chloridionen und die Aktivität der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Tauscherpumpen. Die Prozesse des RVI führen dagegen durch die Erhöhung der Natrium- und Chloridionenkonzentra-

tion im Zelllumen sowie der Konzentration organischer Ionen zu einem nachfolgenden Wassereinstrom in den Zellkörper. Daneben können auch  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Tauscherpumpen sowie der  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ -Tauscher eine Rolle spielen (O'Neill, 1999). Wie bereits erwähnt sind allerdings nicht alle Zellen zu diesen „Notfall-Reaktionen“ in der Lage. In Abhängigkeit von den gewebespezifischen Eigenschaften, bzw. abhängig von den individuellen Charakteristika der Zelllinie, zeichnet sie eine unterschiedliche Osmotoleranz aus. Für MDCK II- Zellen, die aus dem Nierentubulus eines Hundes isoliert wurden, kann aufgrund der zum Teil extremen osmotischen Bedingungen in der Niere ein relativ hohes Maß an Osmotoleranz unterstellt werden, es sind dazu jedoch bisher keine mikromechanischen Untersuchungen beschrieben. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ein RVI bzw. RVD nicht explizit untersucht. Das heißt, es wurden keine Untersuchungen zur Aktivität von Ionenkanälen oder -pumpen durchgeführt. Allerdings konnte sehr wohl beobachtet werden, dass auch unter den extremen hyper- und hypoosmolaren Bedingungen keine Ruptur bzw. irreversibles Schrumpfen der Zellen hervorgerufen wurde.

Nach *Kimelberg et al.* (1991) werden Volumenänderungen für Zellen in einem konfluenten Monolayer mit Zell-Zell- sowie Zell-Substrat-Kontakten durch Zellhöhenänderungen detektierbar. Die Autoren beschreiben für hyperosmolare Bedingungen eine Abnahme der Zellhöhen, unter hypoosmolaren eine Zunahme. In Übereinstimmung zu diesen Arbeiten stehen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit, die eine Zunahme der Zellhöhe unter hypoosmolaren Bedingungen und eine Abnahme bei hyperosmolarer Pufferlösung zeigen. Den gleichen Effekt konnten *Schneider et al.* (2000) mit Hilfe von AFM-Messungen zeigen. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit setzten die Autoren das AFM jedoch ausschließlich zur Zellhöhenbestimmung ein, nicht zur Analyse des elastischen Verhaltens. In der vorliegenden Arbeit wird in isotoner Umgebung ein *Young-Modulus* von  $(6.2 \pm 1.2)$  kPa bestimmt, in guter Übereinstimmung dazu geben *Mathur et al.* (2001) für MDCK II-Zellen einen Wert von 5 - 7 kPa an. Unter hyperosmolaren Bedingungen steigen die Elastizitätsmoduli für die Zellen deutlich an und erreichen Größenordnungen, die auch für aldehydfixierte Zellen bestimmt werden konnten. Es wird vermutet, dass unter hyperosmolaren Bedingungen und dem damit verbundenem Wasserausstrom eine reversible Kondensation des Cytoskeletts der Zellen verursacht wird. Diese führt zu sehr ähnlichen elastischen Eigenschaften, wie sie durch die chemische Quervernetzung der zellulären Proteine verursacht wird. Eine analoge Beobachtung für fixierte Zellen und Zellen unter hyperosmolaren Bedingungen konnte *Reiß* (2004) mit Hilfe der Quarzmikrowaage machen. Die Vernetzung der zellulären Proteine sowie eine Messung unter hyperosmolaren Bedingungen äußern sich jeweils in einem Anstieg des Dämpfungswiderstandes. Im Fall der chemischen Fixierung wird die mechanische Veränderung des Aktin-Cytoskeletts für die Signalentwicklung verantwortlich gemacht, denn *Reiß* konnte zeigen, dass eine Zerstörung des Aktincytoskeletts

durch Cytochalasin D vor Inkubation mit einem Fixanz zu einem deutlich reduzierten Anstieg im Dämpfungswiderstand führte. Für das Cytoskelett zeigt *Henson* (1999), dass Veränderungen in Form von Rupturen der Aktinbündel durch osmotischen Stress hervorgerufen werden können. Im Zusammenhang mit der Zellvolumenregulation, die wie oben beschrieben auf Prozesse in der Zellmembran bzw. Transportaktivitäten für osmotisch und elektrisch wirk-same Teilchen zurückgeführt wird, werden den Veränderungen am Cytoskelett zudem regula-torische Einflüsse für den RVI bzw. RVD unterstellt (*Henson*, 1999). Unter Berücksichti-gung der genannten Studien lässt sich vermuten, dass auch für die vorliegenden Ergebnisse das Aktingerüst der Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Da das Anschwellen der Zellen schneller verläuft als eine Reorganisation des Cytoskeletts stattfinden kann, löst sich die Plasmamembran vom darunterliegenden Cytoskelett ab. Die Kraft, die in rasterkraftmikro-skopischen Untersuchungen dem *cantilever* entgegenwirkt, nimmt ab, da die abgelöste Membran nicht mehr von Cytoskelett unterstützt wird. Abbildung 7.5 zeigt dazu eine schema-tische Übersicht.



**Abb. 7.5:** Schematische Darstellung zum Einfluss von osmotischem Stress auf konfluente MDCK II-Zellen. Ausgehend von isoosmolaren Bedingungen löst sich unter hypoosmolaren Bedingungen die Membran vom Cytoskelett. Im hyperosmolaren Fall bewirkt der Wasserverlust im Cytoplasma ein Schrumpfen und die Kondensation des Cytoskeletts. Beide Prozesse sind reversibel.

SFM-Messungen, die eine Differenzierung zwischen Kernbereich und Peripherie der Zelle unter hypertonen Bedingungen zulassen, zeigen, dass die Veränderung des elastischen Ver-haltens nur für den Bereich der Zellperipherie stattfindet. Im Zellkern der Eukaryonten ist die DNA mit Proteinen und RNA eng vergesellschaftet. Unter diesen Proteinen spielen die Histone eine besondere Rolle, indem sie durch basische Aminosäuren die Ladung der Phos-phatgruppen der DNA neutralisieren und so die dichte Packung der DNA im Zellkern wäh-rend der Interphase ermöglichen (*Koolmann*, 1998). Offensichtlich ist diese dichte Packung bereits so stark komprimiert, dass ein Wasserentzug aus dem Cytosol unter hyperosmolaren Bedingungen keine weitere Versteifung des Materials bewirken kann. Die Ergebnisse legen außerdem nahe, dass für die verwendeten Epithelien ober- bzw. unterhalb des Zellkerns kaum Raum durch das Cytosol eingenommen wird. Daher ist es möglich, dass für Zellen mit einem im Verhältnis zur Gesamtgröße kleineren Kern ein anderes Ergebnis erhalten werden würde. Die Untersuchungen in der Zellperipherie unterstützen die Vorstellung, dass die me-

chanischen Eigenschaften von Zellen zu großen Teilen durch die Eigenschaften des Aktin-Cytoskeletts bestimmt werden. Die Membran der Zellen dagegen wirkt als eine elastische Haut, die die Volumenänderungen ermöglicht bzw. toleriert.

Wie eingangs des Kapitels erwähnt, ist nicht auszuschließen, dass während der Untersuchungen zum Permeationsassay eine Erhöhung der Osmolarität im Puffer stattfindet. Neben den Auswirkungen auf die Spaltgeometrie führt dies möglicher Weise dazu, dass die Zellen schrumpfen und dabei Membrananteile näher an die Substratoberfläche rücken als unter isoosmolaren Bedingungen. Ein Ansatz, diesen Effekt fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen, musste leider aufgrund des zu geringen axialen Auflösungsvermögens des CLSM und der Reflexion an der Substratoberfläche verworfen werden. Nichts desto trotz kann eine partielle Annäherung der Membran unter leicht hyperosmotischen Bedingungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden, und bietet einen möglichen Erklärungsansatz für das in Kapitel 3.3.2.1 beschriebene Phänomen der „schwarzen Poren“ im Zusammenhang mit der Verwendung von NRK-Zellen im lateral aufgelösten Permeationsassay.

## 8 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines orts aufgelösten Permeationsassays zur Untersuchung der Substratpermeation über barrierebildende Grenzflächengewebe vorgestellt. Grundlage dieses Assays bildeten nanoporöse Silizium-Chips mit halbseitig geöffneten Poren, die neben ihrer Funktion als Kultursubstrat gleichzeitig als sensorische Oberfläche genutzt wurden. Die Poren der Substrate ( $d \sim 1 \mu\text{m}$ ) dienten als Auffangbehälter für Sondenmoleküle am Ort des Übertritts über die Zellschicht. Die eingesetzten Siliziumoberflächen erwiesen sich als cytotokompatibel. Ein zelltypischer Differenzierungszustand konnte durch immunocytochemische Vergleichsuntersuchungen ausgewählter Marker für MDCK II-Zellen nachgewiesen werden, bei primärkultivierten Epithelzellen des porcinen *Plexus chorioideus* blieb die Differenzierung unvollständig. Am Modell der MDCK II-Zellen wurde durch mikroskopische Abbildung der lateralen Porenfüllung am Beispiel einer parazellulär diffundierenden fluoreszenzmarkierten Sonde festgestellt, dass das Konzept des lateral aufgelösten Permeationsassays zur Dokumentation des Permeationsweges geeignet ist. Die laterale Diffusion der Sonde im Kontaktbereich zwischen Zelle und Oberfläche wirkt sich insbesondere im Fall weiter Zell-Substrat-Abstände limitierend auf die laterale Auflösung des Assays aus. Für die Entwicklung eines massenspektrometrischen Auslesens der Porenfüllung mit Hilfe der ToF-SIMS konnte der notwendige Zugang zu den von den Zellkörpern abgedeckten Poren durch eine kombinierte Fixierung mit einem Methanol/Eisessig-Gemisch erzielt werden. Der Nachweis der Analyten in den Poren bedarf weiterer Optimierung.

Im Zentrum des zweiten Teils der Arbeit stand eine Übertragung der bislang nur für planare, impermeable Elektroden beschriebenen ECIS-Technik auf poröse Elektroden. Durch das Aufbringen eines Goldfilmes auf die Silizium-Chips und permeablen Filtermembranen wurde deren Oberflächenstruktur übernommen und poröse Goldfilmelektroden erzeugt. Der direkte basolaterale Zugang ist auf porösen Elektroden basierend auf Silizium-Substraten nicht möglich. Die Analyse der Impedanzspektren nach dem ECIS-Modell ist für beide Systeme möglich und erlaubt dadurch Aussagen bezüglich der elektrischen Eigenschaften von Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakten sowie der Kapazität der Plasmamembran. Die Porosität der Elektrode erniedrigt die Beiträge der Elektrodengrenzfläche zur Gesamtimpedanz und erhöht somit die Sensitivität der Messung.

Bei Verwendung von Elektroden auf Basis poröser Filtermembranen lassen sich durch die durchgehenden Poren zwei Messmodi kombinieren, die sich durch die Position der Elektroden unterscheiden. Während bei Messungen im ECIS-Modus die Arbeitselektrode gleichzeitig auch als Substrat dient, ist im TER-Modus kein direkter Kontakt der Zellen zur Elektrode vorhanden. Der Vergleich der Modellparameter derselben Zellen aus beiden Messmodi (ECIS- und TER-Modus) konnte zeigen, dass bei der weit verbreiteten Methode zur Bestim-

mung des transzellulären Widerstandes auf permeablen Filtermembranen (TER-Modus) neben dem Beitrag durch die Zell-Zell-Kontakte ein erheblicher Anteil der Impedanz zusätzlich aus dem Adhäsionskontakt stammt.

Die porösen Elektroden erlauben den experimentellen Zugang zur basolateralen Zellseite. Die poröse Struktur ermöglicht daher auch die gezielte Modulation des spezifischen Widerstandes im Adhäsionskontakt. Die systematische Variation des spezifischen Elektrolytwiderstandes zeigt zweifelsfrei auf, dass der spezifische Widerstand im Adhäsionskontakt gegenüber der *bulk*-Phase erhöht ist und dass die Parameter  $R_b$  und  $\alpha$  aus dem ECIS-Modell unabhängig voneinander bestimmt werden.

Aus den beiden vorstehend beschriebenen Arbeitsschwerpunkten ergaben sich zwei weniger umfassende Nebenprojekte. Durch Kombination einer massenspektrometrischen Oberflächenanalyse mit dem sequentiellen Abtrag von Material durch eine zusätzliche Sputterquelle, konnte die dreidimensionale Struktur von NRK-Zellen anhand der lokalen Verteilung charakteristischer Molekülfragmente rekonstruiert werden. Dazu war keine spezifische Markierung der Moleküle nötig.

Die mikromechanischen Eigenschaften von Zellen unter osmotischem Stress wurden durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen charakterisiert. Hypertone Bedingungen führen in Folge des Wasserentzugs aus der Zelle zu einer Versteifung der Zellkörper, während hypotone Bedingungen eine reduzierte Steifigkeit der Zellkörper induzieren.

## 9 Summary

The first part of the present thesis describes the development of a laterally resolved permeation assay to investigate substrate permeation across a barrier-forming cell layer. The assay is based on nano-porous silicon-wafers with highly ordered pores ( $d \sim 1 \mu\text{m}$ ) opened only to one side. The substrate serves as a growth substrate and as an array of nano-cuvettes at the same time. Once a probe has passed the cell layer the molecule is collected in the porous part of the substrate where lateral diffusion is impossible. As an indispensable prerequisite for the assay, the substrates were shown to be cytocompatible. Immunocytochemistry revealed that MDCK II-cells differentiate similarly on the nanoporous substrates as they do on established culture substrates, whereas differentiation of the porcine choroids plexus epithelial cells remains incomplete. Using MDCK II-cells and a fluorescent-labelled, paracellular probe, imaging of the pore content by confocal microscopy returned the correct permeation pathway (proof of principle). The lateral resolution is affected by lateral diffusion of the probe in the cleft between the cells and the substrate and is therefore depending on the size of the cleft. Regarding the development of a mass spectrometric readout of the pore-content by ToF-SIMS, the required access to the substrate pores was achieved by methanol/acidic acid-treatment of the cells. However, detection of molecules in the pores requires further optimisation.

Technological extension of the ECIS technique from planar, impermeable to porous electrodes was in the focus of the second part of this thesis. In the past the technique was limited to plane electrodes. Porous electrodes have been manufactured by evaporating a thin gold-film (100 nm) either on the porous silicon-wafers as used above or on permeable polymeric filter membranes. In both cases the topography of the substrates was unchanged by the thin goldfilm. In case of silicon-based electrodes the underlying substrates avoided any baso-lateral access to the cells. Analysis of the electrochemical impedance spectra by means of the well-established ECIS-model provided detailed information about the cell-cell- and the cell-surface-interactions as well as about the capacitance of the cellular membranes. The porous topography lowered the impedance-contribution of the electrode interface providing an increased sensitivity of the measurement.

Goldfilm electrodes deposited on polymeric, permeable filter-membranes allowed us to perform impedance measurements of the same cell-layer in two different modes (ECIS- and TER-mode). The differences arise from the individual arrangement of the electrodes. In the ECIS-arrangement one electrode is deposited on the surface of the permeable substrate and thus, directly underneath the cells. In the TER-mode, the cells adhere to the polymeric surface whereas the electrodes dip in the fluid compartments above and below the filter membrane. Comparison of the model-parameters concerning the specific resistance of the cell-

---

cell-contacts indicated, that readings performed in TER-mode contain contributions from the cell-substrate contact.

The opened pores of the porous electrode provide access to the basolateral side of the cell layer and were used to stimulate the cells from below. This was, for instance, used to manipulate selectively the resistivity in the cell-surface junction. The results based on ECIS-measurements indicated that the specific resistivity of the medium is higher in the cleft than in the surrounding *bulk*-phase. Furthermore it was shown, that the ECIS-parameters  $R_b$  and  $\alpha$  can be indeed analyzed independently.

There were two side arms derived from these two main subjects of this thesis. The first one dealt with the three-dimensional analysis of NRK-cells by the surface mass spectrometry (ToF-SIMS). Using a combination of analysis ions and sputter ions, it was possible to analyze the cells by mass spectrometry in a layer-by-layer fashion and to reconstruct the three-dimensional chemical composition from characteristic molecule fragments. The second part dealt with the micromechanics of osmotically stressed cells in a confluent layer as studied by scanning force microscopy. Under hyperosmotic conditions the stiffness of the cells is increased whereas hypotonic conditions induce a decrease of stiffness.

# 10 Literaturverzeichnis

## A

- Aaronson SA, Hartley JW, Todaro GJ (1969) Mouse leukemia virus: "spontaneous" release by mouse embryo cells after long-term in vitro cultivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64 1, 87-94.
- Adam G, Lauger P, Stark G (1988) Physikalische Chemie und Biophysik. *Springer Verlag Berlin*.
- A-Hassan E, Heinz WF, Antonik MD, D'Costa NP, Nageswaran S, Schoenenberger CA, Hoh JH (1998) Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J* 74 3, 1564-78.
- Alberts B.; Bray D. LJ, Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995) Molekularbiologie der Zelle. Weinheim: Verlag Chemie Weinheim.
- Alexander S, Hellemans L, Marti O, Schneir J, Elings V, Hansma PK, Longmiro M, Gurley J (1989) An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J. Appl. Phys.* 65 1, 164-167.
- Almqvist N, Bhatia R, Primbs G, Desai N, Banerjee S, Lal R (2004) Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties. *Biophysical Journal* 86 3, 1753-1762.
- Angelow S (2004) Permeability regulation and drug transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. Dissertation; Münster: Westalische Wilhelms-Universität.
- Angelow S, Zeni P, Galla HJ (2004) Usefulness and limitation of primary cultured porcine choroid plexus epithelial cells as an in vitro model to study drug transport at the blood-CSF barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 12, 1859-1873.
- Arlinghaus HF, Fartmann M, Kriegeskotte C, Dambach S, Wittig A, Sauerwein W, Lipinsky D (2004) Subcellular imaging of cell cultures and tissue for boron localization with laser-SNMS. *Surface and Interface Analysis* 36 8, 698-701.
- Arndt S, Seebach J, Psathaki K, Galla HJ, Wegener J (2004) Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosens Bioelectron* 19 6, 583-94.
- Askari JA, Humphries Martin J. (2004) Cell-Matrix Interactions, in: Encyclopedia of Biological Chemistry; Academic Press.

## B

- Balcarovastander J, Pfeiffer SE, Fuller SD, Simons K (1984) Development of Cell-Surface Polarity in the Epithelial Madin-Darby Canine Kidney (Mdck) Cell-Line. *Embo Journal* 3 11, 2687-2694.
- Bal-Tec (1999) SCD 005 Cool Sputter Coater, Bedienungsanleitung.
- Bates JB, Chu YT, Stribling WT (1988) Surface-Topography and Impedance of Metal-Electrolyte Interfaces. *Physical Review Letters* 60 7, 627-630.
- Belu AM, Graham DJ, Castner DG (2003) Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials* 24 21, 3635-3653.
- Bennett V (1992) Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J Biol Chem* 267 13, 8703-6.

- Bennett V, Gilligan DM (1993) The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol* 9, 27-66.
- Benninghoven A, Rüdenauer, G., Werner, H.W. (1987) Secondary Ion Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons.
- Beyer EC (1993) Gap junctions. *Int Rev Cytol*, 1-37.
- Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 56 9, 930-933.
- Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K, Mankertz J, Schmitz H, Wagner S, Fromm M, Schulzke JD (2001) Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *Journal of Physiology-London* 535 2, 541-552.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92 16, 1295-302.
- Brakenhoff GJ, Blom P, Barends P (1979) Confocal Scanning Light-Microscopy with High Aperture Immersion Lenses. *Journal of Microscopy-Oxford* 117 NOV, 219-232.
- Braun D, Fromherz P (1997) Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A* 65, 341-348.
- Braun D, Fromherz P (2001) Fast voltage transients in capacitive silicon-to-cell stimulation detected with a luminescent molecular electronic probe. *Phys Rev Lett* 86 13, 2905-8.
- Breitenstein D (2004) Tensiometrische und oberflächenmassenspektrometrische Untersuchungen zur Lipidspezifität des Surfactant Protein B. Dissertation; Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
- Brischwein (2005) Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosensortechnologie in zellulärer Diagnostik und Pharmascreening. *Chemie Ingenieur Technik* 77 12, 1955-1959.
- Britland S, Morgan H, Wojak-Stodart B, Riehle M, Curtis A, Wilkinson C (1996) Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells. *Exp Cell Res* 228 2, 313-25.
- Butor C, Davoust J (1992) Apical to basolateral surface area ratio and polarity of MDCK cells grown on different supports. *Exp Cell Res* 203 1, 115-27.

## C

- Caille N, Thoumine O, Tardy Y, Meister JJ (2002) Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics* 35 2, 177-187.
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buee-Scherrer VV, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP (1999) In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36 2-3, 165-178.
- Cereijido M, Gonzalez-Mariscal L, Borboa L (1983) Occluding junctions and paracellular pathways studied in monolayers of MDCK cells. *J Exp Biol* 106, 205-15.
- Cereijido M, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Gallardo JM, Garcia-Villegas R, Valdes J (1993) The making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl* 17, 127-32.
- Cereijido M, Stefani E, Palomo AM (1980) Occluding junctions in a cultured transporting epithelium: structural and functional heterogeneity. *J Membr Biol* 53 1, 19-32.
- Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM (2004) Proteomics in diagnostic pathology - Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *American Journal of Pathology* 165 4, 1057-1068.
- Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM (1999) Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 71 23, 5263-5270.
- Cheng J, Winograd N (2005) Depth profiling of peptide films with TOF-SIMS and a C-60

probe. *Analytical Chemistry* 77 **11**, 3651-3659.

Clark EA, Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268 **5208**, 233-9.

Contreras RG, Shoshani L, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Cerejido M (1999) Relationship between Na(+),K(+)-ATPase and cell attachment. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23), 4223-32.

Crecelius AC, Cornett DS, Caprioli RM, Williams B, Dawant BM, Bodenheimer B (2005) Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16 **7**, 1093-1099.

Crook RB, Farber MB, Prusiner SB (1984) Hormones and neurotransmitters control cyclic AMP metabolism in choroid plexus epithelial cells. *J Neurochem* 42 **2**, 340-50.

Curtis A, Wilkinson C (2001) Nantotechniques and approaches in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 19 **3**, 97-101.

## D

Davies JA (2001) Extracellular Matrix. *Encyclopedia of Life Sciences*.

de Figueiredo RCBQ, Soares MJ (2000) Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research* 86 **5**, 413-418.

De Larco JE, Todaro GJ (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.

Dehouck MP, Jolliet-Riant P, Bree F, Fruchart JC, Cecchelli R, Tillement JP (1992) Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* 58 **5**, 1790-7.

Drexler J, Steinem C (2003) Pore-suspending lipid bilayers on porous alumina investigated by electrical impedance spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 107 **40**, 11245-11254.

Drubin DG, Nelson WJ (1996) Origins of cell polarity. *Cell* 84 **3**, 335-44.

Dusek R.L. JJCR, Green, K..J. (2004) Desmosomes and Hemidesmosomes, in: *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Academic Press.

Dykstra MJ, editor. (1992) *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*; Springer. 380 p.

## E

Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B (1997) Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens Bioelectron* 12 **1**, 29-41.

Ende D, Mangold KM (1993) Impedance Spectroscopy. *Chemie in Unserer Zeit* 27 **3**, 134-140.

Endell (2002) Diplomarbeit; Münster: Westfälische Wilhems-Universität.

Engelhardt J, Knebel W (1993) Konfokale Laser-scanning-Mikroskopie. *Physik in unserer Zeit*. 24, 70-78.

## F

Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM (1999) Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 **6**, 1337-1345.

Faupel J (2005) Wachstum von metallischen Nanoclustern auf Polymeroberflächen, Disser-

tation; Göttingen: Universität Göttingen.

- Franke H, Galla H, Beuckmann CT (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.
- Freshney RI (1984) Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York: Alan R. Liss Inc.
- Fromherz P (2001) Interfacing von Nervenzellen und Halbleiterchips. *Physikalische Blätter* 57 **2**, 43-48.
- Fromherz P (2002) Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chem Phys Chem* 3, 276-284.
- Fromherz P, Offenhausser 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. *Physical Review Letters* 75 **8**, 1670-1673.
- Fuller S, von Bonsdorff CH, Simons K (1984) Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line. *Cell* 38, 65-77.
- Fuller SD, Simons K (1986) Transferrin Receptor Polarity and Recycling Accuracy in Tight and Leaky Strains of Madin-Darby Canine Kidney-Cells. *Journal of Cell Biology* 103 **5**, 1767-1779.
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127 **6 Pt 1**, 1617-26.

## G

- Gath U, Hakvoort A, Wegener J, Decker S, Galla HJ (1997) Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components. *Eur J Cell Biol* 74 **1**, 68-78.
- Giaever I, Keese CR (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 **12**, 3761-4.
- Giaever I, Keese CR (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 **17**, 7896-900.
- Giaever I, Keese CR (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366 **6455**, 591-2.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Transduction - Integrin signaling. *Science* 285 **5430**, 1028-1032.
- Gleixner R, Fromherz P (2006) The extracellular electrical resistivity in cell adhesion. *Biophysical Journal* 90 **7**, 2600-2611.
- Gonsior B (1994) Physik für Mediziner, Biologen und Pharmazeuten. Stuttgart, New York: Schattauer Verlagsgesellschaft.
- Grebenkämper KG, H-J. (1994) Translational diffusion measurements of a fluorescent phospholipid between MDCK-I cells support the lipid model of the tight junctions. *Chemistry and Physics of Lipids* 71, 133-143.
- Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, Croisy A (2005) Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1724 **3**, 228-238.
- Guidotti G (1972) Membrane proteins. *Annu Rev Biochem* 41, 731-52.
- Guilak F, Erickson GR, Ting-Beall HP (2002) The effects of osmotic stress on the viscoelas-

tic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophysical Journal* 82 **2**, 720-727.

Gumbiner BM, Yamada KM (1995) Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7 **5**, 615-8.

Gut A, Balda MS, Matter K (1998) The cytoplasmic domains of a beta1 integrin mediate polarization in Madin-Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization. *J Biol Chem* 273 **45**, 29381-8.

## H

Hagenhoff B (2000) High Resolution Surface Analysis by TOF-SIMS. *Mikrochimica Acta* 132, 259-271.

Hakvoort A, Haselbach M, Wegener J, Hoheisel D, Galla HJ (1998) The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium. *J Neurochem* 71 **3**, 1141-50.

Hammerton RW, Krzeminski KA, Mays RW, Ryan TA, Wollner DA, Nelson WJ (1991) Mechanism for regulating cell surface distribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in polarized epithelial cells. *Science* 254 **5033**, 847-50.

Haselbach M, Wegener J, Decker S, Engelbertz C, Galla HJ (2001) Porcine Choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes. *Microsc Res Tech* 52 **1**, 137-52.

Heintzelman MB, Mooseker MS (1992) Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton. *Curr Top Dev Biol* 26, 93-122.

Henke C, Steinem C, Janshoff A, Steffan G, Luftmann H, Sieber M, Galla HJ (1996) Self-assembled monolayers of monofunctionalized cyclodextrins onto gold: A mass spectrometric characterization and impedance analysis of host-guest interaction. *Analytical Chemistry* 68 **18**, 3158-3165.

Henson JH (1999) Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation. *Microscopy Research and Technique* 47 **2**, 155-162.

Hertz H (1882) Über die Berührung fester elastischer Körper. *J. Reine Angew. Mathematik*. 92, 156-171.

Hillebrandt H, Abdelghani A, Abdelghani-Jacquin C, Aepfelbacher M, Sackmann E (2001) Electrical and optical characterization of thrombin-induced permeability of cultured endothelial cell monolayers on semiconductor electrode arrays. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 73, 539-546.

Hoetelmans RWM, Prins FA, Cornelese-ten Velde I, van der Meer J, van de Velde CJH, van Dierendonck JH (2001) Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 9 **4**, 346-351.

Hofmann UG, Rotsch C, Parak WJ, Radmacher M (1997) Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J Struct Biol* 119 **2**, 84-91.

Hoh JH, Schoenenberger CA (1994) Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J Cell Sci* 107 ( Pt 5), 1105-14.

## I

Insall RML (2001) Cytoskeleton. *Encyclopedia of Life Sciences*.

## J

Janovjak HJ, Struckmeier J, Muller DJ (2005) Hydrodynamic effects in fast AFM single-molecule force measurements. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 34

1, 91-96.

- Janshoff A, Steinem C, Michalke A, Henke C, Galla HJ (2000) Monofunctionalized beta-cyclodextrins as sensor elements for the detection of small molecules. *Sensors and Actuators B-Chemical* 70 **1-3**, 243-253.
- Jayme DW, Smith SR (2000) Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. *Cytotechnology* 33 **1-3**, 27-36.
- Johnson KL (1994) Contact Mechanics. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Jones EA, Fletcher JS, Thompson CE, Jackson DA, Lockyer NP, Vickerman JC (2006) ToF-SIMS analysis of bio-systems: Are polyatomic primary ions the solution? *Applied Surface Science* 252 **19**, 6844-6854.

## K

- Karlson P, Doenecke, D.; Koolman, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Kasemo B (2002) Biological surface science. *Surf. Sci.* 500, 656-677.
- Keese CR, Bhawe K, Wegener J, Giaever I (2002) Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture. *Biotechniques* 33 **4**, 842-4, 846, 848-50.
- Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B (2003) Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent* 12 **2**, 175-81.
- Kiessling V, Müller B, Fromherz P (2000) Extracellular resistance in cell adhesion measured with a transistor probe. *Langmuir* 16, 3517-3521.
- Kimelberg HK, O'Connor ER, Sankar P, Keese C (1992) Methods for determination of cell volume in tissue culture. *Can J Physiol Pharmacol* 70 **Suppl**, S323-33.
- Knight MM, Roberts SR, Lee DA, Bader DL (2003) Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 **4**, C1083-9.
- Koolmann J, Röhm K.-H. (1998) Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Krissansen GW (2001) Integrin Superfamily. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Künneke S (2003) Kontaktmechanik und Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen.
- Kurtyka B, Delevie R (1992) Frequency Dispersion Associated with a Nonhomogeneous Interfacial Capacitance. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 322 **1-2**, 63-77.

## L

- Lazarides E, Weber K (1974) Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 **6**, 2268-72.
- Lo CM, Glogauer M, Rossi M, Ferrier J (1998) Cell-substrate separation: effect of applied force and temperature. *Eur Biophys J* 27 **1**, 9-17.
- Lo CM, Keese CR, Giaever I (1993) Monitoring motion of confluent cells in tissue culture. *Exp Cell Res* 204 **1**, 102-9.
- Lo CM, Keese CR, 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 CM, Keese CR, Giaever I (1995) Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophys J* 69 **6**, 2800-7.
- Lo CM, Keese CR, 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.

Lohmann C, Huwel S, Galla HJ (2002) Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. *J Drug Target* 10 **4**, 263-76.

Luong JH, Habibi-Rezaei M, Meghrouis J, Xiao C, Male KB, Kamen A (2001) Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor. *Anal Chem* 73 **8**, 1844-8.

Luttman WB, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (2006) *Der Experimentator: Immunologie*. München: Elsevier GmbH.

## M/N

Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA (2001) Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomechanics* 34 **12**, 1545-1553.

Matter K (2000) Epithelial polarity: Sorting out the sorters. *Current Biology* 10 **1**, R39-R42.

Mcadams ET, Lackermeier A, Mclaughlin JA, Macken D, Jossinet J (1995) The Linear and Nonlinear Electrical-Properties of the Electro-Electrolyte Interface. *Biosensors & Bioelectronics* 10 **1-2**, 67-74.

Michalke A, Janshoff A, Steinem C, Henke C, Sieber M, Galla HJ (1999) Quantification of the interaction between charged guest molecules and chemisorbed monothiolated beta-cyclodextrins. *Analytical Chemistry* 71 **13**, 2528-2533.

Minsky M (1988) Memoir on investing the confocal microscopy and its applications. *Scanning* 10, 128-138.

Mrksich M, Whitesides GM (1996) Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 25, 55-78.

## O

O'Neill WC (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276 **5**, C995-C1011.

## P/Q

Pancrazio JJ, Whelan JP, Borkholder DA, Ma W, Stenger DA (1999) Development and application of cell-based biosensors. *Ann Biomed Eng* 27 **6**, 697-711.

Petronis S, Gretzer C, Kasemo B, Gold J (2003) Model porous surfaces for systematic studies of material-cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66A **3**, 707-721.

Pitt AM, Gabriels JE, Badmington F, Mcdowell J, Gonzales L, Waugh ME (1987) Cell-Culture on a Microscopically Transparent Microporous Membrane. *Biotechniques* 5 **2**, 162-&.

Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000) The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440 **5**, 653-66.

## R

Radmacher M (2002) Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Methods Cell Biol* 68, 67-90.

Radmacher M, Cleveland JP, Fritz M, Hansma HG, Hansma PK (1994) Mapping interaction forces with the atomic force microscope. *Biophys J* 66 **6**, 2159-65.

Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK (1996) Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J* 70 **1**,

556-67.

- Reiß (2004) Mikrogravimetrische Untersuchung des Adhäsionskontaktes tierischer Zellen: Eine biophysikalische Studie, Dissertation; Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Richter E, Fuhr G, Muller T, Shirley S, Rogaschewski S, Reimer K, Dell C (1996) Growth of anchorage-dependent mammalian cells on microstructures and microperforated silicon membranes. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 7 2, 85-97.
- Rim S, Audus KL, Borchardt RT (1986) Relationship of Octanol Buffer and Octanol Water Partition-Coefficients to Trans-Cellular Diffusion across Brain Microvessel Endothelial-Cell Monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 32 1, 79-84.
- Romagnoli P, Herzog V (1991) Transcytosis in thyroid follicle cells: regulation and implications for thyroglobulin transport. *Exp Cell Res* 194 2, 202-9.
- 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

- San Paulo A, Garcia R (2000) High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophys J* 78 3, 1599-605.
- Sandison M, Curtis ASG, Wilkinson CDW (2002) Effective extra-cellular recording from vertebrate neurons in culture using a new type of micro-electrode array. *Journal of Neuroscience Methods* 114 1, 63-71.
- Schneeberger EE, Lynch RD (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262 6 Pt 1, L647-61.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 6, C1213-28.
- Schneider SW, Pagel P, Rotsch C, Danker T, Oberleithner H, Radmacher M, Schwab A (2000) Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 439 3, 297-303.
- Schoenenberger CA, Zuk A, Zinkl GM, Kendall D, Matlin KS (1994) Integrin expression and localization in normal MDCK cells and transformed MDCK cells lacking apical polarity. *J Cell Sci* 107 Pt 2, 527-41.
- Seelig A, Gottschlich R, Devant RM (1994) A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 1, 68-72.
- Shurety W, Stewart NL, Slow JL (1998) Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Molecular Biology of the Cell* 9 4, 957-975.
- Simons K, Fuller SD (1985) Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol* 1, 243-88.
- Sneddon IN (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.
- Steltenkamp S (2006) Mechanische Eigenschaften von artifiziellen und antiven Membranen, Dissertation; Mainz: Johannes Gutenberg Universität.
- Stelzer EH, Wacker I, De Mey JR (1991) Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology. *Semin Cell Biol* 2 3, 145-52.
- Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM (2001) Imaging mass spectrometry: A

new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine* 7 4, 493-496.

Streyer L (1999) Biochemie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Suselbeck T, Thielecke H, Weinschenk I, Reiningger-Mack A, Stieglitz T, Metz J, Borggreffe M, Robitzki A, Haase KK (2005) In vivo intravascular electric impedance spectroscopy using a new catheter with integrated microelectrodes. *Basic Res Cardiol* 100 1, 28-34.

Suter T (1997) Mikroelektrochemische Untersuchungen bei austenitisch "rostfreien" Stählen, Dissertation ETH Nr. 11962; Zürich: ETH Zürich.

## T

Tagliaferro P, Tandler CJ, Ramos AJ, 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.

Tao NJ, Lindsay SM, Lees S (1992) Measuring the microelastic properties of biological material. *Biophys J* 63 4, 1165-9.

Tipler PA (2000) Physik. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Tirrell M, Kokkoli E, Biesalski M (2002) The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* 500 1-3, 61-83.

Tsukita S (2004) Tight junctions, in: Encyclopedia of Biological Chemistry; Academic Press.

## U

Ulrich W-P (1995) Die Impedanzspektroskopie als Methode zur Untersuchung festkörperunterstützter Lipidschichten und deren Wechselwirkung mit Proteinen. Dissertation; Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.

## V

Vassanelli S, Fromherz P (1999) Transistor probes local potassium conductances in the adhesion region of cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 19 16, 6767-73.

Vogler EA (1998) Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 74, 69-117.

## W

Wagner MS (2005) Molecular depth profiling of multilayer polymer films using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 77 3, 911-922.

Walboomers XF, Croes HJE, Ginsel LA, Jansen JA (1998) Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials* 19 20, 1861-1868.

Wang HS, Keese CR, Giaever I, Smith TJ (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.

Wegener J (1998) Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Goldelektroden. Dissertation; Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.

Wegener J (2001) Cell Junctions. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Wegener J (2003) Lebende Zellen als Sensoren. *Forschungsjournal Universität Münster* 6, 11-17.

Wegener J, Abrams D, Willenbrink W, Galla HJ, Janshoff A (2004) Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *Bio-techniques* 37 4, 590-+.

- Wegener J, Hakvoort A, Galla HJ (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, Janshoff A, Galla HJ (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, Keese CR, 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, Sieber M, Galla HJ (1996) Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J Biochem Biophys Methods* 32 **3**, 151-70.
- Wegener JGH-J (1996) The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions. *Chem. Phys. Lipids* 81, 339-348.
- Weibel DE, Lockyer N, Vickerman JC (2004) C-60 cluster ion bombardment of organic surfaces. *Applied Surface Science* 231-2, 146-152.
- Weis R, Fromherz P (1997) Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E* 55 **1**, 877-889.
- Weisenhorn AL, Khorsandi M, Kasas S, Gotzos V, Butt HJ (1993) Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology* 4, 106-113.
- Wiemann V (2004) Diplomarbeit: Mikroskopische und elektrische Untersuchungen zur Photo-toxizität von Fluoreszenzsonden an kultivierten Zellen [Diplomarbeit]; Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
- Wilhelm S. 2003. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Jena.
- Wolf B, Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Kraus M (1998) Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM (R)). *Biosensors & Bioelectronics* 13 **5**, 501-509.
- X**
- Xiao C, Luong JH (2003) On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biotechnol Prog* 19 **3**, 1000-5.
- Y**
- Yu HS, Sinko PJ (1997) Influence of microporous substratum and hydrodynamics on resistances to drug transport in cell culture systems: Calculation of intrinsic transport parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 **12**, 1448-1457.
- Z**
- Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science* 114 **20**, 3583-3590.
- Zaporojtchenko V, Strunskus, T., Behnke, K., Von Bertolsheim, C., Kiene, M., Faupel, F. (2000) Metal/polymer interfaces with designed morphologies. *LJournal of Adhesion Science and Technologie* 14 **3**, 467-490.
- Zhang SG, Yan L, Altman M, Lassle M, Nugent H, Frankel F, Lauffenburger DA, Whitesides GM, Rich A (1999) Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* 20 **13**, 1213-1220.
- Ziegler C (2000) Cell-based biosensors. *Fresenius J Anal Chem* 366 **6-7**, 552-9.

# Anhang

## A Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:

BAEC	<i>Bovine Aortic Endothelial Cells</i>
b.E.	beliebige Einheit
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CLSM	<i>Confocal Laser-Scanning Microscopy</i>
CPE	<i>Constant Phase Element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>Dimethylformamid</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
ECIS	<i>Electric Cell-surface Impedance Sensing</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EthD	<i>Ethidiumhomodimer</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
FLIC	<i>Fluorescence Interference Contrast Microscopy</i>
GA	<i>Glutardialdehyd</i>
HC	<i>Hydrocortison</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IS	Impedanzspektroskopie
ITO	<i>Indium Tin Oxide</i>
M199	<i>Medium 199 mit Earle's Salzen</i>
mc	<i>maximum counts</i>
MDCK II	<i>Madin-Darby Canine Kidney (strain II)</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
NA	<i>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>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS <sup>++</sup>	<i>Phosphate Buffered Saline mit Calcium und Magnesium</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PDMS	<i>Polydimethylsiloxan</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PSF	<i>Point-Spread-Function</i>
OCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SDI	<i>Standard Deviation Increment</i>
SDM	<i>Standard Deviation Mean</i> (Standardabweichung des Mittelwertes)
SFM	<i>Scanning Force Microscopy</i>
tc	<i>total counts</i>
TER	<i>Transepithelial/-endothelial Electrical Resistance</i>
tj	<i>tight junction</i>
ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
TRITC	<i>Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat</i>
TW	<i>Transwell</i> (Filtereinsatz)
TW1.0	<i>Transwell</i> , Porengröße 1.0 µm (Filtereinsatz)
TWC	<i>Transwell Clear</i> (Filtereinsatz)

TWC3.0	<u>Transwell Clear</u> , Porengröße <u>3.0</u> $\mu\text{m}$ (Filtereinsatz)
(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
ZO	<u>Zonula occludens</u>
ZO-1	<u>Zonula occludens Protein 1</u>

## Symbolverzeichnis:

A	Fläche; Parameter des CPE
C	Kapazität
$C_{CE}$	Kapazität der Gegenelektrode
$C_{Cl}$	Zellschichtkapazität
E	Elastizitätsmodulus
I	Stromstärke; Lichtintensität
Q	Ladungsmenge
R	Widerstand
$R_b$	Spezifischer parazellulärer Widerstand im ECIS-Modus
$R_{Cl}$	Spezifischer parazellulärer Widerstand im TER-Modus
U	Spannung
Z	Impedanz
$Z'$	Wirkwiderstand
$Z''$	Blindwiderstand
d	Abstand
f	Frequenz
g	Erdbeschleunigung
h	Höhe
l	Laufvariable bei Summation
k	Federkonstante
m	Masse
n	Brechungsindex; Parameter des CPE
r	Radius
s	Strecke
t	Zeit
x	Ortskoordinate
y	Ortskoordinate
z	Ortskoordinate; Ladungszahl
$\Delta$	Differenz
$\alpha$	ECIS-Parameter des Adhäsionskontaktes; Öffnungswinkel
$\varphi$	Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom
$\lambda$	Wellenlänge
$\xi$	Osmolarität
$\omega$	Kreisfrequenz

**B Materialien für zellbiologische und biophysikalische Arbeiten**

Aceton	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Antikörper:	
Anti-Claudin-1	Zymed GmbH, Berlin
Anti-Kanninchen-IgG-Alexa	MoBiTec GmbH, Göttingen
Fluor <sup>®</sup> 488	

Anti-Maus-IgG	Chemicon Inc., Temecula, USA
Anti-Natrium/Kalium-ATPase	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-Occludin	Zymed GmbH, Berlin
Anti-Vinculin	Sigma, Saint Louis, USA
Anti-ZO-1	Zymed GmbH, Berlin
Calcein AM	Molecular Probes, Leiden (NL)
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
CO <sub>2</sub>	Westfalen AG, Münster
DMF	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DMEM Earle	Biochrom KG, Berlin
DMEM/Ham's F12	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol (techn. & abs.)	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Lab GmbH, Linz (AU)
FITC-Dextran	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gelatine	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gentamicin	Biochrom KG, Berlin
D-Glucose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EthD	Molecular Probes, Leiden (NL)
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
M199 Earle	Seromed, Berlin
MEM Earle	Biochrom KG, Berlin
Mucasol	Brand, Wertheim
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NCS	Seromed, Berlin
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penicillin	Seromed, Berlin
Photoresistlack Positiv 20	Kontakt Chemie, CRC Industries, Iffezheim
Reinstwasser	Millipore, Eschborn
Saccharose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Janssen Chimica, Geel (B)
Slikon-Kleber	Henkel, Düsseldorf
Streptomycin	Seromed, Berlin
TRITC-Phalloidin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Wasserstoffperoxid (30 %)	Fluka, Buchs (CH)

## C Geräte/Verbrauchsmaterialien

6-well-Gewebekulturplatten	Costar, Bodenheim
Autoklav 3870EL	Jürgens, Münster
Brutschränke: BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
IG 150	Jouan, Unterhaching
IR 1500	Flow, Meckenheim
Bunsenbrenner	Tecnimare, Fernwald
CLSM: TCS SL	Leica, Mannheim

Einmalpipetten	Brand, Wertheim
Einwegspritzen (5 & 20 ml)	Henke-Sass, Tuttlingen
Greiner Röhrchen (10 & 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Impedanzanalysator	Solatron Instruments, Farnborough (GB)
Kanülen	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Kryoröhrchen (1.8 ml)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc GmbH, Wiesbaden-Bieberach
Latexhandschuhe	Roth GmbH, Karlsruhe
Leitfähigkeitsmessgerät: inoLab Multi 720	WTW GmbH, Weilheim
Objektträger (mit ITO- Beschichtung)	PGO, Iserlohn
Gefrierpunkt-Osmometer: Osmomat 030	Gonotec, Berlin
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (< 5 ml)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Rastersondenmikroskop: MFP 3D-Mikroskop <i>cantilever</i> .	Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA
Olympus BLRC150 VB-C1	AFFE, Mannheim
Olympus PSA 400	AFFE, Mannheim
Reaktionsgefäß 0.5 – 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Plamareiniger PDC 32G-2	Harrick, New York (USA)
Sputter Coater SCD 050	BalTec, GmbH
Sterilbank <i>LaminAir Flow</i>	Holten
Sterilfilter (Porengröße 0.2 µm)	Satorius, Göttingen
Sterilisator: UT 6120	Heraeus, Meckenheim
ToF-SIMS: ToF.SIMS 5 instrument	ION-TOF, Münster, Software: TOFSIMS 4.1, ION-TOF, Münster
UV-Belichtungsgerät	Memmert, Schwabach
Wärmeschrank B 6120	Heraeus, Hanau
Wasserbad GFL 1004	GFL, Burgwedel
Zellkultureinsätze (Filter- membranen): TW	Costar, Bodenheim
TW1.0	Greiner, Frickenhausen
TWC	Costar, Bodenheim
TWC3.0	Costar, Bodenheim
Zählkammer nach Bürcker	Fischer, Frankfurt
Zentrifuge Sepatech Megafu- ge 1.0	Heraeus, Hanau



# Danksagung

Ich danke

Herrn Priv.- Doz. Dr. Joachim Wegener für die interessante Themenstellung und die hervorragende Betreuung während der Promotion, für die wissenschaftlichen Anregungen, die Unterstützung und die Freiräume, die das Entstehen dieser Arbeit möglich gemacht haben. Besonders möchte ich mich für seine großartige Hilfsbereitschaft in jeder Form bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla für die freundliche Aufnahme ins Institut, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Frau Dipl.-Chem. Stefanie Michaelis für die gute Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Zeit als Kolleginnen während der Promotion.

Frau Dipl.-Chem. Vanessa Heitmann, Frau Dipl.-Chem. Stefanie Michaelis, Herrn Dr. Björn Reiß, Frau Dipl.-Biol. Eva Döpker und Frau Dipl.-Biotechn. Judith Stolwijk für die Hilfestellungen beim Erstellen der Arbeit und das unheimlich fleißige Korrekturlesen.

Herrn Dr. Siegfried Steltenkamp für eine tolle Kooperation und die vielen Stunden am AFM, für seinen Einsatz, die Hilfsbereitschaft und die persönlichen wie auch witzigen Gespräche bei den vielen Zusammentreffen in Münster, Mainz, Regensburg und München.

Herrn Dr. Daniel Breitenstein sowie Frau Dr. Birgit Hagenhoff von der Tascon GmbH für die gute Kooperation während dieser Promotion. Danke an Daniel für die Hilfsbereitschaft und den persönlichen Einsatz sowie für die Beantwortung aller Fragen rund um die ToF-SIMS.

Vanessa, Steffi, Björn, Eva und Judith für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Zeit im Institut. Danke für die Bereitschaft, sich jeder meiner „Fragen ans Plenum“ zu stellen und für die großartige Zeit im Labor und darüber hinaus.

Frau Sandra Grunewald für ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Unterstützung und Organisation während der Praktika für Studenten.

Frau Sabine Hüwel und Frau Steffi Wulff für die Organisation des Arbeitskreises und die angenehmen Arbeitsbedingungen, die daraus resultieren.

Herrn Dr. Fredrick Höhn für seine große Hilfsbereitschaft in allen technischen Fragen, für die Unterstützung und Aufmunterung und die vielen, zum Teil auch persönlichen, Diskussionen.

Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Willenbrink für die Organisation eines tollen institutseigenen EDV-Systems und seine große Hilfsbereitschaft, wann immer der Computer ein Eigenleben entwickeln wollte.

Herrn Dr. Walter Storkebaum für die Organisation des Instituts und seine Hilfestellungen bei allen Fragen rund um Verträge, Verwaltung und Studienordnung.

allen Mitglieder des Institutes, insbesondere den Mitgliedern des Arbeitskreis Galla, den Hirnis und den Lipidis, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Gespräche bei Festen und Veranstaltungen oder einfach nur beim Kaffee trinken.

meinen Freunden Norman, Barbara und Jens, Mareike, Jana, Ute, Harry und seiner Familie, Dunja und Jan für so manche schöne Stunde und den persönlichen Rückhalt. Danke für jeden neuen Versuch mich zu erreichen, auch wenn die Zeit knapp oder die Entfernung groß ist.

meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung die Kraft und die Sicherheit geben, meine Ziele zu erreichen. Danke für den großen Rückhalt, Euer Verständnis und danke für die wunderschöne Zeit, die wir zusammen verbringen können.

Stephan für sein Verständnis, seine Geduld und seine liebevolle Unterstützung. Schön, dass es Dich gibt.





