

Institut für Chemie
Professur für Physikalische Chemie

Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie zur Aufklärung physiologischer Prozesse in lebenden Zellen

Charakterisierung und Anwendung einer neuartigen lokalen Mikromanipulationstechnik

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Physikalische Chemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Phillip Roder

Potsdam, Juni 2018

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-419806
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-419806>

Für Oma, Opa und meine großartigen Eltern

*„Willst du dich am Ganzen erquicken,
so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Ort und Tag der Disputation: Potsdam, 15.11.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben (Universität Potsdam)
2. Gutachter: Prof. Dr. Ilko Bald (Universität Potsdam)
3. Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti (Universität Bielefeld)

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie der Universität Potsdam im Fachgebiet Physikalische Chemie innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben unter der direkten Leitung von Dr. Carsten Hille angefertigt. In den folgenden Zeilen möchte ich mich bei einer Vielzahl von Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben bedanke ich mich vor allem für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben, die Anfertigung des Erstgutachtens und sein vollkommenes Vertrauen bei meiner Leitung des ZIM-Projektes Mini-CO₂.

Herrn Prof. Dr. Ilko Bald und Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti danke ich für die Erstellung des Zweit- bzw. Drittgutachtens. Ein zusätzlicher Dank geht an Ilko für seine Dienste als Mentor innerhalb der Promotion und seinem Kontakt zum HZDR, ohne den die Injektionspipettenanfertigung nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz spezieller Dank gilt insbesondere Herrn Dr. Carsten Hille für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Themas und seine stetige Unterstützung, sowohl bei biologischen Problemstellungen als auch bei täglichen Problemen mit dem Mikroskopieaufbau. Darüber hinaus bedanke ich mich sowohl für die umfassenden Diskussionen und Anregungen für gemeinsam erstellte Poster und Paper-Manuskripte als auch die sportliche und kulturelle Bereicherung innerhalb gemeinsam erlebter Teamevents. Ohne deinen unermesslichen Eifer wäre diese Arbeit nicht zu dem geworden, was sie ist.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der UPPC für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die tollen Feiern bedanken. Explizit danke ich dabei den Mitgliedern der Nachwuchsgruppe ALSCoMBi (André, Carsten, Julia, Karo, Kristina, Mattes, Michel, Mohsen, Roman und Sven), welche mich über die vielen Jahre begleitet haben. Ihr wart

ein super Team! Ein besonderer Dank geht an meine beiden Bürokollegen Sven und Yan-nik, welche mir mit Rat und Tat zur Seite standen und des Öfteren ein paar kreative Ideen hatten.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Katja Hanack und von Herrn Prof. Dr. Otto Baumann für die Bereitstellung der HEK-Zellen und der Schaben sowie dem IBC des HZDR für die Fertigung der Injektionspipetten. Außerdem bedanke ich mich bei der Potsdam Graduate School und bei der Gesellschaft deutscher Chemiker für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme an Tagungen und bei meinen Veröffentlichungen.

Ich möchte mich bei Christian, Ilko, Jule, Kenny, Lydi, Robin, Steffi, Sven und Youngeun für die abwechslungsreichen Mittagspausen bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei meiner genialen Stammtischgruppe mit Amy, Hannes, Kathi, Kay, Martin, Ricarda, Richard, Selina, Sophie, Till und Tommy, mit der ich innerhalb meiner Promotion einige schöne Abende, Diskussionen und Erlebnisse teilte. Einen herzlichen Gruß auch an meine lieben Studienfreunde Jule, Marcus, Maria, Nicole und Uschi für die tollen gemeinsamen Jahre. Es ist schön, dass wir nach dieser langen Zeit immer noch guten Kontakt miteinander haben. Liebe Nicole, liebe Uschi, vielen Dank fürs Korrekturlesen.

Einen besonders großer Dank geht an Christopher, Maxim und Selina, welche mich über die vielen Jahre begleitet haben, weiterhin begleiten werden, meine Arbeit Korrektur gelesen haben und die mir zusätzlich in der letzten, anstrengenden Phase meiner Doktorarbeit stets beistanden und oft aufgebaut haben, wenn es mal nicht so lief, wie es sollte! Auf euch drei kann man sich immer verlassen. Ihr seid die Besten!

Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie, die mich über die vielen Jahre begleitet, immer zur Seite standen und zu dem gemacht hat, was ich heute bin. Vor allem danke ich meinen Eltern, welche mich sowohl finanziell als auch liebevoll innerhalb meines Lebens unterstützt haben und die ich mit dieser Doktorarbeit stolz machen möchte. Ohne euch beide wäre ich heute nicht da, wo ich mich aktuell befinde und dafür danke ich euch von ganzem Herzen! Liebe Maxim, Irland war für uns eine schicksalhafte Begegnung, welche ich für immer in meinem Herzen behalte. Ich danke dir für dein offenes Ohr, deine Schulter, deinen Rat, deine Geduld in den letzten Monaten und freue mich schon sehr auf unsere gemeinsame Zukunft, die uns erwarten wird! Dich an meiner Seite zu haben, ist mein größtes Glück!

Vielen Dank für alles!!!

Veröffentlichungen

Publikationen

- P. RODER, C. HILLE, „Local tissue manipulation *via* a force- and pressure-controlled AFM micropipette for analysis of cellular processes“, *Scientific Reports* **8**, 5892 (2018)
- P. RODER, C. HILLE, „A Multifunctional Frontloading Approach for Repeated Recycling of a Pressure-Controlled AFM Micropipette“, *PLoS ONE* **10(12)**, e0144157 (2015)
- P. RODER, C. HILLE, „ANG-2 for quantitative Na⁺ determination in living cells by time-resolved fluorescence microscopy“, *Photochemical & Photobiological Sciences* **13**, 1699-1710 (2014)

Posterbeiträge

- P. RODER, C. HILLE, „Single cell injection and local tissue manipulation using a force- and pressure-controlled AFM micropipette“, *Advanced Microscopy in Life Sciences - Workshop*, November **2016**, Potsdam, Deutschland
- P. RODER, C. HILLE, „Optical and atomic force microscopy for the study at living cells“, *PhDay 2016*, Juli **2016**, Potsdam, Deutschland
- P. RODER, C. HILLE, „Combination of AFM, fluorescence microscopy and nanofluidics for micromanipulation experiments in living tissue“, *17. JCF-Frühjahrs-symposium*, März **2015**, Münster, Deutschland

- P. RODER, C. HILLE, „Combination of AFM and nanofluidics for micromanipulation of single cells and surfaces“, *113. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e. V.*, Mai **2014**, Hamburg, Deutschland
- K. JAHN, P. RODER, C. HILLE, „FLIM-basierte Untersuchung von physiologisch relevanten Ionen mittels Asante Farbstoffen“, *8. BioSensor Symposium*, März **2013**, Wildau, Deutschland

Vorträge

- P. RODER, C. HILLE, „Local tissue manipulation using a force- and pressure-controlled AFM micropipette in a frontloading mode“, *115. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e. V.*, Mai **2016**, Rostock, Deutschland
- P. RODER, „Frontloading procedure and its applications for a nanofluidic coupled AFM technique“, *Statusseminar ALSComBi*, Oktober **2015**, Potsdam, Deutschland
- P. RODER, „Combination of AFM and nanofluidics for micromanipulation of single cells and surfaces“, *Statusseminar ALSComBi*, September **2014**, Potsdam, Deutschland
- P. RODER, „FluidFM - Combination of AFM and nanofluidics for micromanipulation at single cell level“, *Statusseminar ALSComBi*, September **2013**, Potsdam, Deutschland

andere wissenschaftliche Beiträge

- Projektleiter des ZIM-Förderprojektes „Optische Hybrid-Minisonden zur simultanen Multiparameter-Analytik für gelöstes Kohlenstoffdioxid, Sauerstoff und Protonenkonzentrationen (Mini-CO₂)“, Juli **2016** bis Dezember **2017**
- aktive Teilnahme am Seminar „Trends in Super-Resolution Microscopy“ des 18. Leibniz-Kolleg 2014 („Nanomikroskopie“), Mai **2014**, Potsdam, Deutschland

- aktive Teilnahme am 2. FluidFM European Workshop bei der Firma Nanosurf, 22. Mai **2013**, Liestal, Schweiz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Mikroskopietechniken	5
2.1.1 Rasterkraftmikroskopie	5
2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie	14
2.1.3 Korrelative Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie	18
2.2 Sensorfarbstoffe	20
2.3 Biomimetische und biologische Modellsysteme	22
2.3.1 Riesige einschichtige Vesikel (GUV)	22
2.3.2 Zelllinien	22
2.3.3 Drüsengewebe der Schabe <i>P. americana</i>	23
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Verwendete Materialien und Reagenzien	25
3.2 Probenvorbereitung	27
3.2.1 Herstellen der Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen	27
3.2.2 Herstellen und Filtern der Lösungsmittel- und Pufferlösungen	28
3.2.3 Herstellen der Dopamin-, SNP- und Triton X-100-Lösungen	29
3.3 Methoden	30
3.3.1 Kombiniertes nanofluidisches Rasterkraftmikroskopie- und inverser Fluoreszenzmikroskopie-Aufbau	30
3.3.2 Beladung, Reinigung und Langzeitlagerung der Pipetten	33
3.3.3 GUV-Präparation	36

3.3.4	Speicheldrüsenpräparation	38
4	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1	Zielstellung	41
4.2	Charakterisierung des FluidFM-Systems	42
4.2.1	Test eines korrelativen Mikroskopieaufbaus	42
4.2.2	Frontloading, Pipettenreinigung und deren Anwendung	43
4.2.3	Flüssigkeitsabgabe an Luft	53
4.2.4	Flüssigkeitsabgabe in Wasser	58
4.2.5	Flüssigkeitsabgabe in anderen Medien	60
4.3	Anpassung des Pipetten-Oberflächen-Abschlusses	63
4.3.1	Kraft-Zeit-Kurven an biomimetischen Systemen	65
4.3.2	Kraft-Zeit-Kurven an komplexen biologischen Systemen	67
4.4	Lokale Farbstoffbeladung	70
4.4.1	Gewebebeladung mit CellTracker Red	70
4.4.2	Gewebebeladung mit SYTO 9 Green	74
4.5	Lokale Mikromanipulation	77
4.5.1	Interzelluläre Ca ²⁺ -Signale im Drüsengewebe	78
4.5.2	NO-Freisetzung im Drüsengewebe	81
4.6	Untersuchungen zu Injektionspipetten	85
4.6.1	Fertigung der Injektionspipetten	86
4.6.2	Injektionsexperimente an Zelllinien	89
4.6.3	Injektionsexperimente an Gewebe	92
5	Zusammenfassung und Ausblick	95
5.1	Zusammenfassung	95
5.2	Ausblick	97
	Literatur	99

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

β	(Auslenkungs-)sensitivität [m/V]
γ	Oberflächenspannung bzw. Grenzflächenspannung [mN/m]
γ_{lg}	Grenzflächenspannung zwischen flüssig und gasförmig [mN/m]
γ_{sg}	Grenzflächenspannung zwischen fest und gasförmig [mN/m]
γ_{sl}	Grenzflächenspannung zwischen fest und flüssig [mN/m]
ε_λ	molarer Extinktionskoeffizient (wellenlängenabhängig) [L/mol·cm]
η	Viskosität [Pa·s]
θ_K	Kontaktwinkel [°]
ϑ	Temperatur [°C]
λ	Wellenlänge [m]
ν	Frequenz [1/s]
ρ	Dichte [kg/m ³]
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
AK	Antikörper
aL	Attoliter, 1 aL = 10 ⁻¹⁸ L
AM	Acetoxymethyl
APTES	(3-Aminopropyl)-triethoxysilan
Au	Gold
BAPTA	(1,2-Bis(o-amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), Ca ²⁺ -Chelator
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
BP	Bandpass
c	Konzentration [mol/L]
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration [mol/L]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat, Ringersalz

CCD	<i>charge-coupled device</i> , Ladungskopplungsspeicher
Cr	Chrom
CTR	CellTracker Red, membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff
d	Durchmesser [m]
D	Diffusionskoeffizient [m^2/s]
d_A	Auslenkung [m]
d_{xy}	laterale Auflösung [m]
DA	Dopamin
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein, NO-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
dc/dx	Konzentrationsgradient
DMSO	Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	<i>1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i> , Phospholipid
DOPS	<i>1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serine</i> , Phospholipid
$E(\lambda)$	Extinktion
ΔE	Energiedifferenz [J]
EMCCD	<i>electron multiplying charge-coupled device</i> , elektronenvervielfachender Ladungskopplungsspeicher
F bzw. I_F	Fluoreszenzintensität
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i> , Fluoreszenzkorrelationspektroskopie
FIB	<i>focused ion beam</i> , fokussierter Ionenstrahl
fL	Femtoliter, $1 \text{ fL} = 10^{-15} \text{ L}$
FluidFM	<i>fluidic force microscopy</i> , nanofluidische Rasterkraftmikroskopie
F_0	Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> , Halbwertsbreite
GJ	<i>gap junctions</i> , Kontaktstellen zwischen den Zellen
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i> , riesiges einschichtiges Vesikel
HCl	Salzsäure, 1 N Maßlösung zur pH-Wert Einstellung
HEK(-Zelle)	<i>human embryonic kidney (cell)</i> , menschliche embryonale Nierenzelle
HeLa(-Zelle)	menschliche Epithelzelle eines Zervixkarzinoms; die Bezeichnung „HeLa“ stammt vom Namen der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HZDR	Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf
IC	<i>internal conversion</i> , innere Konversion
IR	<i>internal relaxation</i> , innere Relaxation
ISC	<i>intersystem crossing</i> , Interkombination
J	Teilchenfluss [$\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$]
k	Federkonstante [N/m]
k_B	Boltzmann-Konstante [J/K]
KCl	Kaliumchlorid, Ringersalz
l	Schichtdicke [m]
L	Länge des Pipettenkanals [m]
LM	Lösungsmittel
LP	<i>longpass</i> , Langpass
m	Masse [g]
max	Maximum
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Ringersalz
N	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid, Ringersalz
NADIS	<i>nanodispenser</i> , AFM-Flüssigkeitsnanodosierer
NaN_3	Natriumazid, Desinfektionsmittel
NaOCl	Natriumhypochlorid, Reinigungsmittel
NaOH	Natronlauge, 1 N Maßlösung zur pH-Wert Einstellung
NO	<i>nitric oxid</i> , Stickstoffmonoxid
NOS	<i>nitric oxid synthase</i> , Stickstoffmonoxid-Synthase
NP	Nanopartikel
OGB-1	Oregon Green 488 BAPTA-1, Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung, Puffer
p_{ex}	Außendruck [Pa]
p_{in}	Innendruck [Pa]
Δp	Differenz zwischen angelegtem Druck und Pipetteninnendruck [Pa]
r	Radius [m]
Rh6G	Rhodamin 6G, Referenzfluoreszenzfarbstoff
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	<i>regions of interest</i> , Bereiche von Interesse

RT	Raumtemperatur
SE	<i>standard error</i> , Standardfehler
SEM	<i>scanning electron microscope</i> , Rasterelektronenmikroskop
SNP	<i>sodium nitroprusside</i> , Natrium-Nitroprussid, NO Donor
SNR	<i>signal-to-noise-ratio</i> , Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SP	<i>shortpass</i> , Kurzpass
SYTO 9	SYTO 9 Green, interkalierender membrangängiger Farbstoff
t	Zeit [s]
$t_{\Delta x^2}$	Diffusionszeit [s]
T	Temperatur [K]
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan, Puffer
V	Volumen [L]
V_A	gemessene Auslenkung [V]
wt%	<i>weight percent</i> , Gewichtsprozent bzw. Massenanteil [%]
\bar{x}	Mittelwert
Δx^2	mittleres Verschiebungsquadrat bzw. durchschnittliches Quadrat der zurückgelegten Wegstrecke [m ²]

Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht der möglichen Mikromanipulationsexperimente	3
2.1	Darstellung des AFM-Messprinzips	7
2.2	AFM-Flüssigkeitsnanodosierer	8
2.3	Nanofluidische Rasterkraftmikroskopie	9
2.4	Kapillareffekt	11
2.5	Darstellung eines Perrin-Jablonski-Diagramms	15
2.6	Kombinierter AFM- und Fluoreszenzmikroskopieaufbau	19
2.7	Schematischer Aufbau eines GUV	22
2.8	Hellfeldbilder von HEK-Zellen	23
2.9	Darstellung des morphologischen Schabenspeicheldrüsenaufbaus	24
3.1	Aufbau des kombinierten Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopes	31
3.2	Beladungsarten der verwendeten Pipetten	34
3.3	Langzeitlagerung der Pipetten	35
3.4	Schematische Darstellung der GUV-Herstellung	37
3.5	Messumgebung für die <i>in situ</i> Experimente	39
4.1	Korrelative Probemessung	42
4.2	Schematische Darstellung der Frontloading-Methode	44
4.3	Pipettenbeladung vorher <i>vs.</i> nachher	46
4.4	Pipettenreinigung nach einmaliger Rh6G Beladung	46
4.5	Pipettenreinigung nach mehrmaliger Rh6G Beladung	47
4.6	Eintrocknen von Rh6G nach 60 Minuten	48
4.7	Pipettenreinigung nach der Antikörper Beladung	49
4.8	Eintrocknen des Antikörpers nach 60 Minuten	50
4.9	Untersuchung des Einflusses verschiedener Reinigungsschritte	52
4.10	Wasserabgabe an Luft	53
4.11	Reproduzierbare Abgabe von Rh6G an Luft	55

4.12	Abgabe definierter DNS-Origami-Nanostrukturen Tropfen	57
4.13	Abgabe von Rhodamin 6G in Wasser	58
4.14	Charakterisierung der Flüssigkeitsabgabe in Wasser	59
4.15	Schematische Darstellung des Diffusionsexperimentes	61
4.16	Übersicht der Diffusionskoeffizienten in verschiedenen Medien	62
4.17	AFM-Parameter	64
4.18	Kraftkurvenmessungen an großen GUV	65
4.19	Kraftkurvenmessungen an kleinen GUV	66
4.20	Testmessungen von Kraftkurven an Drüsengewebe	68
4.21	Kraftkurvenmessungen an Drüsengewebe	69
4.22	Gewebetestbeladung mit 3 μM CellTracker Red	71
4.23	Lokale Farbstoffbeladung von Gewebe mit 1 μM CellTracker Red	72
4.24	Lokale Gewebebeladung mit 10 μM SYTO 9 Green	74
4.25	Lokale Gewebebeladung mit 100 μM SYTO 9 Green	76
4.26	einzelnes zelluläres Ca^{2+} -Signal in Drüsengewebe	79
4.27	interzelluläre Ca^{2+} -Signale in Drüsengewebe	80
4.28	Lokale SNP-Manipulation von Drüsengewebe	82
4.29	Zweite lokale SNP-Manipulation von Drüsengewebe	84
4.30	Übersicht Injektionspipette und Messprinzip	85
4.31	Fertigung von Injektionspipetten mittels dreier verschiedener Ionenarten	86
4.32	Fertigung der Injektionspipette mittels Ne-Ionenstrahl	88
4.33	Übersicht der verwendeten Zelllinien	89
4.34	HEK-Zellen und Kraft-Zeit-Kurve der Injektion	90
4.35	Injektion der HEK-Zelle mit Rh6G	91
4.36	Parameterbestimmung für die Gewebeinjektion	92
4.37	Einfluss der längeren Verweilzeit auf die Drüsengewebeinjektion	93
4.38	Einfluss höherer Kräfte auf die Gewebeinjektion	94

Tabellenverzeichnis

2.1	Spektroskopische Eigenschaften aller Fluoreszenzfarbstoffe	21
3.1	Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	25
3.2	Liste der verwendeten Chemikalien	26
3.3	Stamm- und Endkonzentrationen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe . .	27
3.4	Ringerlösung für <i>in situ</i> Messungen	28
3.5	Filterkombinationen aller Messungen	30
3.6	Übersicht der verschiedenen Pipettenarten	32
3.7	Übersicht der Speicheldrüsenfarbstoffinkubation	38

1

Einleitung

Lebende Zellen bilden die kleinste funktionelle Einheit aller lebenden Organismen und spielen aufgrund ihrer komplexen Struktur und vielfältigen Funktionen eine essenzielle Rolle in jedem Lebewesen. Einzelne Zellen können dabei miteinander interagieren, was zu einer intrazellulären und interzellulären Signalübertragung in komplexen Geweben führt. Wenn eine dieser Interaktionen gestört ist, können Krankheiten wie Stoffwechselstörungen beobachtet werden [1–4]. Aufgrund dessen ist es äußerst wichtig, diese Zell-Zell-Interaktionen umfassend zu verstehen. In der Vergangenheit wurden hierbei viele verschiedene Methoden zur Manipulation und Analyse von Funktionen auf zellulärer Ebene eingeführt. Dazu gehören die Fluoreszenzmikroskopie [5, 6], Elektrophysiologie [7], Mikroinjektion [8] und Photostimulation [9, 10].

Seit 2009 gibt es eine neue Methode der zellulären Mikromanipulation, die als „nanofluidische Rasterkraftmikroskopie“ (FluidFM, *fluidic force microscopy*) bezeichnet wird [11]. Diese Technik ist eine Kombination aus Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) und Nanofluidik. Die AFM ist eine in der Zellbiologie mittlerweile gut etablierte Technik, mit welcher Zellen mittels mechanischer Einflüsse (z.B. Stauchen, Dehnen, Eindrücken) manipuliert werden können. Die FluidFM-Technologie, als erweiterte Methode, ermöglicht eine sanfte Manipulation und die Stimulation einzelner Zellen unter physiologischen Bedingungen und macht dieses Verfahren für jede biologische Anwendung in wäss-

riger Umgebung attraktiv. Hierfür gibt es bereits viele verschiedene Anwendungsgebiete, wie z. B. Zelladhäsionskraftmessungen [12, 13], Einzelzellinjektionen und -extraktionen [14, 15] sowie elektrochemische Schicht-für-Schicht-Abscheidung in wässriger Umgebung [16, 17]. Durch die Kombination mit einer externen Pumpe und einem speziellen Sondenhalter können dabei kleine Volumina vom pL- bis hin zum fL-Bereich druck- und zeitabhängig sowohl in Luft als auch in flüssiger Umgebung abgegeben werden [11, 18, 19]. Im Vergleich zu konventionellen Glaspipetten eignet sich dieses Werkzeug besonders für den Einsatz von hochpreisigen oder limitierten Substanzen, da für ein Experiment deutlich weniger Volumen benötigt wird [20, 21]. Ein weiterer Vorteil der FluidFM-Technik gegenüber den Glaspipetten ist die simultane Aufnahme von Kraft-Zeit-Kurven während der Manipulationsexperimente, mit denen die Zellschäden, welche durch Penetration verursacht werden, deutlich minimiert werden können. Somit kann die Zieloberfläche mit Hilfe der AFM-Pipette, nach der vorherigen, intensiven Charakterisierung, präzise und schonend sowohl physikalisch, biologisch als auch chemisch manipuliert werden.

In diesem Zusammenhang ist die Art der Beladung und der Durchfluss der verwendeten AFM-Pipette von besonderer Bedeutung, da diese beiden Parameter einen essentiellen Einfluss auf die weiteren Experimente haben. Zum jetzigen Zeitpunkt werden die AFM-Pipetten im Allgemeinen rückseitig über das Reservoir beladen. Im Laufe dieser Arbeit sollte deswegen überprüft werden, ob eine vorderseitige Beladung der AFM-Pipette für das weitere Vorgehen effektiver ist. Andererseits bestimmt die Durchflussrate der AFM-Pipette die spätere Abgabemenge und sollte für den verwendeten Pipettentyp charakterisiert werden.

Aktuell werden die meisten FluidFM-Experimente nur an isolierten Einzelzellen durchgeführt [22, 23]. Zellkultur-basierte Informationen können jedoch nicht die essentielle Physiologie von echtem Gewebe widerspiegeln. Tatsächlich gehen die gewebespezifische Architektur, die mechanischen und biochemischen Hinweise durch eine extrazelluläre Matrix sowie die Zell-Zell-Kommunikation zur Aufrechterhaltung der spezifischen Funktionen des Gewebes unter solchen vereinfachten Bedingungen verloren [24, 25]. Aus diesem Grund sollte die FluidFM-Technik innerhalb der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung komplexer Gewebe etabliert werden. Hierbei ist ein ausreichender lokaler Abschluss der verwendeten AFM-Pipetten mit der Gewebeoberfläche von entscheidender Bedeutung und sollte nach dem Schema in **Abb. 1.1** während der nachfolgenden Experimente evaluiert werden. In diesem Zusammenhang sollten membrangängige Substanzen zuvor in die AFM-Pipette eingesogen und anschließend lokal über die Oberfläche an das Gewebe abgegeben werden. Hierbei stand die Untersuchung der inter- und intrazellulären Signalweiterleitung in lebendem Gewebe, wie sie schematisch in **Abb. 1.1 (d)** angedeutet ist, mittels der

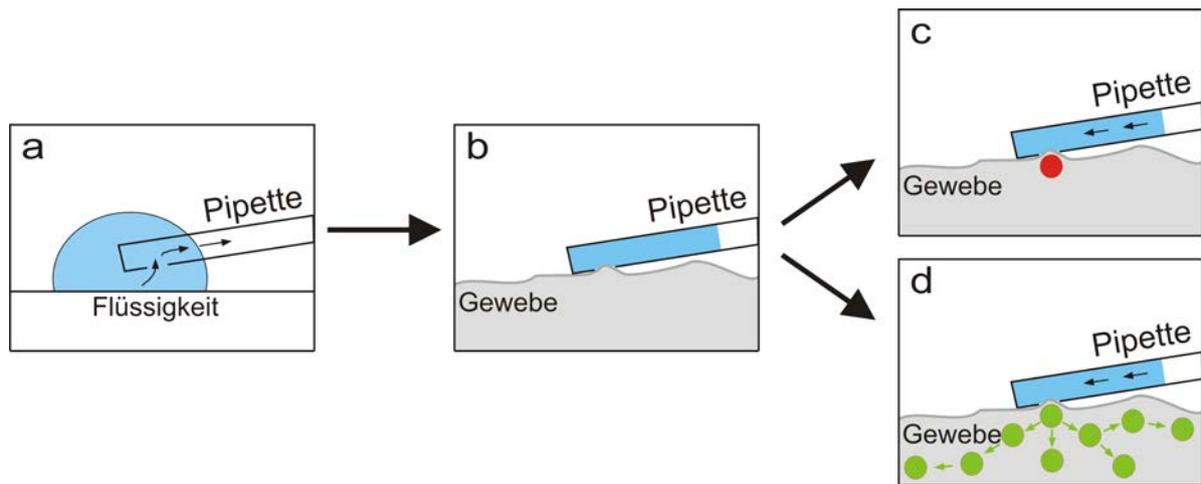


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Mikromanipulationsmethode am komplexem Gewebe. (a) Illustration einer vorstellbaren, neuartigen vorderseitigen Beladungsart am Beispiel einer Mikropipette. (b) Vorstellung eines idealen Pipetten-Oberflächen-Abschlusses für spätere Manipulationen. (c) Schema zur lokalen Farbstoffbeladung an komplexem Gewebe mit Hilfe einer zuvor beladenen Mikropipette. (d) Schematische Darstellung der lokalen Abgabe von Stimulationen, welche im Anschluss eine intrazelluläre Reaktion auslösen.

FluidFM-Technik im Vordergrund.

Dabei werden die Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* als Beispiel für ein komplexes lebendes Kleinorgan verwendet, da sie ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung des aminerg kontrollierten transepithelialen Ionentransports sind [26–28]. Bei der direkten Verwendung von membranundurchlässigen Substanzen müssen diese Flüssigkeiten über zuvor gefertigte Injektionspipetten direkt in das biologische Gewebe injiziert werden, um dort eine lokale Reaktion auszulösen. Die Injektion mittels solcher speziellen AFM-Pipetten wurde schon vermehrt in der Literatur an Zellkulturen beschrieben [14, 15, 22], jedoch noch nie an komplexem biologischen Gewebe. Aus diesem Grund sollte diese neuartige Anwendung im Laufe dieser Arbeit durchgeführt und charakterisiert werden. Durch die gleichzeitige Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und FluidFM-Technologie können vorrangig (sub)zelluläre Prozesse in lebenden Geweben genauer untersucht werden, was die aus der Literatur bekannte korrelative Bildgebung zu einem sehr leistungsfähigen Forschungsansatz macht [29, 30].

2

Theoretischer Hintergrund

2.1 Mikroskopietechniken

2.1.1 Rasterkraftmikroskopie

Grundlagen

In den 1980er Jahren wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) durch Gerd Binnig, Calvin Quate und Christoph Gerber entwickelt. 1986 führten sie dieses neuartige Oberflächenrasterverfahren ein, mit dem subatomare Struktur Oberflächen mit einer hohen örtlichen Auflösung abgerastert werden konnten. Die laterale Auflösung betrug dabei ca. 1-3 nm und die vertikale Auflösung ca. 0.1 nm [31–34]. Als Grundlage dieser Messtechnik diente die Rastertunnelmikroskopie (STM, *scanning tunneling microscopy*), welche 1986 mit dem an die Physiker Gerd Binnig und Heinrich Rohrer verliehenen Nobelpreis für Physik ausgezeichnet wurde [33]. Ein typischer AFM-Aufbau, so wie er schematisch in **Abb. 2.1** dargestellt wird, besteht aus einem AFM-Messkopf mit einer AFM-Messspitze, welche sich an einer langen Blattfeder befindet, einer Photodiode, welche als Detektor dient und einem Piezoelement, welches zur Höhenkorrektur verwendet

wird. Die AFM-Spitze schwingt mit einer für jede AFM-Spitze spezifischen Resonanzfrequenz und erfordert für eine hohe Auflösung eine lang-ausgezogene, dünne Spitze. Die Resonanzfrequenz ist sowohl von der Federkonstante k als auch von der effektiven Masse der Feder abhängig und sollte deutlich höher als die lokale Gebäudeschwingung von 100 Hz sein, da es ansonsten zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) kommt [31, 35]. Die genaue Auflösung einer Probenoberfläche ist sowohl von der Resonanzfrequenz als auch von der Form der Messspitze abhängig, da eine breite AFM-Spitze viel großflächiger als eine feinere Spitze wechselwirkt. Somit kommt es nicht mehr zu einer punktförmigen, sondern zu einer weitläufigen Interaktion, wodurch sich die Auflösung verschlechtert.

Das allgemeine Messprinzip beruht auf der Messung von attraktiven (anziehenden) und repulsiven (abstoßenden) Kräften zwischen der AFM-Messspitze und der Probe. Für die Messung dieser Wechselwirkungen muss sich die Messspitze dicht an der Probenoberfläche befinden, damit diese „abgetastet“ werden kann [32, 35]. Abhängig von der Wechselwirkung mit der Probe, kommt es während des Prozesses zur Auslenkung der Blattfeder. Während der Messungen kann zwischen einem konstanten Höhen- oder einem konstanten Kraftmodus gewählt werden. Damit z. B. die Kraft F konstant gehalten werden kann, wird die Position der Blattfeder über ein Piezoelement nachgeregelt. Das Piezoelement basiert auf dem piezo-elektrischen Effekt, bei dem der Piezoabstand über eine Spannungsänderung eingestellt werden kann. Die Höhenänderung der Blattfederauslenkung d_A wird mit Hilfe eines Lasers und einer Photodiode detektiert. Dazu wird der Laser auf die Rückseite der Blattfeder fokussiert und die Reflektion des Lasers auf eine der vier Bereiche der Photodiode projiziert. Durch die Verbiegung der Blattfeder kommt es nun dazu, dass der reflektierte Laser auf eine andere Stelle der Photodiode trifft (siehe **Abb. 2.1**). Die Auslenkung d_A wiederum kann über den Ausdruck der **Gl. 2.1** mit Hilfe der von der Photodiode gemessenen Auslenkung V_A und der zuvor kalibrierten Sensitivität β bestimmt werden. V_A wird dafür über das elektronisch, detektierte Signal der Photodiode ermittelt.

$$F = k \cdot d_A = k \cdot \beta \cdot V_A \quad (2.1)$$

Schlussendlich kann mit Hilfe der Federkonstante k und d_A die Wechselwirkung zwischen Probe und AFM-Messspitze in Form einer Kraft F ausgedrückt werden [22, 32, 33, 36]. Im Allgemeinen werden hohe Federkonstanten für harte Oberflächen und niedrige Federkonstanten für weiche Oberflächen verwendet. In dieser Arbeit wurden Federkonstanten zwischen 2-3 N/m verwendet, welche vorzugsweise für weichere Oberflächen geeignet sind. Die Bestimmung der Kraft und die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs während der Messung bilden einen essenziellen Bestandteil im Laufe dieser Arbeit. Hierbei wurde in der Mehrzahl der Fälle mit einem konstanten Kraft-Sollwert gearbeitet, welcher über eine

Höhenänderung der Messspitze mittels des Piezoelements durchgeführt wurde. Auf die genaue Handhabung wird detaillierter in **Kap. 4.3** eingegangen. Alle zuvor beschriebenen Größen und Vorgänge sind in **Abb. 2.1** zusammengefasst.

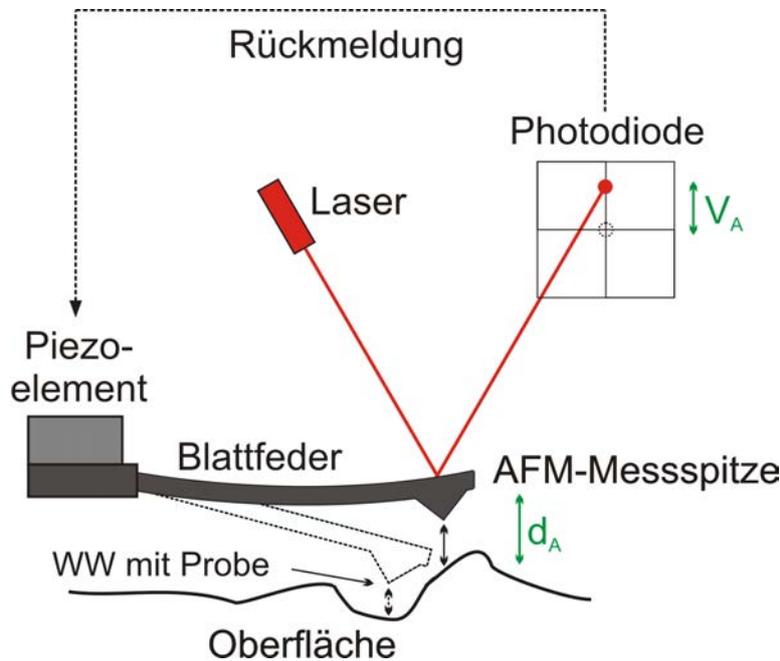


Abbildung 2.1: Darstellung eines AFM-Messaufbaus, welcher nach [22] verändert wurde. Durch Wechselwirkungen der AFM-Messspitze mit der Probenoberfläche kommt es zur Verbiegung der Blattfeder (engl. *cantilever*) um den Abstand d_A . Dadurch wird der Laser um etwa V_A auf einen anderen Bereich der Photodiode reflektiert. Das veränderte Signal an der Photodiode wird an das Piezoelement geleitet, welches anschließend die Position anpasst.

Neben der Kraftbildgebung können auch weitere Oberflächeneigenschaften wie Topographie, Elastizität, Adhäsion, Phasenabbildung und Frequenzmodulation dargestellt werden [31, 32]. AFM findet durch ihre Vielseitigkeit viele Anwendungen wie z. B. in der Materialwissenschaft zur Bestimmung von Metall- und Polymeroberflächen oder zur mechanischen Modifikation von Oberflächen mit der Spitze (kratzen), in der Biologie bei Adhäsions- und Elastizitätsexperimenten, bei der Untersuchung biologischer Strukturen unter physiologischen Konditionen und bei der Manipulation und der bildlichen Darstellung von Zellen mit einer Einzelmolekülaufösung [33, 36–39]. Bei der AFM-Technik gibt es jedoch auch einige Herausforderungen während der Messungen. Dazu gehören Gebäudeschwingungen und Vibrationen durch angeschlossene Geräte wie Kameras oder andere elektronische Komponenten. Des Weiteren können elektrische Aufladungen an der Messspitze, thermische Schwingungen oder eine Verunreinigung der Spitze mit z. B. Partikeln die Qualität der AFM-Messungen beeinflussen. Als Lösung dieser Probleme bietet sich die Verwendung schwingungsgedämpfter Tische, schallisolierter Kammern und Erdungskabel an.

AFM-Flüssigkeitsnanodosierer

Nachdem AFM in der Biologie etabliert war und damit die ersten mechanischen Manipulationen an Zelloberflächen durchgeführt wurden, wurde nach einer neuen Manipulationsart mittels AFM geforscht. Meister et al. entwickelten 2004 eine modifizierte AFM-Messsonde, den sogenannten AFM-Flüssigkeitsnanodosierer (NADIS, *nanodispenser*). Bei den NADIS handelt es sich um AFM-Messsonden, bei denen die Spitze mit einem Loch modifiziert wurde, um einen zuvor zugegebenen Flüssigkeitstropfen mit Hilfe einer kleineren Öffnung fein zu verteilen. Abhängig von der Größe der Öffnung können dabei Volumina bis in den fL- bzw. aL-Bereich abgegeben werden [40]. Das Abgabeprinzip ist in **Abb. 2.2** schematisch dargestellt.

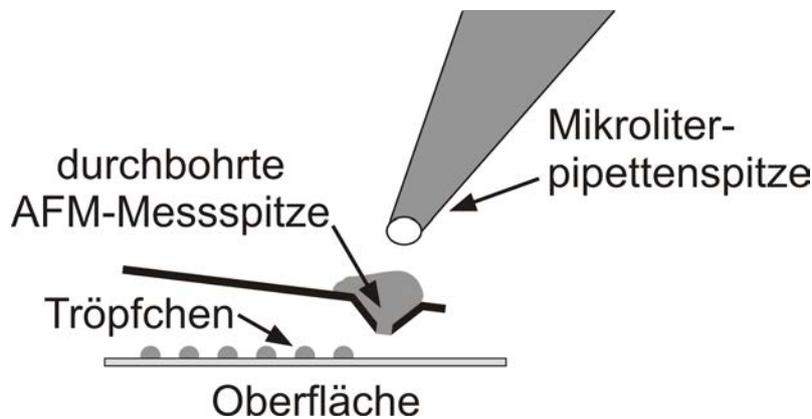


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des AFM-Flüssigkeitsnanodosierer-Prinzips nach [40]. Mittels einer Mikroliterpipette wird das Probevolumen vor dem Experiment auf den NADIS gegeben. Der NADIS fährt, unter Zuhilfenahme der AFM-Technik, an die Oberfläche und gibt, abhängig von der Größe der NADIS-Öffnung, definierte Volumina auf der Probenoberfläche ab.

Die modifizierte Öffnung wird dabei durch die fokussierte Ionenstrahl-Methode erzeugt, welche die am weitesten verbreitete Methode für NADIS ist und in **Kap. 3.3.1** kurz beschrieben wird [41]. Neben der Öffnungsgröße von NADIS ist die abgegebene Tröpfchengröße auch von der Oberflächenbeschaffenheit und dem Material der Messspitze abhängig. Besteht die Oberfläche aus einem hydrophilen Material, dann zieht sich die Flüssigkeit vor der Abgabe am äußeren Bereich entlang, so dass der tatsächliche Flüssigkeitstropfen deutlich größer ist als die eigentliche Öffnung. Dieser Zusammenhang wurde genauer von Meister et al. untersucht, indem sie die Flüssigkeitsabgabe von einem NADIS aus SiO_2 mit einem NADIS aus Si_3N_4 verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass der NADIS, welcher aus Si_3N_4 gefertigt wurde, besser für die Abgabe kleinster Volumina geeignet war [42]. Diese Methode war vor allem in den Oberflächenwissenschaften sehr beliebt, da nun Oberflächen gezielt und reproduzierbar manipuliert werden konnten [40–43].

Nanofluidische Rasterkraftmikroskopie (FluidFM)

Die Etablierung der NADIS führte zu einem Fortschritt in der chemischen Modifizierung von Oberflächen mit kleinsten Volumina. Nichtsdestotrotz war die Abgabe des Volumens durch das extern zugegebene Flüssigkeitsvolumen, die Größe seiner Öffnung in seinem Minimalvolumen und die einseitige Abgabe in einer Luftumgebung limitiert. Aus diesem Grund wurde 2009 erstmals eine neuartige Mikromanipulationsmethode eingeführt, mit der es möglich war, über eine externe Drucksteuereinheit und ein geschlossenes System gezielt und reproduzierbar kleine Volumina im fL-Bereich abzugeben [11]. Dies konnte nun sowohl in der Luftumgebung als auch in der wässrigen Umgebung erfolgen. Durch die Einführung eines mikrofluidischen Kanals, welcher die NADIS-Öffnung mit einem Reservoir verbindet, kann mit Hilfe der Drucksteuereinheit ein definiertes Volumen mit einem Überdruck bis zu 1125 mbar zur AFM-Pipettenspitze gepumpt oder mit einem Unterdruck bis zu -800 mbar in die Pipettenöffnung gesogen werden. Das Druckintervall kann hierbei bis in den ms-Bereich definiert werden [11, 18, 19]. Das Maximalvolumen des Reservoirs beträgt dabei etwa 20 μL . Der schematische Aufbau mit allen Komponenten ist in **Abb. 2.3** dargestellt.

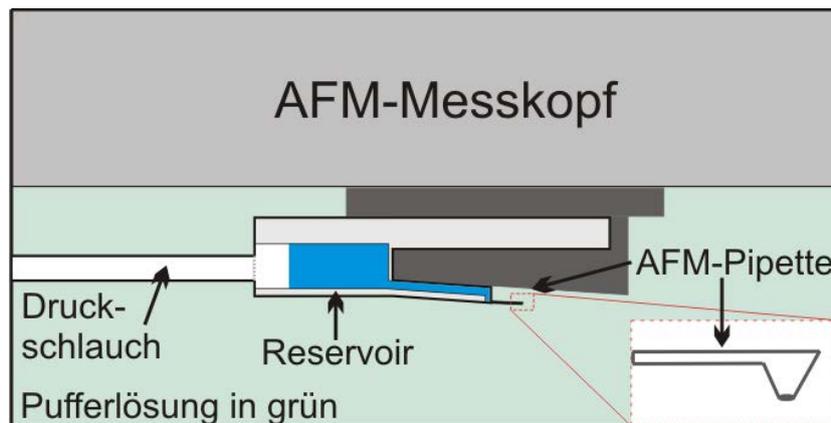


Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung des nanofluidischen Rasterkraftmikroskopie-Aufbaus, verändert nach [44]. Die Erweiterung der NADIS-Technologie durch die Einführung eines isolierten, mikrofluidischen Kanals und eines abgeschlossenen Reservoirs (ca. 20 μL). Mit Hilfe einer Drucksteuereinheit können nun Volumina mit einem Überdruck von 1125 mbar durch den Kanal gepumpt oder mit einem Unterdruck von -800 mbar in den Kanal gesogen werden. Die Nanofluidik ist in einer Plastikklammer integriert, welche mittels eines magnetischen Probehalters mit dem AFM-Messkopf verbunden ist.

Diese neue Manipulationstechnik ist im Allgemeinen als nanofluidische Rasterkraftmikroskopie (FluidFM) bekannt. Für die Volumenabgabe der Nanofluidik werden verschiedene AFM-Pipettenarten mit unterschiedlichen Pipettenöffnungen (300 nm, 2-8 μm) verwendet, welche in **Kap. 3.3.1** genauer beschrieben werden. Die Menge des abgegebenen Volu-

mens ist sowohl von der Größe der Pipettenöffnung, dem angelegten Druck als auch der angewendeten Zeit abhängig. Über eine grafische Auftragung des abgegebenen Volumens gegen den Druckimpuls (Druck·Zeit) kann der Durchfluss für jede individuelle AFM-Pipette bestimmt werden. In der Literatur wird ein Durchfluss von $(64 \pm 2) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für eine $8 \text{ }\mu\text{m}$ große AFM-Pipette beschrieben [18]. Im **Kap. 4.2.4** wird die Durchflussrate für eine $2 \text{ }\mu\text{m}$ große AFM-Pipette bestimmt.

Die Volumenabgabe und der -durchfluss sind des Weiteren von einigen Faktoren, wie der Grenzbeziehung zwischen Flüssigkeit und Luft, dem damit verbundenen Kontaktwinkel, der Diffusion und dem laminaren Fluss, abhängig, auf deren Theorie kurz eingegangen werden soll. Bei der Flüssigkeitsabgabe an Luft mittels einer AFM-Pipette spielt die Oberflächenspannung und der damit verbundene Innen- und Außendruck eines Tropfens eine entscheidende Rolle. Flüssigkeiten haben grundsätzlich das Bestreben ihre Oberfläche so zu minimieren, dass die geometrische Form einer Kugel entsteht, welche das kleinste Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzt. Diese Kugelform wird zusätzlich anhand des Effekts der Oberflächenspannung gewährleistet, welcher der Gravitation entgegenwirkt und abhängig vom verwendeten Lösungsmittel (LM) ist [45]. Der dabei entstehende Tropfen steht im ständigen Gleichgewicht mit seiner Gasphase. Im Allgemeinen ist der auftretende Innendruck p_{in} eines Tropfens größer als der Außendruck p_{ex} und wird mit Hilfe der **Gl. 2.2** (Laplace-Gleichung) beschrieben.

$$p_{\text{in}} = p_{\text{ex}} + \frac{2\gamma}{r} \quad (2.2)$$

γ entspricht der Oberflächenspannung und r dem Tropfenradius. Je größer ein Tropfen wird, desto instabiler wird die Kugelform, da sich p_{in} und p_{ex} immer weiter annähern und dadurch der Druckunterschied gegen null geht. γ wirkt sich neben der Tropfenform auch auf das Verhalten der Flüssigkeit im Kapillarrinneren aus, da Flüssigkeiten die Tendenz haben, innerhalb enger Kapillaren emporzusteigen (Kapillareffekt). Die verwendeten AFM-Pipetten können im Allgemeinen als Kapillaren angesehen werden. Wird die Pipette in eine Flüssigkeit gegeben, so kommt es zum Anstieg des inneren Flüssigkeitslevels, welcher in **Abb. 2.4 (a)** schematisch dargestellt wird. Die in der Literatur als Steighöhe h beschriebene Größe kann mit Hilfe von **Gl. 2.3** beschrieben werden [45].

$$h = \frac{2\gamma}{\rho \cdot g \cdot r} \quad (2.3)$$

ρ entspricht der Dichte des Volumens und g der Fallbeschleunigung ($g = 9.81 \text{ m/s}^2$). Anhand der **Gl. 2.2** und **Gl. 2.3** wird ersichtlich, dass es mit geringer werdendem Kapillarradius bzw. Pipettenöffnung schwieriger wird, Flüssigkeiten ins Kapillarrinnere

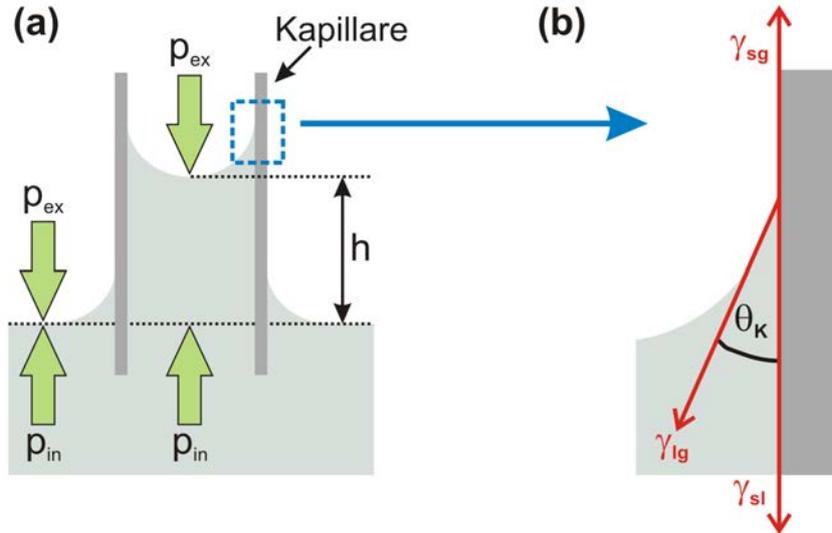


Abbildung 2.4: (a) Schematische Darstellung des Kapillareffekts für das Eintauchen einer Kapillare in eine Flüssigkeit. Die Wölbung der Flüssigkeit an der Wand wird als Meniskus bezeichnet. p_{in} bzw. p_{ex} entsprechen dem Innen- bzw. Außendruck und h der Steighöhe der Flüssigkeit innerhalb der Kapillare. (b) Vergrößerung des blauen Bereiches der Kapillarwand-Flüssigkeit-Kontaktfläche in (a), welche den Kontaktwinkel θ_K besser verdeutlicht. Die Grenzflächenspannung γ ist für die jeweiligen Grenzflächen fest-gasförmig (sg), flüssig-gasförmig (lg) und fest-flüssig (sl) rot beschriftet. Beide Abbildungen wurden nach [45] angepasst.

hineinzuziehen bzw. abzugeben. Im Falle einer Oberflächenspannungserniedrigung (z. B. durch Zugabe von Detergenzien) werden diese Vorgänge wiederum erleichtert. Der Winkel zwischen der Kapillarwand und dem Rand des Meniskus (Wölbung der Flüssigkeit an der Wand) wird als Kontaktwinkel θ_K bezeichnet. θ_K ist in **Abb. 2.4 (b)** schematisch dargestellt und wird mit Hilfe der **Gl. 2.4** berechnet [45, 46].

$$\cos \theta_K = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}} \quad (2.4)$$

γ_{sg} ist die Grenzflächenspannung zwischen fest und gasförmig, γ_{sl} die Grenzflächenspannung zwischen fest und flüssig und γ_{lg} die Grenzflächenspannung zwischen flüssig und gasförmig. θ_K ist sowohl vom verwendeten LM als auch von der Kontaktfläche abhängig, welche hydrophil oder hydrophob sein kann. Über θ_K kann ebenfalls das Verhalten und Aussehen eines abgegebenen Flüssigkeitstropfens auf einer waagerechten Probeoberfläche erklärt werden.

Um die Gesetzmäßigkeiten der allgemeinen Flüssigkeitsdynamiken innerhalb der AFM-Pipetten besser zu verstehen, werden im nächsten Abschnitt die Diffusion und der laminare Fluss in kleinen Dimensionen näher beschrieben. Jede gelöste Substanz bzw. Teilchen ist innerhalb einer inhomogenen Lösung bestrebt von einem Bereich hoher Konzentration

zu einem Bereich niedriger Konzentration zu wandern, bis die Mischung ein Konzentrationsgleichgewicht erreicht hat. Dieser Vorgang wird als Diffusion bezeichnet und erfolgt gegen einen Konzentrationsgradienten. In diesem Zusammenhang gilt nach dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz (**Gl. 2.5**): Je prägnanter sich die Konzentration innerhalb eines Ortes ändert, desto schneller erfolgt die Diffusion. Somit ist nach **Gl. 2.5** der Teilchenfluss J proportional zur ersten Ableitung der Konzentration (dc) nach dem Ort (dx) [45, 47].

$$J = \frac{dN}{A dt} = -D \frac{dc}{dx} \quad (2.5)$$

Im Zuge dessen ist $dN/A dt$ die Anzahl der Moleküle (dN), welche entlang einer Fläche A innerhalb eines Zeitintervalls (dt) diffundieren. D ist der Proportionalitätsfaktor zwischen J und dem Konzentrationsgradienten dc/dx und wird als Diffusionskoeffizient bezeichnet. Dieser ist nach Stokes und Einstein sowohl stoffspezifisch, als auch von der absoluten Temperatur T , der Viskosität η des Mediums und dem Radius r des hydratisierten Teilchens bzw. Moleküls und wird über den folgenden Zusammenhang in **Gl. 2.6** beschrieben.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.6)$$

Bei k_B handelt es sich um die Boltzmann-Konstante. Anhand dieser Gleichung wird deutlich, dass die Teilchendiffusion innerhalb eines LM stark von dessen η und der umgebenden T abhängig ist [47–50].

Um die theoretischen Grundlagen des laminaren Flusses innerhalb der verwendeten AFM-Pipetten besser zu verstehen, wird ein Zusammenhang zwischen dem Radius r der Pipette und dem angelegten Druck p benötigt, welcher die Volumenflussrate Q innerhalb der Pipette berücksichtigt. Die Relation dieser drei Parameter haben Hagen und Poiseuille mit Hilfe der **Gl. 2.7** beschrieben.

$$Q = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot r^4}{8\eta \cdot L} \quad (2.7)$$

Δp entspricht der Druckdifferenz zwischen dem angelegten Druck und dem Druck innerhalb der Pipette und L der Länge des Pipettenkanals. Hierbei wurde ebenfalls herausgefunden, dass Q in der Mitte des Kanals den maximalen Wert annimmt und in Richtung der Pipettenwand immer kleiner wird [51–53]. Mit Hilfe dieser Wechselbeziehung und der Abhängigkeit von Q von r^4 aus **Gl. 2.7** wird angenommen, dass der Strömungswiderstand in den verwendeten AFM-Pipetten sehr stark ist und dadurch hohe Δp benötigt werden, damit Flüssigkeiten abgegeben werden können.

Die FluidFM-Methode fand innerhalb der letzten Jahre Anwendung in verschiedenen Forschungsbereichen. Hierzu gehört beispielsweise das Forschungsfeld der Material- und Oberflächenwissenschaften. In diesem Feld wurde die FluidFM-Technologie verwendet, um Oberflächen mit kleinen Volumina chemisch zu funktionalisieren [43, 54] oder Flüssigkeiten elektrochemisch mit Hilfe von Elektroden auf Oberflächen abzuscheiden [16, 55]. In diesem Zusammenhang wurden nicht nur einzelne Flüssigkeitsmengen willkürlich abgegeben, sondern es wurden gezielt Lithographie-Experimente durchgeführt, in denen Strukturen auf Oberflächen geschrieben wurden [19, 56]. Infolgedessen wurde diese Technologie auch für die Produktion von 3D-Strukturen in wässriger Umgebung verwendet, indem Substanzen, welche aus der AFM-Pipette abgegeben wurden, elektrochemisch Schicht für Schicht abgeschieden wurden [17]. Des Weiteren wurde die FluidFM-gekoppelte Lithographie auch dazu verwendet, um durch eine linienförmige Abgabe von Poly-L-Lysin einzelne Neuronenzellen miteinander zu verbinden, damit diese Zellen untereinander kommunizieren können [57]. Im Anschluss daran wurden Manipulationsexperimente an der Zellmembranoberfläche mit dem Neurotransmitter Glutamat an diesen Neuronenzellen durchgeführt, um einen lokalen Ca^{2+} -Anstieg in den Zellen zu induzieren und eine mögliche Zell-Zell-Kommunikation zwischen den Einzelzellen zu detektieren [23].

Die FluidFM-Technologie wurde weiterhin auch für die Messung von Adhäsionskräften von kolloidalen Strukturen oder Zellkulturen an Oberflächen wie z. B. Glas verwendet. Dabei wurden zunächst Experimente durchgeführt, bei denen Polymerpartikel oder Zellen mit der AFM-Pipette angesogen oder aufgesogen und danach an eine andere Stelle transportiert wurden [18, 22, 44, 58]. Dies bildete die Grundlage für die anschließenden Adhäsionsexperimente mit kolloidalen Teilchen. Dabei wurde sowohl der Einfluss der physikochemischen Eigenschaften, wie unterschiedliche Partikelzusammensetzung (harter oder weicher Kern) und -beschaffenheit (funktionelle Gruppen), als auch der Einfluss der verschiedenen Oberflächen auf die Adhäsion untersucht [59–61]. Auf der anderen Seite gibt es im biologischen Bereich eine deutlich höhere Anzahl an Publikationen, die sich mit der Adhäsion von Zellkulturen und ihren Wechselwirkungen mit verschiedenen Oberflächen beschäftigen [12, 22, 62–64]. In diesem Zusammenhang wurden Zelllinien auch auf ihre Deformationseigenschaften unter Krafteinwirkung untersucht [65]. Neben dem Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit wurde weiterhin der Einfluss von elektrischem Strom auf die Adhäsion von Jaatinen et al. untersucht [13]. Grundsätzlich spielt die simultane Kraftdetektion mittels der AFM-Technik eine sehr wichtige Rolle innerhalb der FluidFM-Technologie.

Eine weitere große Anwendung der FluidFM-Technik zeigte sich in der Injektion, Extraktion und Penetration von Zelloberflächen [22]. Von besonderer Bedeutung war hierbei die

Fixierung der Zellen auf der Oberfläche, da für die Zellpenetration hohe Kräfte von z. B. 550 nN nötig sind [15], um die Membran mit der AFM-Spitze zu durchdringen. Mit dieser Technik wurden exemplarisch Zellen mit membranundurchlässigen Substanzen beladen [14], alle Komponenten von einzelnen Zellkernen und Zellzytosolen extrahiert [15] und die Massen und Zellbestandteile einzelner Zellen in Kombination mit Massenspektrometrie bestimmt [66].

2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Absorption, Fluoreszenz und Desaktivierungsprozesse

Die Wechselwirkungen von elektromagnetischer Strahlung mit Molekülen und die darauffolgenden Desaktivierungsprozesse können mit Hilfe des Perrin-Jablonski-Diagramms in **Abb. 2.5** beschrieben werden. Die allgemeine Resonanzbedingung **Gl. 2.8**, welche die Wechselwirkung von Materie mit elektromagnetischer Strahlung beschreibt und als Grundlage der im Folgenden beschriebenen spektroskopischen Messungen gilt, lautet:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (2.8)$$

Dabei entspricht ΔE der Energie, die aufgebracht werden muss, um ein Elektron vom elektronischen Grundzustand (S_0) in einen energetisch höheren Zustand (S_n) anzuheben. Die Konstante h ist das Planck'sche Wirkungsquantum ($h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ Js) und ν die Frequenz des absorbierten bzw. emittierten Photons. Die daraus folgende Energiedifferenz ΔE ist stoffspezifisch und somit für jede Verbindung charakteristisch. Während des Absorptionsprozesses werden Photonen mit einer bestimmten Energie auf die Probe eingestrahlt. Ist die Energiedifferenz ΔE kleiner als die Energie des eingestrahlten Photons, so kann die Verbindung das Photon absorbieren und ein Elektron in den angeregten Zustand versetzen. Anhand der eingestrahlten Intensität I_0 , der nach dem Absorptionsprozess noch detektierbaren Intensität I und dem Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetz **Gl. 2.9** kann die Güte der Absorption folgendermaßen beschrieben werden.

$$E(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (2.9)$$

In diesem Zusammenhang ist $E(\lambda)$ die Extinktion, c die Konzentration der verwendeten Probe, l die Schichtdicke der Probe, mit der das Licht wechselwirkt und ϵ_λ der molare Extinktionskoeffizient. Dieser Parameter ist wellenlängenabhängig und für jede Substanz

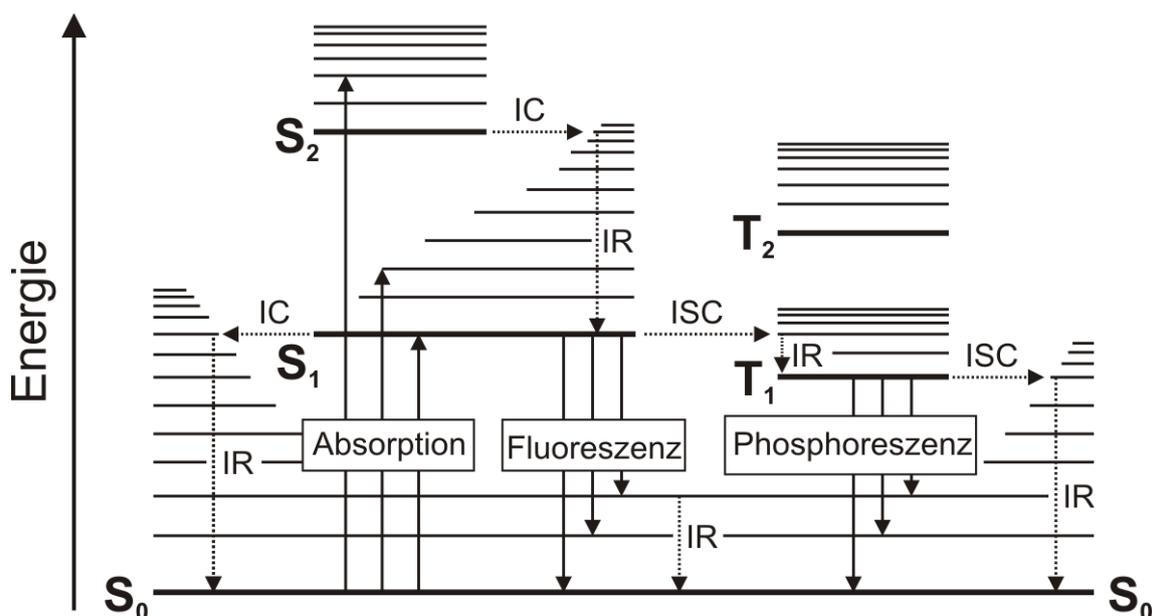


Abbildung 2.5: Darstellung eines vereinfachten Perrin-Jablonski-Diagramms, welches aus [67] adaptiert wurde und sowohl die elektronischen Zustände eines Moleküls als auch die elektronischen Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen schematisch aufzeigt. IC - Innere Konversion, IR - Innere Relaxation, ISC - Interkombination, S - Singulettzustand, T - Triplettzustand, (—) strahlungsbehaftete Prozesse, (···) strahlungslose Prozesse.

spezifisch. Des Weiteren ist dieser Parameter auch abhängig von seiner Umgebung, so dass über ϵ_λ stoffspezifische Eigenschaften bestimmt werden können [45, 68].

Nach der Absorption befindet sich das Elektron in einem elektronisch angeregten Zustand, welcher metastabil ist. In diesem Zustand hat das Elektron mehrere Möglichkeiten, um über die verschiedenen Desaktivierungsprozesse in den Grundzustand zurückzukehren. Dazu gehören die strahlungslose und die strahlende Desaktivierung. Zur strahlungslosen Desaktivierung gehören die innere Konversion (IC) mit anschließender innerer Relaxation (IR) und die Interkombination (ISC). Bei diesen Vorgängen wird thermische Energie durch Translation, Rotation oder Schwingung an die Umgebung abgegeben (IR). Diese Prozesse können innerhalb eines elektronisch angeregten Zustands oder zwischen zwei Schwingungszuständen erfolgen.

Die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz gehören dagegen zu den strahlenden Desaktivierungsprozessen. In diesem Fall wird die Energie spontan durch ein emittiertes Photon abgegeben. Der Unterschied zwischen der Phosphoreszenz und der Fluoreszenz liegt im Allgemeinen in den Zeitdauern der Prozesse. Die Lumineszenzabklingzeit liegt im Falle einer Phosphoreszenz im μs -Bereich bis zu mehreren Stunden, welche einer Spinumkehr aus dem Triplett-Zustand zu Grunde liegt. Das Lumineszenzabklingzeitverhalten bei der Fluoreszenz liegt dagegen im ns-Bereich. Für die Fluoreszenz gilt die Regel von Kasha.

Nach dieser Regel erfolgt die Fluoreszenz immer aus dem Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 [69]. Das emittierte Licht der Fluoreszenz besitzt hierbei eine geringere Energie als das absorbierte Licht, da durch das Zurückkehren in den ersten angeregten Schwingungsgrundzustand S_1 Energie durch IR an die Umgebung verloren geht [45, 48, 67, 68]. Alle zuvor beschriebenen Desaktivierungsprozesse sind in **Abb. 2.5** zusammengefasst dargestellt.

Prinzip und Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie

Eine in der Biologie und Chemie mittlerweile fest etablierte und vielseitige Methode stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Diese gibt einen umfangreichen Überblick über die untersuchte Probenfläche, welche mit Hilfe des verwendeten Objektivs in Echtzeit abgebildet wird. Im Gegensatz dazu wird bei der klassischen Fluoreszenzspektroskopie nur an einem Punkt gemessen. Vor allem bei der Untersuchung biologischer Prozesse in lebenden Zellen spielt die Fluoreszenzmikroskopie eine essentielle Rolle, da dieses bildgebende Verfahren durch ihre nicht invasive Methodik, die Vielzahl an verfügbaren Fluoreszenzmarkern und ihre hohe Sensitivität sehr attraktiv für jede Art von Proben ist [70, 71].

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird Licht mit Hilfe eines Objektivs (Luft-, Wasser-, Glycerin- oder Ölimmersionsobjektiv) in ein Mikroskop eingekoppelt. Bei diesem Anregungslicht kann es sich um monochromatisches Laserlicht einer definierten Wellenlänge oder um Licht eines Wellenlängenbereiches, z. B. aus einer Quecksilberbogenlampe, welches zuvor mit einem Anregungsfilter spektral getrennt wird, handeln. Im Allgemeinen gibt es drei Arten von Filtern. Einerseits den Langpassfilter (LP), welcher nur Licht höher als die angegebene Wellenlänge transmittiert, andererseits den Kurzpassfilter (SP), welcher nur Licht kürzer als die angegebene Wellenlänge durchlässt und den Bandpassfilter (BP), welcher nur Licht in einem bestimmten Intervall transmittiert. Im Falle einer breiten Anregung wird generell ein BP vorgeschaltet, um die gewünschte Anregungswellenlänge zu separieren. Bei der inversen Fluoreszenzmikroskopie, welche im unteren Bereich der **Abb. 2.6** dargestellt wird, wird das Anregungslicht anschließend an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch ein Objektiv in die Probe fokussiert [48, 70, 71]. Nach der Wechselwirkung des Anregungslichtes mit der Probe, welche bereits im **Kap. 2.1.2** beschrieben wurde, wird das langwelligere Emissionslicht mit Hilfe des Objektivs gesammelt und gebündelt. Anschließend wird das emittierte Licht durch den dichroitischen Spiegel transmittiert und im weiteren Verlauf über einen zusätzlichen Spiegel zur Detektionseinheit geleitet. Als Detektionseinheit werden bei der Fluoreszenzmikroskopie

im Allgemeinen Kameras, jedoch auch Photovervielfacherröhren (PMT) und Avalanche-Photodioden (APD) verwendet. Zu den bekanntesten Kamera-Varianten gehören die Ladungskopplungsspeicher (CCD)-Kamera, für deren Entwicklung Boyle und Smith 2009 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet wurden, und die elektronenvervielfachende Ladungskopplungsspeicher (EMCDD)-Kamera. Der Halbleiter-Chip einer CCD-Kamera besteht aus lichtempfindlichen Photodioden, welche eine gute Sensitivität im linearen dynamischen Bereich aufweisen und zweidimensionale Bilder erstellen können. Dabei übertragen die detektierten Photonen ihre Energie durch einen photoelektrischen Effekt auf die Elektronen des Halbleiters, welche in diesem Zusammenhang aus der Halbleiterschicht herausgeschlagen werden. Diese Elektronen werden anschließend aufgrund einer angelegten Spannung getrennt, in Pixeln (Bildpunkten) gesammelt und die Pixel zeilenweise ausgelesen. Bei der EMCCD-Kamera handelt es sich um eine Erweiterung der CCD-Kamera, welche eine höhere Sensitivität besitzt, da das SNR durch eine nachgeschaltete Elektronenvervielfältigung deutlich besser ist. Zunächst werden die Elektronen, ähnlich wie beim CCD-Sensor, herausgeschlagen und gesammelt. Im Anschluss werden die ankommenden Signale vervielfacht, da zwischen dem Ausgangsverstärker und der Ausleseinheit ein Elektronenvervielfacher-Element geschaltet ist. Dadurch lassen sich mit Hilfe dieses Kameratyps auch schwache Signale detektieren [48, 71, 72].

Die räumliche Auflösung der abgebildeten Strukturen ist dabei grundsätzlich beugungsbegrenzt, d. h. alle Strukturen kleiner als die Maximalauflösung werden räumlich nicht aufgelöst. Der Zusammenhang zwischen der lateralen Auflösung d_{xy} , der Emissionswellenlänge λ_{em} und der Numerischen Apertur NA wird in der **Gl. 2.10** (ABBE-Gleichung) beschrieben.

$$d_{xy} = \frac{\lambda_{em}}{2NA} \quad (2.10)$$

d_{xy} ist der minimale Abstand zwischen zwei Objekten, um diese separat darzustellen. Innerhalb dieser Arbeit wurden Objektive mit einer NA von 0.65 verwendet, so dass bei einer Emissionswellenlänge von ca. 535 nm eine maximale Auflösung von etwa 412 nm erreicht werden kann [69, 71].

Als Fluoreszenzmarker für die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Proben werden organische Sensorfarbstoffe, auf die in **Kap. 2.2** detaillierter eingegangen wird, oder fluoreszierende Proteine verwendet. Das bekannteste Fluoreszenzprotein ist das grün fluoreszierende Protein [73, 74], für dessen Entdeckung R. Tsien 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Zusätzlich zu den konventionellen organischen Fluoreszenzfarbstoffen können mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auch Autofluoreszenzsignale in biologischen Proben untersucht werden, da Zellen fluoreszierende Koenzyme, wie z. B.

das Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) oder das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), besitzen. Diese können im UV-Bereich sowie im blauen Bereich des sichtbaren Lichtes angeregt werden [75–77]. Aus diesem Grund muss bei Zellmessungen im Allgemeinen mit erhöhter Hintergrundfluoreszenz gerechnet werden.

Neben der allgemeinen Fluoreszenzmikroskopie gibt es noch zahlreiche Erweiterungen dieser Methode. Hierzu gehören z. B. die konfokale Fluoreszenzmikroskopie [6, 78] und die hochauflösende Mikroskopie mit den bekannten Methoden wie z. B. STED und PALM [79–82], welche 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden [83].

2.1.3 Korrelative Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie

Neben den einzelnen Mikroskopietechniken können diese auch miteinander korreliert werden, um während der Messungen zusätzliche Informationen zu gewinnen. Dazu gehört z. B. die optische Beobachtung der Reaktion von biologischen Systemen auf Pharmaka bei simultaner Kontrolle eines möglichen Anschwellens der Oberfläche. Im Falle von AFM und der Fluoreszenzmikroskopie sind zahlreiche Kombinationen bekannt [29, 34, 84–87]. Hierfür wird im Allgemeinen ein inverser Fluoreszenzmikroskopieaufbau mit einem AFM-Aufbau über eine speziell angepasste Verbindungsplattform miteinander kombiniert. In **Abb. 2.6** ist der kombinierte Aufbau schematisch dargestellt. In diesem Zusammenhang wird die AFM-Technik verwendet, um die Oberfläche oder die zellmechanischen Eigenschaften einer biologischen Probe hochauflösend im nm-Bereich darzustellen. Mittels der Fluoreszenzmikroskopie können parallel die Prozesse innerhalb der Bioprobe visualisiert und die Folgereaktionen aufgrund von mechanischer äußerer Stimulation beobachtet werden [34, 85, 86, 89]. Die grundlegenden Herausforderungen bei diesem Aufbau bestehen vor allem in der Verwendung der passenden AFM-Messspitzen, welche eine möglichst genaue Darstellung der wahren Zelloberflächenbeschaffenheit ermöglichen, der exakten Ausrichtung des Fluoreszenz- und AFM-Aufbaus, damit die gemessenen Signale ideal miteinander überlappen, gemeinsam gemessen und ausgewertet werden können, und einem passenden Anpassungsmodell, so dass die gemessenen Signale in die exakte Struktur umgerechnet und dargestellt werden können [36, 85]. Dazu gehört auch die simultane Ansteuerung beider Methoden, woraufhin das Experiment zum gleichen Zeitpunkt gestartet werden kann. Ein Nachteil der AFM-Technologie ist die relativ langsame Bildaufnahmegeschwindigkeit [34]. Durch die Verknüpfung mit der Fluoreszenzmikroskopie werden schnellere Bildaufnahmen ermöglicht, so dass dynamische Prozesse innerhalb der Zellen beobachtet werden können. Die bei der Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Kameras stellen eine weitere Herausforderung für die simultanen AFM-Messungen dar, da die Kühlungs-

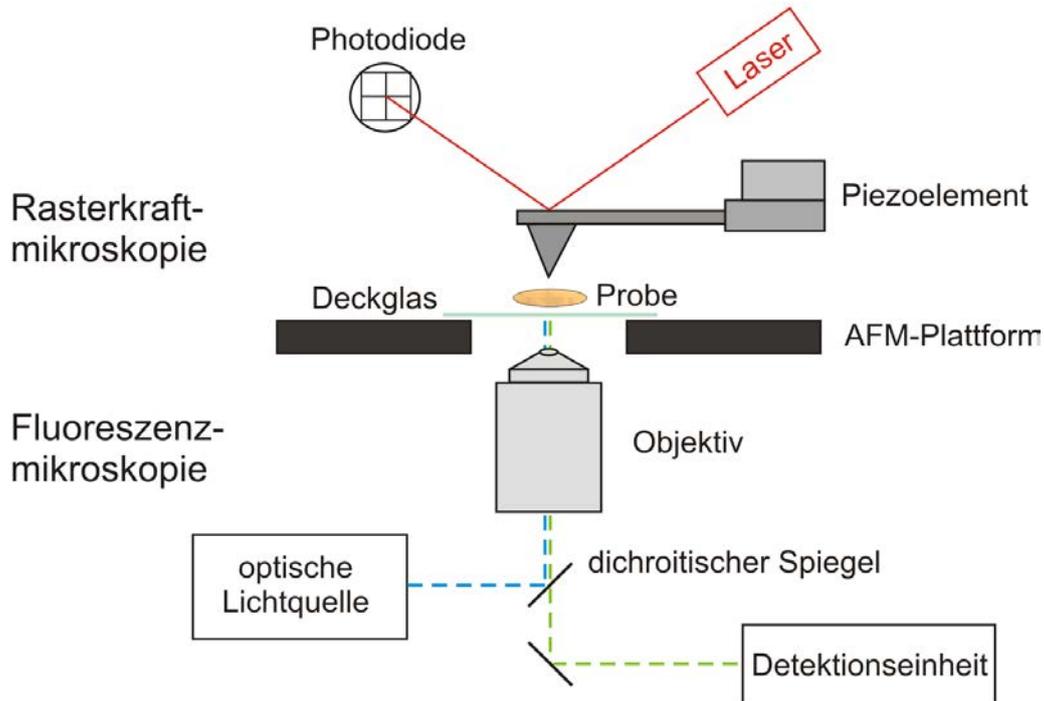


Abbildung 2.6: Vereinfachte, schematische Darstellung eines kombinierten AFM- und Fluoreszenzmikroskopieaufbaus, welches nach [88] verändert wurde. Der obere Bereich besteht aus einem typischen AFM mit speziell angepasster AFM-Plattform, welche mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop im unteren Bereich verbunden ist.

elemente der Kamera zu weiteren Umgebungsvibrationen und dadurch zu einem erhöhten Hintergrundrauschen führen. Die Verwendung von schwingungsgedämpften Tischen soll dem entstehenden Problem entgegenwirken.

In den letzten Jahren wurde in diesem Zusammenhang häufig eine hochauflösende Mikroskopiertechnik mit AFM verknüpft, um damit genauere Informationen über die Ultrastrukturen von biologischen Proben zu erhalten [84]. Dabei liefert die Kombination beider Methoden eine höhere räumliche Auflösung, da sowohl eine hohe Topographieauflösung mittels AFM als auch spezifische chemische Informationen über die Fluoreszenzmikroskopie simultan erhalten werden.

Ein oft verwendetes Beispiel sind die Strukturproteine des Aktinfilaments und die Mikrotubuli, da sie neben den Intermediärfilamenten das Zytoskelett eukaryotischer Zellen bilden und somit ihre genaue Struktur und Funktionsweise von entscheidender Bedeutung für den Zellaufbau sind. Mit Hilfe des korrelierten Mikroskopieaufbaus wurde der Aufbau dieser beiden Proteine und der Einfluss auf die äußere Gerüststruktur erforscht [90–92]. Darüber hinaus wurde sowohl der Prozess der Polymerisierung und der Depolymerisierung vom Monomer G-Aktin zum Polymer F-Aktin [93] als auch die Aktinbindung innerhalb

der Zelle untersucht [94]. Außerdem wurde von Cascione et al. mit diesen Methoden der genauere Prozess der Mitose (Zellteilung) von Wirbeltierzellen beobachtet [90]. Spedden et al. nutzten AFM und die Fluoreszenzmikroskopie, um sich die Elastizität von Neuronen anzuschauen und im Anschluss das Wachstum und die mechanische Belastbarkeit von Neuronen zu verstehen [86]. Des Weiteren gibt es einige Arbeiten, welche sich mit dem Einfluss von mechanischem Stress auf Zellen beschäftigen. Dabei wurde einerseits die mechanische Festigkeit vaskulärer Endothelzellen in Abhängigkeit des elektrischen Potentials analysiert [88]. Andererseits konnte mittels AFM der Einfluss von mechanischem Stress auf Zellen, bei denen parallel Calciumsignale über die Fluoreszenzmikroskopie gemessen wurden, untersucht werden. Hierüber konnten im Anschluss Modelle für die Lage einzelner Zellkompartimente entwickelt werden [95]. Auf eine weitere Anwendung der Kombination beider Methoden wird nochmals beispielhaft in **Kap. 4.2.1** eingegangen.

2.2 Sensorfarbstoffe

Für das bildgebende Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie ist die Verwendung sogenannter Sensorfarbstoffe notwendig, um eine Probe oder einen speziellen Analyten mit einem guten SNR im Vgl. zum Hintergrund darstellen zu können. Sensorfarbstoffe sind spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, welche eine oder mehrere funktionelle Gruppen (z. B. Kronen, Chelator-Gruppen, uvm.) besitzen, mit denen sie bestimmte Analyten kovalent oder ionisch binden und durch die somit induzierte Veränderung ihrer spektroskopischen Eigenschaften visualisiert werden können. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität beruht dabei im Allgemeinen auf der Vergrößerung des delokalisierten π -Elektronensystems, welches in den meisten Fällen zu einer langwelligen Verschiebung von $\lambda_{em,max}$ führt. Zu den bekanntesten Mechanismen gehört z. B. der Photoinduzierte Elektronentransfer (PET), bei dem die Fluoreszenz bei Abwesenheit des Analyten durch z. B. ein N-Atom in der funktionellen Gruppe gelöscht wird. Bei der Anwesenheit des Analyten wird das Energieniveau des Iophors abgesenkt und die Fluoreszenz kann somit aus dem S_1 -Zustand der fluorophoren Gruppe des Sensorfarbstoffs erfolgen. Dadurch kommt es zu einer Intensitätserhöhung der Fluoreszenz. Abgesehen davon sind für ein gutes SNR ebenso ein geringes Photobleichen und eine hohe Quantenausbeute des Farbstoffes vorteilhaft. Das Photobleichen beschreibt den irreversiblen Verlust der Fluoreszenz durch die Lichtbestrahlung, bei dem Farbstoffmoleküle photochemisch zerstört werden. Die Quantenausbeute umschreibt das Verhältnis der absorbierten Photonen zu den eingestrahlenen Photonen [48, 96].

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Rh6G) ist ein etablierter Referenzfarbstoff, wel-

cher aufgrund seiner hohen Quantenausbeute ($\Phi = 0.95$) und seines geringen Photo-bleichens auch als Laserfarbstoff verwendet wird [97, 98]. Rh6G ist sowohl wasser- als auch ethanollöslich und zeigt lösungsmittel- und konzentrationsabhängig unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften [99, 100]. CellTrackerRed (CTR) ist ein membrangängiger Farbstoff, welcher Zellen unspezifisch einfärbt und sich größtenteils im Zytoplasma anreichert. Dieser Farbstoff wird zur Zellmarkierung verwendet, da er Zellen innerhalb von 10 Minuten einlagert [101–103]. SYTO 9 Green ist ebenfalls ein membrangängiger Farbstoff, der sich auch im Zytoplasma anreichert und zusätzlich interkalierende Eigenschaften besitzt, d. h. er lagert sich vorzugsweise in DNS und RNS ein. Somit ist SYTO 9 prädestiniert, um intakte Zellkerne zu markieren [104, 105]. Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1) ist ein Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff, welcher als etablierter Ca^{2+} -Sensor oft für die Ca^{2+} -Darstellung in lebenden Organismen im nM-Bereich verwendet wird. BAPTA ist ein Chelatbildner, welcher Ca^{2+} ionenspezifisch bindet. Die Bindung von Ca^{2+} an den Chelator führt zu einer Fluoreszenzintensitätserhöhung [106–108]. Der NO-Sensorfarbstoff 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoresceindiacetat (DAF-FM) bindet ein NO-Molekül irreversibel, indem der Farbstoff mit einem zuvor gebildeten NO^+ reagiert und ein stabiles und stark fluoreszierendes Triazolofluorescein bildet. Der Nachteil ist, dass dadurch keine weitere NO-Konzentrationsänderung über dieses Sensormolekül detektiert werden kann [109, 110]. Die spektroskopischen Eigenschaften aller Farbstoffe sind zusammenfassend in **Tab. 2.1** dargestellt.

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften aller während der Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen Literaturquellen.

Sensorfarbstoff	Analyt	$\lambda_{\text{abs,max}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em,max}} / \text{nm}$	Quellen
DAF-FM	NO	495	515	[109, 110]
CTR	-	577	602	[101–103]
OGB-1	Ca^{2+}	494	522	[106, 107]
Rh6G	-	530	560	[97, 99, 100]
SYTO 9	DNS/RNS	480	500	[104, 105]

2.3 Biomimetische und biologische Modellsysteme

2.3.1 Riesige einschichtige Vesikel (GUV)

Phospholipidmembranen sind vielfältige Strukturen, um biologische Oberflächen zu imitieren [111]. Diese Phospholipide bestehen aus einer hydrophilen (wasserliebenden) und einer hydrophoben (wasserabweisenden) Gruppe. Ordnen sich diese Phospholipide zweilagig nebeneinander an, so dass eine wassergefüllte Phospholipidkugel mit hydrophilen Gruppen innerhalb der wässrigen Umgebung entsteht, so werden diese als einschichtige Vesikel bezeichnet. Wenn diese Vesikel eine Größe von 5 μm bis etwa 100 μm besitzen, werden diese generell als riesige einschichtige Vesikel (GUV) beschrieben. Die Struktur eines GUV ist in **Abb. 2.7** schematisch dargestellt. Diese GUV werden in der Literatur beispielsweise als Wirkstofftransportsystem oder für die Untersuchung von modellhaften Zellmembranoberflächen verwendet [112, 113]. Im Allgemeinen wird hierbei von biomimetischen (zellähnlichen) Strukturen gesprochen, da diese strukturell als Modellsystem für eine einzelne Zelle dienen und dadurch sowohl für die Aufklärung von biophysikalischen als auch biochemischen Eigenschaften biologischer Membranen benutzt werden können [114, 115].

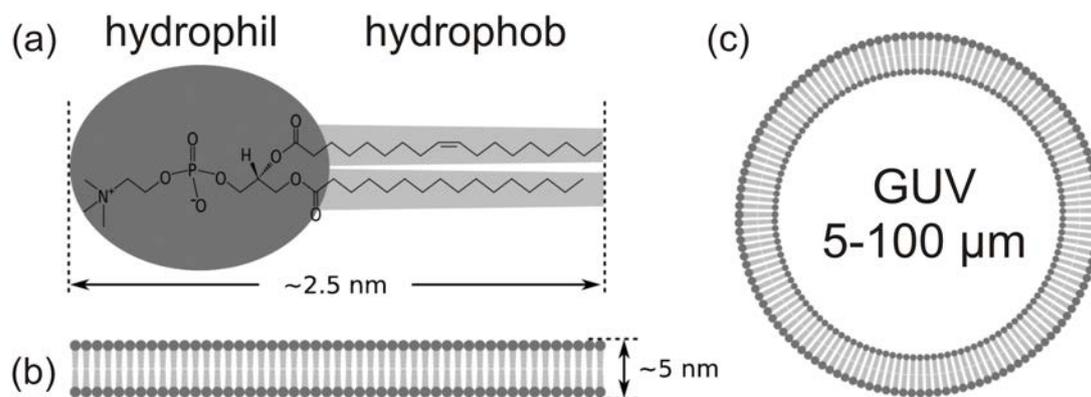


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines GUV nach [116]. (a) Exemplarische Struktur eines Lipid-Moleküls, welches eine hydrophile Kopfgruppe und eine hydrophobe Schwanzgruppe besitzt. (b) Interaktion der Kopf- und Schwanzgruppen, welche sich durch Selbstorganisation zu einer Membranstruktur anordnen. (c) Schema eines GUV.

2.3.2 Zelllinien

Eine Zelle ist der kleinste Bestandteil eines Lebewesen und somit die Grundlage für alle komplexeren Organismen. Aus diesem Grund ist das Verständnis ihres Aufbaus und ihrer

Funktionen von besonderem Interesse. Hierzu gehören z. B. die mechanische Stabilität und der Zytoskelettaufbau solcher Zellen [117]. Des Weiteren werden Zelllinien in der Biologie auch gerne als einfaches biologisches Modellsystem verwendet, um die Wirkungen von neuen Wirkstoffen oder anderen Chemikalien auf diese Zellen zu testen [118]. In dieser Arbeit wurden speziell die menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen, *human embryonic kidney cells*) verwendet, weil HEK-Zellen, neben HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), aufgrund ihrer zuverlässigen Wachstums- und Transfektionsmöglichkeiten eine gut untersuchte, robuste Zellkultur sind [119–121]. Durch ihren spindelförmigen Aufbau, ihre adhärierenden Eigenschaften und ihre geringe Dicke von 1-2 μm , welche in **Abb. 2.8** dargestellt sind, eignen sie sich gut als Testsystem für die späteren Injektionsexperimente, welche in **Kap. 4.6.2** genauer beschrieben werden. Das liegt daran, da der Probenoberflächenkontakt im Anschluss an die Zellpenetration detektiert wird und somit davon ausgegangen werden kann, dass sich die Spitze innerhalb der Zelle befindet.

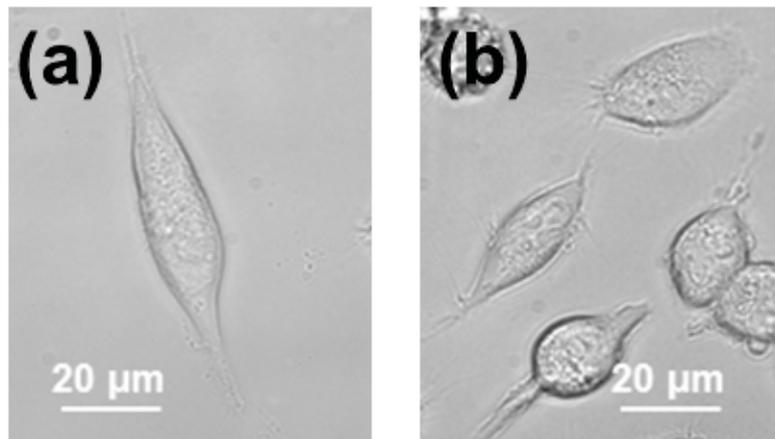


Abbildung 2.8: Hellfeldaufnahme der Morphologie von HEK-Zellen. (a) Exemplarisches Bild einer HEK-Zelle, bei der die spindelförmige Form gut zu erkennen ist. (b) Darstellung von mehreren kleineren HEK-Zellen, welche kleine haarähnliche Filopodien an der Membranaußenseite besitzen.

2.3.3 Drüsengewebe der Schabe *P. americana*

Zur Untersuchung von interzellulären Reaktionen werden bevorzugt komplexere Zellverbände herangezogen [24], die den realen Sachverhalt besser nachbilden als einzellige, separierte Organismen. In diesem Zusammenhang wurden die Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* oft als etabliertes Modellsystem für die physiolo-

gischen Untersuchungen von Ionen- und Wassertransportprozessen in Epithelien verwendet [26, 122, 123]. Diese Drüsen sind leicht zugänglich und einfach zu präparieren. Wie in **Abb. 2.9** dargestellt, bestehen diese Speicheldrüsen aus zwei Regionen: den schlauchförmigen Ausführgängen und den komplexen, traubenförmigen Acini, welche sich aus den zentralen Zellen (c-Zellen) und den peripheren Zellen (p-Zellen) zusammensetzen. Die c-

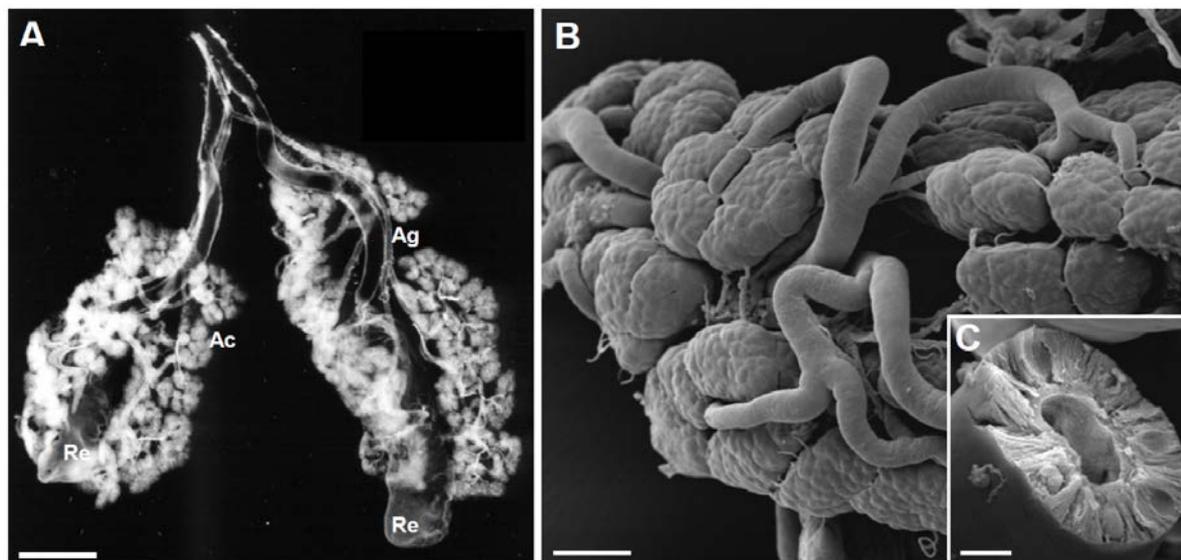


Abbildung 2.9: Übersicht des morphologischen Aufbaus der Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe *P. americana*, welche aus [123] übernommen wurde. (a) Dunkelfeldbild eines paarigen Speicheldrüsensegments, welches aus mehreren Ausführgängen (Ag), vielen azinösen Strukturen (Ac) und zwei Reservoirien (Re) besteht, Skala = 1 mm. (b) Rasterelektronenmikroskopische Bildaufnahme einer äußeren Schicht von verschiedenen Ausführgängen und Acini, Skala = 100 μm . (c) Kryotechnische Darstellung eines eingefrorenen und anschließend aufgebrochenen Ausführgangs zur besseren Abbildung des inneren Lumens, Skala = 20 μm .

Zellen sind auf die Proteinsynthese und -sekretion spezialisiert, während die p-Zellen für den Elektrolyt- und Wassertransport verantwortlich sind [124, 125]. In den Acini wird der NaCl-reiche Primärspeichel produziert, welcher im Anschluss in den Ausführgängen modifiziert und weitergeleitet wird. Mittels der biogenen Amine Serotonin und Dopamin kann die Speichelproduktion in den Drüsen von *P. americana* stimuliert werden. Bei der Stimulierung mit Serotonin entsteht ein proteinhaltiger Speichel, wobei bei der Freisetzung von Dopamin ein wässriger, proteinfreier Speichel produziert wird [28]. Während dieser Arbeit sollte vorrangig dieses komplexe Gewebe mit der FluidFM-Technik untersucht werden, da diese Kombination neue Informationen über interzelluläre Zell-Zell-Kommunikation und Transportprozesse hervorbringen sollte. Hierzu wird sich im **Kap. 4.4** anfangs mit der lokalen Farbstoffbeladung beschäftigt und im Anschluss wird in **Kap. 4.5** der lokale Einfluss von Pharmaka auf diesen Organismus untersucht.

3

Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Chemikalien, ihre Hersteller, ihre Reinheit und ihre Lagerung sind in **Tab. 3.1** und **Tab. 3.2** aufgeführt.

Tabelle 3.1: Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Bezugsquelle	Reinheit	Lagerung
4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoresceindiacetat	Life Technologies ¹	-	-20°C
CellTracker Red CMPTX	Life Technologies ¹	-	-20°C
IgG Antikörper (Ziege gegen Ratte), Alexa Flour 647 gekoppelt	Life Technologies ¹	-	4°C
Oregon Green 488 BAPTA-1 (AM-Ester)	Life Technologies ¹	-	-20°C
Rhodamin 6G	Sirah ²	-	RT
SYTO 9 Green	Life Technologies ¹	-	-20°C
TetraSpeck TM Mikrosphären 0.1 µm	Life Technologies ¹	-	4°C

¹ Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

² Sirah Lasertechnik, Grevenbroich, Deutschland

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle	Reinheit	Lagerung
Aceton	Carl Roth ¹	≥ 99.7%	RT
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth ¹	≥ 99%	RT
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth ¹	≥ 99.8%	RT
1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	Avanti ²	≥ 99%	-20°C
1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin	Avanti ²	≥ 99%	-20°C
Dopamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich ³	-	4°C
Ethanol	Carl Roth ¹	≥ 99.8%	RT
α-D-(+)-Glukose-Monohydrat	Carl Roth ¹	≥ 99.5%	RT
Glyzerin	Sigma-Aldrich ³	≥ 99.5%	RT
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich ³	≥ 99.5%	RT
Kaliumchlorid	Carl Roth ¹	≥ 99.5%	RT
Magnesiumchlorid	Carl Roth ¹	≥ 99%	RT
Natriumazid	Sigma-Aldrich ³	≥ 99%	RT
Natriumchlorid	Carl Roth ¹	≥ 99.5%	RT
Natriumhypochlorid	Carl Roth ¹	≥ 12%	RT
Natronlauge	Carl Roth ¹	1 N	RT
Natrium-Nitroprussid	Riedel-de Haen ⁴	≥ 99%	RT
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich ³	-	RT
Poly-L-Lysin	Ted Pella ⁵	-	4°C
D-(+)-Saccharose	Carl Roth ¹	≥ 99.5%	RT
Salzsäure	Carl Roth ¹	1 N	RT
Trichlormethan	Carl Roth ¹	≥ 99.9%	RT
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Carl Roth ¹	≥ 99.7%	RT
Triton X-100	Sigma-Aldrich ³	-	RT
Vectabond (>70% APTES)	Axxora ⁶	-	4°C

¹ Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland² Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA³ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland⁴ Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland⁵ Ted Pella, Inc., USA; deutscher Vertreter: PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland⁶ Axxora, Lörrach, Deutschland

3.2 Probenvorbereitung

3.2.1 Herstellen der Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen

Zunächst wurden von allen Farbstoffen Stammlösungen hergestellt, aliquotiert und für die Langzeitlagerung bei -20°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzfarbstoffe 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoresceindiacetat (DAF-FM), CellTracker Red (CTR) und Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) lagen in $50\ \mu\text{g}$ Mengen vor und wurden in wasserfreiem DMSO gelöst. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen dabei für DAF-FM ($496\ \text{g/mol}$) $3\ \text{mM}$, für CTR ($686\ \text{g/mol}$) $1\ \text{mM}$ und für OBG-1 ($1258\ \text{g/mol}$) $2\ \text{mM}$. Der Referenzfarbstoff Rhodamin 6G (Rh6G) lag als Feststoff vor und wurde mit Hilfe der Analysenfeinwaage MC210P (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und anschließend in bidestilliertem (bidest.) Wasser zu einer Stammkonzentration von $1\ \text{mM}$ gelöst. Der IgG Antikörper, SYTO 9 Green und die TetraSpeck Mikrosphären bildeten in diesem Zusammenhang jedoch eine Ausnahme. Diese waren schon in gelöster Form vorrätig und wurden in der vorhandenen Form als Stammlösung verwendet. Alle Farbstoffkonzentrationen sind nochmals in **Tab. 3.3** zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3.3: Übersicht der Stammlösungen und Endkonzentrationen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluoreszenzfarbstoff	Stammlösung	Endkonzentration
DAF-FM	$3\ \text{mM}^1$	$10\ \mu\text{M}$
CTR	$1\ \text{mM}^1$	$1\ \mu\text{M}$
IgG Antikörper	$2\ \text{mg/mL}^2$	$10\ \mu\text{g/mL}$
OGB-1 (AM-Ester)	$2\ \text{mM}^1$	$6.67\ \mu\text{M}$
Rh6G	$1\ \text{mM}^3$	$50\ \mu\text{M}$
SYTO 9	$5\ \text{mM}^1$	$10 - 100\ \mu\text{M}$
TetraSpeck	$\sim 1.8 \times 10^{11}$ Partikel/mL ³	

¹ in DMSO ² in PBS ³ in Wasser

Die Farbstoffe wurden vor jeder Beladung mit frischer Ringerlösung und/oder bidest. Wasser auf ihre Endkonzentration verdünnt. Für eine effektivere Farbstoffbeladung der untersuchten biologischen Systeme wurden die Farbstoffe bei den *in situ* Messungen in hypotonischen Ringer (75 % physiologische Ringerlösung und 25 % bidest. Wasser) gegeben. Dabei wurde bei den physiologischen Experimenten explizit darauf geachtet, dass die maximale DMSO-Gesamtkonzentration von 0.3 % nicht überschritten wurde.

3.2.2 Herstellen und Filtern der Lösungsmittel- und Pufferlösungen

Für die Charakterisierung und Reinigung der verwendeten Nano- und Mikropipetten wurden folgende Lösungen verwendet: bidest. Wasser, PBS-Lösung, 4%ige NaOCl-Lösung, 30 wt% und 40 wt% Wasser-Saccharose-Lösung, 20 wt% Glycerin-Lösungsmittel-Gemische und wässrige 5%ige ethanolische Lösung (v/v, 95/5).

Das bidest. Wasser wurde mit Hilfe des Milli-Q Advantage A10 Wasseraufbereiters (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) erzeugt. Für die Herstellung der PBS-Lösung wurde eine PBS-Tablette in 200 mL bidest. Wasser aufgelöst. Eine PBS-Tablette besteht aus 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl und 10 mM Phosphatpuffer und besitzt als fertige Lösung einen pH-Wert von etwa 7.4 bei 25°C. Die NaOCl-Lösung lag als 12%ige Stammlösung vor und wurde mit 2 Teilen Wasser zu einer Endkonzentration von 4% verdünnt. Für die Herstellung der 30 wt% bzw. 40 wt% Wasser-Saccharose-Gemische wurde die Saccharose mit der Analysenwaage abgewogen und in 70 wt% bzw. 60 wt% bidest. Wasser gelöst. Glycerin wurde teilweise bis zu 20 wt% in den Lösungen verwendet, um sowohl die Viskosität der Lösungen zu erhöhen, damit diese nicht aus der Pipette herausgedrückt wurden, als auch um den Dampfdruck zu erniedrigen, um die Verdunstung geringer fL-Volumina zu minimieren.

Für die *in situ* Messungen in lebendem Drüsengewebe wird eine physiologische Ringerlösung benötigt, welche sowohl alle essenziellen Ionen als auch die richtige Osmolarität besitzt, damit die einzelnen Zellen während der Messung nicht schrumpfen oder anschwellen. Die Zusammensetzung der physiologischen Ringerlösung ist in **Tab. 3.4** dargestellt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der physiologischen Ringerlösung für *in situ* Messungen nach [26].

Substanz	c / mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2
Glukose	10
KCl	10
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2
NaCl	160
TRIS	10
pH (HCl)	7.4

Zu Beginn jedes Experimentes wurden alle Lösungsmittel und Pufferlösungen vor dem Kontakt mit den AFM-Pipetten durch einen Minisart® Spritzenvorsatzfilter aus Poly-

ethersulfon mit einer Porengröße von 0.1 μm (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) gefiltert, um einer möglichen Verstopfung der Pipettenöffnung vorzubeugen. Mit dieser Methode wurde sowohl das bidest. Wasser, die PBS-Lösung, die ethanolische Lösung als auch die Ringerlösung vorgereinigt.

3.2.3 Herstellen der Dopamin-, SNP- und Triton X-100-Lösungen

Für die physiologischen Messungen wurde zu Beginn eines Tages eine 10 mM Dopamin-Stammlösung frisch in bidest. Wasser angesetzt. Diese Stammlösung wurde dann vor jedem Experiment und jeder Beladung nochmals mit Ringerlösung auf eine Endkonzentration von 1 μM verdünnt. Im Falle der NO-Experimente wurde 2-3 Mal pro Tag eine frische 1 M SNP-Stammlösung in physiologischem Ringer hergestellt, da diese Substanz nicht langzeitstabil ist und permanent NO freisetzt. Vor einem lokalen Experiment wurde die 1 M SNP-Lösung mit Ringerlösung auf eine Endkonzentration von 20 mM verdünnt. Für die badseitigen (Zugabe von außen) Kontrollexperimente wurde eine Endkonzentration von 5 mM verwendet. Für die Überprüfung einer idealen Farbstoffbeladung des Gewebes wurde teilweise das nichtionische Tensid Triton X-100 als Kontrolldetergenz eingesetzt. Die Triton X-100 Konzentration betrug 1%. Dazu wurden 10 μL Triton X-100 in 990 μL Ringer gelöst.

3.3 Methoden

3.3.1 Kombiniertes nanofluidischer Rasterkraftmikroskopie- und inverser Fluoreszenzmikroskopie-Aufbau

Für die AFM-Messungen mit Nanofluidik wurde ein FlexAFM-Messkopf (Nanosurf, Langen, Deutschland) mit einem $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ Messbereich verwendet. Als Messspitzen wurden unterschiedliche mikrokanalige AFM-Spitzen (Cytosurge, Zürich, Schweiz) verwendet, welche mit Hilfe eines Probenhalters mit dem Messkopf verbunden wurden. Der Messkopf und die Nanofluidik wurden über die C3000 Steuereinheit (Nanosurf, Langen, Deutschland) und das AYRA Programm Version 1.0.45 (Cytosurge, Zürich, Schweiz) angesteuert. Über einen Silikonschlauch und eine Verbindungseinheit wurden die mikrokanaligen AFM-Spitzen (Pipetten) an eine Drucksteuereinheit angeschlossen. Unter Zuhilfenahme eines externen Programms für die Drucksteuereinheit Version 1.2.5 (Cytosurge, Zürich, Schweiz) konnten Drücke zwischen $-800\ \text{mbar}$ (Unterdruck) und $1125\ \text{mbar}$ (Überdruck) eingestellt werden. Die aktuelle AFM-Spitzen-Höhenposition wurde anhand eines Nah-Infrarot-Lasers ($\lambda_{\text{ex}} = 850\ \text{nm}$) und einer Photodiode detektiert [11].

Des Weiteren konnte die Position der Pipetten simultan mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) visualisiert werden. Dieses Mikroskop wurde mit einer speziell angepassten Probenplattform (Nanosurf, Langen, Deutschland) so modifiziert, dass der AFM-Messkopf direkt mit dem Mikroskop-Objektstisch verbunden werden konnte. Das Mikroskop war mit einem 20-fachen Zeiss Fluar Objektiv (NA 0.75) und einem 40-fachen Zeiss Fluar Objektiv (NA 0.75) ausgestattet. Als Anregungsquelle diente eine X-Cite 120 Quecksilberbogenlampe (Visitron System, Purchheim, Deutschland). Das Anregungs- und das Emissionslicht wurde während der verschiedenen Experimente mit unterschiedlichen Filterkombinationen spektral voneinander getrennt, welche in **Tab. 3.5** zusammengefasst sind.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der verwendeten Filterkombinationen für alle nachfolgenden Experimente.

Filterbezeichnung	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter
GFP	BP 485/40	z488rdc	BP 535/50
TRITC	BP 565/30	z568rdc-xt	BP 630/75
RedFP	BP 640/30	z647rdc	BP 700/75

Die Bildaufnahme erfolgte über eine CoolSnap HQ² CCD-Kamera oder eine Cascade 128⁺ EMCCD-Kamera im Falle der NO-Experimente (beide von Photometrics, Arizona, USA) und mittels des Programms MetaMorph Version 7.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Eine detaillierte Übersicht des gesamten Aufbaus ist in **Abb. 3.1** schematisch veranschaulicht.

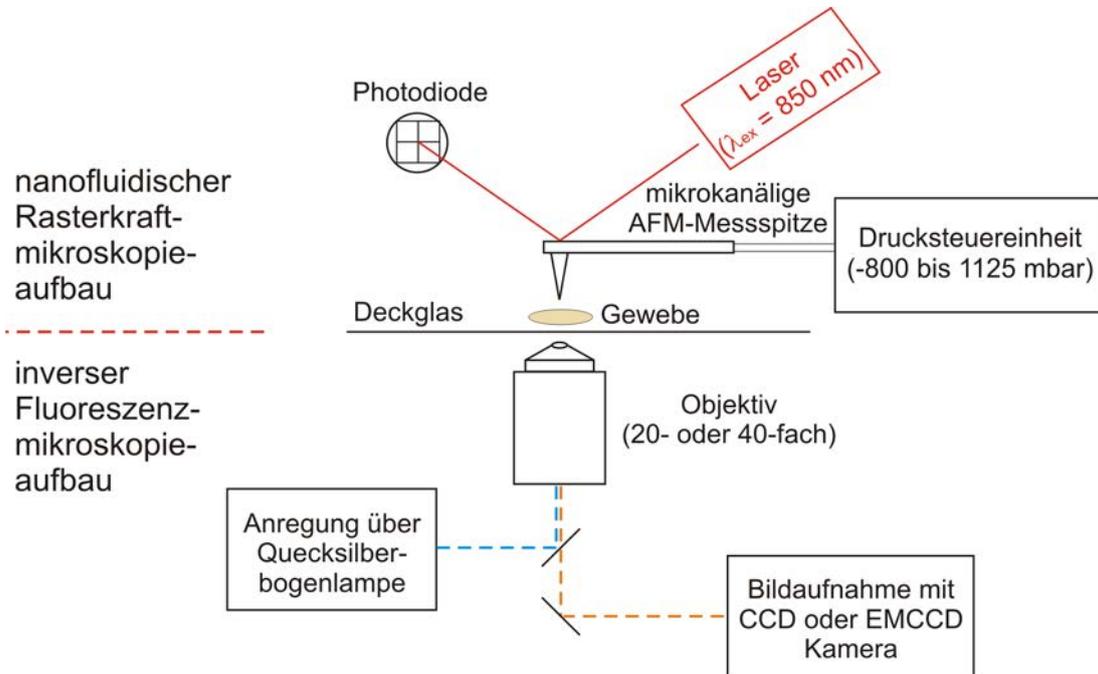


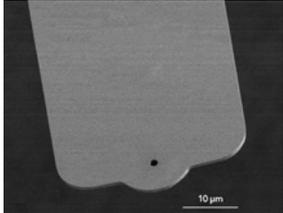
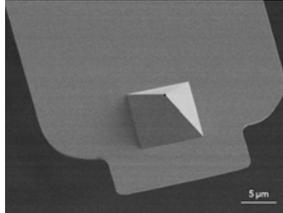
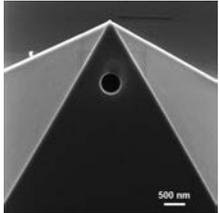
Abbildung 3.1: Die Grafik zeigt eine vereinfachte, schematische Darstellung des kombinierten nanofluidischen Rasterkraft- und inversen Fluoreszenzmikroskopie-Aufbaus. Das Anregungs- und Emissionslicht wird durch verschiedene Filterkombinationen mit Hilfe eines Objektivs in die Probe eingekoppelt und anschließend über ein Kamerasystem detektiert. Anhand einer 40 nm dicken Cr/Au-Schicht auf der Rückseite der AFM-Messspitze wird das emittierte Laserlicht reflektiert und mittels einer Photodiode detektiert. Hierüber wird die Höhe und Deformierung der verwendeten Pipette verifiziert. Der angelegte Druck wird dabei über die Drucksteuereinheit reguliert.

Die Bilder- und Datenauswertung sowie die spätere graphische Darstellung wurde mit Hilfe der Programme Origin 9.1G (Origin Lab Corp., Northampton, USA), ImageJ Version 1.51r und CorelDRAW X3 (Corel, München, Deutschland) durchgeführt. Bei der Darstellung der fluoreszenzintensitätsbasierten Messungen wurden die Daten auf die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = 0$ min (F_0) normiert. Diese Methode wird bei intensitätsbasierten *in situ* Messungen vermehrt durchgeführt, da diese aufgrund inhomogener Farbstoffbeladung nach der Normierung später leichter zu vergleichen sind. Anschließend wurden die Messdaten als normiertes F/F_0 gegen die Zeit dargestellt.

Pipettenarten

Innerhalb dieser Arbeit wurden drei verschiedene Arten von Pipetten verwendet und charakterisiert. Dazu gehören die Nanopipette, die Mikropipette und die Injektionspipette. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrem Aufbau und ihrer Form als auch in ihrer Funktionsweise und dem entsprechenden Anwendungsbereich. Die Mikropipette und die Nanopipette wurden im Laufe dieser Arbeit sowohl für die Systemcharakterisierung in **Kap. 4.2** als auch für die lokalen Gewebemanipulationen in **Kap. 4.5** verwendet. Die Injektionspipette wurde explizit für Injektionsexperimente an biologischen Systemen in **Kap. 4.6** eingesetzt. Eine Zusammenfassung der Pipetten ist in **Tab. 3.6** dargestellt.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der verwendeten AFM-Pipetten. Darstellung der wichtigsten Eigenschaften für jeden einzelnen Pipettentyp.

Eigenschaften	Mikropipette	Nanopipette	Injektionspipette
Aussehen	 [*]	 [*]	
Form	flach ohne Spitze	pyramidenförmig	pyramidenförmig
Größe (L x H x B)	200 µm x 36 µm x 1.7 µm		
Pyramidengröße	-	10 µm x 10 µm x 7 µm	
Pipettenöffnung	2 µm	300 nm	500 nm
Kraftkonstante	2-3 N/m		3 N/m
Beschichtung	Cr/Au (40 µm)		
Verwendungen	kolloidale Spektroskopie Einzelzelladhäsion fL-Flüssigkeitsabgabe	Nanolithographie fL-Flüssigkeitsabgabe bakterielle Adhäsion	Zellinjektion

[*] https://www.cytosurge.com/de_DE/shop (letzter Zugriff 19.02.2018)

Im Allgemeinen bestehen alle drei Pipettentypen aus Siliziumnitrit (Si_3N_4) und besitzen auf der Rückseite eine Chrom(Cr)/Gold(Au)-Beschichtung, welche für die Reflektion des Laserlichtes zur Photodiode und für das Arbeiten in salzhaltigem Medium erforderlich ist. Mittlerweile sind alle drei Pipettentypen kommerziell erhältlich (Cytosurge, Zürich,

Schweiz). Die Injektionspipette war zu Beginn dieser Arbeit allerdings nicht erhältlich, so dass diese zunächst anderweitig hergestellt werden musste. In Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (HZDR) und der dort verwendeten fokussierten Ionenstrahl (FIB) Technik wurden diese Pipetten aus FIB-betriebsbereiten AFM-Messspitzen (Cytosurge, Zürich, Schweiz) hergestellt. Diese Messspitzen besaßen bereits den Nanofluidikkanal und die pyramidale Messspitze, jedoch fehlte dort die Pipettenöffnung. Bei der FIB Technik wird ein fokussierter Ionenstrahl auf eine Probenoberfläche gerichtet. Im Gegensatz zur bekannten Rasterelektronenmikroskopie (SEM) werden anstatt von Elektronen Ionen (wie z.B. Ga-, Ne- oder He-Ionen) für den fokussierten Strahl verwendet. Diese Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und fräsen durch ihre relativ hohe Masse die Probenoberfläche Schicht für Schicht ab [126–130]. Durch die Abtragung der Si_3N_4 -Oberfläche entstand dabei ein ca. 500 nm großes Loch (siehe **Tab. 3.6**). Die genaue Fertigung wird in **Kap. 4.6.1** behandelt.

3.3.2 Beladung, Reinigung und Langzeitlagerung der Pipetten

Beladung

Für die Pipetten gibt es unterschiedliche Beladungsarten. Die in der Literatur bekannte übliche Beladungsmethode ist das rückseitige Beladen über das Reservoir am Ende der Pipette (Backloading), an welchem später auch der Silikonschlauch für die Drucksteuereinheit angeschlossen wird [14]. Hierbei werden etwa 10-20 μL Flüssigkeit in das Reservoir vorgegeben (siehe **Abb. 3.2** links). Im Anschluss wird die Flüssigkeit mit Hilfe eines Überdrucks zur Pipettenöffnung gepumpt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass das Wechseln der Flüssigkeit und das vollständige Reinigen der Pipetten, abhängig von der jeweiligen Pipettenöffnung und dem damit verbundenen Durchfluss, relativ zeitaufwändig ist. Dieser Vorgang kann von einigen Stunden bis zu einem halben Tag andauern. Aufgrund dessen ist diese Methode weitestgehend nur für Experimente praktikabel, bei denen nur eine einzelne Flüssigkeit in großer Menge benötigt wird.

Eine vorteilhaftere Alternative zur rückseitigen Beladung bildet die innerhalb dieser Arbeit entwickelte vorderseitige Beladung der Pipette (Frontloading) [131]. Beim Frontloading werden etwa 5-10 μL Flüssigkeit auf die Pipette und den Probenhalter gegeben (siehe **Abb. 3.2** rechts). Im Anschluss wird ein Unterdruck angelegt und die Flüssigkeit wird in die Pipette gesogen. Hierbei ist zu beachten, dass mit kleiner werdender Pipettenöffnung das Einsaugen der Flüssigkeit komplexer wird, da die Luft im Inneren der Pipette immer stärker gegen die Flüssigkeit drückt. Um die vorderseitige Beladung zu verein-

fachen, werden 20 wt% Glyzerin zur verwendeten Flüssigkeit hinzugegeben. Dies erhöht die Viskosität der Flüssigkeit, so dass diese nicht mehr so leicht aus der Pipette herausgedrückt werden kann, verringert gleichzeitig den Dampfdruck und wirkt so zusätzlich einer schnellen Verdampfung entgegen [132–135]. Aufgrund dessen ist die vorderseitige Beladung vor allem für Experimente geeignet, bei denen mehrere verschiedene Flüssigkeiten in kurzer Zeit benötigt werden, da die Reinigung und Beladung bei dieser Methode deutlich schneller ablaufen. Die Zeit beläuft sich hierbei auf etwa 30-45 Minuten. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode findet in **Kap. 4.2.2** statt.

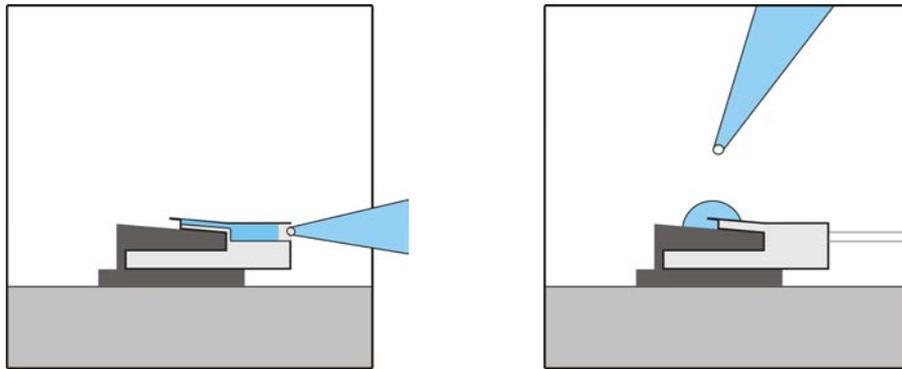


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zweier verschiedener Pipettenbeladungsarten. (links) Die rückseitige Beladung (Backloading), bei der mit einer größeren Pipette das Reservoir befüllt wird. Der blaue Bereich markiert das Reservoir. Mittels Überdruck wird das Volumen zur Pipettenöffnung gepumpt. (rechts) Beladungsposition bei der vorderseitigen Beladung (Frontloading). Über eine größere Pipette wird ein kleines Volumen auf die Pipette getropft. Durch das Anlegen eines Unterdrucks wird die Flüssigkeit (blau) in die Pipette gesogen und kann im Anschlussexperiment wieder abgegeben werden.

Reinigung

Bei der Reinigung der Pipette wird zunächst die Restflüssigkeit aus dem Pipetteninneren mittels Überdruck (1125 mbar) entfernt. Danach wird analog zum vorderseitigen Beladen ein Tropfen Reinigungslösung (Wasser, Ethanol, o. Ä.) auf die Pipette und den Probenhalter gegeben. Anschließend werden im Wechsel Unter- und Überdruck (-800 mbar und 1125 mbar) angelegt, um die Reinigungsflüssigkeit in die Pipette zu ziehen bzw. aus der Pipette herauszudrücken. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die Pipette vollkommen gereinigt ist und keine Restflüssigkeit mehr detektiert werden kann. Auf die genauen Reinigungsschritte und das allgemeine Vorgehen bei der Reinigung wird in **Kap. 4.2.2** detailliert eingegangen.

Lagerung

Für die Langzeitverwendung ein und derselben Pipette über mehrere Monate ist eine ideale Lagerung zwingend notwendig. Wird diese Pipette z. B. einfach nur in der Verkaufsverpackung an Luft gelagert, so kann es durch darauf folgende Verdunstung dazu kommen, dass beispielsweise Salze aus Restflüssigkeiten auskristallisieren oder Reste von biologischen Proben an der Pipettenöffnung festkleben und austrocknen und die Öffnung dauerhaft blockieren. Aus diesem Grund wurde für die Langzeitlagerung eine 24-Loch-Mikrotiterplatte (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet (siehe **Abb. 3.3** links). Die Kavitäten („Löcher“) der Mikrotiterplatte wurden entweder mit bidest. Wasser für eine einfache Lagerung oder mit einer 2 mM Natriumazidlösung (NaN_3) befüllt. NaN_3 diente als Desinfektionsmittel, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Die Klammer der Pipette wird für die Lagerung kopfüber in die Flüssigkeit gegeben. Wichtig hierbei ist, dass die Pipettenöffnung direkt in die Lösung eintaucht und das Reservoir dabei nicht mit der Lagerungsflüssigkeit in Kontakt kommt. Für den Fall, dass sich nach einer rückseitigen Beladung noch restliche Probenlösung in der Pipette befindet, kann das Verdunsten dieser Flüssigkeit durch das Verschließen des Reservoirs mit einer aussortierten Verbindungseinheit verhindert werden (siehe **Abb. 3.3** rechts). Des Weiteren empfiehlt sich eine Lagerung der abgedeckten Mikrotiterplatte bei 4°C im Kühlschrank.



Abbildung 3.3: (links) Verwendung einer 24-Loch-Mikrotiterplatte für die Langzeitlagerung der verwendeten Pipetten. Die Kavitäten sind mit bidest. Wasser gefüllt. (rechts) Darstellung der Seitenansicht einer Kavität mit einer in bidest. Wasser gelagerten Pipette. Die Pipettenöffnung befindet sich im Wasser und das Reservoir ist mit einer Verbindungseinheit verschlossen.

3.3.3 GUV-Präparation

Für die Herstellung riesiger einschichtiger Vesikel (GUV) wurde die Methode des spontanen Quellens verwendet. Hierfür wurde zu Beginn eine Quelllösung aus 100 mM KCl und 2 mM HEPES hergestellt, welche einen pH-Wert von 7.4 besaß. Als Nächstes wurden die Ausgangsstoffe 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC) und 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin (DOPS) abgewogen und anschließend ein Gemisch im Verhältnis 4:1 (DOPC:DOPS) hergestellt, welches in Chloroform gelöst wurde und im Anschluss eine Gesamtkonzentration von 10 mg/mL besaß. Dieses Gemisch wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ein Aliquot (80 µL) wurde im nächsten Schritt mit 240 µL Chloroform verdünnt, so dass die Lipidkonzentration 2.5 mg/mL betrug. Darauf folgend wurde ein rundes Teflonplättchen ausgeschnitten und mit Hilfe von Schleifpapier angeraut. Dieses Teflonplättchen wurde in ein Becherglas gegeben und im Anschluss wurde die verdünnte Lipidlösung mit einer 500 µL Hamiltonspritze dünn auf der Oberfläche verteilt. Das Becherglas wurde für 2-3 Stunden in einen Exsikkator gestellt und das Chloroform mit Vakuum entfernt. Währenddessen wurde die Quelllösung auf 40°C vorgewärmt. Eine Temperatur von 40°C ist notwendig, damit die Phasenübergangstemperatur des Lipides überschritten wird. Danach wurde der getrocknete Lipidfilm vorsichtig mit der Quelllösung benetzt. Dazu wird die Lösung langsam über die Wand des Becherglases gegeben, bis sich der Flüssigkeitsfilm etwa 1 cm über dem Teflonplättchen befindet. Im weiteren Verlauf wurde das abgedeckte Becherglas bei 40°C im Trockenschrank für 1-3 Tage gelagert, damit die Lipidschicht ausreichend quillt und die GUV entstehen können. Im Anschluss wurde ein Aliquot der GUV unmittelbar über der Teflonschicht mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Gefäß entnommen und für die weitere mikroskopische Untersuchung auf ein mit Vectabond oder Poly-L-Lysin beschichtetes Deckglas gegeben. Die restliche GUV-Lösung wurde bei 40°C im Trockenschrank gelagert. In **Abb. 3.4** ist die GUV-Präparation schematisch dargestellt.

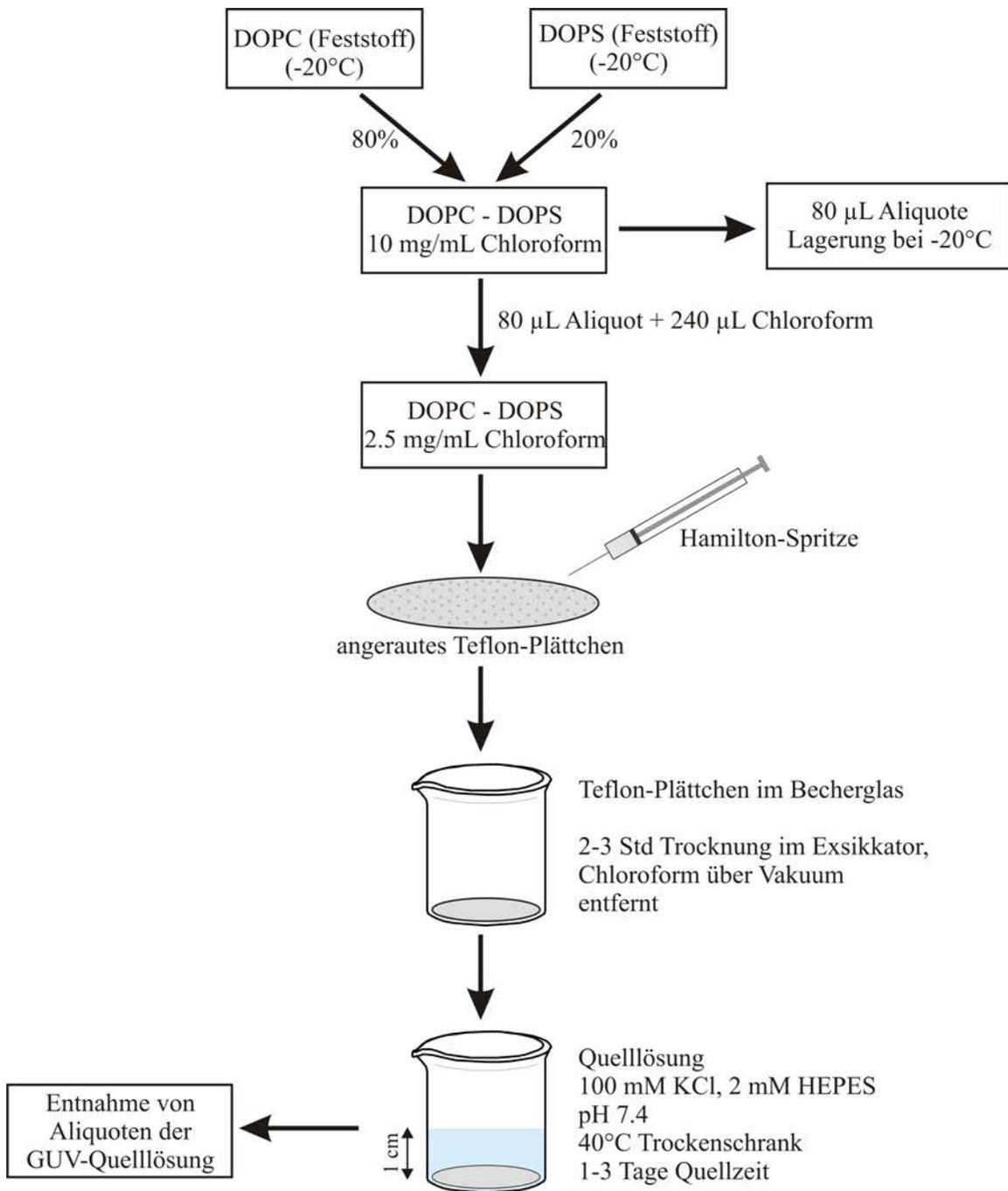


Abbildung 3.4: Zusammenfassung der GUV-Präparation im Fließschema. Die Abbildung wurde nach [136] adaptiert.

3.3.4 Speicheldrüsenpräparation

Für die *in situ* Untersuchungen wurden die Schaben *Periplaneta americana* aus dem Lehrstuhl für Zoophysiologie der Universität Potsdam verwendet. Diese wurden bei einer konstanten Temperatur von 27°C in einem zwölfstündigen Tag-/Nachtwechsel mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten. Zu Beginn dieser Arbeit wurden ausschließlich Speicheldrüsen der 4 bis 6 Wochen alten adulten Männchen genutzt, später musste jedoch aufgrund veränderter Zuchtbedingungen auf adulte Männchen unbestimmten Alters zurückgegriffen werden. Hierbei wurden aus einer Speicheldrüse zwei Loben isoliert, welche aus mehreren verzweigten Ausführgängen und vielen Acini bestanden. Diese wurden während der gesamten Messung in physiologischer Ringerlösung gelagert. Mit Hilfe von Blockschälchen und einem Schüttler (MS 3 digital, IKA, Staufen, Deutschland) wurden die Drüsen mit der jeweiligen Ringer-Farbstofflösung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. In **Tab. 3.7** ist eine Übersicht der Beladungsprotokolle mit dem jeweiligen Farbstoff aufgelistet.

Tabelle 3.7: Beladungsprotokolle für alle verwendeten Farbstoffe während der badseitigen Beladung des Drüsengewebes mit den dazugehörigen Farbstoffkonzentrationen, Ringerarten und den jeweiligen Beladungszeiten.

Fluoreszenzfarbstoff	Konzentration c / μM	Ringerart	Beladungszeit t / min
DAF-FM	10	hypotonisch ¹	60
CTR	1	physiologisch	10
OGB-1 (AM-Ester)	6.67	hypotonisch ¹	60
SYTO 9	10 - 100	physiologisch	1

¹ 75% physiologischer Ringer + 25% bidest. Wasser

Nach der Farbstoffinkubation wurden die Drüsen für 15 Minuten im physiologischem Ringer akklimatisiert und anschließend mit Vectabond-beschichtete Deckgläser (24 mm x 60 mm) fixiert. Bei der Beschichtung der Deckgläser mit Vectabond, wurden die Deckgläser zuvor 5 Minuten mit Aceton gereinigt, danach 5 Minuten in Vectabon gegeben, kurz mit bidest. Wasser abgespült und nachfolgend an der Luft getrocknet. Mittels einer Peristaltikpumpe (Reglo Digital, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) und einer Perfusionswanne, welche auf dem Deckglas mit Hilfe von Vaseline befestigt war, konnten die Drüsen über Zu- und Ablaufschläuche mit frischer Ringerlösung perfundiert werden. Die Flussrate betrug zwischen 1 mL/min und 2 mL/min. Für den in der Arbeit kombinierten Mikroskopieaufbau wurde eine individuelle Perfusionswanne angefertigt, welche

den ungewöhnlichen Ausmaßen des Pipettenhalters inklusive Pipettenklemme entsprach. Ein schematischer Aufbau ist in der **Abb. 3.5** dargestellt.

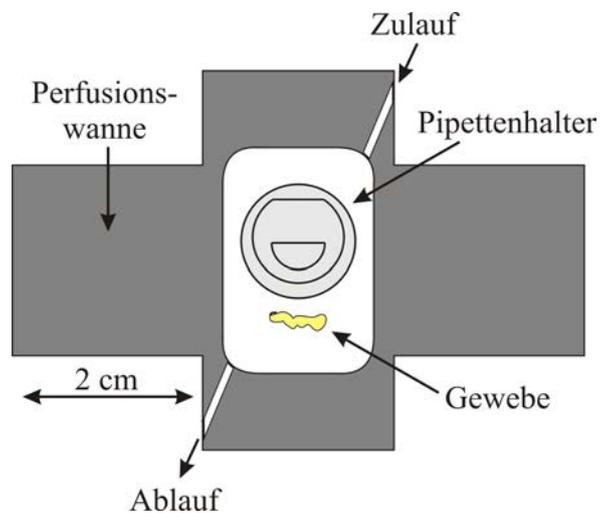


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der verwendeten Perfusionswanne mit der Position des Pipettenhalters und des zu untersuchenden Gewebes. Die diagonalen Pfeile stellen die Flussrichtung der frischen Ringerlösung dar.

4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zielstellung

AFM ist eine mittlerweile gut etablierte, umfangreiche Methode, um biologische Systeme zu untersuchen. Durch die Erweiterung dieser Methode mit nanofluidischen AFM-Messspitzen und der simultanen Druckkontrolle wurde in den letzten Jahren die Grundlage für eine neuartige Mikromanipulationstechnik geschaffen. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die direkte Manipulation von einzelnen Zellen im Zellkomplex und deren Auswirkung auf das gesamte biologische System gelegt. Diese Reaktionen werden in der Literatur oft als Zell-Zell-Interaktionen oder Signalkaskaden bezeichnet. Ziel dieser Arbeit war es zunächst das neuartige Mikromanipulationssystem mit dem vorhandenen inversen Fluoreszenzmikroskopiesystem zu kombinieren, ersteres zu charakterisieren und dessen Möglichkeiten zu testen. Anschließend sollte das neue Wissen auf das komplexere biologische System der Speicheldrüsen der Schabe *P. americana* angewandt werden. In diesem Zusammenhang sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, eine Einzelzelle im gesamten Gewebekomplex lokal zu manipulieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie sich diese lokale Manipulation auf das gesamte Gewebe auswirkt und ob inter- oder intrazelluläre Signalkaskaden nach der Prozedur beobachtet werden können.

4.2 Charakterisierung des FluidFM-Systems

4.2.1 Test eines korrelativen Mikroskopieaufbaus

Nach der Implementierung der nanofluidischen Rasterkraftmikroskopie (FluidFM) in den inversen Fluoreszenzmikroskopieaufbau aus Kapitel **Kap. 3.3.1**, wurde der korrelierte Messaufbau auf seine simultane Ansteuerung getestet und ein Probemesssystem für die korrelative Mikroskopie gesucht. Als geeignetes Testsystem wurden die farbstoffbeladenen Mikrosphären (TetraSpeck) genutzt. Die TetraSpeck werden allgemein für die Kalibrierung konventioneller Fluoreszenzmikroskope verwendet, da sie eine definierte Größe von etwa 100 nm besitzen und ihre vier inkubierten Farbstoffe relativ unanfällig für Photobleichen sind. Für die Messungen wurde ein Tropfen der TetraSpeck-Lösung auf ein Deckglas gegeben und an der Luft eingetrocknet. Das präparierte Deckglas wurde zunächst fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde der grüne Farbstoff in dem TetraSpeck, welcher nach Herstellerangaben bei 505 nm angeregt wird und bei 515 nm emittiert, mit Hilfe einer zuvor gefilterten Quecksilberbogenlampe angeregt, das Emissionslicht detektiert und das entsprechende Fluoreszenzbild in **Abb. 4.1 (a)** abgebildet.

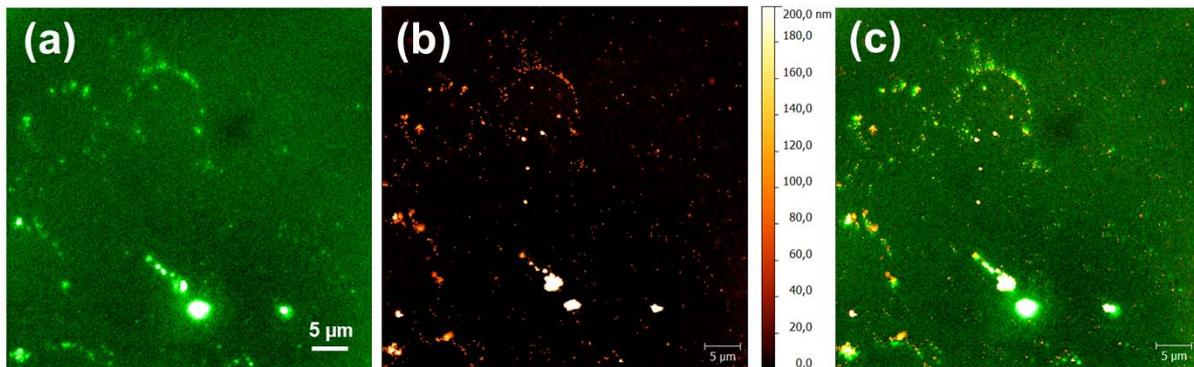


Abbildung 4.1: Überprüfung eines möglichen korrelativen Aufbaus beider Mikroskopiesysteme mit Hilfe von 100 nm großen farbstoffbeladenen Mikrosphären (TetraSpeck). (a) Fluoreszenzaufnahme der auf einem Deckglas eingetrockneten Mikrosphären; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ (b) AFM-Bild der TetraSpeck-Oberfläche aus (a), welche mit einer TAP 150 AFM-Messspitze abgerastert wurde und die dazugehörige Höhenskala. (c) Korrelatives Bild der Überlagerung von (a) und (b), in dem viele Bereiche aus beiden Aufnahmen übereinstimmen, wobei es auch eine minimale Verschiebung der Signale gibt. Ungeachtet dessen ist der Aufbau sehr gut für korrelative Messungen geeignet.

Im Fluoreszenzbild sind einige sphärische Strukturen zu erkennen, jedoch auch ein paar Cluster, bei denen sich die TetraSpeck zusammengelagert haben. Des Weiteren ist zu beachten, dass sich die TetraSpeck unterhalb der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmi-

kroskopes befinden und dadurch nicht vollkommen aufgelöst werden können. Anschließend wurde die Deckglasoberfläche mit dem AFM unter Zuhilfenahme einer TAP 150 AFM-Messspitze abgerastert und die Topographie mit der dazugehörigen Höhenskala in **Abb. 4.1 (b)** dargestellt. In dieser Darstellung sind die Sphären noch deutlicher und feiner verteilt zu erkennen. Zusätzlich kann hierbei die vom Hersteller angegebene Höhe der Partikel mit rund 100 nm reproduziert werden. Darüber hinaus sind in dieser Illustration ebenfalls die TetraSpeck Cluster in der unteren Mitte erkennbar.

Bei der Korrelation des Fluoreszenz- und des AFM-Bildes in **Abb. 4.1 (c)** konnte eruiert werden, dass die abgebildeten Strukturen miteinander übereinstimmen und ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen. Teilweise sind auch leicht verschobene Stellen erkennbar, welche jedoch abhängig von der Art und Position der Überlagerung korrigiert werden können und somit insgesamt vernachlässigbar sind. Schlussendlich konnte mit diesem ersten Experiment gezeigt werden, dass es möglich ist, beide Mikroskopiearten im zuvor beschriebenen Aufbau miteinander zu verknüpfen und eine ähnliche Darstellung der gleichen Probe mit zwei voneinander unabhängigen Methoden zu generieren.

4.2.2 Frontloading, Pipettenreinigung und deren Anwendung

Da die in **Kap. 3.3.1** beschriebenen verwendeten AFM-Pipetten in der Anschaffung sehr teuer sind und deren Wiederverwendung aus finanzieller und ökologischer Sicht wünschenswert ist, wurde nach einer geeigneten und zugleich effektiven Reinigungsprozedur geforscht. Hierzu wurde eine neuartige Beladungsmethode entwickelt, charakterisiert und auf ihre Limitierung getestet. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits im Paper von Roder et al. veröffentlicht und deshalb aus dem Manuskript entnommen [131]. Hierbei handelt es sich um die vorderseitige Beladung (Frontloading). Das Frontloading ist vor allem für Zielsubstanzen lukrativ, welche in der Anschaffung teuer sind oder in geringen Mengen zur Verfügung stehen, da für diese Beladungsart nur etwa 5-10 μL benötigt werden. Dazu werden im vorliegenden Kapitel diese schnelle, vielseitige und kostengünstige Methode und die damit verbundene Reinigungsprozedur, für die Wiederverwendung einer AFM-Mikropipette, für verschiedene Anwendungen näher beschrieben.

Für die Durchführung der Frontloading-Prozedur werden zu Beginn 5-50 μL der verwendeten Flüssigkeit auf die in **Abb. 4.2 (a)** abgebildete AFM-Mikropipette, welche sich auf dem Probehalter befindet, oder direkt auf ein Deckglas gegeben. Wie in **Abb. 4.2 (b)** dargestellt, wird der AFM-Messkopf derart über dem Deckglas positioniert, dass der Tropfen in minimalem Kontakt zwischen Oberfläche und AFM-Spitze ist, damit die Mikropipette nur geringfügig mit der verwendeten Flüssigkeit kontaminiert wird. Im Anschluss wird

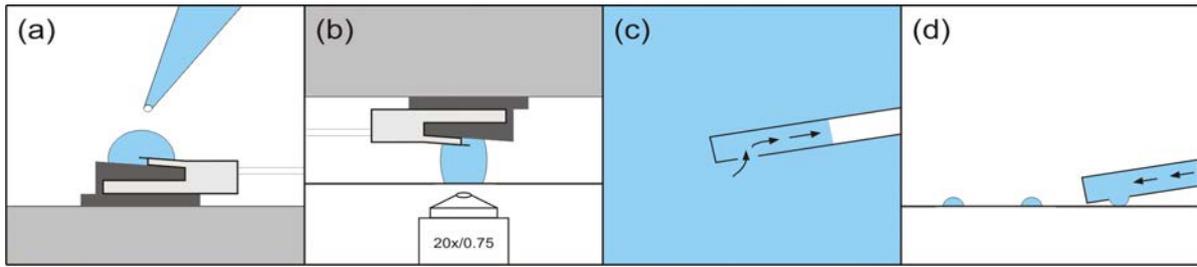


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung von (a) Volumenzugabe auf dem Probenhalter und der AFM-Messspitze mit Hilfe einer Pipette, (b) Beladungsposition des AFM-Messkopfes in der Flüssigkeit über einem eingespannten Deckglas für das Frontloading (der lamellare Flüssigkeitsfilm reduziert die Kontamination der gesamten Klammer) (c) Vergrößerung von (b), Darstellung des Frontloading-Prozesses an der Mikropipettenöffnung unter Anwendung von Unterdruck (die Pfeile zeigen die Laufrichtung der Flüssigkeit an), (d) Abgabe kleiner Flüssigkeitströpfchen auf einer Deckglasoberfläche mit Hilfe von Überdruck nach erfolgreichem Frontloading.

ein Unterdruck von etwa -800 mbar für einige Sekunden angelegt und die Mikropipette wird, wie in **Abb. 4.2 (c)** zu sehen ist, mit der Ziellösung befüllt. Abhängig vom benötigten Volumen kann die Befüllung der Pipette auch für mehrere Minuten durchgeführt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Reinigungszeit, abhängig vom eingesaugten Volumen, deutlich erhöht. Nach der Beladung kann der Rückstand der Flüssigkeit mit Hilfe einer Eppendorf Pipette von der Mikropipette oder vom Deckglas entfernt werden, damit diese dann für ein anderes Experiment verwendet werden kann. Als Nächstes wird der Messkopf über der Zieloberfläche platziert und die Mikropipette kann mit einem festgelegten Kraftsollwert an die Oberfläche gefahren werden. Anschließend kann ein Flüssigkeitstropfen anhand eines kurzen Überdruckpulses auf der Oberfläche abgegeben werden. Dieser Vorgang wird in **Abb. 4.2 (d)** dargestellt.

Für die externe Reinigung der Mikropipette wird ein großer Tropfen 4% Natriumhypochlorid (NaOCl)-Lösung auf die Mikropipettenoberfläche gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von etwa 20-60 s wird das NaOCl entfernt und die Mikropipette mit bidest. Wasser gespült. Für die interne Reinigung des mikrofluidischen Kanals wird die Mikropipettenspitze in eine spezielle Reinigungslösung getaucht. Bidest. Wasser und ethanolische Reinigungslösungen eignen sich sehr gut für kleine polare Zielsubstanzen, wie z. B. organische Fluorophore oder Neurotransmitter. Im Gegensatz dazu sind NaOCl-Lösungen ideal für Proteine oder andere größere biologische Komponenten, wie z. B. Antikörper, geeignet. Durch wiederholte Beladungs- (Unterdruck -800 mbar) und Abgabezyklen (Überdruck 1125 mbar) wird der Mikrokanal der Mikropipette gereinigt. Die Anzahl der Reinigungszyklen ist davon abhängig, welche Konzentration die zuvor genutzte Flüssigkeit besitzt oder wie diese mit der Pipettenoberfläche interagiert und ist weiterhin auch von der verwendeten Reinigungslösung abhängig. Nach der Reinigungsprozedur kann die Mikro-

pipette probeweise mit bidest. Wasser beladen und ein Wassertropfen abgegeben werden, um eine mögliche Restverschmutzung der Pipette durch z. B. Fluoreszenzmessungen ausschließen zu können. Die reguläre Reinigungsperiode für den Austausch einer Zielsubstanz mit einer anderen Lösung benötigt etwa 45 Minuten. Alle Ziel- und Reinigungslösungen werden mit einem Spritzenvorsatzfilter gefiltert und entgast, um einer Verstopfung des Mikrokanals durch restlichen Feststoff oder Luftblasen vorzubeugen.

Nach der Beschreibung der Beladungs- und Reinigungsprozedur sollte das neu entwickelte Frontloading an zwei verschiedenen Testsystemen angewandt werden. Hierzu werden in den nächsten Abschnitten der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Rh6G) und der AlexaFluor647-gekoppelte IgG Antikörper (AK) als biologische Komponente in Bezug auf die neue Methode getestet und diskutiert.

Anwendungsbeispiel Rhodamin 6G

Rh6G und seine Derivate sind durch ihre günstigen Anregungs- und Emissionseigenschaften im visuellen Spektralbereich und ihre hohe Photostabilität oft benutzte organische Farbstoffe in der Fluoreszenzmikroskopie. Deshalb wurden als Nächstes das Frontloading der AFM-Mikropipette mit wässriger 50 μM Rh6G-Lösung getestet und anschließend die erforderlichen Reinigungsschritte durch die Aufnahme der Restfluoreszenz untersucht. Hierzu wurde ein Tropfen Rh6G auf den Probehälter gegeben und die Mikropipette für 4 s mit einem Unterdruck von -800 mbar beladen. Durch die mikroskopische Betrachtung konnte beobachtet werden, dass die eingesogene Flüssigkeit durch die im Mikrokanal vorhandene Luft unmittelbar nach dem Einsaugen herausgedrückt wurde. Dies kann damit erklärt werden, dass nach dem Frontloading mit großer Wahrscheinlichkeit innerhalb des Mikrokanals ein höherer Druck vorherrscht als außerhalb. Allerdings kann die Flüssigkeitsverdrängung durch die Zugabe von 20 wt% Glycerin zur wässrigen Rh6G-Lösung verhindert werden. Des Weiteren sorgt die Glycerinzugabe auch dafür, dass die auf der Oberfläche abgegebene Flüssigkeit langsamer an der Luft verdampft. Als mögliche Gründe könnten die höhere Viskosität, der geringere Dampfdruck und die Veränderung der Oberflächeneigenschaften, wie z. B. die erhöhte Hydrophobie, in Frage kommen [132–135]. Wie in **Abb. 4.3** zu sehen ist, führt die Pipettenbeladung mit glyzerinhaltiger Lösung zu einem stabilen Flüssigkeitspegel im Mikrokanal. Dieser Zustand ist vor allem bei längerfristigen Experimenten essentiell, da die aufgesogene Flüssigkeit ansonsten austreten und das Experiment somit negativ beeinflussen würde. Im nächsten Schritt wurde ein Tropfen Rh6G-Lösung auf das Deckglas gegeben und die Fluoreszenz detektiert. Dies ist sowohl in **Abb. 4.4 (a)** als auch in **Abb. 4.4 (d)** in Pos. 2 dargestellt.

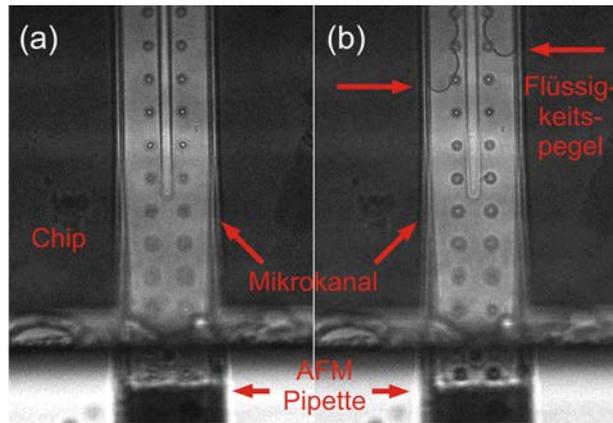


Abbildung 4.3: Hellfeldbilder eines Mikropipetten-Mikrokanals (a) vor und (b) nach der Frontloading-Prozedur mit dem Zusatz von 20 wt% Glycerin, welcher zu einem stabilen Flüssigkeitspegel führt.

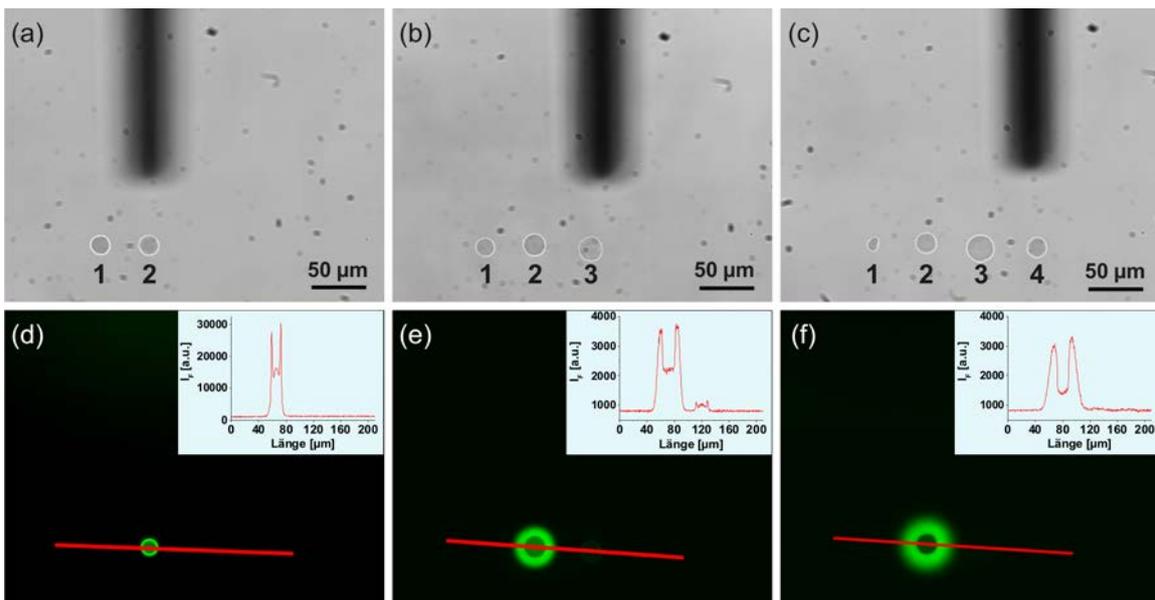


Abbildung 4.4: Mikropipettenreinigung nach der einmaligen Verwendung von Rh6G. (a-c) Hellfeldbilder für vier nacheinander abgegebene Flüssigkeitstropfen (Pos. 1, 3 und 4: Glycerin-Wasser; Pos. 2: 50 μM Rh6G); Im Hintergrund ist die Silhouette der Mikropipette zu erkennen. Der Maßstab ist im Bild angegeben. (d-f) Korrespondierende Fluoreszenzbilder der identischen Bereiche, die in (a-c) gezeigt sind, mit den dazugehörigen Intensitätsprofilkurven entlang der roten Linie; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$; Zeiträume zwischen der Abgabe der einzelnen Tröpfchen: 1 bis 2 in 12 min, 1 bis 3 in 39 min, 1 bis 4 in 70 min.

Für die externe Reinigung wurde ein Tropfen 4% NaOCl-Lösung auf den Probehälter gegeben und nach 20 s entfernt. Die Mikropipette wurde anschließend in einen großen Tropfen 5% ethanolische Wasserlösung getaucht und der Mikrokanal wurde fünf Mal für je 5 s durch alternierende Anwendung eines Unterdrucks (-800 mbar) und eines Überdrucks (1125 mbar) gespült. Der schnelle Druckwechsel wurde mit Hilfe eines externen Drucksteuerprogramms geregelt. Danach wurde die Mikropipette komplett geleert und mit einem Unterdruck für 4 s mit frischer 20 wt% Glycerin-Wasser-Lösung gefüllt. Nachfolgend wurde ein Glycerin-Wasser-Tropfen unmittelbar neben dem zuvor abgegebenen Rh6G-Tropfen, wie in **Abb. 4.4 (b)** auf der Position 3 zu erkennen ist, auf der Oberfläche abgegeben. Trotz des ersten Reinigungsschrittes ist immer noch eine geringe Restfluoreszenz im Glycerin-Wassertropfen des Fluoreszenzbildes der **Abb. 4.4 (e)** wiederzufinden. Aus diesem Grund wurde die Mikropipette noch einmal wie zuvor beschrieben gereinigt und ein zweiter Glycerin-Wassertropfen auf der Deckglasoberfläche bei der Position 4 in der **Abb. 4.4 (f)** abgegeben. Dieses Mal konnte unter denselben Bildaufnahmeeinstellungen kein Restfluoreszenzsignal detektiert werden. Des Weiteren ist in dieser Abbildung das schwache Fluoreszenzsignal der Position 3 aus **Abb. 4.4 (e)** nicht mehr vorzufinden. Dies wird höchstwahrscheinlich das Resultat eines Eintrocknungseffektes sein. Nichtsdestotrotz kann durch das Fehlen des Fluoreszenzsignals im vierten frisch abgegebenen Tropfen davon ausgegangen werden, dass das Rh6G nach zwei Reinigungsschritten bzw. zehnmalem Spülen komplett aus der Mikropipette entfernt wurde.

Mit der zuvor eingeführten Frontloading- und Reinigungsmethode ist es nun möglich, mit ein und derselben Mikropipette Rh6G- und Glycerin-Wassertropfen abwechselnd auf einer Deckglasoberfläche abzugeben. In **Abb. 4.5 (a)** ist ein Hellfeldbild von vier sequenziell abgegebenen Flüssigkeitstropfen dargestellt, von denen der erste und der dritte Tropfen



Abbildung 4.5: Alternierende Tropfenabgabe von Wasser und Rhodamin 6G. (a) Hellfeldaufnahme von vier nacheinander abgegebenen Tröpfchen innerhalb von 100 Minuten (Pos. 1 und 3: Glycerin-Wasser; Pos. 2 und 4: 50 μM Rh6G); Im Hintergrund ist die Mikropipette zu sehen. Abgabezeiträume zwischen den einzelnen Tropfen: 1 bis 2 in 27 min, 1 bis 3 in 75 min, 1 bis 4 in 100 min. (b) Korrespondierendes Fluoreszenzbild; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$. (c) Fluoreszenzintensitätsprofilverlauf entlang der in (b) angegebenen roten Linie.

Glycerin-Wasser und der zweite und vierte Tropfen Rh6G enthält. Wie zuvor angenommen, sind im korrespondierenden Fluoreszenzbild in **Abb. 4.5 (b)** nur in den Rh6G-Tropfen Fluoreszenzsignale zu detektieren. Dennoch ist in **Abb. 4.5 (c)** deutlich zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzintensitäten in den beiden Tropfen signifikant unterscheiden. Der Grund für dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das zeitabhängige Austrocknen des abgegebenen Farbstofftropfens und die damit verbundenen veränderten Fluoreszenzeigenschaften. Diese Vermutung wird durch den Vergleich der Tropfengrößen in **Abb. 4.5 (a)** noch etwas stärker verdeutlicht. Dieser Verdampfungseffekt ist insbesondere bei kleinen fL-Volumen so stark, weil diese Tropfen ein größeres Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis als Tropfen mit mL-Volumen besitzen. Unter der Verwendung eines sensitiven Massensensors konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Verdunstung solcher kleiner Tropfen nur einige Minuten oder weniger benötigt [132]. De facto führte die Aufnahme einer Zeitreihe eines abgegebenen Rh6G-Tropfens in **Abb. 4.6** zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität sowie einer Veränderung der Tröpfchenform während einer 60-minütigen Eintrocknungsphase. Dieser zeitabhängige Verlauf bestätigt die zuvor beobachtete Änderung des Tropfen Nr. 2 zum Tropfen Nr. 4 in **Abb. 4.5 (c)**.

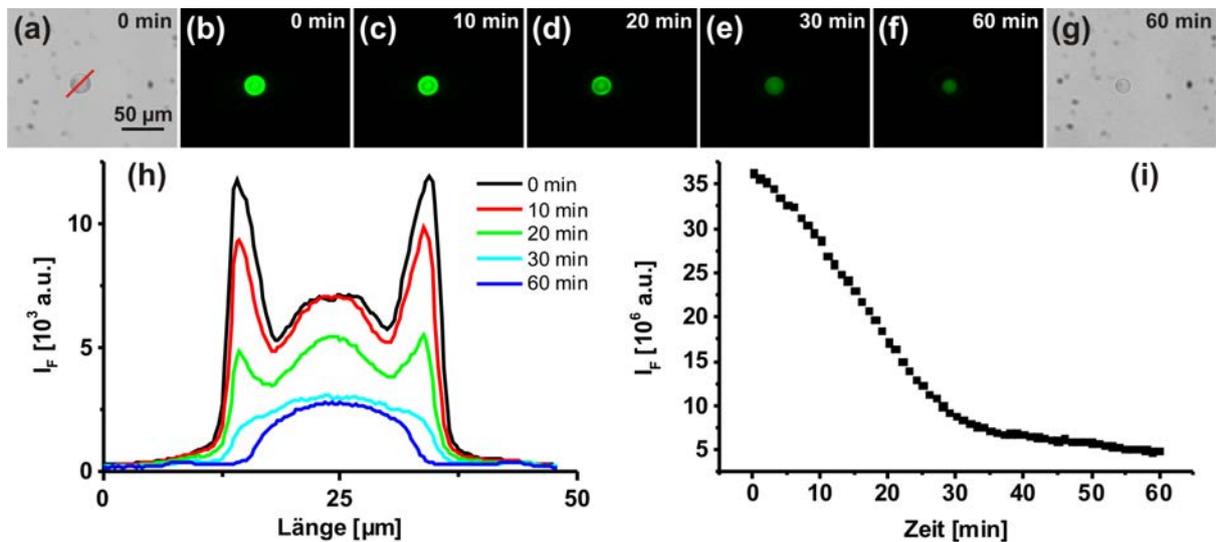


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verdunstungsverlauf eines Rh6G Tropfens an der Luft. (a) Hellfeldbild eines frisch abgegebenen $50 \mu\text{M}$ Rh6G Tropfens auf einem Deckglas und (b-f) korrespondierende Fluoreszenzbilder zu fünf verschiedenen Aufnahmezeitpunkten; $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$. (g) Hellfeldbild desselben Tropfens nach dem 60-minütigen Eintrocknen. (h) Fluoreszenzintensitätsprofilverlauf des Tropfens zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten von (b-f) entlang der roten Linie aus (a). (i) Zeitliche Fluoreszenzintensitätsabnahme im Bereich des Tropfens innerhalb von 60 Minuten. Die Bildaufnahme umfasste 1 Bild pro Minute.

Anwendungsbeispiel AlexaFluor647-gekoppelter IgG Antikörper

Im nächsten Abschnitt werden das Frontloading und die Reinigungsprozedur im Bezug auf den AK als Beispiel für eine Bioprobe untersucht und erörtert. Große biologische Komponenten, wie Proteine, bestehen aus vielen funktionellen Gruppen, welche des Öfteren starke Interaktionen mit Oberflächen eingehen, wodurch die damit verbundene Frontloading- und Reinigungsprozedur anspruchsvoller werden. Deshalb wurde die Beladung und die anschließende Reinigung der Mikropipette für einen AK mit einer molaren Masse von etwa 150 kDa entwickelt. Die Endkonzentration dieses AK beträgt $10 \mu\text{g/mL}$, welcher der vom Hersteller empfohlenen Konzentration für Immunfluoreszenz-Färbung entspricht. Ähnlich wie bei den Rh6G-Experimenten wurde der AK-Pufferlösung 20 wt% Glycerin hinzugefügt. Frühere Studien zeigten bereits, dass der Zusatz von Glycerin zu Pufferlösungen als Lösungsmittel (LM) für Fluoreszenzproteine verwendet werden kann, da es hierbei zu keinerlei Denaturierungseffekten, strukturellen Veränderungen oder Aktivitätsverlusten kommt [43, 74]. Die Beladungsprozedur ist mit der Beladung der Rh6G-Experimente zu vergleichen und die dazugehörigen Ergebnisse sind in **Abb. 4.7 (a) - Abb. 4.7 (d)**

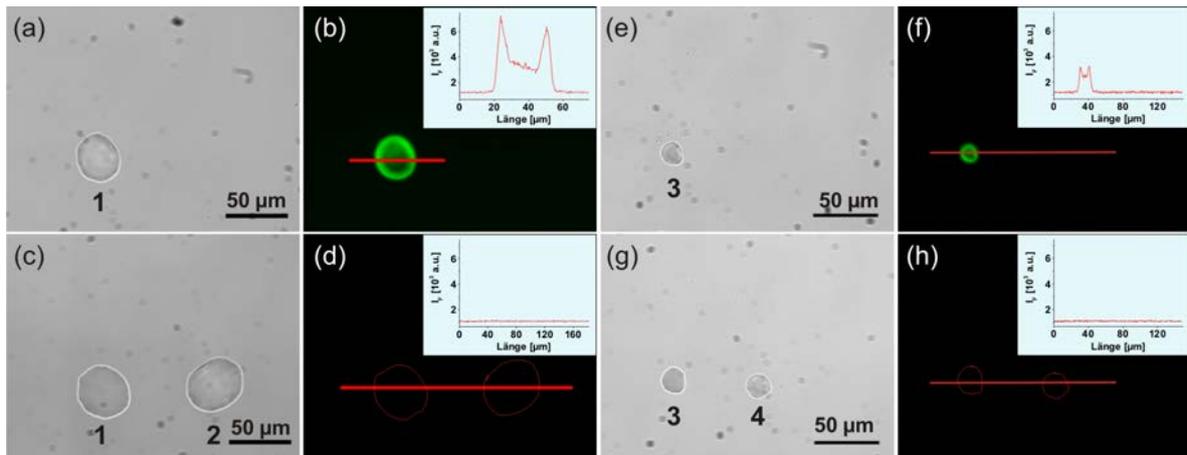


Abbildung 4.7: Wiederholte Verwendung der Mikropipette bei der Antikörperabgabe. (a) Hellfeldbild eines abgegebenen AlexaFluor647-markierten Antikörper IgG Tropfens ($10 \mu\text{g/mL}$) und (b) das dazugehörige Fluoreszenzbild mit einer Intensitätsprofilardarstellung. Der jeweilige Maßstab ist in der jeweiligen Abbildung zu finden; $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm} \pm 37.5 \text{ nm}$. (c,d) Hellfeldbild und korrespondierendes Fluoreszenzbild des gleichen Tropfens wie in (a,b, Pos. 1), sowie des nach dem Reinigungsvorgang anschließend abgegebenen Glycerin-Wassertropfens (Pos. 2); Der Zeitraum zwischen der Abgabe der Tröpfchen 1 und 2 beträgt etwa 65 min. (e,f) Hellfeldbild und dazugehöriges Fluoreszenzbild mit dem Intensitätsdiagramm eines abgegebenen Antikörpertropfens (Pos. 3) infolge wiederholter vorderseitiger Beladung derselben Mikropipette nach mehreren Stunden der Lagerung. (g,h) Korrespondierende Bilder mit einem zusätzlich abgegebenen Glycerin-Wassertropfen nach wiederholtem Reinigungsvorgang; Der Abgabezeitraum zwischen den Tröpfchen 3 und 4 beläuft sich etwa auf 43 min.

als Hellfeld- und korrespondierende Fluoreszenzbilder dargestellt. Zunächst wurde ein Tropfen der AK-Lösung auf der Deckglasoberfläche in **Abb. 4.7 (a)** abgegeben und das Fluoreszenzsignal wurde in Pos. 1 der **Abb. 4.7 (b)** beobachtet.

Im nächsten Schritt wurde eine Reinigungsprozedur durchgeführt, welche der von Rh6G ähnlich war, jedoch wurde der Mikrokanal der Mikropipette dieses Mal mit 4% NaOCl-Lösung anstelle von 5% ethanolischer Wasserlösung gereinigt. In **Abb. 4.7 (c)** und **Abb. 4.7 (d)** wird sowohl der davor abgegebene AK-beinhaltende Tropfen in Pos. 1 als auch der frisch abgegebene Glycerin-Wassertropfen nach der Reinigungsprozedur in Pos. 2 gezeigt. Im letzteren Fall konnte nach der Reinigungsprozedur idealerweise keine Restfluoreszenz im aktuellen Glycerin-Wassertropfen beobachtet werden. Allerdings konnte beim direkten Vergleich der Pos. 1 in **Abb. 4.7 (b)** und in **Abb. 4.7 (d)** im AK-enthaltenden Tropfen auch kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das Austrocknen des Tropfens könnte die Ursache für die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von AlexaFluor647 sein, so wie es auch schon zuvor für Rh6G vermutet wurde (siehe **Abb. 4.5 (a)**, Pos. 2 *vs.* Pos. 4). Um diese Annahme zu bekräftigen, wurde in **Abb. 4.8** ein 60-minütiges Eintrocknungsexperiment an der Luft, ähnlich wie zuvor bei Rh6G, durchgeführt. In die-

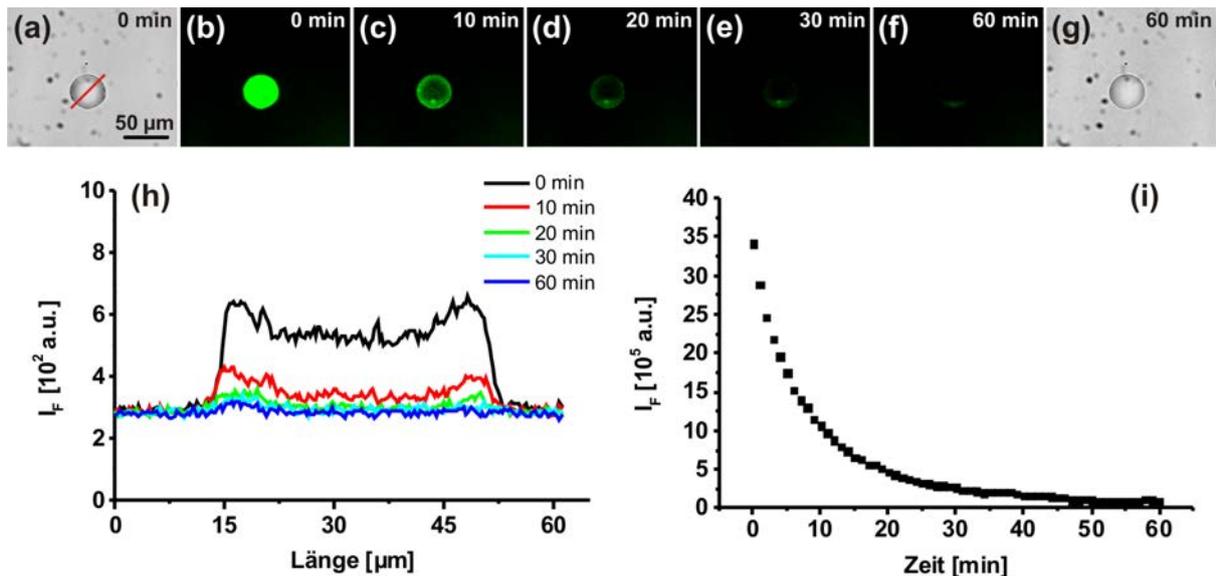


Abbildung 4.8: Zeitlicher Verlauf für das Eintrocknen eines farbstoffmarkierten Antikörpertropfens an der Luft. (a) Hellfeldbild eines frisch abgegebenen Tröpfchens von AlexaFluor647-markiertem Antikörper IgG (10 µg/mL) auf einem Deckglas und (b-f) korrespondierende Fluoreszenzbilder zu fünf verschiedenen Aufnahmezeitpunkten; $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm} \pm 37.5 \text{ nm}$. (g) Hellfeldbild desselben Tropfens nach dem 60-minütigen Eintrocknen. (h) Fluoreszenzintensitätsprofilverlauf des Tropfens zu fünf verschiedenen Zeitpunkten von (b-f) entlang der roten Linie, die in (a) angegeben ist. (i) Zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität im Bereich des Tropfens innerhalb von 60 Minuten. Die Bildaufnahme betrug 1 Bild pro Minute.

sem Zusammenhang wurde wiederum eine zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität registriert. Für die Lagerung über einige Stunden oder mehrere Tage werden die gereinigten und entleerten (nur luftgefüllten) AFM-Mikropipetten kopfüber in eine 24-Loch-Mikrotiterplatte, welche zuvor in **Kap. 3.3** gezeigt wurde, gelegt. Die Behälter werden bis knapp unterhalb der Öffnung des Reservoirs mit bidest. Wasser gefüllt, die Mikrotiterplatte mit einer Parafilm-Folie versiegelt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der Vorteil dieser Lagerungsmethode war die Vorbeugung des Austrocknens der Mikropipettenöffnung, so dass diese unverzüglich und mehrmals nacheinander verwendet werden konnte. Die wiederholte Verwendung ein und derselben AFM-Mikropipette nach mehrstündiger Lagerung in einer wassergefüllten Mikrotiterplatte wird in **Abb. 4.7 (e)** - **Abb. 4.7 (h)** gezeigt. Zu Beginn wurde die gelagerte Mikropipette durch das Anlegen eines Überdrucks vom bidest. Wasser befreit, welches während des Lagerungszeitraumes in die Pipettenöffnung eingedrungen ist. Als nächstes wurde die Pipette ein weiteres Mal mit farbstoffgekoppelten AK beladen und ein neuer Fluoreszenztropfen konnte erfolgreich, wie in Pos. 3 der **Abb. 4.7 (e)** und der **Abb. 4.7 (f)** zu erkennen ist, auf der Deckglasoberfläche abgegeben werden. Im Anschluss konnte in der Pos. 4 der **Abb. 4.7 (g)** und der **Abb. 4.7 (h)** ein weiterer erfolgreicher Reinigungsvorgang visualisiert werden, da im frisch abgegebenen Flüssigkeitstropfen keine Restfluoreszenz detektiert werden konnte. Allerdings verschwand ebenfalls, wie schon zuvor gezeigt, das Fluoreszenzsignal des AK-enthaltenen Tropfens in Pos. 3.

Um die äußere Verschmutzung der Mikropipette so gering wie möglich zu halten, sollte bei der Frontloading-Prozedur wenig Volumen verwendet werden. Dadurch verringert sich die Inkubationszeit und die Anzahl der Reinigungszyklen bei der äußeren Reinigung. Jedoch hängt die äußere Reinigung neben dem verwendeten Volumen auch von der Art und Weise der eingesetzten Substanz und deren Wechselwirkung ab. Diese Relation wurde beispielsweise anhand eines einfachen Experimentes in **Abb. 4.9** mit einer Rh6G-gefüllten Mikropipette gezeigt. Diese Pipette wurde für die Simulation einer flüssigen Umgebung in einen großen Wassertropfen von etwa 1 mL getaucht. Hierbei konnte eine Abnahme des Umgebungsfluoreszenzsignals bei steigender externer Reinigung der Mikropipette beobachtet werden. Generell ist die Frontloading-Prozedur vor allem für Fluoreszenzfarbstoffe geeignet, wenn diese mit einem Fluoreszenzmikroskopie-Aufbau kombiniert werden. Bei der Verwendung nicht-fluoreszenter Substanzen muss das Frontloading und die Reinigung zunächst mit fluoreszenten Referenzsubstanzen optimiert werden, welche der Zielsubstanz in Bezug auf der Molare Masse, spezifischen funktionellen Gruppen und der Löslichkeit ähnlich sind.

Im Laufe dieses Kapitels konnten die erfolgreiche Frontloading-Prozedur, die Reinigung

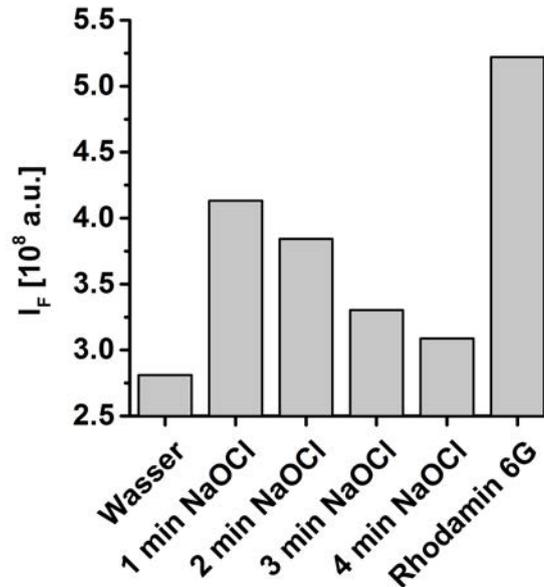


Abbildung 4.9: Einzelmessung des Eintauchens einer Mikropipette in einen Wassertropfen nach dem Frontloading mit Rh6G und nach verschiedenen Reinigungszyklen. Die Mikropipette wurde mit 50 μM Rh6G mittels der Frontloading-Prozedur gefüllt, indem ein Tropfen von etwa 5 μL auf die Deckglasoberfläche gegeben und die Mikropipette in diesen Tropfen getaucht wurde. Anschließend wurde die Mikropipette in vier verschiedenen Reinigungszyklen von außen gereinigt. Die Inkubationszeit der NaOCl-Lösung variierte zwischen 1 min und 4 min. Danach wurde die Mikropipette zusätzlich mit 5% Wasser-Ethanol-Lösung gereinigt, so dass die Gesamtreinigungszeit etwa 5 Minuten betrug. Im weiteren Verlauf wurde die Mikropipette in einen zuvor abgegebenen Wassertropfen für ca. 5 Minuten getaucht. Dann wurde das Restfluoreszenzsignal innerhalb des Wassertropfens, welches hauptsächlich auf eine äußerliche Mikropipettenkontamination zurückzuführen ist, aufgezeichnet und mit dem Hintergrundsignal ohne Mikropipettenkontakt (Balken "Wasser") verglichen. Nach der Überprüfung der vier Reinigungszyklen wurde ein kleines Volumen von Rh6G aus derselben Mikropipette in den Wassertropfen (Balken "Rhodamin 6G") abgegeben. $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$.

sowie die Wiederverwendung einer AFM-Mikropipette am Beispiel des organischen Farbstoffs Rh6G und der strukturell größeren Proteinlösung eines AK gezeigt werden. Die in dem Kapitel durchgeführten Experimente bilden die Grundlage für die späteren Untersuchungen im **Kap. 4.4** und **Kap. 4.5**. Neben der hier präsentierten Tropfenabgabe in Luft, können diese Flüssigkeiten auch in wässriger Umgebung abgegeben werden. Dieser Zusammenhang wird später im **Kap. 4.2.4** nochmal genauer beschrieben. Aufgrund der Abgabe in flüssiger Umgebung eignet sich die Frontloading-Methodik auch für die lokale Manipulation von lebenden Zellen bei denen Substanzen verwendet werden, welche nicht langzeitstabil sind. Ein ausführliches Anwendungsbeispiel stellt dabei die lokale Zellmanipulation von sekretorisch aktivem Epithelgewebe mit biogenen Aminen dar [122, 137], welche zu einem späteren Zeitpunkt im **Kap. 4.5.1** untersucht wird.

4.2.3 Flüssigkeitsabgabe an Luft

Nach der erfolgreichen Beladung und Reinigung der AFM-Mikropipette sollte das Verhalten der Flüssigkeitsabgabe an Luft untersucht werden. Hierbei soll der Einfluss des angelegten Drucks, der Abgabezeit und die Reproduzierbarkeit der Volumenabgabe expliziter beobachtet werden. Des Weiteren soll ein erster Test erfolgen, bei dem die Abgabe einzelner Strukturen für eine gezieltere Oberflächenverteilung ergründet wird.

Während des ersten Experimentes wurden Wassertropfen bei unterschiedlichen Drücken und Abgabezeiten auf einer Deckglasoberfläche abgegeben. Das Endergebnis wurde in **Abb. 4.10 (a)** dargestellt. In dieser Abbildung ist eine deutliche Zunahme bei steigendem Druck und eine Abnahme bei der Verringerung der Abgabezeit dem Augenschein nach zu erkennen. Zur besseren Darstellung des Wassertropfenprofils wurde entlang der roten

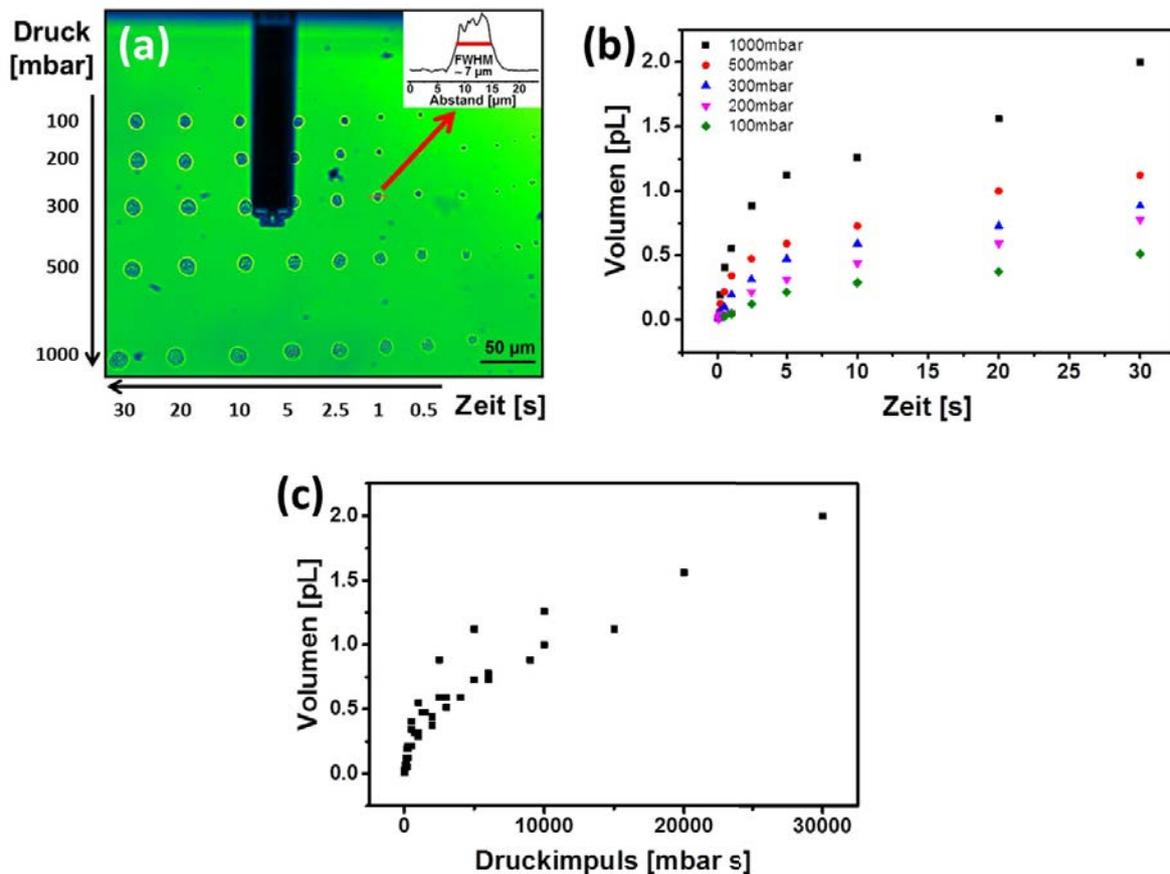


Abbildung 4.10: (a) Druck- und zeitabhängige Volumenabgabe von mehreren Wassertropfen auf einer Deckglasoberfläche mit Hilfe einer Nanopipette; Einfügung oben rechts: Das Profil eines Wassertropfens, welcher im Bild mit einer roten Linie markiert wurde. (b) Auftragung des in (a) abgegebenen Volumens gegen die Zeit für unterschiedliche Drücke (100-1000 mbar). (c) Auftragung des applizierten Volumens gegen den Druckimpuls. Der Druckimpuls entspricht dem Produkt der Abgabezeit und des angelegten Druckes.

Linie ein Intensitätsprofil gegen den Abstand in der oberen rechten Ecke abgebildet. Dieses Profil entspricht näherungsweise dem einer Halbkugel. Mit Hilfe der Halbwertsbreite (FWHM, *full width at half maximum*) kann der Durchmesser der Halbkugel annähernd bestimmt werden.

Zur besseren Hervorhebung der Druck- und Zeitabhängigkeit wurde das ermittelte Volumen in **Abb. 4.10 (b)** gegen die Zeit bei unterschiedlichen Drücken farblich markiert aufgetragen. Das Volumen V wurde hierbei mittels der FWHM bzw. des Durchmessers d und der folgenden Halbkugelgleichung **Gl. 4.1** bestimmt.

$$V = \frac{1}{12} \cdot \pi \cdot d^3 \quad (4.1)$$

Dabei kommt es zu einem asymptotischen Anstieg, welcher sich mit zunehmender Abgabezeit einem Plateau parallel zur x-Achse nähert. Dieser Zusammenhang kann damit erklärt werden, dass sich mit steigendem Volumen das Volumen-zu-Oberflächen-Verhältnis ändert. Dadurch wird höchstwahrscheinlich die weitere Volumenabgabe erschwert, da der äußere Umgebungsdruck gegen den Innendruck des Wassertropfens kontrahiert. Um nun eine zeit- und druckabhängige Durchflussrate zu bestimmen, wurden die angelegten Drücke und die Abgabezeiten für das jeweilige bestimmte Volumen zu einem Druckimpuls multipliziert und in **Abb. 4.10 (c)** mit dem abgegebenen Volumen aufgetragen. In dieser Abbildung ist ebenfalls, wie erwartet, ein umgekehrt exponentieller Verlauf zu erkennen, welcher jedoch große Schwankungen aufweist. Vor allem bei sehr kurzen Abgabezeiten kommt es zu starken Volumenschwankungen, da die Drucksteuereinheit einige Sekunden benötigt, um einen maximalen konstanten Druck aufzubauen. Aus diesem Grund war es bei der Flüssigkeitsabgabe an Luft nicht möglich eine Durchflussrate pro Druck- und Zeiteinheit zu bestimmen.

Ungeachtet dessen sollte im nächsten Schritt die Reproduzierbarkeit der Volumenabgabe bei gleichem Druck und gleicher Abgabezeit untersucht und nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeit der Volumenabgabe stellt eine wichtige Grundlage für alle späteren Funktionalisierungs- und physiologischen Experimente dar, da ohne sie keine Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente miteinander möglich wäre. Dementsprechend wurde zunächst die Nanopipette mit 50 μM Rh6G-Lösung gefüllt. Danach wurden mehrere Flüssigkeitstropfen mit einem konstanten Druck von 300 mbar und einer konstanten Abgabezeit von 300 ms auf einer Deckglasoberfläche verteilt. Die abgegebenen Tropfen wurden in **Abb. 4.11** dargestellt. Um gleichzeitig die Zielgenauigkeit der FluidFM Methode klarzustellen, wurde ein Schriftzug gewählt. Hierbei handelt es sich um den Namen der Nachwuchsgruppe „Angewandte Laserspektroskopie in biologischen System“ (ALSCom-

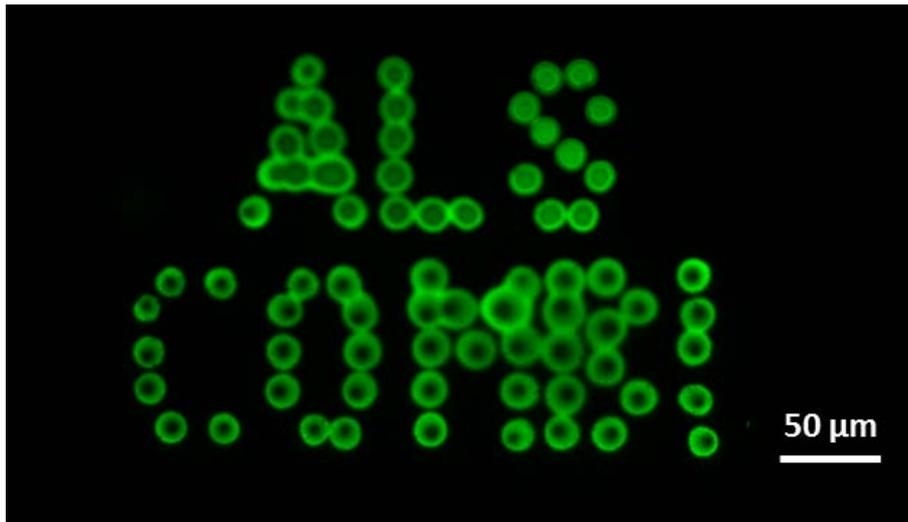


Abbildung 4.11: Darstellung der reproduzierbaren Volumenabgabe von $50 \mu\text{M}$ Rh6G auf einer Deckglasoberfläche für einen konstanten Druck von 300 mbar und eine konstante Abgabezeit von 300 ms. Der Druckimpuls als auch die Position der Tropfen wurde mit Hilfe des AYRA Programms angesteuert. Als Motiv wurde der Name der InnoProfile-Transfer-Gruppe ALSComBi verwendet.

Bi), welche das Messsystem bereitgestellt hat. Wie in **Abb. 4.11** zu erkennen ist, wurden mit Hilfe der Nanopipette nahezu gleichmäßige Rh6G-Tropfen auf der Oberfläche abgegeben. Das Volumen schwankt in diesem Experiment zwischen einem minimalen Tropfen von 0.45 pL bis zu einem maximalen Tropfen von 1.71 pL bei einem Mittelwert von $(0.85 \pm 0.03) \text{ pL}$ ($N = 72, \bar{x} \pm \text{SE}$). Eine mögliche Ursache könnte die Wechselwirkung der Flüssigkeit mit der Deckglasoberfläche und dem Pipettenmaterial sein. Diese Wechselwirkung ist entscheidend für die abgegebene Menge auf der Oberfläche und der Menge, welche noch an der Pipette hängt. Ist das Pipettenmaterial zu hydrophil, klebt die wässrige Probe bevorzugt an der Pipette, so dass der abgegebene Tropfen deutlich kleiner ist. Ist dagegen die Probenoberfläche zu hydrophil, dann verteilt sich die wässrige Lösung nach der Volumenabgabe weiter auf der Oberfläche, wodurch der Tropfen zerläuft und am Schluss größer erscheint, als er nach der Abgabe tatsächlich war. Dadurch kann es zu den oben genannten Schwankungen beim abgegebenen Probenvolumen kommen. Nichtsdestotrotz kann für die weiteren Experimente von einer nahezu reproduzierbaren Volumenabgabe ausgegangen werden, da die Tropfengröße, auf den Mittelwert bezogen, sehr ähnlich zueinander ist.

Im Anschluss daran sollte die gezielte Flüssigkeitsabgabe an Luft an einem ersten Anwendungsbeispiel getestet werden. Hierzu wurden dreieckige DNS-Origami-Nanostrukturen mit einer Kantenlänge von 130 nm der AG „Optical Spectroscopy and Chemical Imaging“ verwendet. Diese Strukturen werden des Öfteren dazu eingesetzt, um Einzelmole-

külspektroskopie mittels oberflächenverstärkter Raman-Streuung durchzuführen, da mit Hilfe der DNS-Origami-Technik einzelne Moleküle und andere Strukturen im Nanometerbereich nachträglich an die zuvor gefalteten Nanostrukturen gebunden werden können [138–141].

Üblicherweise werden die Origami-Nanostrukturen auf eine Oberfläche gegeben, auf welcher sie dann adsorbieren. Im Anschluss wird die Oberfläche mit einer Wasser-Ethanol-Mischung gereinigt und an der Luft getrocknet. Diese Art der Probenvorbereitung führt generell zu einer hohen Beladungsdichte an DNS-Origami-Nanostrukturen auf der jeweiligen Oberfläche, welche in **Abb. 4.12 (b)** beispielhaft für eine Glimmeroberfläche dargestellt wurde. Mit Hilfe der FluidFM-Technik sollte deswegen im nächsten Schritt die Beladungsdichte reduziert werden. Dazu wurde zunächst die Konzentration der Nanostruktur-Lösung durch Verdünnung verringert, um die AFM-Nanopipettenöffnung vor einer möglichen Blockierung zu schützen. Danach wurde die verdünnte Lösung eingesogen und mehrere Tropfen auf einer Deckglasoberfläche neben einem Kratzer platziert. Dieser in **Abb. 4.12 (a)** abgebildete Kratzer diente dazu die Position mit den eingetrockneten Flüssigkeitstropfen später wiederzufinden. Die abgegebenen Tropfen wurden für eine Stunde an der Luft getrocknet und im Anschluss mit einer Wasser-Ethanol-Mischung gereinigt und nochmals an der Luft getrocknet.

Anschließend wurde eine konventionelle AFM-Messspitze (TAP 150) mit dem Messkopf verknüpft und die Oberfläche mit dieser Messspitze abgerastert. In **Abb. 4.12 (c)** ist der Bereich des Tropfens Nr. 2 als AFM-Topographiebild abgebildet. Da in dieser Ansicht noch keine Nanostrukturen deutlich zu erkennen waren, wurde in den mittleren Bereich des Tropfens hineingezoomt. Dieser vergrößerte Bereich wurde in **Abb. 4.12 (d)** illustriert. Dieses Bild deutet erste feine Nanostrukturen an, welche als orangene Punkte zu erkennen sind. Für eine bessere Feinstruktur wurde der rechte Bereich in der **Abb. 4.12 (d)** ein weiteres Mal vergrößert. In **Abb. 4.12 (e)** sind nun signifikante dreieckige DNS-Origami-Nanostrukturen zu erkennen, welche die typische Form und Kantenlänge von etwa 130 nm aufweisen. Des Weiteren fällt in dieser Abbildung auf, dass einige Nanostrukturen etwas defekt sind. Eine Ursache hierfür könnte der Druck bei der Volumenabgabe sein. Bei der Verwendung eines geringeren Druckes sollte dieser Effekt zu minimieren sein. Abgesehen davon ist die Beladungsdichte in **Abb. 4.12 (e)** mit etwa 12 Origami-Nanostrukturen pro Aufnahme deutlich geringer als die 136 Origami-Nanostrukturen pro Bild in **Abb. 4.12 (b)**, so dass diese Präparierungsmethode eine Alternative für die übliche Beladung darstellen könnte, da jeweils die gleiche Konzentration verwendet wurde. Nichtsdestotrotz handelt es sich hier um eine Einzelmessung, so dass weitere Experimente benötigt werden, um diese Aussage statistisch zu belegen. Die unterschiedliche Qualität

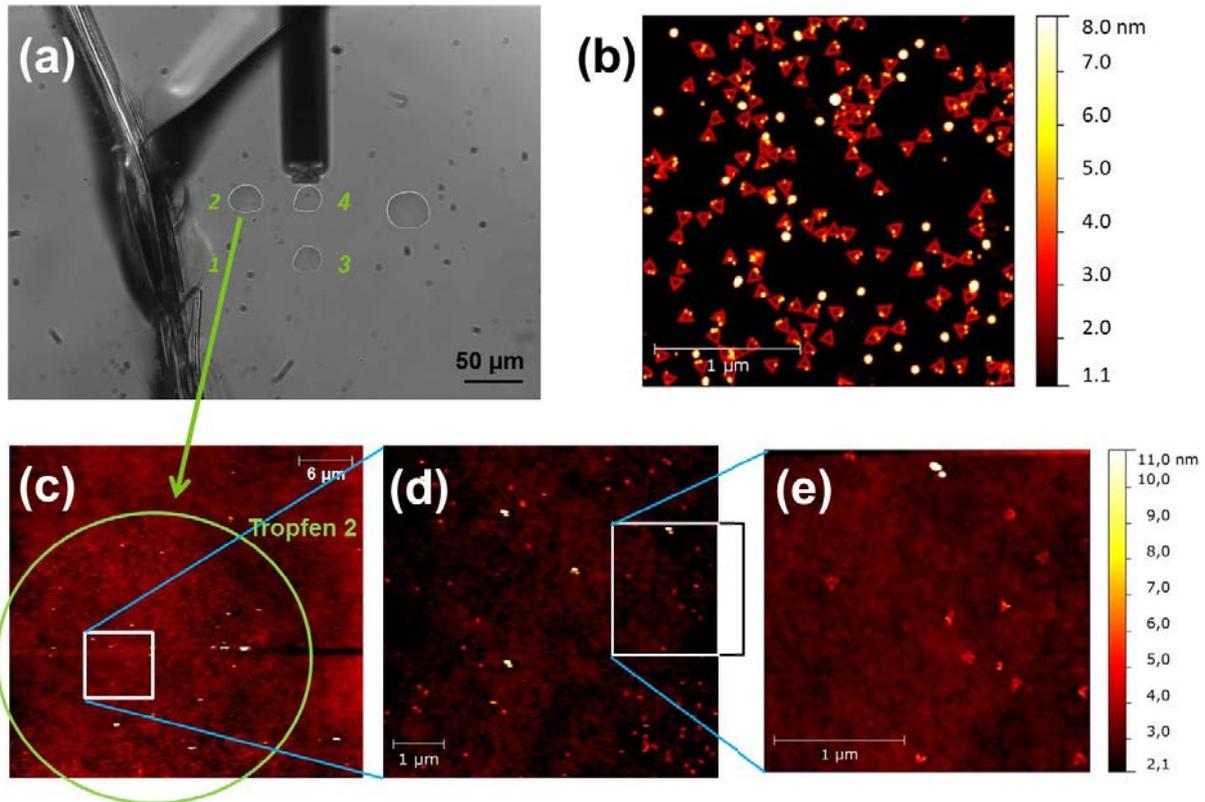


Abbildung 4.12: Untersuchungen zur definierten DNS-Origami-Nanostrukturen-Abgabe im Vergleich mit der üblichen Beladungsmethode der Probenoberfläche. (a) Hellfeldbild von vier abgegebenen Tropfen auf einer Deckglasoberfläche. Auf der linken Seite befindet sich ein Kratzer im Glas, welcher für die spätere Wiedererkennung der Position bei den AFM-Messungen verwendet wird. In der Position 1 gab die Pipette noch kein Volumen ab. In der oberen Mitte des Bildes ist die verwendete Pipette zu erkennen. (b) AFM-Bild der üblichen Verteilung der DNS-Origami-Nanostrukturen bei der regulären Präparationsmethode auf einer Glimmeroberfläche. Zusätzlich sind die DNS-Origami-Nanostrukturen noch mit Au-Nanopartikeln (NP) markiert, welche als weiße Punkte im AFM-Bild dargestellt sind. (c) AFM-Bild des Tropfens Nr. 2 aus (a), welcher zur besseren Darstellung mit einem grünen Kreis markiert wurde. (d) Vergrößerung des Tropfens Nr. 2 aus dem weiß markierten Bereich in (c), in dem einzelne Strukturen besser zu erkennen sind. (e) AFM-Bild der weiteren Vergrößerung des weiß markierten Bereiches in (d), in dem einzelne DNS-Origami-Nanostrukturen und Au-NP erkennbar sind. Die Verteilung der DNS-Origami-Nanostrukturen ist deutlich geringer als bei der üblichen Methode in (b). Die beiden rechten Skalen zeigen die Höhen der jeweiligen Proben an. Die dargestellten Flächen für (b) und (e) betragen jeweils $6.25 \mu\text{m}^2$.

der jeweiligen Hintergründe der beiden AFM-Bilder ist vom verwendeten Substrat abhängig. Die Glasoberfläche in **Abb. 4.12 (e)** weist deutlich mehr Rauschen bzw. Schwingungen auf als die Glimmeroberfläche in **Abb. 4.12 (b)**. Der Vorteil an der Glasoberfläche liegt in ihrer optischen Transparenz. Glimmer dagegen ist intransparent für Licht, so dass zuvor abgegebene Flüssigkeiten im Durchlichtmikroskop nicht optisch erkennbar sind.

4.2.4 Flüssigkeitsabgabe in Wasser

Nach der Untersuchung des Abgabeverhaltens an Luft sollte die Flüssigkeitsabgabe mittels der AFM-Mikropipette in Wasser genauer untersucht und charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch eine Durchflussrate pro Druck- und Zeiteinheit bestimmt werden, da diese für die Abschätzung des abgegebenen Volumens essentiell ist. Dazu wurde die Mikropipette ein weiteres Mal mit Hilfe von Frontloading mit $50 \mu\text{M}$ Rh6G gefüllt und nach der Reinigung in einen großen Wassertropfen ($\sim 500 \mu\text{L}$) gegeben. Danach wurde die Rh6G-Lösung bei unterschiedlichen Abgabezeiten und Drücken in das Wasser abgegeben und unmittelbar nach der Abgabe ein Fluoreszenzbild aufgenommen. In **Abb. 4.13** sind beispielhaft vier Fluoreszenzbilder für die Rh6G-Abgabe in Wasser

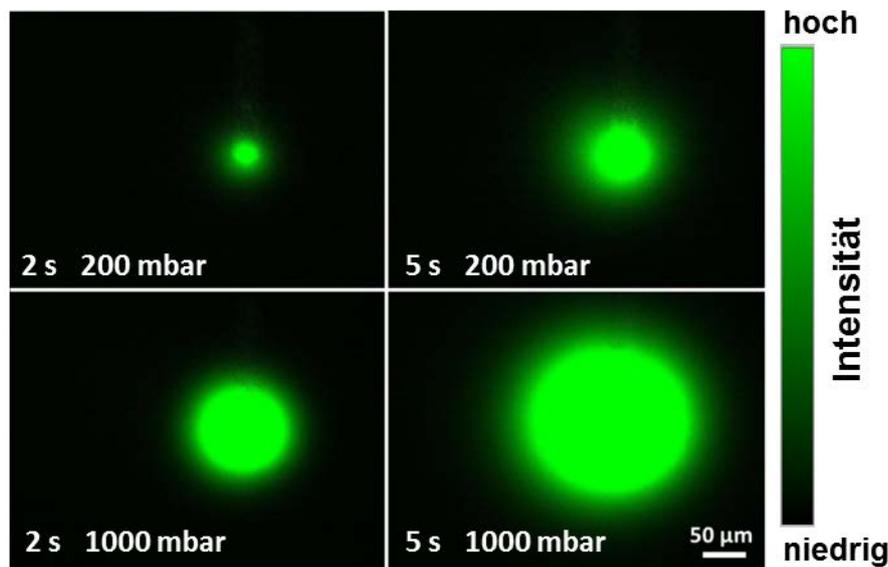


Abbildung 4.13: Überblick von vier exemplarischen Fluoreszenzaufnahmen für die Abgabe von $50 \mu\text{M}$ Rh6G in Wasser mit Hilfe einer $2 \mu\text{m}$ großen Mikropipette bei verschiedenen Abgabezeiten und angelegten Drücken.

bei Druckimpulsen von $400 \text{ mbar}\cdot\text{s}$ bis $5000 \text{ mbar}\cdot\text{s}$ dargestellt. Die Flüssigkeit breitete sich hierbei von der Pipettenöffnung in alle Richtungen gleichmäßig aus. Aus diesem Grund wurde für die spätere Volumenberechnung näherungsweise von einer sphärischen Grundform ausgegangen. Der hellgrüne Bereich entspricht in diesem Fall einer hohen Fluoreszenzintensität. Des Weiteren ist auf den ersten Blick ein einheitlicher zeit- und druckabhängiger Anstieg des Rh6G-Volumens zu erkennen, welcher in **Abb. 4.14** noch weiter charakterisiert wird.

Nach der erfolgreichen und gleichmäßigen Flüssigkeitsabgabe von Farbstoff in Wasser sollte die Rh6G-Abgabe für verschiedene Zeiten und angelegte Drücke reproduziert und eine

Durchflussrate mittels unterschiedlicher Druckimpulse bestimmt werden. Diesbezüglich wurde Rh6G während des nächsten Experimentes wiederholt bei variierenden Drücken zwischen 200 mbar und 1000 mbar und Zeiten zwischen 1 s und 5 s in Wasser abgegeben. Für die Volumenbestimmung der abgegebenen Rh6G-Menge wurde, wie in **Abb. 4.14 (a)** dargestellt, eine Linie durch das Intensitätsmaximum gelegt und das Fluoreszenzintensitätsprofil mit Hilfe des Programmes ImageJ bestimmt. Das Intensitätsprofil entlang der

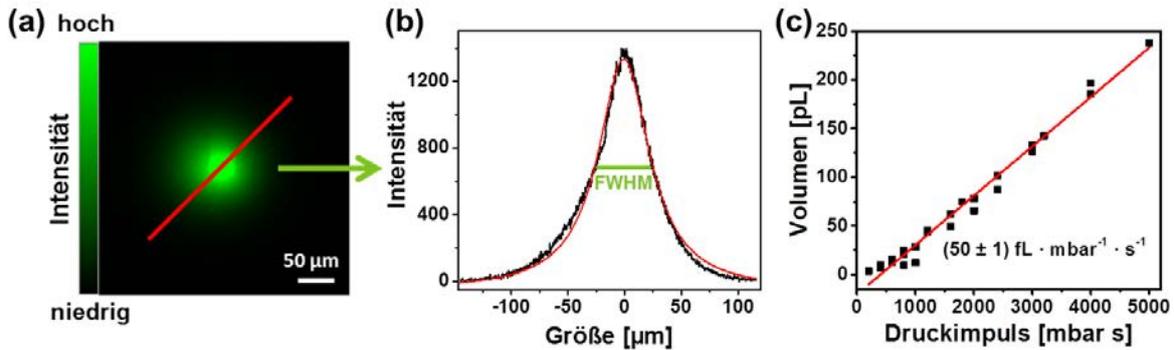


Abbildung 4.14: Charakterisierung der Flüssigkeitsabgabe von 50 μM Rh6G in Wasser für eine 2 μm große Mikropipette. (a) Fluoreszenzaufnahme der Abgabe von Rh6G in Wasser mit der dazugehörigen Intensitätsskala. (b) Abbildung des Intensitätsprofils der in (a) dargestellten Rh6G-Kugel entlang der roten Linie in (a). Die detektierte Intensität wurde gegen die aus der Halbwertsbreite (FWHM) ermittelte Größe dargestellt. Als Nullpunkt wurde das Maximum der Intensität gewählt. (c) Auftragung des bestimmten Volumens gegen den Druckimpuls. Mit Hilfe eines linearen Fits wurde für die 2 μm Mikropipette eine Durchflussrate von $(50 \pm 1) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in Flüssigkeit bestimmt.

roten Linie ist in **Abb. 4.14 (b)** abgebildet. Dabei wurden alle Intensitätsprofile mit einer Lorentz-Funktion angepasst. Mittels der Lorentz-Anpassung (Kurve in rot) wurde die FWHM in **Abb. 4.14 (b)** für jedes Intensitätsprofil bestimmt. Anschließend wurde das Volumen V mittels der Hypothese einer sphärischen Volumenabgabe, der FWHM bzw. dem Durchmesser d und der allgemeinen Kugelvolumengleichung **Gl. 4.2** bestimmt.

$$V = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d^3 \quad (4.2)$$

Das ermittelte Volumen wurde gegen den Druckimpuls der dazugehörigen Messung in **Abb. 4.14 (c)** aufgetragen. Die Daten wurden anschließend linear angepasst und es ergab sich eine Durchflussrate von $(50 \pm 1) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für eine 2 μm große Mikropipette. Dieser Wert stimmt vergleichsweise gut mit dem in [18] bestimmten Wert von $(64 \pm 2) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ überein, welcher für eine 8 μm große Mikropipette bestimmt wurde. Jedoch ist dabei zu beachten, dass dieser Durchfluss nur anhand einer Mikropipette bestimmt wurde und die Verwendung einer anderen 2 μm Mikropipette zu leicht

abweichenden Werten führen könnte. Des Weiteren kann nicht völlig garantiert werden, dass die Farbstoffkugel immer median geschnitten wurde, so dass hierbei auch Abweichungen auftreten können.

Mittels der bestimmten Durchflussrate kann nun das abgegebene Volumen in den biologischen Anwendungsbeispielen in **Kap. 4.4** und **Kap. 4.5** abgeschätzt werden und somit die lokal vorliegende Konzentration mit der in der Literatur global angegebenen Konzentration verglichen werden. Hierüber ist es nun möglich, die geringste lokal notwendige Wirkungskonzentration einzelner Zellen in einem Gewebe bei physiologischen Reaktionen zu bestimmen. Neben der Durchflussratenbestimmung kann diese Abgabemethode auch für die triviale Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in verschiedenen Medien verwendet werden. Hiermit wird sich im folgenden Kapitel **Kap. 4.2.5** näher beschäftigt.

4.2.5 Flüssigkeitsabgabe in anderen Medien

Das Diffusionsverhalten eines Moleküls ist für seinen Transport sowohl innerhalb wässriger Lösungen als auch innerhalb lebender Organismen fundamental. Dieses Diffusionsverhalten wurde von Einstein und Smoluchowski im Allgemeinen über den Zusammenhang zwischen dem mittleren Verschiebungsquadrat bzw. dem durchschnittlichen Quadrat der zurückgelegten Wegstrecke eines Moleküls Δx^2 und der Diffusionszeit $t_{\Delta x}$ definiert und als Diffusionskoeffizient D beschrieben [48, 49]. Mittels der vereinfachten Gleichung **Gl. 4.3** ist es demzufolge möglich, in einem Experiment D eines Moleküls über die mittlere Weglängenänderung pro Zeiteinheit zu bestimmen.

$$D = \frac{\Delta x^2}{2t_{\Delta x}} \quad (4.3)$$

D ist dabei von der Temperatur und der dynamischen Viskosität des Lösungsmittels abhängig, was mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (**Gl. 2.6**) beschrieben wird [48–50]. Anhand dieser Gleichung und der FluidFM-Methode ist es nun möglich, innerhalb kürzester Zeit und mit wenig Aufwand einen annähernden D -Wert zu bestimmen. Für die Bestimmung des exakten D -Wertes bietet sich die etablierte Methode der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) als Alternativmethode an, da hierbei das Diffusionsverhalten einzelner Moleküle untersucht wird [50, 142, 143].

Für die D -Wert-Bestimmung wurde eine mit Farbstofflösung beladene Mikropipette in einen Testmediumtropfen gegeben. Danach wurde ein kurzer, definierter Druckimpuls angelegt und die Diffusion der Farbstofflösung in verschiedenen Testmedien über die Zeit beobachtet. Bei den Medien handelte es sich um bidest. Wasser, ein 30 wt% Saccharose-

Wasser-Gemisch und ein 40 wt% Saccharose-Wasser-Gemisch. Zum besseren Verständnis wurde das Experiment in **Abb. 4.15** schematisch dargestellt. In **Abb. 4.15 (a)** wird die zeitliche Änderung der Farbstoffausbreitung direkt nach der Abgabe demonstriert.

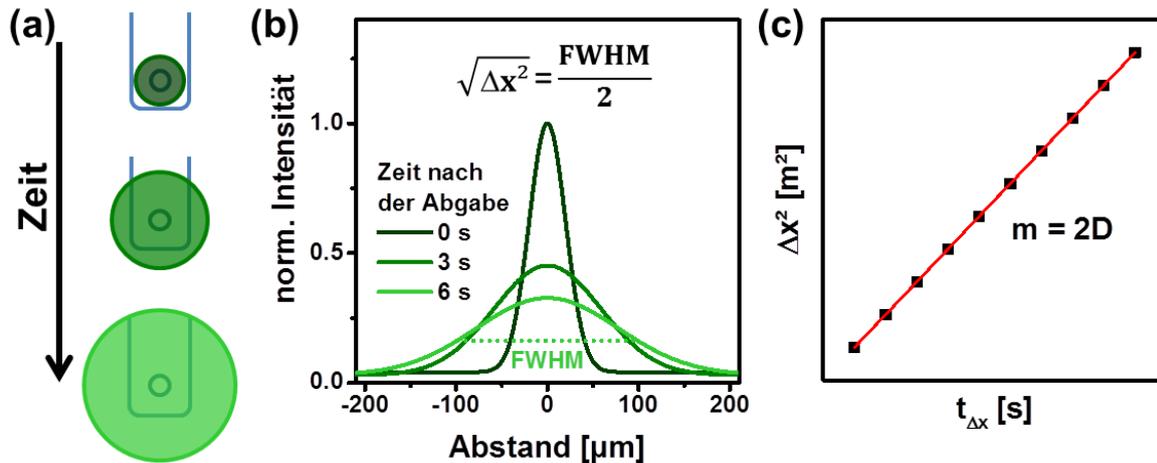


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des Diffusionsexperimentes für (a) die Ausbreitung der Rh6G-Lösung im Medium direkt nach der Abgabe. Die Verringerung der Farbtintensität symbolisiert die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die lokale Konzentrationsverringierung des Farbstoffes aufgrund von Diffusion. (b) Beispielhafte Illustration für die Abnahme der Intensität und Verbreiterung des Fluoreszenzsignals für die Zeitpunkte direkt nach der Abgabe, 3 s und 6 s nach der Abgabe der Rh6G-Lösung. (c) Schematische Auftragung von Δx^2 gegen $t_{\Delta x}$. Der Anstieg m entspricht 2D.

Das Ausbleichen der grünen Farbe soll die Verringerung der Farbstoffkonzentration durch das Vermischen mit dem Lösungsmittel visualisieren. In **Abb. 4.15 (b)** ist sowohl der Verlauf der Fluoreszenzintensität als auch der Verlauf des Abstandes innerhalb der ersten 6 s nach der Farbstoffabgabe schematisch beschrieben. Durch Diffusion und Verdünnung des Farbstoffes im Medium kommt es zum Abfall der Fluoreszenzintensität im Maximum und zur Vergrößerung des Abstandes in der eindimensionalen Betrachtung bzw. zur Vergrößerung der Fläche im zweidimensionalen Raum. Durch die Aufnahme von Bilderserien kann die zeitliche Änderung von Δx^2 im jeweiligen Medium untersucht werden. Im Anschluss kann der Diffusionskoeffizient D durch die Auftragung von Δx^2 gegen $t_{\Delta x}$ und die lineare Regression der Messdaten direkt aus der halben Steigung m , wie in **Abb. 4.15 (c)** dargestellt, bestimmt werden.

Für das nachfolgende Experiment wurde eine mit 50 µM Rh6G-gefüllte Mikropipette nach der Beladung in einen 500 µL Tropfen des Mediums gegeben und die Rh6G-Lösung für jedes Experiment 2 s lang mit einem Druck von 500 mbar aus der Mikropipette gedrückt. Unmittelbar nach der Volumenabgabe wurden Bilderserien im Intervall von einem Bild pro Sekunde aufgenommen. Hierbei ergaben sich deutlich unterschiedlich große

Ausbreitungsflächen für das jeweilige Medium. Korrespondierend zur Auswertung der Bilder in **Abb. 4.14** wird FWHM über die Intensitäts-Abstand-Diagramme mit Hilfe der Lorentz-Anpassung bestimmt. Anschließend wurde Δx^2 über das Quadrat von FWHM/2 berechnet und für das jeweilige Medium gegen $t_{\Delta x}$ in **Abb. 4.16** aufgetragen.

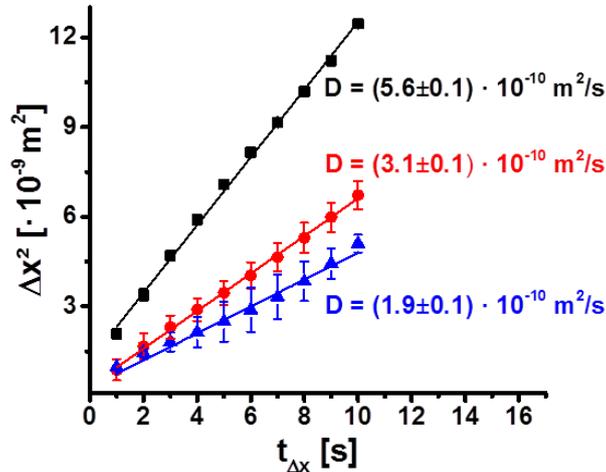


Abbildung 4.16: Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats Δx^2 von Rh6G gegen die Diffusionszeit $t_{\Delta x}$ für die Medien Wasser (schwarz), 30 wt% Saccharose-Wasser (rot) und 40 wt% Saccharose-Wasser (blau) nach 2 sekundiger Rh6G-Abgabe mit einem Druck von 500 mbar ($N = 3$, $\bar{x} \pm \text{SE}$). Der Diffusionskoeffizient D befindet sich neben der linearen Anpassung des jeweiligen Mediums. Die Temperatur ϑ belief sich während der Messungen konstant auf $\vartheta = 23^\circ\text{C}$. Die Bildaufnahmerate betrug 1 Bild pro Sekunde.

In **Abb. 4.16** ist ein linearer Zusammenhang für alle drei Medien zu erkennen, welcher sich in der jeweiligen Steigung der Daten unterscheidet. Die Steigung entspricht dem Diffusionskoeffizienten im individuellen Medium. Dabei fällt mit Prägnanz auf, dass D mit steigender Viskosität des Testmediums geringer wird. Dies stimmt auch sehr gut mit der Theorie überein, da die Diffusion eines Moleküls mit steigender Viskosität eingeschränkt wird [74, 144]. Der D -Wert für Rh6G in Wasser wurde bereits in der Literatur mittels 2-Fokus-FCS untersucht. Der ursprüngliche D -Wert beträgt nach der Umrechnung mit Hilfe von **Gl. 2.6** für $\vartheta = 23^\circ\text{C}$ $3.9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [38]. Dieser Wert ist etwas geringer als der in **Abb. 4.16** bestimmte D -Wert. Messschwankungen könnten dadurch entstanden sein, da nicht sichergestellt werden kann, dass die Fokusebene während der gesamten Bilderserienaufnahme in derselben Ebene blieb. Nichtsdestotrotz war es mittels dieser Methode möglich den D -Wert eines fluoreszierenden Moleküls näherungsweise zu bestimmen.

Anhand der in diesem Kapitel neu gewonnenen Beobachtungen kann das Diffusionsverhalten der in den späteren **Kap. 4.4** und **Kap. 4.5** angewandten Farbstoffe und Pharmaka besser prognostiziert werden.

4.3 Anpassung des Pipetten-Oberflächen-Abschlusses

Nach der vollständigen Charakterisierung der Nanofluidik der AFM-Pipetten sollte nun auch die AFM-Komponente der FluidFM-Technik untersucht werden. In diesem Fall soll sich explizit auf die Kraftkontrolle und -messung bezogen werden, welche bereits im **Kap. 2.1.1** beschrieben wurde. In diesem Zusammenhang wird die Kraft, wie zuvor in **Gl. 2.1** gezeigt, mit Hilfe der detektierten Auslenkung V_A , der Federkonstante k und Sensitivität β ermittelt. Der k -Wert ist spezifisch für jede AFM-Pipette und wird vom Hersteller angegeben. β wird durch direkte Kalibrierung auf der Probenoberfläche für jede AFM-Pipette bestimmt. Die AFM-Funktion dient zur Detektion und Visualisierung des Kontaktes der AFM-Pipette mit der Probenoberfläche und ist wichtig für die späteren lokalen Manipulationen von biologischen Proben. Während der lokalen Messungen werden Kraft-Zeit-Kurven aufgenommen. Die simultane Aufnahme dieser Kurven ist essentiell für den idealen Abschluss zwischen der Pipette und der Membranoberfläche, damit die zusätzliche Diffusion der abgegebenen Flüssigkeit minimiert wird bzw. im Idealfall sogar verhindert wird. Hierbei ist es vor allem entscheidend, dass eine konstante Kraft mit möglichst geringer Höhenänderung über längere Zeiten realisiert werden kann. Die Anpassung der idealen Parameter und die Durchführung langfristiger Kraftmessungen, welche in einem Zeitraum von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten erfolgen, soll im folgenden Kapitel untersucht und diskutiert werden. Abgesehen davon wird die Kraftdetektion mit der FluidFM-Technik in der Literatur nicht nur für den Abschluss oder Kontakt mit Probenoberflächen verwendet [145], sondern auch, um sich Adhäsionskräfte zwischen biologischen Proben und Probenoberflächen anzusehen. In diesem Fall wird ein besonderes Augenmerk auf die Adhäsion von einzelligen Organismen gelegt [12, 13, 62].

Zu den variierbaren AFM-Parametern des FluidFM-Aufbaus, welche in **Abb. 4.17** exemplarisch zusammengefasst sind, gehören die für die Pipettenannäherung verwendete Kraft (der Annäherungssollwert), die Annäherungsgeschwindigkeit, der P-Gain, der I-Gain und der D-Gain. Die PID-Parameter (P-, I- und D-Gain) werden vom AFM-Messkopf verwendet, um den Sollwert in Bezug auf den Kontakt mit der Oberfläche konstant zu halten und regeln somit die Reaktion der Messspitze innerhalb der Z-Ebene. Zu hohe Parameter verursachen eine Oszillation des Systems und zu niedrige Parameter verlangsamen das System, so dass die Oberfläche nicht richtig abgebildet wird. Vom Hersteller zuverlässige Werte sind 50 für den P- und I-Gain und 0 für den D-Gain. Diese drei Werte wurden in den folgenden Experimenten getestet und anschließend für alle Messungen übernommen. Bei allen Experimenten wurde stets mit einem konstanten Kraft-Modus gearbeitet, bei dem zu jeder Zeit einer auftretenden Kraftänderung mit Hilfe einer Höhenkorrektur ent-

AFM-Parameter	
Annäherungssollwert	10nN
Annäherungsgeschwindigkeit	5 μ m/s
P Gain	100
I Gain	100
D Gain	0
Sicherheitsabstand	20 μ m
AFM Beleuchtung	0%

Abbildung 4.17: Übersicht aller variierbaren AFM-Parameter.

gegengesteuert wurde. Hierbei wurde ein Annäherungssollwert in Form eines elektrischen Wertes in mV oder einer Kraft in nN vorgegeben. Sobald die Pipette den angeordneten Sollwert erreicht hat, bleibt sie für eine vorgegebene Zeit an dieser Stelle. Für den Fall, dass die Pipette ihren Sollwert bei der Oberflächenannäherung nicht innerhalb von 5 μ m erreicht, so fährt das Piezoelement in die Ausgangsposition zurück und das Experiment wird unterbrochen. Ein Beispiel hierfür wird zu einem späteren Zeitpunkt in **Kap. 4.3.2** aufgeführt.

Die Annäherungsgeschwindigkeit bestimmt zum einen die Annäherung der Pipette an die Oberfläche, jedoch auch die Geschwindigkeit, welche für die Korrektur des Piezoabstandes bei abnehmender oder zunehmender Kraft innerhalb des Experimentes angewandt wird. Des Weiteren können der Sicherheitsabstand und die AFM-Beleuchtung noch variiert werden. Der Sicherheitsabstand ist der Abstand, den der Messkopf nach einer Messung einnimmt, um die Pipette vor mechanischen Schäden zu schützen. Die AFM-Beleuchtung ist ausschließlich für die Justage des NIR-Lasers erforderlich, um diesen auf der reflektiven Rückseite der AFM-Pipette optisch über die Kamera zu visualisieren. Während einer Messung wird die Beleuchtung auf 0% gesetzt, damit diese den Hintergrund des Fluoreszenzbildes nicht verunreinigt.

In den folgenden Abschnitten sollen die AFM-Parameter am Beispiel eines biomimetischen Systems und eines komplexen biologischen Systems optimiert und für das jeweilige System diskutiert werden. Dabei spielt die Ermittlung der idealen Einzelparameter für die Anwendungen in **Kap. 4.4**, **Kap. 4.5** und **Kap. 4.6** eine entscheidende Rolle.

4.3.1 Kraft-Zeit-Kurven an biomimetischen Systemen

In diesem Abschnitt werden die AFM-Parameter für den idealen Proben-Pipetten-Kontakt anhand von riesigen, einschichtigen Vesikeln (GUV), welche als einfaches biomimetisches System fungieren, untersucht. Hierzu wurden zunächst größere GUV in der Größenordnung von etwa 25-30 μm verwendet und mit der Nanopipette kombiniert. Die GUV wurden mit Hilfe der Quellmethode, wie sie in **Kap. 3.3.3** beschrieben wurde, hergestellt und innerhalb einer PBS-Umgebung verwendet. Ein Tropfen der GUV-Lösung wurde auf eine zuvor mit Vectabond beschichtete Deckglasoberfläche gegeben. Nach etwa 20 Minuten setzten sich die GUV auf der Oberfläche ab und wurden mittels der Vectabond-Schicht auf dem Deckglas fixiert. Zwei dieser fixierten GUV finden sich in den Hellfeldbildern der **Abb. 4.18 (a)** und **Abb. 4.18 (c)** wieder. Diese GUV sind nahezu sphärisch und besitzen eine einschichtige Hülle. Nach der Fixierung der GUV wurde die Mikropipette über die GUV positioniert und an die GUV herangefahren. Im ersten Versuch wurde eine Kraft von 14 nN und eine Annäherungsgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{m}/\text{s}$ verwendet. Dabei konnte

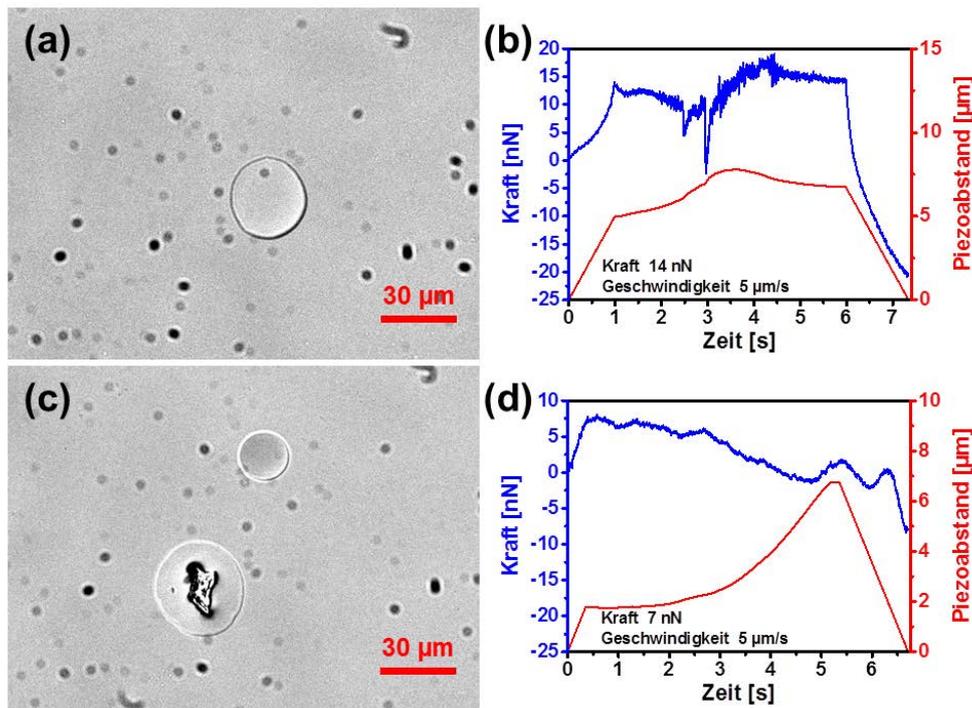


Abbildung 4.18: Untersuchungen der AFM-Parameter an großen GUV (Durchmesser ca. 30 μm). (a) Hellfeldbild eines großen GUV. (b) Illustration der Kraft-Zeit-Kurve mit der Piezoposition für die Interaktion der Pipette mit dem in (a) dargestellten GUV bei einer maximalen Kraft von 14 nN. (c) Hellfeldbild zweier großer GUV. (d) Darstellung der Kraft-Zeit-Kurve mit der Piezoposition für die Interaktion der Pipette mit der oberen GUV aus (c) bei einer maximalen Kraft von 7 nN. Die Piezogeswindigkeit betrug in beiden Fällen 5 $\mu\text{m}/\text{s}$.

zunächst die angelegte Kraft erreicht werden. Jedoch kam es danach zu starken Schwankungen während des konstanten Kraft-Modus, so dass die Kraft über die Variation der Piezohöhe, wie sie in der Kraft-Zeit-Kurve in **Abb. 4.18 (b)** zu erkennen ist, korrigiert wurde. Im zweiten Experiment wurde die Kraft von 14 nN auf 7 nN verringert und dabei die Geschwindigkeit mit $5 \mu\text{m/s}$ konstant gehalten. Die angelegte Kraft wird zu Beginn erreicht, dennoch kam es zum Abfall der konstanten Kraft. Dies geschah vermutlich, weil die Oberfläche der *GUV* nachgab und die Pipette dadurch mittels Piezoelement näher an die Oberfläche heranfährt, um die Kraft von 7 nN ein weiteres Mal zu erreichen. Dies gelang dem AFM-Messkopf jedoch nicht, so wie es in der **Abb. 4.18 (d)** zu sehen ist, so dass dieser nach 5 s in die Ausgangsposition ($0 \mu\text{m}$) zurückfährt.

Da die ersten beiden *GUV*-Experimente keine konstanten Kraft-Zeit-Kurven hervorbrachten, wurde bei den nächsten Experimenten sowohl die *GUV*-Größe als auch die angelegte Kraft und die Geschwindigkeit ein weiteres Mal verringert. Bei den in **Abb. 4.19 (a)** und **Abb. 4.19 (c)** dargestellten Hellfeldbilder wurden kleinere *GUV* mit einer Größe von $5\text{-}10 \mu\text{m}$ verwendet. Die kleinere *GUV*-Größe wurde in den nächsten Experimenten

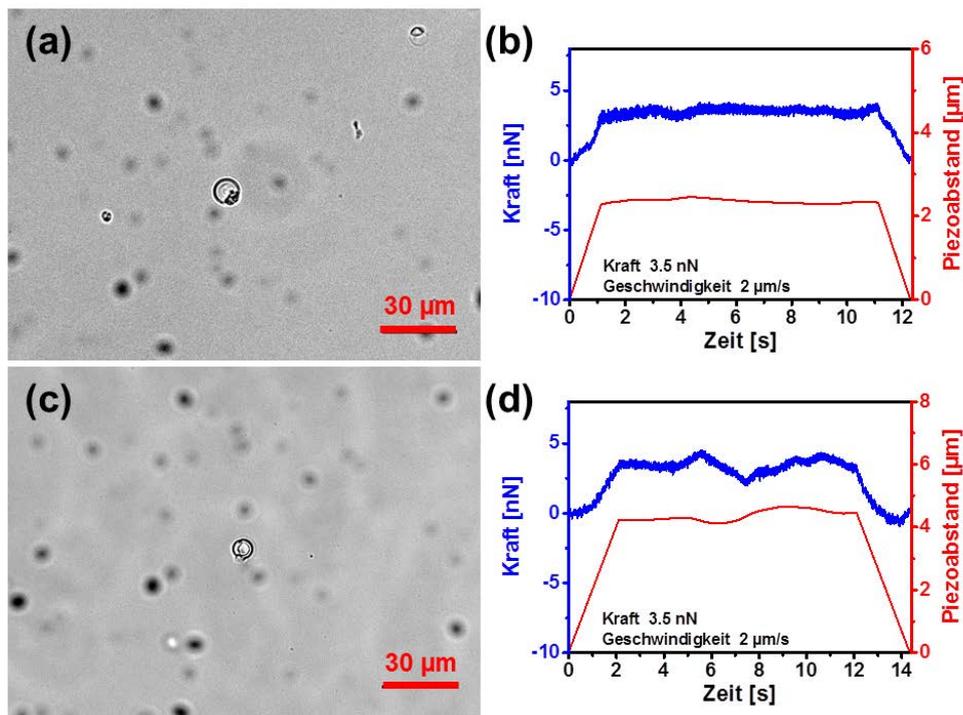


Abbildung 4.19: Tests der AFM-Parameter an kleinen *GUV* (Durchmesser ca. $10 \mu\text{m}$). (a) Hellfeldbild eines kleinen *GUV*. (b) Abbildung der Kraft-Zeit Kurve mit der Piezoposition für die Wechselwirkung der Pipette mit dem *GUV* aus (a) mit einer konstanten Kraft von 3.5 nN. (c) Hellfeldbild eines weiteren kleinen *GUV*. (d) Darstellung der Kraft-Zeit-Kurve mit der Position des Piezos für die Interaktion des *GUV* aus (c) mit der Pipette mit einer konstanten Maximalkraft von 3.5 nN. Die Piezugeschwindigkeit betrug in beiden Fällen $2 \mu\text{m/s}$.

gewählt, da davon ausgegangen wurde, dass die kleineren GUV, aufgrund ihres geringeren Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses, eine geringere Chance haben, der angewandten Kraft auszuweichen und dadurch eine Kraftkonstanz über eine längere Zeit erreicht werden kann. Des Weiteren wurde die angelegte Kraft von 7 nN auf 3.5 nN reduziert, da einige GUV bei vorherigen Experimenten durch Anlegen einer Kraft von 7 nN geplatzt sind. Die Geschwindigkeit wurde ebenfalls von 5 $\mu\text{m/s}$ auf 2 $\mu\text{m/s}$ verringert, um sowohl den Annäherungsprozess der Mikropipette schonender zu gestalten als auch bei der Kraftkorrektur nicht zu ruckartig mit der Nanopipette an die Oberfläche heranzufahren, um diese vor dem Platzen zu schützen. Diese neue Parameteranpassung führt zu einem positiven Ergebnis, welches sich im Verlauf der **Abb. 4.19 (b)** und **Abb. 4.19 (d)** widerspiegelt. Die verwendete Kräfte und Geschwindigkeiten führen zu Kraft-Zeit-Kurven, welche über eine Zeit von etwa 10 s nahezu konstant verlaufen.

Somit konnte im Laufe dieser Messungen gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, einen Abschluss zwischen Nanopipette und GUV zu schaffen, welcher jedoch aufgrund der zu weichen Beschaffenheit der GUV eine Herausforderung für längere Kraftmessungen darstellt. Nichtsdestotrotz soll dieses Vorwissen als Nächstes für die folgenden Kraftmessungen an komplexen Bioproben verwendet werden, da dieser Pipetten-Oberflächen-Abschluss noch essentieller für die kommenden Manipulationsexperimente ist.

4.3.2 Kraft-Zeit-Kurven an komplexen biologischen Systemen

Nach den ersten erfolgreichen Tests an biomimetischen Systemen sollen nun weitere Kraftmessungen an komplexeren biologischen Proben durchgeführt werden. In diesem Fall wird das Drüsengewebe der Schabe *P. americana* aus dem **Kap. 2.3.3** verwendet, die AFM-Parameter an diesem Biosystem optimiert und der Verlauf der Kraft-Zeit-Kurven diskutiert. Das Drüsengewebe ist im Gegensatz zu dem GUV deutlich stabiler, da es sich aus mehreren interagierenden Zellen zusammensetzt, welche wiederum aus mehreren verschiedenen Zellkompartimenten bestehen [47, 146, 147]. Der GUV dagegen liegt nur als weiche Lipidhülle vor, welche mit einer Pufferlösung gefüllt ist. Aus diesem Grund kann beim Drüsengewebe von Beginn an mit höheren Kräften gearbeitet werden, ohne dass dieses von der verwendeten Mikropipette versehrt wird. Bei der Annäherungsgeschwindigkeit sollten zunächst eine niedrige Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ und eine hohe Geschwindigkeit mit 5 $\mu\text{m/s}$ getestet werden. In **Abb. 4.20** wird dieser Zusammenhang anhand zweier Kraft-Zeit-Kurven dargestellt. Die blaue Kurve in **Abb. 4.20 (a)** zeigt einen stark rauschenden Kraftverlauf, welcher höchstwahrscheinlich auf der Tatsache beruht, dass das Piezoelement mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ zu langsam ist, um den Piezoab-

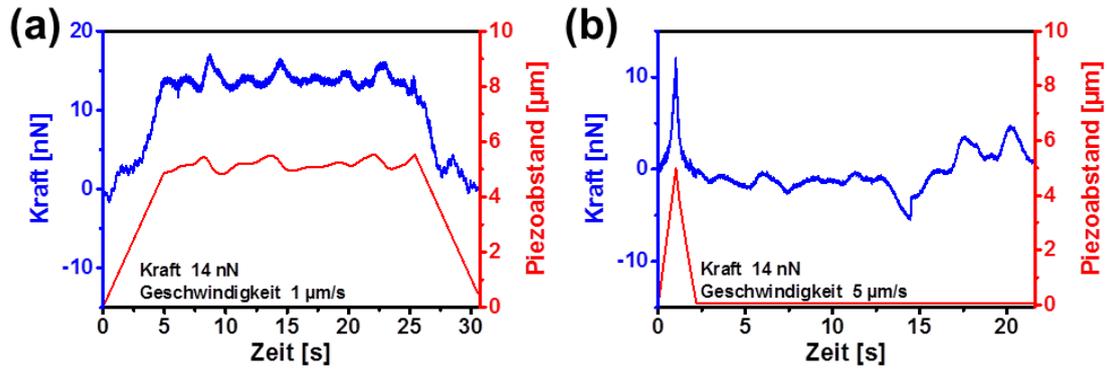


Abbildung 4.20: Untersuchung des Einflusses der Piezogeswindigkeit am Drüsengewebe mit einer konstanten Maximalkraft von 14 nN. (a) Kraft-Zeit-Kurve mit dem dazugehörigen Piezoabstand für eine Piezogeswindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$. Durch die geringe Änderungsgeschwindigkeit schwankt die Kraftkurve sehr. (b) Illustration einer Kraft-Zeit-Kurve mit korrespondierendem Piezoabstand für eine Piezogeswindigkeit von 5 $\mu\text{m/s}$. Wird die vorgegebene Kraft nach 5 μm nicht erreicht, so wandert das Piezo in die Ausgangsposition zurück (siehe 0. - 3. Sekunde).

stand zeitnah an die variierende Kraftänderung des Gewebes anzupassen. In der zweiten Beispielmessung in **Abb. 4.20 (b)** mit einer Änderungsgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{m/s}$ tritt der zu Beginn des Kapitels erwähnte Fall des maximalen Piezoabstandes ein. Hierbei erreicht die AFM-Pipette nach 5 μm nicht die vorgegebene Kraft von 14 nN, so dass das Piezoelement zurück in die Ausgangsposition bei 0 μm fährt. Dadurch werden keine weiteren Höhenänderungen mehr durchgeführt und die Kraftkurve schwankt sehr verrauscht um einen Kraftwert von 0 nN.

Nachdem die ersten Tests am Drüsengewebe nicht erfolgreich waren, wurden die Parameter Kraft und Geschwindigkeit erneut variiert. Für die Annäherungsgeschwindigkeit wurde ein ähnlicher Wert wie bei den GU verwendet. Dahingegen wurde die angelegte Kraft einerseits konstant gehalten und andererseits verringert. Während der folgenden Experimente wurde die Mikropipette so über dem Drüsengewebe positioniert, dass die Pipette beim Kontakt mit der Gewebeoberfläche annähernd die Mitte des Ausführungsgangs berührt. In den Hellfeldbildern der **Abb. 4.21 (a)** und **Abb. 4.21 (c)** sind die Ausführungsgänge mit der jeweiligen Mikropipette und deren Kontakt optisch dargestellt. Für das erste Experiment in **Abb. 4.21 (b)** wurde die angelegte Kraft im Gegensatz zu den vorherigen Gewebeexperimenten zunächst auf 7 nN herabgesetzt. In diesem Beispiel wurde nun ein konstanter Kraftverlauf über eine Zeit von 60 Sekunden beobachtet, welcher sowohl wenig Schwankungen innerhalb der Kraft aufweist als auch eine geringe Änderung des Piezoabstandes mit weniger als 500 nm einhergeht. In der zweiten Beispielmessung in **Abb. 4.21 (d)** wurde die angelegte Kraft auf 14 nN erhöht und zusätzlich sollte die Verweilzeit der Mikropipette am Drüsengewebe deutlich verlängert werden. Dies ist, wie

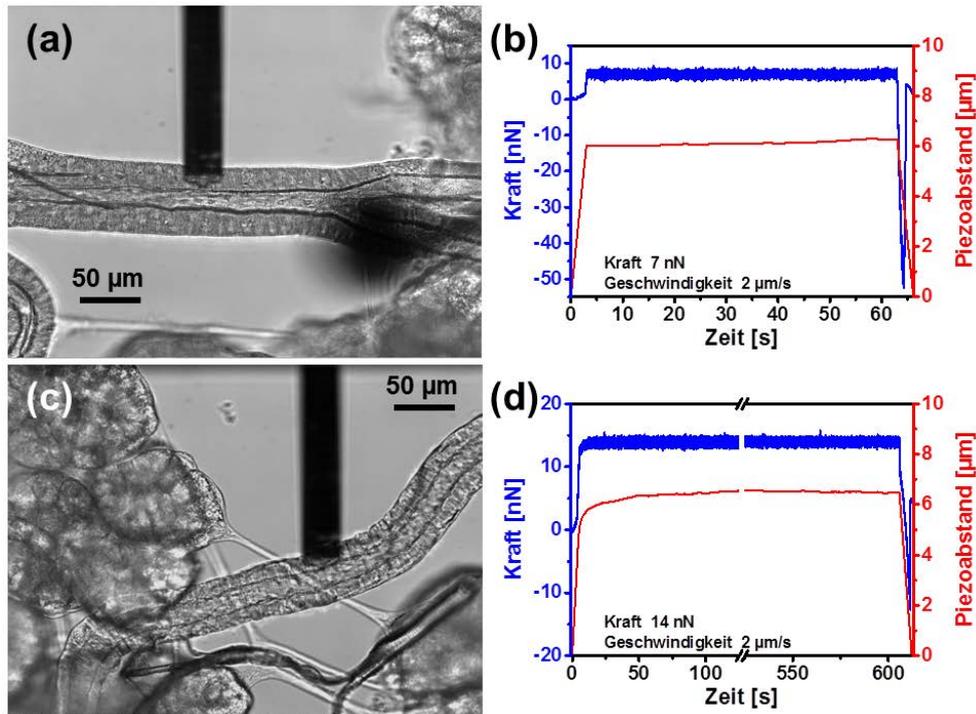


Abbildung 4.21: Untersuchung des Einflusses der Maximalkraft am Drüsengewebe bei einer konstanten Piezogeswindigkeit von $2 \mu\text{m/s}$. (a) Hellfeldbild eines untersuchten Ausführgangs mit der verwendeten Pipette und der dazugehörigen Messposition. (b) Kraft-Zeit-Kurve mit der entsprechenden Piezoposition für die Testmessung am in (a) dargestellten biologischen System mit einer Maximalkraft von 7 nN über eine Zeit von 60 s . Die Kurve ist hierbei sehr konstant. (c) Hellfeldbild eines zweiten Drüsengewebes mit azinösen Strukturen auf der linken Seite und der Messpipette auf dem Ausführgang. (d) Darstellung der Kraft-Zeit-Kurve für eine Langzeitmessung über 600 s und einer Maximalkraft von 14 nN für das in (c) abgebildete Drüsengewebe mit der zeitlichen Änderung der Piezoposition. Die Parameterkombination resultiert in einem stabilen Verlauf über eine lange Zeitspanne.

in **Abb. 4.21 (d)** deutlich zu erkennen, über ein großes Zeitintervall von etwa 10 Minuten erfolgreich gelungen. Hierbei konnte ein konstanter Kraftverlauf mit einem maximalen Höhenunterschied von annähernd $1 \mu\text{m}$ über die gesamte Zeitspanne erreicht werden. Der zunehmende Höhenunterschied im Vergleich zu der Kraft-Zeit-Kurve in **Abb. 4.21 (b)** kann höchstwahrscheinlich damit erklärt werden, dass die höhere Krafteinwirkung eine stärkere Ausweichbewegung des Drüsengewebes zur Folge hat, wodurch das Piezoelement der lokalen Gewebeverschiebung stärker entgegenwirken muss.

Innerhalb dieses Kapitels wurde gezeigt, dass es möglich ist, die AFM-Parameter so zu optimieren, dass ein guter Kontakt zwischen der AFM-Pipette und einer irregulären Biomembran über einen längeren Zeitraum geschaffen werden kann. Dieser permanente Kontakt ist notwendig, um die lokalen Reaktionen in **Kap. 4.4** und **Kap. 4.5** zu ermöglichen, da die freie Substanzdiffusion nach der Abgabe über diesen Kontakt minimiert wird.

4.4 Lokale Farbstoffbeladung

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der Flüssigkeitsabgabe in flüssiger Umgebung und der AFM-Parameteroptimierung für einen idealen Abschluss über eine längere Zeit, sollte im folgenden Kapitel eine realisierbare sowie lokale Abgabe von membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen an Gewebeerflächen überprüft und optimiert werden. Dieser ideale Abschluss zwischen Mikropipette und Gewebeerfläche ist für eine Beladung unmittelbar an der Pipettenöffnung essenziell, da ansonsten die abgegebene Flüssigkeit in alle Richtungen diffundieren und dadurch aus der lokalen Beladung eine globale Beladung werden würde. In diesem Zusammenhang wird der optimale Abschluss bei der lokalen Einzelbeladung nicht nur durch optische Fluoreszenzmessungen, sondern auch durch die simultane Messung von Kraft-Zeit-Kurven in Kombination mit der Piezoabstandkontrolle detektiert.

Die folgenden Experimente werden exemplarisch anhand der membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffe CellTracker Red (CTR) und SYTO 9 Green vorgeführt. Nach der Diffusion in die Zellen werden die Farbstoffe durch Esterasenaktivität oder die direkte Bindung an Nukleinsäuren impermeabel für die Zellmembran und werden in Folge dessen intrazellulär gefangen. CTR ist ein unspezifischer Zellmarker, welcher sich durchgehend im Zytoplasma anreichert [101–103]. Dahingegen kann sich SYTO 9 im Zellplasma anreichern, jedoch interkaliert es noch viel effektiver in der DNS oder der RNS, was zu einer Fluoreszenzverstärkung führt. Im Vergleich zu anderen DNS-Markern, wie Propodiumiodid, kann SYTO 9 in lebenden Zellen angewandt werden [104, 105].

4.4.1 Gewebeladung mit CellTracker Red

In den ersten CTR Experimenten wurden CTR Konzentrationen zwischen 1 μM und 3 μM getestet. Hierbei sollte überprüft werden, ob die Möglichkeit besteht, eine einzelne Zelle in einem komplexen Gewebe mit Hilfe einer Mikropipette lokal zu beladen. Zu Beginn wurde eine Mikropipette, wie zuvor beschrieben, mit 3 μM CTR befüllt und vor der lokalen Beladung gründlich gereinigt. Im Anschluss wurde die Pipette direkt über einen Ausführgang, welcher im Hellfeldbild der **Abb. 4.22 (a)** dargestellt ist, positioniert, die Mikropipette mit einer konstanten Kraft von 14 nN herangefahren und ein Druck von 50 mbar für 10 s angelegt. In **Abb. 4.22 (b)** wurde das korrespondierende Fluoreszenzbild illustriert. Hierbei ist eine hohe Beladung in der Nähe der Pipettenöffnung, welche deutlich über die Größe einer Zelle hinausgeht, und des Weiteren eine zusätzliche Markierung des Gewe-

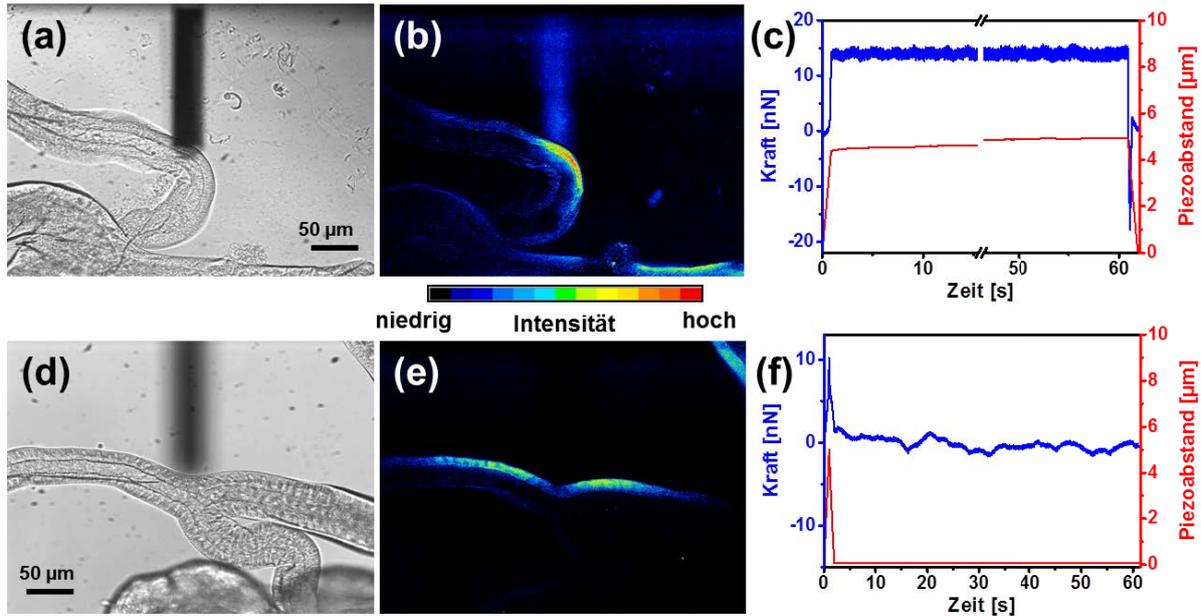


Abbildung 4.22: Lokale Farbstofftestbeladung des Drüsengewebes mit 3 μM CTR für eine einminütige Beladungszeit. (a,d) Hellfeldbilder von Ausführgängen mit der verwendeten Mikropipette. (b,e) Korrespondierende Fluoreszenzbilder von (a) bzw. (d) mit Regenbogenskala. Wärmere Farben entsprechen einer hohen Fluoreszenzintensität. (c,f) Kraft-Zeit-Kontrollkurven für (c) die lokale Beladung des Drüsengewebes in (a) bei einer konstanten Kraft von 14 nN und (f) für die Beladung des Drüsengewebes in (d). Das Kraftmaximum von 14 nN wurde in (f) nicht erreicht, so dass die Kurve sehr verrauscht ist. Der nicht vorhandene Kontakt zwischen der Mikropipette und der Gewebeoberfläche bewirkt eine nicht lokale Beladung, welche zusätzlich in (e) verdeutlicht wird. Die blaue Linie entspricht der Kraft und die rote Kurve der Piezoposition.

bes im unteren rechten Randbereich zu erkennen. Diese unplanmäßige Beladung entstand entweder durch Restfarbstoff an der Pipette, welcher aufgrund zu hoher Farbstoffkonzentration nicht vollkommen entfernt werden konnte und dadurch während des Experimentes zu der anderen Stelle diffundiert ist, oder aufgrund von einem unzureichenden Abschluss zwischen Mikropipette und Membran. Die letzte Vermutung kann jedoch infolge der simultanen Kraft-Zeit-Kurvenmessungen in **Abb. 4.22 (c)** ausgeschlossen werden. Der Verlauf dieser Kurve sieht auf den ersten Blick über den gesamten Zeitbereich konstant aus.

Bei einer zweiten Messung wurde nochmals die zuvor genutzte Mikropipette verwendet und ein weiteres Mal mit einer Kraft von 14 nN an das Drüsengewebe in **Abb. 4.22 (d)** herangefahren. In diesem Fall wurde für 30 s ein Druck von 100 mbar angewandt. Dieses Mal ist in dem korrespondierenden Fluoreszenzbild in **Abb. 4.22 (e)** keine lokale Beladung in der Nähe der Pipettenöffnung zu erkennen, jedoch in einem Bereich um die Pipette herum und in einer weit entfernten Region in der oberen rechten Ecke. Unter Zuhilfenahme der zeitgleich aufgenommenen Kraft-Zeit-Kurve in **Abb. 4.22 (f)** wird

ersichtlich, weshalb es zu keiner lokalen Beladung kommen konnte. Die Mikropipette erreichte innerhalb der 5 μm -Grenze nicht die vorgegebene Kraft von 14 nN, so dass die Pipette in ihren Sicherheitsabstand zurückfuhr und das CTR nach der Flüssigkeitsabgabe frei in der Lösung diffundieren konnte.

Im zweiten Teil der Experimente wurde eine niedrigere Farbstoffkonzentration von 1 μM CTR verwendet, um somit die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Farbstoffbeladung einer Einzelzelle deutlich zu erhöhen. Für eine verständnisvollere Betrachtungsweise wurde im Hellfeldbild der **Abb. 4.23 (a)** ein Bereich rot markiert, welcher einer einzelnen Zelle entspricht. Zur besseren Vergleichbarkeit der lokalen Farbstoffbeladung wurde das lebendige Drüsengewebe in **Abb. 4.23 (b)** von außerhalb mittels badseitiger Inkubation für 10 Minuten mit 1 μM CTR beladen. Aufgrund der badseitigen Anwendung färbte CTR alle Zellen entlang des untersuchten Ausführgangs. Zusätzlich wurden, wie aus der Literatur bekannt ist, nur die peripheren Zellen des dichten azinösen Gewebes beladen. Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass CTR innerhalb der Zelle das gesamte Zytosol homogen einfärbt [101]. Das korrespondierende Fluoreszenzbild des unbeladenen Speicheldrüsengangs aus **Abb. 4.23 (a)** ist in **Abb. 4.23 (c)** dargestellt, welches eine

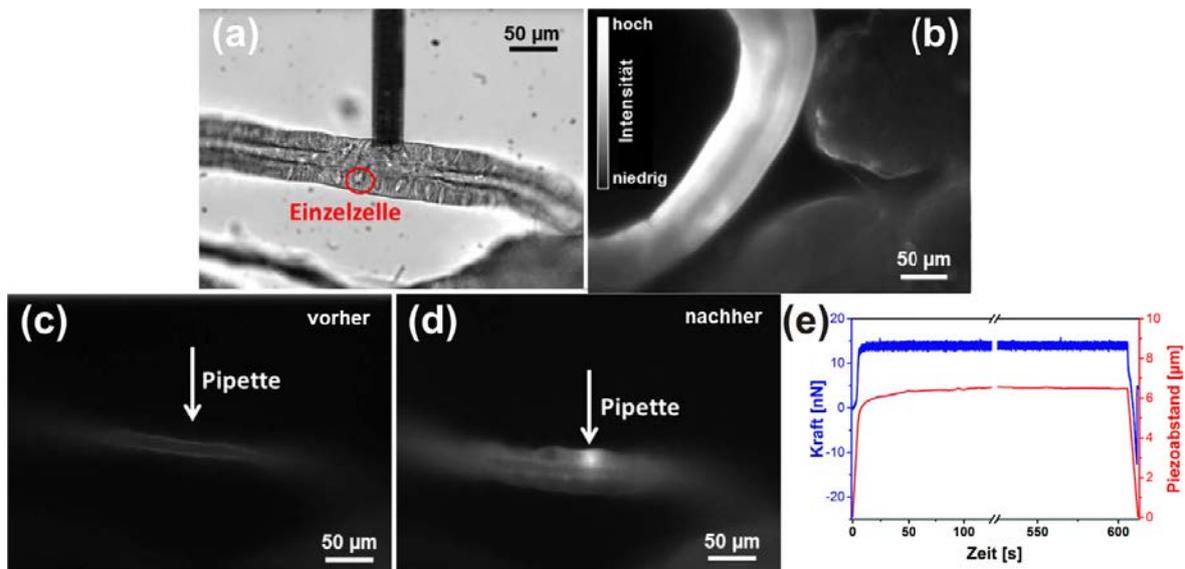


Abbildung 4.23: Lokale Farbstoffbeladung des Drüsengewebes mit CTR. (a) Hellfeldbild eines Ausführgangs der Speicheldrüse mit der verwendeten Mikropipette; Der rote Kreis markiert eine einzelne Zelle. (b) Fluoreszenzbild einer farbstoffbeladenen Speicheldrüsenpräparation über badseitige Inkubation mit 1 μM CTR für 10 Minuten. (c) Autofluoreszenzbild der in (a) gezeigten Speicheldrüse mit Angabe der Mikropipettenladeposition. (d) Fluoreszenzbild des Ausführgangs, welcher in (a) gezeigt wird, nach der 10-minütigen lokalen Farbstoffbeladung mit einer 1 μM CTR gefüllten Mikropipette. (e) Kraft-Zeit-Kurve während des lokalen Beladungsvorgangs mit der Piezoposition; die blaue Linie zeigt die Kraft und die rote Linie die Höhenposition der Mikropipette.

sehr geringe Eigenfluoreszenz unter den gewählten experimentellen Bedingungen aufweist. Die nachfolgende Beladungsposition der Mikropipette wurde mit einem weißen Pfeil markiert. An dieser Position wurde die Mikropipette mit der Drüsengewebeoberfläche mit einer Kraft von 14 nN für 10 Minuten in Kontakt gebracht und das Gewebe wurde mit Hilfe eines kurzen Druckimpulses von 1 s ($1000 \text{ mbar} \cdot \text{s}$) lokal mit $1 \mu\text{M}$ CTR beladen. Die **Abb. 4.23 (d)** zeigt das Fluoreszenzbild einer einzelnen Zelle innerhalb eines Ausführgangs nach der lokalen Farbstoffbeladung, welches eindeutig die lokale Beladung einer Einzelzelle indiziert.

Ein Vorteil dieser Beladungsmethode im Vergleich zur badseitigen Inkubation ist die kontrollierte und sehr präzise Farbstoffabgabe, welche eine geringere Anzahl von Farbstoffmolekülen benötigt. Das hierbei abgegebene Mikropipettenvolumen wurde anhand der in **Kap. 4.2.4** bestimmten Flussrate von $(50 \pm 1) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für diesen $2 \mu\text{m}$ Mikropipettentyp abgeschätzt. Von daher wurde für einen 1 s Druckimpuls von 1000 mbar ein Abgabevolumen von 50 pL angenommen. Unter dieser Annahme und der Verwendung einer Farbstoffkonzentration von $1 \mu\text{M}$ resultierte die Anzahl der abgegebenen Farbstoffmoleküle in etwa $3 \cdot 10^7$ Molekülen. Für die badseitige Inkubation ergab sich dagegen bei einer $1 \mu\text{M}$ Farbstofflösung und einem Badvolumen von 1 mL eine Anzahl von $6 \cdot 10^{14}$ Molekülen für diese Beladungsmethode. Insbesondere bei der Verwendung von Arzneimitteln wird diese Methode sowohl hinsichtlich der Kosten als auch der Gewebebeständigkeit nützlich sein.

Die Überprüfung des direkten Kontaktes zwischen der Mikropipette und der Zelloberfläche wurde ebenfalls über simultane Kraft-Zeit-Kurven in **Abb. 4.23 (e)** kontrolliert. Die blaue Kurve zeigt die angelegte Kraft der Pipette. Hierbei war die Kraft die gesamte Zeit über konstant, da Kraftänderungen, wie zuvor in **Kap. 4.3** beschrieben, über Höhenänderungen korrigiert wurden. Zusätzlich konnte innerhalb der ersten Sekunden die Annäherung der Mikropipette an der Zellmembran beobachtet werden und am Ende konnte eine kurze negative Auslenkung aufgrund einer Wechselwirkung zwischen der Mikropipette und dem Gewebe während des Wegfahrprozesses erkannt werden. Die rote Kurve in **Abb. 4.23 (e)** zeigt die entsprechenden Höhenänderungen während der Messung an. In diesem Fall konnte nur eine geringfügige Höhenänderung beobachtet werden, welche sich höchstwahrscheinlich auf leichte Bewegungen des Gewebes zurückführen lassen. Die Kraft- und Höhenkonstanz ist ein gutes Indiz für einen ausreichenden Abschluss zwischen der Mikropipette und der Zellmembran während des gesamten Experimentes. Andernfalls hätten fluktuierende Piezoabstandswerte zu mehr oder weniger großen Lücken zwischen der Mikropipette und der Zellmembran geführt.

4.4.2 Gewebebeladung mit SYTO 9 Green

Um den Einfluss eines spezifisch akkumulierenden Farbstoffes zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 Green eingesetzt. Zur besseren Nachvollziehbarkeit werden bei den folgenden Experimenten neben den lokalen Beladungen auch die konventionellen Badinkubationen dargestellt, um den Beladungseffekt dieser beiden Methoden besser miteinander vergleichen zu können.

Da sich bei den CTR-Experimenten eine geringe Farbstoffkonzentration für die lokale Beladung als hilfreich erwiesen hatte, wurde zunächst für die SYTO 9 Experimente mit einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ gearbeitet. Die Mikropipette wurde wie gebräuchlich mit SYTO 9 Lösung befüllt und vor der Zellanwendung mit 4% NaOCl-Lösung gereinigt. Anschließend wurde das restliche NaOCl mit Wasser entfernt. In **Abb. 4.24 (a)** ist das Autofluoreszenzbild des Ausführungsgangs vor der lokalen Beladung mit der Beladungsposition der Mikropipette dargestellt. Die Autofluoreszenz in **Abb. 4.24 (a)** ist im Vgl. zur Autofluoreszenz der **Abb. 4.23 (c)** deutlich stärker, da für diese Experimente eine andere Filterkombination verwendet wurde. Diese ist hypsochrom verschoben, so dass die Autofluoreszenz verstärkt wurde. Im Anschluss wurde die Pipette an die Zellmembran herangefahren und das Drüsengewebe über die Mikropipette 10 Minuten lang mit $10\ \mu\text{M}$ SYTO 9 mittels eines Druckintervalls beladen. Das 30 s Zeitintervall bestand während der 10 Minuten-Messung aus 1 s 750 mbar und 29 s 0 mbar. In **Abb. 4.24 (b)** ist das Fluoreszenzbild des Drüsengewebes aus **Abb. 4.24 (a)** nach dem 10-minütigen lokalen Beladungsintervall abgebildet. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass eine intensive lokale Farbstoffbeladung an der Mikropipettenöffnung verifizierbar ist. Des Weiteren ist eine leichte Beladung des umgebenen Gewebes erkennbar, welche höchstwahrscheinlich durch

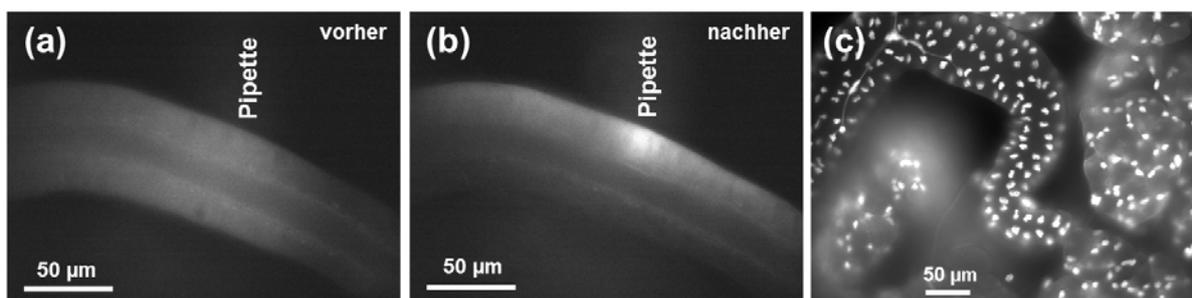


Abbildung 4.24: Vergleich der lokalen Gewebebeladung mit $10\ \mu\text{M}$ SYTO 9 und der badseitigen Beladung mit $5\ \mu\text{M}$ SYTO 9. (a) Autofluoreszenzaufnahme des Drüsengewebes vor der lokalen Beladung mit angezeigter Pipettenposition. (b) Fluoreszenzbild des Drüsengewebes aus (a) nach der 10-minütigen lokalen Beladung mit SYTO 9 unmittelbar in der Nähe der Pipettenöffnung. (c) Fluoreszenzaufnahme der badseitigen Beladung des Drüsengewebes mit $5\ \mu\text{M}$ SYTO 9 für 20 Minuten. Besonders auffällig dabei ist die gute Beladung der einzelnen Zellkerne.

einen nicht vollkommenen Abschluss mit der Zellmembran zu Stande kam oder durch die erhöhte Autofluoreszenz so erscheint. In diesem Beispiel konnte die Beladung einzelner Zellkerne nicht ausfindig gemacht werden, da höchstwahrscheinlich die lokale Farbstoffkonzentration zu gering war. Ausschließlich die RNS im Zytoplasma wurde mit SYTO 9 markiert. Um die lokale Beladung mit der badseitigen Beladung zu vergleichen, wurde das Gewebe nachfolgend für 20 Minuten mit 5 μM SYTO 9-Lösung badseitig inkubiert. Das dazugehörige Fluoreszenzbild wurde in **Abb. 4.24 (c)** dargestellt. In dieser Abbildung wird die spezifische Beladung der Zellkerne klar und deutlich ersichtlich. Im azinösen Gewebe wird eine zusätzliche Zytoplasmabeladung sichtbar, da diese Strukturen dichter gepackt sind und dadurch im Weitfeld intensiver erscheinen. Dieser visuelle Effekt beruht auf der hohen DNS-Affinität des SYTO 9 im Gegensatz zur schwächeren RNS-Affinität, welche die Zellkerne letztendlich intensiver fluoreszieren lässt [105].

Im folgenden Versuch wurde die SYTO 9 Konzentration von 10 μM auf 100 μM erweitert, um die lokale Farbstoffkonzentration zu steigern, so dass die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Färbung einzelner Zellkerne potenziert wird. Die **Abb. 4.25 (a)** zeigt das Fluoreszenzbild von Drüsengewebe, welches für eine Minute mit 100 μM SYTO 9-Lösung badseitig inkubiert wurde. In den Ausführgängen konnte eine signifikante Farbstoffakkumulation innerhalb der Zellkerne neben einer zusätzlichen schwachen Hintergrundfluoreszenz im gesamten Zytosol beobachtet werden. Die Ursache für dieses Verhalten ist, wie im vorherigen Abschnitt bereits angedeutet, die Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes in die Nukleinsäuren (RNS und DNS) zu interkalieren. In diesem Zusammenhang besitzt dieser Farbstoff eine höhere Bindungsaffinität zur DNS, so dass dies zu höheren Fluoreszenzintensitäten in den Zellkernen führt [105]. Das beobachtete helle Fluoreszenzsignal innerhalb des komplexen azinösen Gewebes könnte das Ergebnis unspezifischer Farbstoffakkumulation in der extrazellulären Matrix der Acini sein.

Das Autofluoreszenzbild der untersuchten Gewebepreparation wies in **Abb. 4.25 (b)** zusammen mit der Mikropipettenposition eine niedrigere Hintergrundfluoreszenz auf, da das Autofluoreszenzbild für die bessere Vergleichbarkeit mit **Abb. 4.25 (c)** in seiner Helligkeit modifiziert wurde. In der eingefügten Abb. wurde die 5-fach verstärkte Intensität des ursprünglichen Autofluoreszenzbildes zur besseren Sichtbarkeit abgebildet. Im nächsten Schritt wurde eine kleine Menge der 100 μM SYTO 9-Lösung in die Mikropipette eingesogen und anschließend über einen kurzen Druckimpuls von 2 s abgegeben. In diesem Fall wurde eine kleine Fläche, welche einer einzelnen Zelle entsprach, in **Abb. 4.25 (c)** lokal mit dem Farbstoff beladen. Um den Effekt der lokalen Beladung noch besser zu veranschaulichen, wurden sechs ROI (Bereiche von Interesse) in der Nähe der Beladungsposition in **Abb. 4.25 (d)** ausgewählt und der dazugehörige Fluoreszenzintensitätsverlauf gegen

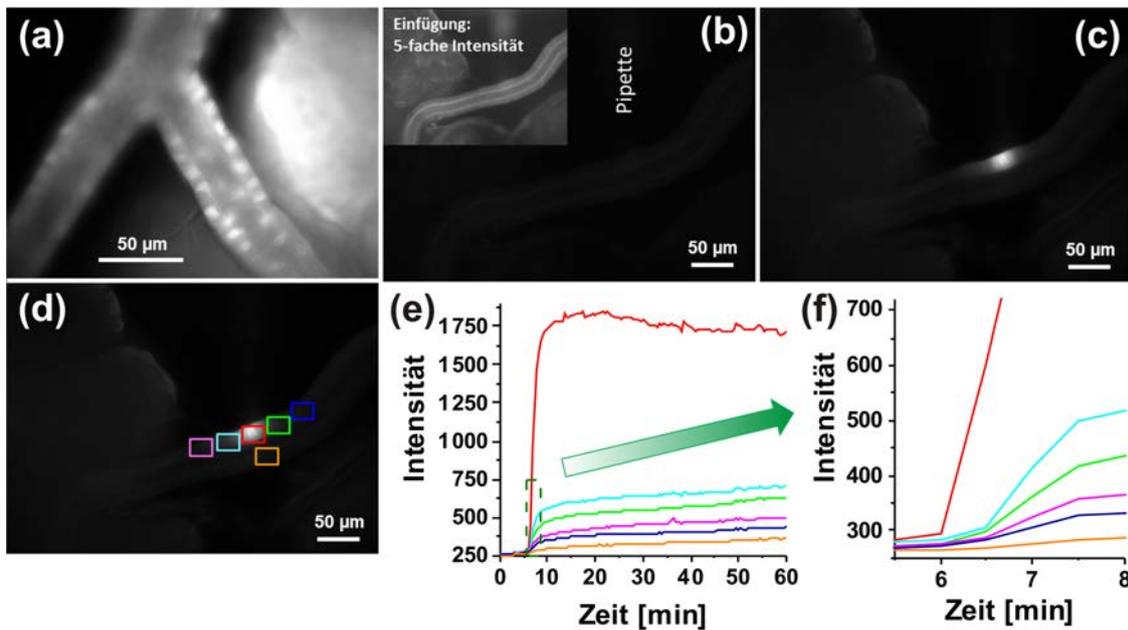


Abbildung 4.25: Vergleich der badseitigen und der lokalen Geweobeladung mit $100\ \mu\text{M}$ SYTO 9. (a) Fluoreszenzbild eines farbstoffbeladenen Drüsengewebes nach der einminütigen badseitigen Inkubation mit $100\ \mu\text{M}$ SYTO 9. (b) Autofluoreszenzbild des untersuchten Drüsengewebes mit Mikropipettenposition; Einfügung: 5-fach erhöhte Fluoreszenzintensität von (b) für die bessere Sichtbarkeit der Autofluoreszenz. (c) Fluoreszenzbild des Bereichs in (b) nach der 10-minütigen lokalen Farbstoffbeladung. (d) Fluoreszenzaufnahme aus (c), welches mit sechs Bereichen von besonderem Interesse markiert wurde. (e) Zeitabhängige Fluoreszenzintensitätsänderungen innerhalb der sechs markierten Regionen in (d). (f) Vergrößerung der gestrichelten grünen Box aus (e). Das Aufnahmeintervall betrug 2 Bilder pro Minute.

die Zeit in **Abb. 4.25 (e)** aufgetragen. In diesem Zusammenhang betrug die Gesamtaufnahmezeit 60 Minuten mit einem Aufnahmeintervall von 30 s, wobei die Zeitspanne des Mikropipettenkontakts nur die ersten 10 Minuten umfasste. Ungefähr ab der 6. Minute begannen die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen ROI in unterschiedlichen Ausmaßen zu steigen. Um die zeitliche Verschiebung der Intensitätsänderungen in den sechs Regionen sichtbar zu machen, wurde der grün gestrichelte Bereich in **Abb. 4.25 (e)** vergrößert. Auf diese Weise konnte die zeitliche Verschiebung der einzelnen Bereiche deutlich sichtbar gemacht werden und es wurde in **Abb. 4.25 (f)** gezeigt, dass die Farbstoffbeladung zunächst in der Zelle stattfindet, die direkt mit der Mikropipettenöffnung in Kontakt war. Der nachfolgende langsamere Intensitätsanstieg in den benachbarten Regionen bzw. Zellen könnte das Ergebnis von unzureichendem Mikropipettenkontakt oder interzellulärer Farbstoffdiffusion sein. Nichtsdestotrotz ist diese Beladungsmethode definitiv zielgerichteter als die großflächige Färbung mittels der badseitigen Beladung und ermöglicht einen methodologischen Zugang zu Einzelzellstudien, selbst in komplexem Gewebe, anstelle von

isolierten Zellkulturen. Aufgrund des allgemeinen AFM-Prinzips können dabei nur Zellen an der Gewebeoberfläche manipuliert werden. Die induzierten physiologischen Reaktionen können jedoch durch die inverse Fluoreszenzmikroskopie in tieferen Zellschichten überwacht werden. Diese Art der Beobachtung hängt primär von der optischen Dichte oder der Autofluoreszenz des Gewebetyps ab. Allerdings erlaubt das weniger gestreute nahinfrarote Anregungslicht, welches in der Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet wird, eine tiefere Gewebebildgebung und Eindringtiefen von bis zu 1 mm [148].

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel erfolgreich gezeigt werden, dass es mit Hilfe eines idealen Pipetten-Zellmembran-Abschlusses und membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen möglich ist, einzelne Zellen in einem komplexen Gewebe mittels einer Mikropipette und kleinstmöglichen Druckimpulsen lokal zu beladen. Das im **Kap. 4.4** gewonnene Wissen spielt eine entscheidende Rolle für die Mikromanipulationsexperimente im folgenden **Kap. 4.5**, da die dort verwendeten Abgabesubstanzen nicht fluoreszent sind und somit die lokale Abgabe optisch nicht nachverfolgt werden kann.

4.5 Lokale Mikromanipulation

Nach dem Nachweis der lokalen Beladungsmethode an komplexen Geweben wurden physiologische Mikromanipulationsexperimente an lebenden Gewebeoberflächen durchgeführt. Dabei wurde das biogene Amin Dopamin (DA) verwendet, da seine physiologische Wirkung für die Speicheldrüsen der Insekten bekannt ist [122, 124, 149]. In Insektengeweben kann der Neurotransmitter DA durch Bindung an den in der basolateralen Membran lokalisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg induzieren. Dabei stimuliert der DA-aktivierte Rezeptor die Phospholipase C-Aktivität, was zur Hydrolyse des membrangebundenem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin führt. Das frei diffundierende IP_3 kann anschließend am endoplasmatischen Retikulum an IP_3 -Rezeptoren binden, was zur Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytoplasma führt. Aufgrund von Kontaktstellen zwischen den Zellen (*gap junctions*, GJ) kann IP_3 oder auch Ca^{2+} in benachbarte Zellen diffundieren, was ebenfalls zu deren Aktivierung führt und schlussendlich als interzelluläre Ca^{2+} -Wellen entlang des Epithels sichtbar gemacht werden kann [150–156]. Das zuvor beschriebene Szenario gilt primär für die azinösen p-Zellen der Speicheldrüse. In den Gangzellen ist der DA-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg eine Folge des starken Na^+ -Reabsorptionsprozesses aus dem luminalen Speichel, welcher zu einer basolateralen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscheraktivität im Ca^{2+} -Aufnahmemodus führt [149]. Die Funktion der resultierenden Ca^{2+} -Erhöhung in

den Gangzellen ist nach wie vor unbekannt. Zur Ca^{2+} -Detektion wurde der Farbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1) verwendet.

Stickstoffmonoxid (NO) ist neben Ca^{2+} ein weiterer wichtiger sekundärer Botenstoff in lebenden Zellen und an vielen physiologischen Prozessen wie Neurotransmission, Immunabwehr und Regulation der kardiovaskulären Homöostase beteiligt. Aus diesem Grund spielt es eine wesentliche Rolle bei der Erforschung von Herzerkrankungen [157–159]. NO ist ein kurzlebiges, freies Radikal [160] und kann aus L-Arginin über das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert werden, von dem drei isomere Formen bekannt sind. Die neuronalen und endothelialen Formen der NOS sind Ca^{2+} -abhängig, die induzierbare NOS jedoch nicht [157, 161]. Einer der nahegelegten NO-Einflüsse ist die Aktivierung von löslichen Guanylylcyclasen, deren Aktivität zu einem cGMP-Anstieg führen und die Proteinkinaseaktivitäten nachgeschaltet beeinflussen [162]. Die stimulusinduzierte NO-Produktion in den Speicheldrüsenzellen wurde in pharmakologischen Studien angedeutet, dennoch sind die Funktionen noch in der Erforschung [161]. Ein Grund hierfür ist das Fehlen adäquater Fluoreszenzfarbstoffe für eine dynamische NO-Detektion. In den nachfolgenden NO-Experimenten wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4-Amino-5-methylamino-2',7'-diaminodifluorofluorescein (DAF-FM)-Diacetat verwendet. Dabei wurde zum ersten Mal eine artifiziell induzierte NO-Freisetzung im komplexen Schaben-Drüsengewebe nachgewiesen.

4.5.1 Interzelluläre Ca^{2+} -Signale im Drüsengewebe

Um den lokalen DA-Effekt an den Gangzellen und die nachfolgenden Signalprozesse genauer zu verstehen, wurden lokale Abgabeexperimente mit DA nahe der Gangzellularmembran begonnen. Dazu wurde das Drüsengewebe mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff OGB-1 vorbeladen, welcher ein etablierter Fluoreszenzfarbstoff für die Ca^{2+} -Bildgebung im nM Ca^{2+} -Konzentrationsbereich ist. Der Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{ex,max}} = 494 \text{ nm}$ und ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em,max}} = 522 \text{ nm}$ [106, 107]. Für die physiologischen Experimente wurde die Mikropipette mit der physiologisch effektivsten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ DA [163] beladen, in Kontakt mit der Zellmembran gebracht. Im Anschluss wurde ein kurzer Druckimpuls von $1125 \text{ mbar}\cdot\text{s}$ angelegt. In diesem Fall wurde eine lokale Reaktion neben der Pipettenöffnung unmittelbar nach der DA-Abgabe erwartet. In **Abb. 4.26** und **Abb. 4.27** sind nachfolgend zwei Beispiele für lokale Freisetzungsreaktionen mit DA dargestellt. Die Bilderfassungsrate betrug dabei 20 Bilder pro Minute. In **Abb. 4.26 (a) - Abb. 4.26 (c)** wurde nur ein transienter intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg nach der lokalen DA-Abgabe in der Gangzelle unmittelbar neben der Pi-

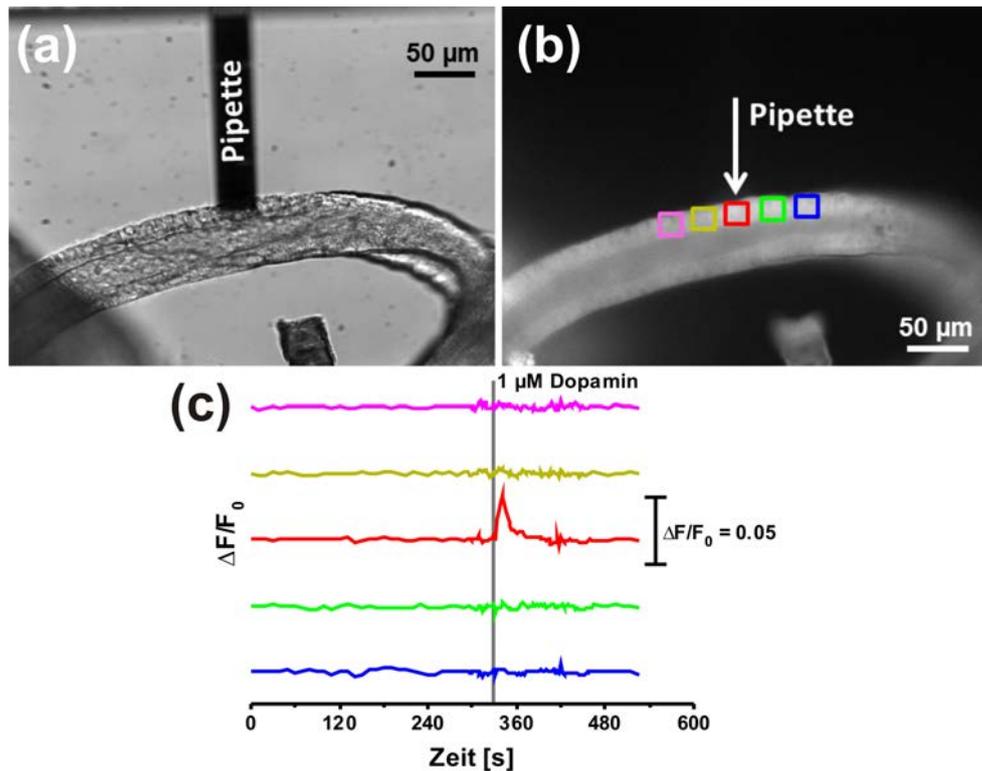


Abbildung 4.26: Lokale Dopamin(DA)-Manipulation von mit OGB-1 vorbeladenem Drüsengewebe. (a) Hellfeldaufnahme eines Ausführgangs und der verwendeten Mikropipette. (b) Fluoreszenzbild eines OGB-1 beladenen Ausführgangs vor der Mikromanipulation mit fünf markierten Bereichen und Pipettenposition. (c) Zeitabhängige Intensitätsänderungen der OGB-1-Fluoreszenz innerhalb der fünf markierten Bereiche aus (b) mit einem einzelnen Anstieg in der roten Region. F = Fluoreszenzintensität, F_0 = Fluoreszenzintensität zu Beginn. Die Daten wurden auf F_0 normiert. Die graue Linie signalisiert den lokalen DA-Abgabezeitpunkt.

pettenöffnung beobachtet. Dieser leichte DA-induzierte Ca^{2+} -Anstieg führte jedoch nicht zur Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in den Nachbarzellen. Der Grund dafür könnte eine zu geringe Ausschüttung von $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ sein, welche ungenügend für die Auslösung einer weiteren Reaktion in der Nachbarzelle war.

Im Gegensatz dazu zeigte die **Abb. 4.27 (a) - Abb. 4.27 (d)** ein positives Beispiel für eine komplexere DA-Antwort. In **Abb. 4.27 (a)** ist das Hellfeldbild des untersuchten Drüsengewebes und in **Abb. 4.27 (b)** das korrespondierende Fluoreszenzbild mit sechs untersuchten und farblich markierten ROI dargestellt. Zunächst konnte in der roten ROI in **Abb. 4.27 (b)** ein transienter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg an der direkten Kontaktstelle zwischen der Mikropipette und dem Ausführgang beobachtet werden. Im Anschluss konnten ebenfalls schwache, zeitverzögerte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale in den benachbarten Regionen erkannt werden. Hierbei wurde in **Abb. 4.27 (c)** mit zunehmender Entfernung von der mit der Mikropipette stimulierten roten ROI ein schwächer werdendes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal beobachtet.

tet. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis für eine Zell-Zell-Kommunikation zwischen den benachbarten Zellen sein. Im Gegensatz zu einem interzellulären Transport könnte auch davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt aufgrund der extrazellulären DA-Diffusion aus der Mikropipettenöffnung entlang des Ganggewebes unter der Annahme eines unzureichenden Abschlusses induziert wurde. Die DA-Diffusionszeit $t_{\Delta x}$ konnte anhand der umgestellten Einstein-Gleichung [48, 49] aus **Kap. 4.2.5** und dem bekannten Diffusionskoeffizienten von DA in Puffer nahe der Zelloberfläche ($D = 8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) [164, 165] nach **Gl. 4.4** prognostiziert werden.

$$t_{\Delta x} = \frac{\Delta x^2}{2D} \quad (4.4)$$

Die DA-Diffusionszeit entlang einer Wegstrecke von $\Delta x = 50 \mu\text{m}$ wurde auf $t_{\Delta x} \sim 16 \text{ s}$

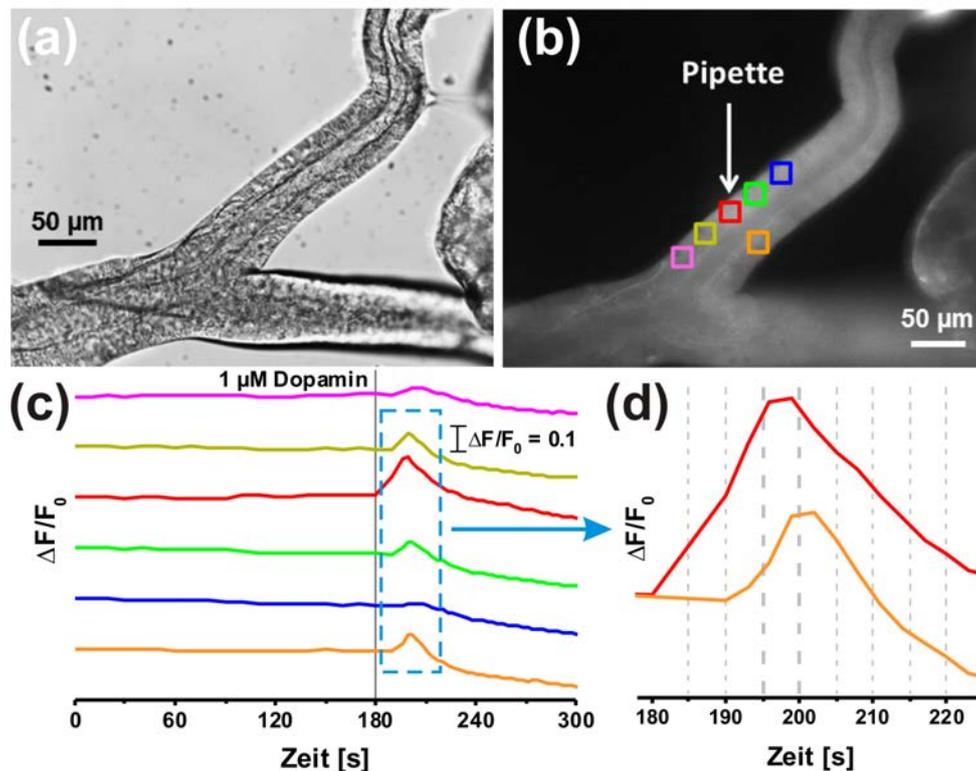


Abbildung 4.27: Lokale Dopamin(DA)-Manipulation und interzelluläre Reaktion von OGB-1 beladenem Drüsengewebe. (a) Hellfeldbild eines Gangdrüsengewebes. (b) Fluoreszenzbild des mit OGB-1 vorbeladenen Drüsengewebes zusammen mit der Mikropipettenposition und sechs markierten Bereichen in der Nähe der Pipettenöffnung. (c) Zeitabhängige OGB-1-Fluoreszenzintensitätsänderungen innerhalb der in (b) markierten Bereiche mit unterschiedlichen Anstiegen. F = Fluoreszenzintensität, F_0 = Fluoreszenzintensität zu Beginn. Alle Daten wurden auf F_0 normiert. Die graue senkrechte Linie signalisiert den lokalen DA-Abgabezeitpunkt. (d) Vergrößerte Ansicht der roten und orangenen Bereiche des in (c) markierten hellblauen Bereiches. In dieser Ansicht ist die zeitliche Verschiebung des Intensitätsmaximums deutlich zu erkennen.

geschätzt und stimmt nicht mit dem detektierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signal aus der orangen Region überein, welches nach etwa 4 s beobachtet wurde, relativ zur ersten Reaktion in der roten Region. Zusätzlich kann es aufgrund der Pufferkapazität von OGB-1 zu einem verzögerten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg innerhalb der Zellen kommen, wodurch die $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion noch schneller ablaufen könnte [166]. Jedoch ist dieser schnellere Anstieg innerhalb der orangen Region höchstwahrscheinlich auf die interzelluläre Ionendiffusion zurückzuführen, da der transzelluläre Na^+ - und Ca^{2+} -Transport ein Teil der Speichelmodifikation in den Speichelgängen ist. Entsprechend der Diffusionskoeffizienten von Ca^{2+} und Na^+ ($D = 5.3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Ca^{2+} [167] und $D = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ für Na^+ [168]) wurde deren intrazelluläre Diffusionszeit bei $\Delta x = 50 \text{ }\mu\text{m}$ auf $t_{\Delta x} \sim 1\text{-}3 \text{ s}$ geschätzt, was gut mit den beobachteten Daten in **Abb. 4.27 (d)** zusammenpasst und die Pufferkapazität von OGB-1 berücksichtigen würde. Unter Zuhilfenahme eines anderen Epithelgewebes und eines anderen Neurotransmitters wurden lokale $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen mittels einer Glaskapillare von Zimmermann et al. durchgeführt. Das dabei verwendete Drüsengewebe der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*, welches mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff fura-2 beladen wurde, zeigte bei der lokalen Serotoninstimulation einen ähnlichen zeitlichen Verlauf und vergleichbare räumliche $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen [169, 170]. Ein entscheidender Vorteil der Fluid-FM-Technik gegenüber der Glaskapillare ist die exakte und sanfte Gewebeoberflächenansteuerung.

4.5.2 NO-Freisetzung im Drüsengewebe

Für die Untersuchung der lokalen NO-Freisetzung im Drüsengewebe wurden die Drüsenzellen mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ DAF-FM beladen, um die NO-Ausbreitung fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen. In Gegenwart eines NO-Radikals reagiert der Farbstoff DAF-FM mit NO^+ anhand von Nitrosierung und Dehydratisierung unter Bildung des stabilen und hochfluoreszierenden Triazolfluoresceins. NO^+ wird aus N_2O_3 durch vorherige Autoxidation von NO gebildet. Schlussendlich ist NO irreversibel an das DAF-FM-Molekül gebunden und aufgrund dessen können keine weiteren Änderungen der NO-Konzentrationen mehr beobachtet werden. DAF-FM absorbiert bei $\lambda_{\text{ex,max}} = 495 \text{ nm}$ und emittiert bei $\lambda_{\text{em,max}} = 515 \text{ nm}$, also im selben Spektralbereich wie OGB-1 [109, 110]. Als NO-Donor wurde Natriumnitroprussid (SNP) verwendet, um damit das Diffusionsverhalten von lokal freigesetztem NO in einem komplexen Gewebe zu untersuchen. Für die physiologischen Experimente wurden SNP-Konzentrationen im μM - bis mM -Bereich herangezogen. Darüber hinaus wird die Effektivität der NO-Freisetzung durch die Verwendung von Licht signifikant erhöht [171–174].

Für die lokalen NO-Experimente wurde die Mikropipette mit 20 mM SNP beladen. Anschließend wurde die Mikropipette direkt an der Zelloberfläche des azinösen Gewebes positioniert, ein kurzer Druckimpuls von 1125 mbar · s abgegeben und das Gewebe simultan mit weißem Licht innerhalb einer Belichtungszeitspanne von 5 s bestrahlt. Als Vergleichsmessung erfolgte die badseitige Anwendung von 5 mM SNP auf das azinöse Drüsengewebe etwa 3 Minuten nach dem Ende des lokalen SNP-Abgabeexperimentes, welches zusätzlich nach 7 Minuten durch einen kurzen Weißlichtimpuls von 5 s aktiviert wurde.

Zwei repräsentative lokale NO-Experimente zusammen mit den entsprechenden Kontrollexperimenten werden in **Abb. 4.28** und **Abb. 4.29** präsentiert. Die Fluoreszenzbilder vom DAF-FM-beladenen azinösen Drüsengewebe mit der Mikropipettenposition vor und nach der lokalen SNP-Abgabe sind in **Abb. 4.28 (a)** und **Abb. 4.28 (b)** dargestellt. Der direkte Vergleich beider Bilder deutet auf eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität unmittelbar neben der Mikropipettenöffnung hin, welcher wiederum auf eine erfolgreiche NO-Erzeugung aus dem lokal abgegebenen NO-Donor SNP hinweist. Da DAF-FM

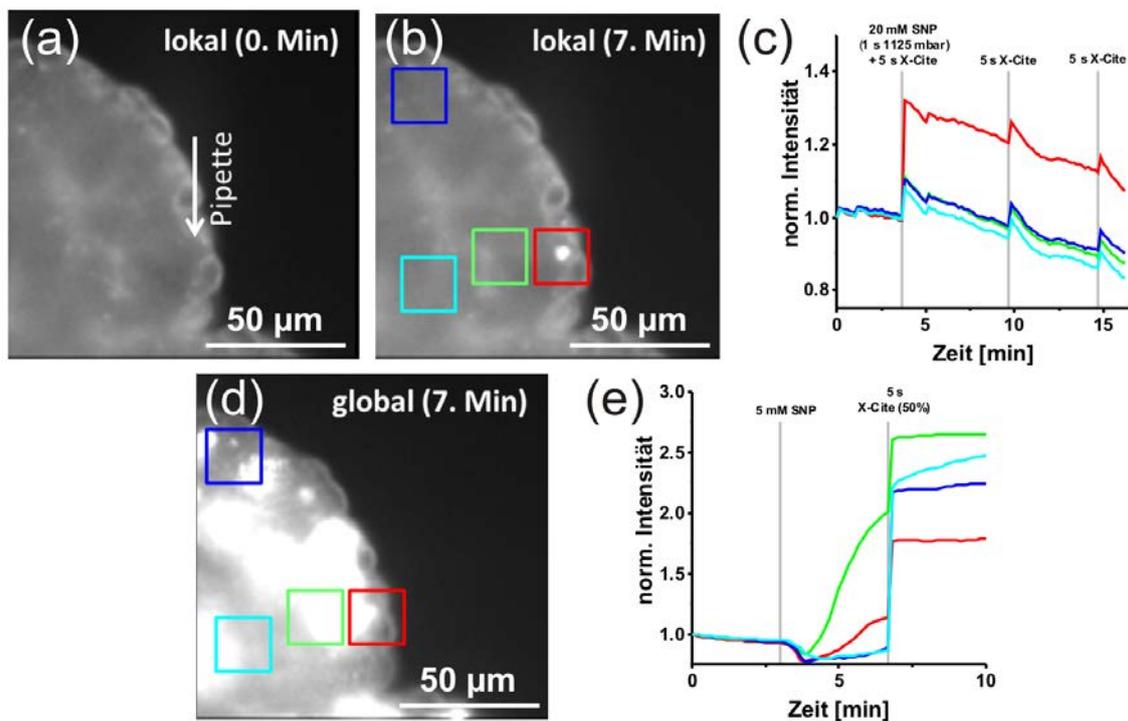


Abbildung 4.28: Lokale SNP-Manipulation von mit DAF-FM vorbeladenem Drüsengewebe. Fluoreszenzbilder von azinösem Drüsengewebe (a) vor und (b) nach der lokalen Abgabe von 20 mM SNP. Der Pfeil markiert die Pipettenposition. (c) Zeitabhängige DAF-FM-Fluoreszenzintensitätsverläufe innerhalb der vier markierten Regionen in (b). (d) Fluoreszenzbild des azinösen Gewebes aus (a) nach der badseitigen Applikation von 5 mM SNP und der Aktivierung mit einem 5 s Weißlichtimpuls (X-Cite). (e) Fluoreszenzintensitätszeitänderungen der vier Bereiche in (d). Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf den F_0 -Wert normiert.

intrazellulär akkumuliert wurde, musste das entstandene NO durch die azinöse Gewebemembran diffundieren. Hierbei wurde der lokale NO-Effekt in **Abb. 4.28 (c)** mittels zeitlicher Intensitätsverläufe für vier verschiedene ROI analysiert. Neben der starken Intensitätszunahme direkt in der Zelle, welche mit der Mikropipette im direkten Kontakt stand, wurden in den anderen Regionen auch geringe Intensitätsanstiege beobachtet. Der in **Abb. 4.28 (c)** dargestellte Effekt ist höchstwahrscheinlich eher eine lichtinduzierte, unspezifische Reaktion vom DAF-FM oder der zellulären Autofluoreszenz als ein Effekt der NO-Diffusion durch benachbarte Zellen.

Ein Hinweis für diese Annahme könnten die exakt gleichen zeitabhängigen Intensitätsänderungen nach der lokalen Abgabe in **Abb. 4.28 (c)** sein, welche ebenfalls nach dem Anlegen eines zweiten und dritten Lichtimpulses ohne lokale SNP-Abgabe beobachtet werden konnten. **Abb. 4.28 (d)** und **Abb. 4.28 (e)** präsentieren die Auswirkungen der badseitigen Zugabe von SNP, welche auf einen intensiveren und großflächigeren Effekt im Vergleich zur lokalen SNP-Abgabe hinweisen. Insbesondere nach der Anwendung eines 5 s Lichtimpulses wurde ein enormer Intensitätsanstieg beobachtet. Demzufolge ist die Applikation eines Lichtimpulses während des Experimentes sehr vorteilhaft für die direkte NO-Erzeugung aus dem NO-Donor SNP. Mittels dieses Experimentes wurde zugleich gezeigt, dass eine ausreichende Akkumulation mit NO-sensitivem Farbstoff in fast allen Zellen des untersuchten azinösen Drüsengewebes in Betracht kam.

In **Abb. 4.29 (a) - Abb. 4.29 (d)** wurde ein zweites Beispiel einer erfolgreichen lokalen SNP-Manipulation dargestellt. Ähnlich wie im ersten Beispiel in **Abb. 4.28 (b)** wurde beim instantanen Vergleich der Fluoreszenzbilder der **Abb. 4.29 (b)** mit der **Abb. 4.29 (c)** ein starker lokaler Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenzintensität in den Zellen direkt neben der Mikropipettenöffnung unmittelbar nach der SNP-Freisetzung beobachtet. Hierbei wurde in der Vergrößerung in **Abb. 4.29 (d)**, neben einer schnellen DAF-FM-Intensitätszunahme innerhalb der ersten Minute nach dem Stimulus, ein langzeitiger Anstieg der Intensität über einige Minuten registriert. Bei der genauen Analyse der verschiedenen ROI aus **Abb. 4.29 (c)** wurde ebenfalls eine zeitliche Verschiebung der Intensitätsänderungen in **Abb. 4.29 (a)** erkannt.

Neben einem unvollständigen Abschluss zwischen der Mikropipette und der Zellmembran könnte die geringe zeitliche Verschiebung des Signals in **Abb. 4.29 (a)** auch ein Hinweis auf eine Zell-Zell-Interaktion bzw. interzelluläre NO-Diffusion sein. Dieser Zusammenhang wird abermals durch die zeitliche Verschiebung des Intensitätsverlaufs der vergrößerten Darstellung in **Abb. 4.29 (d)** verdeutlicht. Die **Abb. 4.29 (e)** und **Abb. 4.29 (f)** demonstrieren den positiven Kontrolleffekt einer badseitigen SNP-Anwendung, welche zu einer ähnlichen Tendenz führt wie sie zuvor schon in **Abb. 4.28 (e)** gezeigt wurde.

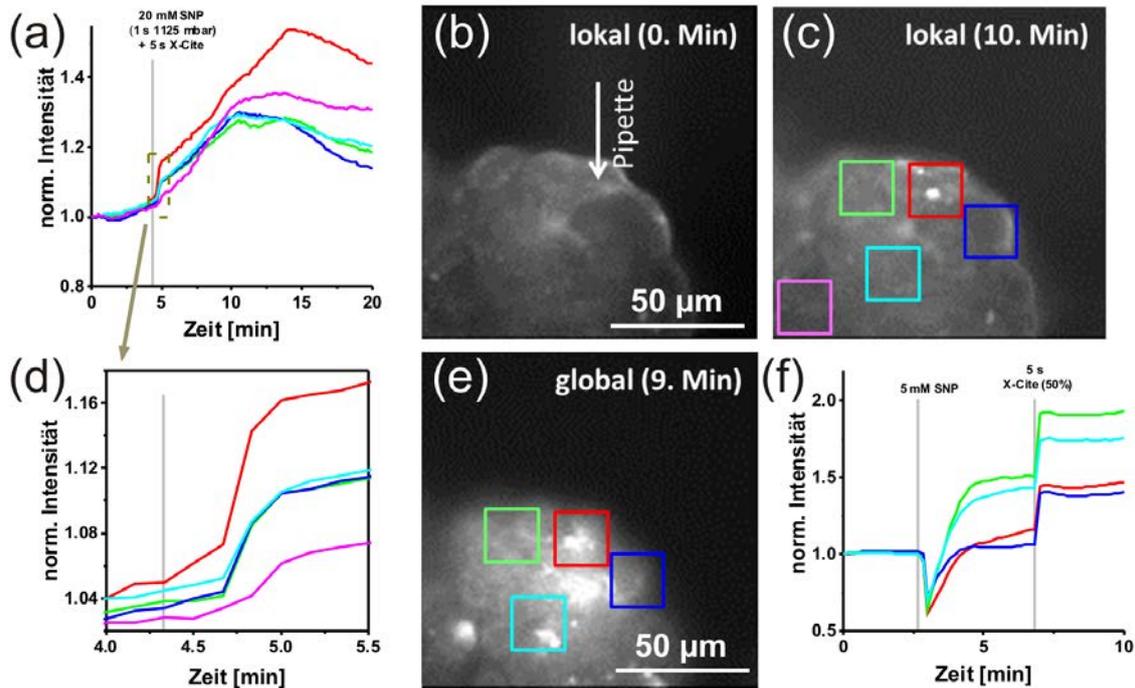


Abbildung 4.29: Zweites lokales SNP-Manipulationsexperiment von mit DAF-FM vorbeladenem Drüsengewebe. (a) Zeitabhängige normierte DAF-FM-Fluoreszenzintensitätstrends innerhalb der fünf markierten Bereiche in (c). Fluoreszenzbilder einer anderen Azinuse-Gewebepräparation (b) vor und (c) nach der lokalen Manipulation mit 20 mM SNP. (d) Vergrößerung des in (a) gestrichelten Rechtecks, welche eine leichte zeitliche Verschiebung der verschiedenen Bereiche aufweist. (e) Korrespondierendes Fluoreszenzbild des azinösen Gewebes in (b) nach der badseitigen Zugabe von 5 mM SNP und einem 5 s Lichtimpuls (X-Cite). (f) Zeitlicher Fluoreszenzintensitätsverlauf der vier markierten Regionen in (e).

Innerhalb dieses Kapitels konnten erfolgreich und reproduzierbar zwei Beispiele für die direkte und nicht-inversive Mikromanipulation von komplexem Drüsengewebe in wässriger Umgebung anhand der lokalen Abgabe von DA- und SNP-Lösungen mittels einer AFM-Mikropipette demonstriert werden. Bei den lokalen NO-Experimenten kam es teilweise zu Intensitätsanstiegen in mehreren ROI, welche aufgrund der zusätzlichen Lichtinduktion entstanden. Diese Extrasignale sind für die lokale NO-Detektion störend, jedoch notwendig, da ansonsten nicht genügend NO gebildet wird. Im Gegensatz zu den Ca^{2+} -Experimenten, wurde bei den NO-Experimenten ausschließlich das azinöse Drüsengewebe untersucht, da ein NO-Anstieg bislang nur bei diesem Gewebetyp beobachtet wurde [161]. Die in diesem Kapitel durchgeführten Vorexperimente bilden die Grundlage für weitere aufschlussreiche physiologische und lokale Experimente, bei denen das Zusammenspiel und die Abhängigkeit von NO und Ca^{2+} innerhalb der Zelle näher untersucht wird. Die Interaktionen zwischen den beiden Botenstoffen Ca^{2+} und NO wurden bereits 2002 von Looms et al. fluoreszenzmikroskopisch an Drüsengewebe erforscht [161, 175].

4.6 Untersuchungen zu Injektionspipetten

Neben der lokalen Mikromanipulation von Zellmembranoberflächen für die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen mit Hilfe der Mikropipette kann die FluidFM-Technologie auch für direkte lokale Injektionsexperimente an biologischen Proben verwendet werden. Hierfür wird eine weitere AFM-Pipette benötigt, welche schon kurz in **Kap. 3.3.1** beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um die Injektionspipette, welche mittlerweile auch konventionell verfügbar ist, jedoch zur Zeit der nachfolgenden Experimente noch nicht verfügbar war. Aus diesem Grund wurden diese speziellen AFM-Pipetten aus konventionellen FIB-bereiten AFM-Pipettenrohlingen über eine Kooperation mit dem HZDR mittels der FIB-Technik hergestellt. Der genaue Verlauf des Herstellungsprozesses wird im folgenden **Kap. 4.6.1** näher beschrieben. Aktuell werden diese Injektionspipetten im Allgemeinen zur direkten Injektion von fluoreszierenden Substanzen innerhalb biologischer Modellsysteme verwendet [11, 14, 18], um die Flüssigkeitsabgabe dieses Pipettentyps zu kalibrieren oder allgemein das anschließende Verhalten der Biosysteme auf die Injektion zu untersuchen. Auf der anderen Seite wird dieser Pipettentyp auch für die Extraktion von Zellbestandteilen aus dem Zytoplasma oder direkt aus dem Zellkern verwendet, um diese einzelnen Komponenten im Anschluss mittels der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) anhand ihrer Massen-zu-Ladungsverhältnisse voneinander zu unterscheiden [66] oder um Zelldynamik und Zell-Zell-Kommunikation unter physiologischen Konditionen auf dem Einzelzellniveau zu untersuchen [15].

Für die während dieser Arbeit durchgeführten Injektionsexperimente wurde nach einer spitzen Injektionspipette mit pyramidaler Spitze, wie sie in **Abb. 4.30 (a)** dargestellt ist, gesucht, welche das biologische Messsystem durch simultane AFM-Messungen möglichst geringfügig penetriert und in der Lage ist, über ein kleines Loch in einer Seitenfläche

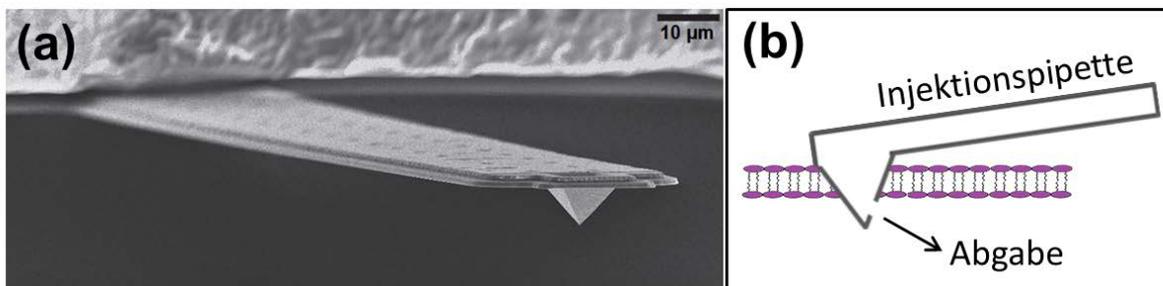


Abbildung 4.30: (a) SEM-Aufnahme einer AFM-Pipette mit pyramidaler Spitze, welche für die Fertigung von Injektionspipetten verwendet wird. Die Abb. wurde aus [22] adaptiert. (b) Schematisches Prinzip der Injektion und Abgabe von Flüssigkeit in einem biologischen System. Die violette Struktur stellt eine Doppellipidschicht dar.

gezielt kleine Volumina direkt ins System abzugeben. In **Abb. 4.30 (b)** ist dieser anvisierte Prozess einmal schematisch dargestellt.

4.6.1 Fertigung der Injektionspipetten

Mit Hilfe der in **Kap. 3.3.1** beschriebenen FIB-Technik und unterschiedlicher Ionen-Arten soll im folgenden Kapitel die Fertigung der Injektionspipetten beschrieben werden. Hierbei ist explizit anzumerken, dass die Fertigung der Injektionspipetten von einem Mitarbeiter des IBC des HZDR durchgeführt wurde. Der Vorteil der FIB-Technologie ist, dass der angewandte fokussierte Ionenstrahl nicht ausschließlich zum Abtragen von Material zur Fertigung von z. B. Löchern genutzt wird, sondern gleichzeitig auch zur bildlichen Darstellung der Probe unmittelbar nach dem FIB-Fräsen verwendet werden kann. Diese Bildgebung funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, wie bei der SEM, nur dass hier Ionen anstatt von Elektronen beschleunigt werden [128, 129]. Für die Fertigung der Injektionspipette wurden drei Ionenquellen getestet: Ga-, He- und Ne-Ionen.

Im ersten Versuch wurden Ga-Ionen verwendet. Hierzu wurde der FIB-bereite AFM-Pipettenrohling zu Beginn mit einer dünnen 7 nm Cr-Schicht bedampft. Anschließend wurde auf der Spitze der Pipettenoberfläche, wie sie in **Abb. 4.31 (a)** dargestellt wurde,

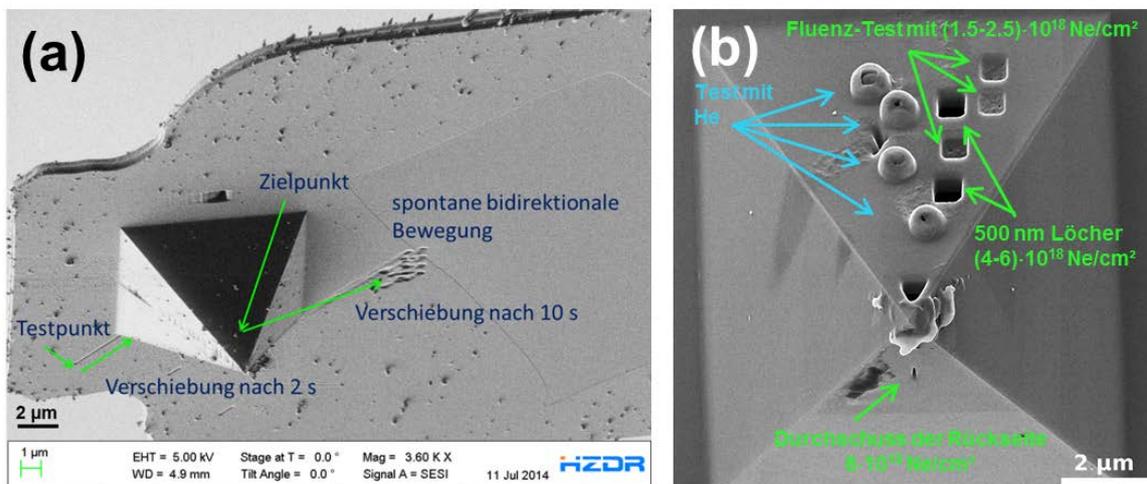


Abbildung 4.31: (a) SEM-Bild einer FIB-betriebsbereiten AFM-Pipette, welche mit 7 nm Cr beschichtet wurde. Sowohl nach dem Bestrahlungsbeginn mit Ga-Ionen am Testpunkt als auch am Zielpunkt ist eine starke Strahlablenkung durch eine Oberflächenaufladung zu erkennen. (b) SEM-Aufnahme der AFM-Pipettenoberfläche, welche mit He- und Ne-Ionen bestrahlt wurde. Die verwendeten Fluenzen sind in (b) beschrieben. Der He-Ionenstrahl verursacht eine Probenoberflächenauflähung. Der Ne-Ionenstrahl bewirkt schlussendlich den gewünschten Probenoberflächeneffekt und resultiert mit der exakten Fluenz in einer Oberflächendurchbohrung. Heliumionenmikroskopiebild von G. Hlawacek, HZDR, Deutschland [176, 177]

ein Testpunkt mit einem Ga-Ionenstrahl vorgenommen. In diesem Fall kam es innerhalb der ersten 2 s zu einer starken Verschiebung des Strahls auf der Oberfläche, welche anhand der grünen Pfeile verdeutlicht wurde. Bei der praktischen Anwendung des Ga-Ionenstrahls auf die eigentliche Zielposition auf einer der pyramidalen Seitenflächen war der Verschiebungseffekt noch extremer, da es in diesem Fall gleichzeitig noch zu einer spontanen bidirektionalen Bewegung des Ionenstrahls kam. Die wahrscheinlichste Ursache für diese große Verschiebung war eine vorherige elektrische Aufladung der Probenoberfläche, welche zu Wechselwirkungen wie z. B. Abstoßung des Ionenstrahls führte.

Aus diesem Grund wurde die Probenoberfläche vor jeder neuen Messung entladen und als Nächstes ein He-Ionenstrahl für das nächste Experiment verwendet. Diese Änderung führte zu einem konstanten Ionenstrahl, welcher nun gezielt auf die Oberfläche fokussiert werden konnte. Nichtsdestotrotz kam es bei der Anwendung des He-Ionenstrahls auf der Probenoberfläche zu einem Aufblähen der äußeren Schicht, was in **Abb. 4.31 (b)** zu erkennen ist.

Aufgrund dessen wurde die Ionenart ein weiteres Mal gewechselt. Für den dritten Versuch wurde ein Ne-Ionenstrahl verwendet. Diese Ionenart führte zur gewünschten und gezielten Abtragung der Si_3N_4 -Oberfläche. Im nächsten Schritt wurde die Fluenz des Ne-Ionenstrahls variiert, um die optimale Energiedichte für die anschließende Bohrung der Abgabeöffnung zu definieren. Mit der Fluenz wird im Allgemeinen die Anzahl der Teilchen pro Fläche gekennzeichnet. Der genaue Einfluss der einzelnen Fluenzen auf die Probeoberfläche ist in **Abb. 4.31 (b)** dargestellt. Hierbei liegt die ideale Fluenz für die verwendeten FIB-bereiten AFM-Pipetten zwischen $4 \cdot 10^{18} \text{ Ne/cm}^2$ und $6 \cdot 10^{18} \text{ Ne/cm}^2$. Höhere Fluenzen führten zu einer weiteren Durchbohrung der Probe.

Nachdem die ideale Ionenart und die dazugehörige Fluenz für das Erstellen eines Abgabelochs auf der pyramidalen Seitenfläche der Injektionspipette gefunden wurde, sollte als Nächstes jeweils ein 500 nm großes Loch in zwei neue FIB-bereite AFM-Pipetten mit einem Ne-Ionenstrahl und einer Fluenz zwischen $4 \cdot 10^{18} \text{ Ne/cm}^2$ und $6 \cdot 10^{18} \text{ Ne/cm}^2$ gebohrt werden, damit diese für die nachfolgenden Injektionsexperimente verwendet werden können. Die Ergebnisse dazu sind in **Abb. 4.32** zusammengefasst. In **Abb. 4.32 (a)** und **Abb. 4.32 (b)** sind erfolgreich zwei pyramidale Seitenflächen zweier Injektionspipetten abgebildet, welche jeweils ein Loch mit einer Größe von etwa 500 nm besitzen. Wird sich jedoch die Draufsicht der ersten Injektionspipette in **Abb. 4.32 (c)** genauer angeschaut, so fallen sofort mehrere Löcher auf der Rückseite der Pipette auf. Die Fluenz des Ne-Ionenstrahls war in diesem Fall höchstwahrscheinlich zu stark gewählt. Im Gegensatz dazu sieht die Durchbohrung der zweiten Injektionspipette vielversprechender aus, da in der Draufsicht in **Abb. 4.32 (d)** nur ein Loch in der pyramidalen Spitze der Pipet-

te zu erkennen ist. Eine Ursache für die vorherige mehrfache Durchbohrung könnte eine variierende Wanddicke zwischen den einzelnen FIB-betriebsbereiten AFM-Pipetten sein, die ungeachtet von der Verwendung gleicher Fluenzen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann (Vgl. **Abb. 4.32 (c)** und **Abb. 4.32 (d)**). Nichtsdestotrotz konnte mit Hilfe dieser Methode erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist, mittels Ne-Ionen-FIB eine Injektionspipette mit einem 500 nm Loch zu fertigen, welche für die Injektionsexperimente in **Kap. 4.6.2** und **Kap. 4.6.3** verwendet werden kann.

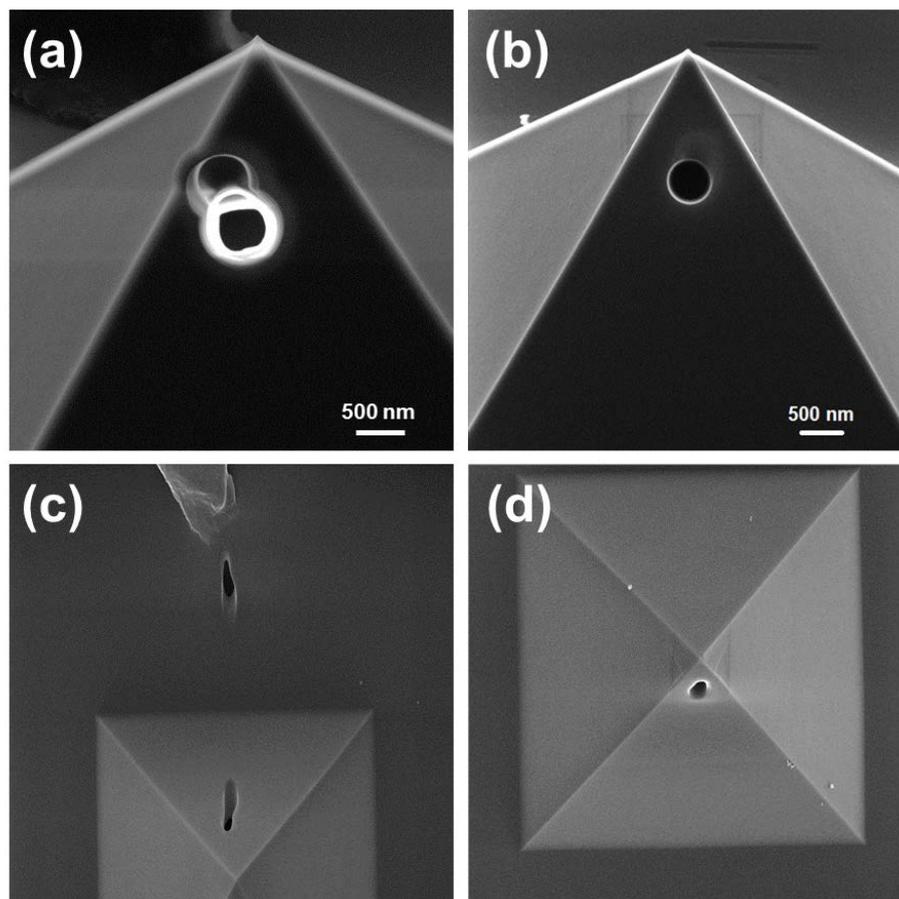


Abbildung 4.32: (a) und (b) SEM-Bilder der Frontansicht zweier Ne-FIB-behandelter AFM-Pipetten, welche Injektionslöcher von etwa 500 nm besitzen. (c) Die Draufsicht der Rückseite der Injektionspipette aus (a). Bei dieser Ansicht ist deutlich zu erkennen, dass die Fluenz des Ne-Ionenstrahls zu hoch gewählt wurde und es dadurch zur mehrfachen Durchbohrung der Pipette kam. (d) Die Draufsicht der Injektionspipette aus (b), bei der eine ideal durchbohrte Öffnung in der pyramidalen Spitze zu erkennen ist. Für die FIB-Experimente wurden Fluenzen von $4 \cdot 10^{18}$ Ne/cm² bis $6 \cdot 10^{18}$ Ne/cm² verwendet. Heliumionenmikroskopieaufnahme von G. Hlawacek, HZDR, Deutschland [176, 177]

4.6.2 Injektionsexperimente an Zelllinien

Für die ersten Injektionsexperimente wurden Zelllinien verwendet, da diese einfach zu handhaben und relativ flach in ihrer Höhe sind. In der Literatur werden hierfür des Öfteren HeLa-Zellen verwendet [14, 15, 18]. Im vorliegenden Anwendungsbeispiel wurden speziell die HEK-Zellen gewählt, da dieser Zelltyp relativ einfach in der benachbarten Arbeitsgruppe von Prof. Hanack kultiviert und zu beschaffen waren. Bei den HEK-Zellen handelt es sich um spindelförmige, adhärenente Zellen, welche im spindelförmigen Zustand eine Dicke von 1-2 μm besitzen. Die HEK-Zellen sind neben den HeLa-Zellen ein weit verbreiteter und vielseitig verwendeter Zelltyp [119–121]. In **Abb. 4.33** wurden beispielhaft drei Hellfeldbilder mit verschiedenen HEK-Zellen präsentiert. Neben den spindelförmigen Zellen gibt es auch viele runde HEK-Zellen, welche sich im Laufe der Zeit von der Glasoberfläche gelöst haben und teilweise im Medium herumschwammen. Für die Injektionsexperimente wurden bevorzugt die spindelförmigen HEK-Zellen verwendet, da diese

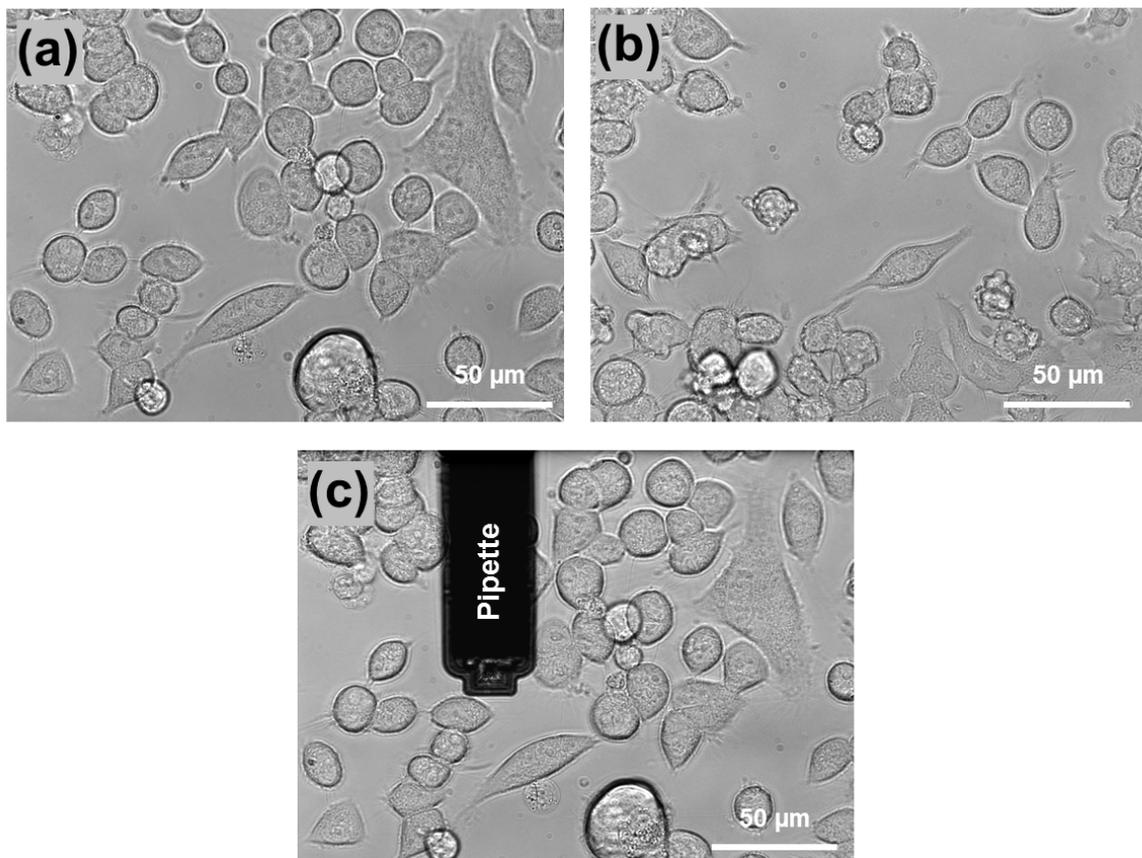


Abbildung 4.33: (a) und (b) Hellfeldbilder der verwendeten HEK-Zelllinie in unterschiedlichen Größen und Formen. Die spindelförmigen Zellen adhäreren am stärksten auf den mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern und eignen sich am besten für die Injektionsexperimente. (c) Hellfeldaufnahme der HEK-Zellen aus (a) mit einer Injektionspipette.

besser an der Oberfläche haften und zugleich aufgrund ihrer geringen Dicke leichter zu penetrieren sind. Für die Erhöhung der Zelladhäsion wurden die Deckgläser zuvor mit Poly-L-Lysin behandelt. Zum besseren Größenvergleich wurde die Injektionspipette in **Abb. 4.33 (c)** neben den HEK-Zellen im Hellfeldbild abbildet.

Für die Durchführung der Injektionsexperimente ist die simultane Aufnahme von Kraft-Zeit-Kurven obligatorisch, damit die nötige Kraft für eine erfolgreiche Injektion nachvollzogen und der Zeitpunkt für die optimale Injektion besser abgeschätzt werden kann. Guillaume-Gentil et al. zeigten 2013 erstmals in ihrer Arbeit, dass es möglich ist, die Injektion in eine HeLa-Zelle anhand des Verlaufs einer Kraft-Zeit-Kurve zu visualisieren [14]. Diese Kraftabsenkung wirkt im ersten Moment zwar marginal, jedoch konnte damit der ideale Zeitpunkt für die Injektion nachgewiesen werden.

Zu Beginn der Injektionsexperimente wurde mit einer unbefüllten Injektionspipette gearbeitet, um zunächst die Kraftabsenkung wie in [14] nachzuvollziehen. Dazu wurde die Injektionspipette über der in **Abb. 4.34 (a)** rot markierte HEK-Zelle positioniert und

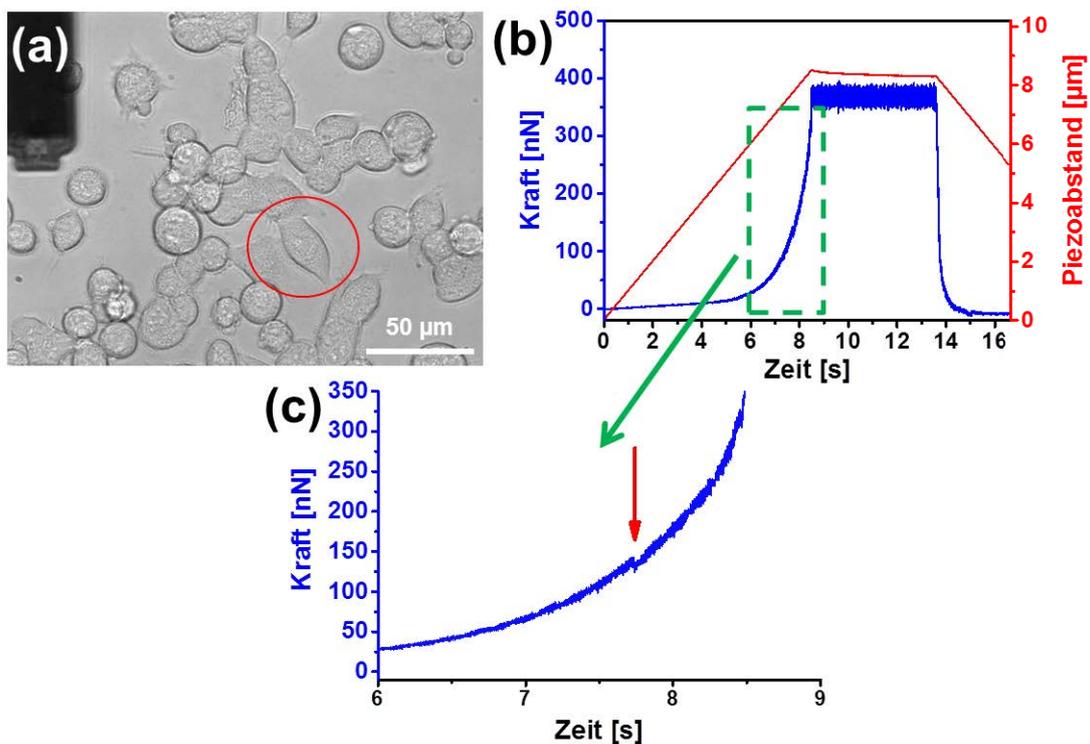


Abbildung 4.34: Darstellung einer HEK-Zelleninjektion mit der dazugehörigen Kraft-Zeit-Kurve. (a) Hellfeldbild der zu untersuchenden HEK-Zellen mit der verwendeten Injektionspipette. Die im Experiment penetrierte Zelle wurde rot markiert. (b) Kraft-Zeit-Kurve des Injektionsexperimentes der Zelle in (a) mit dem dazugehörigen Piezoabstand. (c) Vergrößerung des markierten Bereichs in (b) zur besseren Darstellung der Injektion. Die Penetration der Zellmembran kann über den kleinen Abfall der Kraft, welcher mit einem roten Pfeil markiert wurde, erahnt werden. Diese kleine Absenkung bei einer Injektion wurde ebenfalls in [14] diskutiert.

mit einer vorgegebenen Kraft von etwa 350 nN an die Zelle herangefahren. Der zeitliche Kraftverlauf und der Piezoabstand werden in **Abb. 4.34 (b)** dargestellt und demonstrieren ein konstantes Kraftmaximum mit nahezu unverändertem Piezoabstand. Bei der vergrößerten Darstellung der 6. bis 9. Sekunde in **Abb. 4.34 (c)** wird eine kleine Absenkung von 5-10 nN innerhalb der Kraftkurve bei etwa 150 nN und einer Zeit knapp unter 8 s sichtbar. Diese Kraftabsenkung ähnelt relativ der 5 nN Kraftabsenkung einer Abbildung in [14], bei der mit HeLa-Zellen gearbeitet wurde und zeigt eine erste erfolgreiche Penetration der äußeren Zellmembran der HEK-Zelle innerhalb der durchgeführten Injektionsexperimente. Die angelegte Kraft war im vorliegenden Fall etwas höher, jedoch könnte dies auf einen anderen Zelltypen zurückzuführen sein.

Nach der ersten erfolgreichen Einzelzellinjektion sollte die Injektionspipette als Nächstes vor der Zellpenetration mit einer wässrigen Farbstofflösung gefüllt werden. In diesem Fall wurde ein weiteres Mal der Referenzfarbstoff Rh6G verwendet. Daraufhin wurde die Injektionspipette mit 50 μM Rh6G gefüllt, mit 4% NaOCl und bidest. Wasser gereinigt und anschließend über der Einzelzelle in **Abb. 4.35 (a)** positioniert. Im korrespondierenden Fluoreszenzbild in **Abb. 4.35 (b)** vor der Zellpenetration wurde neben der schwachen Autofluoreszenz in der Mitte des Bildes keine weitere Fluoreszenz detektiert. Erst nach der Zellpenetration und Abgabe des Rh6G mit Hilfe eines kurzen Druckimpulses konnte in **Abb. 4.35 (c)** ein starkes Fluoreszenzsignal innerhalb der HEK-Zelle detektiert werden, was einen Hinweis auf eine erfolgreiche Farbstoffinjektion darstellt. Somit konnte die direkte Farbstoffinjektion in eine Einzelzelle mittels Injektionspipette für einen ähnlichen Zelltyp erfolgreich reproduziert werden. Im folgenden und letzten Kapitel dieser Arbeit soll dieses Wissen über die Injektion von Farbstoff an dem bei der lokalen Mikromanipulation verwendeten komplexem Drüsengewebe angewandt werden.

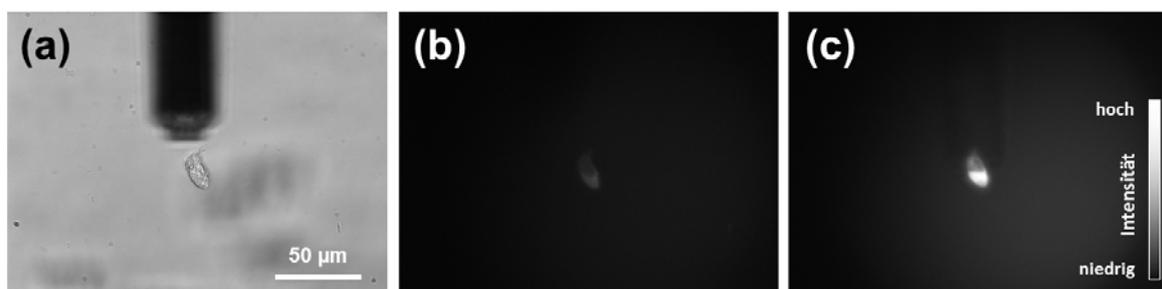


Abbildung 4.35: Injektion und Beladung einer HEK-Zelle mit 50 μM Rh6G. (a) Hellfeldbild einer HEK-Zelle mit einer Rh6G-gefüllten Injektionspipette. Fluoreszenzbilder der in (a) dargestellten HEK-Zelle (b) vor und (c) nach der Injektion der mit Rh6G-gefüllten Injektionspipette. Die hellen Bereiche weisen auf eine hohe Beladung mit Fluoreszenzfarbstoff hin.

4.6.3 Injektionsexperimente an Gewebe

Zum aktuellen Zeitpunkt werden die Injektionsexperimente größtenteils an einfachen isolierten Zellkulturen durchgeführt. Diese Anwendung hat den Vorteil, dass dieses biologische System relativ einfach zu handhaben ist, jedoch können hierbei nur intrazelluläre Reaktionen innerhalb der Zelle nach der lokalen Manipulation untersucht werden. Bei der Untersuchung von interzellulären Wechselwirkungen wie z. B. Zell-Zell-Interaktionen stellt sich dies jedoch als nicht möglich heraus, da die Zellkulturen keine gemeinsamen Verbindungen besitzen und somit nicht direkt interagieren können. Die Verwendung von komplexem Drüsengewebe hat den Vorteil, dass hierbei die Physiologie näher an der Realität untersucht werden kann, da die Zellen über Kontaktstellen miteinander verbunden sind und darüber Informationen austauschen können [24, 25]. Im folgenden Abschnitt wird sich mit der Optimierung einer möglichen Farbstoffinjektion in komplexem Drüsengewebe beschäftigt, welche durch den vielschichtigen Aufbau sehr herausfordernd wird.

Hierfür wurde dieselbe Injektionspipette wie im **Kap. 4.6.2** verwendet. Zunächst wurden in **Abb. 4.36** Testinjektionsexperimente ohne Farbstoff vorgenommen, bei denen, ähnlich

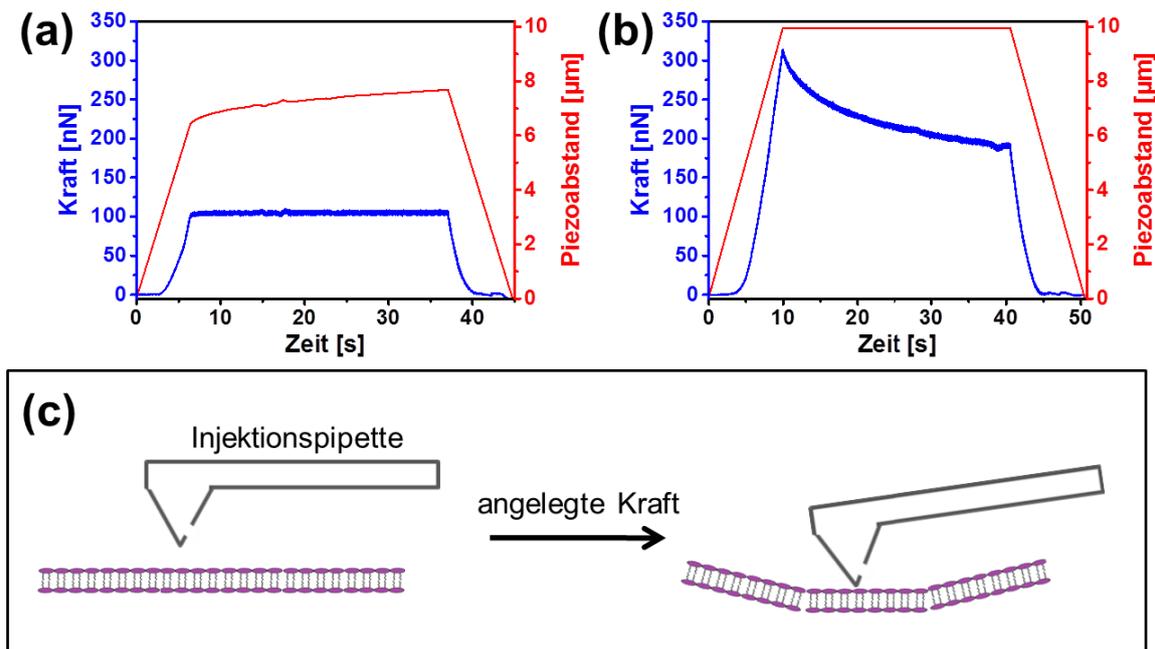


Abbildung 4.36: Testinjektionsexperimente an Drüsengewebe zur Bestimmung der erforderlichen AFM-Parameter. Kraft-Zeit-Kurve für eine 30 s Injektion mit einer konstanten Kraft von (a) 105 nN und (b) 315 nN. Die rote Linie zeigt in beiden Abbildungen den Piezoabstand innerhalb der Messung. In beiden Fällen konnte keine Injektion festgestellt werden. Als eine mögliche Ursache wurde in (c) schematisch eine Zeichnung abgebildet, welche den Ausweichvorgang des Gewebes während der angelegten Kraft verdeutlichen soll.

wie zuvor bei den HEK-Zellen, Kraft-Zeit-Kurven bei unterschiedlich angelegten Kräften aufgenommen wurden. In **Abb. 4.36 (a)** und **Abb. 4.36 (b)** sind die Verläufe für eine vorgegebene Kraft von ca. 100 nN und 300 nN dargestellt. Hierbei kommt es nicht zu einer Absenkung im vorderen Bereich des Kraftverlaufes, wie er zuvor in **Abb. 4.34 (c)** zu sehen war. Somit kam es in beiden Fällen zu keiner Penetration des Gewebes. Eine mögliche Ursache hierfür wurde schematisch in **Abb. 4.36 (c)** dargestellt. Vor allem bei Injektionen in den Ausführgängen kann es bei der Kraftanwendung zum Ausweichen bzw. Zusammendrücken der schlauchförmigen Struktur kommen.

Aus diesem Grund wurde die Verweilzeit der AFM-Pipette bei den nächsten Injektionsexperimenten deutlich erhöht, in der Hoffnung, dass die Spitze nach einer gewissen Zeit in das Gewebe eindringt und diese Penetration in den Kraft-Zeit-Kurven zu erkennen ist. Hierzu wurde in **Abb. 4.37 (a)** und **Abb. 4.37 (b)** für 10 Minuten eine dauerhafte

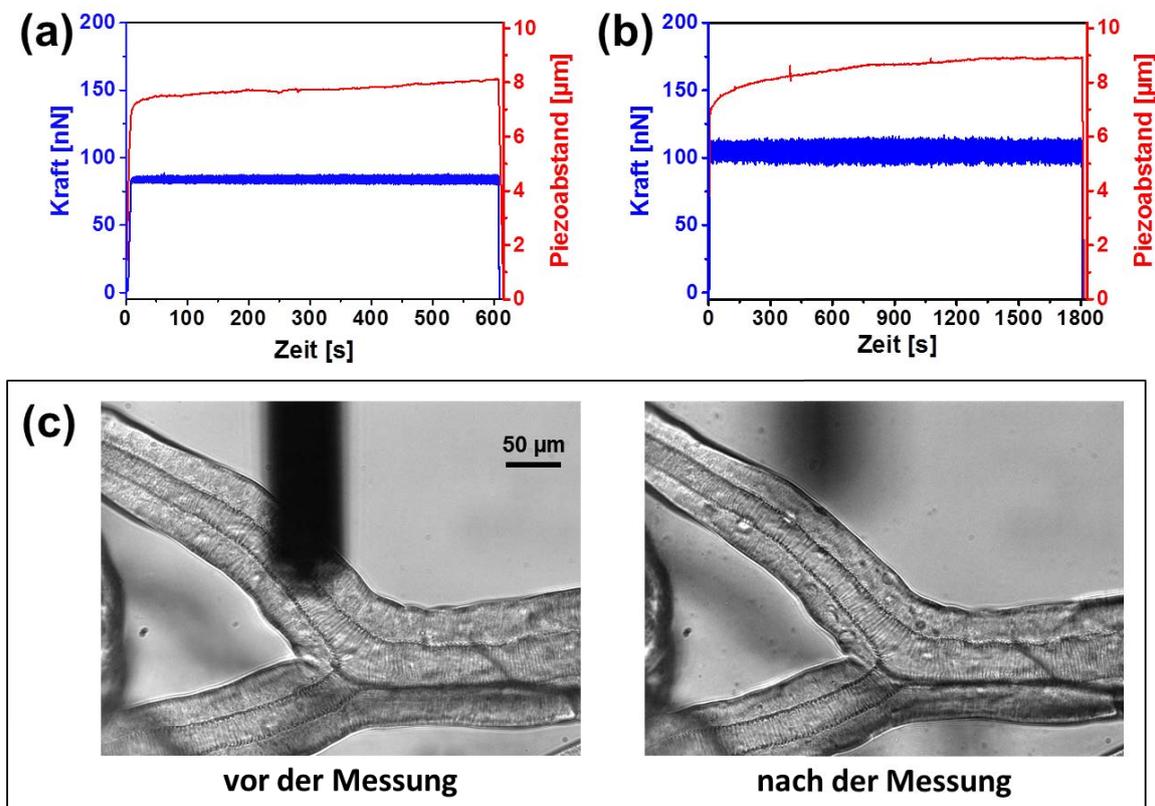


Abbildung 4.37: Drüsengewebeinjektionsexperimente mit längeren Verweilzeiten. (a) Kraft-Zeit-Kurve für eine 600 s Messung mit einer konstanten Kraft von 84 nN. (b) Kraft-Zeit-Kurve für eine 1800 s Langzeitmessung mit einer konstanten Kraft von 105 nN. Der Piezoabstand (rote Linie) bleibt für beide Experimente mit einer maximalen Änderung von etwa 1 μm über die gesamte Messzeit annähernd konstant. (c) Hellfeldbilder vor und nach dem Injektionsexperiment für die Messung aus (b) mit der dazugehörigen Injektionspipette. Auch optisch ist keine strukturelle Änderung des Drüsengewebes durch die Pipette zu erkennen.

Kraft von etwa 84 nN und für 30 Minuten eine Kraft von 105 nN angelegt. Für beide Fälle konnte keine Gewebepenetration innerhalb des Kraftverlaufs detektiert werden. Selbst im Hellfeldbild in **Abb. 4.37 (b)** konnte beim Vergleich des Gewebes vor und nach der Messung keine optische Änderung erkannt werden.

Aus diesem Grund wurde die angelegte Maximalkraft für vier weitere Experimente deutlich erhöht. Dabei betrug die Verweilzeit bei allen Penetrationen 5 Minuten. Ausschließlich die Kraft wurde zwischen 420 nN und 788 nN variiert. Die Verläufe der aufgenommenen Kraft-Zeit-Kurven wurden in **Abb. 4.38 (a) - Abb. 4.38 (d)** zusammengefasst. Alle Kurven zeigen konstante Kraftverläufe ohne signifikante Absenkungen und zugleich große Variationen im Piezoabstand, welcher auf eine Bewegung bzw. ein Ausweichen des Gewebes hinweist. Vor allem in **Abb. 4.38 (d)** wird das Ausweichen sichtbar, da die Kraft nach dem Erreichen des Piezomaximums deutlich abnimmt und der Kontakt zur Injektionspipette verloren geht. Zusätzlich wird bei diesem Experiment das seitliche Ausweichen des Gewebes bei einer Kraft von 788 nN unter dem Mikroskop optisch deutlich sichtbar. Somit konnte keine erfolgreiche Penetration des Drüsengewebes erreicht werden.

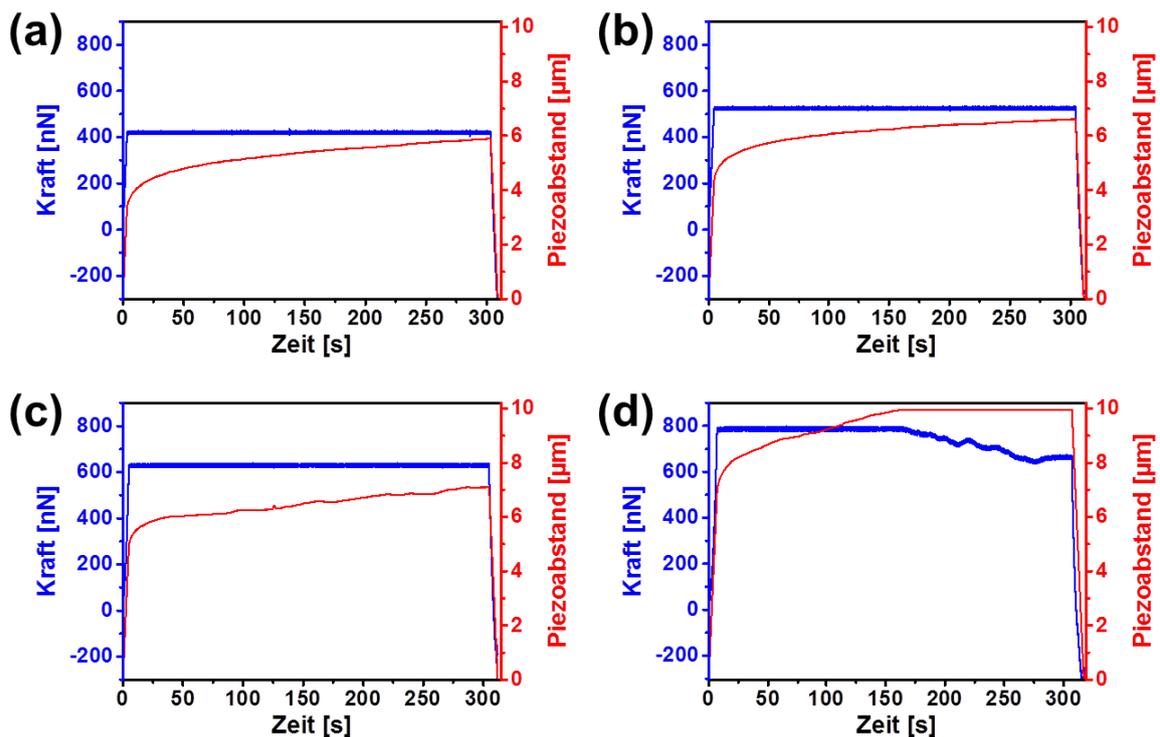


Abbildung 4.38: Gewebeinjektionsexperimente mit höheren Kräften. Vier verschiedene Kraft-Zeit-Kurven mit den dazugehörigen Piezoabständen für 300 s Messungen für die konstanten Kräfte (a) 420 nN, (b) 525 nN, (c) 630 nN und (d) 788 nN. Je höher die angelegte Kraft ist, desto stärker kommt es zum Anstieg in der Piezohöhe. In (d) wurde nach 150 s die Maximalhöhe von 10 µm erreicht, so dass es zu einem Abfall der angelegten Kraft kommt.

5

Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im Laufe dieser Arbeit wurden lokale Reaktionen und Wechselwirkungen in komplexem Drüsengewebe mit Hilfe einer neuartigen lokalen Mikromanipulationsmethode unter Zuhilfenahme der Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie ausgelöst und untersucht, mit denen es realisierbar war, physiologische Prozesse in lebenden Zellen zu analysieren. Zur vollkommenen Aufklärung dieser einzelnen Prozesse sind jedoch noch viele weitere Untersuchungen vonnöten.

Nichtsdestotrotz war es während dieser Arbeit möglich, das hier vorgestellte Mikromanipulationssystem in den inversen fluoreszenzmikroskopischen Aufbau einzukoppeln und im Anschluss vollständig zu charakterisieren. Hierbei wurde während erster Testmessungen an farbstoffbeladenen Mikropartikeln erfolgreich gezeigt, dass die Durchführung kombinierter AFM- und Fluoreszenzmessungen realisierbar ist.

Im nächsten Schritt wurde eine neuartige Beladungs- und Reinigungsprozedur für die verwendeten AFM-Pipetten vorgestellt und diese Methoden am Beispiel des fluoreszierenden Referenzfarbstoffes Rh6G und des deutlich größeren sowie komplexeren AlexaFluor647-gekoppelten IgG Antikörper näher beschrieben. Die dabei durchgeführten Experimente

wurden mehrfach reproduziert und anhand verschiedener Mikropipetten durchgeführt. Unter Zuhilfenahme dieser neu entwickelten Reinigungsmethode war es nun möglich, die AFM-Pipetten mehrfach wiederzuverwenden und somit die Anschaffungskosten neuer AFM-Pipetten deutlich zu reduzieren.

Im folgenden Abschnitt wurde die Flüssigkeitsabgabe an der Luft charakterisiert und deren Grenzen getestet. In diesem Zusammenhang konnte kein linearer Verlauf der Flüssigkeitsabgabe beobachtet werden, welcher höchstwahrscheinlich auf das sich ändernde Volumen-zu-Oberflächen-Verhältnis zurückzuführen ist. Allerdings war es mittels der FluidFM-Technik möglich, gezielt und reproduzierbar gleiche Volumina abzugeben. Diese präzise Volumenabgabe ist vor allem für solche Experimente sehr attraktiv, bei denen teure Substanzen geordnet auf Oberflächen abgegeben werden sollen. Vorstellbar wäre dies bei sehr kleinen Nanometerdruckern, welche mit fL-Volumina arbeiten.

Mit Hilfe des Referenzfarbstoffes Rh6G und einer 2 μm großen Mikropipette wurde die Durchflussrate dieser AFM-Pipette in Wasser bestimmt. Hierbei ergab sich eine linear verlaufende Durchflussrate mit einem Wert von $(50 \pm 1) \text{ fL} \cdot \text{mbar}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, welcher sehr gut mit dem Literaturwert übereinstimmte. Auf dieser Annahme basierend, konnte im Anschluss innerhalb mehrerer Experimente gezeigt werden, dass es unter Verwendung der Einstein-Smoluchowski-Gleichung, der detektierten zeitlichen Ausbreitungsfläche und der Diffusionszeit möglich ist, die Diffusionskoeffizienten von Rh6G in unterschiedlichen Medien annähernd zu bestimmen.

Die Anpassung des Pipetten-Oberflächen-Abschlusses und die Bestimmung der allgemeinen AFM-Parameter war entscheidend für die späteren Mikromanipulationsexperimente. Aus diesem Grund wurden die Parameter für den idealen Abschluss zunächst anhand des biomimetischen Systems der GUV bestimmt. Sich auf die zuvor erlangten Erkenntnisse berufend, wurden die AFM-Parameter und der ideale Abschluss zwischen der Oberfläche und der AFM-Pipette am Beispiel des komplexen biologischen Systems des Drüsengewebes der Schabe *P. Americana* untersucht und optimiert.

Im Anschluss wurde die Flüssigkeitsabgabe an komplexen Drüsengewebeoberflächen in wässriger Umgebung unter Beachtung eines idealen Pipetten-Oberflächen-Abschlusses untersucht, um hierüber lokale Mikromanipulationen zu ermöglichen. In diesem Fall wurden zunächst die Möglichkeiten und die Grenzen einer lokalen Farbstoffbeladung mit Hilfe der membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffe CTR und SYTO 9 getestet. Dabei wurde für beide Farbstoffe eine Einzelzellbeladung im komplexen Drüsengewebe realisiert.

Aufgrund dessen wurden im nächsten Schritt sowohl teilweise physiologische als auch artifizielle Mikromanipulationsexperimente und anschließende interzelluläre Wechselwirkungen mit Hilfe von DA und SNP untersucht. Hierbei wurde im Falle von DA eine kleine

DA-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Zell-Zell-Interaktion über einige Zellen mittels des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes OGB-1 beobachtet, bei welcher, aufgrund der kurzen detektierten Diffusionszeit, von keiner extrazellulären Diffusion des DA-Moleküls ausgegangen werden kann. Für die lokalen NO-Experimente wurde eine reproduzierbare lokale Abgabe von SNP mit anschließender licht-induzierter NO-Freigabe mit Hilfe des NO-sensitiven Farbstoffes DAF-FM observiert.

Im letzten Kapitel wurde die Herstellung und Anwendung der innerhalb der Arbeit produzierten Injektionspipetten beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde bei der Injektionspipettenherstellung der Einfluss der Fluenz und unterschiedlicher Ionen bei der FIB-Technologie gezeigt und diskutiert. Nach der erfolgreichen Fertigung der Injektionspipette, wurde anschließend die Penetration von einzelnen HEK-Zellen und komplexem Drüsengewebe näher untersucht und optimiert. Im Falle der HEK-Zellen konnte eine Penetration der Zellmembran, wie sie in der Literatur bekannt ist, mit anschließender Farbstoffinjektion realisiert werden. Für das komplexere Drüsengewebe war es leider trotz der Optimierung der angelegten Kraft als auch der Verweilzeit nicht möglich, eine Penetration der Zelloberfläche zu beobachten. Dieses System bedarf einer weiteren zukünftigen Optimierung. Hierzu gehören z. B. die bessere Fixierung des Drüsengewebes auf der Oberfläche, die Verwendung dünnerer Drüsengewebeabschnitte oder die Erhöhung des AFM-Annäherungsabstandes.

5.2 Ausblick

Der hier vorgestellte kombinierte AFM- und Fluoreszenzmikroskopieaufbau kann für zukünftige Korrelationsmessungen an komplexem Drüsengewebe verwendet werden, um mit dieser Kombination z. B. topographisch das Anschwellen und die damit verbundene Änderung der Gewebeoberfläche nach einer fluoreszenzmikroskopisch beobachteten intrazellulären Mikromanipulation zu detektieren. Hierüber könnten Analytkonzentrationsänderungen während eines Stimulus-induzierten Anschwellprozesses, welcher höchstwahrscheinlich durch reaktionsbedingte Wassereinlagerungen im Gewebe verursacht wird [178], besser untersucht und anschließend aufgeklärt werden.

Die gezielte Abgabe von Flüssigkeiten innerhalb kleiner definierter Flächen oder in Form von Mustern könnte für eine weiterführende Herstellung von Einzelmolekül-Plattformen für die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie von großem Interesse sein. Des Weiteren besteht mit dieser Methode die Möglichkeit, die Konzentration von z. B. Nanopartikeln zu bestimmen. Hierzu werden mehrere definierte Flüssigkeitstropfen der stark verdünnten

Substanz auf einer Probeoberfläche abgegeben, diese anschließend eingetrocknet und die Anzahl der Nanopartikel mittels AFM oder SEM bestimmt. Anhand des abgegebenen Volumens und der detektierten Molekülanzahl kann schlussendlich die Konzentration bestimmt werden.

Ausgehend von den hier vorgestellten Ergebnissen können die transepithelialen Prozesse im Drüsengewebe noch genauer untersucht werden. Zum Beispiel könnte diese Methode verwendet werden, um den Stimulus-induzierten Na^+ -Transport nach der lokalen Mikropipetten-gesteuerten Abgabe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin zu untersuchen. Ionomycin löst einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg aus, welcher zu einem zeitversetzten Na^+ -Anstieg in den Speicheldrüsenzellen führt [125]. Diese Anwendung wäre eine Fortsetzung einer früheren Untersuchung zum Na^+ -Transport in lebendem Drüsengewebe mit dem Na^+ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Asante NaTRIUM Green-2 (ANG-2) auf Einzelzellniveau [179]. Alternativ könnte diese Methode auch dazu verwendet werden, um das Diffusionsverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen zu untersuchen, da nun mit Hilfe der FluidFM-Methode die ROI gezielt gewählt und die Anzahl der abgegebenen Farbstoffmoleküle gesteuert werden kann. In Kombination mit Einzelmoleküldetektionsverfahren wie der FCS kann das Diffusionsverhalten mit hoher räumlicher Auflösung gezielt untersucht werden. Solche Studien könnten zur Analyse der subzellulären Organisation in lebenden Zellen beitragen [180].

Des Weiteren sollten die Injektionsexperimente an komplexem Drüsengewebe vorangebracht werden, da diese für weitere Zell-Zell-Kommunikationen oder interzelluläre Signalkaskaden unabdingbar sind. Hierbei sollte zunächst die Fixierung des Drüsengewebes optimiert werden, da ansonsten die Penetration der Zelloberfläche nicht möglich ist. Gelingt die direkte Injektion von Substanzen in diesen Gewebetypen, so ist es möglich, Ca^{2+} -Signalkaskaden nach der lokalen IP_3 -Injektion zu beobachten und zu charakterisieren [150, 153, 154].

Die FluidFM-Technologie ist eine relativ neue Methode und bedarf deshalb noch einiger Optimierungen und weiterer Studien, um sich als etablierte Methode durchsetzen zu können. Der Vorteil dieser Technik ist die präzise und lokale Abgabe kleinster fL-Volumina für zahlreiche Anwendungen. Jedoch ist diese Methode teuer, unhandlich und besitzt ein erhöhtes AFM-Pipettenverstopfungsrisiko. Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob diese Probleme eine Weiterentwicklung des FluidFM-Systems rechtfertigen oder ob die einzelnen Bedingungen für die jeweilige Anwendung an das vorherrschende System angepasst werden müssen.

Literatur

- [1] G. S. Hotamisligil, „Inflammation and metabolic disorders“, *Nature*, Bd. 444, S. 860–7, 2006.
- [2] S. Jamwal und S. Sharma, „Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders“, *Inflammation Research*, Bd. 67, S. 391–405, 2018.
- [3] J. J. Heindel et al. „Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders“, *Reproductive Toxicology*, Bd. 68, S. 3–33, 2017.
- [4] S. Craft, „The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia“, *Neurological Review*, Bd. 66, Nr. 3, S. 300–305, 2009.
- [5] J. W. Lichtman und J.-A. Conchello, „Fluorescence microscopy.“, *Nature methods*, Bd. 2, Nr. 12, S. 910–9, 2005.
- [6] C. A. Combs, „Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods“, *Current Protocols in Neuroscience*, Bd. 79, S. 1–25, 2010.
- [7] J. Dunlop et al. „High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology“, *Nature Reviews Drug Discovery*, Bd. 7, Nr. April, S. 358–368, 2008.
- [8] M. Knoblauch et al. „A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes“, *Nature biotechnology*, Bd. 17, Nr. September, S. 906–9, 1999.
- [9] G. C. R. Ellis-Davies, „Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology“, *Nature Methods*, Bd. 4, Nr. 8, S. 619–628, 2007.
- [10] H. M. Lee, D. R. Larson und D. S. Lawrence, „Illuminating the chemistry of life: Design, synthesis, and applications of caged and related photoresponsive compounds“, *ACS Chemical Biology*, Bd. 4, Nr. 6, S. 409–427, 2009.
- [11] A. Meister et al. „FluidFM: Combining Atomic Force Microscopy and Nanofluidics in a Universal Liquid Delivery System for Single Cell Applications and Beyond“, *Nano Letters*, Bd. 9, Nr. 6, S. 2501–7, 2009.

- [12] E. Potthoff et al. „Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy“, *Nanoscale*, Bd. 7, S. 4070–4079, 2015.
- [13] L. Jaatinen et al. „Quantifying the effect of electric current on cell adhesion studied by single-cell force spectroscopy“, *Biointerphases*, Bd. 11, Nr. 1, S. 11 004, 2016.
- [14] O. Guillaume-Gentil et al. „Force-controlled fluidic injection into single cell nuclei“, *Small*, Bd. 9, S. 1904–1907, 2013.
- [15] O. Guillaume-Gentil et al. „Tunable Single-Cell Extraction for Molecular Analyses“, *Cell*, Bd. 166, Nr. 2, S. 506–516, 2016.
- [16] L. Hirt et al. „Local surface modification via confined electrochemical deposition with FluidFM“, *RSC Advances*, Bd. 5, Nr. 103, S. 84 517–84 522, 2015.
- [17] L. Hirt et al. „Template-Free 3D Microprinting of Metals Using a Force-Controlled Nanopipette for Layer-by-Layer Electrodeposition“, *Advanced Materials*, Bd. 28, Nr. 12, S. 2311–2315, 2016.
- [18] O. Guillaume-Gentil, T. Zambelli und J. A. Vorholt, „Isolation of single mammalian cells from adherent cultures by fluidic force microscopy“, *Lab on a chip*, Bd. 14, S. 402–14, 2014.
- [19] R. R. Grüter, J. Vörös und T. Zambelli, „FluidFM as a lithography tool in liquid: spatially controlled deposition of fluorescent nanoparticles“, *Nanoscale*, Bd. 5, S. 1097–104, 2013.
- [20] S. Lee, W. Jeong und D. J. Beebe, „Microfluidic valve with cored glass microneedle for microinjection“, *Lab on a chip*, Bd. 3, S. 164–167, 2003.
- [21] B. G. Chung, F. Lin und N. L. Jeon, „A microfluidic multi-injector for gradient generation“, *Lab on a chip*, Bd. 6, S. 764–768, 2006.
- [22] O. Guillaume-Gentil et al. „Force-controlled manipulation of single cells: From AFM to FluidFM“, *Trends in Biotechnology*, Bd. 32, S. 381–388, 2014.
- [23] M. J. Aegersold et al. „Local Chemical Stimulation of Neurons with the Fluidic Force Microscope (FluidFM)“, *ChemPhysChem*, Bd. 19, S. 1234–1244, 2018.
- [24] F. Pampaloni, E. G. Reynaud und E. H. K. Stelzer, „The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Bd. 8, Nr. 10, S. 839–845, 2007.
- [25] V. van Duinen et al. „Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models“, *Current Opinion in Biotechnology*, Bd. 35, S. 118–126, 2015.

-
- [26] F. Just und B. Walz, „Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: new data from light and electron microscopy“, *Journal of Morphology*, Bd. 220, Nr. 1, S. 35–46, 1994.
- [27] B. Walz et al. „The Aminergic Control of Cockroach Salivary Glands“, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Bd. 62, S. 141–152, 2006.
- [28] F. Just und B. Walz, „The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands“, *The Journal of Experimental Biology*, Bd. 199, Nr. 2, S. 407–13, 1996.
- [29] H. Miller et al. „Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications“, *Reports on Progress in Physics*, Bd. 81, Nr. 2, S. 024 601, 2018.
- [30] O. Peric et al. „Microfluidic bacterial traps for simultaneous fluorescence and atomic force microscopy“, *Nano Research*, Bd. 10, Nr. 11, S. 3896–3908, 2017.
- [31] G. Binnig, C. F. Quate und C. Gerber, „Atomic Force Microscope“, *Physical Review Letters*, Bd. 56, Nr. 9, S. 930–933, 1986.
- [32] G. Kaupp, *Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching - Application to Rough and Natural Surfaces*, 1. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [33] B. Jena und H. J. Hörber, *Atomic Force Microscopy in Cell Biology, Volume 68*, 1. Auflage. Academic Press, 2002.
- [34] L. Zhou et al. „Progress in the Correlative Atomic Force Microscopy and Optical Microscopy“, *Sensors*, Bd. 17, S. 938, 2017.
- [35] G. Meyer und N. M. Amer, „Novel optical approach to atomic force microscopy Novel optical approach to atomic force microscopy“, *Applied Physics Letters*, Bd. 53, Nr. 12, S. 1045–7, 1988.
- [36] D. J. Müller und Y. F. Dufrêne, „Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface“, *Trends in Cell Biology*, Bd. 21, Nr. 8, S. 461–469, 2011.
- [37] O. D. Payton, L Picco und T. B. Scott, „High-speed atomic force microscopy for materials science“, *International Materials Reviews*, Bd. 61, Nr. 8, S. 473–494, 2016.
- [38] C. B. Müller et al. „Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy“, *Europhysics Letters*, Bd. 83, S. 46 001, 2008.

- [39] K. C. Neuman und A. Nagy, „Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy“, *Nature Methods*, Bd. 5, Nr. 6, S. 491–505, 2008.
- [40] A. Meister et al. „Nanodispenser for attoliter volume deposition using atomic force microscopy probes modified by focused-ion-beam milling“, *Applied Physics Letters*, Bd. 85, S. 6260–2, 2004.
- [41] A. Fang, E. Dujardin und T. Ondarçuhu, „Control of droplet size in liquid nanodispersing“, *Nano Letters*, Bd. 6, S. 2368–2374, 2006.
- [42] A. Meister et al. „Hollow Atomic Force Microscopy Probes for Nanoscale Dispensing of Liquids“, *Nano Science and Technology Institute Nanotech*, Bd. 3, S. 273–6, 2008.
- [43] L. Fabié et al. „Direct patterning of nanoparticles and biomolecules by liquid nanodispersing“, *Nanoscale*, Bd. 7, S. 4497–4504, 2015.
- [44] P. Stiefel, T. Zambelli und J. A. Vorholt, „Isolation of optically targeted single bacteria by application of fluidic force microscopy to aerobic anoxygenic phototrophs from the phyllosphere“, *Applied and Environmental Microbiology*, Bd. 79, S. 4895–4905, 2013.
- [45] P. W. Atkins und J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2006.
- [46] T. Young, „An Essay on the Cohesion of Fluids“, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, Bd. 95, S. 65–87, 1805.
- [47] N. Sperelakis, *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics*, 4th. London: Academic Press, 2011.
- [48] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Auflage. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [49] M. A. Islam, „Einstein-Smoluchowski Diffusion Equation: A Discussion“, *Physica Scripta*, Bd. 70, S. 120–125, 2004.
- [50] E. Haustein und P. Schwille, „Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique“, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, Bd. 36, S. 151–69, 2007.
- [51] S. P. Sutera und R. Skalak, „The history of Poiseuille’s law“, *Annual Review of Fluid Mechanics*, Bd. 25, S. 1–19, 1993.

-
- [52] J. Cai et al. „Generalized Modeling of Spontaneous Imbibition Based on Hagen-Poiseuille Flow in Tortuous Capillaries with Variably Shaped Apertures“, *Langmuir*, Bd. 30, S. 5142–5151, 2014.
- [53] C. Loudon und K. McCulloh, „Application of the Hagen-Poiseuille Equation to Fluid Feeding Through Short Tubes“, *Annals of the Entomological Society of America*, Bd. 92, Nr. 1, S. 153–158, 1999.
- [54] A. Meister et al. „Nanoscale dispensing in liquid environment of streptavidin on a biotin-functionalized surface using hollow atomic force microscopy probes“, *Microelectronic Engineering*, Bd. 86, S. 1481–1484, 2009.
- [55] J. Geerlings et al. „Electric field controlled nanoscale contactless deposition using a nanofluidic scanning probe“, *Applied Physics Letters*, Bd. 107, S. 123 109, 2015.
- [56] R. R. Grüter et al. „Patterning gold nanoparticles in liquid environment with high ionic strength for local fabrication of up to 100 μm long metallic interconnections“, *Nanotechnology*, Bd. 26, Nr. 17, S. 175 301, 2015.
- [57] H. Dermutz et al. „Local polymer replacement for neuron patterning and in situ neurite guidance“, *Langmuir*, Bd. 30, S. 7037–7046, 2014.
- [58] P. Dörig et al. „Force-controlled spatial manipulation of viable mammalian cells and micro-organisms by means of FluidFM technology“, *Applied Physics Letters*, Bd. 97, S. 2–4, 2010.
- [59] N. Helfricht et al. „Colloidal Properties of Recombinant Spider Silk Protein Particles“, *Journal of Physical Chemistry C*, Bd. 120, Nr. 32, S. 18 015–18 027, 2016.
- [60] N. Helfricht et al. „Probing the adhesion properties of alginate hydrogels: a new approach towards the preparation of soft colloidal probes for direct force measurements“, *Soft Matter*, Bd. 13, S. 578–589, 2016.
- [61] P. Dörig et al. „Exchangeable colloidal AFM probes for the quantification of irreversible and long-term interactions“, *Biophysical Journal*, Bd. 105, S. 463–72, 2013.
- [62] A. Sancho et al. „A new strategy to measure intercellular adhesion forces in mature cell-cell contacts“, *Scientific Reports*, Bd. 7, S. 46 152, 2017.
- [63] E. Potthoff et al. „Rapid and Serial Quantification of Adhesion Forces of Yeast and Mammalian Cells“, *PLoS ONE*, Bd. 7, Nr. 12, e52712, 2012.
- [64] E. Potthoff, D. Franco und V. D’Alessandro, „Toward a rational design of surface textures promoting endothelialization“, *Nano Letters*, Bd. 14, S. 1069–79, 2014.

- [65] J. S. Mcgrath et al. „Deformability Assessment of Waterborne Protozoa Using a Microfluidic-Enabled Force Microscopy Probe“, *PLoS ONE*, Bd. 11, Nr. 3, e0150438, 2016.
- [66] O. Guillaume-Gentil et al. „Single-Cell Mass Spectrometry of Metabolites Extracted from Live Cells by Fluidic Force Microscopy“, *Analytical Chemistry*, Bd. 89, Nr. 9, S. 5017–5023, 2017.
- [67] B. Valeur und M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and applications*, 2. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2012.
- [68] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 5. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2004.
- [69] P. P. Mondal und A. Diaspro, *Fundamentals of Fluorescence Microscopy*, 1. Aufl. Springer Netherlands, 2014.
- [70] J. W. Lichtman und J.-A. Conchello, „Fluorescence microscopy“, *Nature Methods*, Bd. 2, Nr. 12, S. 910–919, 2005.
- [71] U. Kubitscheck, *Fluorescence Microscopy*, 1. Aufl. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2013.
- [72] S. Schulze, „Untersuchungen zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie (dSTORM) bei Verwendung einer neuartigen sCMOS-Kamera“, Masterarbeit, Universität Potsdam, 2013.
- [73] R. Y. Tsien, „The Green Fluorescent Protein“, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 67, S. 509–44, 1998.
- [74] K. Suhling, D. M. Davis und D. Phillips, „The Influence of Solvent Viscosity on the Fluorescence Decay and Time-Resolved Anisotropy of Green Fluorescent Protein“, *Journal of Fluorescence*, Bd. 12, Nr. 1, S. 91–95, 2002.
- [75] A. Panday et al. „NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies“, *Cellular and Molecular Immunology*, Bd. 12, Nr. 1, S. 5–23, 2015.
- [76] K. Rietdorf, „Wirkungen biogener Amine auf die Erregungs-Sekretions-Kopplung in der Speicheldrüse von *Periplaneta americana* (L.)“, Dissertation, Universität Potsdam, 2003.
- [77] A. A. Heikal, „Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies“, *Biomarkers in Medicine*, Bd. 4, Nr. 2, S. 241–263, 2011.

-
- [78] J. Jonkman und C. M. Brown, „Any Way You Slice It - A Comparison of Confocal Microscopy Techniques“, *Journal of Biomolecular Techniques*, Bd. 26, S. 54–65, 2015.
- [79] S. W. Hell, „Toward fluorescence nanoscopy“, *Nature Biotechnology*, Bd. 21, Nr. 11, S. 1347–1355, 2003.
- [80] W. E. Moerner und D. P. Fromm, „Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy“, *Review of Scientific Instruments*, Bd. 74, Nr. 8, S. 3597–3619, 2003.
- [81] S. W. Hell, „Far-Field Optical Nanoscopy“, *Science*, Bd. 2, Nr. May, S. 1153–1159, 2007.
- [82] S. Shashkova und M. C. Leake, „Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems“, *Bioscience Reports*, Bd. 37, S. 1–19, 2017.
- [83] L. Möckl, D. C. Lamb und C. Bräuchle, „Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in“, *Angewandte Chemie International Edition*, Bd. 53, S. 13 972–13 977, 2014.
- [84] P. Bondia, S. Casado und C. Flors, „Correlative Super-Resolution Fluorescence Imaging and Atomic Force Microscopy for the Characterization of Biological Samples“, in *Super-Resolution Microscopy: Methods and Protocols*, 1. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, 2017, S. 105–113.
- [85] N. Gavara, „A beginner’s guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics“, *Microscopy Research and Technique*, Bd. 80, S. 75–84, 2017.
- [86] E. Spedden et al. „Elasticity Maps of Living Neurons Measured by Combined Fluorescence and Atomic Force Microscopy“, *Biophysical Journal*, Bd. 103, S. 868–877, 2012.
- [87] P. D. Odermatt et al. „High-Resolution Correlative Microscopy: Bridging the Gap between Single Molecule Localization Microscopy and Atomic Force Microscopy“, *Nano Letters*, Bd. 15, S. 4896–4904, 2015.
- [88] C. Callies et al. „Simultaneous mechanical stiffness and electrical potential measurements of living vascular endothelial cells using combined atomic force and epifluorescence microscopy“, *Nanotechnology*, Bd. 20, Nr. 17, S. 175 104–12, 2009.
- [89] D. J. Müller und Y. F. Dufrière, „Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology“, *Nature Nanotechnology*, Bd. 3, S. 261–269, 2008.

- [90] M. Cascione et al. „Atomic Force Microscopy Combined with Optical Microscopy for Cells Investigation“, *Microscopy Research and Technique*, Bd. 80, S. 109–123, 2017.
- [91] J. V. Chacko, F. C. Zanicchi und A. Diaspro, „Probing Cytoskeletal Structures by Coupling Optical Superresolution and AFM Techniques for a Correlative Approach“, *Cytoskeleton*, Bd. 70, S. 729–740, 2013.
- [92] J. V. Chacko et al. „Cellular level nanomanipulation using atomic force microscope aided with superresolution imaging microscope aided with superresolution imaging“, *Journal of Biomedical Optics*, Bd. 19, Nr. 10, S. 105 003, 2017.
- [93] S. Sharma et al. „Correlative nanoscale imaging of actin filaments and their complexes“, *Nanoscale*, Bd. 5, S. 5692–5702, 2013.
- [94] M. S. Thomasson und M. A. Macnaughtan, „Microscopy basics and the study of actin-actin-binding protein interactions“, *Analytical Biochemistry*, Bd. 443, Nr. 2, S. 156–165, 2013.
- [95] G. T. Charras und M. A. Horton, „Single Cell Mechanotransduction and Its Modulation Analyzed by Atomic Force Microscope Indentation“, *Biophysical Journal*, Bd. 82, Nr. 6, S. 2970–2981, 2002.
- [96] B. Valeur und I. Leray, „Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition“, *Coordination Chemistry Reviews*, Bd. 205, Nr. 1, S. 3–40, 2000. Adresse: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854500002460>.
- [97] M. Beija, C. A. M. Afonso und J. M. G. Martinho, „Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes“, *Chemical Society Reviews*, Bd. 38, S. 2410–2433, 2009.
- [98] R. F. Kubin und A. N. Fletcher, „Fluorescence Quantum Yields of some Rhodamine“, *Journal of Luminescence*, Bd. 27, S. 455–462, 1982.
- [99] F. M. Zehentbauer et al. „Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Bd. 121, S. 147–151, 2014.
- [100] S. Terdale und A. Tantray, „Spectroscopic study of the dimerization of rhodamine 6G in water and different organic solvents“, *Journal of Molecular Liquids*, Bd. 225, S. 662–671, 2017.
- [101] J. M. Gonzalez Jr, S. Hamm-Alvarez und J. C. H. Tan, „Analyzing Live Cellularity in the Human Trabecular Meshwork“, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Bd. 54, Nr. 2, S. 1039–1047, 2013.

- [102] K. L. Corbin et al. „A novel fluorescence imaging approach for comparative measurements of pancreatic islet function in vitro“, *Islets*, Bd. 3, Nr. 1, S. 14–20, 2011.
- [103] R. K. Iyer, J. Chui und M. Radisic, „Spatiotemporal tracking of cells in tissue-engineered cardiac organoids“, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Bd. 3, Nr. February, S. 196–207, 2009.
- [104] P. Stiefel et al. „Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide“, *BMC Microbiology*, Bd. 15, Nr. 36, S. 1–9, 2015.
- [105] P. Lebaron et al. „Comparison of Blue Nucleic Acid Dyes for Flow Cytometric Enumeration of Bacteria in Aquatic Systems“, *Applied and Environmental Microbiology*, Bd. 64, Nr. 5, S. 1725–1730, 1998.
- [106] K. Sagolla, H.-G. Löhmannsröben und C. Hille, „Time-resolved fluorescence microscopy for quantitative Ca²⁺ imaging in living cells“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Bd. 405, S. 8525–8537, 2013.
- [107] C. D. Wilms, H. Schmidt und J. Eilers, „Quantitative two-photon Ca²⁺ imaging via fluorescence lifetime analysis“, *Cell calcium*, Bd. 40, Nr. 1, S. 73–79, 2006.
- [108] G Grynkiewicz, M Poenie und R. Y. Tsien, „A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties“, *The Journal of biological chemistry*, Bd. 260, Nr. 6, S. 3440–50, 1985.
- [109] H. Kojima et al. „Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production“, *Angewandte Chemie International Edition*, Bd. 38, Nr. 21, S. 3209–3212, 1999.
- [110] C.-J. Ku et al. „Fluorescence Determination of Nitric Oxide Production in Stimulated and Activated Platelets“, *Analytical Chemistry*, Bd. 79, Nr. 6, S. 4888–4893, 2007.
- [111] I. Czolkos, A. Jesorka und O. Orwar, „Molecular phospholipid films on solid supports“, *Soft Matter*, Bd. 7, S. 4562–4576, 2011.
- [112] B Maherani et al. „Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies“, *Current Nanoscience*, Bd. 7, S. 436–452, 2011.
- [113] R. Dimova et al. „A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy“, *Journal of Physics: Condensed Matter*, Bd. 18, S. 1151–1176, 2006.
- [114] S. Morandat et al. „Atomic force microscopy of model lipid membranes“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Bd. 405, S. 1445–1461, 2013.

- [115] D. Brüggemann, J. P. Frohnmayer und J. P. Spatz, „Model systems for studying cell adhesion and biomimetic actin networks“, *Journal of nanotechnology*, Bd. 5, S. 1193–1202, 2014.
- [116] D. Van Swaay, „Microfluidic methods for forming liposomes“, *Lab on chip*, Bd. 13, S. 752–767, 2013.
- [117] S. M. A. Haghparast, T. Kihara und J. Miyake, „Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states“, *PeerJ*, Bd. 3, e1131, 2015.
- [118] R. Edmondson et al. „Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors“, *Assay and Drug Development Technologies*, Bd. 12, Nr. 4, S. 207–218, 2014.
- [119] J. Dumont et al. „Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives“, *Critical Reviews in Biotechnology*, Bd. 36, Nr. 6, S. 1110–1122, 2016.
- [120] G. B. Gonzales et al. „Review on the Use of Cell Cultures to Study Metabolism, Transport, and Accumulation of Flavonoids: From Mono-Cultures to Co-Culture Systems“, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Bd. 14, S. 741–754, 2015.
- [121] P. Thomas und T. G. Smart, „HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins“, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Bd. 51, S. 187–200, 2005.
- [122] I. Lang und B. Walz, „Dopamine-induced epithelial K⁺ and Na⁺ movements in the salivary ducts of *Periplaneta americana*“, *Journal of Insect Physiology*, Bd. 47, S. 465–74, 2001.
- [123] C. Hille, „Charakterisierung von Transportmechanismen in der Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana*“, Dissertation, Universität Potsdam, 2006.
- [124] I. Lang und B. Walz, „Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*“, *Journal of experimental biology*, Bd. 202, S. 729–738, 1999.
- [125] M. Lahn, C. Dosche und C. Hille, „Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging reveal stimulus-induced intracellular Na⁺ and Cl⁻ changes in cockroach salivary acinar cells“, *American journal of physiology.*, Bd. 300, Nr. 6, S. C1323–36, 2011.
- [126] F. S. Jamaludin, M. F. M. Sabri und M. S. Said, „Controlling parameters of focused ion beam (FIB) on high aspect ratio micro holes milling“, *Microsystem Technologies*, Bd. 19, S. 1873–1888, 2013.

- [127] L. Bischoff et al. „Liquid metal alloy ion sources - An alternative for focussed ion beam technology“, *Applied Physics Reviews*, Bd. 3, S. 021 101, 2016.
- [128] A. A. Tseng, „Recent Developments in Nanofabrication Using Focused Ion Beams“, *Small*, Bd. 1, Nr. 10, S. 924–939, 2005.
- [129] J. J. McClelland et al. „Bright focused ion beam sources based on laser-cooled atoms“, *Applied Physics Reviews*, Bd. 3, S. 011 302, 2016.
- [130] L Bischoff, „Application of mass-separated focused ion beams in nano-technology“, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, Bd. 266, S. 1846–1851, 2008.
- [131] P. Roder und C. Hille, „A Multifunctional Frontloading Approach for Repeated Recycling of a Pressure-Controlled AFM Micropipette“, *PLoS ONE*, Bd. 10, Nr. 12, e0144157, 2015.
- [132] J. Arcamone et al. „Evaporation of femtoliter sessile droplets monitored with nanomechanical mass sensors“, *Journal of Physical Chemistry B*, Bd. 111, S. 13 020–13 027, 2007.
- [133] E. To et al. „Excess chemical potentials, excess partial molar enthalpies, entropies, volumes, and isobaric thermal expansivities of aqueous glycerol at 25°C“, *Journal of Solution Chemistry*, Bd. 28, Nr. 10, S. 1137–57, 1999.
- [134] K. Takamura, H. Fischer und N. R. Morrow, „Physical properties of aqueous glycerol solutions“, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, Bd. 98-99, S. 50–60, 2012.
- [135] J. Segur und H. E. Oberstar, „Viscosity of glycerol and its aqueous solutions“, *Industrial & Engineering Chemistry*, Bd. 43, Nr. 9, S. 2117–20, 1951.
- [136] J. Burzlaff, „Herstellung von großen, einschichtigen Lipidvesikeln (GUVs) mittels spontanen Quellens und ihre lichtmikroskopische Charakterisierung“, Bachelorarbeit, Universität Potsdam, 2012.
- [137] C. Hille und B. Walz, „Characterisation of neurotransmitter-induced electrolyte transport in cockroach salivary glands by intracellular Ca²⁺, Na⁺ and pH measurements in duct cells“, *The Journal of experimental biology*, Bd. 211, S. 568–76, 2008.
- [138] J. Prinz et al. „DNA Origami Substrates for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering“, *Journal of Physical Chemistry Letters*, Bd. 4, S. 4140–5, 2013.
- [139] L. Olejko und P. J. Cywinski, „Ionenselektive Guanin-Quadruplex-Faltung auf DNA-Origami-Strukturen“, *Angewandte Chemie*, Bd. 127, S. 683–687, 2015.

- [140] J Prinz et al. „DNA origami based Au-Ag-core-shell nanoparticle dimers with single-molecule SERS sensitivity“, *Nanoscale*, Bd. 8, S. 5612–5620, 2016.
- [141] P. W. K. Rothemund, „Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns“, *Nature*, Bd. 440, S. 297–302, 2006.
- [142] I. V. Perevoshchikova, E. A. Kotova und Y. N. Antonenko, „Fluorescence Correlation Spectroscopy in Biology, Chemistry, and Medicine“, *Biochemistry*, Bd. 76, Nr. 5, S. 497–516, 2011.
- [143] D. M. Jameson, J. A. Ross und J. P. Albanesi, „Fluorescence fluctuation spectroscopy: ushering in a new age of enlightenment for cellular dynamics“, *Biophysical Reviews*, Bd. 1, S. 105–118, 2009.
- [144] S. Cha, S. H. Kim und D. Kim, „Viscosity of Sucrose Aqueous Solutions Measured by Using Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *Journal of the Korean Physical Society*, Bd. 56, Nr. 4, S. 1315–1318, 2010.
- [145] D. Alsteens et al. „Imaging G protein-coupled receptors while quantifying their ligand-binding free-energy landscape“, *Nature Methods*, Bd. 12, Nr. 9, S. 845–51, 2015.
- [146] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2004.
- [147] W. A. Müller und S. Frings, *Tier- und Humanphysiologie*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
- [148] C. Hille et al. „Two-photon fluorescence lifetime imaging of intracellular chloride in cockroach salivary glands“, *Photochemical & photobiological sciences*, Bd. 8, Nr. 3, S. 319–27, 2009.
- [149] C. Hille und B. Walz, „Dopamine-induced graded intracellular Ca²⁺ elevation via the Na⁺/Ca²⁺ exchanger operating in the Ca²⁺-entry mode in cockroach salivary ducts“, *Cell Calcium*, Bd. 39, Nr. 4, S. 305–11, 2006.
- [150] J. Sneyd et al. „Intercellular calcium waves mediated by diffusion of inositol triphosphate : a two-dimensional model“, *American Journal of Physiology*, Bd. 268, S. C1537–C1545, 1995.
- [151] R. Leurs et al. „The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs“, *Nature Reviews Drug Discovery*, Bd. 4, Nr. February, S. 107–120, 2005.
- [152] J Sneyd, A. C. Charles und M. J. Sanderson, „A model for the propagation of intercellular calcium waves“, *American Journal of Physiology*, Bd. 266, S. C293–C302, 1994.

- [153] M. J. Berridge, „Inositol trisphosphate and calcium signalling“, *Nature*, Bd. 361, S. 315–325, 1993.
- [154] J. Amundson und D. Clapham, „Calcium waves“, *Current Opinion in Neurobiology*, Bd. 3, S. 375–382, 1993.
- [155] J Gromada et al. „Ca²⁺ signalling in exocrine acinar cells: the diffusional properties of cellular inositol 1,4,5-trisphosphate and its role in the release of Ca²⁺“, *Cell calcium*, Bd. 14, S. 711–723, 1993.
- [156] B. Zimmermann, „Control of InsP₃-induced Ca²⁺ oscillations in permeabilized blowfly salivary gland cells: contribution of mitochondria“, *Journal of Physiology*, Bd. 525, Nr. 3, S. 707–719, 2000.
- [157] S. Lepiller et al. „Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe“, *Free Radical Biology and Medicine*, Bd. 43, S. 619–627, 2007.
- [158] S. Moncada, „Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine“, *Journal of the Royal Society of Medicine*, Bd. 92, Nr. April, S. 164–169, 1999.
- [159] W. K. Alderton, C. E. Cooper und R. G. Knowles, „Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition“, *Biochemical Journal*, Bd. 357, S. 593–615, 2001.
- [160] D. D. Thomas et al. „The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 98, Nr. 1, S. 355–360, 2001.
- [161] D. Looms et al. „Nitric oxide signalling in salivary glands“, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, Bd. 31, Nr. 10, S. 569–584, 2002.
- [162] G. Bicker, „Pharmacological Approaches to Nitric Oxide Signalling During Neural Development of Locusts and Other Model Insects“, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Bd. 64, S. 43–58, 2007.
- [163] I Lang und B Walz, „Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*.“, *The Journal of experimental biology*, Bd. 202, Nr. Pt 6, S. 729–38, 1999.
- [164] I. Hafez et al. „Electrochemical imaging of fusion pore openings by electrochemical detector arrays“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 102, Nr. 39, S. 13 879–84, 2005.
- [165] R. Trouillon et al. „Evaluating the Diffusion Coefficient of Dopamine at the Cell Surface During Amperometric Detection: Disk vs Ring Microelectrodes“, *Analytical Chemistry*, Bd. 85, S. 6421–6428, 2013.

- [166] R. Tsien und T. Pozzan, „Measurement of Cytosolic Free Ca²⁺ with Quin2“, *Methods in enzymology*, Bd. 172, S. 230–262, 1989.
- [167] B. S. Donahue und R. F. Abercrombie, „Free Diffusion Coefficient of Ionic Calcium in Cytoplasm“, *Cell Calcium*, Bd. 8, S. 437–448, 1987.
- [168] J. A. Goodman et al. „Sodium Ion Apparent Diffusion Coefficient in Living Rat Brain“, *Magnetic Resonance in Medicine*, Bd. 53, S. 1040–1045, 2005.
- [169] B. Zimmermann und B. Walz, „Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*“, *Journal of Physiology*, Bd. 500, Nr. 1, S. 17–28, 1997.
- [170] B. Zimmermann und B. Walz, „The mechanism mediating regenerative intercellular Ca²⁺ waves in the blowfly salivary gland“, *EMBO Journal*, Bd. 18, Nr. 12, S. 3222–3231, 1999.
- [171] L. Ederli et al. „NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta“, *Plant Physiology and Biochemistry*, Bd. 47, S. 42–48, 2009.
- [172] G. Gilbert et al. „T-type voltage gated calcium channels are involved in endothelium-dependent relaxation of mice pulmonary artery“, *Biochemical Pharmacology*, Bd. 138, S. 61–72, 2017.
- [173] M. William et al. „The nitric oxide donor sodium nitroprusside stimulates the Na⁺-K⁺ pump in isolated rabbit cardiac myocytes“, *Journal of Physiology*, Bd. 565, Nr. 3, S. 815–825, 2006.
- [174] S. D. Maletic et al. „Effects of Exogenous Donor of Nitric Oxide - Sodium Nitroprusside on Energy Production of Rat Reticulocytes“, *Physiological Research*, Nr. 53, S. 439–447, 2004.
- [175] D. K. Looms, K. Tritsarlis und S. Dissing, „Nitric oxide-induced signalling in rat lacrimal acinar cells“, *Acta Physiol Scand*, Bd. 174, Nr. 2, S. 109–115, 2002.
- [176] G. Hlawacek und A. Götzhäuser, *Helium Ion Microscopy*, 1. Aufl. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [177] G. Hlawacek et al. „Helium ion microscopy“, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, Bd. 32, S. 020 801, 2014.
- [178] R. L. Rungta et al. „The Cellular Mechanisms of Neuronal Swelling Underlying Cytotoxic Edema“, *Cell*, Bd. 161, Nr. 3, S. 610–621, 2015.

- [179] P. Roder und C. Hille, „ANG-2 for quantitative Na⁺ determination in living cells by time-resolved fluorescence microscopy“, *Photochemical & photobiological sciences*, Bd. 13, S. 1699–1710, 2014.
- [180] S. Khadem et al. „Spot variation fluorescence correlation spectroscopy by data post-processing“, *Scientific Reports*, Bd. 7, S. 5614, 2017.

Erklärung

Hiermit versichere ich,
dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Des Weiteren versichere ich, dass diese Arbeit weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht wurde.

Potsdam - Golm, den 21. November 2018

Phillip Roder