

Untersuchungen von Zellmonoschichten mittels Elektrochemischer Rastermikroskopie



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND
PHARMAZIE

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Stefan Bergner, M. Sc. aus

Schkeuditz, geb. am 28.06.1985

Im Jahr 2013

Die vorgelegte Arbeit entstand in der Zeit vom Oktober 2009 bis zum Juni 2013 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. habil. Frank-Michael Matysik

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.06.2013

Termin des Kolloquiums: 25.07.2013

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Robert Wolf
Erstgutachter:	Prof. Dr. Frank-Michael Matysik
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Joachim Wegener
Drittprüfer:	Prof. Dr. Günther Bernhardt

Reicher Mann und armer Mann

Standen da und sahn sich an.

Und der Arme sagte bleich:

„Wär ich nicht arm, wärst du nicht reich.“

Berthold Brecht

Danksagung:

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank-Michael Matysik bedanken, der meine akademische Graduierung seit der Bachelorarbeit begleitet und mir im gesamten Zeitraum wertvolle Anregungen gegeben hat.

Folgend möchte ich Herrn Prof. Dr. Joachim Wegener danken, der mir in allen Bereichen der Zellkultur stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und das Zweitgutachten anfertigte.

Herrn Prof. Dr. Günther Bernhardt danke ich für die Tätigkeit als Drittprüfer.

Folgend danke ich dem Fonds der Chemischen Industrie für die großzügige finanzielle Förderung meiner Person in Form eines Kekulé-Stipendiums über 3 Jahre hinweg. Dies ermöglichte mir eine große Unabhängigkeit in meinen Tätigkeiten am Arbeitskreis.

Folgenden Mitarbeitern des Instituts für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg, die mich auf meinem Weg zur Promotion unterstützt haben, danke ich: Preety Vatsyayan, Peter Palatzky, Marco Grundmann, Jonas Mark, Bastiaan Van der Weerd, Stefan Wilhelm, Thomas Hirsch, Nicole Guber, Heike Mader, Marija Cindric, Barbara Goricnik, Michaela Sperber und Christina Hupf.

Zudem danke ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Günther Bernhardt und Maria Beer-Krön.

Auch die hohen Kompetenzen der mechanischen und elektronischen Werkstätten, sowie der Glasbläserei sollen hier nicht unerwähnt bleiben.

Mein größter Dank geht jedoch an meine Frau Franziska Bergner, die mir in den letzten Jahren selbstlos zur Seite gestanden und mich stets unterstützt hat. Zudem möchte ich meinem Bruder danken, der mir in einigen schwierigen Situationen beistand.

Lebenslauf:

Persönliches

Name: Stefan Bergner
Geburtsdatum und -ort: 28. Juni 1985 in Schkeuditz
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Graduierung und Schulbildung

seit 10/2009 **Promotion** zum Dr. rer. nat. am Institut für Analytische Chemie
in Regensburg

10/2007 – 09/2009 **Studium Master of Science Chemie** (Gesamtnote: 1,2)
in Leipzig und Dublin (Irland)
Thema der Abschlussarbeit: *„Charakterisierung der Aminfluoride Olafur und Dectaflur“*

10/2004 – 07/2007 **Studium Bachelor of Science Chemie** (Gesamtnote: 1,4)
in Leipzig
Thema der Abschlussarbeit: *„Verbesserung der Selektivität in der HPLC durch Kombination von Säulensegmenten mit unterschiedlichen stationären Phasen“*

10/2006 – 09/2007 gewähltes Mitglied des Fachschaftsrates der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig

07/2003 **Abitur**, Gymnasium Schkeuditz (Gesamtnote: 1,6)

Stipendien

seit 06/2011 Online-Stipendium von e-fellows.net

seit 07/2010 **Kekulé**-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie

01/2008 – 05/2008 Erasmus-Stipendium für den Auslandsaufenthalt in Dublin

Eigene Publikationen:

1) *Peer-reviewed-Artikel*

Bergner S; Palatzky P; Wegener J; Matysik F-M (2011) High-resolution imaging of nanostructured Si/SiO₂ substrates and cell monolayers using scanning electrochemical microscopy. *Electroanalysis* 23:196-200

Bergner S; Wegener J; Matysik F-M (2011) Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal Chem* 83:169-174

Bergner S; Wegener J; Matysik F-M (2012) Monitoring passive transport of redox mediators across a confluent cell monolayer with single-cell resolution by means of scanning electrochemical microscopy. *Anal Methods* 4:623-629 (**Cover Article**)

Bergner S; Vatsyayan P; Matysik F-M (2013) Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells - a review. *Anal Chim Acta* 775:1-13. (**Cover Article**)

2) *Non-peer-reviewed-Artikel*

Bergner S; Matysik F-M (2013) Chemische Reaktivitäten abbilden – Die Elektrochemische Rastermikroskopie. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 1:38-39

Bergner S; Matysik F-M (2013) Imaging Chemical Reactivity – Scanning Electrochemical Microscopy. *GIT Laboratory Journal* 3-4:10-11

Bergner S (2012) Eirelec 2011: electrochemistry—the future? *Anal Bioanal Chem* 402:1407-1408

3) Vorträge

Bergner S; Matysik F-M (2011) Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy. Eirelec 2011 - electrochemistry—the future? in Adare/Irland

Bergner S; Matysik F-M (2011) Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy. GDCh-Wissenschaftsforum Chemie in Bremen

4) Poster

Bergner S; Matysik F-M (2010) High resolution SECM studies of a porous substrate. ESEAC Gijon/Spanien

Bergner S; Matysik F-M (2011) Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). ANAKON in Zürich/Schweiz

Bergner S; Matysik F-M (2011) Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). GDCh-Wissenschaftsforum Chemie in Bremen

Bergner S; Matysik F-M (2012) Investigation of confluent cell monolayer by means of scanning electrochemical microscopy (SECM). Analytica in München

Bergner S; Matysik F-M (2012) Studies of cell monolayers by means of scanning electrochemical microscopy (SECM). Electrochemistry 2012 in München

Inhaltsverzeichnis:

Inhalt

1 Zielstellungen der Arbeit	1
2 Grundlagen	3
2.1 Voltammetrie.....	3
2.1.1 Einleitung zur Voltammetrie	3
2.1.2 Voltammetrisches Verhalten von Makroelektroden	5
2.1.3 Voltammetrische Besonderheiten von Ultramikroelektroden	8
2.2 Impedanzspektroskopie	10
2.3 Elektrochemische Rastermikroskopie	12
2.3.1 Aufbau des elektrochemischen Rastermikroskops.....	13
2.3.2 SECM-Sonden	14
2.3.3 Charakterisierung der Sonden in der SECM	16
2.3.4 Elektrochemische Mediatoren.....	17
2.3.5 Messprinzipien in der SECM	17
2.3.6 SECM-Abbildungsverfahren	19
2.3.6.1 SECM-Studien lebender Zellen im constant-height-Modus	20
2.3.6.2 SECM-Studien lebender Zellen im constant-distance-Modus	21
2.3.6.3 SECM-Studien mit Elektrolysestrom-unabhängigen constant-distance-Modi..	22
2.4 Konfluente Zellmonoschichten	23
3 Eigene Publikationen.....	26
4 Experimenteller Teil.....	30
4.1 UME-Herstellung.....	30
4.1.1 Pt-UMEs aus Pt-Volldraht.....	30
4.1.2 Pt-UMEs aus Wollastondraht.....	33
4.2 Geräte.....	35
4.2.1 SECM.....	35
4.2.2 Tellerschleifer	37

4.2.3 Mikroskope	39
4.2.4 Osmometer.....	39
4.2.5 Atomkraftmikroskopie	39
4.3 Präparation der Zellen.....	39
4.4 Chemikalien	40
4.5 Testsubstrate	41
4.6 Bildvergleich	41
5 Diskussion der Ergebnisse	42
5.1 Charakterisierung der UMEs	42
5.1.1 CVs der UMEs.....	42
5.1.2 Amperometrische PACs der UMEs.....	43
5.1.3 Impedimetrische PACs der UMEs	44
5.2 Topographiestudien idealer Substrate.....	48
5.2.1 Amperometrisch	48
5.2.2 Impedimetrisch	51
5.3 Untersuchung der positiven Rückkopplung	56
5.3.1 Vorexperimente	56
5.3.2 Goldnanoinseln auf Glas	59
5.4 Topographiestudien an lebenden Zellen	60
5.4.1 Stabilitäts- und Viabilitätsanalyse gängiger Mediatoren	60
5.4.2 SECM-Abbildungen von NRK-Zellen	61
5.4.2.1 Ortsabhängigkeit der PACs über einer NRK-Zellkultur.....	61
5.4.2.2 Einfluss der Osmolarität der Lösung	63
5.4.2.3 Abbildungen lebender NRK-Zellen	64
5.4.2.4 Einfluss des Mediators auf die Abbildungen.....	65
5.4.2.5 Zellen mit inkorporierten Mikropartikeln.....	67
5.4.3 Abbildungen von Krebszelllinien (U373-MG)	68
5.4.4 Abbildungen von Mischzellkulturen.....	69
5.4.5 Abbilden über das Sauerstoffsignal	71
5.5 Die UME als Werkzeug und Sonde	73

5.5.1 Vorversuche zur elektrochemischen in-situ-Generierung aktiver Spezies.....	73
5.5.2 Selektive Schädigung einer Einzelzelle im Zellverbund	74
5.6 Transportstudien	78
5.6.1 Vorversuche an Filtermaterialien	79
5.6.2 Vorexperimente zur elektrochemischen Diffusionszelle	80
5.6.3 Diffusionsexperimente von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch MDCK II-Zellmonoschichten.....	82
5.6.4 Diffusionsexperimente von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch NRK-Zellmonoschichten.....	84
5.6.5 Diffusionsexperimente von FcMeOH durch NRK-Zellmonoschichten.....	85
5.6.6 Diffusionsexperimente von FcMeOH durch MDCK II-Zellmonoschichten.....	86
6 Zusammenfassung	87
Quellenverzeichnis	VII

Abkürzungsverzeichnis:

A	Elektrodenfläche
AC-SECM	Impedanz-SECM oder Wechselstrom-SECM (<i>alternating current-SECM</i>)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
C	Doppelschichtkapazität
CLSM	Konfokalmikroskop (<i>confocal laser scanning microscope</i>)
CV	Zyklovoltammogramm (<i>cyclic voltammogram</i>)
d	Abstand zwischen Arbeits- und Gegenelektrode
D	Diffusionskoeffizient
δ	Diffusionsgrenzschicht
ECIS	Elektrische Zellimpedanzanalyse (<i>electrical cell impedance sensing</i>)
f	Frequenz
FcCOOH	Ferrocencarbonsäure
FcMeOH	Ferrocenmethanol (Hydroxymethylferrocen)
FcMeOH ⁺	Ferrocenylmethanol
Φ	Phasenwinkel zwischen Real- und Imaginärteil der Impedanz
Gln	Gleichung
HPICM	<i>hopping probe ion conductance microscopy</i>
i_c	kapazitiver Strom
i_F	Faradayscher Strom
I_T	aktueller Stromwert an der UME
$I_{T, \infty}$	stationärer Strom einer UME in der Bulkphase der Lösung
IS	Impedanzspektroskopie
κ	spezifische Leitfähigkeit

L	Induktivität einer Spule
MDCK II-Zellen	Zelllinie aus der Niere eines Cocker Spaniels (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>)
NA	numerische Apertur
NRK-Zellen	normale Rattenzellen (<i>normal rat kidney cells</i>)
PAC	Annäherungskurve (<i>probe approach curve</i>)
PSC	Linien-Scan (<i>probe scan curve</i>)
r	Radius
R	Widerstand
R_{ct}	Ladungsdurchtrittswiderstand
R_{Lsg}	(unkompensierter) Widerstand der Messlösung
RG-Wert	Verhältnis des Durchmessers des Isolators an der Sondenspitze zum Durchmesser der aktiven Elektrode
SECM	elektrochemische Rasterelektromikroskopie (<i>scanning electrochemical microscopy</i>)
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
SICM	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (<i>scanning ion conductance microscopy</i>)
SNOM	Optische Rasternahfeldmikroskopie (<i>scanning nearfield optical microscopy</i>)
STM	Rastertunnelmikroskopie (<i>scanning tunneling microscopy</i>)
U	Potential
U_{eff}	effektives Potential an der Arbeitselektrode
ΔU	Amplitude bei AC-SECM-Messungen
UME	Ultramikroelektrode (<i>ultramicroelectrode</i>)
v	Vorschubgeschwindigkeit bei der Aufnahme eines CVs

ω	Kreisfrequenz
Z_F	Faradaysche Impedanz
Z'	Realteil der Impedanz
Z''	Imaginärteil der Impedanz

1 Zielstellungen der Arbeit

Die hochauflösende Darstellung lebender Zellen und Zellverbände ist von zentraler Bedeutung in der Grundlagen- und in der angewandten Forschung der Bioanalytik. Die in jedem Standardlabor zu findende Ausrüstung umfasst ein optisches Mikroskop, welches die Topographie durch verschiedene Spielarten der Hellfeldmikroskopie wie Phasenkontrast oder Fluoreszenz abbildet. In beiden Fällen terminiert das Abbesche Limit die erreichbare Auflösung. Jedoch konnte dieses Limit in letzter Zeit durch verschiedene Techniken umgangen werden. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie werden Farbstoffmoleküle zur Generierung des Kontrastes benötigt, was eine Vielzahl nachfolgender Probleme bedingt.^[1] Neben der reinen Abbildung der Topographie wäre zudem die Detektion freigesetzter Stoffe aus den Zellen interessant. Diese dienen meist der Kommunikation zwischen den Zellen oder sind die Antwort auf einen externen Stimulus. Da diese Stoffe jedoch in sehr niedriger Konzentration vorliegen und meist farblos sind, ist eine orts aufgelöste Detektion sehr anspruchsvoll. Als eine verbreitete Technik zur *in-vitro* Dokumentation zellulärer Aktivität hat sich die elektrische Zellimpedanzanalyse (electrical cell impedance sensing, ECIS) entwickelt.^[2] Die gemessene Impedanz einer Zellbarriere reagiert sehr empfindlich auf Temperatur-, oder pH-Wert-Änderungen, sowie auf eine geänderte Zusammensetzung im Medium durch den Transport gelöster Stoffe.^[3] Damit können auch optisch unsichtbare Änderungen im Membranwiderstand oder im Adhäsionsverhalten der Zellen detektiert werden. Als wesentlicher Nachteil ergibt sich hier jedoch, dass keine Informationen über Einzelzellen gewonnen werden. Vielmehr werden nur integrale Eigenschaften über viele Zellen erhalten. Bei komplexeren Experimenten mit mehreren gleichzeitigen Änderungen im System kann zudem die Interpretation der Daten erschwert sein.

Um Abbildungen im subzellulären Bereich zu erhalten, von denen von der Topographie auf zelluläre Eigenschaften geschlossen werden kann, wurden in den letzten 30 Jahren verschiedene Rastersondentechniken entwickelt. Hochauflösende Techniken zur Bestimmung der Topographie sind insbesondere die Rasterelektronenmikroskopie (SEM) oder die Rasterkraftmikroskopie (AFM). Während die AFM auch in biologischen Puffern durchgeführt werden kann, benötigt die SEM ein Vakuum zur Messung. Insbesondere die wichtigste chemische Verbindung lebender Organismen, das Wasser, ist störend für die Messung und muss vorher entfernt werden.^[4-6] Der Zustand nach der Trocknung kann dabei entscheidend von der physiologischen Topographie abweichen. Zudem kann es in der AFM durch den direkten Kontakt von Probe und Sonde zu Abbildungsartefakten kommen.^[7]

Zur Aufklärung der Topographie und elektrochemischen Aktivität lebender Zellen soll in dieser Arbeit die elektrochemische Rastermikroskopie (scanning electrochemical

microscopy, SECM) verwendet werden. Hierbei werden Sonden mit typischen Dimensionen im unteren μm -Bereich verwendet, die als Ultramikroelektroden (UMEs) bezeichnet werden. Als Kontrastgenerierung dient die Faradaysche Umsetzung eines in Lösung befindlichen Hilfsstoffes (Mediator). Die Menge des an der UME umgesetzten Mediators ist dabei abhängig von topographischen Details und deren elektrochemischer Aktivität. Diese analytische Technik kann unter physiologischen Bedingungen in Zellkulturmedien angewendet werden, um zeit- und örtlich aufgelöste Abbildungen der Morphologie lebender Zellen und Zellverbände zu erhalten. Auch wenn die erreichbare Auflösung im unteren μm - bis hohen nm-Bereich liegt, soll das Potential der SECM, als komplementäre Technik zur optischen Mikroskopie, für die Abbildung lebender Zellverbände erörtert werden.

Folgende Zielstellungen lagen der Dissertation zu Grunde:

- Fertigung und voltammetrische Charakterisierung von Pt-UMEs mit sub- μm -Abmessungen
- Aufnahme von amperometrischen und impedimetrischen Annäherungskurven mit den gefertigten UMEs über idealen Substraten mit unterschiedlicher elektrochemischer Aktivität
- Hochauflösende SECM-Abbildungen idealer anorganischer und organischer Substrate
- Morphologische Studien lebender Zellmonoschichten verschiedener Zelllinien mit dem SECM
- Morphologische Studien von Mischzellkulturen mit dem SECM
- Verwendung der UME als Werkzeug und Sonde zur selektiven Beeinflussung und Abbildung einzelner Zellen innerhalb des Zellverbundes
- Studien zur orts aufgelösten Permeation elektroaktiver Analyte durch Zellmonoschichten

2 Grundlagen

2.1 Voltammetrie

2.1.1 Einleitung zur Voltammetrie

Alle Messprinzipien der Voltammetrie basieren auf einer Messung des Stromes I , der abhängig vom Potential U durch die elektrochemische Zelle (bei Anwesenheit eines elektrochemisch konvertierbaren Analyten) fließt. Durch die potentialabhängige Verfolgung des Stromes werden Strom-Spannungs-Kurven erhalten, aus denen sowohl qualitative, als auch quantitative Informationen über das untersuchte System abgeleitet werden können. Zu den bekanntesten voltammetrischen Techniken gehören die Polarographie, die Zyklovoltammetrie (CV) und die Amperometrie.

Voltammetrische Messungen werden meist mit Hilfe einer 3-Elektrodenanordnung durchgeführt, bei der neben der Arbeitselektrode eine Gegen- und eine Referenzelektrode zum Einsatz kommen. Durch Einsatz eines Potentiostaten wird ein definiertes Potential zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode erreicht. Die Messung des Referenzpotentials sollte dabei möglichst stromlos erfolgen, da andererseits ein Teil der angelegten Spannung U über den Lösungswiderstand R_{Lsg} abfällt. In der Folge ergibt sich ein wirksames Potential U_{eff} , welches gemäß Gleichung (Gln.) 1 von U abweicht.

$$U_{eff} = U - I \cdot R_{Lsg} \quad (1)$$

Wird an einer Elektrode das Potential verändert, wird zunächst noch kein Stoffumsatz an der Elektrode festgestellt. Jedoch wird eine kapazitive Stromkomponente i_C erhalten, die aus der Auf- oder Umladung der elektrischen Doppelschicht resultiert. Erst bei weiterer Erhöhung des Elektrodenpotentials, bis auf das charakteristische Halbstufenpotential des untersuchten Analyten, fließt ein Faradayscher Strom i_F , der aus der Analytumsetzung stammt. Da beide Stromanteile nicht voneinander getrennt werden können, die wichtigen Analytinformationen aber nur im Faradayschen Stromanteil stecken, ist ein möglichst großes i_F/i_C -Verhältnis vorteilhaft. Eine weit verbreitete Methode zur Verbesserung des i_F/i_C -Verhältnisses bei Makroelektroden ist die Ausnutzung der unterschiedlichen Zeitabhängigkeiten beider Anteile durch gepulste Messtechniken.

Der prinzipielle Aufbau der voltammetrischen 3-Elektrodenanordnung ist in Abbildung 1 zusammengefasst.

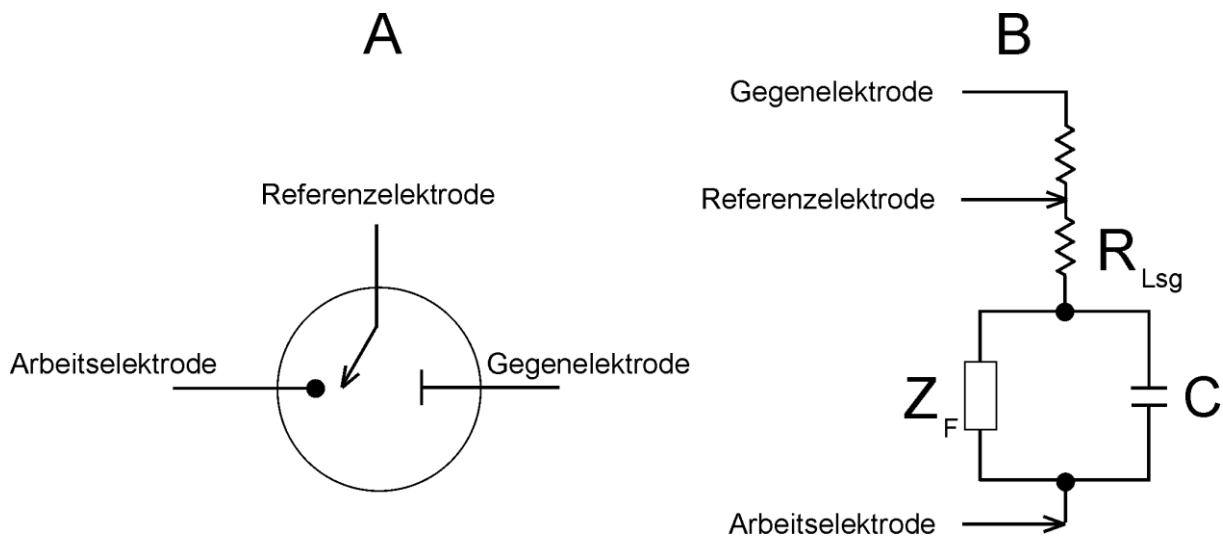


Abbildung 1: Schematischer Aufbau (A) und Ersatzschaltbild (B) einer 3-Elektrodenschaltung bei der voltammetrischen Messung.^[adaptiert von 8] Hierbei ist Z_F die Faraday-Impedanz, welche die Umsetzung des elektroaktiven Stoffes berücksichtigt; C ist die Doppelschichtkapazität der Elektrode.

Die drei wesentlichen Schritte elektrochemischer Umsetzungen beinhalten den Stofftransport des Analyten aus der Lösung an die Elektrodenoberfläche, die Übertragung von Elektronen zwischen Elektrode und Analyt in der Durchtrittsreaktion und letztlich der Abtransport des umgesetzten Analyten von der Elektrodenoberfläche in die Lösung. Zudem können nach der elektrochemischen Umsetzung der Analyte weitere chemische Transformationen der generierten Produkte erfolgen (Folgereaktionen).

Der gemessene Strom kann dabei grundsätzlich vom Massentransport zur Elektrode oder von der Durchtrittsreaktion limitiert sein. Für letzteres kann die Standardgeschwindigkeitskonstante genutzt werden, um eine qualitative Einteilung der Elektrodenprozesse in reversibel, quasi-reversibel und irreversibel vorzunehmen. Allgemein wird eine Reaktion als reversibel bezeichnet, wenn die Durchtrittsreaktion viel schneller als der diffusive Stofftransport ist.

Der Stofftransport hin zur und weg von der Elektrode kann dabei grundsätzlich durch Konvektion, Diffusion oder Migration erfolgen. Häufig werden die Transportmechanismen Migration und Konvektion durch Zugabe von elektrochemisch inertem Leitelektrolyten bei dem Unterlassen von Rühren der Lösung unterdrückt. Wird Konvektion und Migration vernachlässigt, so folgt auf die elektrochemische Umsetzung des Analyten an der Elektrode die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten, welcher den beständigen Transport von Analyten von der Lösung zur Elektrode antreibt (Nernstsche Diffusionsschicht). Der diffusive Transport zur Elektrode ist dabei abhängig von der Elektrodengeometrie und -dimensionierung.

2.1.2 Voltammetrisches Verhalten von Makroelektroden

Makroelektroden haben räumliche Ausdehnungen jenseits der Diffusionsstrecke des Analyten, sodass der diffusive Stofftransport langsamer als der Stoffumsatz an der Elektrode ist. Infolge der Umsetzung des Analyten an der Elektrodenoberfläche verarmt die Lösung nahe dieser. Die örtliche Konzentrationsabhängigkeit kann dabei mit dem ersten der Fick-Gesetze beschrieben werden. Werden radiale Diffusionsanteile an den Kanten oder Peripherie der Elektrode infolge der makroskopischen Ausdehnung vernachlässigt, kann von einer idealen, planaren Diffusion (Abbildung 2B) ausgegangen werden.

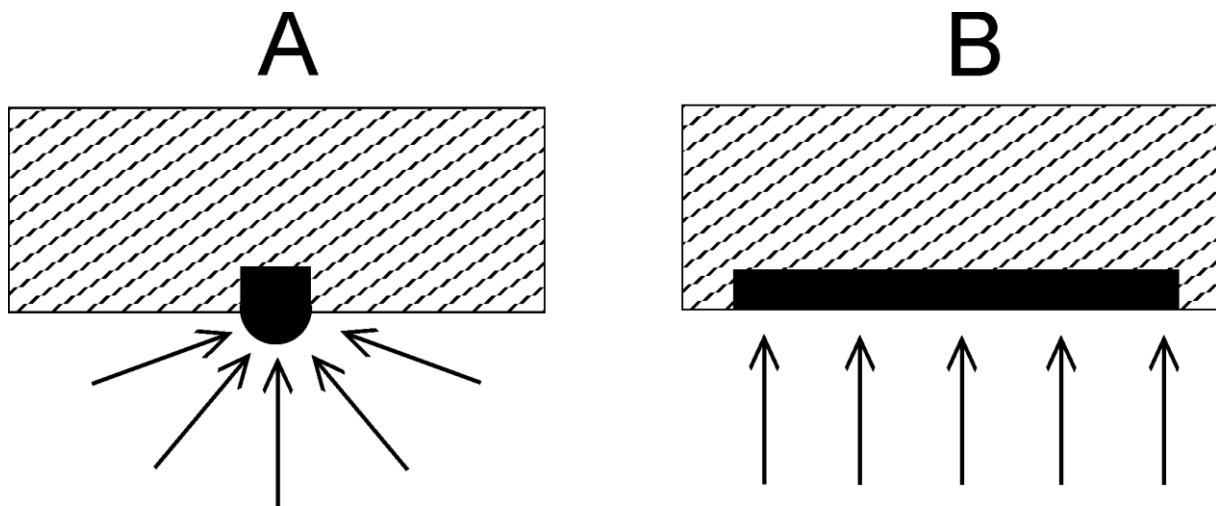


Abbildung 2: Radiale Diffusion an einer hemisphärischen Elektrode (A) und planare Diffusion (B) an einer makroskopisch dimensionierten Elektrode. [adaptiert von 9]

Die Abhängigkeit der Analytkonzentration in der Nernstschen Diffusionsschicht als Funktion des Ortes ist dabei in Abbildung 3 dargestellt. Hierbei ist das Hineinwachsen der Diffusionsschicht in die Bulkphase erkennbar, ohne dass sich nach dieser Zeit ein stationäres Signal einstellt.

Da jedoch die Lösung um die Elektrode immer mehr an Analyt verarmt, handelt es sich also um ein zeitabhängiges System. Zur Beschreibung instationärer Diffusionsvorgänge wird das 2. Ficksche Gesetz angewendet. Konkret soll hier die Abhängigkeit des in der experimentellen Arbeit vorwiegend verwendeten Mediators Ferrocenmethanol (FcMeOH), der zum Ferrocenylmethanol-Kation (FcMeOH^+) oxidiert werden kann, diskutiert werden.

$$\frac{\partial c_{\text{FcMeOH}}}{\partial t} = D_{\text{FcMeOH}} \left(\frac{\partial^2 c_{\text{FcMeOH}}}{\partial x^2} \right) \quad (2)$$

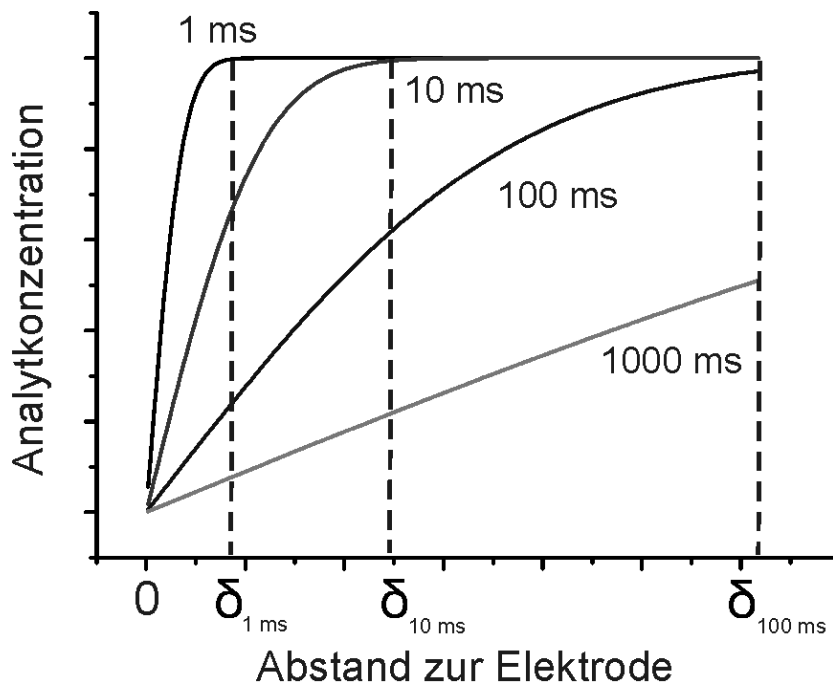


Abbildung 3: Simulation der Abhängigkeit der Analytkonzentration im Falle einer sich ausdehnenden Nernstschen Diffusionsschicht der Dicke δ an einer unendlich großen Makroelektrode und einem Diffusionskoeffizienten des Analyten von $D = 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. [adaptiert von 10]

Die Lösung dieser Differentialgleichung liefert folgenden Ausdruck mit A als Elektrodenfläche und F als Faradaykonstante:

$$I = -\frac{FAD_{\text{FcMeOH}}}{\delta} c_{\text{FcMeOH}} \quad (3)$$

Hierbei hat die Nernstsche Diffusionsschicht eine zeitabhängige Ausdehnung von:

$$\delta = \sqrt{\pi D_{\text{FcMeOH}} t} \quad (4)$$

Durch Kombination der Gln. (3) mit (4) wird die bekannte Cottrell-Gleichung für ein chronoamperometrisches Experiment bei konstanter Spannung erhalten.

$$I = -\frac{FAD_{\text{FcMeOH}}}{\sqrt{\pi Dt}} c_{\text{FcMeOH}} \quad (5)$$

Die Cottrell-Gleichung beschreibt das typische Stromverhalten beim Einschwingvorgang einer Makroelektrode mit einer Zeitabhängigkeit des Stromes von $t^{-0.5}$. Wird das Potential an der Makroelektrode dreieckförmig verändert, so wird die folgende Stromantwort im Zyklovoltammogramm (CV) gefunden:

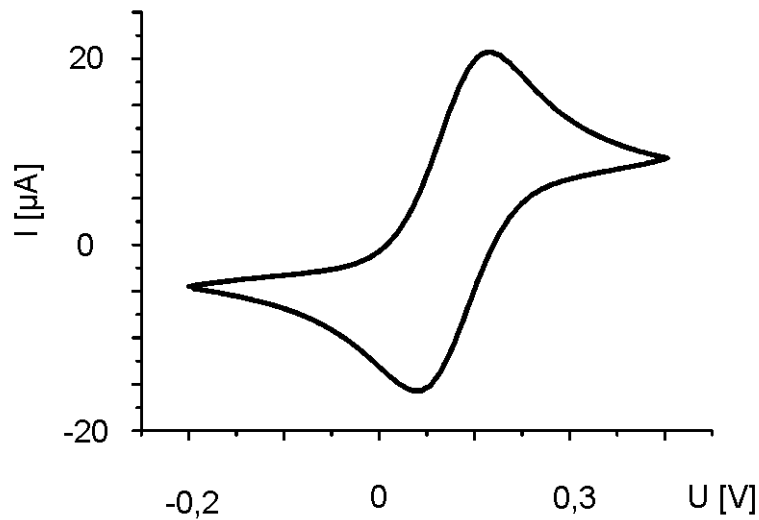


Abbildung 4: CV einer Makroelektrode (Dropsense, Kohlepaste, 3 mm, 1 mM FcMeOH, 0,2 M KNO₃, H₂O).^[11]

Angetrieben durch die hohe Bedeutung der Polarographie^[12], war schon in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts die theoretische Beschreibung von Diffusionseigenschaften (hemi)sphärischer Elektroden vollendet.^[13] Die Peripherie der Elektrode liefert einen Anteil radialer Diffusion, die bei entsprechender Geometrie entscheidenden Einfluss auf die Gesamtdiffusionsverhältnisse bekommt (Vgl. Abbildung 2A).

Für sphärische Elektroden mit einem Radius r muss im zweiten Fickschen Gesetz ein zusätzlicher Term für radiale Diffusionsanteile eingeführt werden:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{d^2 c}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (6)$$

Als Lösung ergibt sich folgender Zusammenhang für die Chronoamperometrie:

$$I = -FAD_{\text{FcMeOH}} \left(\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right) c_{\text{FcMeOH}} \quad (7)$$

Infolge der Radialanteile der Diffusion wird bei sphärischen Elektroden neben dem zeitabhängigen Teil ein zeitunabhängiger Term erhalten, der die radiale Ausdehnung der Diffusionsgrenzschicht berücksichtigt. Für große Elektrodenradien geht Gln. (7) in die bereits erwähnte Cottrell-Gleichung über, da dort der Einfluss von Randeffekten radialer Diffusion vernachlässigbar ist.

2.1.3 Voltammetrische Besonderheiten von Ultramikroelektroden

Auch wenn die theoretische Beschreibung mikrostrukturierter Elektroden durch die Lösung der Diffusionsgleichungen bereits abgeschlossen war, entzogen sich Ultramikroelektroden (UMEs) lange Zeit der experimentellen Beschreibung, da die Fertigung der Elektroden noch nicht bekannt war. Zudem waren Ströme im Bereich weniger Nanoampere durch die damalige Instrumentierung nicht zugänglich. Die Pioniere auf diesem Gebiet waren die Gruppen um Fleischmann^[14] und Wightmann^[15] in den 1980er Jahren. Neben der bloßen Reduzierung der Dimension, was folglich zu einer limitierten Anwendung von kleineren Elektroden infolge der Reduktion der Stromsignale geführt hätte, bekommt ein in der vorherigen Betrachtung vernachlässigter Radialanteil in der Diffusion eine große Dominanz. Durch die radiale Diffusion kommt es zur Ausbildung einer stationären - also über die Zeit konstanten - Diffusionsschicht um die Elektrode. Damit wird mit der Ausbildung einer Stufe im Grenzstrombereich eine grundlegend verschiedene Stromantwort im Voltammogramm (Abbildung 5) erhalten. Bei Potentialen unterhalb des Halbstufenpotentials des Mediators wird nahezu ein konstanter Stromwert erreicht, der nur wenig vom Offsetstrom des Potentiostaten abweicht. Der konstante Strom beruht auf dem nur sehr geringen Ladestrom von UMEs. Wird das Potential an der UME bis in den Bereich des Halbstufenpotentials des Mediators erhöht, setzt mit der elektrochemischen Umsetzung ein Faradayscher Stromfluss ein.

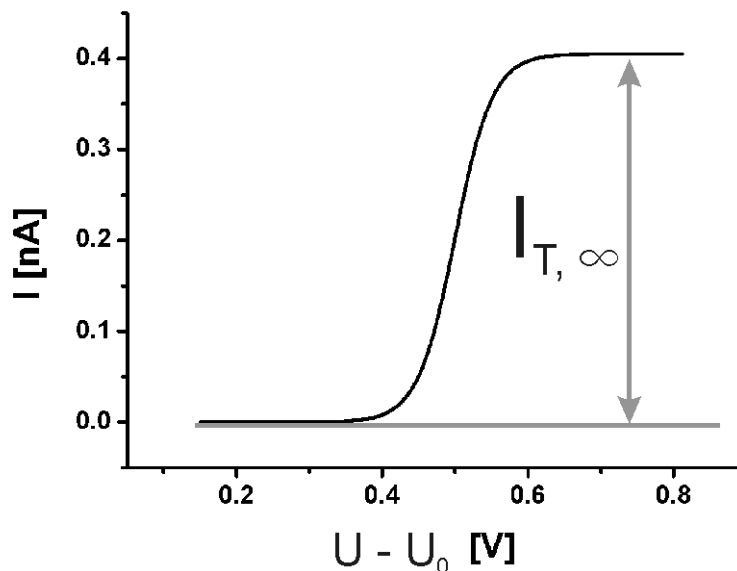


Abbildung 5: Simuliertes *single-sweep*-Voltammogramm einer 2 μm Mikroelektrode (Mediatorkonzentration 1,5 mM; $D = 7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[16])

Wird das Potential weiter erhöht, wird keine weitere Zunahme des Stromwertes registriert, da der diffusive Transport des Mediators den Stoffumsatz limitiert. Infolge einer nur geringen

Kapazität der Doppelschicht sollten im Idealfall, abhängig von der Elektrodengröße, beide Kurvenäste des CVs übereinanderliegen, sodass ein sigmoidales Signal erhalten wird.

Vom gemessenen Grenzstrom $I_{T, \infty}$, der dem stationären Stromwert entspricht, kann bei bekannter Geometrie über einfache Beziehungen auf die effektive Größe der Elektrode geschlossen werden. Für scheibenförmige UMEs in einem endlich großen Isolator gilt folgende Beziehung^[17]:

$$I_{T, \infty} = 4nFD_{\text{FcMeOH}} c_{\text{FcMeOH}} r \beta(RG) \quad (8)$$

Hierin ist $\beta(RG)$ ein geometrischer Faktor, der die Größe des die Scheibenelektrode umschließenden endlichen Isolators berücksichtigt. Damit wird den zusätzlichen Diffusionswegen des Analyten, insbesondere bei einem kleinen RG -Wert, der das Verhältnis des Elektrodendurchmessers zum Durchmesser der Scheibenelektrode beschreibt, Rechnung getragen. Der geometrische Faktor $\beta(RG)$ wird folgend bestimmt^[18]:

$$\beta(RG) = 1 + \frac{0,23}{(RG^3 - 0,81)^{0,36}} \quad (9)$$

Als Besonderheit voltammetrischer Messungen wurde bereits der ohmsche Spannungsabfall in der Lösung angeführt (siehe Gln. (1)). Durch die kleine Elektrodendimensionierung fließen bei UMEs stets sehr kleine Ströme im nA- bis pA-Bereich. Als Konsequenz ist auch der Spannungsabfall in der Elektrolytlösung viel geringer, sodass bei Verwendung von UMEs mit einem 2-Elektrodenaufbau gearbeitet werden kann, ohne das U_{eff} wesentlich von U abweicht. Umgekehrt können auch Messungen in sehr hochohmigen organischen Lösungsmitteln mit geringen Konzentrationen oder in Abwesenheit von Leitsalzen durchgeführt werden.^[19-21] Zur Quantifizierung des ohmschen Lösungswiderstands wurde ein Modell aus zwei konzentrischen Kugeln entworfen, wobei die innere Kugel die Ultramikroelektrode und die größere äußere Kugel die kombinierte Gegen- und Referenzelektrode darstellt.^[22,23] Zwischen beiden Kugeln soll eine isotrope spezifische Leitfähigkeit κ des Elektrolyten herrschen. Durch Integration über die Einzelwiderstände infinitesimaler Elektrolytschalen wird folgender Ausdruck erhalten:

$$R = \frac{\kappa}{4\pi r} \left(1 - \frac{r}{d} \right) \quad (10)$$

Hier ist r der Radius der inneren Kugel und d der Abstand zwischen UME und Gegenelektrode. In der Praxis ist r im Mikrometerbereich, d jedoch im Millimeterbereich, sodass das Verhältnis r/d vernachlässigbar klein wird. Damit geht Gln. (10) in folgenden Ausdruck über:

$$R = \frac{\kappa}{4\pi r} \quad (11)$$

Durch die inverse Abhängigkeit des Lösungswiderstandes vom Elektrodenradius bietet sich ein deutlicher Vorteil bei Verwendung möglichst kleiner Elektrodendimensionen. In analoger Weise wurde dieses Verfahren für scheibenförmige^[24], hemisphärische^[25], zylindrische^[22;26] und bandförmige^[27] Elektroden angewendet.

Ein weiterer wichtiger Vorteil von UMEs ergibt sich aus der Kombination der zuvor besprochenen Vorteile des verringerten Lösungswiderstandes und der Elektrodenkapazität. Das Produkt beider Kenngrößen RC hat die Dimension einer Zeit und stellt die charakteristische Zellkonstante dar. Bei typischen Elektrodenradien im μm -Bereich und in nicht zu resistiven Medien ($\kappa \geq 50 \mu\text{S/cm}$) liegen die Zeitkonstanten im μs - bis ns -Bereich.^[28] Im Vergleich zu makroskopischen Elektroden, welche Zeitkonstanten im s - bis ms -Bereich aufweisen, können nun schon nach sehr kurzen Zeitdauern die Faradayschen von den kapazitiven Stromanteilen separiert werden, sodass auch sehr schnell ablaufende Reaktionen oder schnelllebige Teilchen elektrochemisch untersucht werden können.^[29,30] Der Ladestrom i_c kann dabei Interferenzen hervorrufen und i_f bei kurzen Zeiten oder geringen Mediatorkonzentrationen übersteigen. Durch die sehr schnelle Einstellung eines stationären Stromwertes ist, wie auch bei Makroelektroden, die Verwendung gepulster Techniken besonders attraktiv.^[31,32]

Umgekehrt können auch sehr hohe Vorschubgeschwindigkeiten von einigen kV/s bis zu MV/s ^[33] analytisch genutzt werden. Bei diesen hohen Potentialänderungsgeschwindigkeiten tritt wiederum planare Diffusion in den Vordergrund, sodass transiente Signale im Zyklovoltammogramm erhalten werden. Hierbei konnten beispielsweise schnelle Kinetiken verfolgt^[34] und heterogene Elektronentransferreaktionen mit sehr großen Geschwindigkeitskonstanten von einigen cm s^{-1} bestimmt werden.^[35,36]

2.2 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie (IS) ist bereits seit mehr als einem Jahrhundert^[37] bekannt, jedoch wurde die Praktikabilität der Methode erst durch die Einführung des Potentiostaten (um 1940) und des Frequenzanalysators (um 1970) wesentlich erhöht. Neben den klassischen elektroanalytischen Techniken wie Zyklovoltammetrie und Amperometrie kommt der IS, insbesondere bei der Studie von Phasengrenzen, große Bedeutung zu. Bei dieser Technik wird eine periodische Spannung mit der Frequenz f im Bereich von meist 1 mHz bis 1 MHz mit kleiner Amplitude ΔU (meist einige 10 mV) an das zu untersuchende System appliziert.^[38]

In der IS wird nach dem Anlegen der Wechselspannung die komplexe Form des Widerstandes registriert, die als Scheinwiderstand oder Impedanz bezeichnet wird. Ein einfaches elektrochemisches System einer Elektrode in einer Elektrolytlösung weist dabei die Doppelschichtkapazität eines Kondensators und ohmsche Widerstände aus der Behinderung der Elektronenübertragung an der Phasengrenze (Ladungsdurchtrittswiderstand; R_{ct}) und dem Transport von Ionen in der Elektrolytlösung (R_{Lsg}) auf. Bei jeder Auf- und Umladung der Doppelschicht stellt der Kondensator einen Widerstand dar, der als kapazitiver Blindwiderstand bezeichnet wird. Analog wird nach dem Lenzschen Gesetz in einer Spule bei angelegter Spannung eine dieser entgegen gerichteten Spannung induziert, die als induktiver Blindwiderstand bezeichnet wird. Die Impedanz wird dabei meist in kartesischen Koordinaten aufgetragen, wobei auf der Abszisse die realen ohmschen Widerstandsanteile (Z') und auf der Ordinate die imaginären kapazitiven und induktiven Anteile (Z'') aufgetragen werden (vgl. Abbildung 6).

$$Z \angle \varphi = Z' + j \cdot Z'' \quad (12)$$

Je nach realen und imaginären Anteilen besitzt der Impedanzvektor Z eine bestimmte Richtung. Diese Phasenverschiebung φ beschreibt den Winkel des Vektors mit der Abszisse.

$$\tan \varphi = \frac{Z''}{Z'} \quad (13)$$

Die drei wesentlichen Bauelemente Widerstand, Kondensator und Spule weisen dabei charakteristische Frequenzabhängigkeiten auf. Der ohmsche Widerstand enthält auch im Wechselstromfall nur den realen Anteil R , da die Momentanwerte von Strom und Spannung zu jedem Zeitpunkt proportional sind und sich damit keine Phasenverschiebung und $\varphi = 0^\circ$ ergibt. Hingegen weist eine Spule mit der Induktivität L ein Blindwiderstand von $j\omega L$ auf. Hierbei ist ω die Kreisfrequenz. Es handelt sich um eine komplexe Größe mit $\varphi = 90^\circ$, sodass diese auf der imaginären Achse liegt. Im Falle eines Kondensators ergibt sich ein Blindwiderstand von $(j\omega C)^{-1}$, der also mit steigender Frequenz abnimmt. Hierbei eilt der Strom der Spannung voraus, sodass sich $\varphi = -90^\circ$ ergibt.

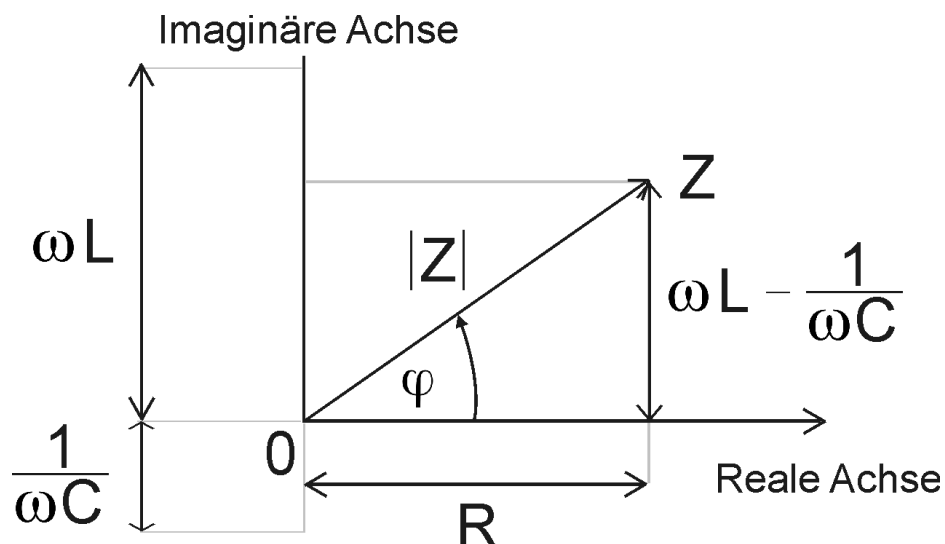


Abbildung 6: Darstellung der Impedanz einer Reihenschaltung eines ohmschen Widerstandes, einer Spule und eines Kondensators in der komplexen Ebene. [adaptiert von 39]

Die Bauelemente der Impedanz werden nachfolgend vektoriell addiert (vgl. Abbildung 6). Mit den Kirchhoffschen Regeln geht beispielsweise eine Reihenschaltung eines ohmschen Widerstandes, einer Spule und eines Kondensators in folgenden Ausdruck über:

$$|Z| = \sqrt{R^2 + \left(\omega L - \frac{1}{\omega C}\right)^2} \quad (14)$$

Auch unter dem Einsatz von UMEs kann IS zur Bildaufnahme mit dem SECM genutzt werden, jedoch wird hier meist bei einer festen Frequenz gearbeitet, was dann als *alternating current*-SECM (AC-SECM) bezeichnet wird.

2.3 Elektrochemische Rastermikroskopie

Die elektrochemische Rastermikroskopie (SECM) ist ein Vertreter der Rastersondentechniken und dient der Abbildung chemischer Reaktivitäten. Die Abkürzung SECM wird dabei sowohl für die Technik als auch für das Messinstrument verwendet. Damit ist die SECM eng mit der Rasterkraft- (AFM), Rastertunnel- (STM) und der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) verwandt. All diese Verfahren dienen der topographischen Kartographierung von Oberflächen. Das Auflösungsvermögen dieser Techniken geht dabei bis in den unteren pm-Bereich. Diese Verfahren haben gemein, dass die Abbildungen nicht wie bei den Techniken der optischen Mikroskopie durch Linsen, sondern durch Wechselwirkungen der Sonden mit den Proben entstehen. Daher muss die Sonde in einer rasterförmigen Bewegung über die zu untersuchende Probe geführt werden. In der SECM wird eine UME als Sonde verwendet. Als deutliche Abgrenzung zu SEM, STM

und den meisten AFM-Experimenten wird die SECM-Messung in Lösung bei Umgebungsbedingungen durchgeführt.

2.3.1 Aufbau des elektrochemischen Rastermikroskops

Die erste Idee zur Untersuchung von Oberflächen mit einer UME wurde 1986 von Bard beschrieben.^[40] Die erste detaillierte Publikation zum Aufbau eines SECM-Geräts ist von 1989.^[41] Ein SECM besteht im Wesentlichen aus einer elektrochemischen Messeinheit und dem Positioniersystem der Sonde. Als Sonde dient eine UME mit typischen Elektrodenradien von 2 nm bis 25 μm , die in einem Probenhalter fest eingespannt ist. Zur Grobpositionierung der Sonde stehen meist Schrittmotoren für jede Raumrichtung xyz vom mm- bis μm -Bereich zur Verfügung. Diese dienen zum Auffinden eines interessanten Ausschnitts innerhalb der zu untersuchenden Probe. Zur Feinpositionierung steht meist zusätzlich noch ein Piezoelement zur Verfügung, welches ein theoretisches Auflösungsvermögen besser 1 nm hat, jedoch nur eine maximale Auslenkung von einigen 10 μm zulässt. Daher ist für kleine Abbildungen bis etwa 30·30 μm^2 das Piezoelement dem Schrittmotor vorzuziehen und umgekehrt. Zur elektrochemischen Messung taucht die UME in der Messzelle in eine Lösung ein, die mindestens ein wässriges oder organisches Lösungsmittel und eine elektrochemisch konvertierbare Spezies enthält. Diese redoxaktive Substanz wird als Mediator bezeichnet, da durch die Menge an umgesetztem Mediator Informationen zwischen der Sonde und der Probe ausgetauscht werden. In den meisten Fällen ist zudem ein Leitelektrolyt in der Messlösung anwesend. Zur hochauflösenden Abbildung müssen Sonde und Substrat exakt orthogonal ausgerichtet sein. Daher befinden sich zur Substratausrichtung an der Unterseite der elektrochemischen Zelle beispielsweise Mikrometerschrauben oder es kommt ein automatisiertes System zur Ausrichtung des Substrates zum Einsatz.

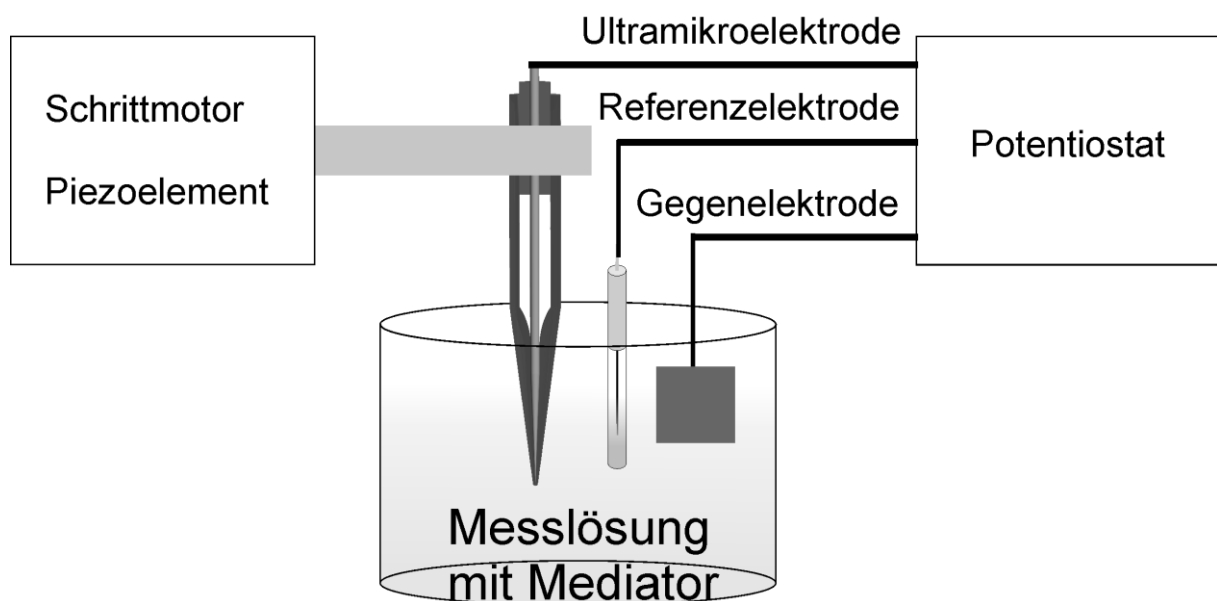


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines SECM.

Zur elektrochemischen Messung wird vom Potentiostaten ein Potential an der UME angelegt, sodass eine elektrochemische Umsetzung des Mediators erfolgt. Der resultierende Strom wird ebenfalls vom Potentiostaten erfasst. Bei SECM-Geräten mit einem Bipotentiostaten kann unabhängig auch eine zweite Arbeitselektrode kontrolliert werden. Da die gemessenen Ströme typischerweise im nA- bis pA-Bereich liegen, sind wichtige technische Anforderungen an den (Bi)Potentiostaten ein sehr gutes Nachweisvermögen, ein geringes elektronisches Rauschen und eine gute Rauschkompensation durch geeignete Tiefpassfilter.

2.3.2 SECM-Sonden

Klassische Sonden für die SECM bestehen aus einem Edelmetalldraht oder einem anderen leitfähigen Material wie Kohlenstoff, welche in Glas^[42], oder anderen Isolatoren wie Polymeren^[43], eingebettet sind.^[16] Konkret werden häufig Kohlefaser-UME für oxidative Umsetzungen organischer Moleküle^[44-46] in biologischen Umgebungen und Pt-UME für oxidative und reduktive Prozesse eingesetzt.^[47-53] In Abbildung 8 ist der schematische Aufbau einer UME gezeigt. Ausgehend von der höchsten Vergrößerung ist eine verjüngte Elektrode erkennbar, die in einem Isolator gebettet ist. Zur Minimierung von mechanischen Kontakten zwischen UME und Substrat während des Abbildungsvorgangs ist eine möglichst kleine konische Struktur des Isolators an der Sondenspitze, also ein kleiner RG-Wert, vorteilhaft.

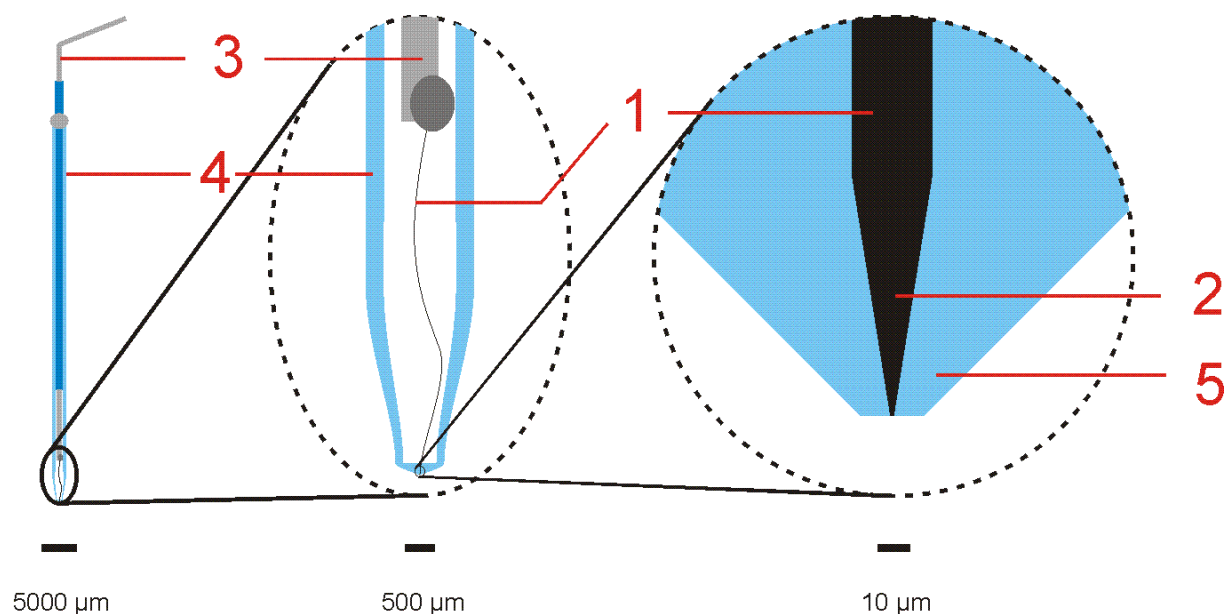


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer UME mit einem RG-Wert von 10 bei drei verschiedenen Vergrößerungen. Herzstück der Sonde ist ein 25 µm Pt-Draht (1) der an der Spitze stark verjüngt ist (2) und in einer Glaskapillare (4) mit konischer Geometrie am Sondenende (5) eingefasst wurde. Zur Kontaktierung des Pt-Drahtes ist dieser an einen Cu-Draht (3) gelötet.

Die laterale und vertikale Auflösung des SECM und insbesondere die Qualität der Bilder hängen stark von der Größe und Qualität der Sonde ab. Daher ist der Fertigungsprozess der wichtigste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Arbeit mit dem SECM. Da sich die Auflösung allgemein bei Verwendung kleinerer Sonden verbessert, ist es vernünftig Elektrodenmaterialien mit möglichst kleiner Dimensionierung zu verwenden. Hierbei sind Pt-Drähte als Volldrähte bis hinunter zu 5 µm Durchmesser kommerziell erhältlich, darunter bis 0,6 µm nur in Form von Wollastondrähten. Letztere sind mit einem Silbermantel versehen, der zuvor entfernt werden muss. Bei der Verwendung von Pt-Volldraht muss dieser für hochauflösende Darstellungen vor dem Einbetten in den Isolator konisch verjüngt werden. Eine sehr robuste Methode ist das elektrochemische Ätzen eines Pt-Drahtes in einer Ätzlösung, bestehend aus gesättigter CaCl_2 (60%), konzentrierter HCl (4%) und H_2O (36%). Nachfolgend wird der Pt-Draht in Natron-Kalk-Glas eingeschmolzen.^[42] Dieser Glastyp ist durch fast identische thermische Ausdehnungskoeffizienten im Vergleich zum Pt besonders geeignet, um eine möglichst gute Einbettung zu erreichen (vgl. Tabellen 1 und 2). Daneben gibt es wenige Arbeiten, in denen ein zylindrisches Ätzverfahren (von C-Fasern) durchgeführt wurde^[54], wodurch polierbare UMEs mit konstantem Durchmesser entstehen. Der Vorteil des konischen Ätzens liegt hier jedoch in einem deutlich kleineren erreichbaren Durchmesser und insbesondere einer höheren mechanischen Stabilität des verjüngten Elektrodenmaterials. In neueren Arbeiten werden UMEs meist ausschließlich mit Hilfe eines Kapillarziehgerätes gefertigt, bei denen ein in Glas eingeschmolzener 25 µm Pt-Draht durch thermische Erhitzung mit einem Laser bis auf 2 nm^[55] bei variablem RG-Wert ausgezogen wird.^[56,57]

Unbehandelte Kohlefasern haben typische Durchmesser zwischen 5-12 µm und müssen daher ebenfalls in ihrem Durchmesser wesentlich verkleinert werden. Dabei kann durch Flammen-^[58], elektrisches^[59] oder elektrochemisches^[60,61] Ätzen, sowie durch Mahlen mit einem Ionenstrahl^[62] der Durchmesser der Faser bis auf unter 100 nm verkleinert werden. Insgesamt betrachtet ist die Fertigung von kleinen C-Faser-UMEs sehr viel schwieriger und mit einer hohen Ausschussrate behaftet. Dies liegt zum einen an der geringen thermischen Stabilität von C, da hier eine thermische Beanspruchung unter Anwesenheit von O_2 zur Bildung von CO_2 führt und damit die Elektrode unbrauchbar macht. Zum anderen weicht der thermische Ausdehnungskoeffizient von C stark von dem von Glas ab, sodass sich das erhitzte, fließende Glas eng um die C-Faser schmiegt, beim Erkalten jedoch unweigerlich ein Spalt zwischen C-Faser und Glas entsteht. Daher werden C-Faser-UMEs häufig auch in Polymeren eingebettet.^[63] Nachfolgend sind Tabellen mit den thermischen Ausdehnungskoeffizienten und Glasübergangstemperaturen der verwendeten Gläser, sowie der genutzten Elektrodenmaterialien aufgelistet.

Glastyp	Glasübergangstemperatur [°C]	Erweichungstemperatur [°C]	Linearer Ausdehnungskoeffizient [K ⁻¹]
Natron-Kalk-Glas	550	1040	9,0·10 ⁻⁶
Borosilikatglas	550	1260	3,1·10 ⁻⁶
Bleiglas	430	820	9,1·10 ⁻⁶

Tabelle 1: Verschiedene Kenngrößen der zum Einschmelzen von Elektrodenmaterialien verwendeten Gläser.

Elektrodenmaterial	Schmelztemperatur [°C]	Linearer Ausdehnungskoeffizient [K ⁻¹]
Pt	1768	8,8·10 ⁻⁶
Ag	962	19,0·10 ⁻⁶
C	3432 (Sublimation)	0,8·10 ⁻⁶

Tabelle 2: Verschiedene Kenngrößen der verwendeten Elektrodenmaterialien.

Eine weitere Kategorie von SECM-Sonden bilden die optischen Faserelektroden, bei denen ein Lichtleiter aus Quarzglas mit einem Kapillarziehgerät konisch verjüngt wird. Folgend wird die Spitze der Faser mit einem Edelmetall besputtert und mit einer isolierenden Schicht bedeckt. Durch Polieren der Sondenspitze wird eine ringförmige Elektrode um den Lichtleiter freigelegt.^[55,64] Damit zugängliche Elektrodendurchmesser liegen bei etwa 100 nm. Der Vorteil dieser Elektrodenart liegt in der simultanen Aufnahme elektrochemischer (Ringelektrode) und optischer (Lichtleiter) Informationen über die Probe, welche grundsätzlich komplementärer Art sind.

Eine eng mit der SECM verwandte Technik ist die Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (*scanning ion conductance microscopy*, SICM) welche Kapillaren mit Öffnungsdurchmessern unter 1 µm verwendet.^[65] Hierbei wird eine hohle Glaskapillare mit einem Kapillarzieher ausgezogen, mit einem Elektrolyten gefüllt und von der Rückseite mit einem Ag/AgCl-Draht versehen. Die Messung der Ionenleitfähigkeit zwischen der inneren und einer zweiten Referenzelektrode in der elektrochemischen Zelle ist resistiver Art. Da kein Mediator in der Messlösung anwesend ist, laufen hierbei keinerlei Faradaysche Umsetzungen ab. Somit ist diese Methode für biochemische Experimente sehr gut geeignet. Zur Studie der Topographie und elektrochemischen Aktivität, kann zudem eine Ringelektrode um die Kapillaröffnung konstruiert werden.^[66]

2.3.3 Charakterisierung der Sonden in der SECM

Schon während der Fertigung und auch als Qualitätskontrolle am Ende dient die Aufnahme von CVs in Messlösungen mit Mediatorzusatz als wichtigste Methode zur Charakterisierung

der UMEs. Hierbei kann mit Gln. (8) der aktive Elektrodenradius aus $I_{T, \infty}$ bestimmt werden. Liegen die beiden Kurvenäste von Vor- und Rückwärtsscan auch bei niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten ($v = 20$ mV/s) nicht übereinander, ist dies ein Hinweis auf eine schlechte Einbettung der Elektrode. Bei einer schlechten Einbettung kommt es aufgrund der höheren Oberfläche bei einer Potentialänderung zu größeren kapazitiven Strömen, welche dann den Faradayschen Anteil überlagern. Als weitere schnelle Charakterisierungsmethode sollten Annäherungskurven (PACs) aufgenommen werden. Um einen ausreichenden Kontrast zu gewährleisten, sollte sich die UME auf mindestens 50% $I_{T, \infty}$ annähern lassen. Durch Gln. (15) bzw. Gln. (16) können nachfolgend die RG-Werte bestimmt werden und mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme verglichen werden. Insbesondere bei sehr kleinen Elektroden ist das Auflösungslimit der optischen Mikroskopie erreicht, sodass dann auf eine SEM-Aufnahme ausgewichen werden muss. Zudem können bei aktiven Elektrodenradien im nm-Bereich Oberflächendefekte eine entscheidende Rolle im Verhalten der UME spielen. Hier kann durch AFM die Topographie der Elektrode eingehender untersucht werden, um auszuschließen, dass die aktive Elektrode relativ zur isolierenden Schicht hervorsteht oder zurückgesetzt ist.^[67]

2.3.4 Elektrochemische Mediatoren

Die elektrochemischen Mediatoren dienen dem Elektronentransport an der Grenzfläche UME/Messlösung. Bei diesen handelt es sich um kleine Moleküle, die sich im Solvens ausreichend lösen und vor allem elektrochemisch gut umzusetzen sind. Hierbei ist ein schneller, reversibler 1-Elektronentransfer innerhalb des elektrochemisch zugänglichen Fensters von Vorteil. Die beiden in dieser Arbeit am häufigsten eingesetzten Mediatoren waren FcMeOH und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, welche sich in ihren chemischen Eigenschaften stark unterscheiden.

2.3.5 Messprinzipien in der SECM

Grundsätzlich gibt es in der SECM verschiedene Messprinzipien, wie den Rückkopplungs-Modus oder den Generator/Kollektor-Modus.^[68] Bei letzterem wird ein Bipotentiostat verwendet, um den in der Lösung anwesenden Mediator zwischen einer Generator- und einer Sammlerelektrode, wobei eine von diesen die UME ist, immer wieder zu regenerieren. Damit wird der Mediator im Kreislauf gefahren, wodurch sehr hohe Ströme erreicht werden. Die Effizienz der Mediatorregenerierung nimmt dabei mit abnehmendem Abstand von UME und der zweiten Elektrode zu, sodass bei Annäherung der UME eine stetig ansteigende Strom-Abstand-Kurve erhalten wird. Die weitaus häufigere Methode ist der Rückkopplungsmodus, bei dem nur die UME einen Potentialaufschlag erfährt, sodass ein Bipotentiostat hier keine apparative Voraussetzung darstellt. Grundsätzlich wird in positive und negative Rückkopplung unterschieden (Vgl. Schema in Abbildung 9). Die negative

Rückkopplung tritt bei Annäherung an jede Art von Oberfläche auf und ist auf eine Blockierung des Flusses an Analytmolekülen (meist der Mediator) zur Elektrode zurückzuführen. Hierbei gilt $I_T < I_{T, \infty}$. Dieser Effekt tritt erst ab einer Distanz von fünf Elektrodenradien auf, sodass dieser Abstand den maximalen Arbeitsabstand der UME vom Substrat in der SECM beschreibt. Außerhalb dieses Abstandes wird an der UME stets der stationäre Stromwert erreicht, sodass ab diesem Abstand keine topographischen Informationen zur Probe mehr gewonnen werden können. Um verschiedene UMEs qualitativ miteinander zu vergleichen wird jeder Strom I_T auf den stationären Bulkstromwert $I_{T, \infty}$ normiert. Ebenso wird die Distanzachse (Abszisse) auf den aktiven Elektrodenradius normiert. Die so erhaltene Strom-Abstand-Kurve wird als PAC bezeichnet. Die Form der PACs ist dabei nicht linear, sondern nimmt über einem nicht-leitenden Substrat am Anfang allmählich, mit geringerer Distanz zum Substrat immer stärker, ab. Da die Ableitung der PAC der Empfindlichkeit der Methode entspricht, gibt es in der SECM grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Erhöhung der Auflösung: Zum einen kann eine kleinere UME kleinere Oberflächenstrukturen auflösen, zum anderen nimmt die Auflösung mit abnehmenden Abstand der UME zur Probe zu.

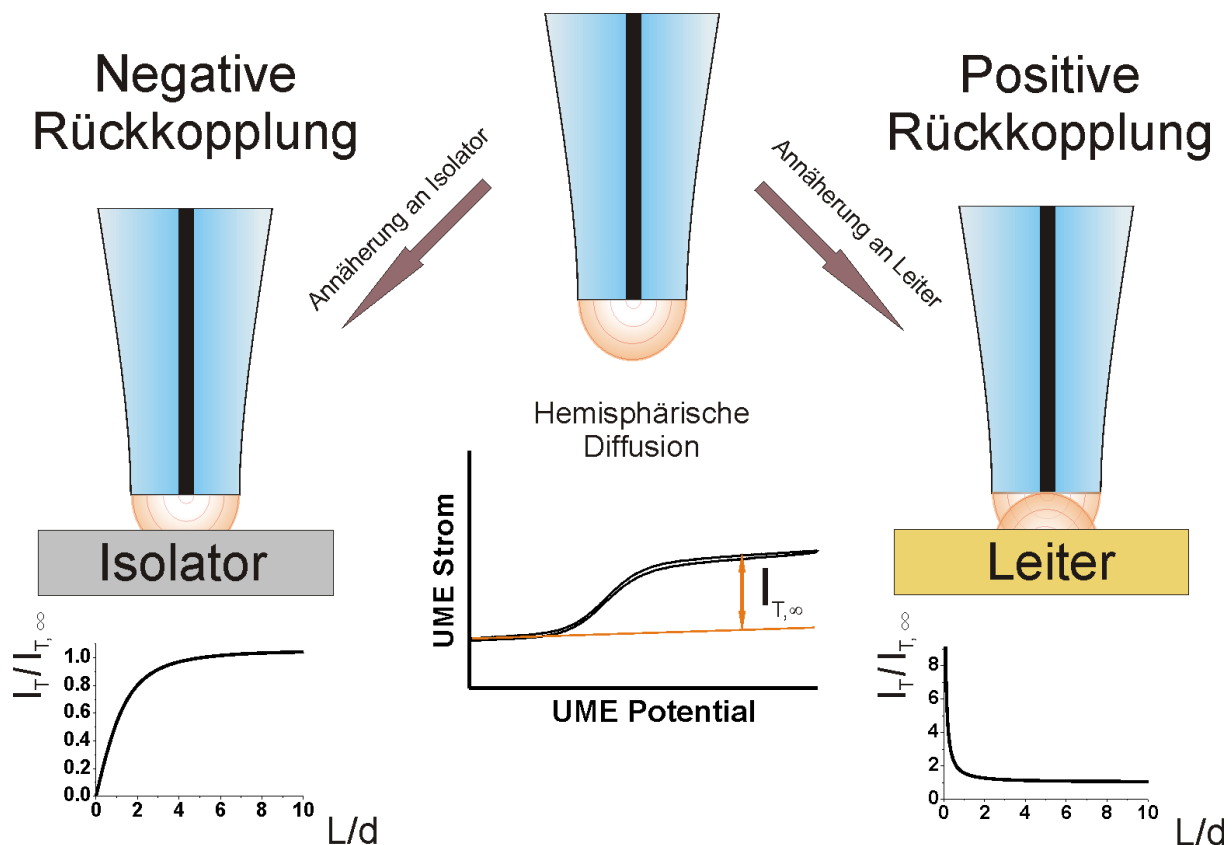


Abbildung 9: Schema zur positiven und negativen Rückkopplung von UMEs über Oberflächen mit den zugehörigen PACs ^[adaptiert von P4].

Jedoch wird das gesteigerte Auflösungsvermögen von der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Beschädigung der UME durch das Aufsetzen auf der Probe konterkariert, sodass eine Probe mit starken topographischen Details nicht ohne weiteres mit einer sehr kleinen UME untersucht werden kann. Insbesondere eine starke Annäherung der UME auf $I_T/I_{T, \infty} \leq 50\%$, also eine Annäherung auf weniger als 50% des Stromwertes der Bulkphase, stellt eine große Herausforderung dar. Neben der negativen Rückkopplung tritt die positive Rückkopplung nur über leitenden Oberflächen auf, welche den an der UME umgesetzten Mediator regenerieren können. Hierbei muss der Leiter mit dem Mediator Elektronen tauschen und daher als eine bipolare Oberfläche fungieren können. Durch die Zyklisierung des Mediators zwischen UME und der zweiten leitenden Oberfläche tritt eine Stromerhöhung bei Annäherung auf, so dass gilt: $I_T > I_{T, \infty}$. Da ähnlich wie beim Generator/Kollektor-Modus die Effizienz der Mediatorzyklisierung mit abnehmendem Abstand zunimmt, wird insgesamt eine ansteigende PAC erhalten. Die theoretische Beschreibung der Annäherungskurven wurde in den letzten Jahren sukzessive verbessert, um insbesondere verschiedene RG-Werte zu berücksichtigen. Die momentan aktuellsten Varianten sind in den folgenden Gleichungen für die negative Rückkopplung (Gln. (15)) und für die positive Rückkopplung (Gln. (16)) angegeben.^[18]

$$\frac{I_T}{I_{T, \infty}} \approx \frac{\frac{2,08}{RG^{0,358}} \left(L - \frac{0,145}{RG} \right) + 1,585}{\frac{2,08}{RG^{0,358}} \left(1 + 0,0023 RG \right) \left[1,57 + \frac{\ln RG}{L} + \frac{2}{\pi RG} \ln \left(1 + \frac{\pi RG}{2L} \right) \right]} \quad (15)$$

$$\frac{I_T}{I_{T, \infty}} \approx \alpha \left[\frac{1}{\beta} \frac{\pi}{4 \text{ArcTan} L} + \left(1 - \alpha \right) \frac{1}{2\beta(RG)} \right] \frac{2}{\pi} \text{ArcTan} L \quad (16)$$

$$\text{mit } \alpha = \ln 2 + \left(1 - \frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG} \right) - \ln 2 \left[1 - \left(\frac{2}{\pi} \text{ArcCos} \frac{1}{RG} \right)^2 \right]$$

2.3.6 SECM-Abbildungsverfahren

Grundsätzlich werden in der SECM mit Rückkopplungsmodus zwei Abbildungsverfahren unterschieden: Im sogenannten *constant-height*-Modus wird die UME in einer definierten Ebene lateral über das Substrat geführt. Die zweite Möglichkeit ist der *constant-distance*-Modus, bei dem über einen Rückkopplungsmechanismus die UME in einem definierten Abstand über die Probe geführt wird. Die Positionen der Sonde bei beiden Mechanismen mit den jeweiligen neuralgischen Punkten während der Bildgebung sind am Beispiel von Einzelzellen und Zellmonoschichten als Substrate in Abbildung 10 gezeigt. Beide Verfahren ergänzen sich dabei in deren Anwendungen: Wenn ein Substrat über starke topographische

Details verfügt, ist der *constant-distance*-Modus eindeutig dem *constant-height*-Modus vorzuziehen, da bei letzterem die topographisch höchst liegenden Strukturen zwar mit ausreichendem Kontrast abgebildet werden können, die tiefer liegenden Strukturen jedoch schnell außerhalb des maximalen Arbeitsabstandes von $5 r$ sind.

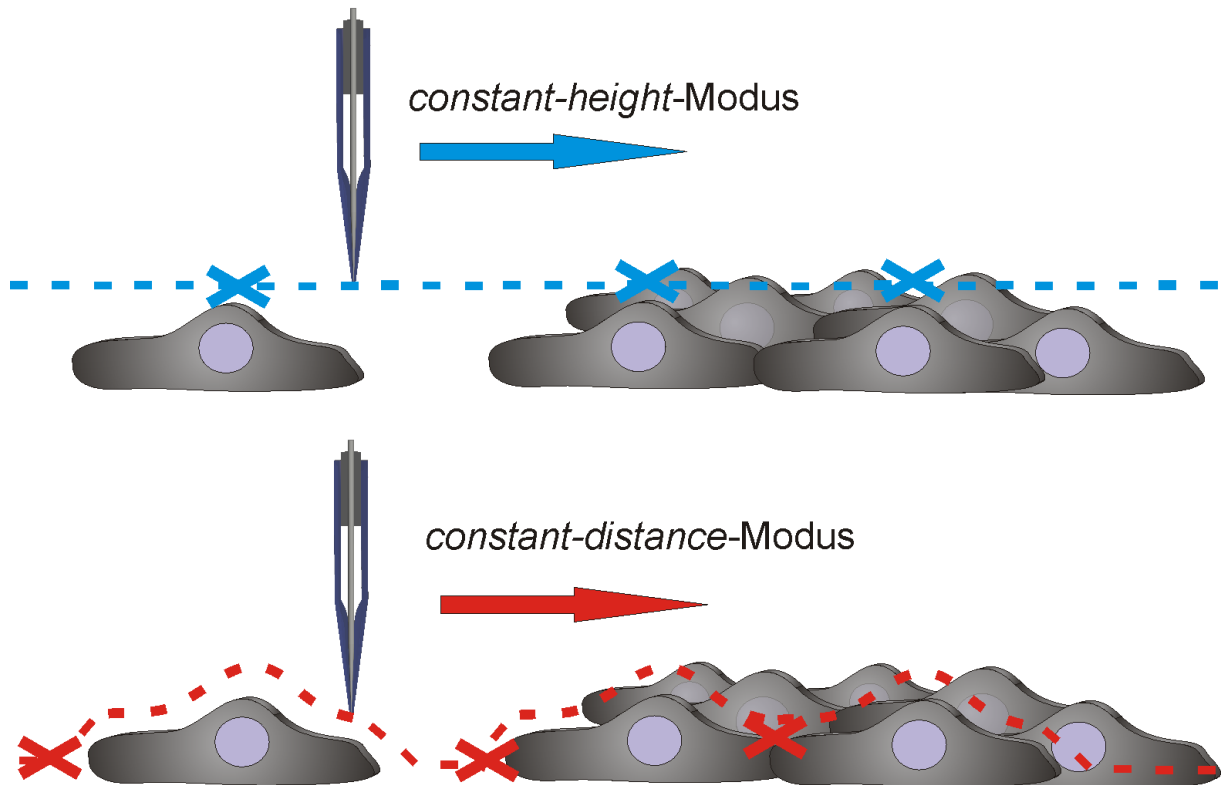


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Abbildungsverfahren *constant-height*- (oben) und *constant-distance*-Modus (unten) bei der Abbildung von Einzelzellen (links) und von Zellmonoschichten (rechts). Die gestrichelten Linien zeigen die Positionen der UMEs während der Bildgebung. Die Kreuze zeigen mögliche Kollisionspunkte der UME mit den Substraten. Die Größen der UMEs sind nicht im Maßstab zu den Zellen. ^[adaptiert von P4]

2.3.6.1 SECM-Studien lebender Zellen im *constant-height*-Modus

Der *constant-height*-Modus wurde bereits in den Anfangsjahren der SECM zur Studie lebender Zellen angewandt. Eine Übersicht über bereits publizierte Arbeiten mit Stand Ende 2012 findet sich hier.^[P4] Mit Hilfe dieser Technik wurden vielfach elektrochemisch gut detektierbare Analyte wie O_2 ^[69-71], reaktive Sauerstoffspezies^[72] oder Mediatoren wie FcMeOH^[73] oder Menadion^[74] in verschiedenen Tier- und Pflanzenzellen bestimmt. Neben den amperometrischen Arbeiten wurden Einzelzellen auch mittels AC-SECM abgebildet, bei dem ein an der UME aufgeschlagenes konstantes Potential mit einem hochfrequenten alternierenden Potential überlagert wird.^[75] Da es sich bei der gemessenen Impedanz um einen komplexen Widerstandswert handelt, ist die Interpretation der Daten ähnlich wie bei der SICM. Im Vergleich zu zellfreien Regionen wird über einer Zelle ein höherer

Gesamtwiderstand beobachtet, da der Stromfluss behindert wird. Analog zur SICM muss kein Mediator in der Messlösung vorhanden sein, da keine Faradayschen Ströme gemessen werden. Der wesentliche Unterschied zur SICM besteht in den verwendeten Sonden, da bei letzterem Kapillaren zum Einsatz kommen, bei der AC-SECM jedoch UMEs, die auch in den amperometrischen Experimenten eingesetzt werden können.

Da im *constant-height*-Modus die Sonde nicht bei jedem Bildpunkt in ihrer vertikalen Position neu angepasst werden muss, können hier dynamische Prozesse mit höherer Zeitauflösung beobachtet werden. Im Umkehrschluss kann im *constant-distance*-Modus bei gleicher Bildaufnahmezeit die Anzahl an Bildpunkten pro Linie höher gewählt werden. Dies ist gleichbedeutend mit einer höheren nominellen Auflösung. Falls also alle topographischen Details im Substrat innerhalb des UME-Fokus liegen, ist der *constant-height*-Modus vorzuziehen.

Jedoch können mit dieser Methode Substrate mit hoher Topographie nicht hochauflösend dargestellt werden, da die Tiefenschärfe in der SECM auf $5r$ beschränkt ist. Zur Verdeutlichung kann folgendes Beispiel herangezogen werden: Bei Verwendung einer UME mit $r = 0,5 \mu\text{m}$ lassen sich also ausgehend von der Scanebene der UME maximal $2,5 \mu\text{m}$ in Richtung des Substrates auflösen. Bei allen Bereichen, die tiefer liegen, wird der Stromwert $I_{T, \infty}$ angezeigt, was einer Nivellierung der tiefer liegenden Topographie entspricht. Da Einzelzellen typische Höhen von $5\text{-}15 \mu\text{m}$ ^[76] aufweisen, kann somit die gesamte Zellmorphologie nicht hochauflösend dargestellt werden. Jedoch stellt gerade der *constant-height*-Modus eine attraktive Alternative zur Studie konfluenter Zellmonoschichten dar, da hier zwischen den topographisch am höchsten liegenden Punkten über den Zellkernen und den am tiefsten liegenden Punkten in den Zell-Zell-Kontakten nur etwa $2,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ^[P2] liegen. Die laterale Ausdehnung dieser Zell-Zell-Kontakte lässt sich dagegen durch die konvergierende Struktur nicht genau quantitativ beschreiben. Durch die von der Seite betrachtet tafelförmigen Strukturen der Zell-Zell-Kontakte kommt es beim *constant-distance*-Modus bei geringen Abständen von wenigen 100 nm zu Problemen, wenn die Positioniereinheit die Sonde auch in den Zell-Zell-Kontakten bis auf diese geringen Abstände annähert (s. Abbildung 10). Analog führt das Abbilden poröser Substrate mit durchgehenden Poren aufgrund der eben angeführten Argumentation zu experimentellen Problemen.

2.3.6.2 SECM-Studien lebender Zellen im constant-distance-Modus

Bereits realisierte Rückkopplungsmechanismen basieren auf der Messung des Elektrolysestroms^[77] bei der Umsetzung des Mediators, welcher auch als *constant-current*-Modus bezeichnet wird. Zudem sind Messungen der zwischen dem Substrat und der bewegten Sonde auftretenden Scherkräfte oder der Messung der Ionenleitfähigkeit bekannt.^[78-80] Als kleinerer Nachteil der *constant-distance*-Modi sind die erhöhten

apparativen Anforderungen zu nennen, da der zur Sondenführung benötigte Rückkopplungsmechanismus auch als potentielle Fehlerquelle betrachtet werden muss. Zudem können sich Varianzen im Abstand der UME vom Substrat durch lokale Abweichungen der dem Rückkopplungsmechanismus zu Grunde liegenden PACs ergeben. Eine ungenügende Abstandskontrolle kann dabei zu einem mechanischen Kontakt mit der Probe und damit zu Bildartefakten oder zur Beschädigung der Sonde führen. Zudem ergeben sich Probleme bei der Untersuchung von Substraten mit stark variierender Topographie und elektrochemischer Aktivität, da beide Effekte die Positionierung der Sonde beeinflussen und auch gegenläufig sein können. Dieses Problem wurde früh erkannt und es wurden Distanzregulierungen eingeführt, die sich auf Strom-unabhängige Messgrößen beziehen.

2.3.6.3 SECM-Studien mit Elektrolysestrom-unabhängigen constant-distance-Modi

In einigen Arbeiten wurde eine AFM-Spitze mit einer (bandförmigen) Elektrode versehen^[81-83], welches auch als AFM/SECM bezeichnet wird. Dies ist einerseits vorteilhaft, da hier auf die technisch ausgereiften Positioniereinheiten kommerzieller AFM-Geräte zurückgegriffen werden kann. Zudem wird eine für die SECM vollkommen ausreichende Auflösung im nm-Bereich erreicht. Andererseits basiert die AFM auf einem direkten Kontakt zwischen Sonde und Substrat. Dabei können Abbildungsartefakte insbesondere bei mechanosensitiven Substraten wie Zellen auftreten.^[84] Eine andere Möglichkeit zur Abstandsregulierung greift auf hydrodynamische Scherkräfte zurück, welche über sehr kleine Distanzen (100 – 300 nm) zwischen bewegter Sonde und der Messlösung infolge von Reibung entstehen. Apparativ wird die Sonde durch ein Piezoelement^[85] oder eine Art Stimmgabel^[86] in eine vertikale Schwingung versetzt, welche durch Reibung mit der die Sonde umgebenden Flüssigkeit gedämpft wird. Die Dämpfung der Amplitude wird anschließend optisch durch einen Laser oder durch einen phasenempfindlichen Gleichrichter registriert.^[87] Hierbei ergeben sich jedoch Empfindlichkeitsprobleme, da die Scherkraft nicht nur selektiv zwischen der aktiven Elektrode und der Lösung, sondern von der gesamten in die Lösung eintauchenden Sonde herrührt.^[88] Zusätzlich wird häufig ein Drift der gemessenen Scherkraft beobachtet, der aber durch wiederholte Abgleichung des Messsignals auf den Untergrund entfernt werden kann.^[89] Eine weitere Methode ist die Kopplung von SECM/SNOM (*scanning near-field optical microscopy*, SNOM), bei der optische Faserelektroden zum Einsatz kommen. Hierbei dienen der Elektrolysestrom^[90], die Scherkräfte^[85,86] oder eine mechanische Barriere zwischen Elektrode und der Sondenspitze, durch Anschleifen der Sonde auf Winkel von 45° – 60°^[91], der Distanzregulierung. Dabei sind bei letzterer Methode, in Folge der schrägen Elektrode, die Diffusionsprofile auf beiden Seiten nicht gleich. Daraus ergeben sich verschiedene Abstandsabhängigkeiten, wodurch die Transformation eines Stromwertes in reale Topographie unmöglich ist. Die in letzter Zeit hervorgebrachte Kombination von

SECM/SICM stellt eine vielversprechende Methode zur Charakterisierung lebender biologischer Objekte dar. Der Vorteil zur SECM liegt in der mediatorfreien Abbildung, da hier der Lösungswiderstand gemessen wird. Zudem besteht im Gegensatz zur AFM kein direkter Kontakt zum Substrat. Durch die kleinen Kapillaröffnungen liegen die erreichbaren lateralen Auflösungen bei der Abbildung lebender Zellen bei unter 1 μm .^[92] Durch die Verwendung von Sonden mit Durchmessern kleiner 100 nm ergeben sich große apparative Probleme bei der Abbildung von Zellen durch das sehr kleine Diffusions- oder Ionenleitfähigkeitsprofil, sodass es hier häufig zur Kollision der Sonden in Vertiefungen und insbesondere beim Übergang von einer Zelle zur nächsten kommt (Vgl. Abbildung 10). Zur Lösung dieses Problems wird vor jedem Bildpunkt eine PAC von einer festgelegten Referenzebene aus gefahren (*hopping probe ion conductance microscopy*; HPICM).^[93] Durch die wiederholten Annäherungen werden größere topographische Details oberhalb der aktiven Elektrode erkannt und damit ein Sondenkontakt zum Substrat verhindert, andererseits werden Driftprozesse eliminiert. Mittels HPICM wurden extrazelluläre Filamente von Haarzellen abgebildet, die einen Durchmesser von weniger als 20 nm aufwiesen.^[92] Hierbei wurden die Limitierungen bei der Abbildung vertikaler oder mechanosensitiver Strukturen aufgezeigt, die nicht unmittelbar zur Beschädigung der Sonde, aber zu Abweichungen im Abstand zum Substrat führen. Zudem wurden Nieren- (A6) und Nervenzellen (SCG) durch eine HPICM-Abstandsregulierung abgebildet.^[66] Außerdem wurden Membranproteine in A431 Zellen abgebildet.^[45]

2.4 Konfluente Zellmonoschichten

Die Zelle ist die kleinste lebende Einheit höher entwickelter Organismen. Innerhalb des Körpers haben sich verschiedene Zelltypen entwickelt, die sich je nach Anforderungen in Morphologie und Aufbau unterscheiden. Um die vielfältigen Aufgaben im Organismus durchzuführen, agieren die Zellen jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern leisten durch konzertierte Aktionen einen Mehrwert. Die Koordination der Aktionen kann dabei mechanisch durch einen direkten Kontakt, chemisch durch die Kommunikation zwischen zwei Zellen über ausgetauschte Botenstoffe oder durch die direkte Übertragung elektrischer Signale erfolgen. Die Interaktionen zwischen zwei Zellen oder einer Zelle mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix, werden allgemein als Zell-Kontakte bezeichnet.^[94] Im Organismus dienen diese der mechanischen Stabilisierung von Gewebe, als Barriere der freien Diffusion entlang der Zellgrenzen und zum direkten Austausch von Molekülen und Ionen zwischen Nachbarzellen. Die mechanische Stabilität von Zellen wird dabei durch Verknüpfungen zwischen den Zellen durch die Schlussleiste (*tight junction*), *adherent junctions*, Desmosomen, Hemidesmosomen und die fokalen Adhäsionen bedingt.^[95] Die besondere Eigenschaft der Epithelzellen, die Kontrolle oder gar das Unterbinden der freien Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen apikaler und basaler Seite, basiert ausschließlich auf der Schlussleiste. Diese liegt auf apikaler Zellseite und hat eine

laterale Ausdehnung von etwa 200 nm. Je nach Lokalität der Zellen im Körper können diese den Transport von Xenobiotika sehr effektiv kontrollieren, wie beispielsweise in der Blut-Hirnschranke. Je nach physiologischen Anforderungen im Körper besitzen Zellen jedoch auch signifikant geringere Barrierefunktionen.^[96] Die Struktur der Schlussleiste ist noch Gegenstand der heutigen Forschung, jedoch ist ihr Aufbau heterogen und umfasst mindestens die Transmembranproteine Occludin, sowie andere Claudine und die peripheren Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3.^[97] Für die direkte Kommunikation zwischen Nachbarzellen sind im Wesentlichen chemische Synapsen und *gap junctions* verantwortlich. Der schematische Aufbau der Zell-Kontakte in Epithelzellen ist in der folgenden Abbildung 11 dargestellt.

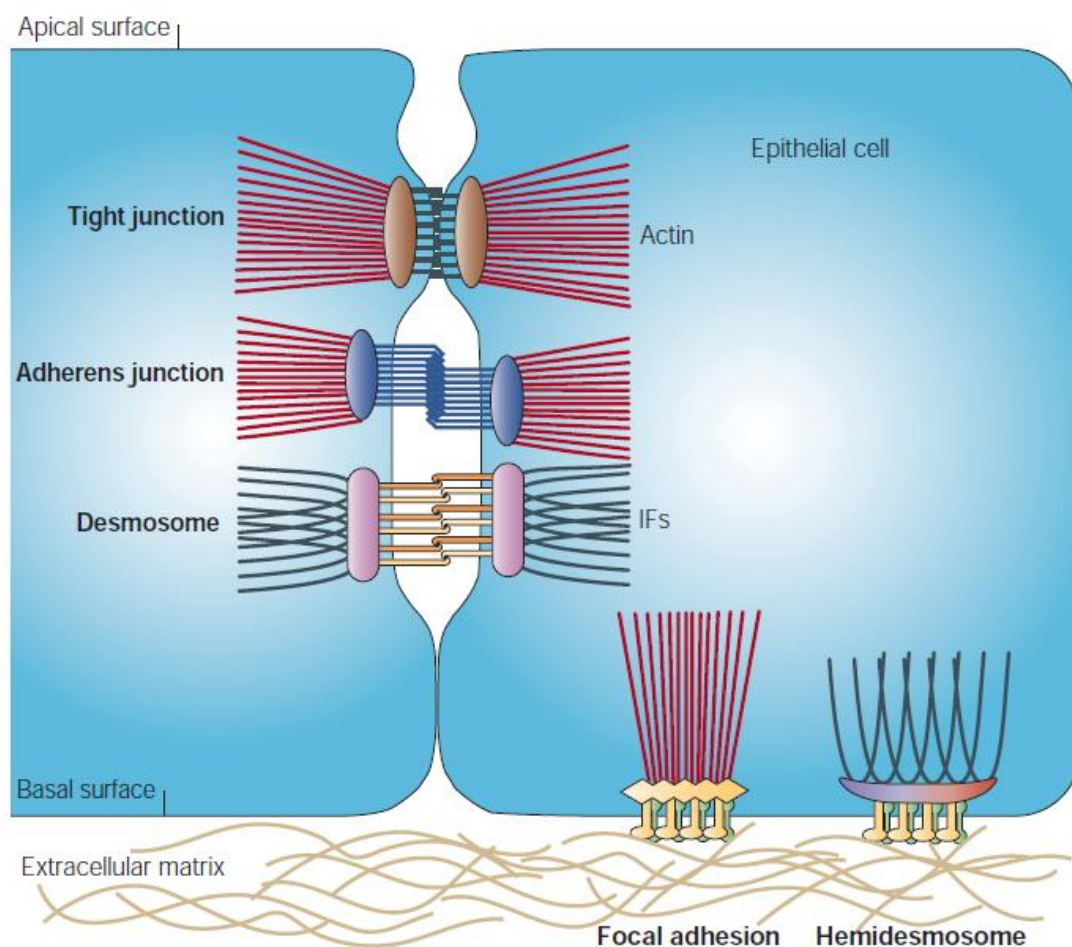


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Zell-Zell-Kontaktes zweier adhärierter Epithelzellen mit den wichtigsten Transmembranproteinen und Adhäsionsrezeptoren wie *tight junction*, Desmosome und Fokalfunkte. Die davon ausgehenden Linien stellen Adapterproteine wie Actin oder *intermediate filaments* (IF) dar, welche die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verbinden.^[98]

Die direkte Studie der Zell-Kontakte mit einer Rastersondentechnik ist sehr anspruchsvoll, da diese nur geringe Ausdehnungen aufweisen und wie die fokalen Adhäsionen auf diese

Weise überhaupt nicht zugänglich sind. Daher wurden die Zell-Kontakte mittels nicht-mikroskopischer Techniken wie der Interferenzreflexionsmikroskopie^[99], der Quarzkristallmikrowaage^[100] oder ECIS^[101] studiert.

3 Eigene Publikationen

Teile der folgend angeführten Originalpublikationen bilden die Basis der im nachfolgenden Abschnitt zusammengestellten Ergebnisse und deren Diskussion. Zur klaren Hervorhebung bereits publizierter Teile der Arbeit werden diese mit einer eigenen Zitation [P1] - [P4] versehen.

[P1] Bergner S; Palatzky P; Wegener J; Matysik F-M (2011) *Electroanalysis* 23:196-200

High-resolution imaging of nanostructured Si/SiO₂ substrates and cell monolayers using scanning electrochemical microscopy.

Abstract:

High-resolution scanning electrochemical microscopy (SECM) in the constant-height mode was applied to image details of a nanostructured porous substrate as well as a confluent epithelial cell monolayer. Platinum disk ultramicroelectrodes (UMEs) with radii down to 100 nm were fabricated by sealing electrochemically etched Pt wires into soda-lime glass capillaries. A subsequent thermal treatment was used to improve the quality of electrode sealing. The size and shape of the SECM probes were adapted to the requirements of the inorganic and biological surfaces to enable high-resolution SECM imaging and to ensure stability and reliability during image acquisition. A mesoporous substrate (Si/SiO₂) with 800 nm rectangular pores was imaged with sub- μm resolution. In addition, confluent epithelial cell monolayers derived from kidney were investigated. Independent measurements with ferrocene methanol and hexamine ruthenium (III) chloride led to equivalent SECM results. High quality SECM images with well separated cells within the monolayer were obtained. Resolved regions of cell-cell contacts extending about 1–3 μm in lateral direction were imaged.

[P2] Bergner S; Wegener J; Matysik F-M (2011) Anal Chem 83:169-174.

Simultaneous Imaging and Chemical Attack of a Single Living Cell within a Confluent Cell Monolayer by Means of Scanning Electrochemical Microscopy

Abstract:

Epithelial cell monolayers from rat kidney were imaged by scanning electrochemical microscopy (SECM) with sub-micrometer resolution in both lateral and vertical direction. Platinum disk ultra-microelectrodes (UMEs) with effective electrode radii between 200 and 600 nm were operated in the constant-height mode. The quality of the recorded SECM images compare favorably with those of phase contrast and confocal laser scanning microscopy. Besides the acquisition of SECM images, the UME was used to selectively attack a single living cell within the monolayer ensemble. Hydroxide ions were locally generated in the vicinity of a single target cell by the UME. The increase in pH induced cell necrosis that was subsequently imaged by SECM. It could be clearly demonstrated that the single target cell was selectively affected, whereas the adjacent reference cells remained unchanged.

[P3] Bergner S; Wegener J; Matysik F-M (2012) Anal Methods 4:623-629.

(Cover Article) Monitoring passive transport of redox mediators across a confluent cell monolayer with single-cell resolution by means of scanning electrochemical microscopy

Abstract:

Scanning electrochemical microscopy (SECM) was used for time-resolved studies of passive transport of redox active substances across cell monolayers with sub-cellular resolution. Platinum disk ultramicroelectrodes (UMEs) with effective electrode radii in the sub μm range were operated in the constant-height mode. Monolayers of normal rat kidney (NRK) or Madin Darby canine kidney strain II (MDCK II) epithelial cells served as model cell lines and were grown to confluence on permeable membrane filters to investigate the transport of redox mediators across epithelial barriers. A novel electrochemical cell was developed ensuring reliable mechanical fixation of the growth substrate and preventing membrane vibrations during the SECM operation. The detection of different redox mediators was enabled by potential switching at the UME. This concept proved to be an attractive alternative to the use of dual-microelectrodes or micropipette-microelectrode combinations. The various cell lines were investigated regarding their barrier functions with respect to different redox mediators. Para- and/or trans-cellular transport mechanisms could be distinguished using either hydrophilic ruthenium hexamine chloride or lipophilic ferrocene methanol as redox mediators.

[P4] Bergner S; Vatsyayan P; Matysik F-M (2013) Anal Chim Acta 775 (2013) 1-13.

(Cover Article) Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells - a review

Abstract:

This review discusses advances in the field of high resolution scanning electrochemical microscopy (HR-SECM) and scanning ion conductance microscopy (SICM) to study living cells. Relevant references from the advent of this technique in the late 1980s to most recent contributions in 2012 are presented with special discussion on high resolution images. A clear progress especially within the last 5 years can be seen in the field of HR-SECM. Furthermore, we also concentrate on the intrinsic properties of SECM imaging techniques e.g. different modes of image acquisition, their advantages and disadvantages in imaging living cells and strategies for further enhancement of image resolution, etc. Some of the recent advances of SECM in nanoimaging have also been discussed which may have potential applications in high resolution imaging of cellular processes.

4 Experimenteller Teil

4.1 UME-Herstellung

Alle genannten Dimensionierungen der aktiven Elektrodengrößen beziehen sich im Manuskript auf den Durchmesser.

4.1.1 Pt-UMEs aus Pt-Volldraht

UMEs aus Pt-Volldraht wurden während der experimentellen Arbeiten am häufigsten gefertigt, da die Fertigungsmethode sehr robust ist und die erreichbaren Durchmesser bei unter 100 nm liegen.^[42] Hierbei wurde ein ca. 10 - 15 mm langer Pt-Draht (25 μm , Goodfellow, UK) an einen 5 - 7 cm langen Cu-Draht mit einem Außendurchmesser inklusive Isolierung von 1,1 mm gelötet. Nachfolgend wurde der Draht mit einem Mikromanipulator von oben in einen Tropfen der Ätzlösung geführt. Dabei wurde der Draht nur wenige 100 μm tief eingetaucht. Von der Seite wurde eine Pt-Schleife (Durchmesser der Schleife ca. 3 mm, Durchmesser des Pt-Drahtes ca. 200 μm) in den Tropfen eingeführt und diente als pseudo-Referenzelektrode zum Schließen des Stromkreises. Der Pt-Draht wurde elektrochemisch in einer Ätzlösung folgender Zusammensetzung verjüngt: CaCl_2 (gesättigt, 60% v/v), H_2O (36% v/v) und HCl (konz. 4% v/v). Die Ätzung erfolgte durch Differenzpulsamperometrie bei einer Pulslänge von 20 ms und Pulspotentialen von alternierend ± 2 V. Der Ätzprozess dauerte, je nach Eintauchtiefe, nur etwa 20 s bis 1 min. Im Differenzpulsamperogramm sank der Stromwert durch die oxidative Auflösung des Pts in Anwesenheit großer Chlorid-Mengen unter die Nachweisgrenze. Dieser Prozess ist daher selbst-terminierend.

Der geätzte Pt-Draht wurde anschließend bei 100x-Vergrößerung auf seine ungefähre Größe und einen konischen Verlauf hin untersucht. Anschließend wurde dieser mehrfach in H_2O und Aceton gespült und an der Luft getrocknet. Nachfolgend wurde der Draht in einer ausgezogenen Kapillare (Soda-Kalk-Glas, 1,15 mm Innendurchmesser, Durchmesser der ausgezogenen Spitze 100 μm , Hilgenberg, Malsfeld) ca. 50 – 200 μm hinter der Kapillaröffnung positioniert. Durch die abgestimmten Außendurchmesser des Cu-Drahtes und des Innendurchmessers der Kapillare wurde eine gute Fixierung des Drahtes in der Kapillare gewährleistet. Das Einschmelzen des Drahtes erfolgte anfangs mit einem Tischfeuerzeug mit Butangasflamme bei hoher Luftzufuhr, im späteren Verlauf der experimentellen Arbeiten mit einem Heizdraht mit regelbarer Temperatur und optischer Kontrolle mittels Stereomikroskop (Abbildung 12).

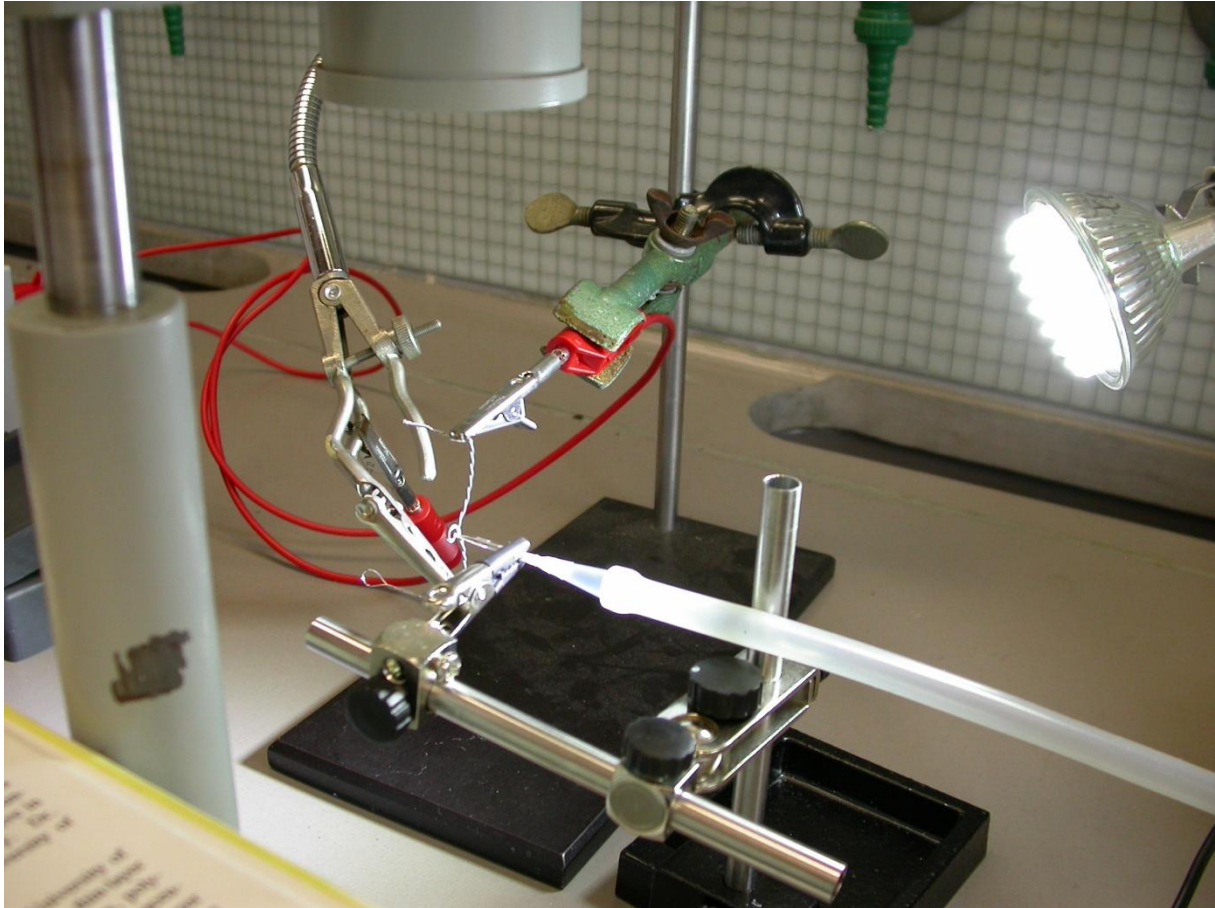


Abbildung 12: Verwendeter Aufbau zum Einschmelzen von Elektrodrähten mittels eines Kanthal-Widerstands mit regelbarer Temperatursteuerung, Vakuumschluss und optischer Kontrolle durch ein Stereomikroskop.

Der Heizdraht (Kanthal, Länge ca. 20 cm, \varnothing 0,2 mm, 44,2 Ω /m) wurde doppelt verdreht und in 2 - 3 Schlaufen mit ca. 2 mm Durchmesser gelegt. Zur Spannungsversorgung diente ein Laborspannungsnetzteil (Voltcraft, PPS-11360, 180 W). Während des Einschmelzens wurde der maximale Strom auf 12 A begrenzt und die Spannung hochgeregelt, bis der Heizdraht gelb-weiß glühte und kurz darauf das Glas zu fließen begann. Da mit dieser Apparatur Blei-, Soda-Kalk-, nicht jedoch Borosilikat-Glas zum Fließen gebracht werden konnte, liegt die maximal erreichbare Temperatur bei etwa 1000°C. Der Einschmelzvorgang wurde dabei mittels Stereomikroskop (25x Vergrößerung, Carl Zeiss, Jena, DDR) verfolgt. Tabellen mit Erweichungstemperaturen und thermischen Ausdehnungskoeffizienten der verwendeten Gläser und Elektrodenmaterialien finden sich auf Seite 16. Zusätzlich kann am Elektrodenhalter ein Wasserstrahlvakuum angeschlossen werden, um auch niedrig schmelzende Materialien wie Au, oder oxidationsempfindliche Elektrodenmaterialien wie C einzubetten. Zur Freilegung der Elektrodenfläche wurde mit verschiedenen *Lapping*-Folien (SiC oder Al₂O₃ mit Partikelgrößen von 20 – 0,1 Mic, 3M) poliert. Dies geschah zunächst per Hand, jedoch kann damit nur schwer eine Orthogonalität der Elektrodenfläche zur

Sondennormalen gewährleistet werden. Daher wurde hierfür ein Tellerschleifer entworfen, mit dem Trockenschleifen mit *Lapping*-Folien, sowie Nassschleifen in Al_2O_3 -Partikelsuspension durchgeführt werden konnten. Der Polierprozess zur Freilegung der Elektrodenfläche muss sehr sorgsam ausgeführt werden, um Elektrodendurchmesser von wenigen 100 nm zu erreichen. Schon eine volle Umdrehung auf dem Tellerschleifer mit 1 Mic *Lapping*-Folien vergrößert den Sondendurchmesser auf einige μm und macht damit die Sonde für hochauflösende SECM-Aufnahmen wertlos. Zur Beurteilung, ob die Elektrode freiliegt oder noch im Glas eingebettet ist, kann durch die starke Reflexion und Brechung des Lichtes keine optische Mikroskopie verwendet werden. Jedoch haben sich die wiederholten Aufnahmen von CVs als gute Qualitätskontrolle zur Beurteilung des Stromdurchgangs und der Einbettung des Drahtes im Glas erwiesen. Die Aufnahmen der CVs wurden dabei in 1,5 mM wässriger FcMeOH-Lösung mit 0,2 M KNO_3 als Leitsalz durchgeführt. Nur UMEs, welche gute Einbettungen und die gewünschten Größen der aktiven Elektrode zeigten, wurden nachfolgend durch Definition des Glaskonus in SECM-Sonden überführt. Die Definition des Glaskonus wurde ausschließlich durch mechanisches Polieren auf einem Tellerschleifer unter nachfolgender optischer Kontrolle bei 500 x Vergrößerung (Leica) durchgeführt. Die Inspektionen erfolgten dabei von der Seite und von oben. Dabei muss im Idealfall von vielen Seiten geschliffen werden, um einen runden Konus zu erhalten. In der Praxis wurde jedoch meist nur von vier Seiten geschliffen, sodass sich eine eher quadratische Stirnfläche des Glases ergab. Durch diese Prozedur sind mit viel Geschick und Übung Glasdurchmesser von etwa 10 μm zu erreichen. Eine fertige, in Soda-Kalk-Glas eingebettete 2 μm UME ist in Abbildung 13 gezeigt.

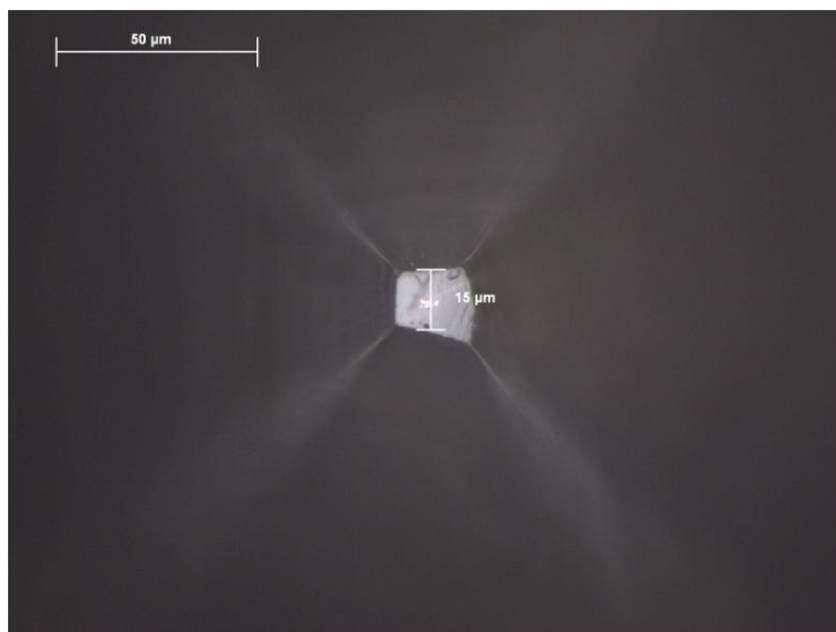


Abbildung 13: Aufsicht auf eine in Soda-Kalk-Glas eingeschmolzene 2 μm Pt-UME mit einem RG-Wert von 15.

Nach dem Schleifen wurden wiederum CVs der UMEs aufgenommen, um auszuschließen, dass während des Schleifvorgangs die Elektroden getroffen wurden, was sich in stark vergrößerten Elektrodendurchmessern zeigen würde. Meist kam es durch die Schleifprozesse zur Ablagerung von abrasiertem Schleifmaterial. Zur routinemäßigen Reinigung der UMEs wurden diese in verdünnter H_2SO_4 -Lösung (0,1- 0,5 M) zwischen der H_2 -und O_2 -Entwicklung zyklisiert (100 Zyklen, $v = 0,2 \text{ V/s}$). Da es in einigen Fällen beim Freipolieren auch zur Beschädigung der Einbettungen kam, wurde in diesen Fällen eine thermische Behandlung der UMEs durchgeführt. Dazu wurden die UMEs vertikal eingespannt, von unten in eine Heizschleife (Kanthal, weitere Parameter s.o.) geführt und den Heizdraht für wenige Sekunden auf etwa 800°C , also knapp oberhalb der Erweichungstemperatur des Glases, erhitzt. Wenn die CVs geeignete Größen und gute Einbettungen zeigten und die RG-Werte nahe zehn lagen, wurden PACs zur Charakterisierung der Eigenschaften als SECM-Sonden aufgenommen. Die PACs wurden über Deckgläsern in 1,5 mM wässriger FcMeOH-Lösung mit 0,2 M KNO_3 als Leitelektrolyt durchgeführt, bis deutliche Abweichungen vom theoretischen Verlauf sichtbar wurden. Wenn die UMEs als SECM-Sonden eingesetzt werden sollten, mussten hier mindestens Signalreduktionen auf 50% erfolgen. Andernfalls lag eine Störung in der periplanaren Anordnung von Elektrode und Deckglas vor, was meist auch durch weiteres Polieren des Glaskonus nicht mehr behoben werden konnte. Zur vollständigen Charakterisierung wurden die PACs von einzelnen Sonden an die theoretischen Verläufe angenähert und die so erhaltenen RG-Werte mit den RG-Werten der mikroskopischen Observationen verglichen.

4.1.2 Pt-UMEs aus Wollastondraht

UMEs aus Wollastondraht von $2 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$ wurden nach einer vollkommen neuartigen Prozedur hergestellt, die sehr reproduzierbar ist und mit geringstem Materialeinsatz auskommt. Der Wollastondraht wurde dazu zunächst von einer etwaigen Ag_2S - oder Ag_2O -Schicht durch mechanisches Polieren mit einer 5 Mic *Lapping*-Folie befreit. Anschließend wurden ca. 2-3 mm Wollastondraht in eine ausgezogene und nachfolgend wieder zugeschmolzene Kapillare gegeben und mit einem Stück Draht bis zur Kapillarspitze geschoben. Dann wurde der Wollastondraht mittels der Widerstandsheizung eingeschmolzen. Nachfolgend wurde der Wollastondraht durch grobes Polieren wieder freigelegt und in eine Ätzkammer eingeführt (1,5 mL Vial mit Deckel), welche ca. 1 mL HNO_3 (konz.) enthielt (s. Abbildung 14B). Der Ätzvorgang wurde abgebrochen, wenn ein abgeätzter Kanal von etwa $500 \mu\text{m}$ zu erkennen war. Dies dauerte ca. 2 h, wobei die Zeit stark vom Durchmesser des Wollastondrahtes, also wesentlich von der Menge an zu oxidierendem Silber, abhängt. Jedoch können hier viele UMEs parallel gefertigt werden, was einen Vorteil der Methode darstellt. Dann wurde der Inhalt des Kanals im Wasserstrahlvakuum entleert und über Nacht in ein 1,5 mL Vial mit Wasser gegeben, um

Reste der entstandenen Silbersalze zu entfernen. Anschließend wurde der Kanal abermals im Vakuum entleert. Dann wurde die Kapillare an der Spitze mit der Heizapparatur zugeschmolzen und die Einbettung optisch kontrolliert. Hierbei kann es aufgrund der verwendeten Chemikalien und ihrer Reaktionsprodukte zu leichten Einfärbungen im Glas kommen, welche die Einbettung jedoch nicht stören. Nachfolgend wurde an der Kapillarrückseite ein 5 mm langes Stück Lötzinn eingeführt. Durch leichtes Erwärmen der Kapillarwand wurde das Lötzinn verflüssigt und schnell ein Stück Cu-Draht von hinten zur Kontaktierung in die Kapillare gegeben. Ein Fabrikationsschema ist in der nachfolgenden Abbildung 14A dargestellt:

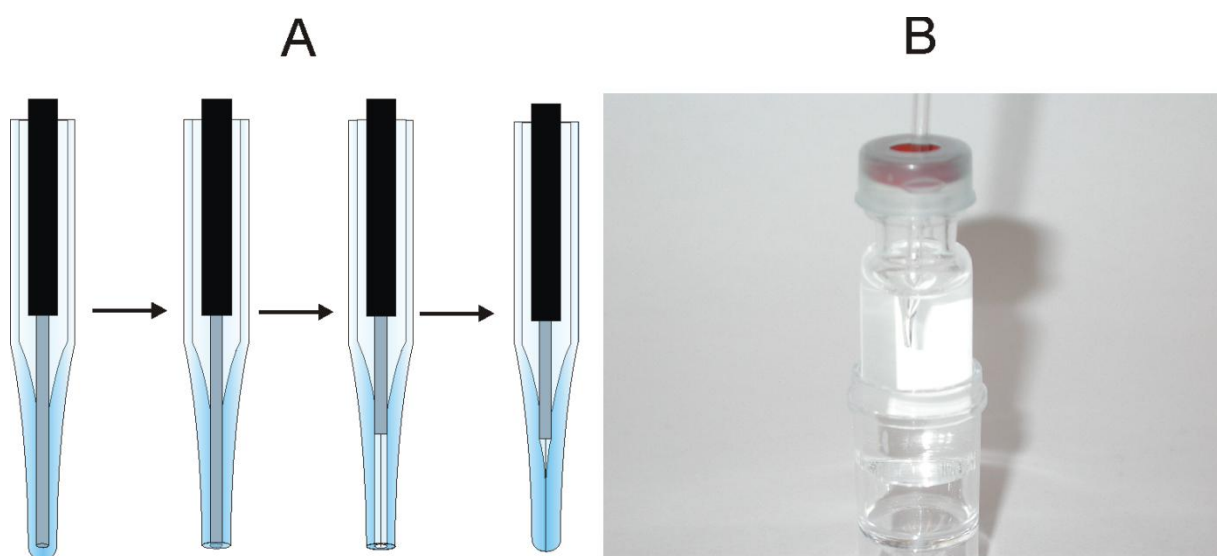


Abbildung 14: Fabrikationsschema zur alternativen Herstellung von UMEs aus Wollastondrähten (A) und die verwendete Ätzkammer mit eintauchender UME (B).

Die Definition des Glaskonus bei Wollaston-UMEs wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Als alternative Methode zu dem zeitaufwändigen Schleifprozess wurden Experimente zur chemischen Ätzung des Glases in Flusssäure durchgeführt. Dazu wurde in ein 1,5 mL Vial Flusssäure (40%) gegeben und mit Öl überschichtet.^[102] In Vorversuchen mit Kapillarmaterial aus Quarzglas wurden an der entstehenden Grenzfläche konisch zulaufende Spitzen mit glatten Oberflächen erhalten. Wurde diese Methode auf Natron-Kalk-Gläser angewandt, wurden keine glatten Wände erhalten. Vielmehr kam es zu einem anisotropen Ätzvorgang durch die im Natron-Kalk-Glas in größeren Mengen enthaltenen Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen, welche in HF als schwerlösliche Fluoride ausfallen und damit den Ätzprozess stören.

Zudem wurde zur Definition des Glaskonus eine Methode angewandt, welche die Oberflächenspannung und Benetzungseigenschaften des Glases in flüssigem Zustand

ausnutzt.^[42] Diese so gefertigten Sonden werden nach dem Autor der Publikation nachfolgend als *Lee*-Sonden bezeichnet. Durch den rein physikalischen Vorgang sollte dieser auf UMEs jeglicher Größe angewendet werden können. Dazu wurde der Draht in einer ausgezogenen Kapillare aus Soda-Kalk-Glas mittels der Heizschleife eingeschmolzen. Dann wurde die Temperatur der Schleife nicht reduziert, sondern noch leicht erhöht. Nach kurzer Zeit begann der Draht in Richtung Kapillarende zu wandern, durchstieß dieses und stand letztlich sichtbar hervor. Abbildung 15 zeigt eine repräsentative Abbildung der erhaltenen UME am Beispiel einer 25 μm Pt-UME.

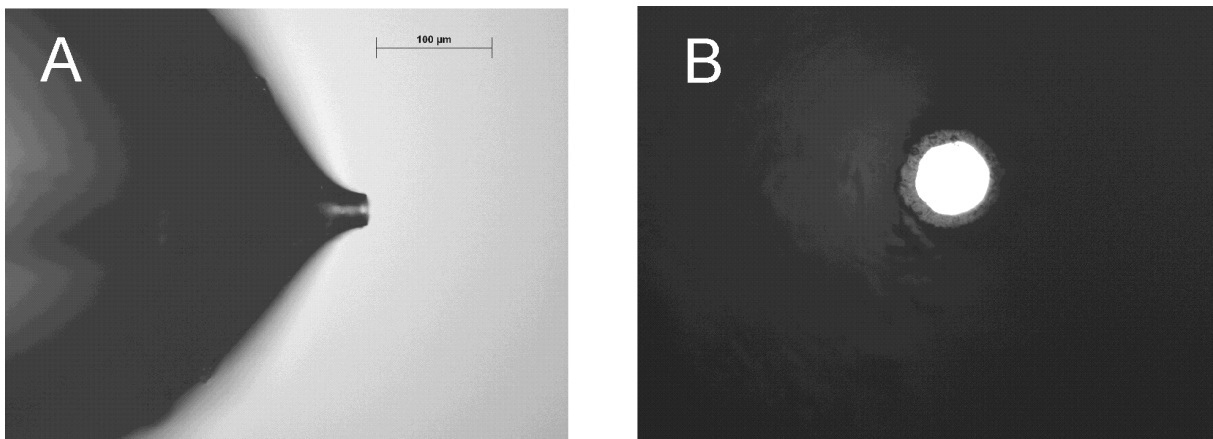


Abbildung 15: Seitenansicht (A) und Aufsicht (B) einer nach der Lee-Methode^[42] gefertigten 25 μm Pt-UME.

Diese Methode wurde für UMEs bis 2 μm durchgeführt. Die Bilder dieser kleineren UMEs sehen analog aus, jedoch ist dort der wesentliche Aufbau durch die begrenzte Auflösung der optischen Mikroskopie nicht so klar zu erkennen.

4.2 Geräte

4.2.1 SECM

Für die experimentellen Arbeiten wurde ein kommerzielles SECM (920c, CH Instruments, Austin, USA) verwendet, welches in Abbildung 16 dargestellt ist. Die Positionierung der Sonde erfolgte durch drei Schrittmotoren, welche über eine maximale Auslenkung von 50 mm mit 4 nm Auflösung verfügen. Zusätzlich kann die UME auch mit einem Piezoelement positioniert werden, welches jedoch nur eine Auslenkung von maximal 40 μm bei einer Auflösung von 1,6 nm zulässt. Der mitgelieferte Elektrodenhalter war aus Teflon gefertigt, welcher jedoch infolge Materialerschaffung bald gegen einen baugleichen Halter aus Polyetheretherketon getauscht wurde. Die Fixierung des Substrates ist von hoher Bedeutung, um eine Positionsänderung während des Abbildungsvorganges zu vermeiden. Je nach Applikation wurden verschiedene elektrochemische Zellen aus Teflon eingesetzt. Für die Aufnahme von PACs und den Experimenten mit Zellen auf Deckgläsern wurde eine

Zelle mit speziellen Halterungen entworfen (Abbildung 17A). Diese bestehen aus zwei Brücken, die durch Schrauben an variabler Position fest mit der elektrochemischen Zelle verbunden werden können. Zusätzlich sind auf den Brückenhaltern weitere Schrauben zur Fixierung des Substrates angebracht.



Abbildung 16: A: SECM-Messplatz mit Faradaykäfig, schwingungsgedämpftem Tisch, Computersteuerung, Bipotentiostat und Motorsteuerung. B: Nahaufnahme des SECM mit elektrochemischer Teflonzelle. Im Hintergrund sind der Bipotentiostat (unten) und die Motorsteuerung (oben) gezeigt.

In den Diffusionsexperimenten wurde zur Halterung der Filtermaterialien eine speziell für diese Anforderungen entworfene Zelle genutzt (Abbildung 17B). Hierbei kann die gleiche elektrochemische Teflonzelle verwendet werden, jedoch muss der spezielle modulare Halter eingesetzt werden.

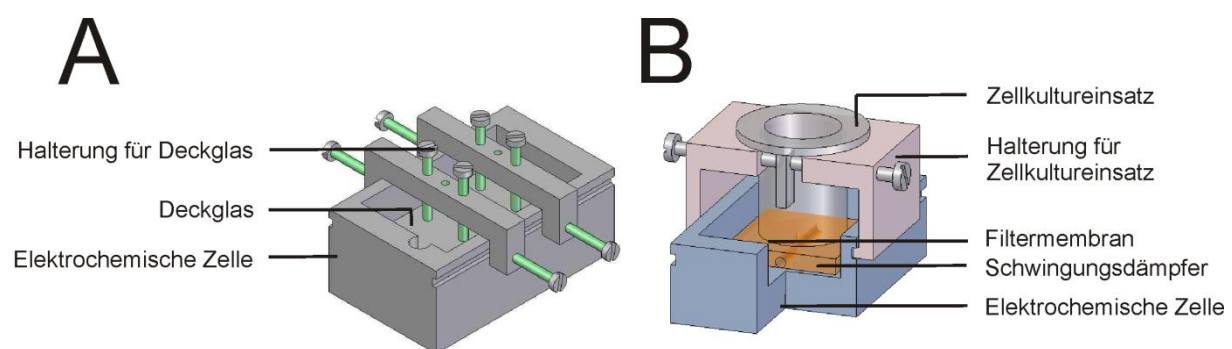


Abbildung 17: A: Elektrochemische Zelle zur Fixierung eines Deckglases für die Aufnahme von PACs zur Sondenkontrolle und für topographische Studien konfluenter Zellmonoschichten. B: Zelle der Diffusionsexperimente mit Halterung für die Zellkultureinsätze und Schwingungsdämpfer. Zur besseren Demonstration des Aufbaus wurde in der Darstellung die vordere Ecke der Zelle entfernt.

In diesem Halter können Einsätze verschiedener Hersteller und geometrischer Abmessungen durch Schrauben fixiert werden. Zudem wurde am Boden der Zelle ein Schwingungsdämpfer zur Reduktion der Vibrationen der dünnen Membran während der Bildaufnahme eingesetzt. Durch eine zentrale Bohrung von 2 mm besitzt die Membran nur eine minimale Auflagefläche. Die Versorgung mit Analyt wurde durch eine zweite orthogonale Bohrung sicher gestellt.

Zur Vorbereitung der elektrochemischen Aufnahmen wurden die zu untersuchenden Substrate mit dem jeweiligen Halter in der elektrochemischen Zelle fixiert. Bei Zellstudien können diese auf Deckgläsern kultiviert und dann in die elektrochemische Zelle überführt werden. Als weitere Möglichkeit können die Zellen auch direkt in Petrischalen untersucht werden.

Die orthogonale Ausrichtung des Substrates zur UME spielt eine wesentliche Rolle im Umgang mit dem SECM, da es andernfalls infolge der Neigung zu einem Driften der Stromwerte kommt. Dieser Drift kann nach Bildaufnahme nur bei exakter Kenntnis und angenommener Konstanz der PAC über den gesamten Bildausschnitt mathematisch subtrahiert werden. Die Ausrichtung des Substrates erfolgte durch repetitive Aufnahmen von PACs an drei oder vier Punkten über dem Substrat, wobei die Distanz zweier Punkte mehrere mm betrug. Mit dieser Strategie kann der Neigungswinkel des Substrates mit hoher Präzision orthogonal zur UME eingestellt werden. Die PACs wurden bis auf einen vorher definierten Stromwert (etwa 50% $I_{T, \infty}$) automatisch gefahren, jedoch maximal bis deutliche Abweichungen vom theoretischen Verlauf auftraten. Dies deutete auf einen unerwünschten Kontakt der UME mit dem Substrat hin. Mit dieser Ausrichtungsmethode kann eine minimale Höhendifferenz von etwa 5 μm zwischen zwei Ausrichtungspunkten erreicht werden, was in einem Bild von 40 μm Kantenlänge und bei einem Abstand zwischen zwei Ausrichtungspunkten von 1 cm etwa 20 nm entspricht. Mit den experimentell verwendeten Sonden kann diese Varianz der Höhe nicht aufgelöst werden. Nach der Substratausrichtung wurde die UME bis auf den gewünschten Stromwert angenähert und erste Linienscans (PSCs) aufgenommen, um einen repräsentativen oder interessanten Ausschnitt zu finden. Nachfolgend wurde die Bildaufnahme gestartet. In allen PACs, PSCs und SECM-Bildaufnahmen wurden Tiefpassfilter von 0,15 oder 1,5 Hz verwendet. Zur Filterung unerwünscht eingekoppelter Netzfrequenzen wurde eine Verweilzeit der Sonde von ganzzahligen Vielfachen von 0,02 s verwendet, in Standardexperimenten jedoch 0,04 s.

4.2.2 Tellerschleifer

Für die Schleifprozesse an den UMEs wurde ein Tellerschleifer verwendet, der eine exakte Positionierung des Schleifgutes durch eine Mikropositioniereinheit am Elektrodenhalter ermöglichte. Zusätzlich können über ein Seitenrad Winkel von 10° bis 90° zwischen

Schleifgut und dem Schleifteller eingestellt werden. Das Herzstück bildet ein regelbarer Gleichstrommotor (12 V; Conrad 240834), welcher über einen Riemen die Schleifscheibe antreibt. Durch die Übersetzung kann die Umdrehungszahl des Schleiftellers bis auf Werte von etwa 100 min^{-1} gesenkt werden. Das Lager des Schleiftellers entstammt einer alten Festplatte. Der Schleifteller besteht aus einer äußeren Kammer für das Nassschleifen in einer Partikelsuspension und einer inneren Kammer für das Trockenschleifen, in der ausgestanzte Ringe aus *Lapping*-Folien eingesetzt werden können. Durch Wechseln des Spannfutters am Elektrodenhalter können Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers (\varnothing_a 1,8 – 1,9 mm) sowie Kapillarmaterial aus Quarzglas mit \varnothing_a 360 μm eingespannt werden. Der standardmäßig eingesetzte starre Elektrodenhalter kann zudem durch einen Halter ausgetauscht werden, der das Schleifgut beständig dreht. Bedingt durch die feinmechanische Fertigung beträgt die Abweichung vom Mittelpunkt des Schleifgutes jedoch 10 μm , sodass hier nur größere UMEs oder Quarzglaskapillaren mit \varnothing_a 360 μm eingesetzt werden sollten. Der Schleifprozess in Lösung kann durch Kombination mit einem Keithley Sourcemeter 6430 in Echtzeit verfolgt werden. Dazu wurde vom Sourcemeter eine Eingangsspannung von 10 V an die UME angelegt. Der Strom kann dann über den geerdeten Schleifteller fließen und wird vom Sourcemeter aufgezeichnet. Das Ein- und Ausschalten des Poliertellers, das Anlegen der Spannung, die Beendigung des Experiments bei Überschreiten eines vorher festgelegten Stromwertes und die Datenaufzeichnung in Echtzeit wurde dabei mit einer Software (OhmsMeasure, Elektronikwerkstatt Universität Regensburg) überwacht.

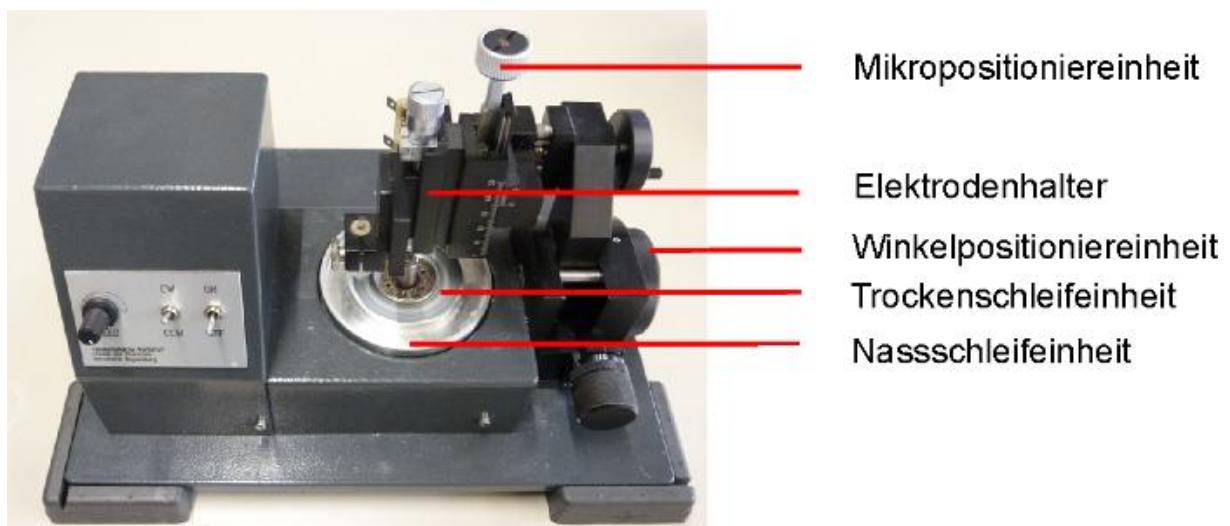


Abbildung 18: Verwendeter Tellerschleifer für die Sondenpräparation mit regelbarer Drehzahl zum Trockenschleifen mittels Polierfolien und einer Einheit zur Abrasion in Partikelsuspension. Im Elektrodenhalter können verschiedene Glaskapillaren und Kapillarmaterial mit \varnothing_a 360 μm eingespannt werden und mittels Mikropositioniereinheit definiert auf den Schleifteller geführt werden.

Wenn die UME noch vollständig isoliert ist, liegt der Widerstand im TΩ-Bereich. Wenn während des Schleifprozesses die Elektrode freigelegt wird, sinkt der Widerstand abrupt und die Poliermaschine wird automatisch gestoppt. Dies funktioniert reproduzierbar für 25 µm UMEs. Bei UMEs im sub-µm-Bereich ist die Endpunktdetektion jedoch nicht empfindlich genug.

4.2.3 Mikroskope

Zur groben Inspektion geätzter Edelmetalldrähte und Kontrolle des Einschmelzvorgangs wurde ein Mikroskop (NA 0,19, Peak, Bornheim-Roisdorf) bei 100x Vergrößerung verwendet. Zur Inspektion während des Schleifens des Glaskonus wurde ein leistungsstärkeres Mikroskop (Leica DMRB) mit 500x Vergrößerung (NA 0,55) genutzt. Zur Kontrolle der Zellkulturen wurde ein Phasenkontrastmikroskop bei 100x Vergrößerung (Nikon Phase Contrast 2, ELWD 0,3, 10x NA 0,25) verwendet. Zur Aufnahme der dreidimensionalen Topographie der Zellen wurde ein Konfokalmikroskop (C1 multicolor, Nikon) bei einer Wellenlänge von 488 nm und einem 60x Tauchobjektiv (NA 0,9) verwendet.

4.2.4 Osmometer

Zur Kontrolle des osmotischen Drucks von Messlösungen wurde ein kryoskopisches Osmometer verwendet (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Deutschland). Zur Messung der Osmolarität wurden 30 µL der Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben und in die Halterung des Gerätes eingespannt. Zur automatischen Bestimmung der Osmolarität kühlte ein Peltier-Element die Lösung ab. Aus der Gefrierpunktniedrigung wurde folgend vom Gerät die Osmolarität bestimmt.

4.2.5 Atomkraftmikroskopie

Die AFM-Aufnahmen des porösen Trägers wurden an einem kommerziellen Atomkraftmikroskop (nanosurf easyScan 2, Nanoscience Instruments, Phoenix, USA) mit AFM-Sonden (PPP-NCLR, Nanoscience Instruments, Phoenix, USA) durchgeführt. Die Sonden wurden dabei mit einer Resonanzfrequenz von 155 kHz und einer Amplitude von 400 mV im intermittierenden Modus (*tapping-Modus*) geführt.

4.3 Präparation der Zellen

Madin-Darby-Hundenierenzellen vom Strang II (MDCK II-Zellen) wurden freundlicherweise vom Institut für Biochemie der Universität Münster bereit gestellt. Die gewöhnlichen Nierenzellen der Ratte (*normal rat kidney*, NRK-52E, NRK-Zellen) stammen von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Zugangsnummer ACC 199).

Alle Zellen wurden auf 0,17 mm dicken Deckgläsern kultiviert, die sich in kleinen Petrischalen befanden. Das Medium für die NRK-Zellen enthielt 5% Kälberserum, 2 mM L-

Glutamin und je 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin. Für die Aufzucht von MDCK II-Zellen wurde MEM-Earle Basismedium verwendet, welches 5% Kälberserum, 4 mM L-Glutamin und 100 mg/mL Penicillin/Streptomycin enthält. Die hier verwendeten Puffer wurden auf Basis von Dulbeccos Phosphat-gepufferter Salzlösung (Dulbeccos MEM, Sigma-Aldrich) hergestellt und enthielten 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂·6H₂O und 1,0 mM CaCl₂·2H₂O (PBS⁺⁺). Die Kulturmedien wurden alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden in einer 1:20 Verdünnung ausgesät. Dabei dauerte es etwa eine Woche bis zu deren Konfluenz. Die Morphologie der Zellen wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Direkt vor den SECM-Messungen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellkulturen fünfmal mit PBS⁺⁺-Puffer mit 1 g/L Glukose gewaschen bis im Mikroskop keine nicht-adhärenierten Zellen mehr zu sehen waren.

Zum Einbau der Mikropartikel in den NRK-Zellen wurden diese für 12 h in einer Suspension mit 2 µm Silikapartikeln inkubiert. Die Präparation der Zellen wurde von Michaela Sperber vom Arbeitskreis Prof. Wegener am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg durchgeführt.

MCF-7- (ATTC HTB-22) und MDA-MB-231-Brustkrebszelllinien (ATTC HTB-26), sowie U373-MG-Glioblastomzellen (ATCC HTB-17) wurden auf Deckgläsern oder direkt in Petrischalen kultiviert. Für die Aufzucht wurde Eagle's Basismedium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit folgenden Zusätzen verwendet: 2 mM L-Glutamin, 2,2 g/L NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,11 g/L Natriumpyruvat (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 5% Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland).

Alle Zellkulturen befanden sich während der Aufzucht in Inkubatoren mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO₂.

Zur Fixierung der MDCK II-Zellen wurden diese nach der Aufzucht für 30 min mit 2,5%iger Glutardialdehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS⁻ behandelt.

4.4 Chemikalien

Zur Aufnahme von CVs und von SECM-Abbildungen anorganischer Substrate wurden wässrige Lösungen von 1,5 mM FcMeOH (99%, ABCR, Karlsruhe, Deutschland) oder 1 mM [Ru(NH₃)₆]Cl₃ (98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit 0,2 M KNO₃ als Leitelektrolyten verwendet. Durch seinen kovalenten Charakter wurde FcMeOH zunächst für 20 min bei 60°C im Ultraschallbad behandelt. Nicht gelöste Mengen an FcMeOH wurden nachfolgend abfiltriert (Cellulose Acetat, 0,45 µm, Roth).

SECM-Aufnahmen von MDCK II- und NRK-Zellen wurden in physiologischem Phosphatpuffer mit einer Osmolarität von 320 mosmol/kg und 1 g/L Glukose durchgeführt.

SECM-Aufnahmen von U373-MG-, MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen wurden in Leibovitz-L15-Puffer mit 1 g/L Glukose durchgeführt.

In den Toxizitätstest der Mediatoren wurden neben FcMeOH und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ auch $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98,5\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Ferrocencarbonsäure (FcCOOH, 98%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. $\text{K}_4[\text{W}(\text{CN})_8]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $\text{K}_4[\text{Os}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ wurden nach den Literaturangaben synthetisiert.^[103,104]

Zur Anfärbung der Messlösung in den CLSM-Experimenten wurde FITC-Dextran (2 mg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet, welches nicht membrangängig ist und die Messlösung daher hell erscheinen lässt.

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (membraPure Astacus) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von maximal 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hergestellt.

4.5 Testsubstrate

Zur Bestimmung der erreichbaren SECM-Auflösung wurden poröse Filtermaterialien mit Durchmessern von 0,4 - 8 μm verwendet (Corning, New York, USA). Zudem wurden TEM-Substrate mit 400 *mesh* aus Cu und 2000 *mesh* aus goldbeschichtetem Cu (Plano; Wetzlar, Deutschland) verwendet.

4.6 Bildvergleich

Zur Ausführung mathematischer Bildoperationen von Graustufenbildern mit 256 Abstufungen diente das *open source*-Programm ImageJ (Version 1.45).

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der UMEs

5.1.1 CVs der UMEs

Die CVs der konisch geätzten Pt-UMEs zeigten häufig nur eine minimale Hysterese zwischen Vor- und Rückwärtszyklus. Dies weist auf eine gute Einbettung des Elektrodenmaterials im Glas hin. Jedoch kann während des Schleifvorgangs die Einbettung der UME durch das Schleifmaterial verletzt werden, was insbesondere bei sehr kleinen Elektroden das voltametrische Verhalten beeinflusst. Durch die entstehenden Risse und Furchen an der Oberfläche kam es zu einem erhöhten Stromwert und einer ausgeprägten Hysterese (Abbildung 19A). Durch eine erneute thermische Behandlung bei Temperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur wurde das Glas an der Oberfläche wieder zum Fließen gebracht. Das unterseitig-vertikale Einführen der UME in die Heizschleife entlang der Gravitationslinien bewirkte dabei ein isotropes Fließen des Glases. Dabei zeigte sich nach der thermischen Behandlung eine signifikant bessere Einbettung und ein kleinerer effektiver Radius, der auf das Schließen der Risse an der Phasengrenzfläche (Abbildung 19B) hinwies. Gelegentlich zeigte sich auch, dass mit dieser thermischen Behandlung festsitzende Verunreinigungen an der Oberfläche entfernt werden konnten.

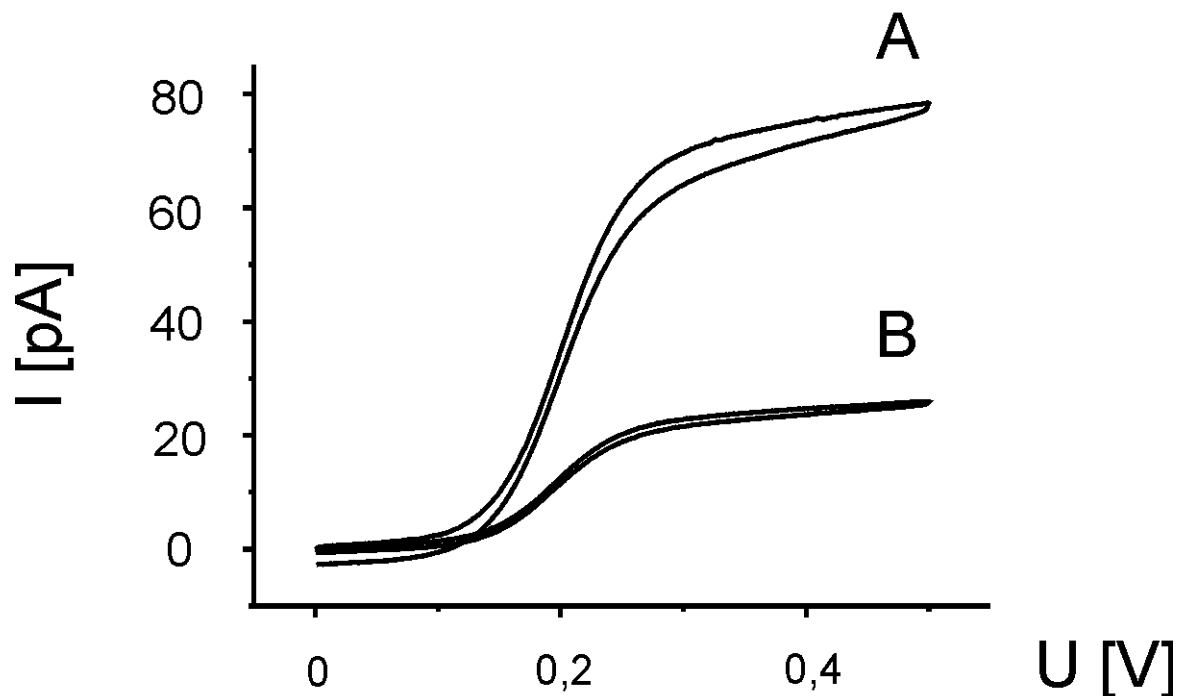


Abbildung 19: CV einer UME mit 200 nm bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s vor (A) und nach (B) der thermischen Behandlung bei 800°C mit der Heizapparatur. Die wässrige Messlösung enthielt 1,0 mM FcMeOH und 0,25 M KNO₃.^[P2]

Die thermische Behandlung wurde nur dann zur Anwendung gebracht, wenn dies nach Aufnahme des CVs notwendig war.

Die mit der neuartigen Methode gefertigten Wollaston-UMEs zeigten gute Einbettungen und stabile $I_{T, \infty}$ -Werte. Ein repräsentatives CV einer 2 μm Wollaston-UME ist in Abbildung 20B gezeigt.

5.1.2 Amperometrische PACs der UMEs

Der wichtigste Vortest zur Abschätzung der zu erwartenden Abbildungsqualität ist die Aufnahme von PACs. Diese wurden stets über harten, idealen Oberflächen wie Deckgläsern durchgeführt. Routinemäßig wurden die PACs bis zu einer deutlichen Abweichung vom idealen Verhalten aufgenommen. Die erhaltenen PACs wurden mit Gln. (15) angenähert. Die Annäherung beider Kurven basiert auf der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate und liefert einen theoretischen RG-Wert. In Abbildung 20A ist die gute Übereinstimmung beider Kurven bis zum Stoppwert von 20% $I_{T, \infty}$ zu erkennen. Durch die Iteration der Gleichung wurde ein RG-Wert von 17 errechnet, der die mittlere Ausdehnung der Glasschicht wiedergibt. Jedoch ist aufgrund des Schleifprozesses nicht mit einer idealen runden Geometrie des Glaskörpers, sondern eher mit vier- oder mehreckigen Formen zu rechnen. Hierbei zeigten die Mikroskopiebilder RG-Werte zwischen 12 und 20, sodass der berechnete Wert gut damit übereinstimmte.

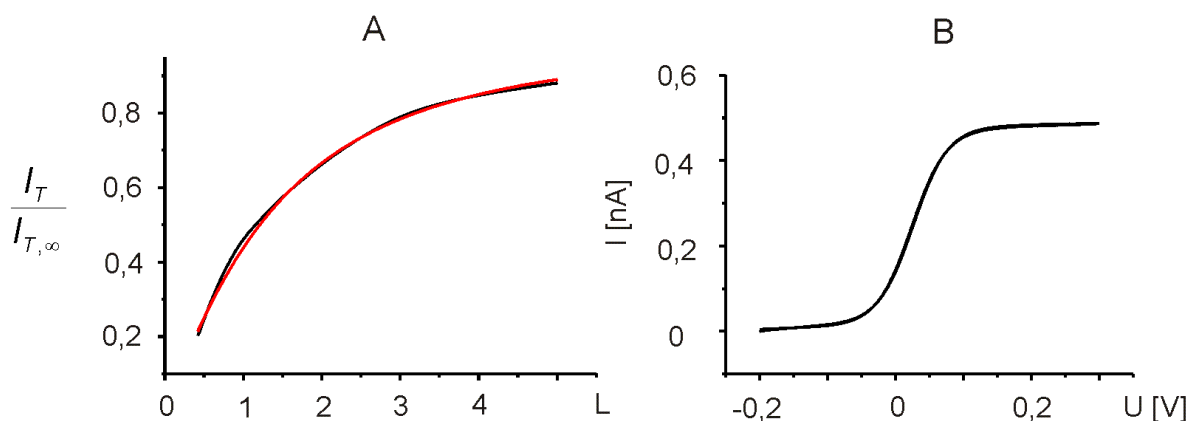


Abbildung 20: A: Experimentelle PAC einer 2 μm Wollaston-UME (schwarz Kurve) und die Annäherung an den theoretischen Verlauf (rote Kurve) nach Gln. (15). B: CV einer 2 μm Wollaston-UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s. In beiden Abbildungen wurde 1,5 mM FcMeOH als Mediator verwendet.

Durch die Annäherung der experimentellen PACs können Stromwerte in reale Abstände der UME vom Substrat umgerechnet werden. Insgesamt sind diese Transformationen der SECM-Bilder als Matrix (I, x, y, z) in reale Topographie (Abstand zur Oberfläche, x, y, z) kritisch zu sehen, da die Diffusionsgleichungen für ideale Substrate und UMEs mit perfekter

Geometrie gelöst wurden. Deshalb ist in Experimenten mit Abweichungen zu rechnen. Zudem ergeben sich Probleme mit der Eineindeutigkeit der errechneten Distanzen bei Substraten mit wechselnder Topographie und elektrochemischer Aktivität. In der Literatur wurde auf die Abhängigkeit der PACs von der Größe mehrerer Au-Spots hingewiesen, die in einem Isolator eingebettet waren. Durch die Ortsabhängigkeit der PACs kann die Transformation in reale Topographie selbst bei diesem einfachen Modellsystem nicht erfolgen.^[105] Eine ähnliche Abhängigkeit ist auch bei der negativen Rückkopplung bei der Abbildung talförmiger Topographien denkbar, da es hier zu einer Abweichung der Koplanarität von Substrat und UME kommt. Jedoch ist diese Anordnung der Ansatz in der Lösung der Diffusionsgleichungen. Zur Untersuchung des Verhaltens bei den hier verwendeten Substraten wurde die Ortsabhängigkeit der PACs über Zellmonoschichten eingehend studiert (Abschnitt 5.4.2.1).

5.1.3 Impedimetrische PACs der UMEs

Erste Experimente wurden mit 25 µm UMEs mit RG 10 in PBS⁻ durchgeführt, welches die gleiche Zusammensetzung wie PBS⁺⁺ hat, jedoch ohne die Anteile der Ca- und Mg-Salze. Insgesamt lieferten die 25 µm Pt-UMEs gute PACs und eine Zunahme der Impedanz bei Annäherung an ein Deckglas bei einer Frequenz von 100 kHz, einer Amplitude von 70 mV und einem Grundpotential von 0,3 V (vgl. Abbildung 21). In der AC-SECM wird eine Zunahme des Widerstands bei der Annäherung an ein Substrat als negative Rückkopplung bezeichnet, da auch in diesem Falle der analoge Stromwert abnimmt. Bei Annäherung wurden Phasenwinkel von etwa -60° erhalten. Dies lässt den Schluss auf eine Überlagerung von kapazitiven und resistiven Impedanzanteilen zu. Bei angenommener Konstanz im Aufbau der Phasengrenzfläche Elektrode/Elektrolyt, sollte nur der reale ohmsche Anteil eine Ortsabhängigkeit bei der Annäherung zeigen. Eine Methode um beide Anteile voneinander zu trennen, ist die Erhöhung der Messfrequenz, wodurch die ohmschen Anteile stärker betont werden. Die apparative Grenze des Frequenzgenerators im SECM betrug 1 MHz. Bei sukzessiver Steigerung der Frequenz kam es jedoch zu einem Resonanzphänomen (Abbildung 21). Die Halbierung der Annäherungsgeschwindigkeit bei Aufnahme der PACs, durch Halbierung der Abstände zwischen zwei Aufnahmepunkten führte zu einer Verdopplung der Frequenz der Resonanz, was auf die Entstehung eines elektronischen Schwingkreises hinweist.

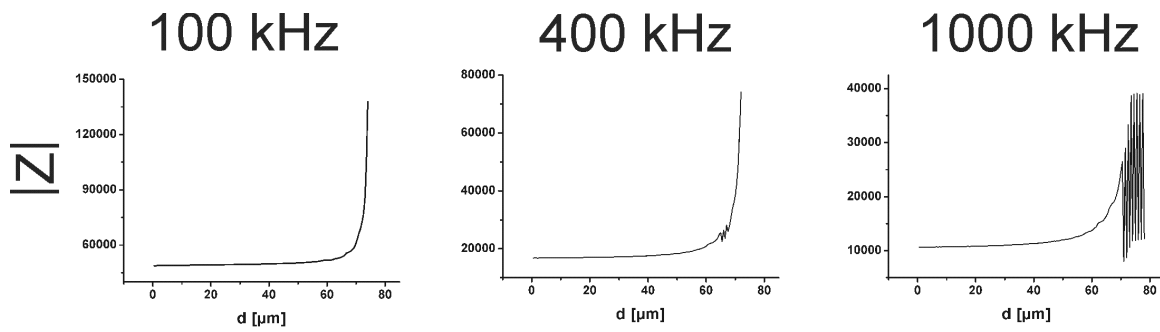


Abbildung 21: Impedimetrische PACs einer 25 μm UME bei 100 kHz, 400 kHz und 1 MHz zur Verdeutlichung des entstehenden Resonanzphänomens bei Annäherung an ein Deckglas.

Bei Annäherung über einem Isolator kann der Real- und Imaginärteil der Impedanz getrennt voneinander diskutiert werden (Abbildung 22 Mitte). Hierbei wiesen beide Anteile eine qualitativ ähnliche Abstandsabhängigkeit auf. Der Realteil Z' veränderte sich bei Annäherung jedoch schon bei größerem Abstand zur Oberfläche als der Imaginärteil Z'' . Zudem lieferte die Auftragung des Phasenwinkels bei dieser Sondengröße keine eindeutige Zuordnung des Abstands (Abbildung 22 rechts). Da einzig die Doppelschicht Einfluss auf die imaginären Impedanzanteile besitzt, kann auf eine Abhängigkeit der Doppelschicht während der Annäherung geschlossen werden. Dies wurde in den ersten publizierten Arbeiten zur AC-SECM noch nicht berücksichtigt.^[75] Dort wurde von einer konstanten Beschaffenheit der Phasengrenzfläche ausgegangen, sodass die Kapazität der UME keine Abstandsabhängigkeit zeigen sollte. Da die in dieser Arbeit abgebildeten Zellen auch bei der Darstellung des Phasenwinkels alle topographischen Details erkennen lassen, wurde dies mit einer lokalen Änderung der Elektrolytzusammensetzung über den Zellen durch metabolische Aktivität begründet. In späteren Publikationen wurden die Abhängigkeiten von Real- und Imaginärteilen der Impedanz eingehender diskutiert.^[106] Hierbei konnte eine Abhängigkeit von positiver oder negativer Rückkopplung der Impedanz von der Frequenz gezeigt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon von anderen Autoren beschrieben.^[107,108]

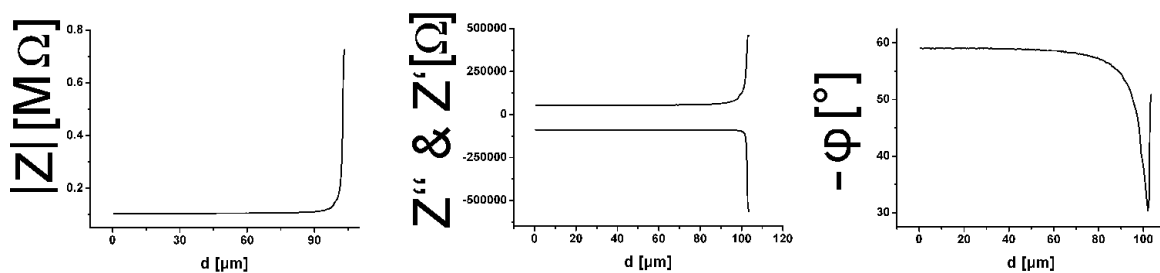


Abbildung 22: Verläufe der Gesamtimpedanz (links), der Real- und Imaginärteile (Mitte) und des Phasenwinkels (rechts) bei Annäherung einer 10 μm UME an ein Deckglas.

Folgend wurde das Impedanzverhalten einer kleineren UME mit $\varnothing 2 \mu\text{m}$ mit der Annäherung im amperometrischen Modus verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei kleiner werdenden Elektroden der Einfluss der Doppelschicht über dem Lösungswiderstand zunimmt. Die Applikation zunehmend höherer Frequenzen wurde dabei von Stabilitätsproblemen, was sich in hohem Rauschen zeigte, verhindert. Zudem wurde deutlich, dass die absolute und auch relative Impedanzänderung bei kleineren UMEs stark abnimmt. Die praktikable Grenze waren dabei UMEs mit etwa $2 \mu\text{m}$, welche noch eine ausreichende Signaländerung bei Aufnahme der PACs und eine gute laterale Auflösung ermöglichten. Die Verwendung von sub- μm UMEs wurde mehrfach getestet, jedoch konnte hier nie eine signifikante Änderung der Impedanz während der Annäherung gemessen werden.

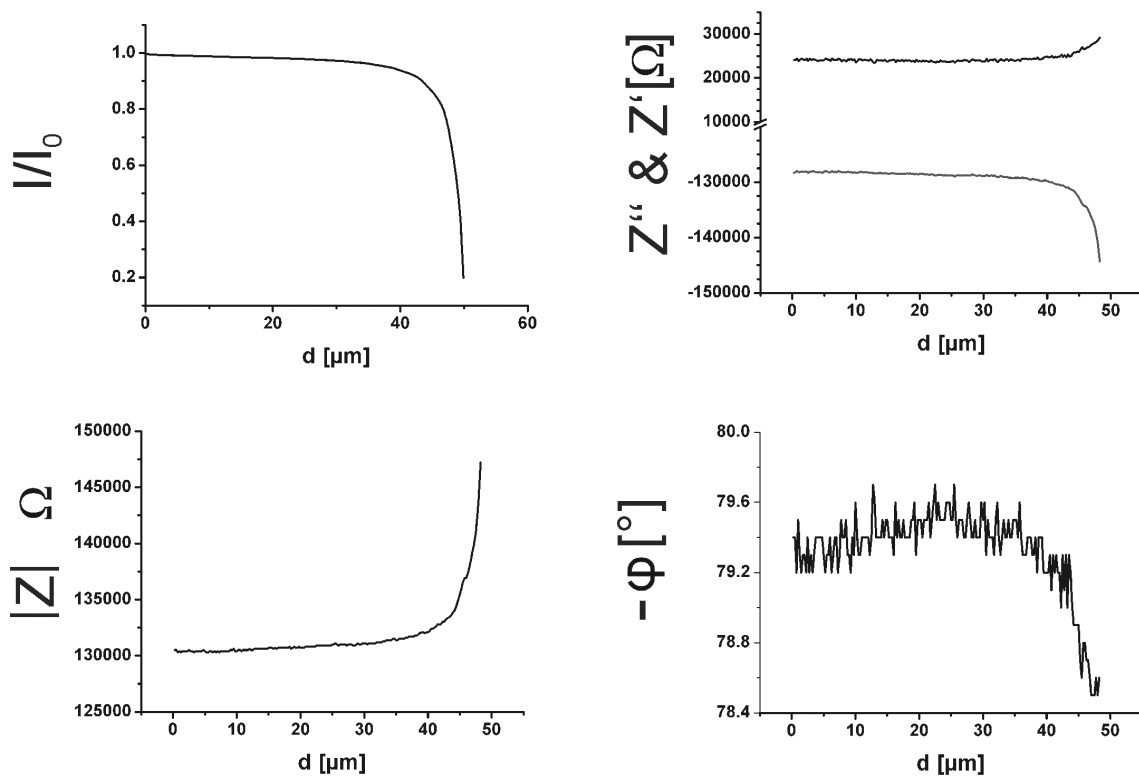


Abbildung 23: Links: Verläufe bei amperometrischer (oben links) und impedimetrischer Annäherung (unten links) einer $2 \mu\text{m}$ UME an einen Isolator. Rechts: Verläufe der impedimetrischen Annäherung aufgeschlüsselt nach Real- und Imaginärteilen (oben rechts) und des Phasenwinkels (unten rechts). Die amperometrische PAC wurde bei $0,3 \text{ V}$ zur Oxidation von FcMeOH ($1,5 \text{ mM}$) aufgenommen. Die Aufnahme der impedimetrischen PAC wurde in PBS^- -Puffer bei $f = 150 \text{ kHz}$, $U = 0 \text{ V}$ und $\Delta U = 500 \text{ mV}$ durchgeführt.

Zudem wurde das impedimetrische Verhalten von UMEs mit sehr kleinen RG-Werten anhand der Lee-Sonden untersucht. Diese gaben im Vergleich zu Sonden gleicher Größe, aber mit RG 10 viel kleinere Änderungen der Impedanz. Dies ist auf den verringerten Blockierungseffekt durch die minimierte Glashülle zurückzuführen. Am Beispiel von $25 \mu\text{m}$

Pt-UMEs wurden diese einer systematischen Studie zum Einfluss des RG-Wertes auf die Änderung der Impedanz unterzogen. Hierbei wurden Sonden mit RG-Werten zwischen eins bis zwei hergestellt und diese an einen Isolator angenähert. Anschließend wurden diese Sonden an der Stirnseite leicht poliert, gefolgt von weiteren PAC-Aufnahmen. Mit dieser Strategie konnten fünf bis sechs PACs einer UME mit verschiedenen RG-Werten im Bereich $1 - 2 \leq 10$ aufgenommen werden. Hierbei zeigten sich Unterschiede in den absoluten Impedanzen zwischen verschiedenen Elektroden, jedoch waren die qualitativen Verläufe der Kurven ähnlich. Dabei stieg die Änderung der Impedanz während der Annäherung von den anfänglichen RG-Werten (1 - 2) zunächst stark an. Bei mittleren RG-Werten von etwa 3-5 wurde dann ein Maximum erreicht, bei größeren RG-Werten nahm die Impedanzänderung wieder ab. Folglich ist die Blockierung des Stromflusses (Widerstand) zur UME bei mittleren RG-Werten effektiver, da hier eine ausreichend große Isolatorschicht vorhanden ist.^[109] In der Praxis lassen sich UMEs mit kleineren RG-Werten näher an das Substrat bewegen, da in jedem Experiment eine Winkelverkipfung zwischen UME und Substrat auftritt. Zudem wurden die Änderungen der Phasenwinkel bei Annäherung bestimmt. Analog zu den Ergebnissen der Gesamtimpedanz weisen *Lee*-Sonden mit sehr kleinen RG-Werten nur eine geringe Änderung der Phasenwinkel beim Annähern auf. Wurden die Elektroden an der Stirnseite nochmals poliert, konnten größere Änderungen des Phasenwinkels auf Werte von etwa $25^\circ - 45^\circ$ beobachtet werden. Diese Werte waren auch bei weiterer Vergrößerung des RG-Wertes konstant.

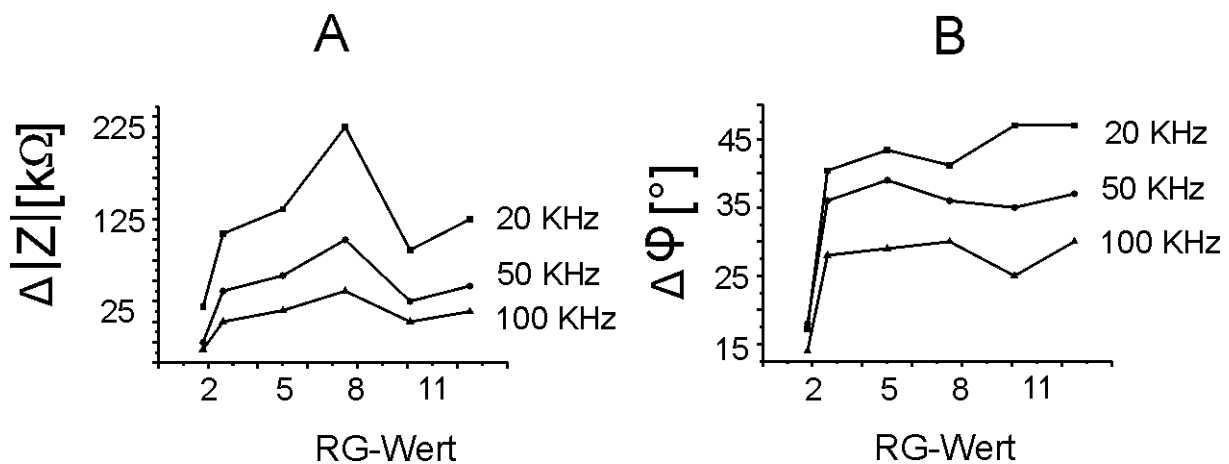


Abbildung 24: Abhängigkeit der Änderungen der Gesamtimpedanz (A) und der Änderungen der Phasenwinkel (B) bei der Annäherung einer 25 μm Pt-UME an ein Deckglas bei verschiedenen Frequenzen und RG-Werten.

5.2 Topographiestudien idealer Substrate

5.2.1 Amperometrisch

Zur Demonstration der erreichbaren Abbildungsqualität wurde ein poröser Träger mit quadratischen Löchern (Kantenlänge 800 nm; Tiefe 10 μm) mit einer 200 nm UME und FcMeOH als Redoxmediator abgebildet.^[P1] Zur Ausrichtung des Substrates wurden PACs bis 50% $I_{T, \infty}$ aufgenommen. Anschließend wurden PSCs zur Positionierung der UME in einem Lochfreien Bereich aufgenommen. Zur Verbesserung der Auflösung wurde die Sonde anschließend auf 20% $I_{T, \infty}$ an das Substrat angenähert. Hierbei wurde eine sehr gute laterale Auflösung im nm-Bereich erreicht. Die Signale im gezeigten Ausschnitt sind sehr homogen und reichen von Werten nahe dem Offset des Potentiostaten von etwa -5 pA zwischen den Löchern bis zu 24 pA über den Löchern. Durch die große Tiefe der Löcher im Vergleich zur Sonde wird über den Löchern $I_{T, \infty}$ erreicht. Jedoch sind beim Vergleich beider Abbildungen Unterschiede erkennbar. Die geometrischen Verzerrungen im SECM-Bild sind dabei auf eine kleine Neigung im Substrat in y-Richtung zurückzuführen. Als Resultat sind die Abstände in y-Richtung kleiner als in der AFM-Abbildung. Als Folge spannen vier Poren ein Parallelogramm anstatt eines Quadrates auf. Zusätzlich treten in Vorschubrichtung der Sonde (x-Richtung in Abbildung 25) Ausbuchtungen auf, sodass die Poren dreieckig erscheinen. Dieser Sachverhalt kann durch einen Strömungseffekt von den Poren zur UME bei dem sehr kleinen Abstand zum Substrat erklärt werden. Wurde der Abstand der Sonde zum Substrat vergrößert, traten die zusätzlichen hydrodynamischen Massentransporte aus den Poren nicht mehr auf, jedoch war die erreichte Auflösung viel geringer.

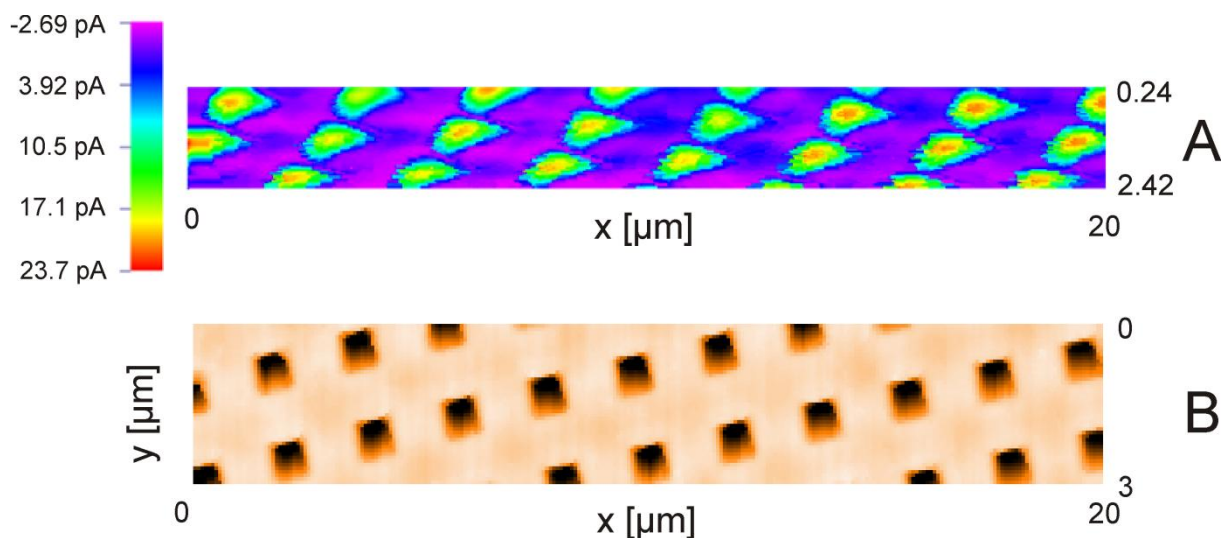


Abbildung 25: A: SECM-Abbildung eines porösen Si/SiO₂-Substrates mit einer 200 nm UME. Aufnahmeparameter: Vorschubgeschwindigkeit 0,4 $\mu\text{m/s}$; Detektionspotential 0,4 V; 1 mM wässrige FcMeOH-Lösung mit 0,25 M KNO₃. B: AFM-Abbildung des porösen Substrates.^[P1]

Weitere ideale Substrate stellen poröse Filtermaterialien dar, welche zur besseren Fixierung in Form von Zellkultureinsätzen verwendet werden. Hierbei ist der Filter bereits fest mit einem Plastikhalter verbunden. Die Filter sind in verschiedenen Materialien und Porengrößen kommerziell erhältlich. Diese werden mittels Ionenspurtechnologie gefertigt und bestehen meist aus Polykarbonat. Dabei werden Schwerionen auf das Polykarbonat geschossen und hinterlassen dabei Ionenspuren, welche nachfolgend durch chemische Ätzverfahren (beispielsweise durch NaOH) bis zum gewünschten Durchmesser aufgeweitet werden. Somit werden statistisch verteilte, zylindrische Poren mit scharfen Übergängen und sehr regelmäßigen Durchmessern erhalten. Abbildung 26 zeigt eine SECM-Aufnahme einer Polykarbonatmembran mit 8 µm Poren, die mit einer 2,4 µm UME und 4 mM [Ru(NH₃)₆]Cl₃ bei U = -0,4 V aufgenommen wurde. Dabei sind die statistisch verteilten Poren von regelmäßiger Größe gut zu erkennen. Bei der Fertigung kann es vorkommen, dass zwei Ionen nah beieinander auf das Filtermaterial treffen, sodass sich die geätzten Poren überlappen (Position (140; 60)). Aus der Anzahl der Poren im Bildausschnitt kann zudem die Porendichte bestimmt werden. Bei erkennbaren neun Poren in Abbildung 26 ergibt sich eine Porendichte von $9 \text{ Poren}/(110 \cdot 90 \text{ µm})^2 = 0,9 \cdot 10^5 \text{ Poren/cm}^2$, welche gut mit den Herstellerangaben von $1 \cdot 10^5 \text{ Poren/cm}^2$ übereinstimmt.

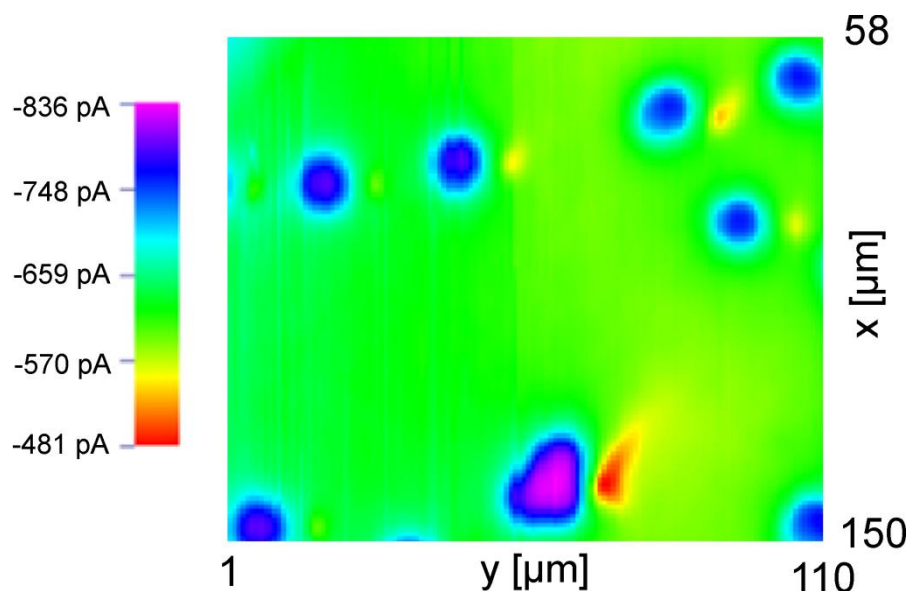


Abbildung 26: SECM-Abbildung einer Filtermembran aus Polykarbonat mit 8 µm Poren. Aufnahmeparameter: 2,4 µm UME; 4 mM [Ru(NH₃)₆]Cl₃; U = -0,4 V.

Die Porendurchmesser in der SECM-Abbildung liegen dabei mit $10 \pm 1 \text{ µm}$ etwas über den Werten der optischen Mikroskopie-Aufnahmen. Dies ist in der diffusiven Verbreiterung der Strukturen an den Lochkanten begründet.

Neben den untersuchten anorganischen Substraten standen insbesondere Abbildungen verschiedener Zellen im Fokus der Arbeit. Als erste Testobjekte wurden mit Glutaraldehyd durchfixierte Epithelzellen verwendet. Durch die Fixierung wurden die Zellen plastisch konserviert, sodass diese in Messlösungen jedweder Osmolarität und in vielen Experimenten studiert werden konnten, ohne dass eine Topographieänderung auftrat. In Abbildung 27A ist ein größerer Ausschnitt einer MDCK II-Zellmonoschicht gezeigt. Dabei wurde eine 3 μm UME mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 8 $\mu\text{m}/\text{s}$ und einem Potential $U = -0,3 \text{ V}$ betrieben, um $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ umzusetzen.^[P1] Hierbei zeigte sich, dass eine Zellmonoschicht in einem weiteren Bereich über keine homogene Topographie verfügt. Innerhalb der Zellmonoschicht gibt es Regionen, in denen mehrere benachbarte Zellen auf ähnlichem Höhenniveau liegen, zudem sind auch Zell-freie Bereiche im SECM erkennbar. Da jedoch die untersuchte Zellschicht konfluent bewachsen war, liegen einige Zellen viel tiefer als die höchstgelegenen Zellen und sind daher außerhalb des Fokus des SECM. Zusätzlich sind in Abbildung 27A rechts oben und an der linken Seite Bereiche zu identifizieren, die rundlich erscheinen und vergleichsweise hoch liegen. Diese dreidimensionalen Strukturen werden als *domes* bezeichnet. Sie entstehen bei MDCK II-Zellkulturen, die bereits konfluent sind und dann weiter in Kultur gehalten werden. Nach erfolgter Konfluenz transportieren die Zellen Salze von der apikalen (oberen) zur basalen (unteren) Zellseite und reichern diese dort an. In der Folge wird die Konzentrationsdifferenz des Salzes zwischen apikaler und basaler Zellseite durch Wasser abgebaut, wodurch es zur lokalen Desorption der Zellen vom Substrat und so zur Bildung der *domes* kommt. Diese können, je nach Ausprägung und Stadium, mehrere Zelldurchmesser in vertikaler Dimension erreichen und führen daher zu Problemen in SECM-Abbildungen im *constant-height*-Modus.

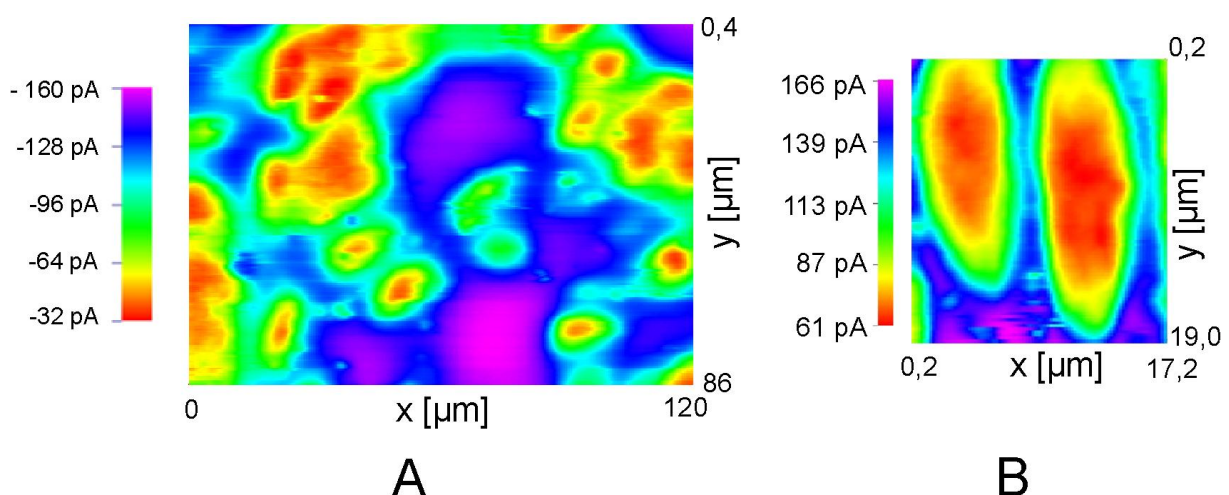


Abbildung 27: SECM-Abbildungen im *constant-height*-Modus einer fixierten MDCK II-Zellmonoschicht. A: Übersichtsabildung der Monoschicht mit 3 μm UME und 1 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ bei $U = -0,3 \text{ V}$; B: Hochauflösende Abbildung zweier Zellen mit einer 1 μm UME und 1,5 mM FcMeOH bei $U = 0,4 \text{ V}$.^[P1]

In Abbildung 27B ist zudem ein hochauflösender Ausschnitt einer MDCK II-Zellmonoschicht ohne *domes* angeführt, der mit einer 1 μm UME und 1,5 mM FcMeOH abgebildet wurde. Um die von den *domes* ausgehende Gefahr der Sondenschädigung zu umgehen, wurde in nachfolgenden Experimenten auf NRK-Zellen ausgewichen, die ebenfalls über eine Pflasterstein-Morphologie verfügen, jedoch keine dreidimensionalen Strukturen ausbilden.

5.2.2 Impedimetrisch

Die erreichbare Auflösung in der AC-SECM ist Gegenstand aktueller Forschung und wird konträr diskutiert. In der ersten Arbeit zur AC-SECM wurde auf die Beziehung zwischen Strom und Widerstand über das Ohmsche Gesetz hingewiesen, sodass beide Größen zwar gegenläufig sind, jedoch zwischen beiden kein Vor- oder Nachteil in der erreichbaren Auflösung bestehen sollte.^[110] An anderer Stelle wird auf eine inverse Beziehung zwischen der Sondengröße und Änderung der Impedanz bei Annäherung an ein Substrat hingewiesen, sodass der Einsatz möglichst kleiner UMEs vorteilhaft ist.^[111] Zudem ist eine Arbeit zur AC-SECM zur vergleichenden Abbildung von Zellen unter An- und Abwesenheit von Mediator dokumentiert.^[75] Dabei wurde bei Annäherung einer 2 μm UME im amperometrischen Betrieb eine Stromreduzierung von 90% erreicht, im impedimetrischen jedoch nur von 10%. Damit wurde der Einsatz größerer UMEs mit Durchmessern von 5 - 10 μm bei impedimetrischer Aufnahme erwogen, die jedoch nicht für hochauflösende Darstellungen von Substraten geeignet sind.

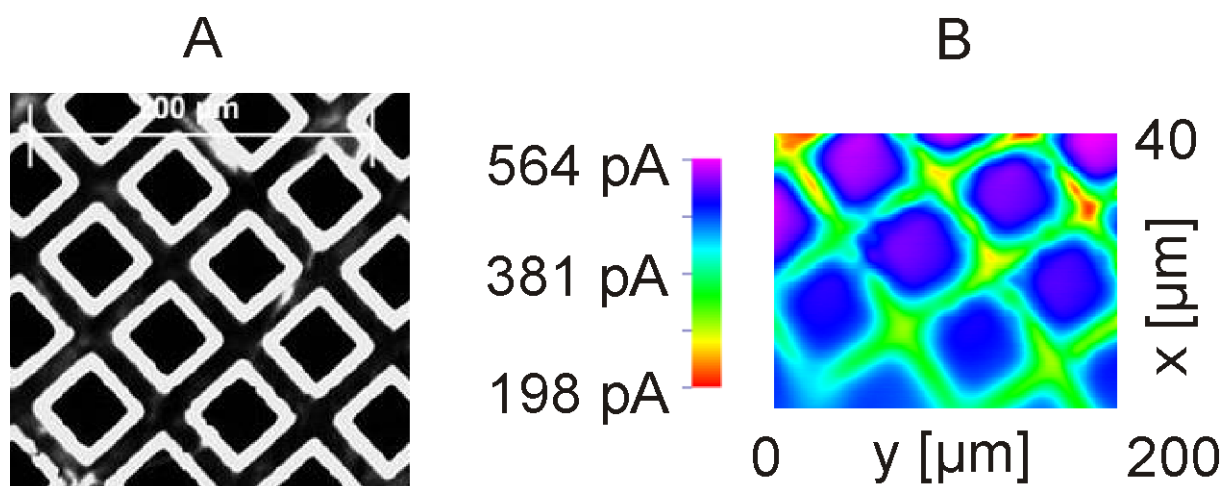


Abbildung 28: Optische Aufnahme eines C-beschichteten Cu-TEM-Gitters mit 400 *mesh* (A) und eine amperometrische SECM-Aufnahme, aufgenommen mit einer 10 μm UME mit 1,5 mM FcMeOH bei $U = 0,3$ V (B).

Als ideale Substrate mit topographischen Details in der Größenordnung von 10 - 50 μm eignen sich Gitter, die in der TEM als Probenhalter verwendet werden. Die Gitter sind aus blankem Cu gefertigt und je nach Ausführung nachträglich mit Kohlenstoff oder Gold beschichtet. Damit ist in jedem Falle eine leitende Oberfläche zu erwarten. Die Gitter

besitzen einen regelmäßigen Aufbau und sind in verschiedenen Stegbreiten und Kantenlängen der quadratischen Aussparungen erhältlich. Abbildung 28A zeigt eine optische Aufnahme eines 400 *mesh* Substrates aus C-beschichtetem Cu.

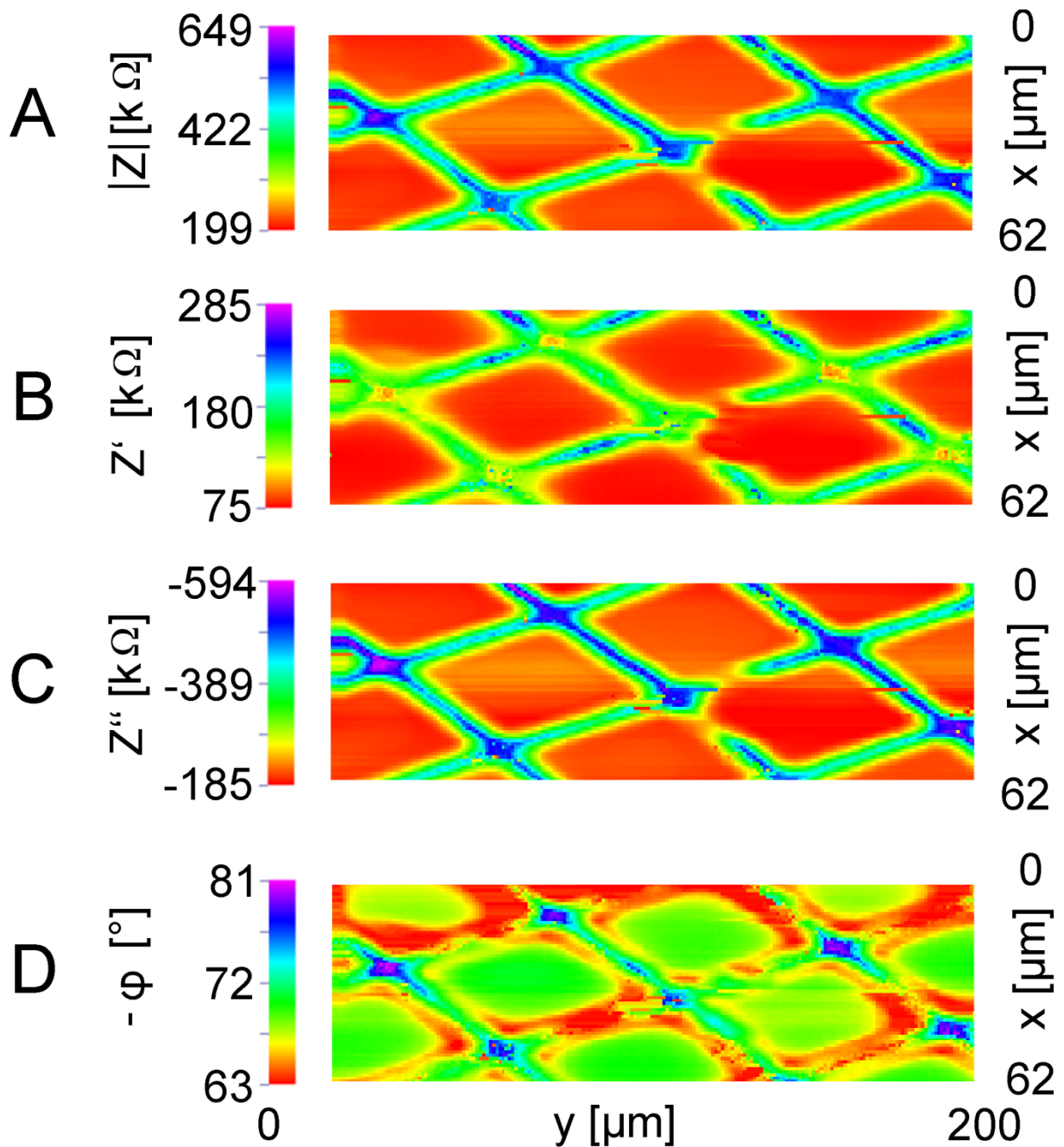


Abbildung 29: Impedimetrische SECM-Aufnahme im *constant-height*-Modus als Darstellung der Gesamtimpedanz (A), der Real- und Imaginärteile (B und C), sowie des Phasenwinkels (D) eines 400 *mesh* C-beschichteten Cu-TEM-Gitters mit einer 10 μm UME unter Anwesenheit von FcMeOH bei $U = 0,3 \text{ V}$, $f = 100 \text{ kHz}$ und $\Delta U = 0,1 \text{ V}$.

Zur ersten Orientierung wurden amperometrische Aufnahmen mit einer 10 μm UME in einer FcMeOH-Lösung bei 0,3 V durchgeführt. Hierbei ist die regelmäßige Struktur zu erkennen, jedoch sind die Übergänge an den Kanten der Aussparungen und insbesondere an den

Ecken durch die diffusive Verbreiterung weicher. Trotz der leitenden Oberfläche und der sehr guten Abbildungsqualität, was auf eine gute Sondenqualität hinweist, wurde keine positive Rückkopplung erhalten. Offenbar ist hier die Regeneration des Mediators am C-beschichteten Cu bei der verwendeten Sondengröße nicht effizient genug, um die an allen Oberflächen auftretende negative Rückkopplung zu überkompensieren.

Anschließend wurde die Sonde an der auch für die amperometrische Bildaufnahme verwendeten Position belassen und auf die Impedanzmessung mit $f = 100 \text{ kHz}$, $\Delta U = 0,1 \text{ V}$ und $E = 0,3 \text{ V}$ umgeschaltet. In Abbildung 29A ist dabei zunächst die Gesamtimpedanz gezeigt. Da bei der Bildaufnahme an jedem Messpunkt die Frequenz eingestellt werden muss, ist die Aufnahmezeit im Vergleich zur Amperometrie deutlich verlängert. Bei einer Anzahl von 40000 Bildpunkten, die jener in Abbildung 28B entspricht, werden im amperometrischen Modus etwa 30 min, im impedimetrischen Modus dagegen etwa 4 h benötigt, sodass dynamische Prozesse oder instationäre Substrate nicht mit hoher Zeitauflösung abgebildet werden können. Analog dem amperometrischen Modus entspricht der maximale Signalwert etwa dem dreifachen des minimalen Signalwertes, sodass hier auf eine analoge Beziehung zwischen Strom (amperometrisch) und Widerstand (impedimetrisch) bei konstantem Potential geschlossen werden kann.^[110] Neben der geringfügigen Verzerrung in x-Richtung sind im Vergleich zur Amperometrie sehr scharfe Kanten zu erkennen, da bei der Impedanzmessung keine Verbreiterung der Strukturen infolge der Mediator diffusion erfolgt. Analog zu den amperometrischen Messungen zeigte sich eine negative Rückkopplung mit einer erhöhten Impedanz über den Gitterstegen und einer erhöhten Admittanz über den Aussparungen. Die Abbildung 29B zeigt die realen Signalanteile, welche die ohmschen Anteile zwischen der UME und der Gegenelektrode widerspiegeln. Dieser Parameter ist zur hochauflösenden topographischen Darstellung der TEM-Gitter weniger gut geeignet, da hier der Kontrast im Vergleich zur Gesamtimpedanz abgenommen hat. In Abbildung 29C sind die imaginären Signalanteile gezeigt. Die Beträge der imaginären Impedanzen ist dabei deutlich höher als die der realen, sodass die Doppelschicht schon bei einer $10 \text{ }\mu\text{m}$ UME einen dominierenden Effekt auf die Gesamtimpedanz aufweist. Dieses Verhalten zeigt sich auch in Abbildung 29D, in der die Phasenwinkel orts aufgelöst dargestellt wurden. Durch Werte nahe -90° besitzt die UME einen großen kapazitiven Charakter. Dabei zeigt die Darstellung des Phasenwinkels einige topographische Auffälligkeiten, die auf eine lokale Beeinflussung der Doppelschichtkapazität hinweisen. Wurde anstatt eines gleich dimensionierten, jedoch blanken Cu-Gitters ohne Beschichtung mit einer $5 \text{ }\mu\text{m}$ UME untersucht, ergaben sich sowohl im amperometrischen als auch im impedimetrischen Modus positive Rückkopplungen. Dies kann auf eine höhere Effizienz der Mediatorregeneration an reinem Cu zurückgeführt werden.

Zudem wurde die Potentialabhängigkeit der impedimetrischen Messung bei Anwesenheit von FcMeOH untersucht. Dazu wurden repetitive Abbildungen eines blanken 400 *mesh* Cu-Gitters mit einer 5 μm UME bei -0,2 V und +0,4 V durchgeführt. Hierbei erfolgt bei +0,4 V eine vollständige Konversion von FcMeOH an der UME, nicht dagegen bei -0,2 V. Dabei wurden in den impedimetrischen Abbildungen keine qualitativen Unterschiede festgestellt.

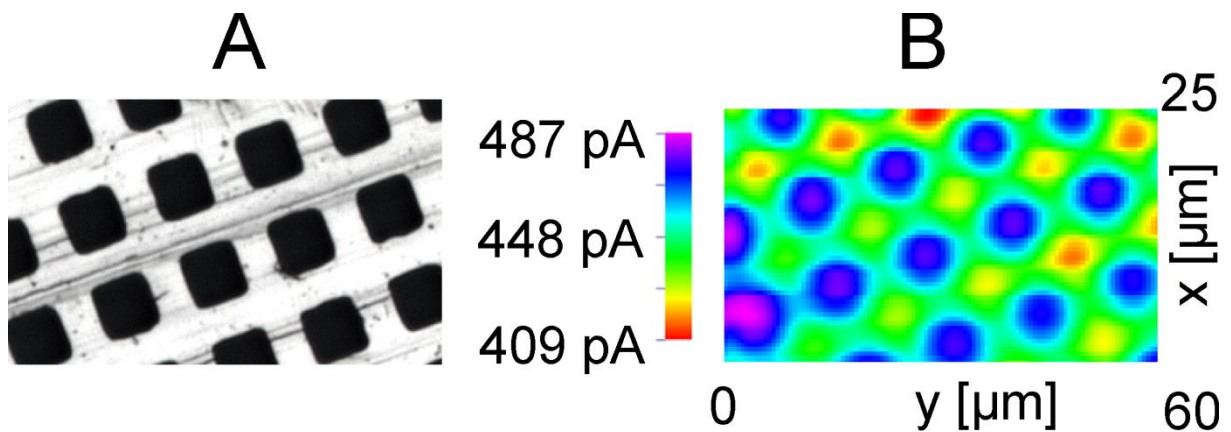


Abbildung 30: Abbildungen eines Au-beschichteten Cu-TEM-Gitters mit 2000 *mesh*. A: Optische Mikroskopieaufnahme; B: Amperometrische SECM-Aufnahme mit einer 3,5 μm UME mit FcMeOH bei $U = 0,3$ V.

Nachfolgend wurde der Einfluss einer reduzierten Sondengröße untersucht. Zudem sollte der Vorteil der Impedanz, die mediatorfreie Abbildung, genutzt werden. Um vergleichbar viele Poren im Bildausschnitt zu erhalten, wurde ein Cu-Gitter mit 2000 *mesh* verwendet, auf das Au aufgedampft war. Neben der optischen Aufnahme (Abbildung 30A) wurde mit einer 3,5 μm UME zunächst unter Anwesenheit von FcMeOH eine amperometrische Aufnahme durchgeführt (Abbildung 30B). Hier ist die regelmäßige Anordnung und Größe der Poren erkennbar. Konträr zur Abbildung des 400 *mesh* Substrates mit der 10 μm UME wurde eine schwache positive Rückkopplung über den Stegen (blauen Kolorierung) erhalten, die durch die Aufnahme der zugehörigen PACs unterstützt wurde. Dies kann auf den edlen Charakter des Gittersubstrates zurückgeführt werden, welches offenbar mit einer erhöhten Regenerationseffizienz einhergeht. Da der erhaltene Stromwert additiv aus den Anteilen der negativen Rückkopplung, welche zu einem kleineren Stromwert führt, und der positiven Rückkopplung, die eine Signalerhöhung bedingt, zusammen gesetzt ist, ist die absolute Signaländerung über den Stegen und über den Poren vergleichsweise gering.

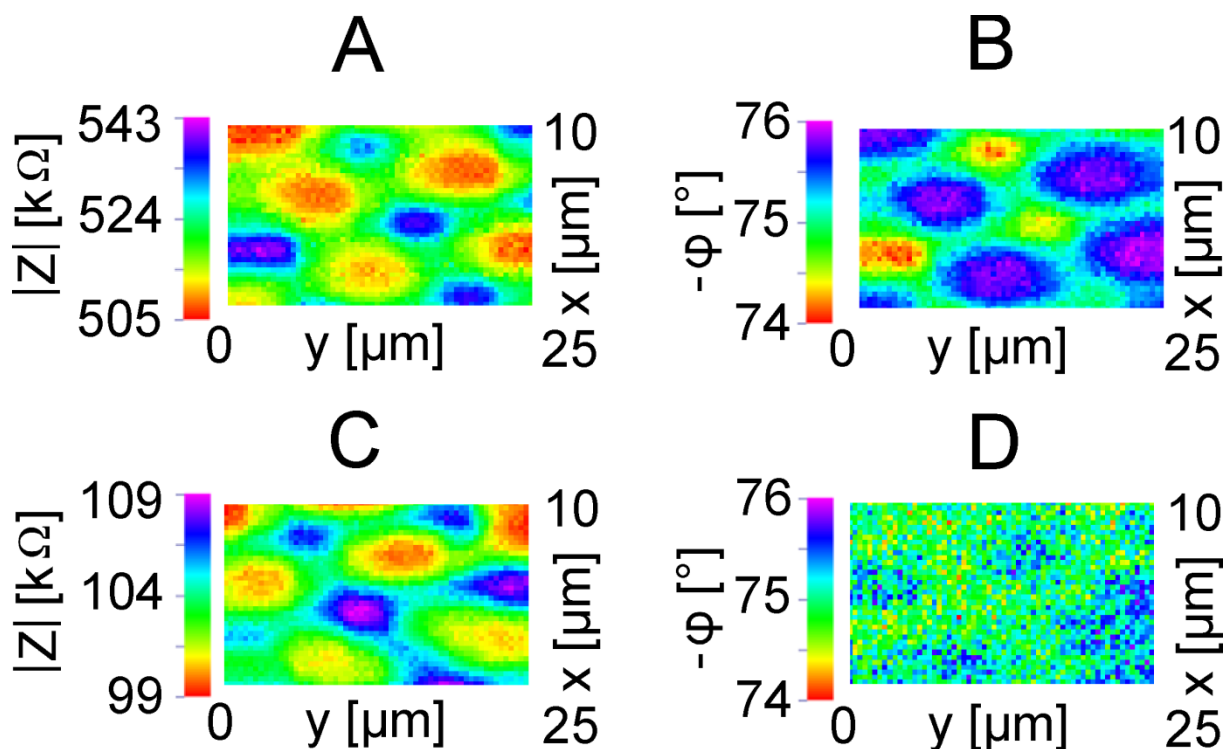


Abbildung 31: Impedimetrische SECM-Aufnahmen eines goldbeschichteten Cu-TEM-Gitters mit 2000 *mesh*. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 5 μm UME mit $U = 0,3 \text{ V}$ und $\Delta U = 0,1 \text{ V}$ in PBS^- -Puffer ohne Mediatorzusatz bei $f = 100 \text{ kHz}$ (A/B) und $f = 400 \text{ kHz}$ (C/D). Bei beiden Ausschnitten sind jeweils die Gesamtimpedanzen (A und C) und die zugehörigen Phasenwinkel (B und D) dargestellt.

Anschließend wurde das 2000 *mesh* Substrat mit einer 5 μm UME in PBS^- Puffer ohne Mediatorzusatz und unter konstanten Bedingungen ($f = 100 \text{ kHz}$, $\Delta U = 0,1 \text{ V}$, $E = 0,3 \text{ V}$) impedimetrisch abgebildet. Hier wurde eine negative Rückkopplung erhalten (Abbildung 31A). Auch in der zugehörigen Darstellung der Phasenwinkel wurden alle wichtigen topographischen Details erhalten. Anschließend wurde die Frequenz auf 400 kHz erhöht, um die resistiven Anteile der Impedanz stärker zu betonen (Abbildung 31C). Hierbei wurde qualitativ keine bessere Auflösung erreicht, jedoch ging bei dieser hohen Frequenz die Information über die Phasenwinkel vollständig verloren (Abbildung 31D).

Insgesamt kann aus den Impedanzexperimenten geschlossen werden, dass die Abbildungsmethode insbesondere bei größeren UMEs (10 - 25 μm) durch das Potential zur Abbildung in Mediatorabwesenheit mit dem amperometrischen Modus konkurrieren kann, auch wenn die Zeitauflösung deutlich schlechter ist. Jedoch zeigten insbesondere die kleineren UMEs mit $\varnothing \leq 5 \mu\text{m}$ eine signifikant geringere Änderung der Impedanz bei Annäherung. Dies steht im Einklang der Ergebnisse von Diakowski.^[75] Umgekehrt müssen die Ergebnisse von Horrocks^[110] zurückgewiesen werden, nachdem die Impedanzänderung bei Sonden jedweder Dimensionierung analog der amperometrischen Änderung ist. Ebenso

stehen die Ergebnisse konträr zu der Arbeit von Osbourn^[111], in der kleinere Sonden eine umso größere Änderung der Impedanz bei Annäherung zeigten.

5.3 Untersuchung der positiven Rückkopplung

Wird an einem Leiter kein externes Potential aufgeschlagen, so können dennoch Elektronen vom Leiter auf einen anwesenden Mediator übergehen. Im Falle einer damit stattfindenden Regenerierung des Mediators wird eine positive Rückkopplung erhalten. Die dafür benötigten Elektronen müssen an einem räumlich entfernten Punkt des Leiters durch eine elektrochemische Umsetzung eines in der Lösung anwesenden Analyten oder des Lösungsmittels übertragen werden. Durch die räumliche Trennung der Elektronenabgabe und Elektronenaufnahme entstehen im Leiter Orte mit Elektronenüberschuss und Elektronenmangel. Durch die Ladungstrennung innerhalb des Leiters wird von der Entstehung einer bipolaren Elektrode gesprochen. In der jüngsten Literatur ist eine Limitierung der positiven Rückkopplung über leitenden Oberflächen bei hinreichend kleinen Leitern ohne Potentialaufschlag diskutiert worden.^[112] Dieses Verhalten eines Leiters bei Variation der Größenverhältnisse zwischen Substrat und UME sollte im Folgenden untersucht werden.

Nachfolgende Anwendungen könnten Studien ein- und zweidimensionaler Nanostrukturen sein, die mindestens eine makroskopische Dimension aufweisen. In der Literatur wurden SECM-Abbildungen eines Au-Nanobandes (Breite: 500 nm; Länge: 50 μm) mit einer 2 μm UME beschrieben.^[113] Hier ist die abbildende Elektrode etwa 10-mal größer als das Substrat. Zudem wurde die Abbildung eines einwandigen Nanoröhrchens (\varnothing 1,6 nm, Länge 2 mm) mit einer 10 μm UME beschrieben.^[114] Dieses erstaunliche Ergebnis wurde mit einer sehr effizienten Mediatorregeneration erklärt.

5.3.1 Vorexperimente

Zur Untersuchung, ob die Verringerung der Sondengröße Einfluss auf die Fähigkeit als bipolare Elektrode hat, wurden zwei Pt-UMEs an einer Normalen, jedoch gegenläufig zueinander, positioniert. Diese Anordnung entspricht der eines Generator/Kollektor-Experiments. Dazu wurde eine 60 μm Pt-UME mit einer 25 μm UME einmal unter Potentialaufschlag für die Regeneration von FcMeOH und nachfolgend ohne Potentialaufschlag abgebildet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stromerhöhung über dem Leiter. Im Falle eines Potentialaufschlags an der Substratelektrode kam es zu einem höheren Stromwert an der abbildenden UME. Nachfolgend wurde die 60 μm Pt-UME mit einer 0,6 μm UME abgebildet (Abbildung 32A und C). Hierbei zeigte sich nur eine marginale Stromerhöhung bei Verwendung eines Potentialaufschlags an der Substratelektrode. Dies kann mit den relativen Größenverhältnissen beider UMEs begründet werden. Während im ersten Experiment beide UMEs eine ähnliche Dimensionierung

aufweisen, ist im zweiten Experiment die Substratelektrode um ein Vielfaches größer als die abbildende UME. Ist der abzubildende Leiter von ähnlicher Größe, ist die Fähigkeit des Leiters, als bipolare Elektrode zu wirken, begrenzt. Daher resultierte eine Stromerhöhung bei Potentialaufschlag nur im ersten Experiment. Im zweiten Experiment ergaben sich mit und ohne Potentialaufschlag nahezu keine Unterschiede, da hier die kleinere UME den Einfluss eines quasi unendlichen Leiters spürt.

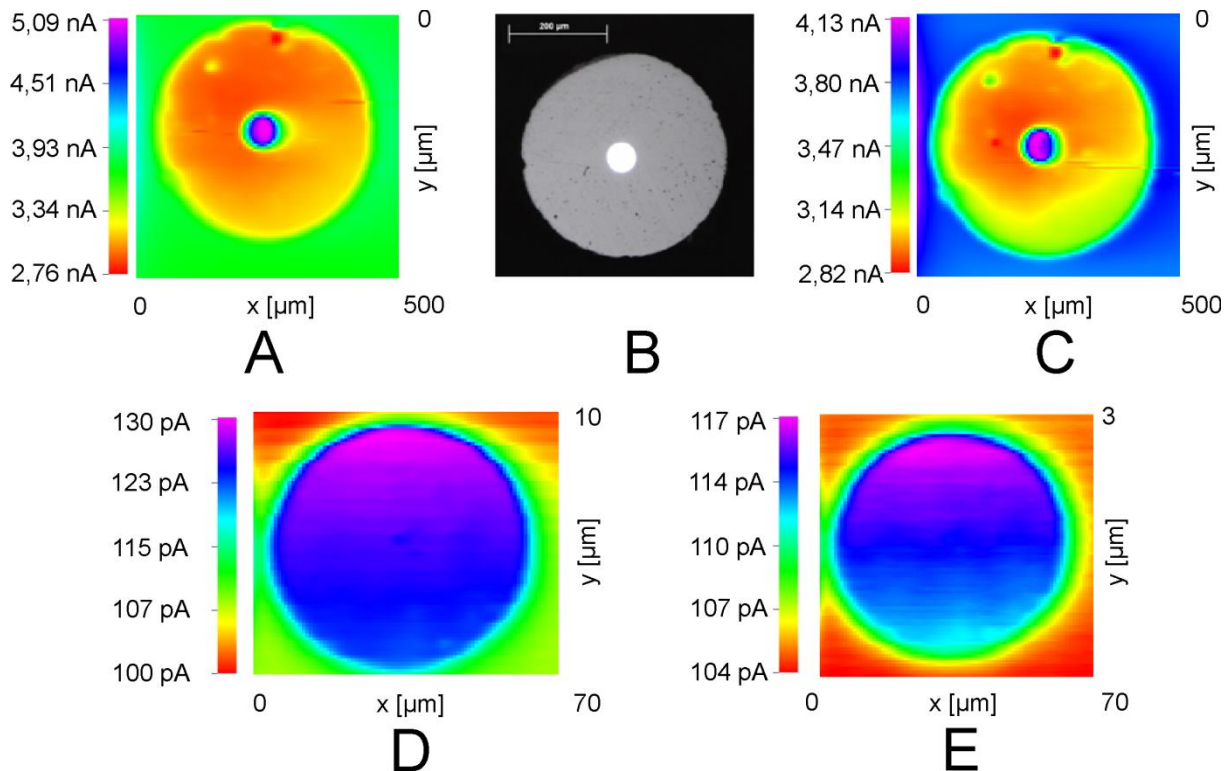


Abbildung 32: SECM-Abbildungen einer 60 µm Pt-UME als Substratelektrode mit einer 25 µm Pt-UME mit (A) und ohne (C) Potentialaufschlag von -0,2 V zur Reduktion von FcMeOH⁺. Die vergleichende Darstellung der UME mittels optischer Mikroskopie ist in (B) dargestellt. Die aktive Pt-Elektrode wurde nachfolgend mit einer 0,6 µm UME mit (D) und ohne (E) Potentialaufschlag von -0,2 V zur Reduktion von FcMeOH⁺ abgebildet. In allen SECM-Abbildungen wurde FcMeOH (1 mM) bei 0,3 V an der scannenden UME oxidiert.

Nachfolgend wurde das Experiment mit einer 25 µm UME wiederholt, die wiederum mit einer 25 µm UME und einer 0,6 µm UME abgebildet wurde (vgl. Abbildung 33). Da hier beide UMEs gleich groß sind (Ø 25 µm), wurde keine positive Rückkopplung mehr erhalten, wenn kein Potential aufgeschlagen wurde (Abbildung 33C). Jedoch zeigte sich eine deutliche Signalverstärkung bei Potentialaufschlag (Abbildung 33A). Bei der Abbildung der 25 µm UME mit der 0,6 µm UME, ergaben sich mit und ohne Potentialaufschlag an der Substratelektrode wiederum kaum Unterschiede, da auch die 25 µm UME viel größer als die 0,6 µm UME ist (Abbildungen 33D und E).

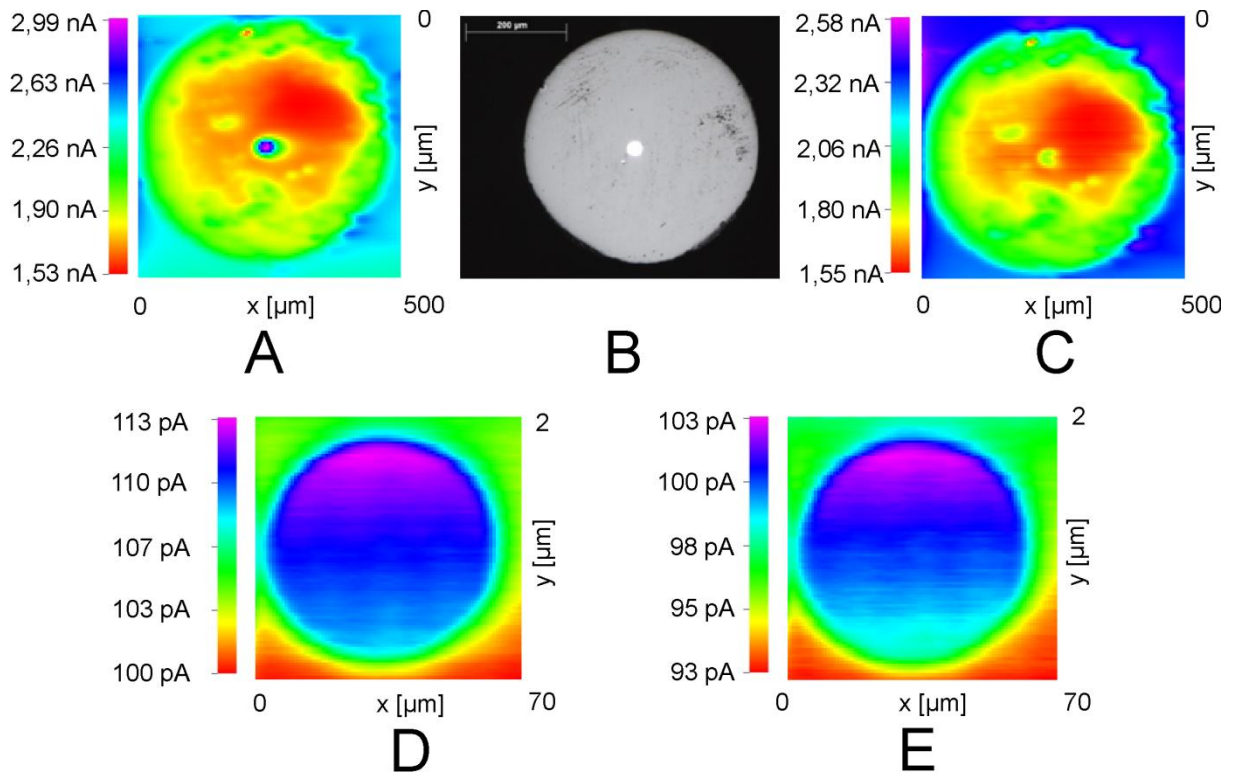


Abbildung 33: SECM-Abbildungen einer 25 µm Pt-UME als Substratelektrode mit einer 25 µm Pt-UME mit (A) und ohne (C) Potentialaufschlag. Anschließend wurde die aktive Pt-Elektrode gegen eine 0,6 µm UME mit (D) und ohne (E) Potentialaufschlag getauscht. Die optische Mikroskopieaufnahme ist in B dargestellt. Alle weiteren Parameter sind analog zu Abbildung 32.

Im letzten Experiment wurde versucht, eine 3 µm UME mit einer 25 µm UME abzubilden (Abbildung 34). Hierbei wurde erwartungsgemäß ohne Potentialaufschlag keine positive Rückkopplung erhalten. Unter Potentialaufschlag an der Substratelektrode wurde zwar keine positive Rückkopplung detektiert, jedoch war der gemessene Stromwert über dem Leiter größer als über der isolierenden Glasschicht, wenngleich nicht höher als der Stromwert der Bulkphase. Bei der Abbildung der 3 µm UME mit der 0,6 µm UME wurde eine positive Rückkopplung bei Potentialaufschlag erhalten, die jedoch ohne diesen ausblieb. Dies liegt an der nicht ausreichenden Koplanarität zwischen beiden UMEs, sodass hier die 0,6 µm UME nicht nah genug angenähert werden konnte, um die negative Rückkopplung zu überkompensieren.

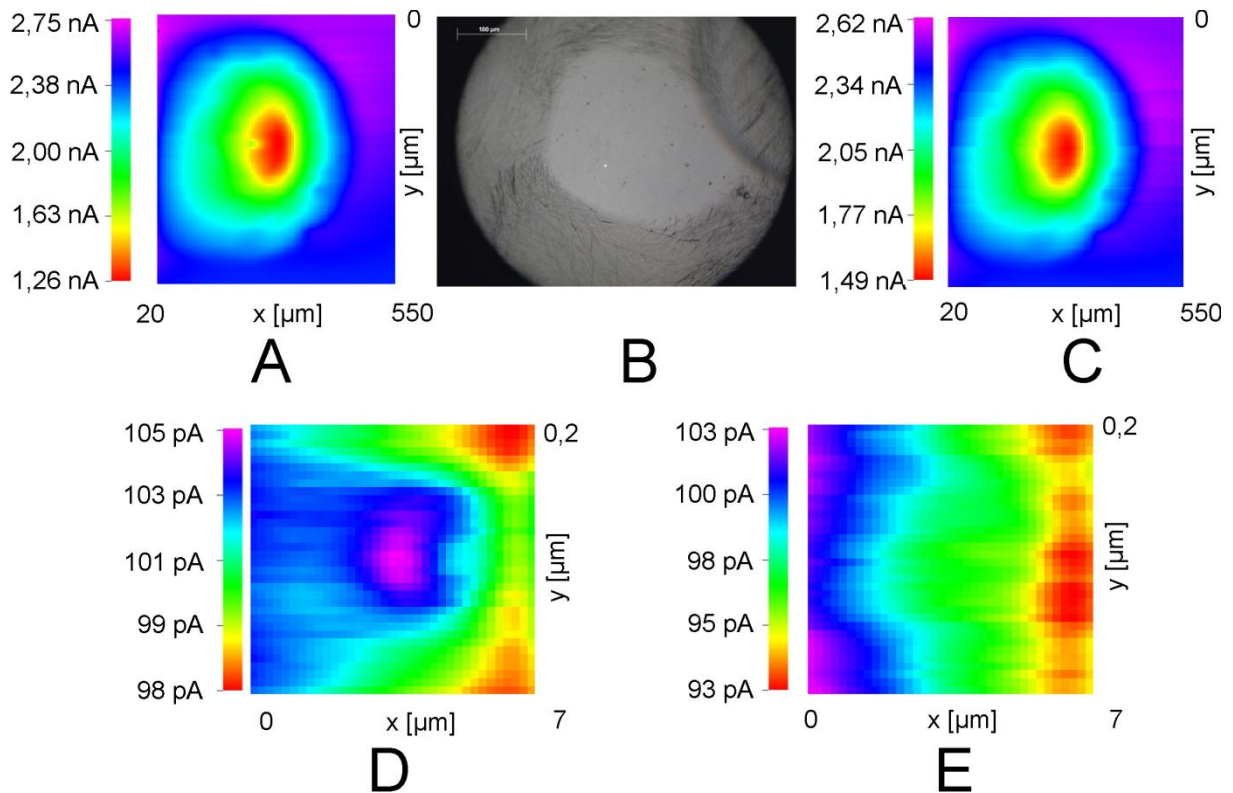


Abbildung 34: SECM-Abbildungen einer 3 µm Pt-UME als Substratelektrode mit einer 25 µm Pt-UME mit (A) und ohne (C) Potentialaufschlag. Anschließend wurde die aktive Pt-Elektrode gegen eine 0,6 µm UME mit (D) und ohne (E) Potentialaufschlag getauscht. Die optische Mikroskopieaufnahme ist in B dargestellt. Alle weiteren Parameter sind analog zu Abbildung 32.

Abschließend kann festgehalten werden, dass ein leitendes Substrat ohne Potentialaufschlag nur mit einer UME mit kleinerer Dimensionierung abgebildet werden kann.^[112] Wird jedoch mit Potentialaufschlag gearbeitet, können auch kleinere Strukturen abgebildet werden.

5.3.2 Goldnanoinself auf Glas

Als Applikation sollte die Auflösungsgrenze bei sehr kleinen UMEs untersucht werden. Als Substrat diente hier ein Objektträger, auf denen Goldinseln in Form liegender Tropfen mit Durchmessern im Bereich von 50 - 200 nm aufgetragen wurden.^[115] Leider konnte hier keine Stromerhöhung bei Verwendung einer 400 nm UME erhalten werden.

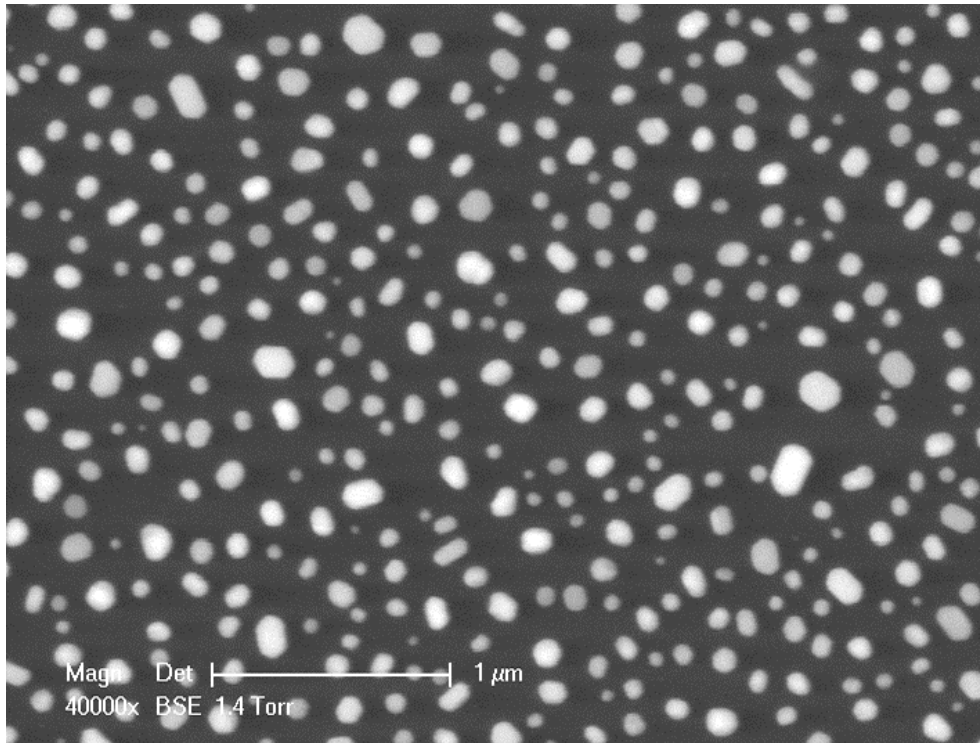


Abbildung 35: SEM-Abbildung der Gold-Nanoinseln auf Glas.^[115]

5.4 Topographiestudien an lebenden Zellen

Die hier beschriebenen Studien wurden an konfluenten Zellmonoschichten durchgeführt, um die erwähnten Vorteile des *constant-height*-Modus auszuschöpfen. Dabei wurde zunächst der Einfluss verschiedener Mediatoren auf die Zellviabilität und der Einfluss des osmotischen Drucks der Lösung untersucht. Anschließend wurden verschiedene Anwendungen erprobt.

5.4.1 Stabilitäts- und Viabilitätsanalyse gängiger Mediatoren

Die verwendeten Mediatoren müssen in erster Linie an Pt-UMEs zuverlässig elektrochemisch detektierbar und im elektrochemischen Fenster alleinig konvertierbar sein, um keine unerwünschten Nebenreaktionen auszulösen. Als geeignete Kandidaten der vergleichenden Studie wurden neben den häufig in der SECM-Literatur verwendeten Mediatoren $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, FcMeOH, FcCOOH und $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ auch die analogen Cyanometallate $\text{K}_4[\text{W}(\text{CN})_8]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und $\text{K}_4[\text{Os}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in die Studie mit einbezogen. Die Mediatoren wurden in einer Konzentration von je 1 mM in PBS^{++} mit 1 g/L Glukose gelöst und auf die NRK-Zellmonoschichten appliziert. Die Experimente wurden analog den SECM-Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde ein auf Calcein-AM basierter Assay durchgeführt, um zuverlässig tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. Calcein-AM ist ein hydrophobes Molekül, das mehrere Ester- und Lactonfunktionen enthält. Als kleines, unpolares Molekül kann es leicht in intakte Zellen permeieren. Dort transformieren Esterasen in den Zellen Calcein-AM zu Calcein, welches stark fluoresziert und nicht mehr die Zellbarrieren überqueren kann. In diesem Viabilitäts-

Assay zeigten $K_4[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Os(CN)_6] \cdot 3H_2O$ zytotoxische Wirkungen auf NRK-Zellen. Von den verbliebenen Kandidaten wurden nachfolgend zykvoltammetrische und amperometrische Messungen durchgeführt, um das Redoxverhalten und die Signalstabilität zu untersuchen. Dabei zeigte $K_4[W(CN)_8] \cdot 2H_2O$ in PBS^{++} -Puffer ein ausgeprägtes ohmsches Verhalten, welches nur durch Zugabe höherer, jedoch unphysiologischer Konzentrationen an NaCl normalisiert werden konnte. Da die Redoxpotentiale von FcMeOH und FcCOOH nur etwa 50 mV auseinander liegen, wurde FcMeOH aufgrund der besseren amperometrischen Signalstabilität der Vorzug gegeben.

Zur Viabilitätsanalyse von U373-MG-Zellen wurden diese mit Messlösungen bestehend aus je 1 mM FcMeOH und $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ in Leibovitz-L15-Puffer überschichtet und die Topographie der Zellen über die Zeit verfolgt. Dabei zeigte sich, dass FcMeOH auch nach 6 h keine sichtbare Topographieänderung induzierte, jedoch wies $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ schon nach 3 h eine starke Zytotoxizität auf.

5.4.2 SECM-Abbildungen von NRK-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse aus den zuvor durchgeführten Zellstudien mit fixierten Zellen und der Mediatorentests wurden NRK-Zellen eingehend im *constant-height*-Modus studiert. Um mögliche Interferenzen mit der Reduktion von gelöstem O_2 auszuschließen, wurde vorzugsweise mit FcMeOH gearbeitet. Zunächst wurden alle Zellmonoschichten durch Aufnahme von PACs ausgerichtet. Nachfolgend wurde die Ortsabhängigkeit der PACs über der Zellmonoschicht untersucht.

5.4.2.1 Ortsabhängigkeit der PACs über einer NRK-Zellkultur

Wird eine UME über einer Stelle der Zellmonoschicht angenähert, ist es im Voraus unklar, ob sich die Sonde direkt über einem Zellkörper, über einem Zell-Zell-Kontakt oder an einer Position zwischen diesen beiden Extremen befindet. Daher wurde eine 1,2 μm UME zunächst auf 75% $I_{T, \infty}$ an das Substrat angenähert und eine PSC aufgezeichnet (eingefasstes Bild in Abbildung 36). Dabei sind zwei Zellkörper bei den Positionen 15 μm und 30 μm zu erkennen.

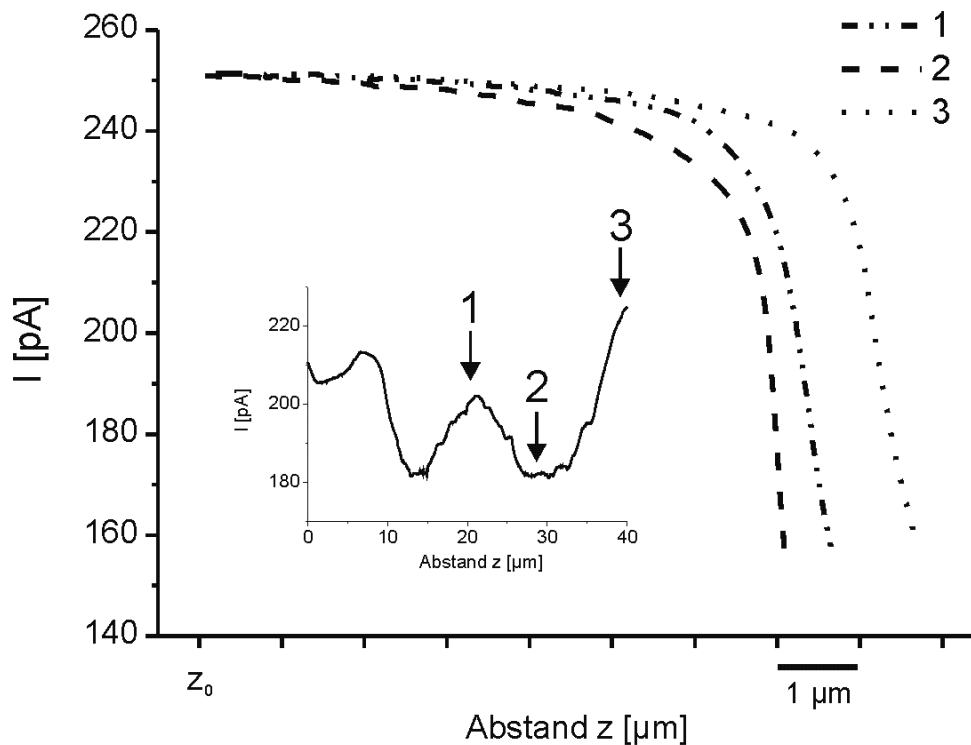


Abbildung 36: Abhängigkeit der Form der PACs an drei verschiedenen Positionen (1 - 3) über einer NRK-Zellmonoschicht mit einer $1,2 \mu\text{m}$ UME in PBS^{++} -Puffer mit $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH. Die PACs wurden von einer virtuellen Ebene z_0 aus aufgenommen und der Abstand der UME bis zum Erreichen von $60\% I_{T, \infty}$ aufgezeichnet. Das eingefasste Bild zeigt eine PSC über der Zellmonoschicht und mit den zugehörigen Positionen aus denen die UME angenähert wurde.^[P2]

Anschließend wurden von einer virtuellen Ebene über der Zellmonoschicht aus PACs an drei charakteristischen Stellen aufgenommen. Hierbei sollte zunächst geklärt werden, ob die Stromunterschiede zwischen Zellkörper und Zell-Zell-Kontakten auf topographische Unterschiede im Substrat zurückzuführen sind. Beim Vergleich der über dem Zellkörper aufgenommen PAC2 in Abbildung 36, mit der über einem Zell-Zell-Kontakt aufgenommenen PAC1, konnte dies verifiziert werden. Diese topographischen Unterschiede sind in der PAC3, in der tieferliegenden, benachbarten Zelle in Richtung größerer Distanzen noch verstärkt. Zudem wurde eine Ortsabhängigkeit der Form der PACs über der Zellmonoschicht detektiert. Während an Position 2 eine steile und ideal verlaufende PAC aufgenommen wurde, ist bei den PACs der Positionen 1 und 3 ein Wendepunkt erkennbar, der einem mechanischen Kontakt zwischen der UME und den Zellen entstammt. Dabei wird deutlich, dass eine Sonde nicht beliebig nah an die Zell-Zell-Kontakte angenähert werden kann. Als direkte Konsequenz kann eine Transformation der $(I; x; y; z)$ -Matrix in eine $(d; x; y; z)$ -Matrix durch die nicht konstanten PACs nicht ohne große Fehler erfolgen. Die Ortsabhängigkeit der PACs über PC12 Zellen wurde bereits in der Literatur diskutiert und auf Unterschiede in der

dreidimensionalen Form der Zellen zurückgeführt.^[116] Als Konsequenz führt die Abbildung von Zellmonoschichten im *constant-distance*-Modus zu den eben erläuterten Problemen bei der Annäherung in die schmalen Spalten zwischen den Zellen. Der zur Darstellung von Zellmonoschichten impraktikable *constant-distance*-Modus bei konstantem Strom wurde auch in Vorexperimenten bestätigt.

5.4.2.2 Einfluss der Osmolarität der Lösung

Der osmotische Druck der Lösung hat einen großen Einfluss auf die Form und insbesondere das Volumen von Zellen. Der isotonische Wert des osmotischen Drucks liegt bei etwa 270 mosmol/kg, bei dem Zellen ihre native Ausdehnung und Form aufweisen. Wird die Zelle einer hypotonischen Lösung ausgesetzt, die eine Osmolarität < 270 mosmol/kg aufweist, wird Wasser in die Zelle transportiert, um die intrazelluläre Konzentration an gelösten Teilchen anzupassen. Von außen betrachtet, erhöht sich durch die Wasseraufnahme das Zellvolumen und die Zelle erscheint stark konvex. Umgekehrt reagiert die Zelle unter hypotonischem Stress (Osmolarität > 270 mosmol/kg) mit einem Efflux von Wasser, sodass die Zelle insgesamt flächiger erscheint. Diese Abhängigkeit wurde in rudimentärer Art mit PSCs an PC12-Zellen studiert.^[116] Hierbei wurden einem HEPES-Puffer einerseits 0 mM NaCl (hypotonisch), 260 mM NaCl (isotonisch) und 520 mM (hypertonisch) zugesetzt. Dabei ist anzumerken, dass bei der Dissoziation von NaCl sowohl Kation als auch Anion zur Osmolarität beitragen, sodass die dort verwendete isotonische Lösung keine isotonische Osmolarität, sondern theoretisch 520 mosmol/kg aufweist.

Durch die Abhängigkeit der Zellkurvatur von der Osmolarität der Lösung bedingt sich ein direkter Einfluss auf die Abbildungen im *constant-height*-Modus. Zunächst wurde eine PBS⁺⁺-Lösung, die 1,5 mM FcMeOH und 1 g/L Glukose enthielt, mit Wasser auf eine Osmolarität von 240 mosmol/kg eingestellt (Abbildung 37A). Hierbei sind drei Zellen dargestellt, die nicht konfluent erscheinen. Infolge der hypotonischen Bedingungen weisen diese zudem eine konvexe Gestalt auf. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,5 M NaCl-Lösung die Osmolarität mit 290 mosmol/kg in den schwach hypertonischen Bereich geändert. Die Zugabe der hochkonzentrierten Salzlösung verringert hierbei eine zu starke Mediatorverdünnung. Die nachfolgende Abbildung 37B zeigt den gleichen Ausschnitt der Zellmonoschicht, jedoch weisen die Zellen eine flächigere Morphologie auf. Durch erneute Zugabe der NaCl-Lösung wurde die Osmolarität anschließend auf 330 mosmol/kg erhöht. Dabei zeigten sich die Zellen sehr flach und konfluent. Der scheinbare Gegensatz, dass die Zellen in Abbildung 37A und Abbildung 37B nicht konfluent erscheinen, obwohl diese konfluent gewachsen sind, resultiert aus der geringen Tiefenschärfe des SECM im Vergleich zur Phasenkontrastmikroskopie. Insgesamt kann aus dieser Studie geschlussfolgert werden, dass bei einem höheren osmotischen Druck die topographischen Extreme reduziert werden,

was einer Abbildung im *constant-height*-Modus unter Verwendung kleiner UMEs zuträglich ist.

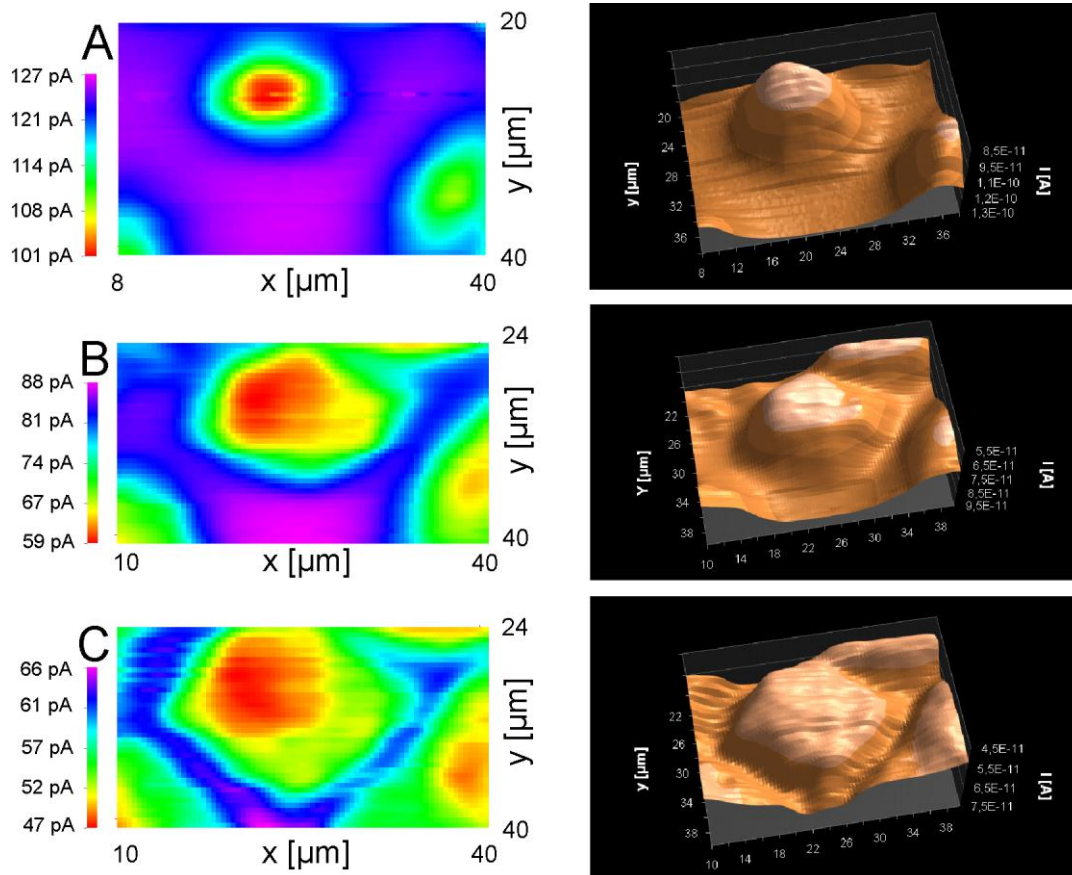


Abbildung 37: Studie zum Einfluss der Osmolarität der Lösung auf die Abbildung einer NRK-Zellmonoschicht. Hierbei wurde eine 0,9 μm UME bei einem Potential $U = 0,4 \text{ V}$ und einer Vorschubgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m/s}$ in einer PBS^{++} -Lösung mit 1 g/L Glukose und $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH verwendet. Dabei wurden die Zellen hypo- (A: 240 mosmol/kg) und hypertonen Umgebungen (B: 290 mosmol/kg ; C: 330 mosmol/kg) ausgesetzt. Die Abbildungen sind jeweils in Falschfarben (links) und dreidimensional (rechts) dargestellt.

5.4.2.3 Abbildungen lebender NRK-Zellen

Nachdem das Substrat mittels der Aufnahme von PACs und PSCs studiert wurde, folgte die SECM-Bildaufnahme. Abbildung 38 zeigt zwei typische SECM-Aufnahmen einer konfluenten NRK-Zellmonoschicht. Hierbei wurde eine $0,6 \mu\text{m}$ UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m/s}$ und einem Potential von $0,3 \text{ V}$ verwendet. Dabei sind in Abbildung 38A etwa fünf Zellen abgebildet, die in der typischen Pflastersteinmorphologie angeordnet sind. Auffällig sind hier die individuellen Kolorationen der Zellkörper, welche auf verschiedene Höhenniveaus hinweisen. Insbesondere liegt die Zelle links oben deutlich tiefer als die daran angrenzenden Zellen. Die Auflösung individueller Höhenprofile innerhalb der Monoschicht kann hierbei nicht mit der Phasenkontrastmikroskopie gezeigt werden. Dies verdeutlicht die Stärken des SECM, insbesondere bei der Auflösung vertikaler Strukturen. Das wichtigste

Kriterium zur Auflösung der Einzelzellen innerhalb eines Zellverbandes sind die Zell-Zell-Kontakte. Diese sind im gezeigten Ausschnitt gut zu erkennen und haben in lateraler Richtung eine Ausdehnung von etwa 1 - 3 μm und weniger als 1 μm in horizontaler Richtung. Hierbei können die Zell-Zell-Kontakte auch zwischen Zellen, die unterschiedliche Höhengniveaus aufweisen, gut abgebildet werden.

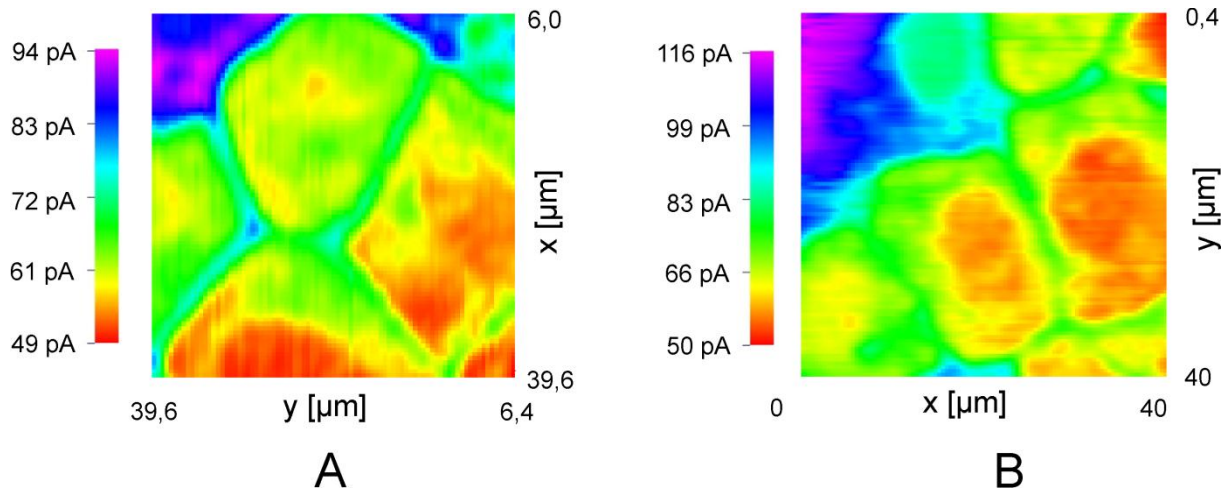


Abbildung 38: Hochaufgelöste SECM-Abbildungen einer NRK-Zellmonoschicht, abgebildet mit einer 0,6 μm UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ und 1,5 mM FcMeOH in PBS⁺⁺-Puffer.^[P2]

5.4.2.4 Einfluss des Mediators auf die Abbildungen

Die chemische Natur des Mediators hat ebenso einen direkten Einfluss auf die SECM-Abbildungen, da hydrophile ionische Mediatoren die Zellmembranen nicht überqueren können. Im Gegensatz dazu können Mediatoren wie FcMeOH oder Benzochinon^[117] die Zellmembran leicht überwinden oder sich in der Zellmembran einlagern. Im letzteren Fall stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht des Mediators zwischen der Zellmembran und der Messlösung ein. Wird die Sonde sehr nah an den Zellen positioniert und wird anschließend der Mediator umgesetzt, wird dessen Konzentration in der Lösung reduziert, sodass aus der der Zellmembran frischer Mediator nachgeliefert werden muss. Dieser als induzierte Transfer bezeichnete Vorgang wurde mittels PACs aufgeklärt.^[118] Des Weiteren ist eine Publikation bekannt, in der FcMeOH als Mediator bei der Abbildung von Zellen eingesetzt und dabei eine positive Rückkopplung erhalten wurde.^[119] Dabei soll das zuvor an der UME umgesetzte FcMeOH in der Zelle regeneriert worden sein, wodurch die Stromerhöhung resultierte. Jedoch ist die chemische Natur von FcMeOH und dem oxidierten FcMeOH⁺ zu unterschiedlich, sodass entweder das Kation nicht in größerem Umfang aus der Zellmembran ins Zytoplasma gelangt oder das in der Zelle regenerierte FcMeOH aufgrund der hohen extrazellulären Konzentration nicht über die Membran transportiert wird. Als weiterer Punkt muss angemerkt werden, dass die Regeneration und der Transport des

Mediators innerhalb der Aufenthaltsdauer der UME an einem Bildpunkt, also etwa im Zeitbereich weniger 100 ms, erfolgen muss.

Zur Untersuchung des Einflusses der Mediatoreigenschaften auf die Abbildung von NRK-Zellen wurde ein Ausschnitt einer Zellmonoschicht mit einer 3 μm UME sukzessive mit FcMeOH bei $U = 0,35\text{ V}$ und mit $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ bei $U = -0,4\text{ V}$ abgebildet. Anschließend wurden beide SECM-Abbildungen in Graustufenbilder mit 256 Farbabstufungen umgewandelt und beide Bilder Pixel für Pixel von einander abgezogen. Wenn beide Mediatoren dasselbe Bild liefern, würde im Differenzbild nur die Farbe Schwarz auftauchen, da Schwarz einem (Differenz-)Farbwert von Null entspricht. Dieses Differenzbild wurde anschließend invertiert, sodass die Bereiche guter Übereinstimmung weiß erscheinen. Dies wurde im Zuge eines höheren Kontrasts der Grauwerte auf weißem Hintergrund im Vergleich zu einem schwarzen Hintergrund durchgeführt.

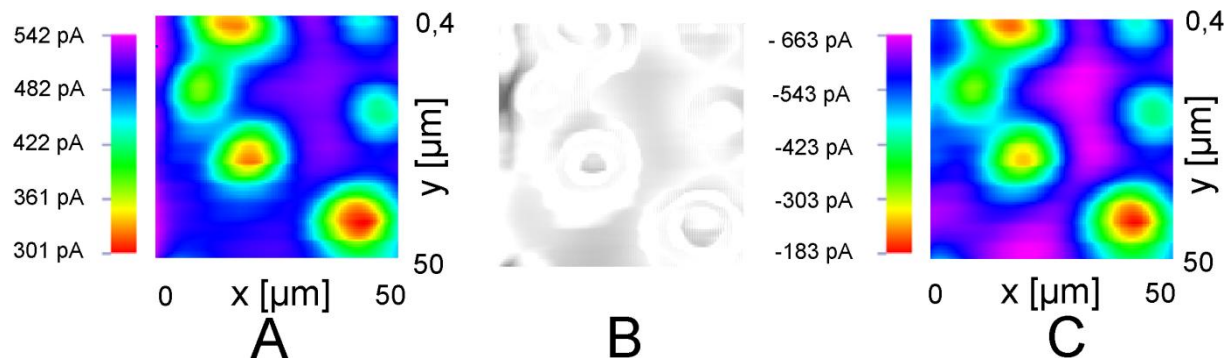


Abbildung 39: SECM-Abbildungen einer NRK-Zellmonoschicht aufgenommen mit einer 3 μm UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ mit 1,5 mM FcMeOH (A) und 1,5 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (C). Beide Abbildungen wurden nachfolgend in Graustufenbilder umgewandelt und ein Differenzbild (B) erstellt.

Beim Vergleich der Bilder in den Abbildungen 39A und C wird deutlich, dass alle wichtigen topographischen Details isotrop wiedergegeben wurden. Sowohl in Anzahl, als auch in Form und Ausdehnung der Zellen gibt es keine Unterschiede zwischen den verwendeten Mediatoren. Jedoch zeigt das Differenzbild kein vollständig weißes Bild, sodass Unterschiede vorherrschen, die auf die Eigenschaften der Mediatoren zurückzuführen sind. Beim Vergleich der Werte von Strommaxima und -minima ist die größere Differenz beim hydrophilen $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ im Gegensatz zum lipophilen FcMeOH auffällig. Während die Maximalwerte über den tiefer liegenden Zellen vergleichbar sind, fällt die Stromabnahme bei FcMeOH über den höchstgelegenen Zellen viel geringer aus. Dies kann mit einem induzierten Transfer von FcMeOH aus der Zellmembran in die Bulk-Lösung bei der Störung des Konzentrationsgleichgewichtes durch den Umsatz an der UME begründet werden. Die Effizienz des induzierten Transfers nimmt dabei mit geringerem Abstand zu. Durch die

größeren Stromwertabstufungen bei $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ im Vergleich zu FcMeOH ergeben sich die Differenzen in Abbildung 39B. Da jedoch beide Mediatoren qualitativ gleichartige Bilder liefern, können beide für Abbildungen mit dem SECM eingesetzt werden.

5.4.2.5 Zellen mit inkorporierten Mikropartikeln

Als Applikation der SECM-Abbildungen im *constant-height*-Modus wurden NRK-Zellen mit inkorporierten 2 μm Silikatpartikeln studiert. Aufgrund des Zellkerns in der Mitte der Zelle, sind die Silikatpartikel vorzugsweise an der Zellmembran zu finden.

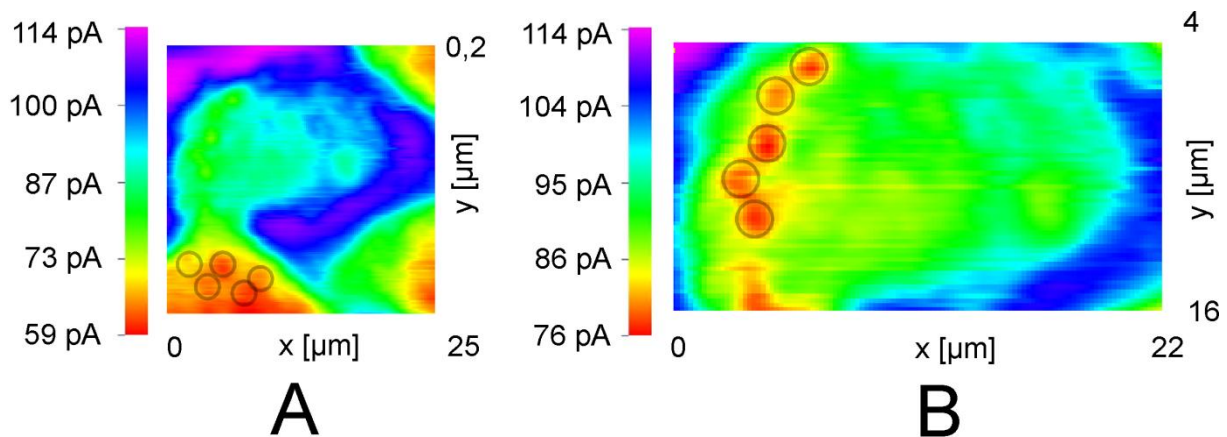


Abbildung 40: SECM-Aufnahmen einer NRK-Zellmonoschicht mit intrazellulären Silikat-Mikropartikeln (A) und vergrößerter Ausschnitt der tieferliegenden Zelle (B). Die kreisförmigen Umrandungen wurden nachträglich zur besseren Visualisierung der Mikropartikelpositionen eingefügt. Zur Bildaufnahme wurde eine 2 μm UME mit 1,5 mM FcMeOH in PBS⁺⁺ mit 1 g/L Glukose verwendet.

In der Übersichtsdarstellung in Abbildung 40A sind vier Zellen einer NRK-Zellmonoschicht zu erkennen. Dabei liegen drei Zellen auf einem Höhenniveau, die Zelle in der Mitte des Ausschnitts liegt dagegen tiefer. In der roten Kolorierung sind runde Bereiche zu erkennen, die auf eine Anwesenheit der Mikropartikel hinweisen. Die Differenzierung, ob die Partikel intra- oder extrazellulär sind, kann ebenfalls mit dem SECM erfolgen. Da für den Abbildungsprozess ein repetitiver Vorschub der Sonde nötig ist, würde sich die Position eines Mikropartikels sukzessive in Vorschubrichtung verändern. Die sphärische Gestalt der Partikel kann mit dem SECM nur wiedergegeben werden, wenn sich diese in ihren Positionen nicht verändern. Extrazelluläre Partikel mit veränderten Positionen während der Bildaufnahme wurden ebenfalls detektiert. Umgekehrt kann bei der gezeigten Abbildung 40 auf intrazelluläre Mikropartikel geschlossen werden, da deren Positionen während der Bildaufnahme unverändert bleiben. Abbildung 40B zeigt den vergrößerten Ausschnitt der mittleren Zelle. Durch die Begrenzung der Bilddimension sind nun topographische Details innerhalb dieser Zelle besser sichtbar. Zudem sind mehrere runde Strukturen mit Durchmessern im Bereich von 2 μm nahe der Zellmembran auffällig. Im

Phasenkontrastmikroskop wurde sichtbar, dass die Mikropartikel in mehreren Schichten übereinander angeordnet sind, sodass die im SECM sichtbaren Partikel nur die oberste Ebene dieser sind. Jedoch sind an der Peripherie der Zelle noch weitere runde Ausstülpungen zu erkennen, die auf tieferliegende Partikel hinweisen.

5.4.3 Abbildungen von Krebszelllinien (U373-MG)

Neben den idealen Studienobjekten NRK-Zellen sollten die SECM-Untersuchungen nachfolgend auf Krebszelllinien ausgeweitet werden, da diese eine hohe Relevanz in der pharmazeutischen Forschung besitzen. Ziel der Experimente war zunächst die Charakterisierung der nativen Topographie. Anschließend sollte in Mischkulturen eine Zelldifferenzierung zwischen den einzelnen Zelltypen erfolgen. Hierbei wurden U373-MG-Zellen verwendet. Diese adhärente Zelllinie ist pleomorph, verfügt also über verschiedene Zellmorphologien. Sie wurde von einem menschlichen Astrozytom (Gehirntumor) abgeleitet.^[120] In Abbildung 41 ist ein Ausschnitt einer U373-MG-Zellkultur gezeigt, der mit einer 2 μm UME mit einem RG-Wert von eins (*Lee*-UME) in Leibovitz-L15-Puffer mit 1,5 mM FcMeOH aufgenommen wurde.

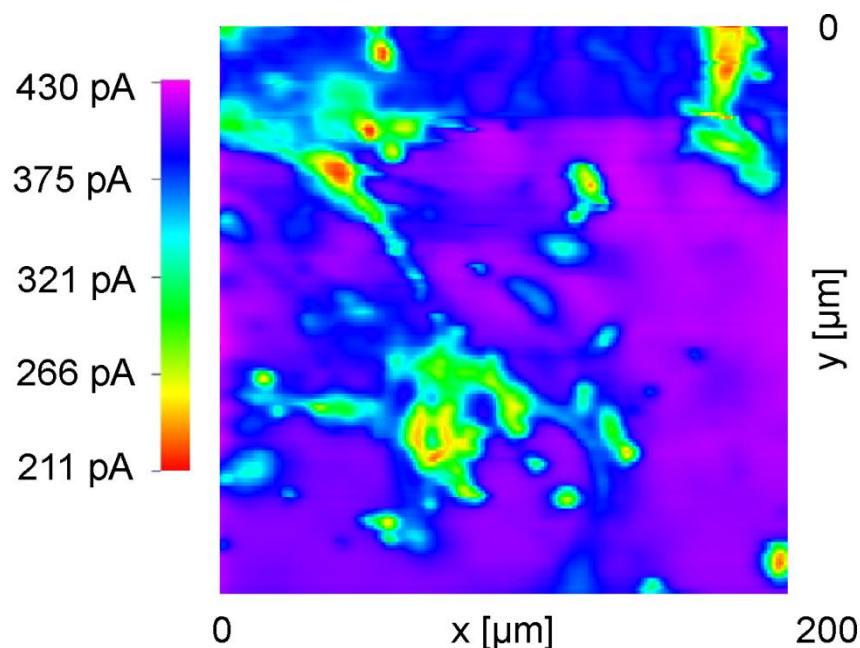


Abbildung 41: SECM-Abbildung einer U373-MG-Zellkultur mit einer 2 μm UME mit RG-Wert = 1 (*Lee*-UME) in Leibovitz-L15-Puffer mit 1,5 mM FcMeOH.

Hierbei wurde bewusst eine Sonde mit sehr kleinem RG-Wert verwendet, um einen möglichen Kontakt mit der Zellkultur zu minimieren. In dieser Abbildung sind verschiedene Zellen zu erkennen, die in ihrer Größe zwischen 8 bis 25 μm variieren. Ebenso gibt es Zellen mit eher runder Gestalt und solche, die über längliche Zellkörper und lange Fortsätze zu benachbarten Zellen verfügen. Entscheidend für die Abbildungsqualität ist jedoch die große

Varianz in den Zellhöhen. Hierbei ist eine Vielzahl von Zellen erkennbar, jedoch liegt der größte Teil außerhalb des Fokus. Somit können über die Majorität der Zellen keine detaillierten topographischen Aussagen gemacht werden. Zur Auflösung mehrerer Zellen im Zielausschnitt kann nur eine Sonde mit größerem Durchmesser verwendet werden, jedoch geht dies mit einer Verschlechterung der lateralen Auflösung einher.

5.4.4 Abbildungen von Mischzellkulturen

In Abbildung 42A ist eine SECM-Aufnahme einer Mischkultur aus MDA-MB-231- und MCF7-Zellen gezeigt, die mit einer 10 µm UME und 1,5 mM FcMeOH als Mediator aufgenommen wurde. MDA-MB-231-Zellen entstammen einer Brustkrebszelllinie, die einen spindelförmigen Phänotyp aufweist.^[121] MCF-7-Epithelzellen sind eine häufig verwendete Brustkrebszelllinie, die auf eine Östrogengabe mit Zellproliferation reagiert.^[122] Sie besitzt eine runde Gestalt und neigt *in-vitro* zur Bildung von *domes*. In der SECM-Abbildung sind nur wenige hochliegende MCF-7-Zellen zu erkennen. Diese Zellen sind einfach an ihrer runden Gestalt zu identifizieren. Der größte Teil der Mischkultur liegt jedoch weit unterhalb dieses Höhenniveaus. Diese tieferliegenden Zellen sind selbst bei einer Sonde dieser Größe außerhalb des Fokus in z-Richtung. Nachfolgend wurden vergleichende CLSM-Aufnahmen (Abbildung 42B) einer MCF-7/MDA-MB-231-Mischzellkultur angefertigt. Hierbei sind die Zellen dunkel dargestellt. Zunächst sind in der xy-Aufnahme (Aufsicht) die runden MCF-7-Zellen zu erkennen, welche am höchsten liegen. In den tieferen Ebenen der Abbildung sind zudem die spindelförmigen MDA-MB-231-Zellen zu sehen. Die beiden Seitenansichten liefern dabei wichtige Informationen über mögliche Strategien zur SECM-Abbildung. Insbesondere die Präsenz der dreidimensionalen *domes* muss festgehalten werden. Entscheidend ist zudem, dass der Abstand in z-Richtung zwischen den höchsten und den niedrigsten Bereichen etwa 20 µm beträgt, welches die Variation in den einzelnen Zellhöhen bei den NRK-Zellen um mindestens das 10-fache übersteigt. Umgekehrt muss somit mit einer deutlich größeren UME gearbeitet werden, um alle topographischen Details abzubilden.

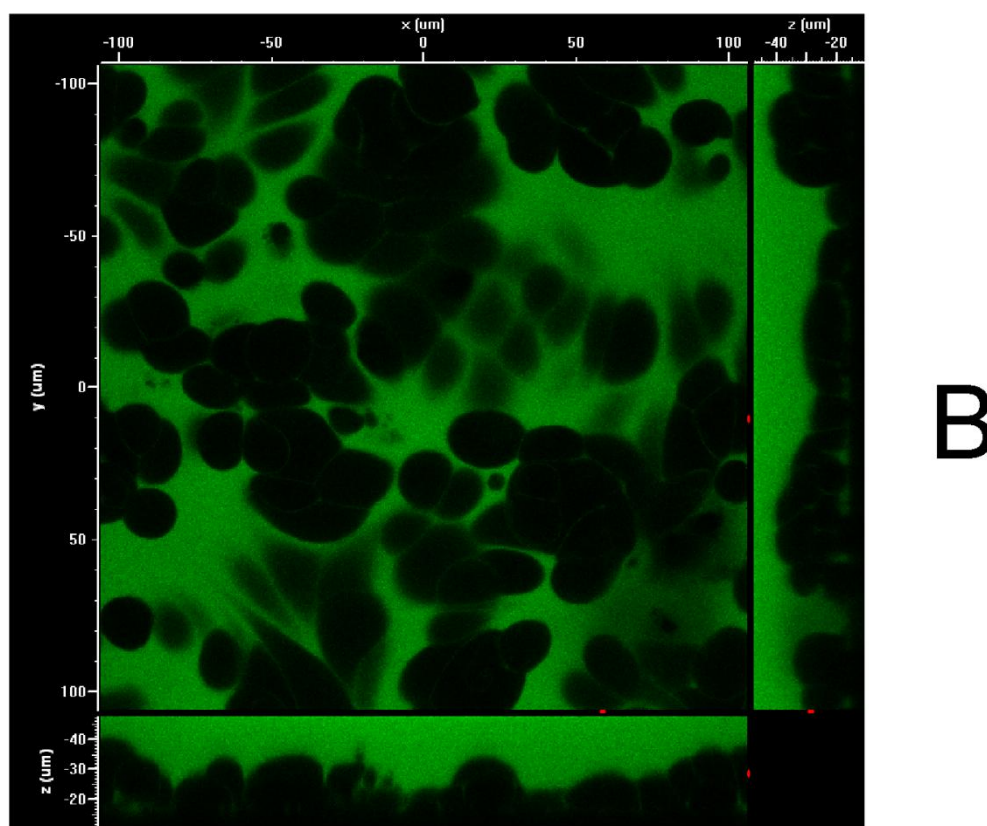
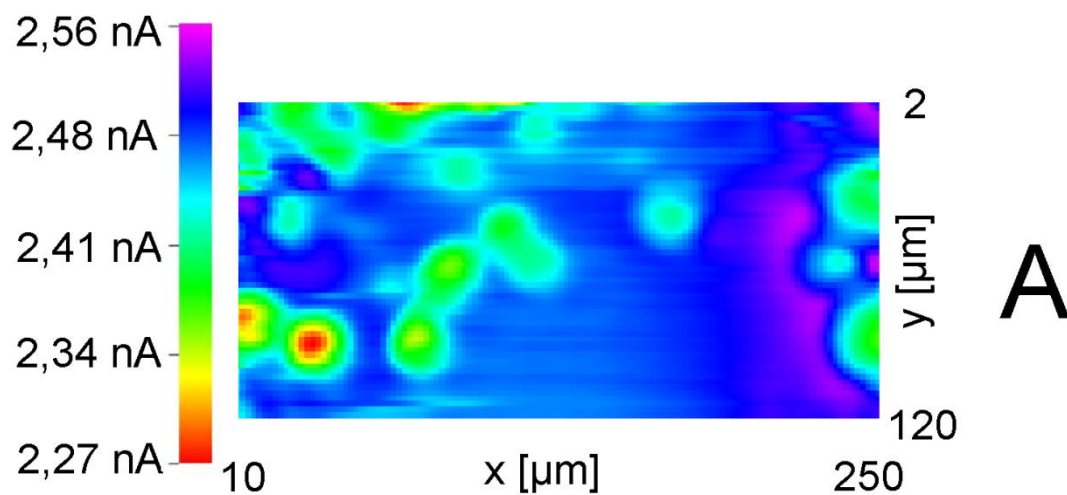


Abbildung 42 A: SECM-Aufnahme einer MCF-7/MDA-MB-231-Mischzellkultur mit einer 10 μm UME und 1,5 mM FcMeOH. B: CLSM-Aufnahme einer MCF-7/MDA-MB-231-Mischzellkultur in der Aufsicht (xy-Dimension) und als Seitenansicht (xz-Schnitt).

Bei dieser Mischzellkultur und weiteren Mischzellkulturen wie MDA-MB-231/U373-MG wurde vielfach versucht, mit kleineren Sondendurchmessern von 2 μm bis hinab zu sub- μm UMEs zu arbeiten. Jedoch konnte hier keine SECM-Abbildung ohne große Artefakte oder Bildstörungen erhalten werden, was auf einen massiven mechanischen Kontakt der Sonde mit der Zellkultur hinweist. Zudem sind in der CLSM-Abbildung keine Bereiche zu identifizieren, in denen beide Zelltypen nebeneinander und auf ähnlichem Höhenniveau

liegen. Daher wird es gerade in der praktischen Durchführung der SECM-Experimente unmöglich sein, ohne lichtmikroskopische Kontrolle einen solchen Bereich zu finden und störungsfrei abzubilden. Abschließend kann festgehalten werden, dass die inhomogene Verteilung der Höhenprofile innerhalb der Mischzellkultur sehr problematisch für das Abbilden der Topographie im *constant-height*-Modus ist. Insbesondere können aus dem gleichen Grund keine UMEs im sub- μm -Bereich verwendet werden, sodass in jedem Falle die zu erwartende Auflösung in jeder Dimension, mit der bei den NRK-Zellen erreichten, nicht vergleichbar sein wird.

5.4.5 Abbilden über das Sauerstoffsignal

Die Detektion von Sauerstoff gilt als wichtiger Schritt zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen. Eine Arbeit zur Ermittlung der individuellen intrazellulären Sauerstoffkonzentration von NRK-Zellen wurde dabei mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.^[123] Dabei zeigten sich große Unterschiede in der Sauerstoffkonzentration innerhalb des gezeigten Ausschnitts der NRK-Zellmonoschicht. Während einige Zellen eine Sauerstoffkonzentration nahe der Sättigung aufwiesen, wurde in benachbarten Zellen praktisch eine komplette Abwesenheit von O_2 detektiert. Dies kann unter dem Gesichtspunkt einer fast ungehinderten Diffusion von O_2 durch Zellmembranen nicht leicht verstanden werden. Daher sollte dieses Experiment mittels SECM nachgestellt werden. Gelöstes O_2 kann dabei insbesondere an Pt gut detektiert werden.^[124] Neuere Forschungen aus dem Bereich der Elektrokatalyse zur O_2 -Reduktion gehen zu binären Elektrodenmaterialien wie Pt_3Sc , Pt_3Ni oder PtCo ^[125-127], welche eine bis um Faktor 10 erhöhte katalytische Aktivität im Vergleich zum reinen Pt aufweisen. Da diese Legierungen in Hochtemperatursynthesen gefertigt werden, können daraus nicht ohne Weiteres UMEs hergestellt werden. Daneben gibt es zahlreiche Untersuchungen zur Reduktion von O_2 an Pt-UMEs. Hierbei wurde gezeigt, dass sich Pt grundsätzlich bei sauren, neutralen oder alkalischen pH-Werten zur O_2 -Reduktion in Lösung eignet. Je nach pH-Wert der Lösung verschiebt sich dabei jedoch das Reduktionspotential.^[128] Die erhaltenen CVs sind dabei zusätzlich von der Pufferkapazität und der Ionenstärke der Lösung abhängig. Zur Erhöhung der Sensorstabilität wurde ein Pulsregime zur O_2 -Detektion an einer $25\ \mu\text{m}$ Pt-UME in $1\ \text{mM}$ NaCl-Lösung vorgeschlagen, bei der die UME für $30\ \text{s}$ bei $0,8\ \text{V}$ oxidiert und anschließend für $20\ \text{s}$ bei $-0,60\ \text{V}$ reduziert wurde.^[129] Zudem sind SECM-Abbildungen basierend auf der O_2 -Reduktion an tierischen MCF10A-Zellen mit einer $10\ \mu\text{m}$ Pt-UME in Puffer^[130], an tierischen SW-480 Zellen mit einer $3,8\ \mu\text{m}$ Pt-UME in Puffer^[131] und an einem Protoplast mit einer dualen UME unter Anwesenheit von $1\ \text{mM}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ publiziert. Hierbei wurden die CV-Studien zur Reduktion von O_2 mit großen $25\ \mu\text{m}$ UMEs ohne Zusatz eines elektroaktiven Mediators durchgeführt. Die SECM-Abbildungen wurden ebenfalls meist in Puffer und mit UMEs fernab von sub- μm Dimensionen durchgeführt.

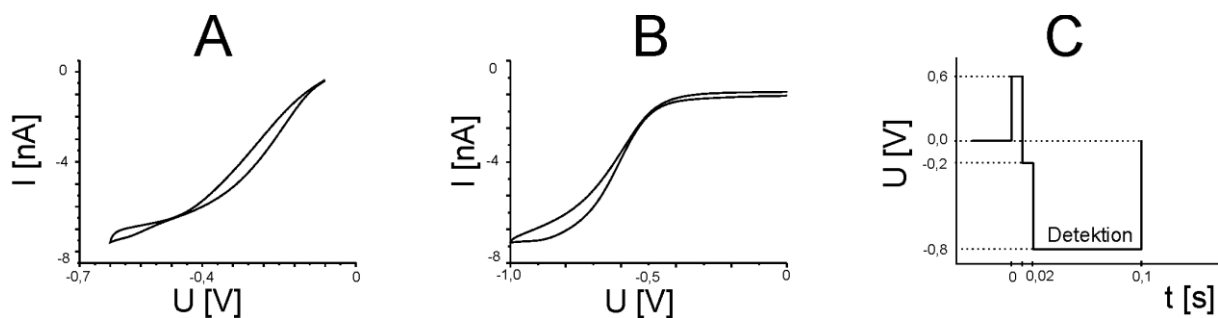


Abbildung 43: CVs zur Detektion von O_2 mit einer $25 \mu\text{m}$ UME in PBS^- -Puffer bei Anwesenheit (A) und bei Abwesenheit (B) von $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH. C: Verwendete Pulssequenz für die gepulste amperometrische Detektion von gelöstem O_2 .

Eigene Voruntersuchungen wurden mit einer $25 \mu\text{m}$ UME in PBS^- -Puffer durchgeführt (vgl. Abbildung 43). Dabei wurde selbst bei diesem idealen Aufbau kein stationärer Stromwert im CV erhalten. Insbesondere muss hier mit langsameren Vorschubgeschwindigkeiten von etwa 10 mV/s gearbeitet werden, da die Reduktion von O_2 vier schrittweise übertragene Elektronen beinhaltet. Zudem kommt es während der Reduktion zu pH-Wert-Änderungen, sodass die CVs eine starke Hysterese zeigten. Nach den CVs wurden amperometrische Messungen zur Signalstabilität durchgeführt. Hierbei wurden massive Signalabnahmen im Bereich des 10-fachen Wertes im Vergleich zur Stabilität der FcMeOH-Oxidation detektiert. Zur Verbesserung der amperometrischen Signalstabilität wurde eine Pulssequenz entwickelt. Dabei wurde die Elektrode kurzzeitig zum Pt-O oxidiert, welches im zweiten Puls wieder zum Pt reduziert wurde. An diese Reinigungssequenz schloss sich die amperometrische Detektion von O_2 bei $-0,8 \text{ V}$ an. Unter dem Einsatz dieser Pulssequenz wurde der Drift des Stromwertes im Vergleich zur amperometrischen Messung mindestens um eine Größenordnung verbessert.

Anschließend wurden SECM-Aufnahmen einer NRK-Zellmonoschicht mit einer $1,8 \mu\text{m}$ UME in 1 mM FcMeOH durchgeführt (Abbildung 44A). Dabei wurde zunächst die Topographie der Zellen mit FcMeOH abgebildet. Anschließend wurde das Potential an der UME auf $-0,75 \text{ V}$ geändert und in einem zweiten Bild O_2 amperometrisch detektiert (Abbildung 44B). Dabei konnten die Zellbegrenzungen durch die hohe Diffusivität von O_2 nicht aufgelöst werden (B). Wurde die UME auf eine $2 \mu\text{m}$ höher liegende Ebene positioniert, konnten die individuellen O_2 -Profile zusammen mit einer um Faktor drei geringeren Vorschubgeschwindigkeit besser aufgelöst werden. Jedoch konnte auch durch den Einsatz des Pulsregimes der störende Einfluss von FcMeOH nicht ausgeschaltet werden. Versuche mit dem zweiten biokompatiblen Mediator zur Abbildung von NRK-Zellen, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, konnten nicht durchgeführt werden, da die Redoxpotentiale von O_2 und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ zusammenfallen und damit keine komplementären Informationen gewonnen werden können. Durch die Störung der O_2 -Detektion bei Anwesenheit eines Mediators bietet sich eine Kombination mit der AC-

SECM an, die auch unter Abwesenheit eines Mediators genutzt werden kann. Zudem könnte die gesamte SECM-Messung in Puffern durchgeführt werden. In unabhängigen Experimenten zur Abbildungsqualität in der AC-SECM konnten jedoch keine UMEs mit $\varnothing < 2 \mu\text{m}$ verwendet werden, welche allerdings für die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte nötig sind. Daher wurde dieser Pfad der Forschung auf diesem Stand nicht weiter verfolgt.

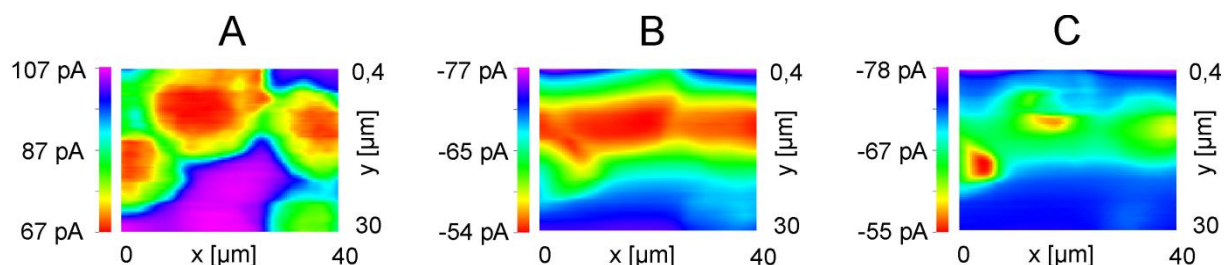


Abbildung 44: SECM-Abbildungen einer NRK-Zellmonoschicht mit einer $1,8 \mu\text{m}$ UME in PBS^{++} -Puffer mit 1 mM FcMeOH. Die Topographie der Zellmonoschicht wurde mit dem FcMeOH-Signal bei $U = 0,3 \text{ V}$ aufgenommen (A). Die Abbildung B wurde in derselben Ebene wie (A) aufgenommen und stellt die O_2 -Reduktion bei einem Detektionspotential von $-0,75 \text{ V}$ und einer Vorschubgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m/s}$ dar. In Abbildung C ist die O_2 -Reduktion bei $-0,8 \text{ V}$ bei einer Vorschubgeschwindigkeit von $3,3 \mu\text{m/s}$ in einer um $2 \mu\text{m}$ höher liegenden Scanebene gezeigt.

5.5 Die UME als Werkzeug und Sonde

Neben der Abbildung der Substratopographie durch verschiedene Mediatoren sollte die UME als Werkzeug zur ortsaufgelösten Manipulation der Proben verwendet werden. In der Literatur wurden selbstorganisierende Monoschichten^[132] und Polymere^[133] durch gepulste Methoden lokal aufgelöst oder abgeschieden. In der vorliegenden Arbeit sollte das Ziel verfolgt werden, durch *in-situ*-Generierung von hochreaktiven Verbindungen, einzelne Zellen innerhalb einer Zellmonoschicht selektiv zu schädigen. Die lokale Schädigung mit einhergehender Änderung der Zelltopographie sollte nachfolgend mit dem SECM abgebildet werden.

5.5.1 Vorversuche zur elektrochemischen in-situ-Generierung aktiver Spezies

Zunächst wurde untersucht, welche aktiven Spezies an Pt-UMEs generiert werden können. In ersten Vorversuchen wurden zunächst die elektrochemischen Oxidationen zu Cl_2 und Br_2 getestet. Chlorid wäre im PBS^{++} -Puffer in ausreichender Menge (ca. 137 mM ^[134]) vorhanden, jedoch ist für die Bildung von Cl_2 ein vergleichsweise hohes Standardpotential von $1,36 \text{ V}$ nötig. Dieses liegt somit am oberen Bereich des elektrochemischen Fensters des Lösungsmittels. Folglich wurde auf die Oxidation von Br^- ausgewichen, da entstehendes Br_2 über ein ähnliches Schadenspotential auf Organismen verfügt, jedoch kann die elektrochemische Transformation schon bei $1,07 \text{ V}$ erfolgen. Dazu wurden 25 mM NaBr in PBS^- -Puffer gelöst und CVs aufgenommen. Hierbei wurde kein stationäres, sondern ein

transientes Signal erhalten. Dies könnte auf eine Veränderung der Oberflächencharakteristik von Pt hinweisen. Bei der Aufnahme von CVs vor und nach der Br_2 -Generierung in einer 1,5 mM FcMeOH-Lösung wurde eine Desaktivierung der Oberfläche (geringerer Grenzstromwert), sowie eine massive Schädigung der Einbettung von Pt im Glaskörper (starke Hysterese) festgestellt. Dies kann auf die Bildung von löslichen Komplexen von Pt^{2+} und/oder Pt^{4+} mit Br^- herrühren.^[135] Neben diesen oxidativen Umwandlungen wurde auch die Reduktion von gelöstem O_2 bzw. die Spaltung von Wasser infolge der Protonenreduktion studiert. Bei beiden Reaktionen kommt es zur Bildung von OH^- -Ionen, sodass an der UME der pH-Wert lokal stark ansteigt. Dazu wurde für einige Minuten ein Potential von etwa -1 V an die UME angelegt. Nachfolgend aufgezeichnete CVs zeigten keine Schädigung der Einbettung oder Blockierung der UME. Da für die Erhöhung des pH-Wertes zudem keine Änderung in der Zusammensetzung der Messlösung erforderlich war, wurde diese Methode zur lokalen Schädigung von Zellen getestet.

5.5.2 Selektive Schädigung einer Einzelzelle im Zellverbund

Das Verhalten von NRK-Zellen bei einer Erhöhung des pH-Wertes wurde zunächst mittels CLSM-Aufnahmen untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläsern bis zur Konfluenz kultiviert. Kurz vor der Messung wurde das Medium gegen einen PBS^{++} -Puffer mit 1 mM Glukose und 1 mg/mL FITC-Dextran getauscht. Da letzteres membranimpermeabel ist, erscheinen die Zellkörper dunkel, während die Messlösung hell fluoresziert. Zur besseren Visualisierung wurde der Bildkontrast invertiert, sodass nun die Zellen hell erscheinen. In Abbildung 45A ist die native Morphologie einer NRK-Zellmonoschicht bei pH 7,2 in der Aufsicht (xy-Ebene) und in der Seitenansicht (xz-Ebene) dargestellt. Hierbei sind die sehr homogenen, individuellen Höhen der NRK-Zellen erkennbar. Zudem besteht eine durchschnittliche Höhendifferenz zwischen den höchsten Punkten in der Mitte der Zelle und den tiefsten Punkten in den Zell-Zell-Kontakten von etwa $(2,5 \pm 0,5) \mu\text{m}$. Nachfolgend wurden 90 μL einer 10 mM NaOH-Lösung zugegeben, wodurch der pH-Wert auf 8,0 erhöht wurde. Durch fünf minütiges Schwenken der Petrischalen wurde eine homogene Verteilung der zugegebenen NaOH-Lösung sicher gestellt. Nachfolgend wurde Abbildung 45B aufgezeichnet. Durch die pH-Wert-abhängige Emission von FITC-Dextran hat der Kontrast im Bild abgenommen. Besonders in der Aufsicht ist eine Aufweitung der Zell-Zell-Kontakte zu erkennen, was mit einer Volumenzunahme der Zellen einher geht. Dies lässt sich auch mit einer erhöhten durchschnittlichen Höhendifferenz von $(3,0 \pm 0,3) \mu\text{m}$ untermauern.

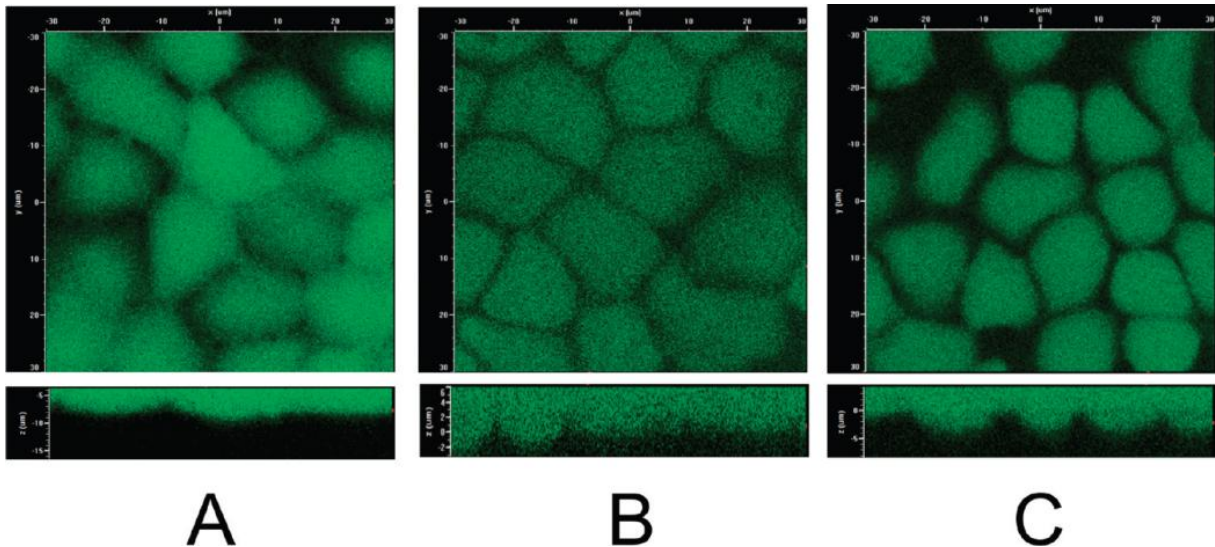


Abbildung 45: CSLM-Aufnahmen in der Aufsicht (xy-Ebenen; obere Bilder) und als Seitenansichten (xz-Ebenen; untere Bilder) einer NRK-Zellmonoschicht. Die Bilder (A-C) demonstrieren den Einfluss des pH-Wertes (7,2; 8,0 und 10,0) auf die Zellmorphologie. Der Bildkontrast wurde durch die Zugabe von FITC-Dextran zum Messpuffer und nachfolgende Kontrastinvertierung hergestellt.^[P2]

Anschließend wurden erneut 10 μL der 10 mM NaOH-Lösung zugegeben, wodurch die Pufferkapazität erschöpft wurde und der pH-Wert auf etwa 10 stieg. In Abbildung 45C sind die Zellen nun deutlich angeschwollen. In der Seitenansicht ist eine sphärische Zellmorphologie erkennbar, die auf nekrotische Zellen hindeutet.^[136,137] Die Höhendifferenz zwischen den höchsten Zellabschnitten und den Punkten, in denen zwei benachbarte Zellen miteinander zu verschmelzen scheinen, ist nun mit $(4,3 \pm 0,4)$ μm signifikant vergrößert.

In einem weiteren Experiment sollte diese Schädigung von NRK-Zellen durch die Erhöhung des pH-Wertes örtlich stark begrenzt werden, sodass im Idealfall nur eine Zelle in die Nekrose überführt wird. Hierbei stellen die vorhandenen Nachbarzellen eine Art Referenzobjekte oder interne Standards des Manipulationsexperimentes dar. Zunächst wurde die Topographie der NRK-Zellmonoschicht mit einer 0,6 μm UME in einer 1,5 mM FcMeOH-Lösung in PBS⁺⁺-Puffer abgebildet. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug hierbei 10 $\mu\text{m}/\text{s}$. Bei einem typischen Bildausschnitt von 40 x 40 μm^2 lag die Zeitauflösung damit bei etwa 10 min.

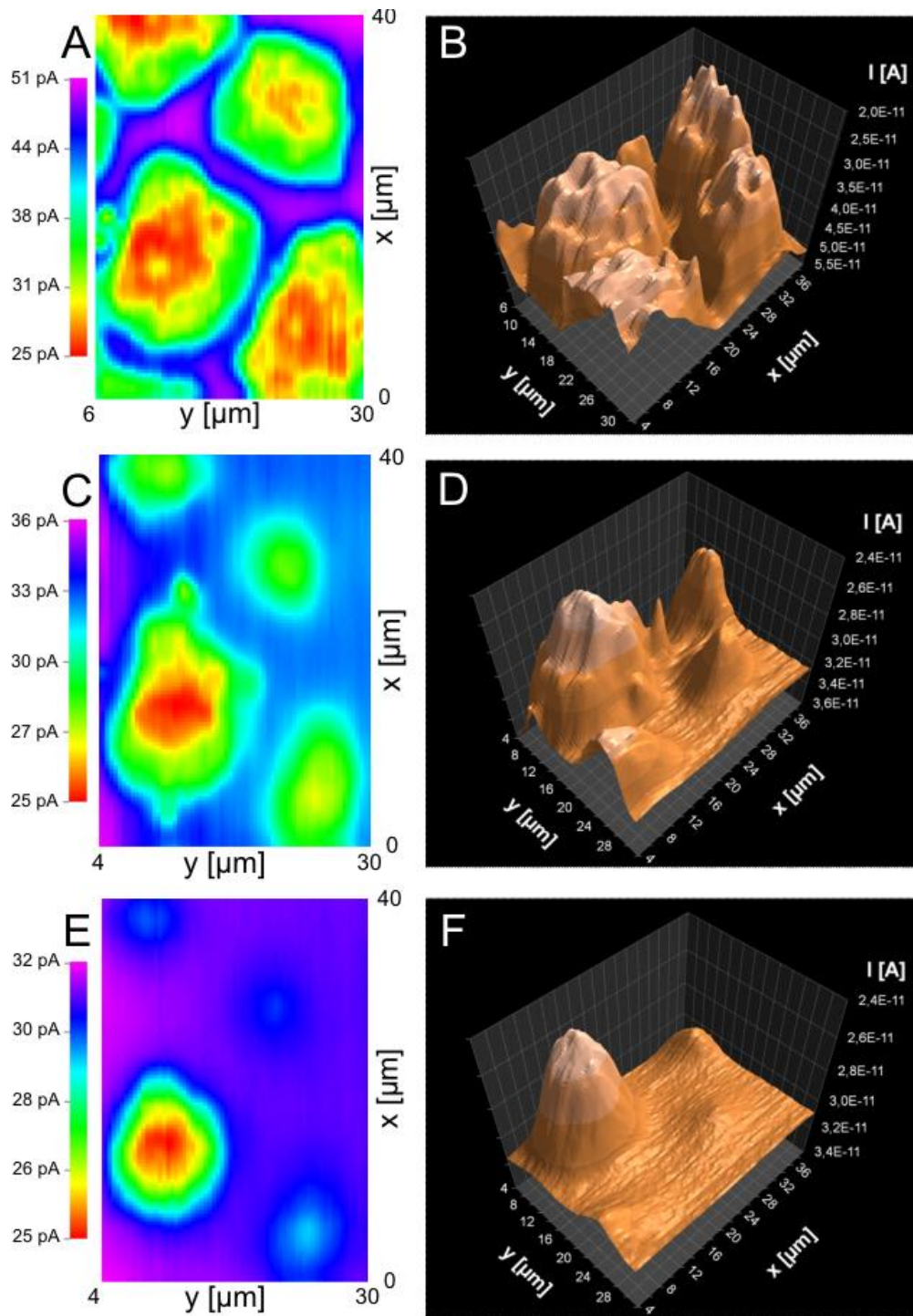


Abbildung 46: SECM-Abbildungen einer NRK-Zellmonoschicht als Falschfarbendarstellungen (A, C, E) und als dreidimensionale Darstellungen (B, D, F) während einer örtlichen Erhöhung des pH-Wertes. Die native Morphologie der Monoschicht ist dabei in A/B dargestellt. Die Bilder C/D und E/F wurden 10 bzw. 20 min nach der elektrochemischen Attacke auf eine Einzelzelle aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einer $0,6 \mu\text{m}$ UME in $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH in PBS^{++} -Puffer durchgeführt.^[P2]

Abbildung 46A/B zeigt eine SECM-Aufnahme eines Ausschnitts einer NRK-Zellmonoschicht bei pH 7,2 in Falschfarben (A) und als dreidimensionale Darstellung (B). Unter diesen

physiologischen Bedingungen sind die abgebildeten Zellen auf einem ähnlichen Höhenniveau, welches die ähnliche Kolorierung der Zellkörper induziert. Nach der Bildaufnahme wurde die UME über der links unten gelegenen Zielzelle (14 μm ; 14 μm) positioniert und durch Chronoamperometrie bei $U = -1,1 \text{ V}$ für 160 s OH^- -Ionen gebildet. Aus dem ruhigen Verlauf des Stromes während des chronoamperometrischen Experimentes (Abbildung 47) kann auf einen sehr effizienten Massentransport zur und von der UME geschlossen werden. Insbesondere die Entwicklung und Ablösung von H_2 -Gasblasen an der UME wurde nicht beobachtet.

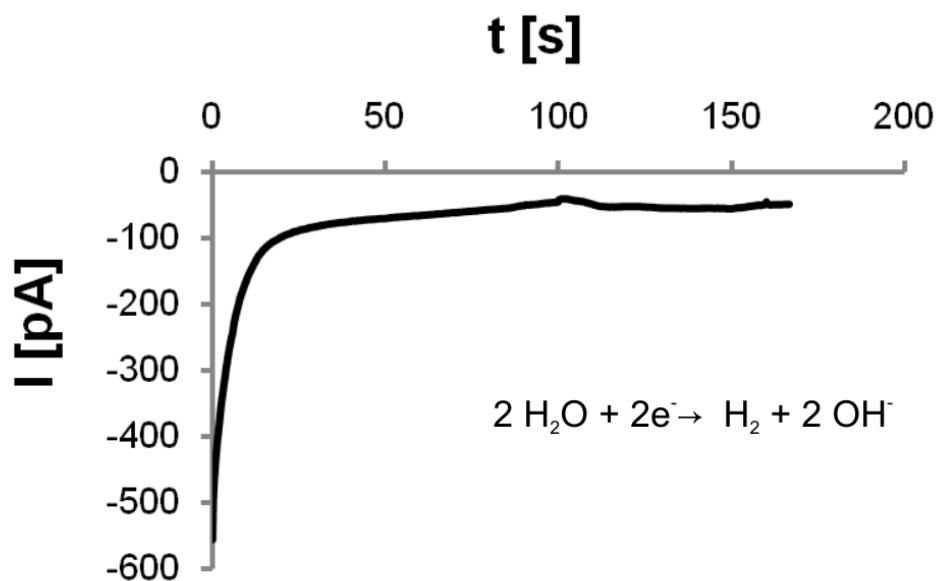


Abbildung 47: Chronoamperogramm der kathodischen Halbzellreaktion der Wasserelektrolyse bei $U = -1,1 \text{ V}$ an einer $0,6 \mu\text{m}$ UME in PBS^{++} -Puffer mit 1 g/L Glukose und $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH .^[P2]

Aus der Integration der Kurve wurde mittels der Ladung die Stoffmenge an generierten OH^- -Ionen zu 135 fmol bestimmt. Zur Sicherstellung, dass die generierte Menge an OH^- -Ionen ausreicht, wurde ein PBS^{++} -Puffer mit einer reduzierten Gesamtpufferkonzentration von 1 mM verwendet. Um mechanische Interaktionen der UME mit den Zellen zu vermeiden, wurde die UME erneut über der Zielzelle bis auf $60\% I_{T, \infty}$ angenähert. Nachfolgend wurde derselbe Ausschnitt der Monoschicht erneut abgebildet (Abbildung 46C/D). Durch die benötigte Zeit der Bildaufnahme korrespondiert der Zustand der Monoschicht zu einer Zeitdifferenz von 10 min . Der reduzierte Stromwert weist auf eine, entgegen den Ergebnissen der Vorexperimente mit der $25 \mu\text{m}$ Pt-UME, leichte Veränderung der Elektrodencharakteristik hin. Dennoch ist eine veränderte Morphologie der Zielzelle gegenüber den Nachbarzellen augenscheinlich. Die Zielzelle liegt nun schon signifikant höher als die Nachbarzellen. Zwischen den Nachbarzellen kann kein Unterschied in den Höhenniveaus detektiert werden, was auf eine selektive Schädigung der Zielzelle hinweist.

Anschließend wurde die Position der UME auf die geänderte Höhe der Zielzelle angepasst und 10 min später Abbildung 46E/F aufgenommen. Hier zeigte die Zielzelle nun eine kuppelförmige Morphologie, die sich von der der Nachbarzellen deutlich unterscheidet. Durch den Übertritt der Zielzelle in den nekrotischen Zustand wurde vermehrt H_2O in die Zelle aufgenommen. Damit erklärt sich das weiter zugenommene Höhenniveau im Vergleich zu den Referenzzellen. Insgesamt stehen die Ergebnisse der selektiven Schädigung einer Einzelzelle mit dem SECM und der globalen Schädigung der gesamten Monoschicht, was mit dem CLSM verfolgt wurde, in guter Übereinstimmung, da in beiden Fällen die wesentlichen Antworten der Zellen bei einer Erhöhung des pH-Wertes, das Anschwellen der Zellen und die kuppelförmige Gestalt, detektiert wurden.

5.6 Transportstudien

Epithelzellen formieren Barrieren entgegen der freien Diffusion zwischen zwei Kompartimenten und bestimmen damit maßgeblich die an bestimmten Orten verfügbare Konzentration von Stoffen (*bioavailability*). Zur Untersuchung der Transportmechanismen und Permeabilität werden häufig Zellmonoschichten verwendet, die auf porösen Filtermaterialien adhärirt sind. Je nach verwendeter Zelllinie können verschiedene Absorptionscharakteristika von Analyten nachgestellt werden. Ein Vorteil in der Verwendung dieser *in-vitro*-Ansätze ist die einfache Kultivierung der Zellen und die Bildung reproduzierbarer Permeationsbarrieren. Der diffusive Stofftransport durch Epithelzellschichten kann dabei über parazelluläre und transzelluläre Pfade erfolgen. Während ersterer den Weg entlang der wässrigen Pfade (Zell-Zell-Kontakte) beschreibt, permeieren lipophile Substanzen bevorzugt durch die Zelle oder entlang der Zellmembran.

Zur Nutzung des Alleinstellungsmerkmals eines elektrochemischen Mikroskops sollte im Weiteren die lokale Verteilung elektrochemisch konvertierbarer Analyte studiert werden, da Lichtmikroskope die Stoffverteilung von ungefärbten Analyten in geringer Konzentration nicht auflösen können. Hierzu eignen sich insbesondere die schon zuvor studierten Zellmonoschichten von MDCK II- und NRK-Zellen. Bis zum Beginn der eigenen Untersuchungen war keine SECM-Studie zum Transport elektrochemischer Mediatoren durch Zellmonoschichten bekannt. In der älteren Literatur wurde häufig die Freisetzung von Neurotransmittern über verschiedenen Zellen mit einer ortsgebundenen UME amperometrisch verfolgt.^[138] In anderen Arbeiten wurde mit der Aufnahme von PACs die Permeation durch eine Eizelle verfolgt.^[139] Ebenso wurde nach erfolgter Perforation einer Einzelzelle durch Applikation eines Tensides die Permeabilität der Zellmembran untersucht.^[140] Auch der Transport von Mediatoren durch verschiedene Membranmaterialien wurde mit einem SECM orts aufgelöst studiert.^[81,141,142] SECM-Diffusionsstudien wurden zudem an Gewebe am Beispiel von $[Fe(CN)_6]^{4-}$ durch eine Maushaut mit Follikeln^[143] und

$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ durch Knorpelgewebe^[144] durchgeführt. Bei der Verwendung von Gewebe liegt ein Problem in der großen Varianz der Permeabilitäten innerhalb diesem. So wurden in den Arbeiten deutliche Unterschiede zwischen dem Transport über eine epitheliale Barriere und dem Haarfollikel detektiert. Jedoch kommt dem Transport durch Zellbarrieren ohne Follikel *in-vitro* eine viel entscheidendere Bedeutung zu. Daher sollte in den eigenen Experimenten der orts aufgelöste Transport von Redoxmediatoren durch intakte Barrieren mit dem SECM untersucht werden. Basierend auf den Untersuchungen von auf Deckgläsern adhärenen Monoschichten sollten UMEs mit kleiner Dimensionierung verwendet werden, um eine gute Abbildungsqualität zu erreichen.

5.6.1 Vorversuche an Filtermaterialien

Abbildung 48 zeigt das CV einer 1,6 μm UME bei Anwesenheit von je 1 mM FcMeOH und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ in PBS^{++} -Puffer und einer Vorschubgeschwindigkeit von 20 mV/s. Hierbei wurden zwei Stufen im CV ausgebildet. Damit können beide Mediatoren unabhängig voneinander detektiert werden. FcMeOH kann dabei quantitativ bei 0,3 V oxidiert, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ bei -0,5 V reduziert werden. Zudem sind in Abbildung 48 die chemischen Strukturen und Produkte der elektrochemischen Umsetzungen dargestellt.

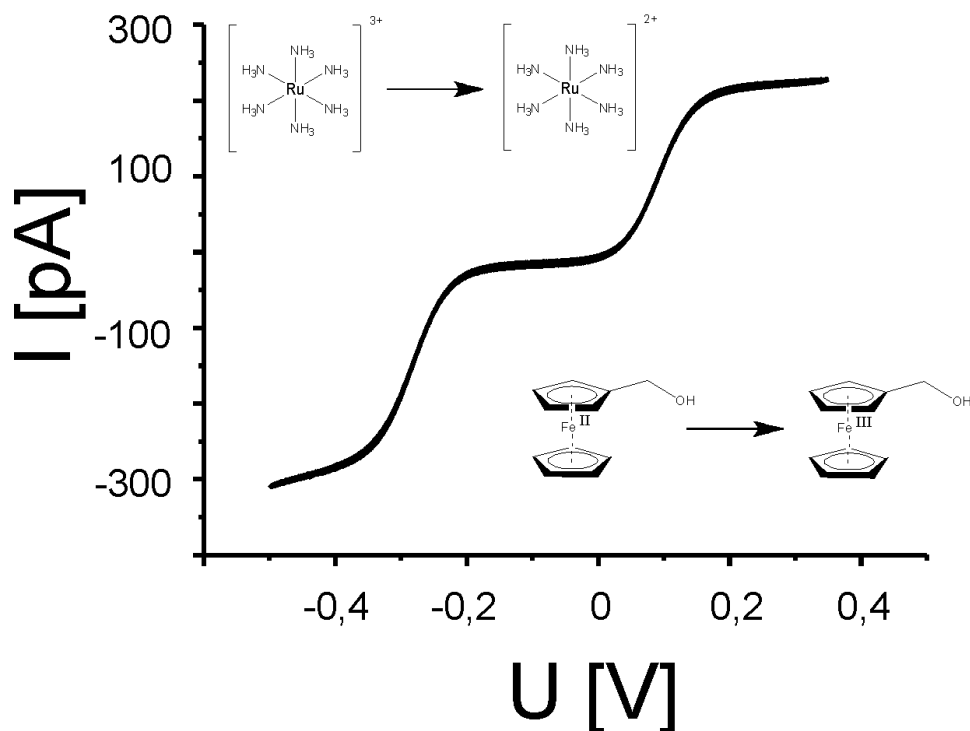


Abbildung 48: CV einer 1,6 μm UME bei Anwesenheit von je 1 mM FcMeOH und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ in PBS^{++} -Puffer bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 20 mV/s. Zudem sind die Strukturen beider Mediatoren und die elektrochemischen Transformationen gezeigt.^[P3]

Anhand der Eduktstrukturen sind deutliche Unterschiede in der Hydrophobizität abzuleiten. Als quantitatives Maß zur Beurteilung der Lipophilie kann der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient K_{OW} herangezogen werden. Dabei weist FcMeOH einen $\log K_{OW}$ -Wert von 2,0 auf^[145], sodass sich also von 101 Teilen FcMeOH 100 Teile im hydrophoberen Oktanol gegenüber einem Teil in der wässrigen Phase verteilen. Im Gegensatz zu FcMeOH besitzt $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ einen stärker hydrophilen Charakter mit $\log K_{OW} = 0,5$ ^[118]. Interessant sind jedoch auch die unterschiedlichen Stufenhöhen, die aus der einsetzenden O_2 -Umsetzung im kathodischen Bereich ab -0,3 V resultieren. Die Diffusionskoeffizienten beider Mediatoren sind dabei ebenfalls mit $D ([Ru(NH_3)_6]Cl_3) = 6,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[146] und $D (FcMeOH) = 7,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[147] leicht unterschiedlich. Zu Beginn der Studien wurden Filtermaterialien verschiedener Hersteller optisch untersucht. Bei der Verwendung der Zellkultureinsätze muss auf gleiche Füllstände in beiden Kompartimenten geachtet werden, da sonst infolge des hydrostatischen Drucks ein zusätzlicher Massenaustausch stattfindet. Mittels SECM wurde zunächst überprüft, ob die Membran glatt gespannt war oder in der Mitte durchhing. Da die Filter ohne Zellbewuchs absolut plan sind, konnte durch das Aufzeichnen von PACs verifiziert werden. Diese Experimente sollten vorzugsweise mit UMEs durchgeführt werden, die eine im Vergleich zu den Poren größere Dimensionierung aufweisen, um lokale Effekte bei Annäherung zu minimieren. Zudem wurden Versuche zum Mediatorwechsel gemacht. Dazu wurde eine Lösung die den ersten Mediator enthielt, in beide Kompartimente gegeben (500 μL in oberes; 7 mL in unteres Kompartiment) und zunächst eine SECM-Aufnahme des Filters vorgenommen. Anschließend wurde das untere Kompartiment mittels einer Pipette mit Anschluss an ein Wasserstrahlvakuum geleert und zügig mit einer Lösung des zweiten Mediators gefüllt. Nachfolgend wurde das Potential an der UME auf die Detektion des zweiten Mediators umgeschaltet und der Filter abermals abgebildet. Durch das Fehlen einer Diffusionsbarriere konnte der zweite Mediator sofort detektiert werden.

5.6.2 Vorexperimente zur elektrochemischen Diffusionszelle

Die zuvor beschriebene Kombination aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Mediator wurde nachfolgend eingesetzt, um verschiedene Transportwege durch Zellmonoschichten zu untersuchen. Dazu wurden NRK- und MDCK II-Zellen auf porösen Trägern kultiviert. Die Porengröße wurde mit 0,4 μm so gering wie möglich gewählt, um eine Wanderung der Zellen auf die Unterseite der Porenmembran definitiv auszuschließen. Zudem besitzt dieses Filtermaterial die größte Porendichte mit $2,0 \cdot 10^6$ Poren/ cm^2 , sodass der diffusive Transport nicht durch die Membran selbst limitiert wird. Durch optische Inspektion mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden die Anwesenheit von Monoschichten verifiziert. Auch bei der Kultivierung der MDCK II-Zellen auf porösen Filtern besteht nicht die Gefahr der Bildung dreidimensionaler Strukturen, da die von den Zellen transportierten Salze sich nicht akkumulieren können, sondern sich im unteren Kompartiment frei verteilen. Von

diesen auf Filtern gewachsenen Zellen wurden nachfolgend PSCs aufgezeichnet. Die Abbildung 49B zeigt drei repetitive PSCs über einem Ausschnitt der Monoschicht, die mit einer 1 μm UME und 1 mM FcMeOH in PBS⁺⁺-Puffer aufgenommen wurden. Dabei sind die periodischen Schwankungen in den Stromwerten auffällig. Diese sind qualitativ reproduzierbar, sodass diese topographischen Ursprungs sind, jedoch stimmen die absoluten Stromwerte schlecht überein. Bei Verringerung der Vorschubgeschwindigkeit von den standardmäßig verwendeten 10 $\mu\text{m/s}$ auf 5 $\mu\text{m/s}$ und 2,5 $\mu\text{m/s}$ wurden die Übereinstimmungen der PSCs besser. Durch die Abhängigkeit von der Vorschubgeschwindigkeit der UME wurde hier auf das Auftreten von Scherkräften geschlossen. Diese kurzreichenden hydrodynamischen Kräfte basieren auf der Reibung zwischen der bewegten Sonde und der viskosen Messlösung. Dies liegt in dem geringen Abstand der UME von der Zellmonoschicht und der geringen Dicke der Membran von 10 μm begründet. Zur Verifizierung wurde ein Experiment zur Untersuchung der Aufnahmefähigkeit von mechanischen Schwingungen mittels optischer Mikroskopie durchgeführt. Dazu wurde ein Zellkultureinsatz aus den Vorexperimenten (Vgl. Abbildung 26) mit einem Außendurchmesser von 6,5 mm und ein Zellkultureinsatz der Transportstudien mit 12 mm Außendurchmesser in eine Inkubationskammer eingesetzt und diese auf den beweglichen Positioniertisch eines optischen Mikroskops gesetzt. Wurde nun eine laterale Bewegung dieses Tisches durchgeführt, wurde der Zellkultureinsatz mit dem größeren Durchmesser deutlich in Schwingungen versetzt. Dies kann nur mit der größeren Dimensionierung und einer damit einhergehenden größeren Empfindlichkeit für dieses Resonanzphänomen erklärt werden. Da die Zellkultureinsätze mit der größten Porendichte nur mit 12 mm Außendurchmesser erhältlich sind, wurde der Einsatz eines die Membran unterseitig stabilisierenden Substrats als Schwingungsdämpfer erwogen. Hierzu wurde ein Zellkultureinsatz ohne Zellbewuchs in die elektrochemische Zelle eingespannt, mit Polydimethylsiloxan (PDMS) ausgegossen und im Ofen ausgehärtet. Dieses weiche Polymer passt sich bis in den μm -Bereich genau der Gießform an, sodass hier die Membran mehr Auflagefläche besitzt. Anschließend wurde an der Stelle, wo die Membran auflag, ein Loch von 4 mm ausgestanzt und ein Kanal von 3 mm für die Applikation des zweiten Mediators und zum Schließen des Stromkreises aus dem Polymer herausgeschnitten. Mittels des Polymerblocks wurden die Schwingungen während der PSCs und der Bildaufnahme effektiv eingedämmt (Abbildung 49A). Jedoch wurde eine ungewöhnliche Reduktion des Stromwertes über die Zeit festgestellt, welches in der Akkumulation von FcMeOH im PDMS begründet lag. Während weniger Stunden verfärbte sich das PDMS in der FcMeOH-Lösung von ursprünglich nahezu transparent nach dunkelgelb, der Farbe von FcMeOH. Durch die abnehmende Konzentration an FcMeOH ließen sich keine Diffusionsuntersuchungen, basierend auf der detektierten Mediatorkonzentration, durchführen. Zur Vermeidung der

Akkumulation des Mediators wurde nachfolgend ein analog aufgebautes Polykarbonatsubstrat mit 2 mm Loch und Kanal verwendet.

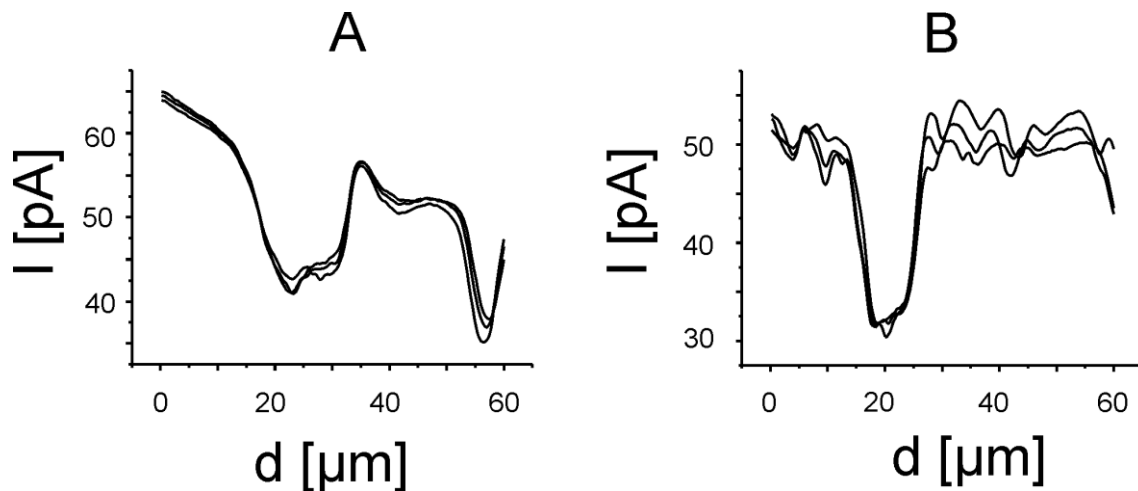


Abbildung 49: Repetitive PSCs über NRK-Zellen auf einer Zellkulturmembran mit einem unterseitig angebrachten Schwingungsdämpfer aus PDMS (A) und ohne diesen (B). Zur Aufnahme wurde eine $1 \mu\text{m}$ UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m/s}$ und 1 mM FcMeOH in PBS^{++} -Puffer verwendet.

Der experimentelle Aufbau der Diffusionsexperimente umfasste demnach die Halterung für die Zellkultureinsätze, sowie ein unterseitig angebrachtes Substrat aus inertem Polykarbonat mit einer kleinen zentralen Aussparung, um der Membran möglichst viel Auflagefläche zu bieten.

5.6.3 Diffusionsexperimente von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch MDCK II-Zellmonoschichten

Die Diffusionsexperimente wurden zunächst an MDCK II-Zellmonoschichten durchgeführt, da diese Zelllinie über eine moderat dichte Barrierefunktion verfügt. Die Permeabilität einer Membran wird dabei mit Saccharose bestimmt, da diese *in-vivo* weder aktiv noch passiv transportiert wird.^[148] Für MDCK II-Zellen wurde eine Saccharose-Permeabilität von $(0,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$ ^[149] mittels einer *Ussing*-Kammer und einem Szintillationszähler für die radioaktiv markierte Saccharose bestimmt. Vor Beginn des Experimentes wurden beide Kompartimente mit $1,5 \text{ mM}$ FcMeOH-Lösung in PBS^{++} -Puffer und 1 g/L Glukose gefüllt. Dabei wurde auf exakt gleiche Füllstände in beiden Kompartimenten geachtet. Im ersten Schritt der SECM-Experimente wurde die Morphologie der MDCK II-Zellmonoschicht mit dem FcMeOH-Signal aufgezeichnet (Abbildung 50A). Dieser Zustand wurde als $t = 0 \text{ min}$ definiert.

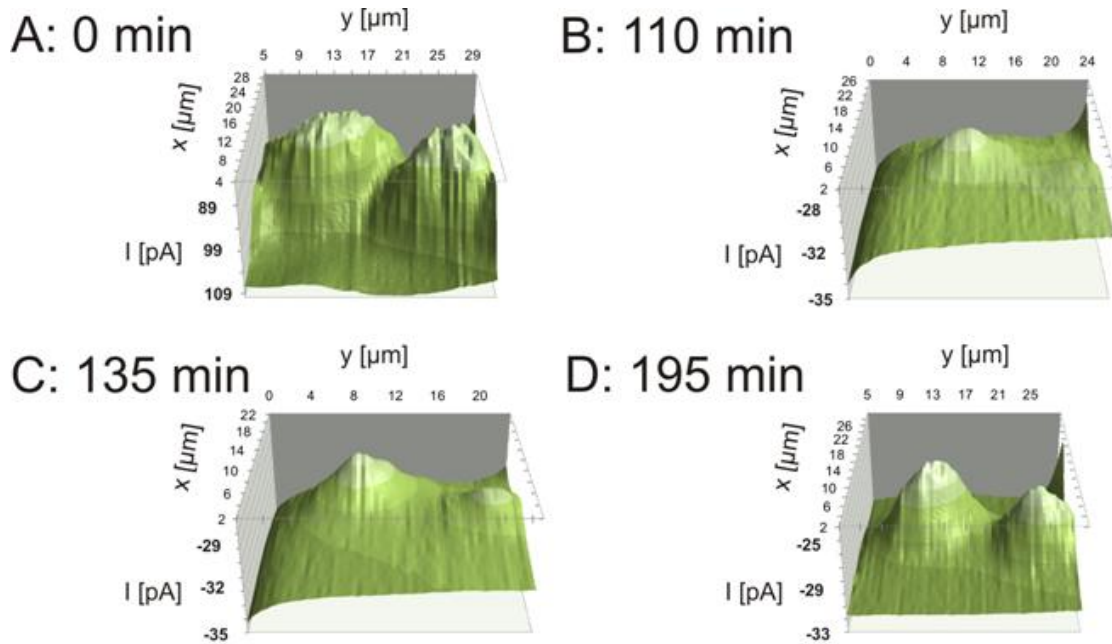


Abbildung 50: SECM-Studie zum diffusiven Transport von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch eine MDCK II-Zellmonoschicht mit einer zwei Kompartimente umfassenden elektrochemischen Zelle. Bild A wurde bei 0,3 V zur Oxidation von FcMeOH (1,5 mM) im oberen Kompartiment aufgenommen. Die Bilder B-D geben den Transport von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (2 mM, reaktiv bei -0,5 V detektiert) vom unteren ins obere Kompartiment zu bestimmten Zeitpunkten wider. Im gesamten Experiment wurde eine 0,6 μm UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ verwendet.^[P3]

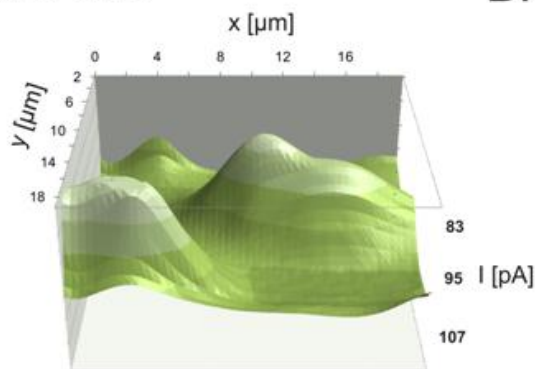
Hierbei sind zwei Zellen auf ähnlichem Höhenniveau erkennbar, was durch die ähnliche Kolorierung beider Zellkörper induziert wird. Angrenzende Zellen liegen in einer tieferen Ebene und sind daher außerhalb des Fokus dieser kleinen Sonde (\varnothing 0,6 μm). Nachfolgend wurde das untere Flüssigkeitskompartiment mit einer Pipette mit Anschluss an ein Wasserstrahlvakuum schnell entleert und gegen eine 2 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ -Lösung ausgetauscht. Dann wurde das Potential an der UME auf -0,5 V zur Reduktion von anwesendem $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ umgeschaltet. Nach sofortigem Abbilden der Zellmonoschicht wurden keine topographischen Details oberhalb des Rauschens detektiert, was an einer zu geringen Mediatorkonzentration lag. Mittels repetitiver SECM-Aufnahmen wurde die Diffusion von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ zeitlich verfolgt. Abbildung 50B wurde dabei nach 110 min aufgenommen. Dabei konnte die linke Zelle langsam oberhalb des Rauschens detektiert werden, während sich die rechte Zelle noch innerhalb des Grundrauschens befand. Dies kann ein Hinweis auf individuell verschiedene Barrierefunktionen sein, da beide Zellen nicht ausschließlich dieselben Zellnachbarn besitzen. Bei weiterer Betrachtung des Systems wurden die Differenzen in der Konzentration von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch diffusive Verteilung im oberen Kompartiment über die Zeit zunehmend kleiner (Abbildung 50C-D). Bei Vergleich von Abbildung 50B mit Abbildung 50C sind über beiden Zellkörpern ähnliche Stromwerte zu erkennen. Jedoch sind die Stromwerte der Zell-Zell-Kontakte, also des Untergrunds, zu

höheren Stromwerten verschoben. Da offensichtlich die Mediatorkonzentration an den Zell-Zell-Kontakten zunimmt, kann dies als Hinweis auf einen parazellulären Transport dieses Mediators entlang der wässrigen Pfade gewertet werden. Der Stromwert nach 195 min entspricht dabei einer Konzentration an $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ von etwa 0,097 mM. In einem Wiederholungsexperiment wurde nach einer Zeit von 260 min eine Konzentration an $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ von etwa 0,099 mM bestimmt. Die etwas unterschiedliche Darstellung beider Zellen in den Abbildungen 50A und 50D liegt, wie in Abschnitt 5.4.2.4 diskutiert, an den individuellen Mediatoreigenschaften. Da sich eine verschlechternde Zellviabilität häufig in einer Änderung der Zellmorphologie zeigt, wurde die Zelltopographie mittels des FcMeOH-Signals jede Stunde wiederholt. Dabei wurden keine Änderungen in der Morphologie festgestellt.

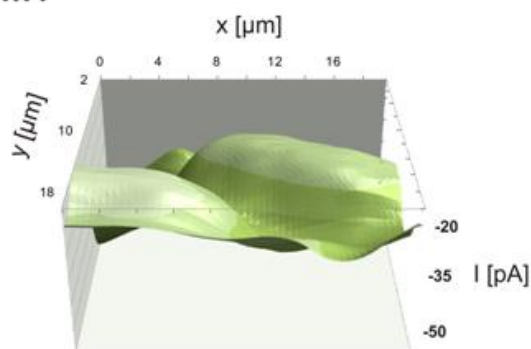
5.6.4 Diffusionsexperimente von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch NRK-Zellmonoschichten

Nachfolgend wurde der Transport von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch NRK-Zellen untersucht. Diese Fibroblasten zeigen konträre Membraneigenschaften mit einer Saccharosepermeabilität von $(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}^{[149]}$, sodass die zuvor studierten MDCK II-Zellen etwa 100-Mal dichtere Zell-Zell-Kontakte als die NRK-Zellen ausbilden. Analog zum vorherigen Experiment wurde zunächst die native Morphologie mit FcMeOH abgebildet (Abbildung 51A). Hierbei sind zwei Zellen auf ähnlichem Höhenniveau zu erkennen. Anschließend wurde im unteren Kompartiment ein Mediatorwechsel auf 2 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durchgeführt und an der UME bei -0,5 V detektiert. Schon im ersten Bild nach dem Mediatorwechsel (Abbildung 51B) ist der volle Kontrast vorhanden. Die Zeitdifferenz von 6 min entspricht dabei der minimalen Zeitspanne zum Mediatorwechsel und der Bildaufnahme. Bei der Verfolgung der weiteren Entwicklung wurden keine qualitativen Unterschiede mehr detektiert, sodass der Transport durch die Zellmonoschicht qualitativ bereits abgeschlossen ist (Abbildung 51B-D). Dabei dehnt sich das Diffusionsprofil von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ im oberen Kompartiment weiter aus, die Konzentration in der Nähe der Zellen besitzt jedoch im betrachteten Zeitbereich einen stationären Wert. Vom Stromwert über einer tief liegenden Zelle, welche die Diffusion von Mediator zur UME nicht einschränkt, wurde eine Konzentration von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ von 0,25 mM nach einer Zeit von 6 min errechnet. Bei Ableitung einer Permeabilität von NRK-Zellen wurde ein im Vergleich zu den MDCK II-Zellen etwa 100-Mal größerer Wert erhalten. In den Bestimmungen der Permeation mittels der *Ussing*-Kammer und Szintillationszählung wurde ebenfalls ein Verhältnis von 100:1 bestimmt. Mit der Bestimmung der Permeabilität von redoxaktiven Substanzen kann bei dieser Art von durchlässigen Zellen, durch die ungenügende Zeitauflösung infolge des Rasterprozesses, keine Unterscheidung bzgl. para- und transzellulären Transportes erfolgen. Jedoch ist anzunehmen, dass der hydrophile Mediator $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ wie im Falle der MDCK II-Zellen den wässrigen Pfaden um die Zellen folgt.

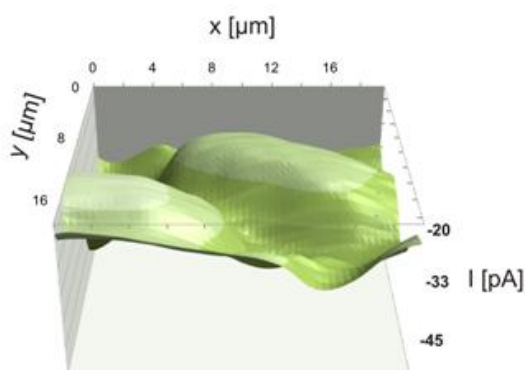
A: 0 min



B: 6 min



C: 9 min



D: 12 min

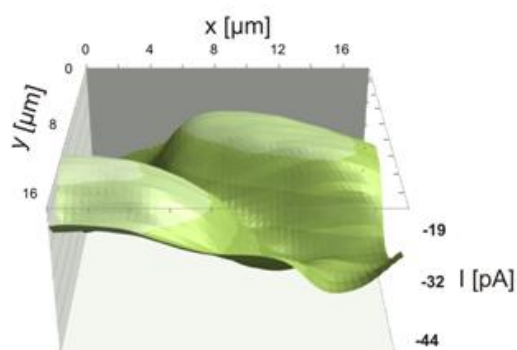


Abbildung 51: SECM-Studie des diffusiven Transports von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ durch eine NRK-Zellmonoschicht. Bild A wurde bei 0,3 V zur Oxidation von FcMeOH im oberen Kompartiment aufgenommen. Die Bilder B-D zeigen den Transport von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ vom unteren ins obere Kompartiment zu bestimmten Zeitpunkten. Experimentelle Bedingungen sind identisch mit denen in Abbildung 50.^[P3]

5.6.5 Diffusionsexperimente von FcMeOH durch NRK-Zellmonoschichten

Zur Studie des Diffusionsverhaltens einer lipophilen Substanz durch Zellmonoschichten wurde der experimentelle Ansatz beibehalten, nur befand sich nun 1 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ im oberen und das lipophile FcMeOH mit einer Konzentration von 1,5 mM im unteren Kompartiment. Dazu wurden NRK-Zellen zunächst bei -0,5 V mit dem $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ -Signal abgebildet (Abbildung 52A). Hier sind drei Zellen der Monoschicht zu sehen. Anschließend wurde FcMeOH ins untere Kompartiment gefüllt und das Detektionspotential an der UME auf 0,3 V umgeschaltet. Selbst 20 min nach dem Mediatorwechsel wurden keine Signale oberhalb des Rauschpegels detektiert (Abbildung 52B). Die nachfolgenden Abbildungen 52C-D zeigen die Zunahme an Kontrast über insgesamt 140 min. Dabei wurde nach 140 min eine Konzentration von 0,04 mM nach Abzug des Hintergrundes erhalten. Beim Vergleich der Permeabilität von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ und FcMeOH durch NRK-Zellen wurde ein Verhältnis von 1:145 erhalten. Dieser deutliche Unterschied ist in der Lipophilie von FcMeOH

begründet. Da das untere Kompartiment ein quasi unendliches Reservoir an Mediator darstellt, akkumuliert FcMeOH zunächst in der basalen Zellmembran. Durch den zuvor bestimmten geringen Permeationswiderstand durch NRK-Zellen sättigen sich nachfolgend auch Membranbereiche der Zell-Zell-Kontakte mit Mediator. Durch den Verteilungsprozess des Mediators bleibt die Konzentration an FcMeOH in der wässrigen Phase oberhalb der apikalen Zellseite auch nach über 2 h sehr gering.

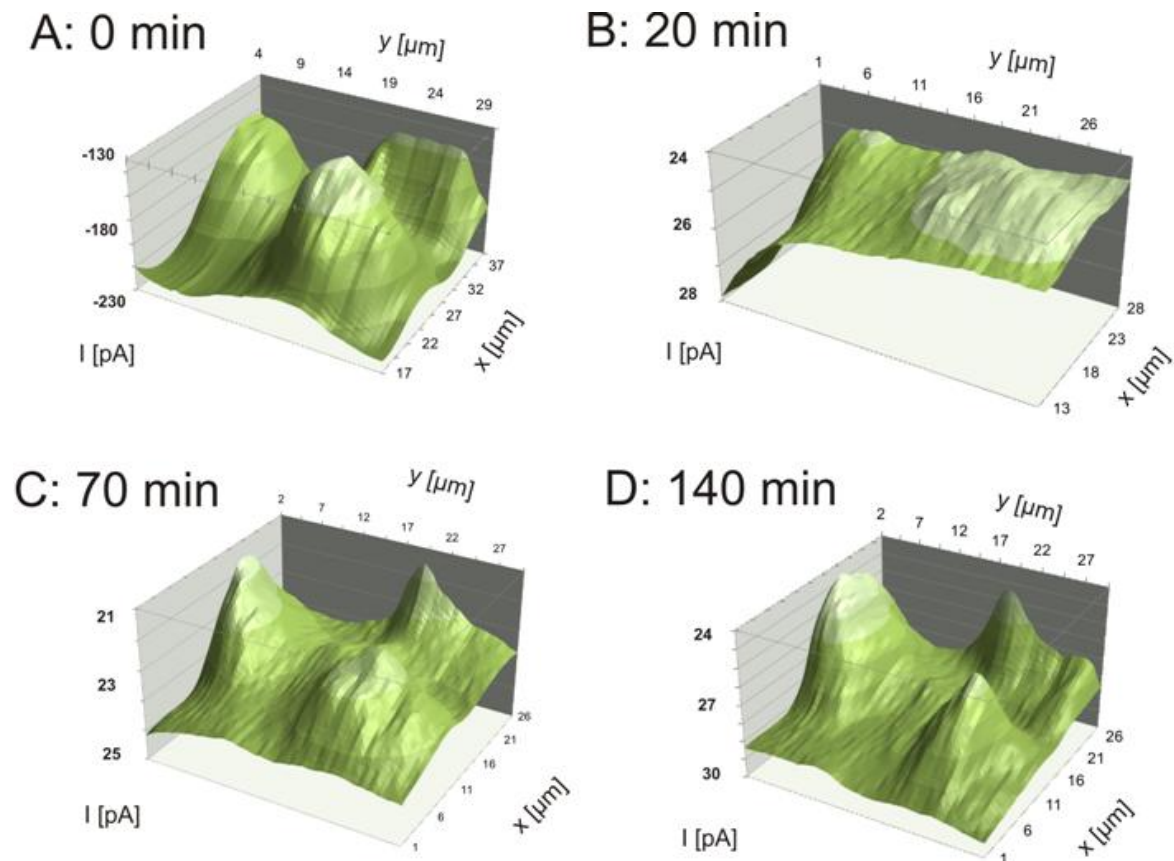


Abbildung 52: SECM-Studie des diffusiven Transports von FcMeOH durch eine NRK-Zellmonoschicht. Bild A wurde bei -0,5 V zur Reduktion von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (1 mM) aufgenommen. Die Bilder B-D zeigen den Transport von FcMeOH (1,5 mM) vom unteren ins obere Kompartiment zu bestimmten Zeitpunkten. Die Detektion von FcMeOH im oberen Kompartiment erfolgte bei einem Potential von 0,3 V. Die SECM-Aufnahmen wurden mit einer 1,2 µm UME bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 12,5 µm/s aufgenommen.^[P3]

5.6.6 Diffusionsexperimente von FcMeOH durch MDCK II-Zellmonoschichten

Abschließend wurde die Diffusion von FcMeOH durch MDCK II-Zellen studiert. Infolge der zuvor diskutierten Lipophilie von FcMeOH und der deutlich niedrigeren Permeationsrate durch MDCK II-Zellen wurden hier auch nach über 4 h keine topographischen Details oberhalb des Rauschens aufgenommen.

6 Zusammenfassung

- 1) Für die experimentellen Arbeiten konnten UMEs, mit effektiven Elektrodendurchmessern zwischen 60 μm und 200 nm, durch Einschmelzen in verschiedene Gläser hergestellt und durch die Aufnahmen von CVs und lichtmikroskopischer Abbildungen charakterisiert werden.
- 2) Für Pt-UMEs aus Wollastondrahnten bis hinunter zu \varnothing 2 μm wurde eine neue Fertigungsmethode entwickelt, die eine parallele Fabrikation der Sonden unter geringstem Materialeinsatz erlaubt.
- 3) Für die Fixierung planarer Substrate mit verschiedenen Dimensionierungen wurde eine spezielle elektrochemische Zelle konstruiert.
- 4) Die wichtigste KenngröÙe einer SECM-Sonde ist die Annaherungskurve an das Substrat (PAC), da diese den Arbeitsabstand und die erreichbare AuflöÙung bestimmt. Daher wurden von UMEs jedweder Dimensionierung amperometrische und impedimetrische PACs über idealen leitenden und nicht-leitenden Substraten aufgenommen. Von ausgewählten Sonden wurden zudem die experimentellen Verläufe der PACs an die Theorie angenähert.
- 5) In der Rastersondenmikroskopie dienen Testsubstrate mit definierter Geometrie der Charakterisierung der verwendeten Sonden und des Mikroskops. Für die SECM wurden als kostengünstige, isolierende Substrate Deckgläser und poröse Filtermaterialien in Form von Einsätzen für die Zellkultur verwendet. Als kostengünstige, leitende Substrate wurden bevorzugt Gitterstrukturen genutzt, die in der TEM als Probenhalter dienen.
- 6) Zur Untersuchung einer Limitierung der positiven Rückkopplung eines Leiters wurden zwei UMEs gegenläufig an einer Sondennormalen im Sinne eines Generator/Kollektor-Experimentes positioniert. Durch Variation der GröÙenverhältnisse konnte eine Limitierung der Fähigkeit eines Leiters, als bipolare Elektrode zu fungieren, aufgezeigt werden. Diese Limitierung konnte durch Potentialaufschlag an der unterseitigen Generatorelektrode umgangen werden. Diese Voruntersuchungen wurden folgend auf die Abbildung von Goldnanoinselfn auf Glas angewendet. Hierbei konnte keine positive Rückkopplung detektiert werden.
- 7) Mit einer 200 nm UME konnten ideale anorganische Substrate, wie poröse Trägermaterialien, im amperometrischen Modus mit nm-AuflöÙung abgebildet werden.
- 8) Die angeführten TEM-Gitter wurden vergleichend mittels Amperometrie und Impedimetrie (AC-SECM) mit verschiedenen SondengröÙen abgebildet. Hierbei wurden grundlegende Limitierungen im Auflösungsverhalten der AC-SECM unter An- und Abwesenheit eines Mediators aufgezeigt.

9) Individuelle Zellen einer fixierten MDCK II-Epithelzellmonoschicht konnten unter Verwendung von sub- μm UMEs abgebildet werden.

10) Für die elektrochemische Abbildung lebender Zellmonoschichten von NRK- und MDCK II-Zellen wurden aus einem Pool von sechs Mediatoren FcMeOH und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ als geeignete Kandidaten auf Grundlage der elektrochemischen Eigenschaften und der Zellviabilität identifiziert.

11) Durch die ortsabhängigen Aufnahmen der PACs über Zellmonoschichten wurde der Vorteil der SECM-Aufnahmen im *constant-height*-Modus verifiziert. Hierbei konnten die Änderungen der Stromwerte auf topographische Details innerhalb der Monoschicht zurückgeführt werden. Durch die Varianz der PACs über einer Zelllinie war eine Transformation der Stromwerte in reale Abstände nicht möglich.

12) Der Einfluss der Osmolarität der Messlösung auf die Abbildung im *constant-height*-Modus wurde studiert. Hierbei wurde eine Zellkultur sukzessive einer hypertonen, isotonischen und hypotonischen Lösung ausgesetzt. Dabei wurde eine starke Abhängigkeit in der abgebildeten Konfluenz der Zellen beobachtet.

13) Der Einfluss der chemischen und physikalischen Mediatoreigenschaften auf die Abbildung der Zellmonoschichten wurde untersucht. Durch den Bildvergleich eines Ausschnitts einer Zellmonoschicht, der mit FcMeOH und nachfolgend mit $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ aufgenommen wurde, konnten die individuellen Merkmale des Mediators auf die SECM-Abbildungen diskutiert werden. Hierbei wurde eine starke Akkumulation des lipophilen FcMeOH in der Zellmembran beobachtet.

14) Zellmonoschichten von NRK- und MDCK II-Zellen wurden hochauflösend mittels sub- μm UMEs im *constant-height*-Modus abgebildet. Hierbei konnten individuelle Höhenprofile einzelner Zellen der Monoschicht aufgelöst werden. Die Bildung dreidimensionaler *dome*-Strukturen bei MDCK II-Zellen stellte hierbei ein Problem dieses Abbildungsmodus dar.

15) Bei der Studie von NRK-Zellen mit inkorporierten Mikropartikeln konnte durch SECM-Abbildungen zwischen intra- und extrazellulären Mikropartikeln unterschieden werden.

16) Krebszelllinien von U373-MG-Zellen zeigten aufgrund ihrer Pleomorphie große Unterschiede in den individuellen Höhenniveaus, sodass hier bei Verwendung kleiner UMEs die meisten Zellen, bedingt durch die geringe Tiefenschärfe des SECM, außerhalb des Fokus lagen.

17) Mischzellkulturen aus Krebszelllinien konnten durch ein starkes dreidimensionales Wachstum nur unter Verwendung größerer UMEs (\varnothing 10 μ m) abgebildet werden. Jedoch wurde mit diesen Sonden nur eine geringere laterale Auflösung erreicht.

18) Zur amperometrischen Detektion des physiologisch wichtigen O_2 wurden CVs mit verschiedenen Sondengrößen aufgenommen. Durch den komplizierten 4-Elektronentransfer und eine damit einhergehende Änderung des pH-Wertes, konnten nur bei Abwesenheit des elektrochemischen Mediators und bei großen UMEs stationäre Signale für die Reduktion erhalten werden. Daher wurde während des Projektes auf eine Kombination aus AC-SECM und gepulster, amperometrischer Sauerstoffdetektion gesetzt, da beide in Pufferlösungen und ohne Mediatorzusatz durchgeführt werden können. Jedoch wurde unter Verwendung der AC-SECM nicht die benötigte Auflösung im sub-zellulären Bereich erreicht.

19) Neben der Verwendung der UME als Sonde wurde diese zur lokalen Schädigung von Einzelzellen innerhalb der Zellmonoschicht durch *in-situ*-Generierung reaktiver Verbindungen verwendet. Hierbei konnte durch Wasserspaltung der pH-Wert über einer Einzelzelle stark erhöht werden. Infolgedessen ging die Zielzelle in die Nekrose über. Der dynamische Verlauf der selektiven Beeinflussung von Einzelzellen, ohne sichtbare Schädigung der direkten Nachbarzellen, wurde nachfolgend mit dem SECM dokumentiert.

20) Zur Nutzung des Alleinstellungsmerkmals des SECM, der lokalen Abbildung chemischer Aktivitäten, wurden Experimente zum diffusiven Transport von Mediatoren durch poröse Filtermaterialien durchgeführt. Hierzu wurde eine spezielle elektrochemische Zelle mit zwei Kompartimenten entworfen. Die zeitgleiche Verwendung von FcMeOH und $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ als Mediatoren ist hierbei vorteilhaft, da diese durch hinreichend verschiedene Halbstufenpotentiale unabhängig voneinander detektiert werden können. Zudem ist deren chemische Natur sehr unterschiedlich.

21) Mit der Verwendung von Filtermaterialien mit adhären MDCK II-Zellen wurde der parazelluläre Transport von hydrophilem $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ entlang der wässrigen Zell-Zell-Kontakte ortsaufgelöst untersucht. Der Transport von hydrophobem FcMeOH durch MDCK II-Zellen konnte durch die starke Akkumulation des Mediators und/oder der geringen transzellulären Diffusivität nicht verfolgt werden.

22) Analog dazu wurden Diffusionsexperimente an NRK-Zellen auf Filtern durchgeführt. Hier wurde eine signifikant geringere Barrierefunktion dieser Zelllinie gefunden. Zudem wurde der ortsaufgelöste Transport von FcMeOH und $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ durch die Zellschicht detektiert. Hierbei zeigten sich große Unterschiede in der Mediatorkonzentration und -verteilung, die auf trans- und parazelluläre Transportmechanismen zurückgeführt werden konnten.

Quellenverzeichnis

- [1] Stephens DJ; Allan VJ (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300: 82–86
- [2] Giaever I; Keese CR (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366: 591–592
- [3] Keese CR; Giaever I (1994) A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE* 13:402-408
- [4] Hoh JH; Schoenenberger CA (1994) Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *J Cell Sci* 107:1105–1114
- [5] Braet F; Rotsch C; Wisse E; Radmacher M (1998) Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy. *Appl Phys A: Mater Sci Process* 66:575–578
- [6] Fritz M; Radmacher M; Gaub HE (1993) In Vitro Activation of Human Platelets Triggered and Probed by Atomic Force Microscopy. *Exp Cell Res* 205:187–190
- [7] Kienberger F; Stroh C; Kada G; Moser R; Baumgartner W; Pastushenko W; Rankl C; Schmidt U; Mueller H; Orlova E; Le Grimellec C; Drenckhahn D; Blaas D; Hinterdorfer P; (2003) Dynamic force microscopy imaging of native membranes. *Ultramicroscopy* 97:229–237
- [8] Matysik F-M (1994) Beiträge zur Anwendung voltammetrischer Mikroelektroden in der Analytik. Universität Leipzig Dissertation
- [9] Buchberger W (1998) Elektrochemische Analysenverfahren: Grundlagen, Instrumentierung, Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin
- [10] Henze G (2001) Polarographie und Voltammetrie: Grundlagen und analytische Praxis. Springer Berlin Heidelberg
- [11] CV wurde aufgenommen von Peter Palatzky
- [12] Koutecky J (1953) Correction for spherical diffusion to the Ilkovič equation. *Czechoslovakij fiziceskij zurnal* 2:50-54
- [13] Mac Gillavry D; Rideal E-K (1937) On the theory of limiting currents. I. Polarographic limiting currents. *Recl Trav Chim Pays-Bas* 56:1013-1021

- [14] Fleischmann M; Pons S; Rolison DR (1987) Ultramicroelectrodes. Datatech Systems, Inc. Morganton
- [15] Wightman RM (1981) Microvoltammetric electrodes. *Anal Chem* 53:1125A-1134A
- [16] Wightman RM, Wipf DO (Editor: Bard AJ) (1989) *Electroanalytical Chemistry Vol 15*. Marcel Dekker, New York
- [17] Lingane PJ (1964) Chronopotentiometry and Chronoamperometry with Unshielded Planar Electrodes. *Anal Chem* 36:1723-1726
- [18] Cornut R; Lefrou C (2007) A unified new analytical approximation for negative feedback currents with a microdisk SECM tip. *J Electroanal Chem* 608:9–66.
- [19] Bond AM; Mann TF (1987) Voltammetric measurements without ohmic and other forms of distortion in aromatic hydrocarbon solvents. *Electrochim Acta* 32:663-670
- [20] Bond AM; Fleischmann M; Robinson J (1984) Electrochemistry in organic solvents without supporting electrolyte using platinum microelectrodes. *J Electroanal Chem* 168:299-312
- [21] Da Silva SM (1998) Determination of Lead in the Absence of Supporting Electrolyte Using Carbon Fiber Ultramicroelectrode Without Mercury Film. *Electroanalysis* 10:72-725
- [22] Kasper C (1940) The Theory of the Potential and the Technical Practice of Electrodeposition II. Point-Plane and Line-Plane Systems. *Trans Electrochem Soc* 77:365-384
- [23] Nemeč L (1964) The effectiveness of iR compensation in controlled-potential polarography. *J Electrochem Soc* 117:198-210
- [24] Newman J (1970) Frequency Dispersion in Capacity Measurements at a Disk Electrode. *J Electrochem Soc* 117:198-203
- [25] Oldham KB (1987) *Microelectrodes: Theory and Applications*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- [26] Robinson RS; McCurdy CW; McCreery RL (1982) Microsecond spectroelectrochemistry by external reflection from cylindrical microelectrodes. *Anal Chem* 54:2356-2361
- [27] Wehmeyer KR; Deakin MR; Wightman RM (1985) Electroanalytical properties of band electrodes of submicrometer width. *Anal Chem* 57:1913-1916

- [28] Wipf DO; Kristensen EW; Deakin MR (1988) Fast-scan cyclic voltammetry as a method to measure rapid heterogeneous electron-transfer kinetics. *Anal Chem* 60:306-310
- [29] Robinson RS; McCreery RL (1981) Absorption spectroelectrochemistry with microelectrodes. *Anal Chem* 53:997-1001
- [30] Howell JO; Goncalves J; Amatore C; Klasinc L; Kochi J; Wightman RM (1984) Electron transfer from aromatic hydrocarbons and their pi-complexes with metals. Comparison of the standard oxidation potentials and vertical ionization potentials. *J Am Chem Soc* 106:3968-3976
- [31] Gonon FG; Fombarlet CM; Buda MJ; Pujol JF (1981) Electrochemical treatment of pyrolytic carbon fiber electrodes. *Anal Chem* 53:1386-1389
- [32] Gonon FG; Navarre F; Buda MJ (1984) In vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential normal pulse voltammetry. *Anal Chem* 56:573-575
- [33] Wipf DO; Wightman RM (1988) Submicrosecond measurements with cyclic voltammetry. *Anal Chem* 60:2460-2464
- [34] Howell JO; Wightman RM (1984) Ultrafast voltammetry and voltammetry in highly resistive solutions with microvoltammetric electrodes. *Anal Chem* 56:524-529
- [35] Montenegro MI; Pletcher D (1986) The determination of the kinetics of electron transfer using fast sweep cyclic voltammetry at microdisc electrodes. *J Electroanal Chem* 200:371-374
- [36] Bond AM; Henderson TLE; Mann DR; Mann TF; Thormann W; Zoski CG (1988) A fast electron transfer rate for the oxidation of ferrocene in acetonitrile or dichloromethane at platinum disk ultramicroelectrodes. *Anal Chem* 60:1878-1882
- [37] Macdonald DD (2006) Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* 51:1376-1388
- [38] Ende D; Mangold K-M (1993) Impedanzspektroskopie. *Chemie in unserer Zeit* 3:134-140
- [39] Stroppe H. (2003) Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften. Fachbuchverlag Leipzig
- [40] Liu HJ; Fan F-RF; Lin CW; Bard AJ (1986) Scanning electrochemical and tunneling ultramicroelectrode microscope for high-resolution examination of electrode surfaces in solution. *J Am Chem Soc* 108:3838-3839

- [41] Kwak J; Bard AJ (1989) Scanning electrochemical microscopy. Apparatus and two-dimensional scans of conductive and insulating substrates. *Anal Chem* 61:1794-1799
- [42] Lee C; Miller CJ; Bard AJ (1991) Scanning electrochemical microscopy: preparation of submicrometer electrodes. *Anal Chem* 63:802 78–83
- [43] Zoski CG (2002) Ultramicroelectrodes: design, fabrication, and characterization. *Electroanalysis* 14:801 1041–1051
- [44] Bard AJ; Fan F-RF; Pierce DT; Unwin PR; Wipf DO; Zhou F (1991) Chemical imaging of surfaces with the scanning electrochemical microscope. *Science* 254:68–74
- [45] Takahashi Y; Shevchuk AI; Novak P; Babakinejad B; Macpherson J; Unwin PR; Shiku H; Gorelik J; Klenerman D; Korchev YE; Matsue T (2012) Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage-switching mode scanning electrochemical microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:11540–11545
- [46] Feng W; Rotenberg SA; Mirkin MV (2003) Scanning electrochemical microscopy of living cells. 5. Imaging of fields of normal and metastatic human breast cells. *Anal Chem* 75:4148–4154
- [47] Takii Y; Takoh K; Nishizawa M; Matsue T (2003) Characterization of local respiratory activity of PC12 neuronal cell by scanning electrochemical microscopy. *Electrochim Acta* 48:3381–3385
- [48] Torisawa Y-S; Kaya T; Takii Y; Oyamatsu D; Nishizawa M; Matsue T (2003) Scanning electrochemical microscopy-based drug sensitivity test for a cell culture integrated in silicon microstructures. *Anal Chem* 75:2154–2158
- [49] Kaya T; Torisawa Y-S; Oyamatsu D; Nishizawa M; Matsue T (2003) Monitoring the cellular activity of a cultured single cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). A comparison with fluorescence viability monitoring. *Biosens Bioelectron* 18:1379–1383
- [50] Nishizawa M; Takoh K; Matsue T (2002) Micropatterning of HeLa cells on glass substrates and evaluation of respiratory activity using microelectrodes. *Langmuir* 18:3645–3649
- [51] Yasukawa T; Kaya T; Matsue T (1999) Dual imaging of topography and photosynthetic activity of a single protoplast by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 71:4637–4641

- [52] Yasukawa T; Kaya T; Matsue T (1999) Imaging of photosynthetic and respiratory activities of a single algal protoplast by scanning electrochemical microscopy. *Chem Lett* 9:975–976
- [53] Yasukawa T; Kondo Y; Uchida I; Matsue T (1998) Imaging of cellular activity of single cultured cells by scanning electrochemical microscopy. *Chem Lett* 8:767–768
- [54] Schulte A; Chow RH (1998) Cylindrically Etched Carbon-Fiber Microelectrodes for Low-Noise Amperometric Recording of Cellular Secretion. *Anal Chem* 70:985–990
- [55] Katemann BB; Schuhmann W (2002) Fabrication and Characterization of Needle-Type Pt-Disk Nanoelectrodes. *Electroanalysis* 14:22-28
- [56] Shao YH; Mirkin MV; Fish G; Kokotov S; Palanker D; Lewis A (1997) Nanometer-sized electrochemical sensors. *Anal Chem* 69:1627-1634
- [57] Zhang X; Ogorevc B (1998) Poly (tetrafluoroethylene) film housing of carbon fibers using capillary-pull technology for one-stage fabrication of carbon disk ultramicroelectrodes and their characterization. *Anal Chem* 70:1646–1651
- [58] Strein TG; Ewing AG (1992) Characterization of submicron-sized carbon electrodes insulated with a phenol-allylphenol copolymer. *Anal Chem* 64:1368–1373
- [59] Millar J; Pelling CWA (2001) Improved methods for construction of carbon fibre electrodes for extracellular spike recording. *J Neurosci Methods* 110:1–8
- [60] Štulík K; Amatore C; Holub K; Mareček V; Kutner W (2000) Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical report). *Pure Appl Chem* 805: 1483–1492
- [61] Chen S; Kucernak A (2002) Fabrication of carbon microelectrodes with an effective radius of 1 nm. *Electrochem Commun* 4:80–85
- [62] Zhang X; Zhang W; Zhou X; Ogorevc B (1996) Fabrication, characterization, and potential application of carbon fiber cone nanometer-size electrodes. *Anal Chem* 68:3338–3343
- [63] Zhang X; Ogorevc B; Tavčar G; Grabec Švegl I (1996) Over-oxidized polypyrrole-modified carbon fibre ultramicroelectrode with an integrated silver/silver chloride reference electrode for the selective voltammetric measurement of dopamine in extremely small sample volumes. *Analyst* 121:1817-1822

- [64] Takahashi Y; Shiku H; Murata T; Yasukawa T; Matsue T (2009) Transfected single-cell imaging by scanning electrochemical optical microscopy with shear force feedback regulation. *Anal Chem* 81:9674–9681
- [65] Hansma PK; Drake B; Marti O; Gould SA; Prater CB (1989) The scanning ion-conductance microscope. *Science* 243:641–643
- [66] Takahashi Y; Shevchuk AI; Novak P; Murakami Y; Shiku H; Korchev YE; Matsue T (2010) Simultaneous noncontact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation. *J Am Chem Soc* 132:10118–10126
- [67] Nogala W; Velmurugan J; Mirkin MV (2012) Atomic force microscopy of electrochemical nanoelectrodes. *Anal Chem* 84:5192–5197
- [68] Bard AJ; Fan F-RF; Kwak J, Lev O (1989) Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles. *Anal Chem* 61:132-138
- [69] Lee C; Kwak J; Bard AJ (1990) Application of scanning electrochemical microscopy to biological samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1740-1743
- [70] Tsionsky M; Cardon ZG; Bard AJ; Jackson RB (1997) Photosynthetic electron transport in single guard cells as measured by scanning electrochemical microscopy. *Plant Physiol* 113:895–901
- [71] Zhu R; Macfie SM; Ding Z (2005) Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. *J Exp Bot* 56:831–2838
- [72] Zhao X; Zhang M; Long Y; Ding Z (2010) Redox reactions of reactive oxygen species in aqueous solutions as the probe for scanning electrochemical microscopy of single live T24 cells. *Can J Chem* 88:569–576
- [73] Li X; Bard AJ (2009) Scanning electrochemical microscopy of HeLa cells—Effects of ferrocene methanol and silver ion. *J Electroanal Chem* 628:35–42
- [74] Nagamine K; Takahashi Y; Ino K; Shiku H; Matsue T (2011) Influence of Tip Size on Single Yeast Cell Imaging Using Scanning Electrochemical Microscopy. *Electroanalysis* 23:1168–1174
- [75] Diakowski PM; Ding Z (2007) Interrogation of living cells using alternating current scanning electrochemical microscopy (AC-SECM). *Phys Chem Chem Phys* 9:5966–5974

- [76] Kersting U; Schwab A; Treidtel M; Pfaller W; Gstraunthaler G; Steigner W; Oberleithner H (1993) Differentiation of Madin-Darby Canine Kidney Cells Depends on Cell Culture Conditions. *Cell Phys Biochem* 3:42–55
- [77] Kurulugama RT; Wipf DO; Takacs SA; Pongmayteegul S; Garris PA; Baur JE (2005) Scanning electrochemical microscopy of model neurons: constant distance imaging. *Anal Chem* 77:1111–1117
- [78] Sun P; Laforge FO; Abeyweera TP; Rotenberg SA; Carpino J; Mirkin MV (2008) Nanoelectrochemistry of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 105:443-448
- [79] Isik S; Schuhmann W (2006) Detection of Nitric Oxide Release from Single Cells by Using Constant-Distance-Mode Scanning Electrochemical Microscopy. *Angew Chem* 45:7541-7545
- [80] Korchev YE; Negulyaev YA; Edwards CRW; Vodyanoy I; Lab MJ (2000) Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nature Cell Biology* 2:616-619
- [81] Macpherson J; Unwin PR (2000) Combined scanning electrochemical-atomic force microscopy. *J Am Chem Soc* 118:6445–6452
- [82] Kranz C; Friedbacher G; Mizaikoff B (2001) Integrating an Ultramicroelectrode in an AFM Cantilever: Combined Technology for Enhanced Information. *Anal Chem* 73:2491–2500
- [83] Burt D; Wilson N; Weaver J; Dobson P; Macpherson J (2005) Nanowire probes for high resolution combined scanning electrochemical Microscopy-Atomic force Microscopy. *Nano Lett* 5:639–643
- [84] Rheinlaender J; Geisse NA; Proksch R; Schaeffer TE (2010) Comparison of scanning ion conductance microscopy with atomic force microscopy for cell imaging. *Langmuir* 27:697–704
- [85] Lee Y; Ding Z; Bard AJ (2002) Combined scanning electrochemical/optical microscopy with shear force and current feedback. *Anal Chem* 74:3634–3643
- [86] Takahashi Y; Hirano Y; Yasukawa T; Shiku H; Yamada H; Matsue T (2006) Topographic, Electrochemical, and Optical Images Captured Using Standing Approach Mode Scanning Electrochemical/Optical Microscopy. *Langmuir* 22:10299–10306

- [87] Ludwig M; Kranz C; Schuhmann W; Gaub HE (1995) Topography feedback mechanism for the scanning electrochemical microscope based on hydrodynamic forces between tip and sample. *Rev Sci Instrum* 66:2857–2860
- [88] Amemiya S; Bard AJ; Fan F-RF; Mirkin MV; Unwin PR (2008) Scanning electrochemical microscopy. *Annu Rev Anal Chem* 1:95–131
- [89] Etienne M; Layoussifi B; Giornelli T; Jacquet D (2012) SECM-based automate equipped with a shearforce detection for the characterization of large and complex samples. *Electrochem Commun* 15:70–73
- [90] Maruyama K; Ohkawa H; Ogawa S; Ueda A; Niwa O; Suzuki K (2006) Fabrication and characterization of a nanometer-sized optical fiber electrode based on selective chemical etching for scanning electrochemical/optical microscopy. *Anal Chem* 78:1904–1912
- [91] Ueda A; Niwa O; Maruyama K; Shindo Y; Oka K; Suzuki K (2007) Neurite Imaging of Living PC12 Cells with Scanning Electrochemical/Near-Field Optical/Atomic Force Microscopy. *Angew Chem Int Ed* 46:8238–8241
- [92] Novak P; Li C; Shevchuk AI; Stepanyan R; Caldwell M; Hughes S; Smart TG; Gorelik J; Ostanin VO; Lab MJ; Moss GWJ; Frolenkov GI; Klenerman D; Korchev JG (2009) Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat Methods* 6:279–281
- [93] Klenerman D; Korchev YE; Davis JS (2011) Imaging and characterisation of the surface of live cells. *Curr Opin Chem Biol* 15:696–703
- [94] Wegener J (2002) *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group London
- [95] Wegener J (2009) (Ed. Fuchs H) *Nanotechnology*. Volume 6: Nanoprobes Wiley-VCH Weinheim
- [96] Powel DW (1981) Barrier function of epithelia. *The American Journal of Physiology* 241:G275-G288
- [97] Matter K; Aijaz S; Tsapara A; Blada MS (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17:453-458
- [98] Jefferson JJ; Leung CL; Liem RKH (2004) Cell-adhesion complexes in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio* 5:542-553
- [99] Verschueren H (1985) Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications. *J Cell Sci* 75:279-301

- [100] Heitmann V; Reiss B; Wegener J (Ed. Steinem C; Janshoff A) (2006) Piezoelectric Sensors Springer Berlin
- [101] Giaver I; Keese CR (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. Proc Natl Acad Sci USA 81:3761-3764
- [102] Turner DR (1984) Etch procedure for optical fibres. Patent-Nr.: 4,469,554
- [103] Olsson OZ (1914) Komplexe Cyanide vierwertigen Wolframs.(über die tieferen Oxydationsstufen des Wolframs III.) Anorg Allg Chem 88:49–53
- [104] Krauss F; Schrader G (1928) Zur Kenntnis der Cyanverbindungen der Platinmetalle. III. Über die Cyanverbindungen des Osmiums. J Prakt Chem 119:279–286
- [105] Bard AJ; Mirkin MV; Unwin PR; Wipf DO (1992) Scanning electrochemical microscopy. 12. Theory and experiment of the feedback mode with finite heterogeneous electron-transfer kinetics and arbitrary substrate size. J Phys Chem 96:1861–1868
- [106] Eckhard K; Schuhmann W; Maciejewska M (2009) Determination of optimum imaging conditions in AC-SECM using the mathematical distance between approach curves displayed in the impedance domain. Electrochim Acta 54:2125-2130
- [107] Diakowski PM; Baranski AS (2006) Positive and negative AC impedance feedback observed above conductive substrates under SECM conditions. Electrochim Acta 52:854-862
- [108] Eckhard K; Kranz C; Shin H; Mizaikoff B; Schuhmann W (2007) Frequency Dependence of the Electrochemical Activity Contrast in AC-Scanning Electrochemical Microscopy and Atomic Force Microscopy-AC-Scanning Electrochemical Microscopy Imaging. Anal Chem 79:5435-5438
- [109] Bonazza HL; Fernández JL (2010) An efficient method for fabrication of disk shaped scanning electrochemical microscopy probes with small glass-sheath thicknesses. J Electroanal Chem 650:75-81
- [110] Horrocks BR; Schmidtke D; Heller A; Bard AJ (1993) Scanning electrochemical microscopy. 24. Enzyme ultramicroelectrodes for the measurement of hydrogen peroxide at surfaces. Anal Chem 65:3605–3614
- [111] Osbourn DM; Sanger RH; Smith PJS (2005) Determination of single-cell oxygen consumption with impedance feedback for control of sample-probe separation. Anal Chem 77:6999–7004

- [112] Oleinick A; Battistel D; Daniele S; Svir I; Amatore C (2011) Simple and Clear Evidence for Positive Feedback Limitation by Bipolar Behavior during Scanning Electrochemical Microscopy of Unbiased Conductors. *Anal Chem* 83:4887-4893
- [113] Xiong H; Kim J; Kim E; Amemiya S (2009) Scanning electrochemical microscopy of one-dimensional nanostructure: Effects of nanostructure dimensions on the tip feedback current under unbiased conditions. *J Electroanal Chem* 629:78-86
- [114] Kim J; Xiong H; Hofmann M; Kong J; Amemiya S (2010) Scanning electrochemical microscopy of individual single-walled carbon nanotubes. *Anal Chem* 82:605-1607
- [115] Angefertigt und bereitgestellt in der Arbeitsgruppe von K. Haupt (University of Technology of Compiègne)
- [116] Liebetrau JM; Miller HM; Baur JE (2003) Scanning electrochemical microscopy of model neurons: imaging and real-time detection of morphological changes. *Anal Chem* 75:563-571
- [117] Yasukawa T; Uchida I; Matsue T (1999) Microamperometric Measurements of Photosynthetic Activity in a Single Algal Protoplast. *Biophys J* 76:1129-1135
- [118] Barker AL; Macpherson JV; Slevin CJ; Unwin PR (1998) Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) as a Probe of Transfer Processes in Two-Phase Systems: Theory and Experimental Applications of SECM-Induced Transfer with Arbitrary Partition Coefficients, Diffusion Coefficients, and Interfacial Kinetics. *J Phys Chem B* 102:1586-1598
- [119] Li X; Bard AJ (2009) Scanning electrochemical microscopy of HeLa cells – Effects of ferrocene methanol and silver ion. *J Electroanal Chem* 628:35-42
- [120] http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=08061901&collection=ecaec_gc (Zugriffsdatum: 22.04.2013)
- [121] <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mda-231-cell-line.pdf> (Zugriffsdatum: 22.04.2013)
- [122] <http://mcf7.com> (Zugriffsdatum: 22.04.2013)
- [123] Wang X; Gorris HH; Stolwijk JA; Meier RJ; Grögel DBM; Wegener J; Wolfbeis OS (2011) Self-referenced RGB colour imaging of intracellular oxygen. *Chem Sci* 2:901-906
- [124] Hitchman ML (Eds. Winefordner JD; Elving PJ) (1978) Measurement of Dissolved Oxygen. John Wiley & Sons New York

- [125] Greeley J; Stephens IEL; Bondarenko AS; Johansson TP; Hansen HA; Jaramilo TF; Rossmeisl J; Chorkendorff I; Nørskov JK (2009) Alloy of platinum and early transition metals as oxygen reduction electrocatalysts. *Nat Chem* 1:552-556
- [126] Stamenkovic VR; Fowler B; Mun BS; Wang G; Ross PN; Lucas CA; Marković NM (2007) Improved Oxygen Reduction Activity on Pt₃Ni (111) via Increased Surface Site Availability. *Science* 315:493-496
- [127] Jayasayee K; Dam VAT; Verhoeven T; Celebi S; de Bruijn FA (2009) Oxygen Reduction Kinetics on Electrodeposited PtCo as a Model Catalyst for Proton Exchange Membrane Fuel Cell Cathodes: Stability as a Function of PtCo Composition. *J Phys Chem C* 113:20371-20380
- [128] Pletcher A; Sotiropoulos S (1995) Cathodic Reduction of Oxygen in Water and Media of Low Ionic Strength. *93:457-462*
- [129] Pletcher D; Sotiropoulos S (1996) Towards a microelectrode sensor for the determination of oxygen in waters. *Anal Chim Acta* 322:83-90
- [130] Rapino S; Marcu R; Bonazzi D; Marcaccio M; Pelicci PG; Giorgio M; Paolucci F (2011) Probing Oxygen Metabolism in Tumour and Normal Living Cells by Scanning Electrochemical Microscopy. Abstract # 1182, 219th ECS Meeting
- [131] Yasukawa T; Kondo Y; Uchida I; Matsue T (1998) Imaging of Cellular Activity of Single Cultured Cells by Scanning Electrochemical Microscopy. *Chem Lett* 1998:767-768
- [132] Wilhelm T; Wittstock G (2001) Patterns of functional proteins formed by local electrochemical desorption of self-assembled monolayers. *Electrochim Acta* 47:275-281
- [133] Schuhmann W; Kranz C; Wohlschläger H; Strohmeier J (1997) Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces. *Biosens Bioelectron* 12:1157-1167
- [134] http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v._01.pdf
(Zugriffsdatum 24.04.2013)
- [135] Wiberg N (2007) Holleman Wiberg - Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter Berlin, New York
- [136] Berghe TV; Vanlangenakker N; Parthoens E; Deckers W; Devos M; Festjens N; Guerin CJ; Brunk UT; Declercq W; Vandenabeele P (2010) Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 17:922-930

- [137] Alberts B; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K; Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science New York
- [138] Wightman RM; Jankowski JA; Kennedy RT; Kawagoe KT; Schroeder TJ; Leszczyszyn DJ; Near JA; Diliberto EJ; Viveros OH (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10754-10758
- [139] Guo J; Amemiya A (2005) Permeability of the nuclear envelope at isolated *Xenopus* Oocyte nuclei studied by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 77:2147-2156
- [140] Koley D; Bard AJ (2010) Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:16783-16787
- [141] Bath BD; White HS (2000) Electrically facilitated molecular transport. Analysis of the relative contributions of diffusion, migration, and electroosmosis to solute transport in an ion-exchange membrane. *Anal Chem* 72:433-442
- [142] Uitto OD; White HS (2001) Scanning electrochemical microscopy of membrane transport in the reverse imaging mode. *Anal Chem* 73:533-539
- [143] Scott ER; White HS (1993) Ionophoretic transport through porous membranes using scanning electrochemical microscopy: application to in vitro studies of ion fluxes through skin. *Anal Chem* 65:1537-1545
- [144] Macpherson JV; ÓHare D; Unwin PR; Winlove CP (1997) Quantitative spatially resolved measurements of mass transfer through laryngeal cartilage. *Biophys J* 7:2771-2781
- [145] Bergren AJ; Porter MD (2007) Selectivity mechanisms at self-assembled monolayers on gold: Implications in redox recycling amplification systems. *J Electroanal Chem* 599:12-22
- [146] Mirkin MV, Arca M, Bard AJ (1993) Scanning Electrochemical Microscopy. 22. Examination of Thin Solid Films of AgBr: Ion Diffusion in the Film and Heterogeneous Kinetics at the Film/Solution Interface. *J Phys Chem* 97:10970-10975
- [147] Weast RC (Ed) (1986) *CRC Handbook of Chemistry & Physics*, 67th ed. CRC Press Boca Raton, USA
- [148] Bowman PD; Ennis SR; Rarey KE; Betz AL; Goldstein GW (1983) Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol* 14:396-402

[149] Lohmann C (1997) Die Blut-Hirn-Schranke in vitro. Universität Münster Dissertation