

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Marcus Patrick Abel
aus Ludwigshafen

Tag der mündlichen Prüfung:
24. April 2008

Thema

**Analyse TNT- basierter Netzwerke in
permanenten und primären Zellkulturen
mittels mikrostrukturierten Oberflächen**

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz
PD Dr. Reiner Dahint

Abstract

Biofunctionalized microstructures were introduced as an idealized platform system for culturing permanent, as well as primary cell-culture-systems and for analyzing so called tunneling nanotubes (TNTs) representing a recently discovered intercellular way of cell-to-cell communication. To guarantee an optimized separation of cells on the platforms, different cell-types were immobilized separately distributed on the gold-dots, to which suitable ligands were covalently bound. This separation of cells is a crucial requirement for the detection of TNTs in the course of investigations. The optimized platforms, which were produced by means of photolithographie, were utilized to analyse chemical, as well as mechanical influences on the formation and stability of TNTs. Furthermore, the structures were characterized in detail due to their structural properties by applying forcespectroscopic measurements. In this context, it was possible for the first time to determine the force which is necessary to disrupt a TNT.

Biofunktionalisierte mikrostrukturierte Oberflächen wurden als ideales Plattformsystem zur Kultivierung permanenter, sowie primärer Zellkultursysteme und zur Analyse der zwischen ihnen ausgebildeten *Tunneling Nanotubes* (TNTs) etabliert, die eine neuartige Form interzellulärer Kommunikation darstellen. Um eine optimale Zellvereinzelung auf den Plattformen zu gewährleisten wurden unterschiedliche Zelltypen durch geeignete, kovalent an die Goldpunkte angebundene Liganden vereinzelt auf den Goldpunkten der mikrostrukturierten Oberflächen immobilisiert. Diese Vereinzelung stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Detektion der TNTs dar. Die optimierten, mittels photolithographischer Verfahren hergestellten Plattformen wurden im Zuge der Arbeit zur präzisen Analyse einer sowohl chemischen, als auch mechanischen Beeinflussung der Bildung, bzw. Stabilität von TNTs herangezogen. Zudem wurden die Strukturen hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften durch kraftspektroskopische Messungen im Detail charakterisiert, wobei unter anderem erstmals die Kraft ermittelt werden konnte, die nötig ist, ein TNT zum Reißen zu bringen.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	4
3. Einleitung	6
3.1 Mikrotechnologie zur Oberflächenstrukturierung	6
3.1.1 Allgemeines zur Mikrotechnologie	6
3.1.2 Photolithographie	6
3.1.3 Prozessführung der optischen Photolithographie	7
3.2 Funktionalisierung von Oberflächen	8
3.2.1 Monolagen von Thiolen auf Gold	10
3.3 Formen zellulärer Interaktionen	11
3.4 Interzelluläre Kommunikation über Tunneling Nanotubes (TNTs)	15
3.5 Ziele der Arbeit	18
4. Material	20
4.1 Chemikalien	20
4.2 Puffer, Medien und Stammlösungen	22
4.3 In vivo Farbstoffe	24
4.4 Plasmide (Expressionsvektoren)	24
4.5 Eukaryotische Zelllinien und Primärkulturen	25
4.6 Bakterienstamm	25
4.7 Geräte	26
4.8 Verbrauchsmaterialien	29
4.9 Software	29
5. Methoden	30
5.1 Herstellung mikrostrukturierter Oberflächen	30
5.1.1 Herstellung der Chrommasken	30

5.1.2 Herstellung strukturierter Deckgläschen _____	32
5.1.3 Funktionalisierung der strukturierten Deckgläschen _____	34
5.1.4 Quarzkristall-Mikrowaage (QCM)-Messungen _____	35
5.2 Zellkultur von PC12-251 Zellen _____	36
5.2.1 Kultivierung und Passagieren _____	36
5.2.2 Einfrieren von PC12-Zellen _____	36
5.2.3 <i>In vivo</i> Färbungen bei PC12-251 Zellen _____	37
5.2.4 Amplifizierung von Expressionsvektor und Transfektion _____	37
5.2.5 Mikroinjektion _____	39
5.3 Zellkultur primärer embryonaler Astrozyten und Neuronen _____	39
5.3.1 <i>Präparation und Kultivierung</i> _____	40
5.3.2 <i>In vivo Färbung</i> bei primären embryonalen Astrozyten und Neuronen ____	41
5.4 Mikroskopische Methoden _____	42
5.4.1 Konventionelle Fluoreszenz- und Videomikroskopie _____	42
5.4.2 Zellpräparation für hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie (REM)	43
5.4.3 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie mittels Atomic Force Microscopy (AFM)-Messungen _____	44
5.5 Chemische Beeinflussung der TNT-Bildung _____	46
5.5.1 Stimulation von Zellen mit Fentons Reagenz _____	46
5.4.3 Stimulation von Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) _____	47
5.6 Mechanische Beeinflussung der TNT-Bildung _____	47
5.6.1 Konstruktion der <i>Flow Cell</i> _____	47
5.6.2 Experimente mit PC12-251 Zellen _____	48
6. Ergebnisse _____	49
6.1 Design und Charakterisierung der mikrostrukturierten Oberflächen ____	49
6.1.1 Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskopie _____	50
6.1.2 Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie _____	51
6.1.3 Nachweis der Ligandenanbindung mittels QCM-Messungen _____	53
6.2 Experimente mit Zellen der Zelllinie PC12-251 auf biofunktionalisierten Oberflächen _____	56
Anmerkung zur statistischen Auswertung der Ergebnisse _____	57

6.2.1 Zellvereinzelung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen	58
6.2.2 Analyse der TNTs durch Fluoreszenz- und Rasterelektronen- Mikroskopie	62
6.2.3 Analyse der Längenverteilung und Höhendifferenz von TNTs auf mikrostrukturierten Oberflächen	65
6.2.4 TNT-Analysen mittels exprimierter Markerproteine	67
6.2.5 Chemische Stimulation durch Fentons Reagenz und Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)	70
6.2.5.1 Stimulation mit Fentons Reagenz	70
6.2.5.2 Stimulation mit Methy- β -Cyclodextrin	72
6.2.6 Mikrostrukturierte Plattform zur Anwendung von Mikroinjektion	74
6.2.7 Auswirkungen eines mechanischen Einflusses auf die TNT-Bildung	76
6.2.8 Kraftmessungen an TNTs mittels Atomic-Force-Microscopy (AFM)	79
6.3 Experimente mit primären embryonalen neuronalen Rattenzellen auf biofunktionalisierten Oberflächen	86
6.3.1 Zellvereinzelung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen	86
6.3.2 Visualisierung der TNTs durch Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie	90
6.3.3 Chemische Stimulation durch Fentons Reagenz	93
Membranphänomene hervorgerufen durch das Fentons Reagenz	100
7. Diskussion	102
7.1 Anwendung von mikrostrukturierten Oberflächen als Plattform zur TNT-Analyse	103
7.2 Untersuchungen zur chemischen Beeinflussung der TNT-Bildung	108
7.3 Untersuchung zur mechanischen Beeinflussung der TNT-Bildung	111
8. Literatur	116
9. Abbildungen	125
10. Abkürzungen	132
Danksagung	135

2. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden biofunktionalisierte mikrostrukturierte Oberflächen als ideales Plattformsystem zur Kultivierung unterschiedlicher Zellkultursysteme etabliert und zur Analyse komplexer biologischer Fragestellungen herangezogen. Dabei wurden sowohl Zellen der neuroendokrinen Zelllinie PC12-251, als auch hippokampale Primärkulturen auf die Existenz und die Eigenschaften von TNTs hin untersucht. Die Detektion von sogenannten *Tunneling Nanotubes* (TNTs), die eine neuartige interzelluläre Kommunikationsart darstellen, wurde bisher durch großflächigen Membrankontakt der Zellen in den Kulturen erschwert. Auf die durch photolithographische Verfahren hergestellten Goldpunkte der mikrostrukturierten Oberflächen wurden für die Immobilisierung der unterschiedlichen Zelltypen spezifische Liganden ermittelt und kovalent angebunden, sodass die Zellen ausschließlich auf den Goldpunkten immobilisiert werden. Dies ermöglichte eine kontrollierte Separierung der Zellen und ist somit von großem Vorteil für die Detektion von zwischen den Zellen aufgespannten TNTs.

Die optimierten Plattformen wurden des Weiteren zur Analyse einer chemischen Beeinflussung der TNT-Bildung verwendet. Hierzu wurden die auf den biofunktionalisierten Oberflächen kultivierten Zellen mit Fentons Reagenz und Methyl- β -Cyclodextrin behandelt, welche die Zusammensetzung der Plasmamembran verändern. Dabei zeigte sich, dass es bei PC12-251 Zellen in beiden Fällen zu einem Rückgang der TNT-Bildung kam. Bei den primären Zellen wurde nach Zugabe des Fentons Reagenz dagegen ein Anstieg der TNT-Bildung beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass die Membranzusammensetzung der unterschiedlichen Zelltypen prinzipiell sehr verschieden ist. Unter Verwendung der mikrostrukturierten Oberflächen wurde auch eine mögliche mechanische Einflußnahme auf die sehr sensitiven TNT-Strukturen untersucht. Dazu wurden PC12-251 Zellen einem definierten Mediumfluss in einer eigens entwickelten Flusszelle ausgesetzt. Hierbei konnte bestätigt werden, dass TNTs extrem mechanosensitive Strukturen sind. Allerdings konnte gleichzeitig gezeigt werden,

dass einzelne TNTs stabiler waren als andere. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass verschiedene Arten von TNTs mit unterschiedlichen Eigenschaften existieren. Um die TNTs von PC12-251 Zellen hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften näher zu charakterisieren wurden daher kraftspektroskopische Messungen angewendet, wobei zum ersten Mal die Kraft ermittelt werden konnte, die nötig ist, ein TNT zum Reißen zu bringen. Ferner konnte im Rahmen dieser Studien die Existenz von Membranreservoirs gezeigt werden, die es TNTs ermöglichen, Membranspannungen zu einem gewissen Grad auszugleichen.

3. Einleitung

3.1 Mikrotechnologie zur Oberflächenstrukturierung

3.1.1 Allgemeines zur Mikrotechnologie

Die Mikrotechnologie beschäftigt sich mit der Forschung und Entwicklung kleiner Strukturen und ist ein Oberbegriff für die unterschiedlichen Analysearten und Bearbeitungsmethoden von Materialien, denen ihre Größendimension von ein bis einhundert Mikrometer gemeinsam ist. Sie umfasst dabei verschiedene Forschungsgebiete aus der belebten und unbelebten Natur, der Chemie, Physik, Biologie sowie den Ingenieurwissenschaften, die interdisziplinär eng zusammenarbeiten [1]. Mittlerweile ermöglichen zahlreiche Verfahren zur Mikrostrukturierung, wie beispielsweise die Photolithographie, die Herstellung von Strukturen im mikro-Maßstab [2]. So finden inzwischen beispielsweise *Micro-Contact-Printing* [3,4], *Micropillars* [5,6] sowie *Micro-Arrays* [7] bei der Bearbeitung unterschiedlichster biologischer Fragestellungen ihre Anwendung.

3.1.2 Photolithographie

Die Photolithographie ist ein lithographisches Reproduktionsverfahren (Lithographie vom altgriechischen *lithos* -der Stein und *graphein* -schreiben), bei dem mittels Belichtung, das heißt der Projektion der von Objekten reflektierten Lichtstrahlen mit Hilfe optischer Linsensysteme auf eine lichtempfindliche Schicht, Strukturen auf Materialien aufgebracht werden können. Neben Elektronen- bzw. Ionenlithographie und Röntgenlithographie findet vor allem die optische Lithographie Anwendung. Im Folgenden wird die Prozessführung der optischen Photolithographie beschrieben.

3.1.3 Prozessführung der optischen Photolithographie

In der optischen Photolithographie werden die späteren Strukturen über Masken definiert, welche meist aus Quarzglas und Chrom bestehen. Die Struktur der Arbeitsmaske wird dann auf eine Schicht organischen Photolacks (Photoresist) übertragen [8]. Die Auflösung wird dabei im Wesentlichen von der verwendeten Lichtwellenlänge bestimmt.

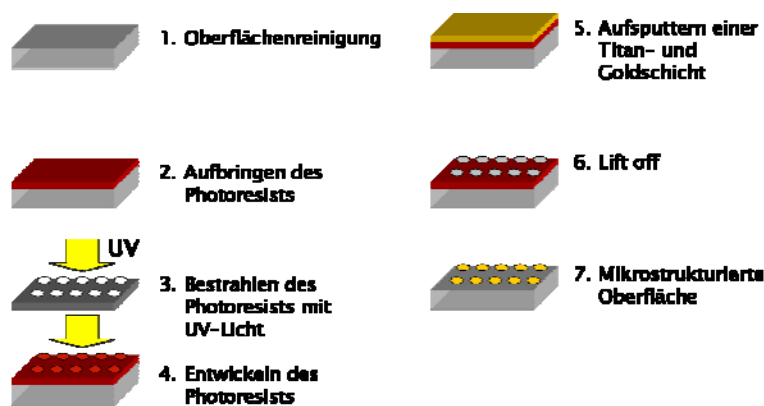


Abbildung 1: Schema der Prozessführung in der optischen Photolithographie.

Zunächst wird das zu verwendende Substrat gereinigt (Abbildung 1, Schritt 1) [9]. Der Resist (Photolack) ist eine meist organische, lackartige Flüssigkeit, welche nun über eine Lackschleuder (spincoater) auf das zuvor gereinigte Substrat aufgebracht wird (Abbildung 1, Schritt 2). Man unterscheidet zwischen Negativ- und Positivlack. Beim Negativlack bleiben die belichteten Stellen beim Entwickeln erhalten, während beim Positivlack, der ausschließlich in dieser Arbeit verwendet wird, die belichteten Stellen durch den Entwickler herausgelöst werden [9]. Eventuelle topographische Stufen auf einem nicht ebenen Substrat werden durch den Photolack aufgrund seiner Oberflächenspannung planiert, was eine unterschiedliche Lackdicke an Stufen zur Folge hat [10]. Je nach Aufgabe und damit verbundener Beanspruchung des Lacks beträgt die Schichtdicke 0.5 - 8 μm . Eine Mindestschichtdicke von 0.5 μm sollte nicht unterschritten werden, da dünne Lackschichten zur Lochbildung neigen, auch wenn dadurch eine höhere Strukturauflösung erreicht werden kann. Beim sogenannten *prebake* verdunstet das

Lösemittel, wodurch der Lack ausgehärtet wird [8]. Die Lackschicht nimmt infolge einer Kontaktbelichtung (Abbildung 1, Schritt 3) die von der Arbeitsmaske vorgegebene Struktur an, indem sich die belichteten Gebiete photochemisch verändern. Nach dem Entwickeln und dem daraus resultierenden Herauslösen der belichteten Strukturen, verbleibt der nicht-belichteten Teil (Abbildung 1, Schritt 4) des Photoresists auf dem Substrat. Mittels der *Sputter*-Technik werden homogene Metallschichten (Titan- und Goldschichten) auf das Substrat und den verbliebenen Photoresist aufgebracht (Abbildung 1, Schritt 5) [9,10]. Der sich anschließende *lift-off* dient zum Abtragen bzw. Ablösen des überschüssigen, zuvor aufgesputterten Metalls (Abbildung 1, Schritt 6). Nach diesem Prozess verbleibt nur die gewünschte gesputterte Struktur auf dem Substrat zurück (Abbildung 1, Schritt 7) [9]. Die so hergestellten mikrostrukturierten Substrate können nun durch eine so genannte Biofunktionalisierung der Goldstrukturen für unterschiedliche biologische Fragestellungen und daraus resultierenden Anforderungen, wie beispielsweise die bessere Vereinzelung und Separierung von eukaryotischen Zellen, herangezogen werden.

3.2 Funktionalisierung von Oberflächen

Ein wichtiger Zweig der Oberflächenwissenschaft ist die Erforschung von organischen Adsorbatsystemen, die unter anderem in der Biologie Anwendung finden. Hierbei sind selbstorganisierende organische Monolagen (SAMs, *self assembling monolayers*) von besonderem Interesse [11]. Dabei handelt es sich um geordnete Monolagen organischer Moleküle auf Oberflächen, die sich spontan durch das Eintauchen eines Substratmaterials in eine Lösung des Moleküls bilden (Abbildung 2).

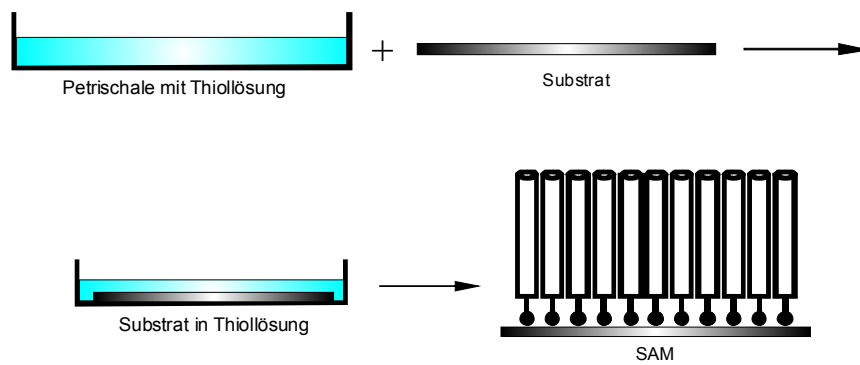


Abbildung 2: Generierung von *self assembling monolayers* (SAMs) auf Substraten.

Insbesondere Alkyl-, Arylthiole, Trichlorsilane aber auch Fettsäuren und Alkylamine bilden auf Metallen wie Gold, Silber, Kupfer, Quecksilber und Platin, sowie Halbleitern wie Silizium, Galliumarsenid und Indiumphosphid meistens kovalente Bindungen, die dem Adsorbat eine hohe Stabilität verleihen [11,12,13]. Zusätzlich führen van-der-Waals-Kräfte zwischen längeren Alkylketten (ab einer Methylenkettenlänge von zehn C-Atomen) zu einer hohen inneren Ordnung und darüber hinaus zu einer weiteren Stabilisierung der Monoschichten. Durch die Wahl der jeweiligen Alkyl- bzw. Arylkettenlänge und die Verwendung weiterer funktioneller Endgruppen lassen sich modifizierte Monolagen mit maßgeschneiderten Eigenschaften herstellen [14].

Die verwendeten Moleküle müssen dazu mehrere Eigenschaften besitzen. Die zur Ausbildung von SAMs verwendeten Moleküle kann man in drei Moleküleinheiten unterteilen: die Kopf- bzw. Ankergruppe, den Spacer und die Endgruppe (Abbildung 3).

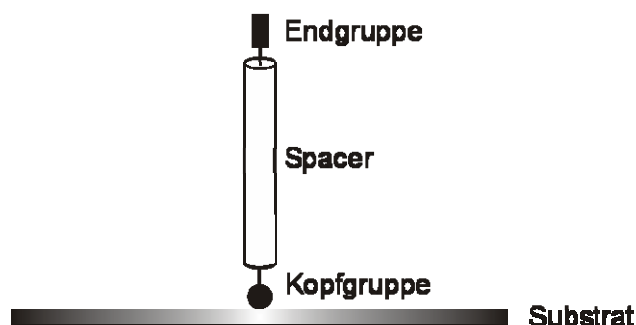


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines zur SAM-Bildung befähigten Moleküls.

Die Kopf- bzw. Ankergruppe (Thiol-Gruppe) bindet das Molekül auf der Oberfläche (Gold), während der Spacer durch van-der-Waals-Wechselwirkungen die Monolage stabilisiert. Die Endgruppe ist maßgeblich für die chemischen und physikalischen Eigenschaften der neu gebildeten Oberfläche wie beispielsweise ihre Hydrophobie, Hydrophilie oder ihre Reaktivität verantwortlich. Ebenso können verschiedene Substrate durch die Anbindung von Peptiden und Proteinen, die eine zur kovalente Anbindung befähigte Ankergruppe (Thiol-Gruppe) besitzen, biofunktionalisiert und auf diese Weise für biologische Anwendungen herangezogen werden. Diese so funktionalisierten Substrate haben gegenüber konventionell mit Proteinen beschichteten Oberflächen den Vorteil, dass die Proteine oder Peptide durch die kovalente Anbindung definiert und strukturiert auf der Oberfläche vorliegen.

3.2.1 Monolagen von Thiolen auf Gold

Im Hinblick auf funktionalisierte Oberflächen sind die am häufigsten untersuchten Monolagen die auf Goldoberflächen, da sich Gold leicht auf Trägermaterialien aufspalten lässt und zudem an der Luft keine Oxidschicht bildet. Durch die hohe Affinität von Schwefelverbindungen zu Gold ist es außerdem möglich, selbstorganisierende Monolagen (SAMs) auf Goldoberflächen herzustellen [11], in dem man organische Thiollösungen mit der Goldoberfläche in Kontakt bringt. Auch Disulfide (RS-SR) und Xanthate (ROC(S)-S) bilden auf Gold SAMs aus [13]. Eine kovalente Bindung zwischen weichen Nukleophilen, wie beispielsweise Thiolen (-SH) oder Isonitrilen (-NC), bei der die Bindungsenergie der Gold-Schwefel-Bindung zwischen 120 und 180 kJ/mol liegt, ermöglicht eine Funktionalisierung der Goldoberfläche durch Chemisorption [13]. Der Mechanismus der Adsorption eines Thiols auf einer Goldoberfläche kann als oxidative Addition der S-H-Bindung an Gold unter Bildung des Au(I)-Thiolats beschrieben werden. Im Anschluss erfolgt eine reduktive Eliminierung von Wasserstoff. Dieser Reaktionsablauf konnte jedoch bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden [13].



Die Ausbildung der Thiolmonolagen findet in zwei Schritten statt. Der erste Schritt, der nur wenige Minuten dauert, ist eine schnelle Adsorption, die einen Bedeckungsgrad der Oberfläche von 80 bis 90 % des Maximalwertes liefert. Die Kinetik der Adsorption ist abhängig von der Konzentration der Thiollösung und kann beispielsweise mit Hilfe von XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*) und Kontaktwinkelmessung genauer untersucht werden. Die Alkylkettenlänge hat einen entscheidenden Einfluss auf die Anbindung von Alkanthiolen, da mit wachsender Alkylkettenlänge die Geschwindigkeit des ersten, schnellen Adsorptionsschrittes abnimmt. Im Gegensatz dazu findet mit langkettigen Thiolen eine schnellere, vollständige Bedeckung der Oberfläche als mit kurz-kettigen statt [15]. Im zweiten Schritt, der bis zu mehreren Stunden dauern kann, wird der Maximalwert der Oberflächenbedeckung erreicht [13]. Die Alkylketten gehen in einen geordneten Zustand über, der durch van-der-Waals-Kräfte vermittelt wird [13]. Auch elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken zwischen funktionellen Gruppen (z.B. -OH, -COOH) der Alkylketten haben einen Einfluss auf die Ordnung der sich bildenden SAMs. Die Alkylketten sind gegenüber der Oberflächennormale um etwa 30 ° Grad verkippt [16]. Diese Orientierung ist energetisch günstig, da diese zum einen die sp³-Hybridisierung der Schwefelatome ermöglicht, zum anderen bestehen zwischen den Alkylketten die bereits erwähnten van-der-Waals-Wechselwirkungen [16]. Diese Thiol-Monolagen und sich ausbildenden SAMs können zur Analyse von Zell-Substrat-Interaktionen unter exakt definierten und reproduzierbaren Bedingungen herangezogen werden.

3.3 Formen zellulärer Interaktionen

Mit steigender Komplexität des Umfeldes einer eukaryotischen Zelle, bzw. durch die Interaktion mit anderen Zellen, entstand die Notwendigkeit komplexe interzelluläre Kommunikationssysteme zu entwickeln. Dies bedeutet, dass

spätestens mit dem Schritt zur Vielzelligkeit solche Kommunikationssysteme bei der Entwicklung, Funktion und Aufrechterhaltung eines Organismus von essentieller Bedeutung sind [17]. Die interzelluläre Kommunikation stellt daher einen essentiellen Schritt bei der Entstehung multizellulärer Organismen dar [18]. Die Mechanismen, die der interzellulären Kommunikation zugrunde liegen, sind extrem vielfältig und gehören zu den meistuntersuchten Prozessen überhaupt. Die dabei verwendeten Kommunikationssysteme dienen der funktionellen Kontrolle und Koordination verschiedenster, teilweise weit voneinander entfernter Zellsysteme.

Eine der verbreitetsten Form interzellulärer Kommunikation besteht im Austausch spezieller Signalmoleküle, die zu einer Reihe verschiedenster Stoffklassen zählt, wie beispielsweise Proteine, Peptide, Aminosäuren, Nukleotide, Steroide, Retinoide, Fettsäurederivate und lösliche Gase wie zum Beispiel NO und CO [19]. Die meisten dieser Signalmoleküle verlassen die Zelle über Exozytose spezieller Transportvesikel oder durch Diffusion über die Plasmamembran. Andere verbleiben an der Zelloberfläche und werden erst durch eine Interaktion mit einem Rezeptor wirksam [19,20]. Bei der sogenannten parakrinen Signalübertragung werden Signalmoleküle aus einer Zelle sezerniert, die dann direkt auf die benachbarten Zellen wirken [19,20]. Im Gegensatz dazu werden bei der endokrinen Signalübertragung Signalmoleküle ins Blut sezerniert. Durch den Blutkreislauf werden diese schliesslich im gesamten Organismus verteilt. Neben den bereits beschriebenen Formen der Signalweiterleitung können Signale auch über Cytoneme [21] oder extrazelluläre Membranvesikel, genannt Exosome/Argosome, übertragen werden [22]. Die Signale können hierbei auch über größere Entfernungen weitergeleitet werden. Eine der bestcharakterisiertesten und gleichzeitig komplexesten Form der interzellulären Kommunikation ist die Kommunikation im Nervensystem, die im Folgenden näher dargestellt wird.

Das menschliche Gehirn besteht aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen, wobei jede Nervenzelle ca. 10.000 Synapsen mit anderen Nervenzellen ausbildet. Synapsen sind spezialisierte Kontaktzonen, an denen Nervensignale weitergeleitet

werden; sie bilden daher strukturelle Grundlagen von Lernprozessen, sowie Kommunikation und Bewegung [20]. An chemischen Synapsen (Abbildung 4) besteht kein direkter Kontakt der Membranen von sendender und empfangender Zelle, sie sind durch den synaptischen Spalt (Breite 20 nm) voneinander getrennt [19]. Ein an der präsynaptischen Membran ankommendes Aktionspotential verursacht dort eine Potentialänderung, welche zu einer Konformationsänderung der sich dort befindenden Kalzium-Kanäle führt [23]. Es erfolgt nun durch diese Kanäle ein Kalzium-Ionen Einstrom, der die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran steuert [24]. Die Vesikel sezernieren nun die sich in ihnen befindenden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Diese Neurotransmitter diffundieren an die postsynaptische Membran, wo sie, nach Bindung an die dort lokalisierten Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, eine Öffnung des Ionenkanals und einen daraus resultierenden Einstrom von Ionen bewirken (Abbildung 4). An einer Synapse kann eine Erregung also nur unidirektional weitergeleitet werden. Die Neurotransmitter werden im Anschluss entweder enzymatisch abgebaut, oder in die umgebenden Nervenendigungen oder Gliazellen aufgenommen.

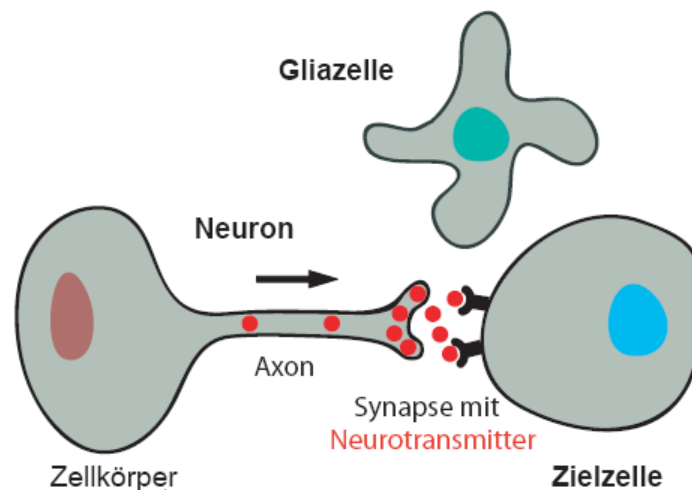


Abbildung 4: Signalweiterleitung zwischen Neuronen an einer chemischen Synapse.

Gliazellen wurden lange Zeit als passive Elemente des Nervensystems angesehen, da sie, anders als Neurone, nicht elektrisch erregbar sind [25]. Sie sind jedoch bei vielen neuronalen Mechanismen von großer Wichtigkeit. Die Astrozyten, eine von drei Gliazelltypen, sind der häufigste Zelltyp (80 %) im menschlichen Gehirn. Sie sind eng mit synaptischen Strukturen und Blutgefäßen assoziiert, weshalb sie als Nähr- und Stützzellen bezeichnet werden [25]. So findet die Versorgung der Neuronen mit z.B. Cholesterol über Astrozyten statt [26]. Astrozyten sorgen ebenso für die Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt. Aufgrund ihrer Expression funktionaler Rezeptoren für Neurotransmitter werden sie vermutlich in die neuronale Kommunikation integriert [27]. Neben der beschriebenen Kommunikation zwischen Neuronen, sowie zwischen Neuronen und Gliazellen, findet auch eine Kommunikation zwischen Astrozyten statt. Sie verarbeiten Signale in Form von intrazellulären Erhöhungen der Kalziumkonzentration [27,28].

Neben diesen Signalübertragungswegen existiert allerdings auch die Möglichkeit eines direkten Austauschs von Signalmolekülen zwischen Zellen [20]. Der Austausch kann entweder durch zytoplasmatische Kontinuität erfolgen, wie zum Beispiel über Gap Junctions, oder aber über Membrankanäle, wie zum Beispiel bei Pflanzenzellen über Plasmodesmata [29,30,31]. Neben diesen sehr gut charakterisierten Kommunikationssystemen wurden gerade in den letzten Jahren Mechanismen gefunden, die neben direktem Austausch von Signalmolekülen sogar den interzellulären Transfer von ganzen Zellorganellen ermöglichen [32,33]. Diese völlig neuartige Form der interzellulären Kommunikation wurde 2004 von Rustom et al. erstmalig beschrieben [32]. Hierbei handelt es sich um die so genannten *tunneling nanotubes* (TNTs) [32].

3.4 Interzelluläre Kommunikation über Tunneling Nanotubes (TNTs)

Im Jahr 2004 wurde erstmalig eine neue, direkte interzelluläre Verbindung zwischen phäochromozytomen Rattenzellen (PC12-251) beschrieben [32]. Die neuartigen, interzellulären Verbindungen wurden aufgrund ihrer Struktur *tunneling nanotubes* (TNTs) benannt (Abbildung 5) [32]. Die sogenannten TNT-Verbindungen bestehen aus dünnen Membrankanälen und können sich *de novo* zwischen räumlich getrennten Zellen ausbilden [34,35]. Ebenso wurde die Bildung von komplexen zellulären Netzwerken beobachtet [36]. Nach und nach konnten TNT-ähnlichen Strukturen auch bei Kulturen anderer Zelllinien und sogar in primären Zellkulturen nachgewiesen werden, darunter bei humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293), Nierenzellen der Ratte (NRK), sowie Primärkulturen von Rattenastrozyten [37]. Interessanterweise wurden TNT-ähnliche Strukturen auch zwischen Immunzellen, zum Beispiel zwischen dendritischen Zellen, gefunden [34,35,36]. Dort sind sie möglicherweise an der Entstehung und Funktion der sogenannten Immunsynapsen beteiligt. Ob diese Strukturen auch in Geweben, zum Beispiel zwischen Gliazellen und Neuronen, existieren, ist bislang allerdings noch immer eine offene Frage. TNTs überwinden beim Verbinden von Zellen große Distanzen, die bis zu mehreren Zelldurchmessern lang sind [32]. Der Durchmesser dieser Strukturen liegt zwischen 50 und 200 nm [32]. Erstaunlicherweise sind TNTs in der Regel nicht mit dem Substrat der Zellen assoziiert, sie schweben vielmehr frei im Zellkulturmedium [36].

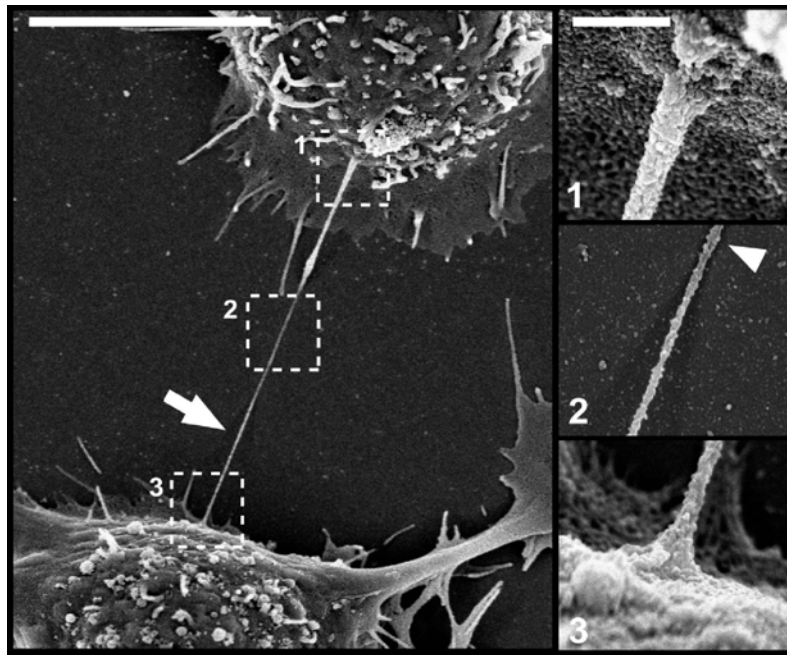


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zweier PC12-Zellen, die über ein TNT miteinander verbunden sind (aus Rustom et al. 2004 [32]). Der Pfeil kennzeichnet das TNT, die Boxen 1-3 sind in den rechten Bildern (1-3) vergrößert dargestellt. Man beachte, dass das TNT zwischen zwei Zellen aufgespannt ist und keinen Kontakt zum Substrat hat. Die TNT-Membran geht scheinbar übergangslos in die Plasmamembranen der verbundenen Zellen über (1, 3).

Eine sehr prominente strukturelle Eigenschaft von TNTs ist das Vorhandensein eines F-Aktin-Bündels, welches das gesamte TNT durchzieht. Die Polymerisation von F-Aktin scheint zudem die treibende Kraft für die Bildung dieser Strukturen zu sein [32,36,38,39,40,41]. Die Geschwindigkeit des TNT-Wachstums liegt bei Immunzellen zum Beispiel bei $0.2 \mu\text{m/s}$. Seit kurzem sind allerdings auch TNTs bekannt, die Mikrotubuli anstelle von F-Aktin aufweisen [38]. Eine weitere, sehr prominente Eigenschaft von TNTs ist ihre Sensitivität. TNTs reagieren sensibel auf mechanischen Stress, ebenso auf chemische Fixierung und dem Aussetzen von UV-Licht [32].

Aufgrund der Tatsache, dass TNTs Membrankontinuität zwischen den verbundenen Zellen vermitteln (Abbildung 5), sind sie am interzellulären Transfer von Organellen, Bestandteilen von Membranen und zytoplasmatischen Molekülen beteiligt [32,33,42]. Watkins et al. konnten sogar zeigen, dass Kalziumsignale innerhalb von Sekunden von einer zur anderen Zelle über Distanzen von mehreren

hundert Mikrometern durch TNTs verbreitet werden [36]. TNTs zeigen damit in ihrer Funktion Parallelen zu den *Gap Junctions*, den am häufigsten vorkommenden Zellverbindungen zwischen tierischen Zellen [29]. Im Gegensatz zu den chemischen Synapsen bei Nervenzellen bilden *Gap Junctions* eine zytoplasmatische Kontinuität zwischen zwei benachbarten Zellen aus [29]. *Gap Junctions* ermöglichen den Austausch von anorganischen Ionen, Nukleotiden, Zuckern, Aminosäuren und Vitaminen [29]. Moleküle mit einem Molekulargewicht über 1 kDa können nach gängigen Modellen nicht mehr ausgetauscht werden [29]. Durch die TNT-ähnlichen Strukturen, die zwischen Immunzellen ausgebildet werden, konnte ein interzellulärer Transfer von GPI (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol) verankertem GFP beobachtet werden [36]. Bei diesen Immunzellen entstehen diese Strukturen jedoch nicht *de novo*, vielmehr sekundär an jenen Stellen, an denen sich Immunsynapsen befanden [36]. Zwischen Myozytenvorläuferzellen werden durch TNTs vermutlich sogar Mitochondrien interzellulär transportiert [43].

Interessanterweise finden sich im Pflanzenreich ebenfalls Strukturen, die auffallende Parallelen zu den TNTs aufweisen, die so genannten Plasmodesmata [31]. Um zwischen Pflanzenzellen eine zytoplasmatische Kontinuität zu vermitteln, verbinden sogenannte Plasmodesmen als feine Membrankanäle nahezu alle lebenden Zellen einer Pflanze miteinander [31]. Plasmodesmata sind zylindrische Plasmastränge mit einem Durchmesser von ca. 40 nm, die von einer Zisterne des endoplasmatischen Reticulums (ER), dem so genannten Desmotubulus, durchzogen sind [31]. Das Plasmodesmata wird zudem, wie viele TNTs, vom dynamischen Aktin-Zytoskelett der Zelle durchzogen. Plasmodesmata werden primär bei der Zellteilung angelegt, können jedoch auch *de novo* zwischen Zellen gebildet werden (sekundäre Plasmodesmata). Die Funktion von Plasmodesmen liegt im interzellulären Transfer von anorganischen Ionen und Nährstoffen. Der Transport erfolgt entweder ungerichtet oder passiv, solange das zu transportierende Molekül unterhalb der Ausschlussgröße von 1 kDa liegt, oder aber selektiv und reguliert, wenn das Molekül ein spezifisches Transportsignal besitzt. Die Regulation des Transports über Plasmodesmen ist abhängig vom Aktin/Myosin System der Zelle [31], was erneut die Ähnlichkeit zu TNTs verdeutlicht.

Die Tatsache, dass TNTs eine vollkommen neuartige Art interzellulärer Zellverbindung mit außergewöhnlichen Eigenschaften darstellen und diese Strukturen auffallende Parallelen zu bereits gut charakterisierten interzellulären Verbindungen sowohl im Tier-, als auch im Pflanzenreich aufzeigen, macht sie als Ziel für nähere Untersuchungen, wie zum Beispiel zum Bildungsmechanismus von TNTs, mittels mikrotechnologischer Techniken extrem interessant.

3.5 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von TNTs und TNT-basierten Netzwerken zwischen Zellen mit Hilfe von mikrostrukturierten biofunktionalisierten Oberflächen. Zu diesem Zweck sollen sowohl die permanente Zelllinie PC12-251, als auch primäre embryonale Kulturen von Astrozyten und Neuronen, in vereinzelter Form auf speziell entwickelten, durch Photolithographie hergestellten, mikrostrukturierten Oberflächen kultiviert werden. Da eine optimale Zellvereinzelung essentiell für den Nachweis der TNT-Strukturen ist, müssen die Goldflächen dieser Oberflächen mit den, für den jeweiligen Zelltyp optimalen Liganden biofunktionalisiert werden. Die TNTs, die zwischen den Zellen der unterschiedlichen Zelltypen auf den mikrostrukturierten Oberflächen ausgebildet werden, sollen in der Folge hinsichtlich ihrer charakteristischen Eigenschaften untersucht werden. Hierzu werden sowohl phasenkontrast-, fluoreszenz-, als auch rasterelektronenmikroskopische Techniken verwendet. Anhand der optimierten Zellsysteme soll im Weiteren untersucht werden, ob und in welcher Weise, die Bildung, bzw. die Stabilität, von TNTs durch chemische Einflüsse, zum Beispiel durch Zugabe von ausgewählten Reagenzien, die die Eigenschaften der Plasmamembran verändern, beeinflusst werden kann. Von großem Interesse sind ferner die Auswirkungen von mechanischen Einflüssen auf die hoch sensitiven TNTs. Aus diesem Grund ist ein weiteres Ziel der Arbeit, Zellen in einer *Flow Cell* einem definierten Mediumfluss auszusetzen, um die Auswirkungen auf die TNT-Neubildung, sowie bereits bestehende TNTs zu untersuchen. Diese Methode soll zudem erste Hinweise darüber geben, welche Mechanismen bei der TNT-Bildung zwischen Zellen

beteiligt sind, und auf welche Weise diese beeinflusst werden können. In diesem Zusammenhang sollen die generellen Eigenschaften von TNTs, vor allem ihre Stabilität, präziser charakterisiert werden. Aus diesem Grund sollen Rasterkraftmikroskopie-Messungen herangezogen werden, um die Kraft, die aufgebracht werden muss, ein TNT zum Reißen zu bringen, zu messen.

4. Material

4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Acros, Allresist, Clariant, Gibco, Merck, Roche Diagnostics und Sigma-Aldrich und haben p.a. Qualität. Medien und Medienzusätze stammen von den Firmen Invitrogen und Sigma-Aldrich.

- Aceton p.a. Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- 10-Aminodecan-1-thiol Ulf Fritz (AK Grunze),
Universität Heidelberg
- AR 300-35 Allresist GmbH, Strausberg
- AR-P 5350 Allresist GmbH, Strausberg
- AZ 1505 Clariant GmbH, Frankfurt
- AZ 351 B Clariant GmbH, Frankfurt
- Cytochrome C Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- Dimethylformamid (DMF) Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- di-Natriumhydrogenphosphat Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- Eisen(II)sulfat Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen
- Etch 18 SHIPLEY Europe Limited,
Coventry (UK)
- Ethanol 99 %ig Chemikalienlager des
Theoretikums der Universität
Heidelberg

- Ethanol p.a. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Extran MA 01 alkalisch Merck KGaA, Darmstadt
- 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumchlorid Merck KGaA, Darmstadt
- Glutaraldehyd 2.5 % Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- L-Glutamin Gibco-BRL, Gaithersburg (USA)
- IKVAV-Peptid Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein
- Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- 11-Mercaptoundecansäure 95 % Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- 0.1 M Natrium Cacodylat Acros Organics, Schwerte
- Natriumchlorid J.T.Baker
- Natriumdihydrogenphosphat Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Natriumhydrogenphosphat Merck KGaA, Darmstadt
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco-BRL, Gaithersburg (USA)
- Poly-L-Lysin (PLL) 100 μ g/ml Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Trypsin Roche Diagnostics Mannheim
- Twinsil® (Zweikomponentenkleber) picodent® Dental-Produktions- und Vertriebs-GmbH, Wipperfürth
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 3 % Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

- Wasserstoffperoxid (30 %ig) Sigma-Aldrich GmbH,
Taufkirchen

4.2 Puffer, Medien und Stammlösungen

- 10x PBS
 - 37 mM NaCl
 - 2.7 mM KCl
 - 1.4 mM NaH₂PO₄
 - 4.3 mM Na₂HPO₄
 - pH 7.4
- PB-Puffer
 - 5 mM Na₂HPO₄
 - 5 mM NaH₂PO₄
 - ad 100 ml H₂O
- Fentons Reagenz
 - 1.2 µl einer 1 M Eisen(II)sulfat-Lösung werden mit 26.4 µl aqua dest. versetzt. 3 µl einer 30 %igen Wasserstoffperoxid- Lösung werden mit 129 µl aqua dest. versetzt. Beide Lösungen werden auf Eis in einem 1:1 Verhältnis gemischt. Die daraus resultierende Endkonzentration des Fentons Reagenz beträgt 200 mM.
- PC12-Zellkulturmedium
 - DMEM (Invitrogen)
 - 10 % Pferdeserum HS (Invitrogen)
 - 5 % fötales Kälberserum FCS (Invitrogen)
 - 4 mM L-Glutamin
- PC12-Einfriermedium
 - 90 % fötales Kälberserum FCS (Invitrogen)
 - 10 % DMSO

-
- Neuronenmedium NMEM-B27
1 mM Natrium-Pyruvat
2 mM L-Glutamin
0.22 % (w/v) NaHCO₃ (5.5 %)
33 mM D(+)-Glucose
2 % (v/v) B27-Zusatzmedium
MEM-E
 - Trypsin/EDTA (0.125 %)
Gibco-BRL, Gaithersburg (USA)
 - TFB 1
100 mM RbCl
30 mM KOAc
50 mM MgCl₂
10 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glyzerin
pH 5.8
 - TFB 2
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
10 mM MOPS
15 % (v/v) Glyzerin
pH 7.0
 - LB-Medium
10 g NaCl
10 g Bacto-Trypton (Difco)
5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco)
ad 1l H₂O
pH 7.5
 - LB-Platten
LB-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar
 - Ampizillin
50 mg/ml Stocklösung in ddH₂O
1:1000 verdünnt in LB oder LB-Agar

- Kanamycin 10 mg/ml Stocklösung in ddH₂O
1:500 verdünnt in LB oder LB-Agar

4.3 In vivo Farbstoffe

Alle verwendeten *in vivo* Farbstoffe wurden von Molecular Probes Inc., USA bzw. von Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen bezogen.

- Dil, DiO, DiD Vybrand™ Multicolor Cell-Labeling Kit (Molecular Probes Inc., USA)
- Celltracker™ Blue CMAC, Stocklösung 10 mM in DMSO (Molecular Probes Inc., USA)
- Weizenkeim Agglutinin (*Wheat Germ Agglutinin*) WGA® Alexa Flour 488 und WGA® Alexa Flour 565, Stocklösung 1 mg/ml in PBS (Molecular Probes Inc., USA)
- Tetramethylrhodaminisothiocyanat-Dextran (TRITC-Dextran), Stocklösung: 5 mg/ml (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

4.4 Plasmide (Expressionsvektoren)

- pEGFP-F Clontech Laboratories (USA)
- VSV-G-ECFP
(entspricht VSV-G im Text) freundlicherweise bereitgestellt von
P. Keller (siehe Rustom et al. [44])

4.5 Eukaryotische Zelllinien und Primärkulturen

- **PC12-Zellen**

Neuroendokrine Zellen, die einem Phäochromozytoma-Tumor (Nebennierentumor) der Ratte entstammen [45]. Der im Labor verwendete Klon Nummer 251 stammt ursprünglich von Herrn Dr. H. Thoenen aus Martinsried [46].

- **Neuronen-Primärkulturen aus E18-Embryonen von Wistar-Ratten**

Die Neuronen stammen aus der Hippokampusregion von E18-Embryonen (Wistar-Ratten) und wurden nach Standardmethoden präpariert (siehe Methoden 5.3.1) [47].

- **Astrozyten-Primärkulturen aus E18-Embryonen von Wistar-Ratten**

Die Astrozyten wurden nach Standardmethoden präpariert und kultiviert (siehe Methoden 5.3.1) [48].

4.6 Bakterienstamm

DH5 α [49]

Genotyp: supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

4.7 Geräte

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Geräten wurden die üblichen Laborgeräte benutzt.

- *Flow Cell* Eigenkonstruktion von M. Abel (siehe Methoden 5.6.1)
- *Gene-Pulser® Electroporation System* Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Harvard Spritzenpumpe 11 (RS-232) Harvard Apparatus, Massachusetts (USA)
- Inkubatoren *Hera Cell* Thermo Scientific, Langenselbold
- Kritisch-Punkt-Trockner CPD030 Bal-Tec GmbH, Witten
- Lackschleuder BLE Delta10 SUSS MicroTec GmbH, Garching/München
- *Maskaligner MJB3* Karl Süss GmbH, Garching/München
- Mikromanipulation *FemtoJet®* Eppendorf AG, Hamburg
- Photomaskendirektschreiber DWL66 Heidelberger Druckmaschinen
- Plasmaätzer 100-E TePla AG, Aslar
- Schüttelwasserbäder GFL 1083 GFL- GmbH; Burgwedel
- *Sputter-Coater MED020* Bal-Tec GmbH, Witten
- Sterilbänke *Hera Safe* Thermo Scientific, Langenselbold
- Ultraschallbad SONOREX SUPER 10P BANDELIN GmbH & Co, Berlin

- Q-Sense E4 (QCM) Q-Sense AB, Schweden
- Zentrifuge *Centrifuge 5702 R* Eppendorf AG,
Hamburg

Mikroskope:

- ZEISS LEO 1530 (Rasterelektronenmikroskop) Carl Zeiss NTS GmbH,
Oberkochen
- ZEISS Ultra 55 (Rasterelektronenmikroskop) Carl Zeiss NTS GmbH,
Oberkochen
- Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope = AFM)-System:
Nanowizard I, JPK-Instruments (Berlin); Piezo ranges; x, y: 100 μm , z: 15 μm ;
CellHesion, JPK-Instruments (Berlin); inverses Fluoreszenzmikroskop:
Axiovert 200, Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen),
Ölimmersionsobjektiv (63 x EC Plan-NEOFLUAR 63 x/1.25 Oil Ph3; Carl Zeiss
MicroImaging GmbH, Göttingen) und verschiedene Filtersets (CFP-YFP, GFP-
mRFP oder CFP-mRFP, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen).
- Aufrecht Mikroskop:
AxioPlan 2 Imaging von Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen) mit
monochromer AxioCam MRm Digitalkamera (6.45 μm x 6.45 μm
Auflösungsvermögen) von Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen).
- Konventionelles, inverses Fluoreszenzmikroskop:
Olympus IX70 (Olympus Optical. Co.Europa GmbH, Hamburg) ausgestattet
mit einem T.I.L.L. Photonics System (T.I.L.L. Photonics GmbH, Martinsried),
verschiedenen Ölimmersionsobjektiven (100 x PlanApo 100 x/1.40 NA und
40 x PlanApo 40 x/0.95 NA; Olympus Optical Co. Europe GmbH, Hamburg)

und zwei verschiedene Filtersets (ein „Tripleband“-Filterset DAPI/FITC/TRIC F61-020 sowie ein „Dualband“-Filterset ECFP/EYFP F51-017; AHF-Analysetechnik AG, Tübingen). Das Mikroskop war zudem mit einer 37°C Wärmekammer und einer CO₂-Begasungsanlage ausgerüstet (Live Imaging Services). Das Anregungslicht stammt von einem Monochromator (PolychromeIV) mit einer 100°W Xenon Lampe. Die Bilder wurden am Seitenport des Mikroskops mit einer Digitalkamera (IMAGO-QE, T.I.L.L. Photonics GmbH) unter Kontrolle der TILLvisION-Software aufgenommen. Zur 3D-Analyse wurde ein Piezo z-Stepper E-662 (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe/Palmbach) unter Kontrolle des TILLvisION-Systems verwendet.

- Nikon TE2000-E (Nikon Imaging Center, Bioquant Heidelberg):
Konventionelles, inverses Fluoreszenzmikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgestattet mit einer Perkin Elmer spinning disc confocal ERS-FRET Einheit [Laser Linien: 405, 440, 488, 514, 568, 640 nm] (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA), Ölimmersionsojektive (100 x Plan Apo VC 100 x/1.40 NA; Nikon GmbH, Düsseldorf) und verschiedene Filtersets (CFP-YFP, GFP-mRFP oder CFP-mRFP, Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA). Das Mikroskop war zudem mit einer 37°C Wärmekammer, *Tokai Hit Microscope Incubation System for life-cell-imaging*, ausgerüstet (Tokai Hit Co., Ltd., Japan). Die Bilder wurden am Seitenport des Mikroskops mit einer hochsensitiven 30 Hz Digitalkamera [Auflösungsvermögen: 1024 x 1024 Pixel] (EM-CCD HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GmbH (Herrsching am Ammersee) unter Kontrolle der UltraVIEW ERS-Software aufgenommen. Zur 3D-Analyse wurde ein Piezo z-Stepper (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA) unter Kontrolle des UltraVIEW ERS-Systems verwendet.

4.8 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf und Sarstett bezogen. Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc, Sarstett sowie Greiner und Söhne bezogen.

- | | |
|-----------------------------------|--|
| • Zellkulturschalen (60 x 15 mm) | Greiner Bio-One GmbH,
Frickenhausen |
| • Zellkulturschalen (100 x 15 mm) | Nunc GmbH & Co.KG,
Wiesbaden |
| • Zellkulturschalen (150 x 20 mm) | Nunc GmbH & Co.KG,
Wiesbaden |
| • Deckgläser (24 x 24 mm) | Roth GmbH, Karlsruhe |
| • Deckgläser (rund) Ø 50 mm | Menzel GmbH & Co. KG,
Braunschweig |

4.9 Software

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| • TillVisION v4.01 | T.I.L.L. Photonics GmbH, Martinsried |
| • UltraView ERS v3.0 | Perkin Elmer Inc.,USA |
| • JPK Image Processing v2.1.12 | JPK Instruments AG, Berlin |
| • Microsoft Excel 2003 | Microsoft Inc., USA |
| • Microsoft Word 2003 | Microsoft Inc., USA |
| • Origin v7.0383 | Origin Lab Corporation |
| • ImageJ 1.38d | National Institutes of Health, USA |
| • Corel Draw 11.0 | Corel Corporation, Ireland |
| • Adobe Photoshop CS2 | Adobe Systems Inc., USA |
| • Adobe Acrobat 6.0 Professional | Adobe Systems Inc., USA |
| • Adobe Acrobat Distiller 6.0 | Adobe Systems Inc., USA |

5. Methoden

5.1 Herstellung mikrostrukturierter Oberflächen

5.1.1 Herstellung der Chrommasken

- **Reinigen des Quarzglases**

Das Quarzglas (70 x 70 mm) wird zunächst in Milli-Q-Wasser 10 min im Ultraschallbad bei einer Wassertemperatur von 20 °C und einer Ultraschallintensität von 100 % vorgereinigt, im Anschluss daran in einer Lösung aus Extran/Milli-Q-Wasser (1:10-Volumenteile) weitere 20 min im Ultraschallbad endgereinigt, zuletzt 10 min mit Milli-Q-Wasser im Ultraschallbad (bei 20 °C und 100 %) gewaschen. Das feuchte Quarzglas wird im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend für 10 min im Ofen bei einer Temperatur von 100 °C erhitzt.

- **Besputtern des gereinigten Quarzglases mit Chrom**

Das gereinigte Quarzglas wird einseitig bei 120 mA und einem Argondruck von 1.3×10^{-2} mbar für 320 s mit Chrom besputtert (*Sputter-Coater MED020*, Bal-Tec GmbH). Die so erreichte Schichtdicke des Chroms auf dem Quarzglas beträgt 150 nm.

- **Belacken des mit Chrom besputterten Quarzglases**

Das mit Chrom besputterte Quarzglas wird im Ofen bei 200 °C 5 min inkubiert, anschließend mit der chrombesputterten Seite nach oben in einen Exsikkator gelegt, in dem zuvor in eine kleine Petrischale mit 200 µl des Haftvermittlers 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan gegeben wurde. In dem Exsikkator wird für 10 min Vakuum gezogen (ca. 10^{-2} mbar) und danach weitere 10 min gehalten. Es wird belüftet, das besputterte Quarzglas herausgenommen, in der Lackschleuder zentriert ausgerichtet und mittels

Vakuum fixiert. 800 µl des Positiv-*Photoresists* AZ1505 werden mit einer Eppendorfpipette zentriert auf das Quarzglas gegeben. Die Lackschleuder wird in 2 Stufen betrieben, wobei die erste Stufe bei 500 U/min und einem Beschleunigungsgrad von 6 für 7 s den *Photoresist* auf dem Quarzglas homogen verteilt. In der zweiten Stufe wird bei 3500 U/min und einem Beschleunigungsgrad von 6 mit einer Zeitdauer von 25 s eine Schichtdicke des *Photoresists* von 1 µm erzeugt. Das Quarzglas mit dem aufgeschleuderten *Photoresist* wird 30 min bei einer Temperatur von 80 °C im Ofen getrocknet. Danach kann das abgekühlte Quarzglas mittels des Photomaskendirektschreibers DWL66 beschrieben werden.

- **Beschreiben des belackten Quarzglases mit dem DWL66**

Das belackte Quarzglas wird mittels des Photomaskendirektschreibers DWL66 der Firma Heidelberger Druckmaschinen beschrieben, wobei zuvor mit der AutoCAD-Software die gewünschten Strukturinformationen auf den Laserdirektschreiber übertragen wurden.

- **Entwickeln des beschriebenen Quarzglases**

In eine Petrischale (Durchmesser des Petrischalenbodens: 11 cm) wird eine Lösung aus Milli-Q-Wasser/AZ351B-Entwickler (6:1-Volumenanteile) gegeben und das beschriebene Quarzglas für 55 s auf einer wippenden Mischapparatur entwickelt. Das entwickelte Quarzglas wird sofort danach in ein zuvor vorbereitetes, mit Milli-Q-Wasser gefülltes Becherglas gelegt, um den Entwicklungsprozess zu stoppen. Danach wird das Quarzglas nochmals gründlich mit Milli-Q-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet. Im Anschluß erfolgt die Prüfung der Strukturübertragung mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

- **Ätzen des entwickelten Quarzglas**

Das entwickelte Quarzglas wird in eine mit Chromätzlösung *Etch18* gefüllte Petrischale (Bodendurchmesser: 11 cm) gelegt. Unter ständigem Rühren und Schwenken des Quarzglas für 55 s in der Chromätzlösung wird die gewünschte Struktur in die Chromschicht des Quarzglas hineingeätzt. Die geätzte Maske wird nach Ablauf einer Ätzzeit von 55 s aus der Petrischale genommen und in ein zuvor vorbereitetes, mit Milli-Q-Wasser gefülltes Becherglas gelegt, um den Ätzprozess zu stoppen. Anschließend wird die Chrommaske mit Milli-Q-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Strukturüberprüfung der Chrommaske erfolgt unter dem Lichtmikroskop.

- **Reinigen der geätzten Chrommaske**

Um den belichteten und somit nicht entwickelten Teil des Positiv-*Photoresists*, der noch auf der Chromschicht vorhanden ist, vollständig zu entfernen, wird die geätzte Chrommaske in ein mit DMF gefülltes Becherglas gelegt und für 2 min im Ultraschallbad (Temperatur 20 °C, Intensität 100 %) gereinigt. Anschließend wird die Chrommaske mit DMF abgespült und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet.

5.1.2 Herstellung strukturierter Deckgläschen

- **Reinigen der 24 x 24 mm Deckgläschen**

Die Deckgläschen werden in ein Teflongestell platziert und dieses in ein mit Aceton gefülltes Becherglas gelegt. Das Becherglas wird zur Reinigung der Deckgläschen in ein Ultraschallbad (5 min, 20 °C, 100 % Intensität) gestellt. Danach wird jedes Deckgläschen einzeln aus dem Aceton entnommen und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet.

- **Belacken des gereinigten Deckgläschens**

Das zuvor mit Aceton gereinigte Deckgläschen wird zentriert auf dem Tisch in der Lackschleuder ausgerichtet und mittels Vakuum fixiert. 250 µl des Positiv-*Photoresists* AR-P5350 werden mit einer 1 ml Einwegspritze zentriert auf das Deckgläschen gegeben. Die Lackschleuder wird in 2 Stufen betrieben, wobei die 1. Stufe 500 U/min bei einem Beschleunigungsgrad von 6 für 7 s den *Photoresist* auf dem Deckgläschen homogen verteilt. In der 2. Stufe bei 4000 U/min und einem Beschleunigungsgrad von 6 mit einer Zeitdauer von 40 s wird der *Photoresist* auf eine Schichtdicke von 850 nm gebracht. Das Deckgläschen mit dem aufgeschleuderten *Photoresist* wird bei einer Temperatur von 80 °C für 25 min im Ofen getrocknet. Das abgekühlte, belackte Deckgläschen kann dann mittels des *Maskaligners* belichtet werden.

- **Belichten der belackten Deckgläschen**

Die Arbeitsmaske mit den gewünschten Strukturinformationen wird im *Maskaligner* Model MJB3 der Firma Karl Süss mittels Vakuum fixiert und durch das Direktkontaktverfahren auf die belackten Deckgläschen übertragen. Die Belichtungszeit beträgt 9 s.

- **Entwickeln der belichteten Deckgläschen**

In einem Becherglas wird eine Lösung aus Milli-Q-Wasser/AR300-35-Entwickler (1:1-Volumenverhältnis) vorbereitet und die Deckgläschen für jeweils 25 s in der Lösung entwickelt. Direkt nach Ablauf der Entwicklungszeit werden die Deckgläschen in ein mit Milli-Q-Wasser vorbereitetes Becherglas gegeben, um den Entwicklungsprozess zu stoppen. Danach werden die Deckgläschen mit Milli-Q-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet. Zur Strukturkontrolle werden die entwickelten und getrockneten Deckgläschen unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um gegebenenfalls zeitliche Änderungen bei der Belichtungszeit und/oder Entwicklungszeit anzupassen, da diese Parameter von der jeweiligen Reinraumtemperatur und Luftfeuchtigkeit abhängen und minimal differieren können.

- **Besputtern der entwickelten Deckgläschen**

Die entwickelten Deckgläschen werden zuerst bei 120 mA und einem Argondruck von 1.3×10^{-2} mbar 35 s mit Titan (Schichtdicke 5 nm) und anschließend bei 60 mA und einem Argondruck von 5.0×10^{-2} mbar für 60 s mit Gold (Schichtdicke 50 nm) besputtert.

- **Lift off der besputterten Deckgläschen**

Das Deckgläschen wird in ein mit Aceton gefülltes Becherglas gelegt und für 1 min bei einer Temperatur von 46 °C und 100 % Intensität im Ultraschallbad behandelt. Während dieser Zeit lösen sich die meisten unerwünschten Titan- und Goldreste zwischen den Strukturen des Deckgläschens ab. Zur vollständigen Reinigung des strukturierten Deckgläschens wird der Reinigungsprozess im Ultraschallbad ein zweites Mal mit neuem Aceton für weitere 20 s bei wiederholt und das Deckgläschen im Anschluss im Stickstoffstrom vollständig getrocknet.

5.1.3 Funktionalisierung der strukturierten Deckgläschen

- **Plasmaätzen der Substrate**

Die Deckgläschen werden mit der nichtstrukturierten Oberfläche auf Objektträger in ein Metallgestell gelegt und für 5 min bei 150 W und einem Druck von 0.4 mbar in ein Wasserstoffplasma platziert, um die Oberfläche der Deckgläschen zu reinigen.

- **Biofunktionalisierung der mikrostrukturierten Deckgläschen**

Je nach späterem Verwendungszweck werden die Deckgläschen in einer 50 µM 11-Mercaptoundecansäure-Lösung, einer 50 µM 10-Aminodecan-1-thiol-Lösung, oder einer 50 µM IKVAV-Lösung, jeweils in PB-Puffer gelöst,

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die biofunktionalisierten Deckgläschen werden nach dem Inkubieren mit PB-Puffer mehrmals gewaschen und mit Hilfe eines 2-Komponenten-Klebstoffes in einen Petrischalenboden, in welchem ein Loch ausgespart ist (Durchmesser: 1.4 cm), geklebt.

5.1.4 Quarzkristall-Mikrowaage (QCM)-Messungen

QCM-Messungen erlauben es, Massenanalysen und viskoelastische Analysen von adsorbierten Proteinschichten an fest/flüssig-Grenzflächen durchzuführen [50,51,52].

- **Reinigung der Kristalle (SiO₂- und Au-Kristall)**

Die SiO₂- und Au-Kristalle (QSX 301 - Standard Gold und QSX 303 - Silicon Dioxide (Q-Sense AB, Schweden)) werden 45 min in einer 3 %igen SDS-Lösung inkubiert, und anschließend mit Milli-Q-Wasser abgespült. Nachdem sie im Stickstoffstrom getrocknet wurden, werden sie einer 15 min Sauerstoff-Plasmabehandlung (150 W bei 0.4 mbar) unterzogen. Die gereinigten Kristalle können nun in das Gerät platziert werden.

- **Nachweis der Liganden auf den Kristallen**

Zunächst wird die Resonanz-Frequenz bestimmt. Diese dient als Referenz für alle weiteren Messungen. Die im Anschluss für die Messungen verwendeten Lösungen haben folgende Konzentrationen: 10-Aminodecan-1-thiol [20 µM], 11-Mercaptoun-decansäure [10 µM], IKVAV [10 µM] in PB-Puffer. Die Flussraten betragen 60 µl/min.

5.2 Zellkultur von PC12-251 Zellen

Die neuroendokrine Zelllinie PC12 wurde aus einem Phäochromozytom-Tumor (Nebennierentumor) der Ratte etabliert [45].

5.2.1 Kultivierung und Passagieren

Die adhärent in Kultur wachsenden PC12-Zellen werden in DME-Medium mit 10 % Pferdeserum, 5 % FCS und 1 % L-Glutamin auf 10 cm Petrischalen kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wird. Die Inkubation der Zellen erfolgt im Inkubator bei 37 °C in einer mit 10 % CO₂ gesättigten Atmosphäre. Zur Passagierung werden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min in 0.25 % Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Vor dem erneuten Ausplattieren (PC12-Zellen 1:3) werden die Zellen mit Hilfe einer verengten Pasteurpipette vereinzelt. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wird mit PC12-Zellen der Passage 13-16 gearbeitet.

5.2.2 Einfrieren von PC12-Zellen

Nach dem Trypsinieren wird zunächst die Zellzahl der sich abgelösten Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wird nun so eingestellt, dass sich pro Kryoröhrchen 1 x 10⁶ Zellen pro Milliliter Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % FCS) befinden. Die Zellen werden zunächst ein Tag bei -80 °C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.2.3 *In vivo* Färbungen bei PC12-251 Zellen

- **Dil/DiO-Färbung**

Die Zellen einer konfluenten 15 cm Schale werden trypsinisiert, für 5 min bei 800 U/min abzentrifugiert, in 2 ml 1 x PBS aufgenommen und zu gleichen Teilen auf zwei Falconröhrchen verteilt. Zu je einem ml Zellsuspension werden 15 µl Dil bzw. DiO vorsichtig zugegeben. Die Zellen werden für 20 min bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert und alle 3 - 5 min vorsichtig geschüttelt, um die Zellen in Suspension zu halten. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert, jeweils dreimal in 2 ml 1 x PBS und einmal in Kulturmedium gewaschen, um dann auf den strukturierten Oberflächen ausplattiert zu werden.

- **WGA-Färbung**

Die in Kulturmedium vorliegenden PC12-Zellen werden direkt auf dem strukturierten Deckgläschen in der 5 cm Petrischale mit WGA Alexa[®] Fluor 488 und WGA Alexa[®] Fluor 565 (Stocklösung 1 mg/ml in PBS) in einer Verdünnung von 1:300 angefärbt (→ 3 µl). Die Färbung erfolgt 3 - 5 min vor der Mikroskopie.

5.2.4 Amplifizierung von Expressionsvektor und Transfektion

- **Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation**

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, werden die Bakterien zunächst vorbehandelt [49]. 100 ml einer Bakterien-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0.4 - 0.55) werden auf Eis gekühlt und in zwei Aliquote 10 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Das Sediment

wird in 30 ml kaltem TFB1 suspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und wie oben zentrifugiert. Die kompetenten Bakterien werden in 4 ml kaltem TFB2 aufgenommen und in 200 µl Aliquoten bei -80 °C gelagert.

- **Transformation von Bakterien**

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Dazu werden 10 ng zirkuläre Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und danach die Zugabe von 800 µl LB-Medium. Der Ansatz wird über Nacht bei 37 °C rotiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agar-Platten (vorgewärmt und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) verteilt. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C, bis Kolonien sichtbar werden.

- **Präparation von Nukleinsäuren (Plasmid-DNA-Maxi-Präparation)**

Zur Gewinnung größerer Mengen sauberer Plasmid-DNA (zum Beispiel für die Transfektion eukaryotischer Zellen) werden Säulen der Firma Marligen verwendet. Die Präparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Aus 400 ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden auf diese Weise 600 bis 800 µg Plasmid-DNA isoliert.

- **Transfektion der PC12-251 Zellen**

Die PC12-Zellen werden in einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Nach dem Trypsinieren werden die Zellen in ein 15 ml Spitzröhrchen überführt und 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS mit einer verengten Pasteurpipette resuspendiert. 800 µl der Zellsuspension werden in eine Elektroporationsküvette überführt und die entsprechende Menge zirkularisierte cDNA hinzu gegeben (50 µg). Nach mehrmaligem Resuspendieren wird die DNA-Zell-Suspension mit einer

Spannung von 0.25 kV und einer Kapazität von 960 μ F elektroporiert [53,54]. Die Zellen werden sofort in 37 °C warmem DME-Medium aufgenommen und in einer Zellkulturschale ausplattiert.

5.2.5 Mikroinjektion

Die mikrostrukturierten Deckgläschen werden zunächst 5 min in einem Wasserstoffplasma von Verunreinigungen befreit. Sie werden nun über Nacht bei 4 °C in 40 μ l einer IKVAV-Lösung [50 μ M] inkubiert. Überschüssiger Ligand wird danach durch zweimaliges Waschen in PB-Puffer entfernt. Die biofunktionalisierten Deckgläschen werden in die Aussparung (Durchmesser: 1.4 cm) einer Petrischale geklebt, und es werden darauf 5×10^5 -PC12 Zellen ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation werden ausgewählten Zellen Cytochrome C (10 μ l [12.5 mg/ml], gelöst in 3 μ l TRITC-Dextran) mit einer Mikroinjektionsnadel injiziert (Mikromanipulation *FemtoJet*®, Eppendorf AG), wobei TRITC-Dextran dazu dient, mikroinjizierte von nicht injizierten Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie (Olympus IX70, Olympus Optical. Co.Europa GmbH Hamburg) zu unterscheiden [61,62,63].

5.3 Zellkultur primärer embryonaler Astrozyten und Neuronen

Bei Primärkulturen handelt es sich um bis zur ersten Passage aus Körperflüssigkeiten oder Körpergeweben gewonnene Explantate von vielzelligen Organismen. Als Ausgangsmaterial für die Kulturen dient in dieser Arbeit Hippokampusregion von E18-Embryonen der Wistar-Ratte [47,48] (siehe Material 4.5)

5.3.1 Präparation und Kultivierung

- **Hippokampaler Neurone**

Die Präparation der Hippokampi erfolgt nach dem Protokoll von Banker et al. [47]. Die isolierten Hippokampi werden in einem 15 ml Spitzröhrchen mit 5 ml HBSS gesammelt. HBSS wird verworfen, die Hippokampi mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt, 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und nach Zugabe von 2 ml NMEM-B27 mit einer Pasteurpipette dissoziiert. Die Suspension wird nun 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um zu gewährleisten, dass sich vorhandene Aggregate und Hirnhautreste absetzen können, die vereinzelt Neurone jedoch in Lösung bleiben. Der Überstand wird nun in ein weiteres 15 ml Spitzröhrchen überführt, mit 12 ml NMEM-B27 versetzt, bei 250 x g 10 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit einer Pasteurpipette in 1 ml NMEM-B27 resuspendiert. Die Zellsuspension wird zum Schluss mit konditioniertem NMEM-B27 auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wird nun eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen bestimmt, das entsprechende Volumen aus der Zellsuspension entnommen, abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl NMEM-B27 resuspendiert und auf die mikrostukturierten Oberflächen aufgebracht.

- **Präparation Primärer Astrozyten aus E18 Rattenembryonen**

Die E18 Rattenembryonen werden dekapitiert, die Schädeldecke entlang des Schädelmedians geöffnet und die beiden Großhirnhälften entnommen. Jeder Großhirnhälfte wird die Hippokampus-Region entnommen, welche für die spätere Weiterverarbeitung in HBSS auf Eis gelagert wird. Die Großhirnhemisphären werden von den Meningen befreit und je ein Großhirn wird in einem 15 ml Spitzröhrchen mit 2 ml HBSS gesammelt. Die HBSS-Lösung wird verworfen und durch 1 ml DNase-Lösung (0.5 mg DNase/ 1 ml HBSS) ersetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gewebe wird zunächst mit der Pasteurpipette dissoziiert und zur weiteren Vereinzelung mit

1 ml Trypsin/EDTA für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Suspension mit 10 ml DME-Medium mit 10 % FCS versetzt und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 ml DME-Medium mit 10 % FCS resuspendiert und in mit Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen (Nunc) ausplattiert. Die Zellen werden nun 10 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei nach jeweils 2, 3 und 8 Tagen das Kulturmedium ausgetauscht wird. Am achten Tag werden zusätzlich durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche die sich mit in Kultur befindenden Neurone und Mikrogliazellen von den fester adhätierenden Astrozyten separiert. Das Zellkulturmedium wird ausgetauscht, und die Zellen werden bis zum zehnten Tag wie beschrieben weiterkultiviert. Die Astrozyten werden mit 2 ml Trypsin/EDTA für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ vom Flaschenboden abgelöst, in ein 15 ml Spitzröhrchen überführt und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Die Astrozyten werden nun in einer Kokultur mit den frisch präparierten Neuronen auf den mikrostrukturierten Oberflächen kultiviert (Verhältnis Astrozyten/Neurone 1:2).

Die so präparierten Astrozyten werden nun bis zu drei Wochen wie beschrieben weiterpassagiert, wobei das DME-Medium mit 10 % FCS gegen NMEM-B27 ausgetauscht wird, um ein Neuronen-konditioniertes Astrozyten-Medium zu erhalten. Im Gegensatz dazu werden die Neuronen stets frisch präpariert für die Zellexperimente verwendet.

5.3.2 *In vivo* Färbung bei primären embryonalen Astrozyten und Neuronen

- ***Celltracker*TM-Blue Färbung (Neurone)**

Zur Anfärbung von Neuronen werden 6 µl des Farbstoffes *Celltracker-Blue* zu 1 ml Neuronenmedium gegeben und mit einem Zellpellet resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min werden die Zellen in Medium resuspendiert, gezählt und auf die Oberflächen ausplattiert.

- **Dil Färbung (Astrozyten)**

Der Farbstoff Dil wird zunächst 1:500 in PBS verdünnt, anschließend direkt auf das Zellpellet gegeben und mit den Zellen resuspendiert. Nach 15 min Inkubationszeit werden die Zellen mit PBS gewaschen, gezählt und auf die Oberflächen ausplattiert.

5.4 Mikroskopische Methoden

Während sämtlicher *in vivo* Analysen wurde darauf geachtet, den Transfer der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen vom Inkubator zum Mikroskop mit äußerster Vorsicht durchzuführen, um Bewegungen des Zellkulturmediums zu vermeiden. Überflüssige Lichteinstrahlung wurde während der mikroskopischen Analysen wenn möglich vermieden.

5.4.1 Konventionelle Fluoreszenz- und Videomikroskopie

Für Fluoreszenz-, Durchlicht- bzw. DIC-Mikroskopie wurde ein monochromator-basiertes Mikroskopiesystem von T.I.L.L. Photonics (Olympus IX70, siehe Material 4.7) verwendet. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Fluoreszenzfarbstoffe *CelltrackerTM Blue* (353 nm), Alexa WGA 488 (493 nm), Dil (551 nm), DiO (487 nm) und TRITC-Dextran (550 nm), sowie die an die Markermoleküle gekoppelten Farbstoffmoleküle EGFP (pEGFP-F: 488 nm) und ECFP (VSV-G-EGFP: 437 nm), mit den angegebenen Anregungswellenlängen verwendet. Weitere Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem konventionellen, inversen Fluoreszenzmikroskop (Nikon TE2000-E, Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgestattet mit einer Perkin Elmer spinning disc confocal ERS-FRET Einheit [Laser Linien: 405, 440, 488, 514, 568, 640 nm] (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA), erstellt (siehe Material 4.7). Für 3D-Analysen wurden jeweils 40 (z)-Schnitte mit Hilfe eines Piezo z-Steppers (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA) unter Kontrolle des

UltraVIEW ERS-Systems aufgenommen und die 3D-Datensätze mit der 3D-Erweiterung der UltraView ERS Software analysiert. Wichtig während aller mikroskopischen Analysen war die Energie des Anregungslichtes so weit wie möglich zu reduzieren und die Beobachtungszeiträume so kurz wie möglich zu halten, um die sensitiven TNTs nicht zu zerstören.

5.4.2 Zellpräparation für hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur ultrastrukturellen Analyse der TNTs bzw. TNT-basierter Netzwerke auf den mikrostrukturierten Oberflächen werden die Proben mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (siehe Material 4.7) untersucht, welches Aufnahmen mit einer höheren Schärfentiefe erlaubt. Die Präparation der Proben folgt folgendem Schema:

- **Entwässern und Fixieren der Zellen**

In das Medium der ausplattierten Zellen wird zur Fixierung eine Lösung bestehend aus 2.5 % Glutaraldehyd und 0.1 M Natrium Cacodylat (pH 7.4) zugegeben. Nach 15 min werden die strukturierten Deckgläschen vom Petrischalenunterboden vorsichtig abgelöst und das sich noch auf dem Deckgläschen befindende Medium zusammen mit der Fixierlösung abgenommen. Die Zellen werden anschließend nach folgendem Schema in einer ethanolischen Reihe entwässert:

1. Ethanol 50 %	20 min
2. Ethanol 60 %	20 min
3. Ethanol 70 %	20 min
4. Ethanol 80 %	20 min
5. Ethanol 90 %	20 min
6. Ethanol 100 %	20 min

- **Durchführung der Kritisch-Punkt-Trocknung**

Die sich in absolutem Ethanol befindenden Proben werden in den Probenhalter platziert und in die Kammer der kritischen Punkt-Trocknung gestellt. Die Probenkammer wird mit absolutem Ethanol zur Hälfte befüllt und anschließend verschlossen. Nach Erreichen der Solltemperatur von 10 °C kann CO₂ in die Kammer einströmen. Das Ethanol-CO₂-Gemisch wird 2 min durchmischt und anschließend soweit abgelassen, dass die Proben von der Flüssigkeit gerade noch bedeckt sind. Durch das Auslassventil wird ein Teil des Ethanols aus der Anlage entfernt. Dieser Vorgang des kontinuierlichen Austausches von Ethanol gegen CO₂ wird zwölf Mal wiederholt. Danach sollte jegliches Ethanol in den Zellen gegen CO₂ ausgetauscht worden sein. Die Probenkammer wird auf 40 °C erwärmt. Nach Überschreiten des kritischen Punktes von 31 °C (76 bar) wird das Auslassventil geöffnet und das CO₂ langsam und kontrolliert abgelassen, bis wieder Atmosphärendruck in der Kammer herrscht. Die strukturierten Deckgläschen mit den sich darauf befindenden Zellen können nun aus der Apparatur entnommen werden.

- **Besputtern der getrockneten Zellen**

Die Proben werden nach dem Trocknen mit einer Kohlenstoffschicht besputtert (siehe Material 4.7) und können danach im Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet und charakterisiert werden.

5.4.3 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie mittels Atomic Force Microscopy (AFM)-Messungen

- **Rasterkraftmikroskopie**

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) dient zur mechanischen Abtastung von Oberflächen und der Messung atomarer Kräfte auf der Nanometerskala.

Während der Messung wird eine an einer mikroskopisch kleinen Blattfeder (*Cantilever*) befestigte Nadel zeilenweise in einem definierten Raster über die mikrostrukturierte Oberfläche geführt (*Scan*-Vorgang) [58]. Durch die Oberflächenstruktur der Probe biegt sich dabei der *Cantilever* positionsabhängig unterschiedlich weit. Diese Auslenkung des *Cantilevers* kann mittels optischer Sensoren gemessen werden und ist ein Maß für zwischen der Spitze und der Oberfläche wirkende atomare Kräfte. Durch das punktweise Aufzeichnen der Auslenkungen bzw. Kräfte lässt sich eine Abbildung der Substratoberfläche erzeugen.

Alle Experimente, die eine Abbildung der mikrostrukturierten Oberfläche zeigen (*Cantilever*: Veeco Nano Probe NP-S113-29517), werden im intermittierenden Modus durchgeführt. Das Abbilden der Mikrostrukturen erfolgt in PBS.

- **Kraftspektroskopie**

Vor der Versuchsdurchführung werden zunächst die *Cantilever* 30 min in Caroscher Säure (1:3 H₂O₂ / H₂SO₄) gereinigt und im Anschluss mit Milli-Q-Wasser mehrmals abgespült. Darauf folgt ein 45 min Sauerstoffplasma (150 W bei 0.4 mbar). Die so gereinigten *Cantilever* werden nun 30 min bei Raumtemperatur in einer 1 %igen PLL-Lösung inkubiert. Gereinigte, runde Glasdeckgläschen werden in die Aussparung (Durchmesser: 4 cm) einer Petrischale mit Hilfe eines Zweikomponentenklebstoffes geklebt, zweimal mit PBS gewaschen und 30 min in 250 µl einer PLL-Lösung (100 µg/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Um nicht absorbiertes PLL zu entfernen werden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. PC12-Zellen werden mit einer verengten Pasteurpipette vereinzelt, gezählt und jeweils 5 x 10⁵-Zellen auf jede Oberfläche ausplattiert. Die Zelleexperimente werden nach 90 min Inkubation im Zellkulturmedium vorgenommen (*Cantilever*: µmasch Ultrasharp NSC12 / tipless / no Al).

Eine zuvor mit PLL auf dem *Cantilever* durch Andrücken von 1800 s immobilisierte PC12-Zelle wird von der Substratoberfläche abgezogen. Eine zweite PC12-Zelle, die durch ein TNT mit der am *Cantilever* immobilisierten PC12-Zelle verbunden ist, verbleibt während des Abrissvorgangs der ersten PC12-Zelle auf dem Substrat. Die Verbiegungen des *Cantilevers*, hervorgerufen durch Abrisskräfte zwischen Substrat und PC12-Zelle, sowie der anschließende Riss des zwischen den beiden PC12-Zellen aufgespannten TNTs, werden hochaufgelöst gemessen, indem ein Laserstrahl auf die Spitze des *Cantilevers* gerichtet wird und der reflektierte Strahl mit einem Photodetektor aufgefangen wird. Die Verbiegungen des *Cantilevers* geben zum einen Aufschluss über die Kräfte, die aufgebracht werden müssen, um die Zelle vom Substrat abzuziehen, zum anderen über die benötigte Abrisskraft für ein TNT [59,60].

5.5 Chemische Beeinflussung der TNT-Bildung

Eine mögliche Beeinflussung der TNT-Bildung auf den mikrostrukturierten Substraten wird nach Zugabe von Fentons Reagenz und Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) zu den Zellen analysiert. Hierbei wird durch Fluoreszenzmikroskopie das Verhältnis von TNTs zu Zellen vor und nach der Behandlung mit den jeweiligen chemischen Reagenzien ermittelt (siehe Ergebnisse 6.2.5 und 6.3.3).

5.5.1 Stimulation von Zellen mit Fentons Reagenz

PC12 Zellen werden auf den Oberflächen ausplattiert. Nach 1 Stunde erfolgt die Zugabe von 200 mM Fentons Reagenz [55,56] in einer 1:100 Verdünnung. Die Analyse der TNT-Bildung erfolgt 1 h nach der Zugabe.

Astrozyten und Neurone werden in Kokulturen 3 h nach dem Ausplattieren mit 200 mM Fentons Reagenz (1:100) behandelt, die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Nikon TE2000-E, Nikon GmbH, Düsseldorf) erfolgt auch hier 1 h nach der Zugabe [40].

5.4.3 Stimulation von Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)

PC12-251 Zellen werden auf den mikrostrukturierten und biofunktionalisierten Oberflächen ausplattiert. Nach 20 Minuten Inkubation erfolgt die Zugabe einer 2 mM M β CD-Lösung in einer Verdünnung von 1:200 zu dem Zellkulturmedium. Die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie (Nikon TE2000-E, Nikon GmbH, Düsseldorf) erfolgt 1.5 Stunden nach der Zugabe.

5.6 Mechanische Beeinflussung der TNT-Bildung

Die Frage nach einer mechanischen Beeinflussung der TNT-Bildung auf den mikrostrukturierten Oberflächen wird durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse des Verhältnisses von TNTs zu Zellen nach Anlegen eines definierten Mediumflusses untersucht (siehe Ergebnisse 6.2.7).

5.6.1 Konstruktion der *Flow Cell*

Zur Untersuchung der Stabilität von TNTs findet eine selbst entworfene und konstruierte *Flow Cell* [57] Verwendung (Abbildung 6). Auf den Teflongrundkörper der *Flow Cell* (Aussendurchmesser 5.4 cm, Innendurchmesser 2.5 cm) ist eine Plexiglasplatte mit vier Schrauben und einem Dichtungsring montiert. So wird gewährleistet, dass kein Medium aus der *Flow Cell* auslaufen kann. An der Unterseite des Teflongrundkörpers ist eine Aussparung (25 x 25 mm), so dass ein Deckgläschen (24 x 24 mm) mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers darin fixiert werden kann. Der Mediumfluss durch die *Flow Cell* wird durch ein Schlauchsystem ein- und ausgeleitet, das an den Verbindungsstellen zum Teflonkörper durch jeweils einen Hahn abgeriegelt werden kann. Die Geschwindigkeit des Mediumflusses wird durch eine an das Schlauchsystem angeschlossene handelsübliche Spritzenpumpe reguliert (hier nicht gezeigt).

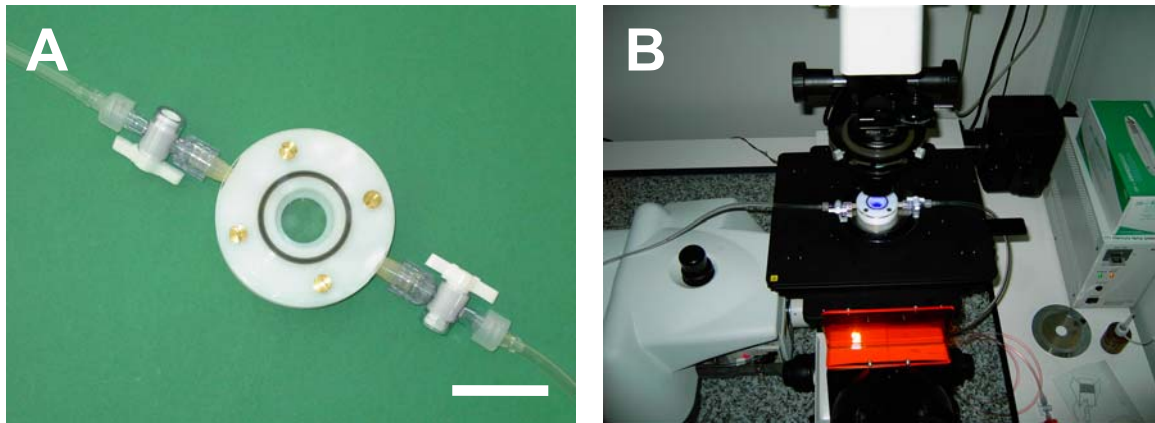


Abbildung 6: *Flow Cell* Eigenkonstruktion mit Anschlussschläuchen zum Durchfluss des Zellmediums (Bild A) (Maßstabsbalken, 2 cm). Die mikrostrukturierte Oberfläche wird mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers an das Teflongehäuse der *Flow Cell* angebracht. Die transparente Plexiglasscheibe ermöglicht das Visualisieren der Zellen unter dem Mikroskop unter dem Mikroskop, Bild B.

5.6.2 Experimente mit PC12-251 Zellen

Zur Durchführung der Experimente werden die zuvor in PB-Puffer gereinigten, mikrostrukturierten und biofunktionalisierten Deckgläschen mit Hilfe des Zweikomponentenklebstoffes in die vorgegebene Aussparung (25 x 25 mm) der *Flow Cell* geklebt. Pro Oberfläche werden 3.5×10^5 Zellen gesetzt und je nach Experiment 1 - 3 h in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch die angeschlossene Spritzenpumpe wird ein definierter Fluss angelegt, wobei sowohl während des Flusses, als auch nach dem angelegten Fluss Bilder mit Hilfe eines Spinning Disc Mikroskops aufgenommen werden (siehe Abbildung 6, Bild B).

6. Ergebnisse

6.1 Design und Charakterisierung der mikrostrukturierten Oberflächen

Die Parameter der mikrostrukturierten Oberfläche wurden so gewählt, dass die PC12 Zellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $13\ \mu\text{m}$ ein wenig über die Goldfläche hinausragen, wenn sie zentriert darauf sitzen. Dieses gewollte Überlappen soll vor allem bei fluoreszenzmarkierten Zellen der erleichterten Visualisierung der TNT-Ansatzstellen an der Zellmembran dienen.

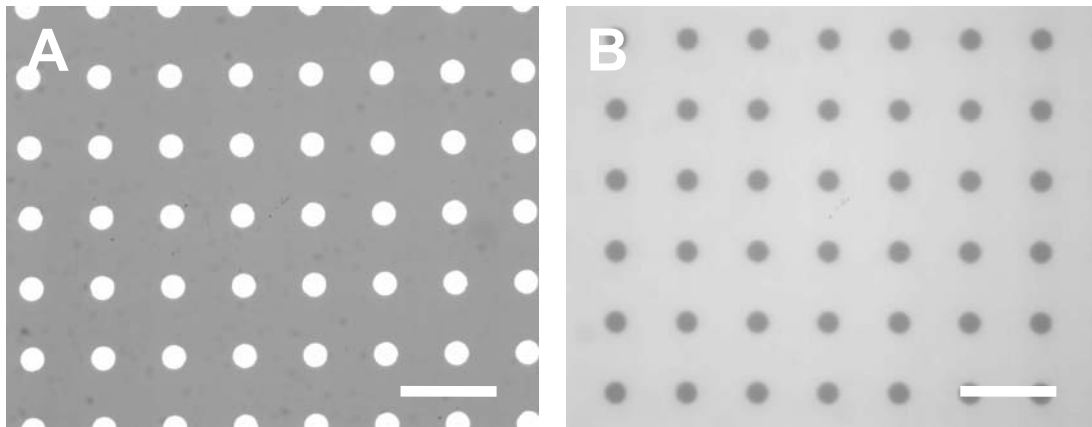


Abbildung 7: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von der durch Photolithographie hergestellten Chrommaske (A), und des mikrostrukturierten Deckgläschens (B), (Maßstabsbalken, $40\ \mu\text{m}$).

Durch durchlichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 7) konnten einerseits die durch die Chrommaske erhaltene mikrostrukturierte Oberfläche, andererseits eine homogene und fehlerfreie Anordnung der durch Photolithographie anhand der Chrommaske hergestellten Goldflächen auf den Deckgläschen gezeigt werden (vgl. Methoden 5.1.1 und 5.1.2). Die Goldflächen haben einen Durchmesser von exakt $10\ \mu\text{m}$, der Kantenabstand zwischen den einzelnen Goldflächen beträgt $20\ \mu\text{m}$ (Abbildung 7). Der Abstand der Goldpunkte von $20\ \mu\text{m}$ zueinander dient dazu, einen noch ausreichenden Abstand der Zellen zu gewährleisten, selbst wenn diese nicht optimal vereinzelt auf den Oberflächen vorliegen sollten. Zwischen diesen Zellen aufgespannte TNTs können aufgrund des noch vorhandenen Abstandes problemlos detektiert werden.

Im Folgenden werden die so hergestellten Oberflächen hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert.

6.1.1 Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskopie

Mittels rasterelektronenmikroskopischer Verfahren soll ein Gesamtüberblick über die mikrostrukturierte Oberfläche dargestellt werden. Dazu wird auf die zu untersuchenden Oberflächen eine 3 nm dicke Graphitschicht aufgedampft, um die für die Untersuchungen benötigte Leitfähigkeit der Proben zu erhalten. Anschließend werden die Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert (siehe Material 4.7).

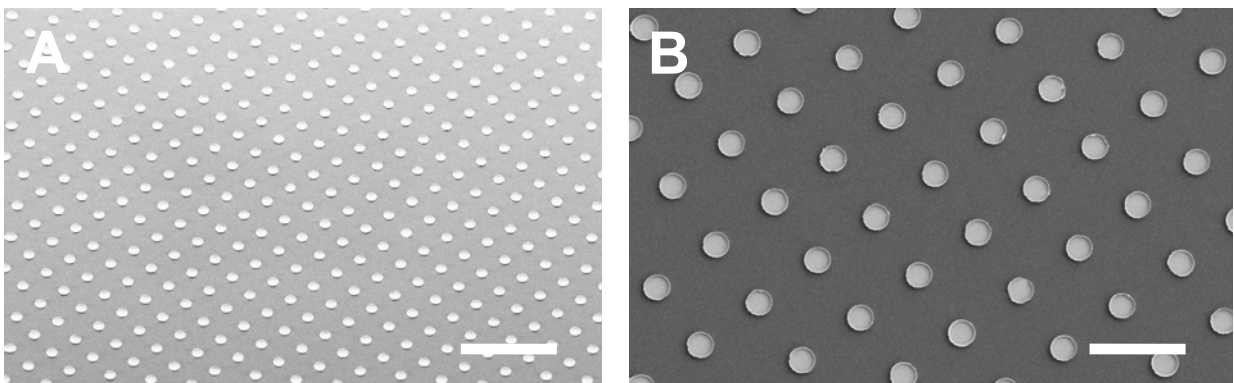


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines mikrostrukturierten Deckgläschens. (A): 45° Seitenansicht in 200x-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken, 120 µm). B zeigt die Aufsicht auf das Substrat bei 500x-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken, 40 µm).

Abbildung 8 A zeigt eine Übersicht über die μ -Struktur der Chrommaske, die als Schablone für die Herstellung aller Deckgläschen verwendet wird. Abbildung 8 B zeigt ein mit Hilfe dieser Chrommaske hergestelltes Deckgläschen.

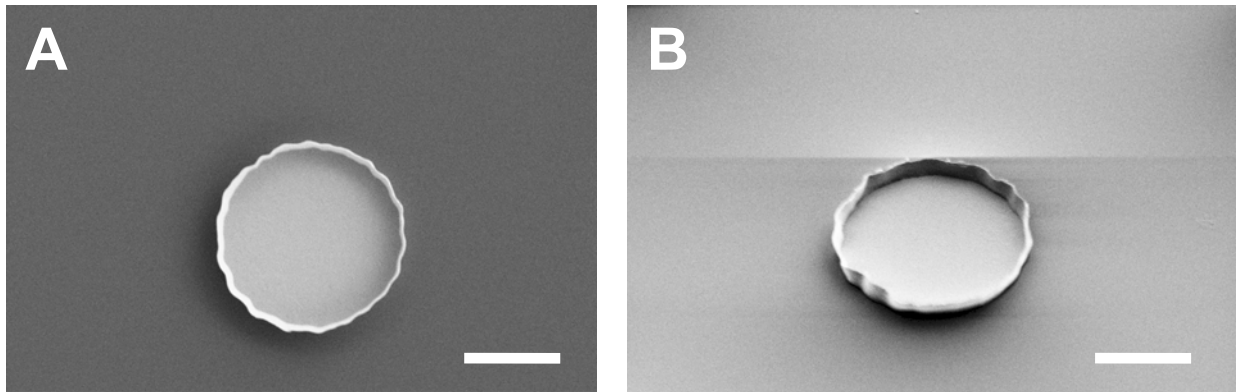


Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von μ -Goldschüsseln 3700x-fach vergrößert.

A: Aufsichtsbild der Goldschüssel, B: 45° Seitenansicht der Goldschüssel (Maßstabsbalken, 6 μm).

Durch eine höhere Vergrößerung, sowie einer gekippten Seitenansicht, zeigt sich, dass es sich bei den Goldflächen vielmehr um Goldschüsseln handelt (Abbildung 9 A und B). Der verbleibende Rand ist ein *Lift-off*-Effekt, hervorgerufen durch den negativen Kantenwinkel des *Photoresists* und des anschließenden *Sputter*-Prozesses mit Titan und Gold. Dieser Effekt findet positive Verwendung in der zusätzlichen Stabilisierung der rundlichen PC12-251 Zellen, die in den späteren Zellexperimente auf den Goldschüsseln immobilisiert werden.

6.1.2 Charakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie

Als weitere Methode, die mikrostrukturierten Oberflächen genauer zu charakterisieren, wurden rasterkraftmikroskopische Messungen durchgeführt. Hierbei rastert ein *Cantilever* die mikrostrukturierte Oberfläche ab (siehe Methoden 5.4.3). Die Auslenkung des *Cantilevers* wird von einem Laserstrahl erfasst, dessen Reflexionen von einem Photodetektor. Dieser wandelt die Informationen schließlich in ein Bild um, wobei die Oberflächen in wässriger Lösung im intermittierenden Modus gescannt (Methoden 5.4.3) werden. Diese Technik ermöglicht eine einheitliche Oberflächenabbildung der mikrostrukturierten Deckgläschen.

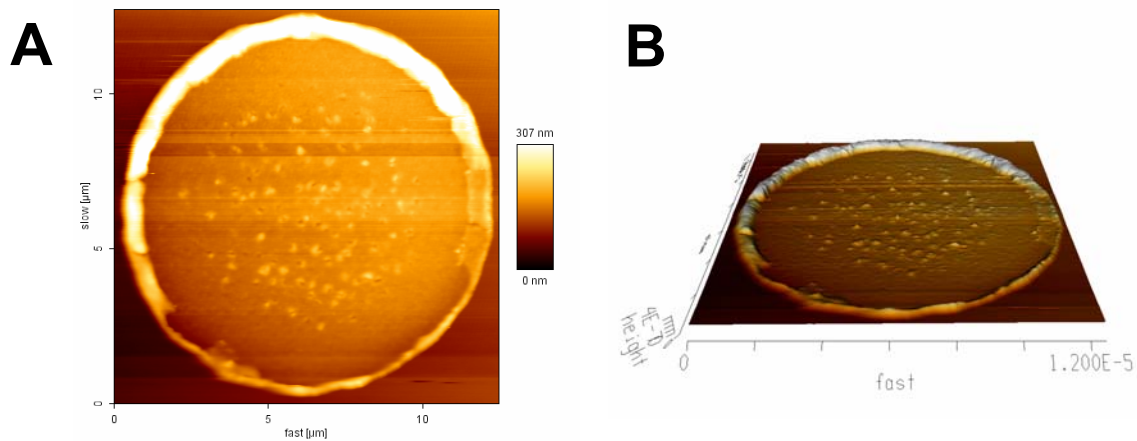


Abbildung 10: Oberflächenabbildung einer μ -Goldschüssel mittels Rasterkraftmikroskopie. A: Aufsichtsbild der Goldschüssel, B: Seitenansicht (Neigungswinkel 45°) einer Goldschüssel.

Abbildung 10 zeigt die Darstellung einer Goldschüssel auf einem Deckgläschen in Aufsicht (A) und in Seitenansicht (B). Die sich in Bild A rechts befindende Farbskala gibt Aussage über die Höhe der gescannten Probe. Je heller bestimmte Areale der Probe sind, desto höher sind diese. Der bereits in Abschnitt 6.1.1 beschriebene Rand der Goldflächen ist hier ebenfalls deutlich zu erkennen.

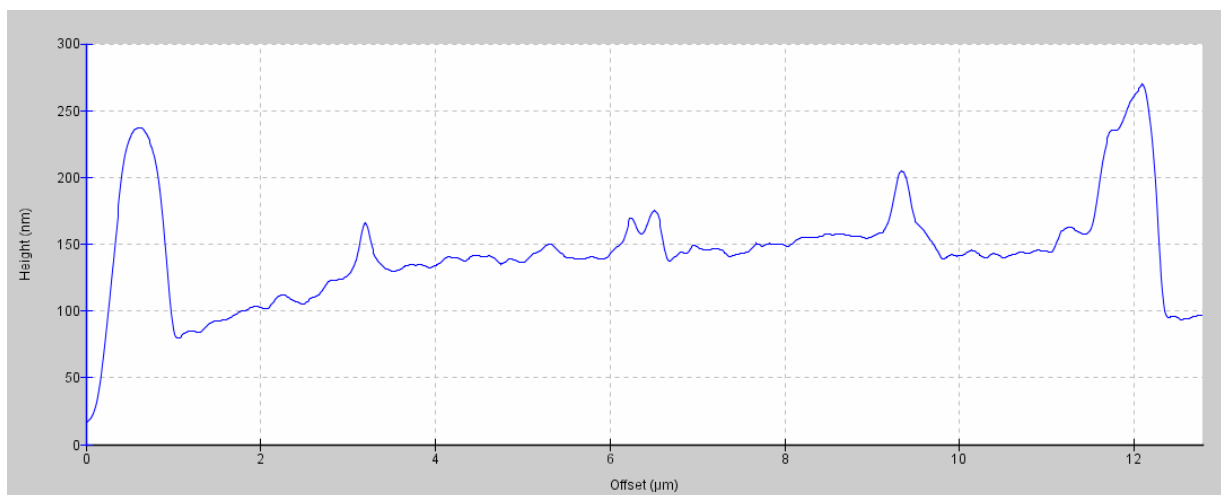


Abbildung 11: Höhenprofil einer μ -Goldschüssel.

Die Darstellung eines Höhenprofils (Abbildung 11) zeigt unterschiedliche Höhen der gescannten Goldschüssel im Querschnitt. Die beschriebenen Ränder haben eine Höhe von ungefähr 150 nm, die Grundhöhe der Goldschüssel beträgt 50 nm. Der Rand hebt sich folglich 100 nm über die Grundfläche des Goldes ab.

Die mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie charakterisierten Oberflächen werden nun mit Liganden biofunktionalisiert, um später als Substrate für eukaryotische Zellsysteme verwendet werden zu können.

6.1.3 Nachweis der Ligandenanbindung mittels QCM-Messungen

Nach der Charakterisierung der mikrostrukturierten Oberflächen wird durch QCM-Messungen (Quarzkristall-Mikrowaage: *Quartz-Crystal-Microbalance*) die Frage nach der Anbindung unterschiedlicher Liganden zur Biofunktionalisierung der Strukturen beantwortet. Im Zuge der nachfolgenden Experimente soll geklärt werden, ob die für die Biofunktionalisierung der Substrate ausgewählten Liganden kovalent an Gold anbinden, an die freien Glasflächen zwischen den Goldschüsseln jedoch nicht. Hierzu werden zwei Quarzkristalle verwendet, wobei der eine mit SiO₂, der andere mit Au beschichtet ist, was den Glas- bzw. Goldstrukturen der mikrostrukturierten Oberflächen entspricht. Zur Biofunktionalisierung der Goldflächen kommen als Liganden sowohl Alkanthiole, die 11-Mercaptoundecansäure oder das 10-Aminodecan-1-thiol, als auch das IKVAV-Peptid in Frage. Das IKVAV-Peptid ist eine Zell-Bindungs-Domäne der A-Kette von Laminin [64], die Zelladhäsion und neuronales Zellwachstum vermittelt [65]. Es enthält die IKVAV-Zell-Bindungs-Domäne und entspricht dem Bereich 2091-2108 der Laminin A Kette [66]. Es weist zusätzlich ein N-terminales Cystein auf. Diese Liganden werden nun in unterschiedlichen Experimenten in die Reaktionskammern, in welchen die unterschiedlich beschichteten Kristalle eingespannt sind, eingespült (Methoden 5.1.4). Die Adsorption eines Liganden an einen Kristall verursacht eine Massenänderung auf dem Kristall, was eine Frequenzänderung der Schwingung des Kristalls bedingt. Diese Frequenzänderung kann in einem zeitlichen Verlauf verfolgt werden. Das Einspülen des Puffers, in dem die jeweiligen Liganden gelöst sind, zeigt anhand der aufgezeichneten Kurve der Frequenzänderung, ob sich die adsorbierten Liganden von der Kristalloberfläche ablösen lassen und gibt so Ausschluss über die Bindungsstärke des Liganden.

In den nachfolgenden Schaubildern wird das Adsorptionsvermögen der unterschiedlichen Liganden auf den mit Glas oder Gold beschichteten Kristallen dargestellt.

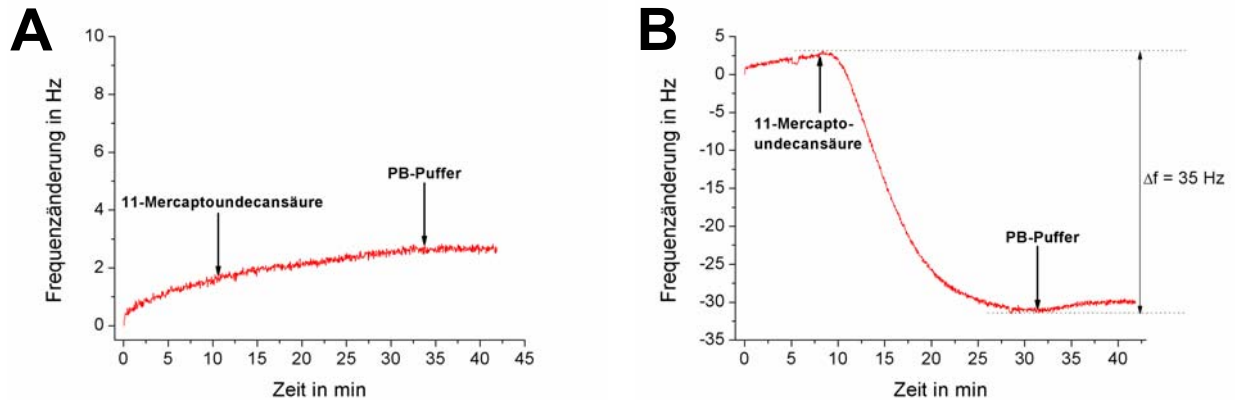


Abbildung 12: Bild A zeigt das Schaubild zur Frequenzänderung von 11-Mercaptoundecansäure auf SiO₂-Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von 11-Mercaptoundecansäure auf Au-Kristall.

Abbildung 12 zeigt deutlich, dass die 11-Mercaptoundecansäure nicht unspezifisch an Glas adsorbiert (A), da keine Frequenzänderung gezeigt werden konnte. Der leichte Drift der Kurve resultiert aus der Messeigenschaft des verwendeten Kristalls.

Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der 11-Mercaptoundecansäure und somit die kovalente Bindung an den Goldkristall eine drastische Abnahme der Schwingungsfrequenz bewirkt (B). Das Einspülen von PB-Puffer erzeugt keine Frequenzänderung. Die 11-Mercaptoundecansäure bleibt folglich kovalent an dem Goldkristall gebunden und lässt sich nicht durch den PB-Puffer abspülen. Die Frequenzänderung beträgt 35 Hz, was auf eine Schichtdicke von 7 nm schließen lässt (5 Hz entsprechen ca. 1 nm). Diese Schichtdicke lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine Multilage des Liganden auf der Oberfläche handelt.

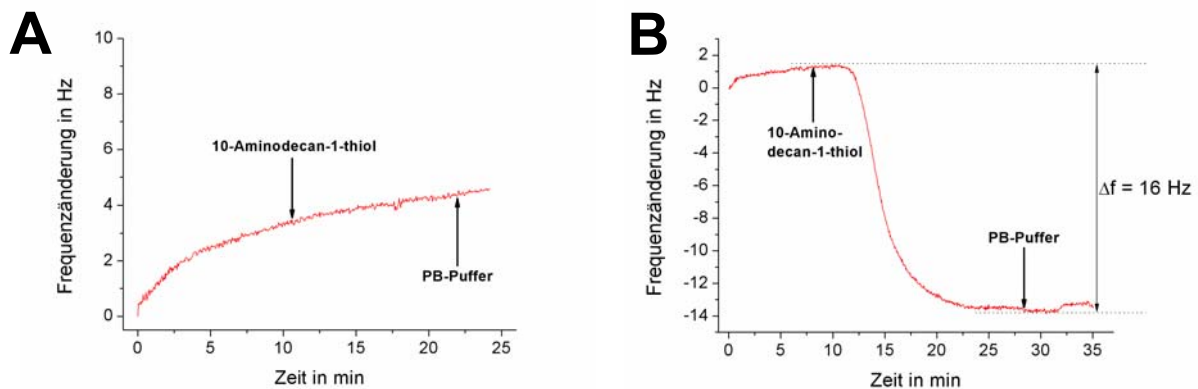


Abbildung 13: Bild A zeigt Schaubild der Frequenzänderung von 10-Aminodecan-1-thiol auf SiO_2 -Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von 10-Aminodecan-1-thiol auf Au-Kristall.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Messungen mit dem zweiten Liganden, dem 10-Aminodecan-1-thiol. Dieser Ligand adsorbiert ebenfalls nicht unspezifisch an den SiO_2 -Kristall (A). Der angezeigte Drift der Kurve resultiert auch hier aus den Messeigenschaften des verwendeten Kristalls. Im Gegensatz dazu ist auch hier eine kovalente Bindung an den Goldkristall zu beobachten (B), die auch durch das Einspülen des PB-Puffers nicht reversibel ist. Die Frequenzänderung beträgt hier 16 Hz, die errechnete Schichtdicke 3.2 nm, was auf eine Monolage des Liganden hindeutet.

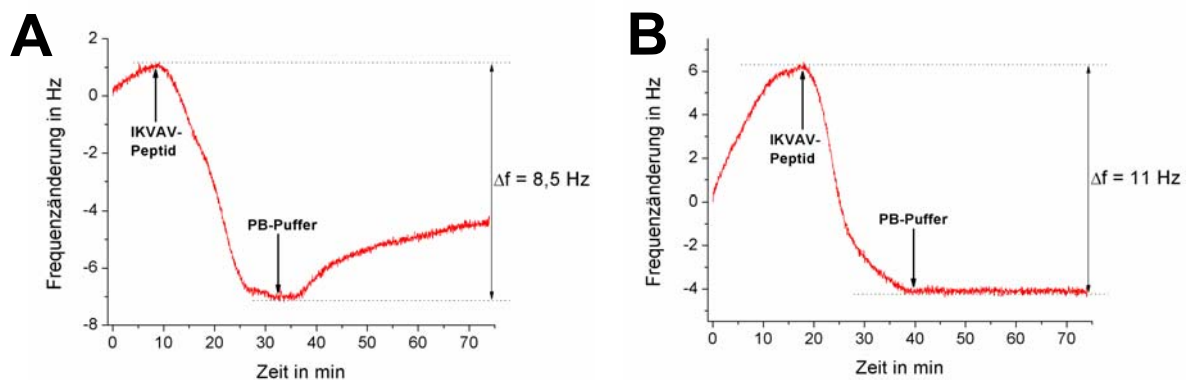


Abbildung 14: Bild A zeigt das Schaubild der Frequenzänderung von IKVAV-Peptid auf SiO_2 -Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von IKVAV-Peptid auf Au-Kristall.

Die Messungen zum dritten Liganden, dem IKVAV-Peptid (Abbildung 14), zeigen, dass das IKVAV-Peptid zunächst an die Oberfläche des SiO_2 -Kristalls anbindet, jedoch nach Zugabe des PB-Puffers im Laufe der Zeit wieder von der

Oberfläche gewaschen wird (A). Im Fall der Physisorption des IKVAV-Peptids an die Glasoberfläche kann bei einer Frequenzänderung von 8.5 Hz eine Schichtdicke von 1.7 nm berechnet werden. Die Monolage löst sich jedoch im Laufe der Zeit von der Glasoberfläche ab, da die Anbindung reversibel ist. Bild B beschreibt das Anbinden des IKVAV-Peptids an die Goldoberfläche des zweiten Kristalls. Im Gegensatz zur Anbindung an die Glasoberfläche ist diese Bindung irreversibel; das Einspülen von PB-Puffer führt hier nicht zu einem Ablösen des Liganden. Die Anbindung an Gold erfolgt also kovalent. Die hier errechnete Schichtdicke beträgt 2.2 nm (Frequenzänderung: 11 Hz).

Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Liganden aufgrund ihrer Thiolgruppe kovalent an die Goldoberfläche des Kristalls anbinden und somit auch an die Goldschüsseln der mikrostrukturierten Oberfläche. Eine Physisorption an Glas ist, wenn vorhanden, stets reversibel, das heißt die Liganden werden durch den PB-Puffer abgespült. Aus diesem Grund sind prinzipiell alle drei Liganden zur selektiven Biofunktionalisierung der mikrostrukturierten Oberflächen geeignet.

In den folgenden Zellexperimenten werden die drei unterschiedlichen Liganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Zellen vereinzelt auf den durch sie biofunktionalisierten Goldflächen zu immobilisieren, getestet.

6.2 Experimente mit Zellen der Zelllinie PC12-251 auf biofunktionalisierten Oberflächen

Nachdem in den vorausgegangenen Experimenten gezeigt wurde, dass alle zur Verfügung stehenden Liganden zur selektiven Biofunktionalisierung der Zellen herangezogen werden können, wird nun die Fähigkeit der einzelnen Liganden untersucht, Zellen vereinzelt auf den funktionalisierten Goldflächen zu immobilisieren. Dazu werden zunächst PC12-251 Zellen der Passagen 13 bis 16 verwendet. Die

biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberflächen werden dabei parallel als standardisierte Plattformen zur Analyse von Tunneling Nanotubes (TNTs) verwendet. Diese Membrankanäle sind zwischen einzelnen Zellen aufgespannt und sind vermutlich an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Da die Zellen durch die Goldflächen auf den mikrostrukturierten Oberflächen separiert immobilisiert werden, soll die Detektion von TNTs durch die Verwendung der mikrostrukturierten Oberflächen entscheidend erleichtert werden.

Anmerkung zur statistischen Auswertung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Zellversuche wird stets das Verhältnis von der Gesamtzahl TNTs zur Gesamtzahl von Zellen eines definierten Bereiches in Prozent angegeben. Bei diesem Verhältnis ist zu beachten, dass nicht immer der Fall eintritt, dass nur ein TNT zwischen zwei Zellen zu finden ist (Abbildung 15, A). Es besteht auch die Möglichkeit, dass keine oder mehrere TNTs zwischen den Zellen zu beobachten sind (Abbildung 15, B).

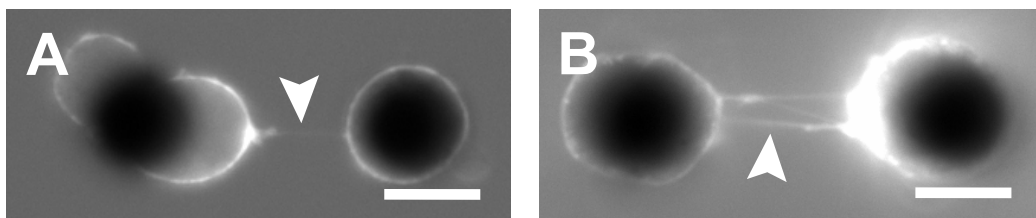


Abbildung 15: A: Fluoreszenzbild WGA-gefärbter PC12-251 Zellen auf einer biofunktionalisierter Oberfläche, die durch ein TNT miteinander verbunden sind (weiße Pfeilspitze). B: Fluoreszenzbild WGA-gefärbter PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche, die durch mehrere TNTs miteinander verbunden sind (weiße Pfeilspitze), (Maßstabsbalken je 10 μm).

6.2.1 Zellvereinzelung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen

In Abschnitt 6.1.3 konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Liganden zur Biofunktionalisierung der mikrostrukturierten Oberflächen prinzipiell verwendet werden können. Diese werden im Folgenden in Bezug auf optimale Zellvereinzelung und Affinität der Zellen zu den funktionalisierten Goldflächen untersucht. Dazu wurden zunächst PC12-251 Zellen vor dem Ausplattieren auf die mit den unterschiedlichen Liganden funktionalisierten mikrostrukturierten Oberflächen aufgrund ihrer Neigung zur Clusterbildung stets durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine Pasteurpipette vereinzelt, um das starke Verklumpen der Zellen zu verhindern. Die Zellen werden für die jeweiligen Experimente eine Stunde auf den funktionalisierten Oberflächen inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben findet nach dieser Inkubationszeit die Analyse der Zellvereinzelung und der Affinität der Zellen zu den funktionalisierten Goldflächen mittels Durchlicht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie statt.

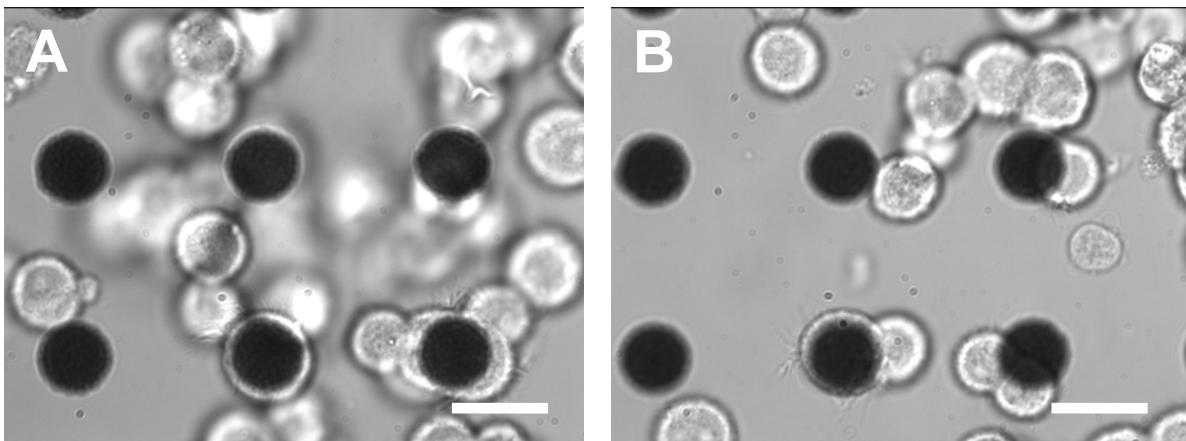


Abbildung 16: Die Durchlichtbilder A und B zeigen die Anordnung von PC12-251 Zellen auf mit 10-Aminodecan-1-thiol biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 μm).

Abbildung 16 zeigt PC12-251 Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen, die mit 10-Aminodecan-1-thiol als Linker funktionalisiert wurden. Hierbei ist eine gewisse Affinität der Zellen zu den funktionalisierten Goldflächen zu erkennen, wenngleich die Zellen sehr stark verklumpt und zum Teil in mehreren Ebenen vorliegen.

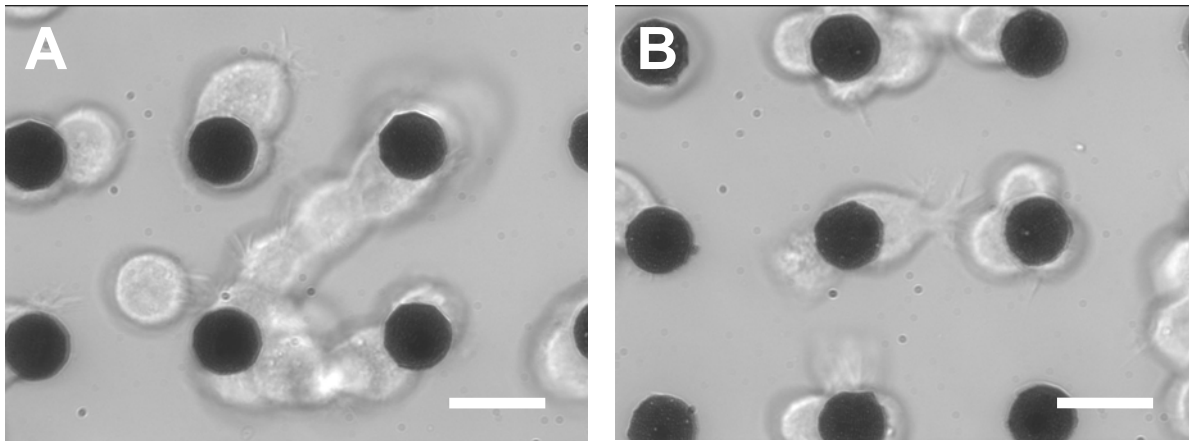


Abbildung 17: Die Durchlichtbilder A und B zeigen PC12-251 Zellen auf mit 11-Mercapto-undecansäure biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 μm).

In Abbildung 17 sind Zellen auf mit 11-Mercapto-undecansäure funktionalisierten Substraten abgebildet. Dieser Ligand zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, die Affinität der Zellen zu den Goldflächen deutlich zu verbessern. Jedoch weisen die Zellen auf der Oberfläche immer noch eine starke Clusterbildung auf.

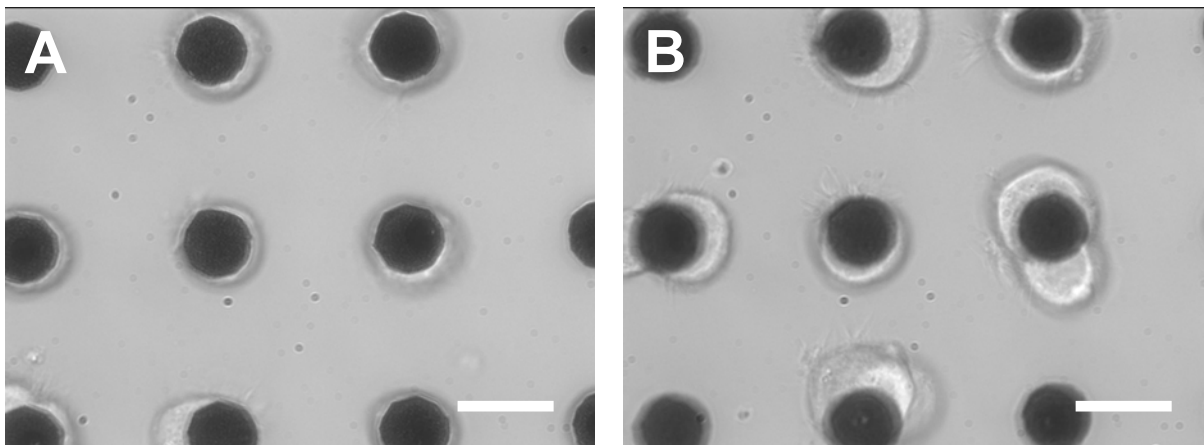


Abbildung 18: Die Durchlichtaufnahmen A und B zeigen vereinzelte PC12-251 Zellen auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 μm).

Die Ergebnisse der Funktionalisierung der mikrostrukturierten Oberflächen mit dem IKVAV-Peptid zeigen, dass sich mit diesem eine optimale Zellvereinzelnung und Affinität zu den funktionalisierten Goldflächen erzielen lässt [67]. Sowohl auf den Durchlichtaufnahmen (Abbildung 18, Bild A und B), als auch auf der Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 19) der PC12-251 Zellen ist zu erkennen, dass in fast allen Fällen jeweils nur eine Zelle auf einer Goldfläche immobilisiert ist [68].

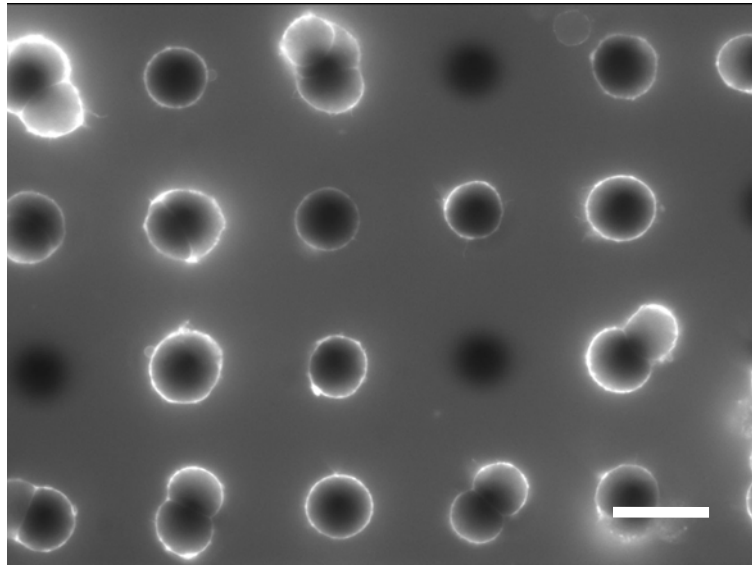


Abbildung 19: Fluoreszenzbild von PC12-251 Zellen (WGA 488) auf einer IKVAV-biofunktionalisierten Oberfläche (Maßstabsbalken, 20 μm).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PC12-251 Zellen auf den mit IKVAV biofunktionalisierten Oberflächen bestätigen ebenfalls die gute Zellvereinzelung und Affinität zu den Goldflächen (Abbildung 20, Bild A und B).

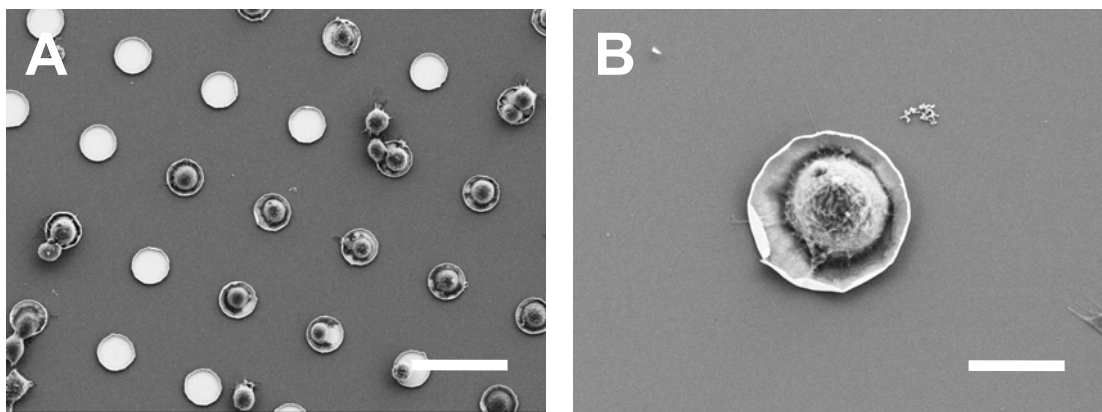


Abbildung 20: A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Anordnung von PC12-251 Zellen auf einer IKVAV-funktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche 720x-fach (Maßstabsbalken, 30 μm). B: REM-Aufnahme der Affinität einer PC12-251 Zelle zu einer IKVAV-funktionalisierten μ -Goldschüssel 3200x-fach (Maßstabsbalken, 6 μm).

Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von PC12-251 Zellen ausplattiert auf Glas, mit Poly-L-Lysin (PLL) gecoatet, und auf den mit IKVAV biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberflächen verdeutlicht nochmals die unterschiedliche

Vereinzelung der Zellen (Abbildung 21, Bild A und B), sowie die wesentlich erleichterte Detektion der TNTs zwischen den Zellen auf dem Plattformsystem (Abbildung 21, Bild B). Dazu wurden die Zellen 2h auf einer PLL-beschichteten Glasoberfläche, sowie auf einer IKVAV-biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche kultiviert. Es zeigte sich, dass die Zellen in Clustern auf der PLL-beschichteten Glasoberfläche vorliegen (A). Diese Tatsache erschwert die TNT-Detektion erheblich, jedoch können vereinzelt TNTs visualisiert werden (weiße Pfeilspitzen). Auf der IKVAV-biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche hingegen liegen die Zellen stark vereinzelt vor (B), was die TNT-Detektion wesentlich erleichtert (weiße Pfeilspitzen).

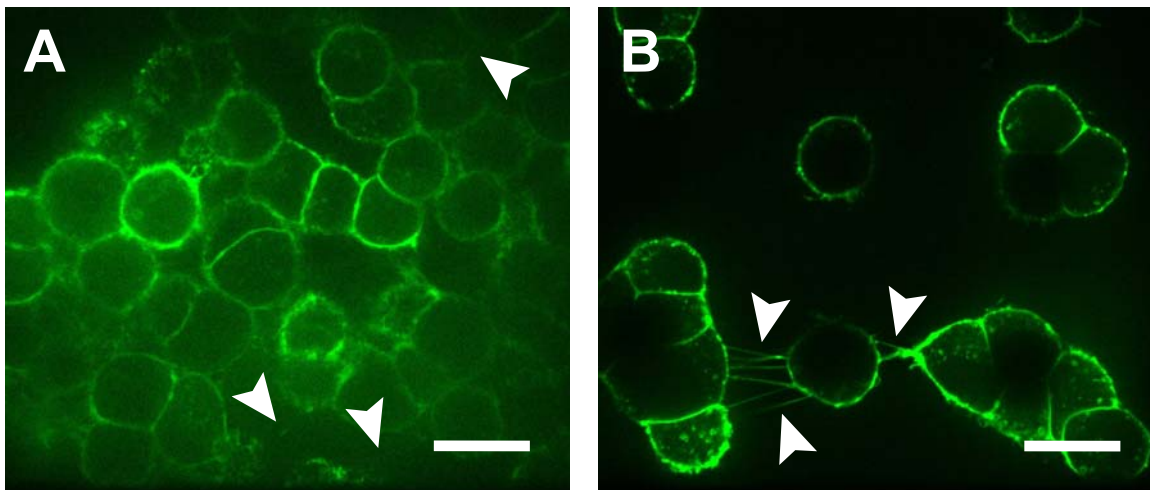


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PC12-251 Zellen auf einer PLL-beschichteten Glasoberfläche (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PC12-251 Zellen 2h auf einer IKVAV-biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche (B) (Maßstabsbalken je 20 μm).

Durch eine Auswertung der TNT-Zahlen in beiden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Zahl der detektierten TNTs auf Glas und auf den mikrostrukturierten Oberflächen keinen signifikanten Unterschied zeigt (Abbildung 22).

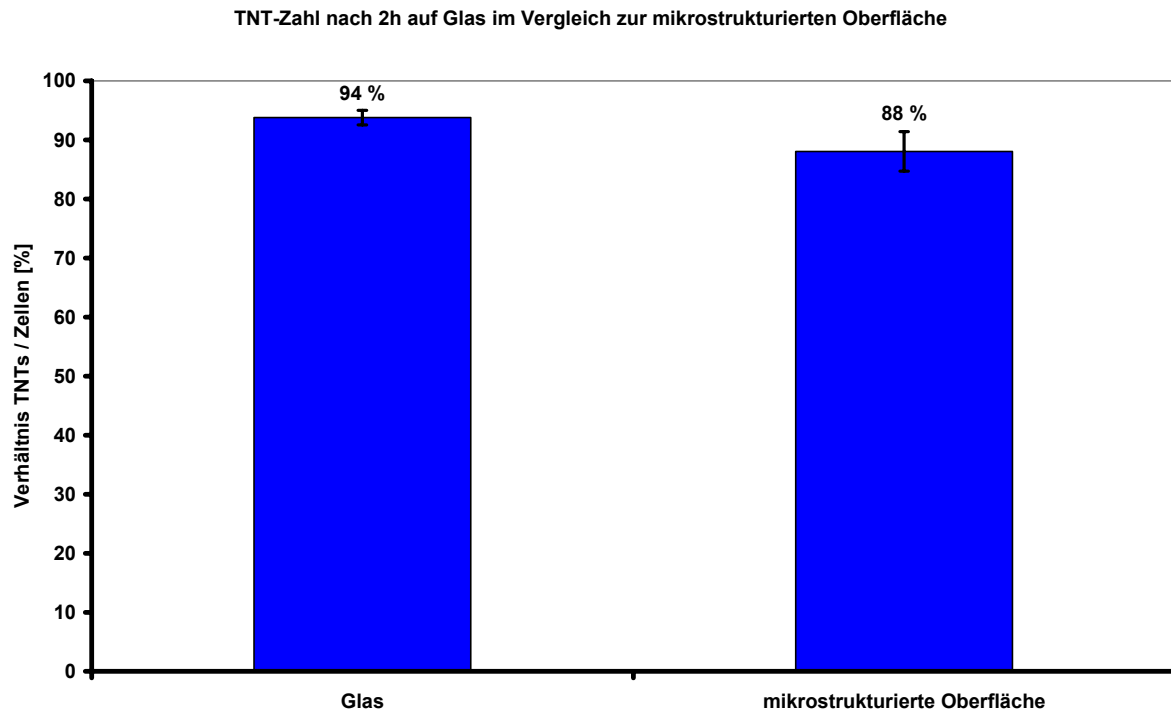


Abbildung 22: Vergleich des Verhältnisses von TNTs zu Zellen auf Glas und mikrostrukturierter Oberfläche.

Zusammen genommen zeigen die Ergebnisse, dass das IKVAV-Peptid als Ligand in Bezug auf die Zellvereinzelung und Affinität zu den durch ihn funktionalisierten Goldflächen bei PC12-251 Zellen am besten geeignet ist [68] und keinen Unterschied bei der Ausbildung von TNTs bedingt. In den nachfolgenden Experimenten mit PC12-251 Zellen werden daher alle mikrostrukturierten Oberflächen mit dem IKVAV-Peptid biofunktionalisiert.

6.2.2 Analyse der TNTs durch Fluoreszenz- und Rasterelektronen-Mikroskopie

Um TNTs, bzw. TNT-basierte Netzwerke zwischen den durch die mikrostrukturierten Oberflächen vereinzelt PC12-251 Zellen zu visualisieren, werden sowohl Fluoreszenz-, als auch Rasterelektronenmikroskopie angewendet. Dazu werden die Zellen zunächst auf den IKVAV-funktionalisierten Mikrostrukturen

ausplattiert. Anschließend werden die TNTs 1 bis 3 Stunden nach dem Ausplattieren detektiert. Im Falle der Fluoreszenzmikroskopie werden die Zellmembranen und damit die TNTs vor der Analyse mit dem *in vivo* Farbstoff WGA 488 angefärbt.

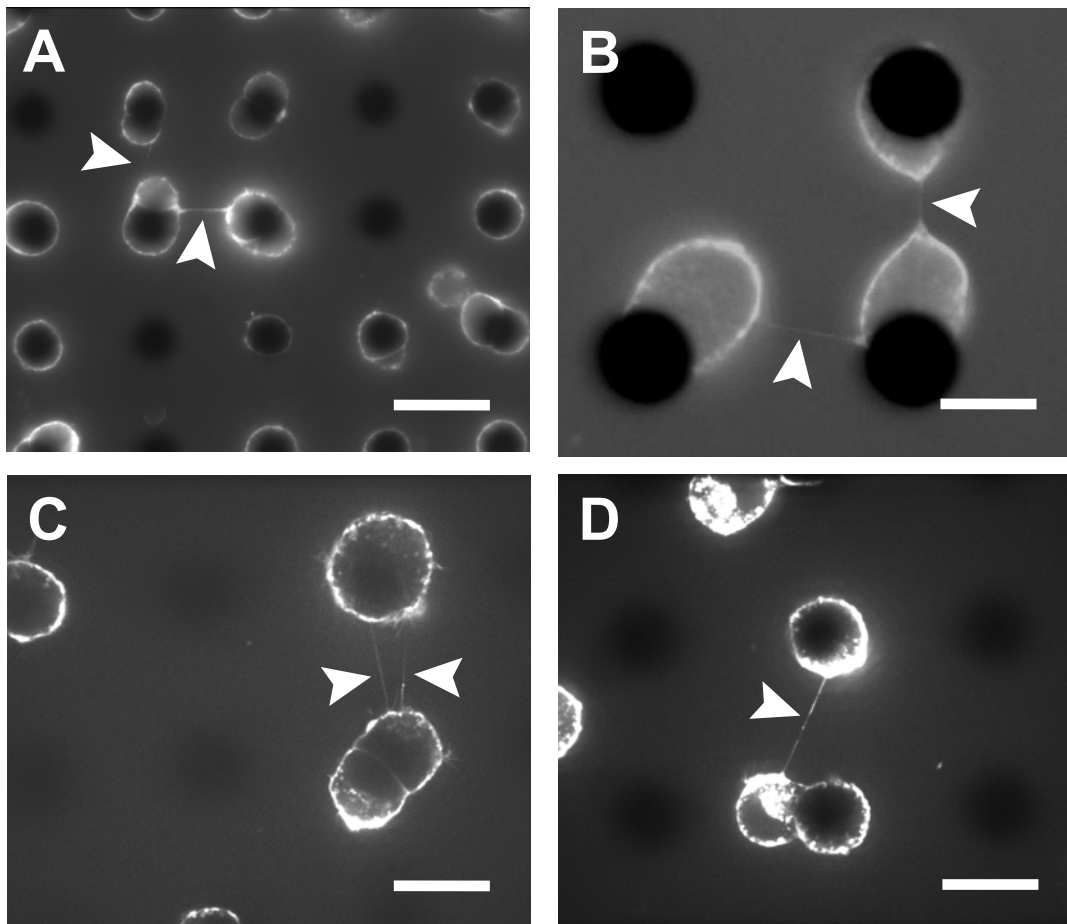


Abbildung 23: A: Visualisierung von TNTs (weiße Pfeilspitzen) zwischen PC12-251 Zellen (Maßstabsbalken, 30 μm). B: Ausbildung eines TNT-Netzwerkes (weiße Pfeilspitzen) zwischen PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche (Maßstabsbalken, 10 μm). C: Mehrfach-TNTs (weiße Pfeilspitzen) aufgespannt zwischen zwei PC12-251 Zellen. D: Zwei PC12-251 Zellen, die durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) miteinander verbunden sind (Maßstabsbalken je 20 μm).

Abbildung 23 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von TNTs und TNT-Netzwerken, die zwischen PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen ausgebildet werden (A, B, C, D). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die TNT-Bildung am höchsten 1 bis 2 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen ist [69]. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die meisten TNTs innerhalb der ersten 2 Stunden nach dem Ausplattieren gebildet

werden. Nach diesen ersten 2 Stunden nimmt die TNT-Bildung stetig ab. Neben einzelnen TNTs (Bild A und D) konnten auch mehrfach-TNTs zwischen vereinzelt PC12-251 Zellen detektiert werden (Bild C). Hierbei ist jedoch unklar, ob die TNT-Bildung nur von einer Zelle ausging, oder ob TNTs von beiden Zellen gebildet wurden. Bild B zeigt ein TNT-Netzwerk zwischen vereinzelt Zellen. Auch hier bleibt die Frage unbeantwortet, von welchen Zellen die Bildung der TNTs ausging. Auf den Bildern C und D ist zu erkennen, dass einzelne Bereiche eines TNTs deutlich heller erscheinen. Dies liegt zum einen daran, dass TNTs parallel zur mikroskopischen Ebene aufgespannt sind [32], was ihr Auffinden zudem erschwert. Die heller erscheinenden Bereiche können zum anderen auch aus Membranausstülpungen, die an dieser Stelle lokalisiert sind, resultieren.

In der Folge wurden die zwischen den Zellen ausgebildeten TNTs auf den Oberflächen auch durch Rasterelektronenmikroskopie dargestellt. Dazu wurden die Proben 2 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen in einer 3.7 % Glutaraldehyd-Lösung fixiert, Kritisch-Punkt getrocknet und mit einer Graphitschicht versehen.

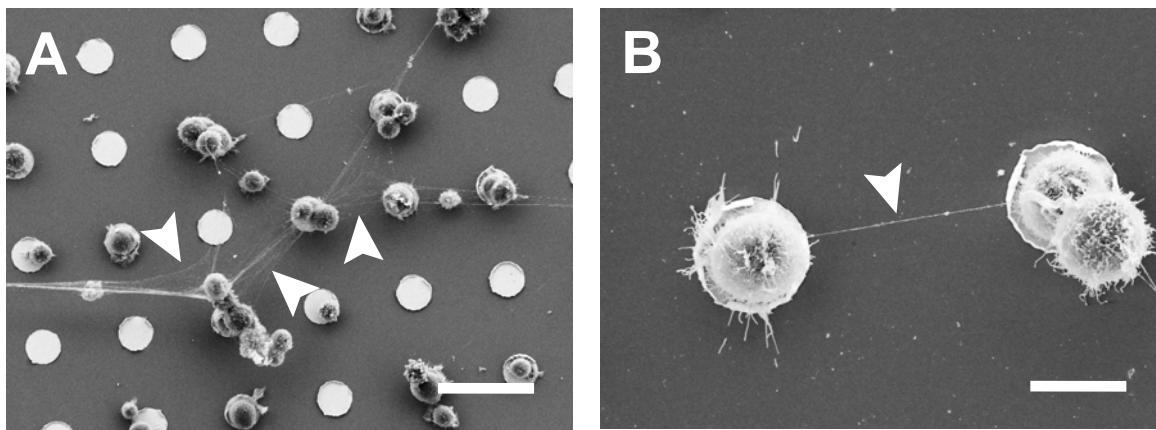


Abbildung 24: A: Übersichtsaufnahme von PC12-251 Zellen, die durch ausgebildete TNT-Netzwerke (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind 680x-fach (Maßstabsbalken, 30 μm). B: Detailaufnahme zweier durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbundener PC12-251 Zellen 2300x-fach (Maßstabsbalken, 10 μm).

Abbildung 24 Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme der Zellen auf der Mikrostruktur. Einzelne Zellen sind durch ausgebildete TNT-Netzwerke auf der Oberfläche miteinander verbunden. Bild B zeigt in einer höheren Auflösung zwei Zellen auf den funktionalisierten Goldflächen, die durch ein TNT miteinander verbunden sind. Hier sind erneut heller erscheinende, verdickte Bereiche des TNTs zu erkennen, was in diesem Fall auf eine Membranausstülpung an dieser Stelle hindeuten könnte. Der aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der PC12-251 Zellen ermittelte Durchmesser der TNTs liegt zwischen 35 und 240 nm. Ermittelt man den Durchmesser eines TNTs an den verdickten Stellen, so beträgt der Durchmesser bis zu 1 μm (Daten nicht gezeigt). Da auf den mikrostrukturierten Oberflächen die Zellen über größere Distanzen separiert werden (vgl. Abbildung 24), können im folgenden Abschnitt TNTs und deren Längenvariation analysiert werden.

6.2.3 Analyse der Längenverteilung und Höhendifferenz von TNTs auf mikrostrukturierten Oberflächen

Nach der erfolgreichen Visualisierung von TNTs wird im Folgenden die Länge der TNTs analysiert, um zu sehen, ob und wenn welche Unterschiede zu den detektierten TNT-Längen auf nicht-mikrostrukturierten Oberflächen vorhanden sind. Dazu wurden die TNTs eine Stunde nach dem Ausplattieren der Zellen auf den Mikrostrukturen visualisiert. Dies zeigte, dass eine große Varianz der TNT-Längen auf den Mikrostrukturen detektiert werden konnte.

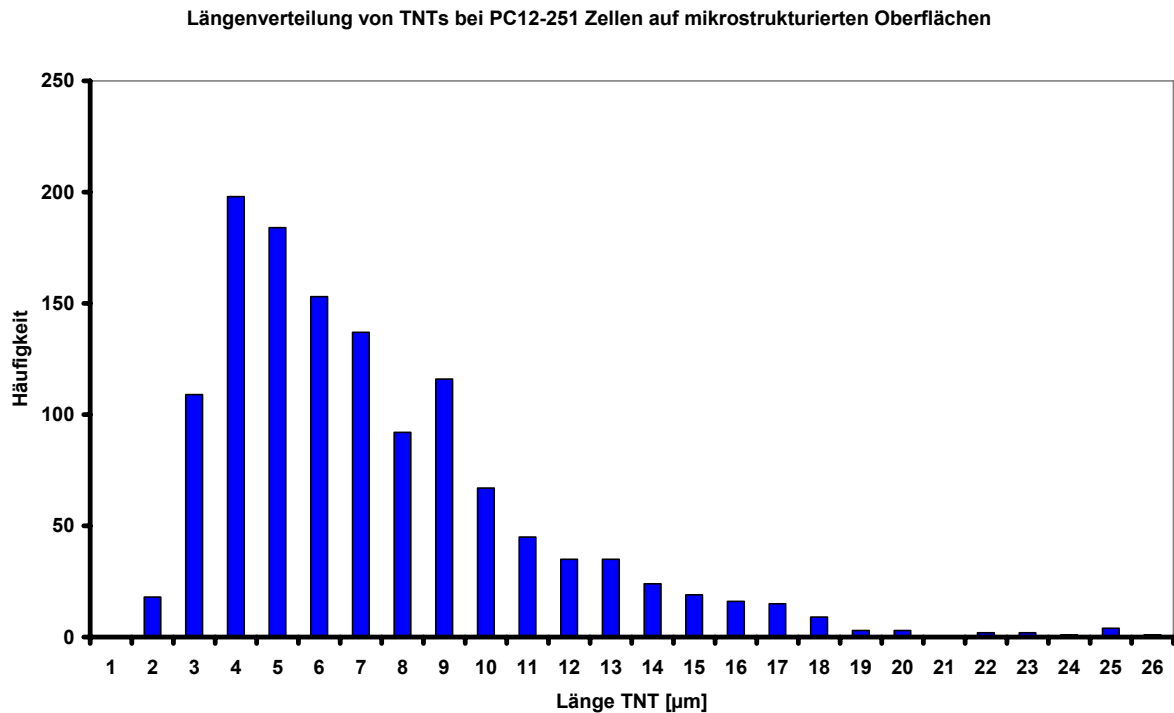


Abbildung 25: TNT-Längenverteilung bei PC12-251 Zellen der Passage 15 auf mikrostrukturierten Oberflächen.

Im obigen Schaubild (Abbildung 25) wird die unterschiedliche Längenverteilung von TNTs graphisch dargestellt. Dabei fällt auf, dass das Maximum der Längenhäufigkeit bei 4 μm liegt. Danach folgt ein stetiger Abfall der möglichen Längen. TNT-Längen von bis zu 26 μm sind möglich. Wie auch schon in vorigen Studien [32] wurden jedoch auch auf den mikrostrukturierten Oberflächen vereinzelt TNTs detektiert, die eine Länge von 26 μm überschritten. Diese TNTs überspannen demnach mehrere Zellen und bleiben offenbar auch über längere Distanzen stabil [70]. Das Maximum der Länge bei 4 μm lässt sich durch die Tatsache erklären, dass nicht jede Zelle immer zentriert auf der Goldfläche immobilisiert ist. Die Zellen können somit den von ursprünglich 20 μm festgelegten Abstand der Goldflächen auf bis zu 2 μm verkürzen (vgl. Abbildung 23, B).

Da TNTs meist nicht in einer Ebene zwischen den Zellen aufgespannt sind [32], wurden aus diesem Grund auch die Höhendifferenzen der Ansatzpunkte eines TNTs zwischen zwei Zellen analysiert. Dazu wurden 40 (z)-Schnitte von den durch ein TNT verbundenen Zellen aufgenommen und die Höhendifferenzen der TNT-Ansatzpunkte daraus berechnet (siehe Methoden 5.4.1).

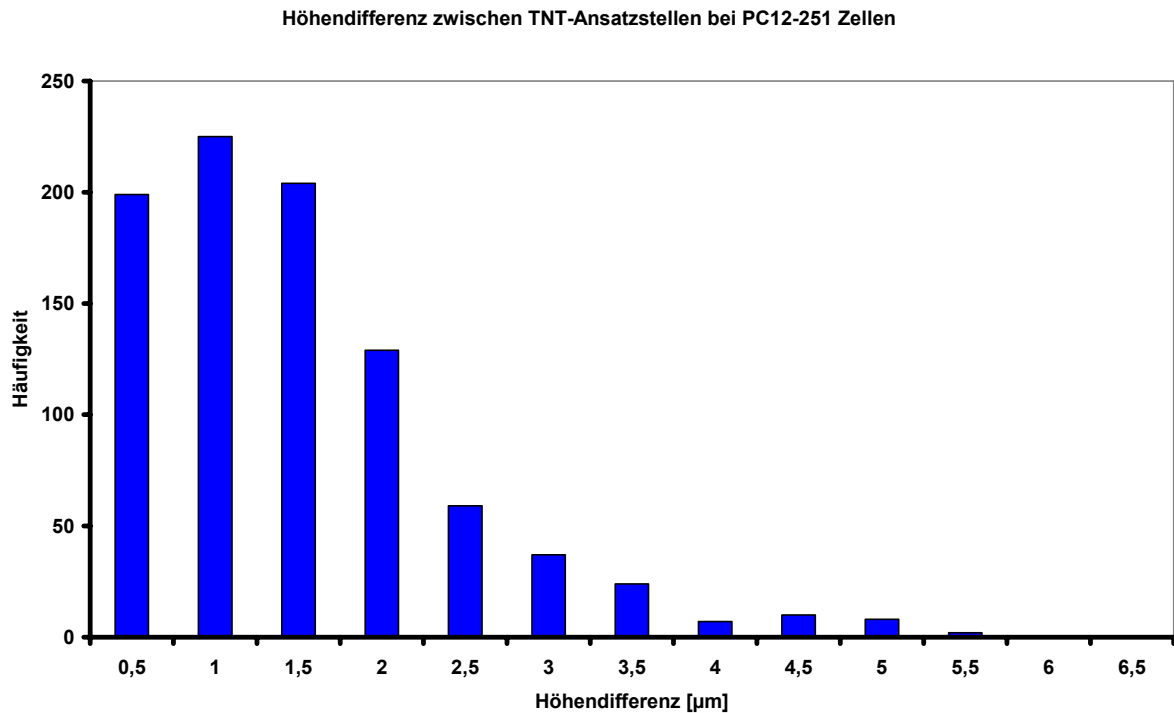


Abbildung 26: Verteilung der Höhendifferenz der TNT-Ansatzstellen bei PC12-251 Zellen der Passage 13 auf mikrostrukturierten Oberflächen.

Die Auswertungen ergaben ein Maximum der Höhendifferenz bei 1.5 μm , jedoch sind in sehr seltenen Fällen auch Höhendifferenzen der Ansatzpunkte von bis zu 5.5 μm möglich. Aufgrund der Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass die meisten TNTs nahezu parallel über der Oberfläche der mikrostrukturierten Deckgläschen aufgespannt sind.

6.2.4 TNT-Analysen mittels exprimierter Markerproteine

Ein weiterer Ansatz, TNTs besser detektieren zu können, ist die Transfektion der PC12-251 Zellen mit pEGFP-F, einem Markerprotein mit Farnesylanker, welches spezifisch in Plasmamembranen lokalisiert ist. Die Zellen wurden dazu 24 Stunden nach einer transienten Transfektion mit entsprechender cDNA (Methoden 5.2.4) auf die mikrostrukturierten Oberflächen ausplattiert, die Visualisierung erfolgte auch hier 1 Stunde nach dem Ausplattieren.

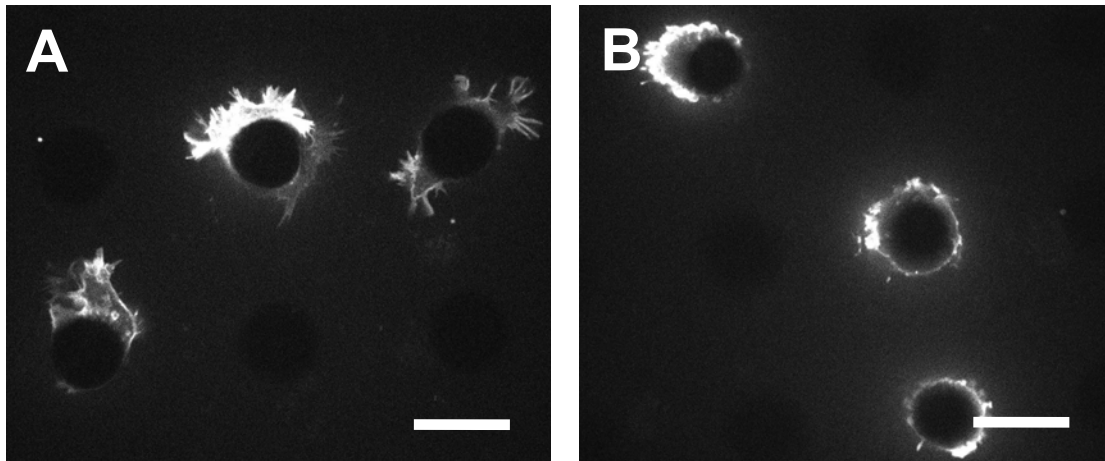


Abbildung 27: pEGFP-F transfizierte PC12-251 Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen (A und B), (Maßstabsbalken je 15 μm). Man beachte, dass zu keinem Zeitpunkt TNTs zwischen den Zellen detektiert werden konnten.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die PC12-251 Zellen mit einer Transfektionseffizienz von 55 % mit pEGFP-F transfiziert wurden. Die Analysen zeigen weiter, dass zwar Filopodien, jedoch keine TNTs beobachtet werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit, TNTs zu visualisieren, bestand in der Transfektion der PC12-251 Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten vesikulären Stomatitis Virus G (VSV-G) Protein. VSV-G ist als Transmembranprotein in der Plasmamembran lokalisiert, wo es aufgrund seiner fusogenen Eigenschaften [71,72,73] unter anderem für Zell-Zell Fusionen, sowie das *Virus-Budding* verantwortlich ist [74]. Aufgrund der Lokalisation und der fusogenen Eigenschaft des VSV-G Proteins sollten damit transfizierte PC12-251 Zellen prinzipiell auch in der Lage sein, mehr TNTs auszubilden.

Dazu werden die PC12-251 Zellen 24 Stunden nach der Transfektion auf die mikrostrukturierten Oberflächen ausplattiert, die TNT-Zahl wird eine Stunde nach Ausplattieren mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Zellen mit einer Transfektionseffizienz von 70 % mit VSV-G transfiziert werden konnten, zum anderen, dass zu keinem Zeitpunkt TNTs zwischen den transfizierten Zellen detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auffällig jedoch ist die geänderte Zellmorphologie der sonst eher abgerundeten PC12-251 Zellen.

Um diese Veränderungen näher zu untersuchen wird Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Dazu werden die Zellen Kritisch-Punkt getrocknet und mit einer Graphitschicht versehen. Hierbei konnte der Eindruck einer völlig veränderten Zellmorphologie bestätigt werden (Abbildung 28, A und B).

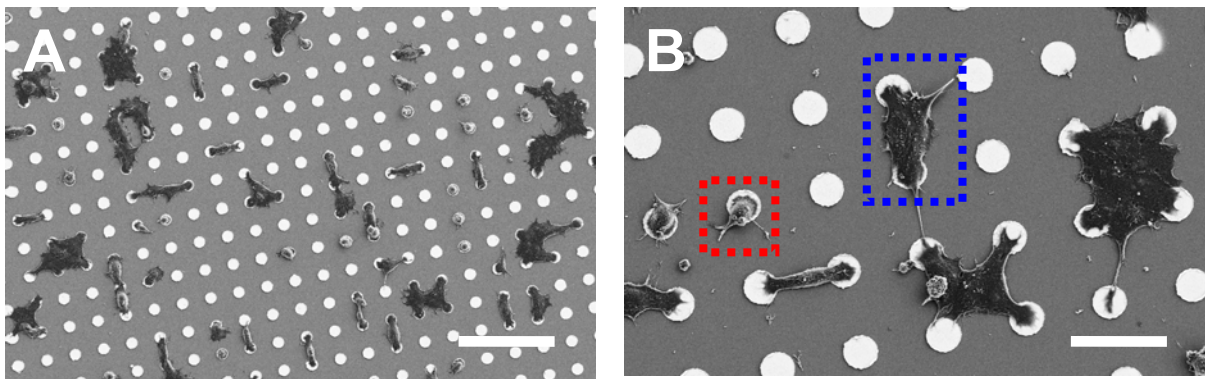


Abbildung 28: A: Übersichtsaufnahme VSV-G transfizierter PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche. Hierbei wird die strukturierte Anordnung der PC12-251 Zellen auf der Oberfläche besonders deutlich (200x-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μm). Bild B zeigt Details der morphologischen Veränderungen von Zellen, die VSV-G exprimieren (blaue Box) und nicht VSV-G exprimierende Zellen (rote Box) (Vergrößerung: 600x-fach, Maßstabsbalken 30 μm).

Die PC12-251 Zellen erscheinen nicht mehr abgerundet, sondern nehmen eine abgeflachte Morphologie an (Abbildung 28, B). Zusätzlich fällt auf, dass die Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen nur auf den mit IKVAV biofunktionalisierten Goldflächen immobilisiert sind. Durch ihre abgeflachte Morphologie überspannen sie dabei große Bereiche der dazwischen liegenden Glasfläche. Die Zellen sind auf den Mikrostrukturen ausgebreitet und lang gestreckt (blaues Kästchen). Sie nehmen nach der Transfektion eine eher Fibroblasten-artige Morphologie an. Dabei kann vermutet werden, dass das Zytoskelett der Zelle durch VSV-G eine Änderung erfährt, die für das Fibroblasten-artige Aussehen der Zellen verantwortlich ist. Zugleich sind die VSV-G-transfizierten Zellen viel größer als nicht transfizierte Zellen, was auf eine Zellfusion aufgrund der fusogenen Eigenschaft des VSV-G Proteins zurückzuführen sein könnte. Es sind jedoch auch vereinzelt PC12-251 Zellen zu sehen, die ihre Morphologie nicht verändert haben (B, rotes Kästchen). Diese Zellen stammen vermutlich aus nicht exprimierenden Zellpopulationen. Aufgrund der Ergebnisse bleibt der *in vivo* Farbstoff WGA 488 Mittel der Wahl für das Anfärben der Zellmembran und der TNTs.

6.2.5 Chemische Stimulation durch Fentons Reagenz und Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)

Die vorangegangenen Analysen zeigten, dass die mikrostrukturierten Oberflächen für die Analyse von TNTs hervorragend geeignet sind, bieten sie doch ein sehr gut reproduzierbares System für weitere Analysen. So soll nun untersucht werden, ob und in welcher Weise sich die TNT-Bildung durch chemische Stimulation beeinflussen lässt. Hierzu sollen im Besonderen zwei Reagenzien Verwendung finden, die die Plasmamembran gezielt beeinflussen.

6.2.5.1 Stimulation mit Fentons Reagenz

Um einen Einfluss von freien OH-Radikalen auf die Zellmembran von PC12-251 Zellen und damit auf die TNT-Bildung zu untersuchen, werden die Zellen mit dem Fentons Reagenz [56] stimuliert, einem Gemisch aus Eisen(II)sulfat und Wasserstoffperoxyd [40]. Die Zugabe einer 200 mM Fentons-Lösung zum Zellkulturmedium erfolgt eine Stunde nach dem Ausplattieren der Zellen auf den Mikrostrukturen. Nach einer Inkubationszeit von eine Stunde in Gegenwart des Reagenz wird die TNT-Anzahl analysiert. Die Auswirkung dieser freien OH-Radikale in Bezug auf die TNT-Bildung ist im Folgenden dargestellt.

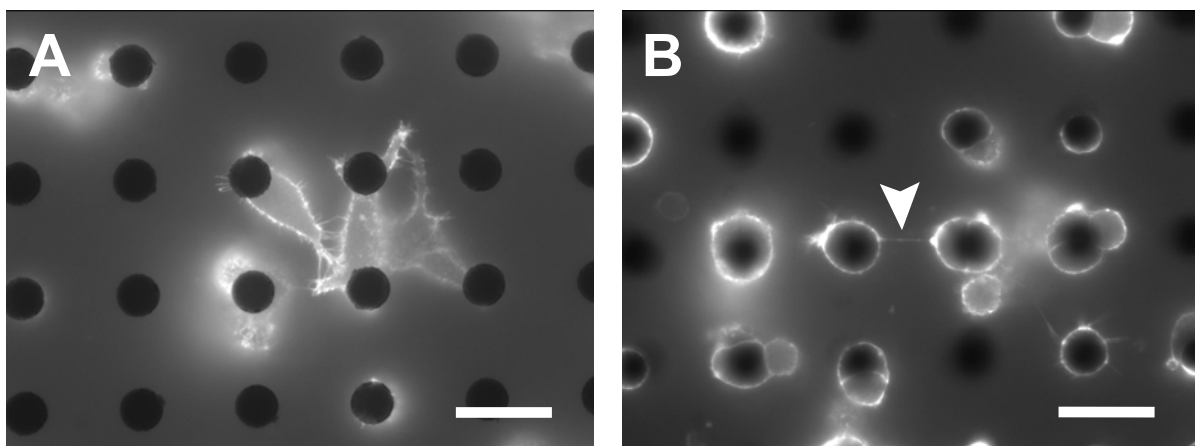


Abbildung 29: Fluoreszenzbilder von Fentons-stimulierten PC12-251 Zellen (WGA 488) auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen (A und B). Man beachte, dass die Zellmembranen eine deutlich fransige Struktur aufweisen. Vereinzelt können jedoch TNTs detektiert werden (B, Pfeilspitze), (Maßstabsbalken je 25 μ m).

Die Analysen zeigen, dass die freien OH-Radikale [55] vermutlich die Zellmembran der PC12-251 Zellen angreifen, was durch das leicht fransige Aussehen der Zellmembran deutlich wird (Abbildung 29, Bild A).

Weiter zeigt sich, dass noch immer TNTs zwischen den Zellen detektiert werden können (Abbildung 29, Bild B). Die TNT-Bildung wird durch Zugabe des Reagenz also nicht vollständig inhibiert. Eine quantitative Analyse der TNT-Zahlen ergab, dass jedoch eine sehr starke Reduktion der TNT-Anzahl stattfindet (Abbildung 30).

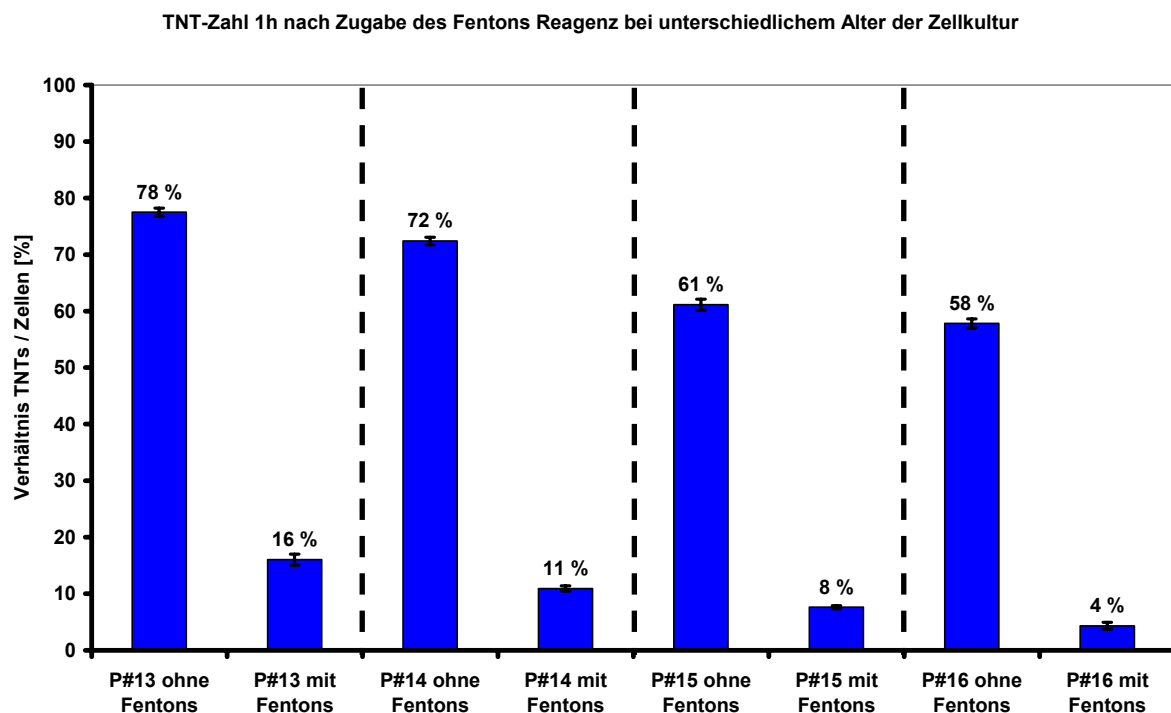


Abbildung 30: Einfluss des Fentons Reagenz auf die TNT-Bildung unter Berücksichtigung des Alters der Kultur auf mikrostrukturierten Oberflächen.

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss der chemischen Stimulation auf die TNT-Bildung sind in obigem Schaubild (Abbildung 30) zusammengefasst. Das Schaubild zeigt das Verhältnis von TNTs zu Zellen in Prozent mit und ohne Zugabe des Fentons Reagenz zu PC12-251 Zellen. Zusätzlich wird in diesem Zusammenhang das Alter der für die Experimente verwendeten Zellkultur im Hinblick

auf das Vermögen der Zellen, TNTs auszubilden, in die Ergebnisse miteinbezogen. Die Ergebnisse verdeutlichen eine signifikante Reduktion der TNT-Bildung um 80 %, wenn das Fentons Reagenz zugegeben wurde. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch bei höherem Alter der Zellkultur, wenngleich die TNT-Bildung mit steigender Passage auch ohne Zugabe des Fentons Reagenz abnimmt. Diese Ergebnisse lassen folglich den Schluss zu, dass die TNT-Bildung zum einen durch die erzeugten freien OH-Radikale, zum anderen durch das zunehmende Alter der Zellen negativ beeinflusst wird.

6.2.5.2 Stimulation mit Methy- β -Cyclodextrin

Im Folgenden soll der Einfluss von sogenannten *Lipid Rafts* [75], d.h. Cholesterin-reichen Mikrodomänen der Zellmembranen, auf die TNT-Bildung bzw. Stabilität untersucht werden. Hierzu wird Methy- β -Cyclodextrin verwendet [76]. Dieses Molekül entzieht der Zellmembran Cholesterol, was zu einer Depletion der *Lipid Rafts* und folglich zu einer Veränderung der Plasmamembran führt. Dazu wird eine 5 mM Methy- β -Cyclodextrin-Lösung zum Zellkulturmedium gegeben und die TNT-Anzahl nach zweistündiger Inkubation mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

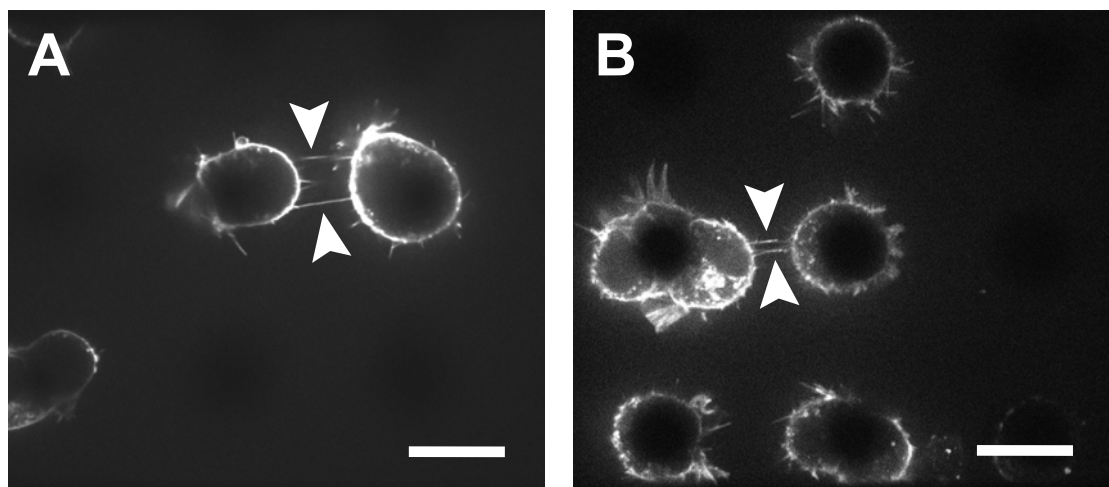


Abbildung 31: Fluoreszenzbilder von mit M β CD-behandelten PC12-251 Zellen (WGA 488) (A) und nicht behandelten PC12-251 Zellen (B) auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen. Detektierte TNTs sind durch weiße Pfeilspitzen markiert (Maßstabsbalken je 20 μ m).

Es zeigte sich, dass in beiden Fällen TNTs und auch mehrfach-TNTs beobachtet werden konnten (Abbildung 31 A und B), was auch in quantitativen Experimenten bestätigt werden konnte (Abbildung 32).

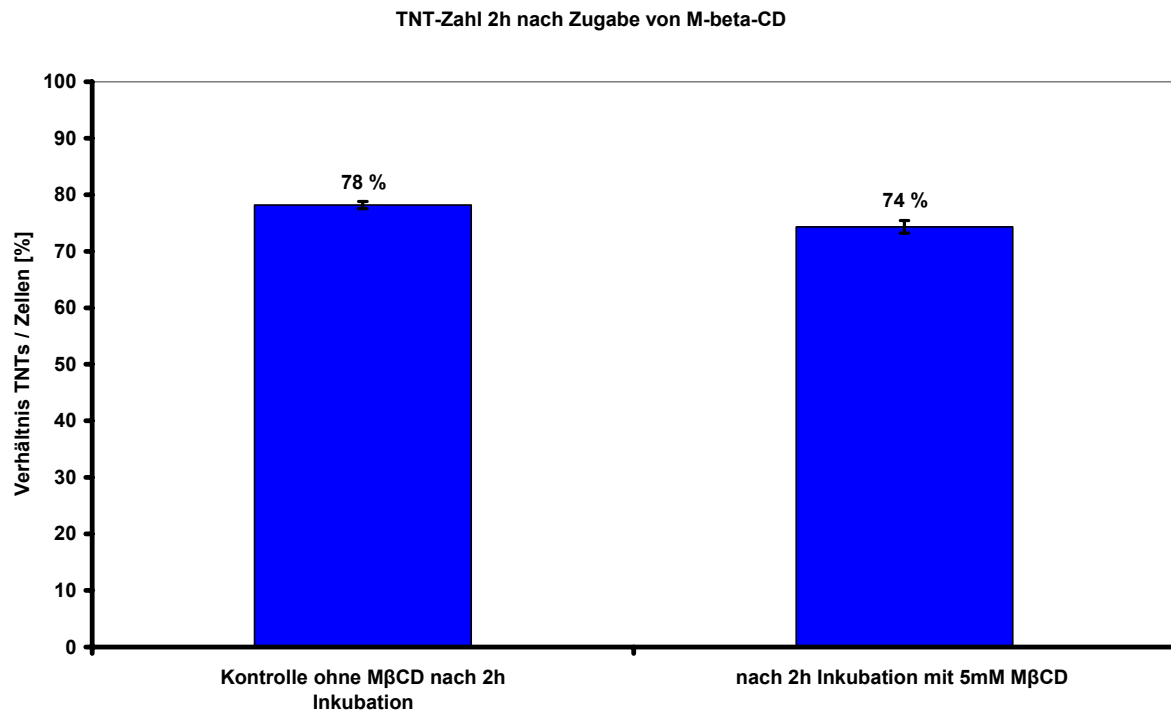
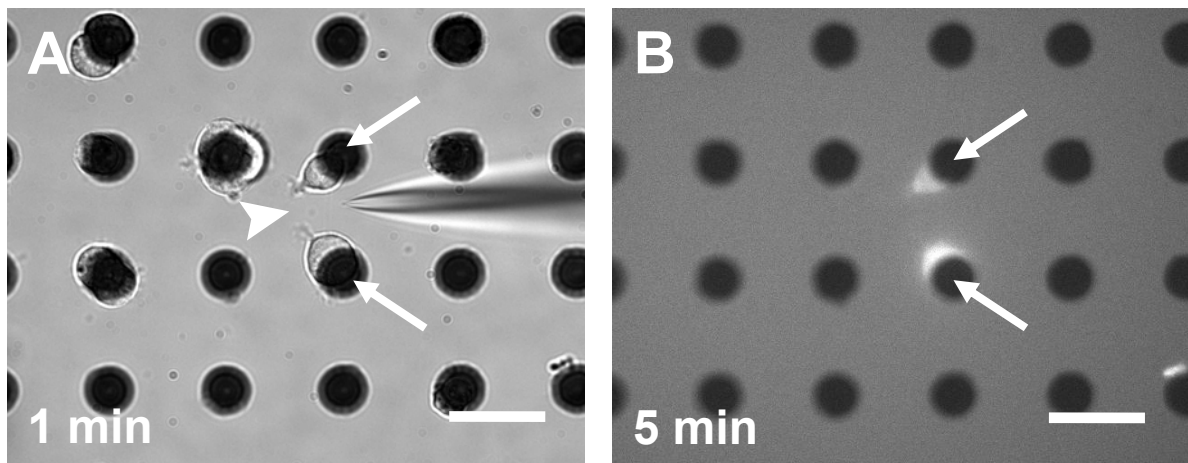


Abbildung 32: Einfluss von Methyl-β-Cyclodextrin auf die TNT-Bildung.

Die quantitative Auswertung der entsprechenden Experimente sind in Abbildung 32 dargestellt. Bei der Betrachtung des Verhältnisses TNTs zu Zellen in Prozent fällt auf, dass 2 Stunden nach Inkubation ohne und mit MβCD die TNT-Zahl mit Inkubation der Cholesterol-extrahierenden Droge gering, aber signifikant von 78 % auf 74 % gefallen ist. Diese Tendenz konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden [69].

6.2.6 Mikrostrukturierte Plattform zur Anwendung von Mikroinjektion

Da die mikrostrukturierten Oberflächen ideale Bedingungen bereitstellen, Zellen auf den Goldflächen zu immobilisieren und in definierten Mustern vereinzelt wachsen zu lassen, wurde das in dieser Arbeit entwickelte und etablierte Plattformsystem nun zur Mikroinjektion von PC12-251 Zellen herangezogen. Es wurden dazu PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche ausplattiert und die Stabilität eines TNTs welches zwei Zellen miteinander verbindet durch die Mikroinjektion von Cytochrome C [63] während des Vorgangs untersucht (Abbildung 33, Bild A) (vgl. Methoden 5.2.5). Cytochrome C wird in der Zelle von Mitochondrien als Antwort auf pro-apoptotische Stimulierung sezerniert [77,78]. Als Konsequenz werden Effektor-Kaspasen aktiviert, was letztendlich zur Apoptose der Zelle führt. Wird Cytochrome C wie bei diesen Versuchen durch Mikroinjektion in Zellen eingebracht, fungiert es als Apoptoseinitiator. Dies führt direkt zum Zelltod beider injizierter Zellen. Das verwendete Cytochrome C ist in TRITC-Dextran gelöst, was bedeutet, dass die injizierte Lösung durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Ein erfolgreiches Injizieren kann so visualisiert werden (Abbildung 33, Bild B).



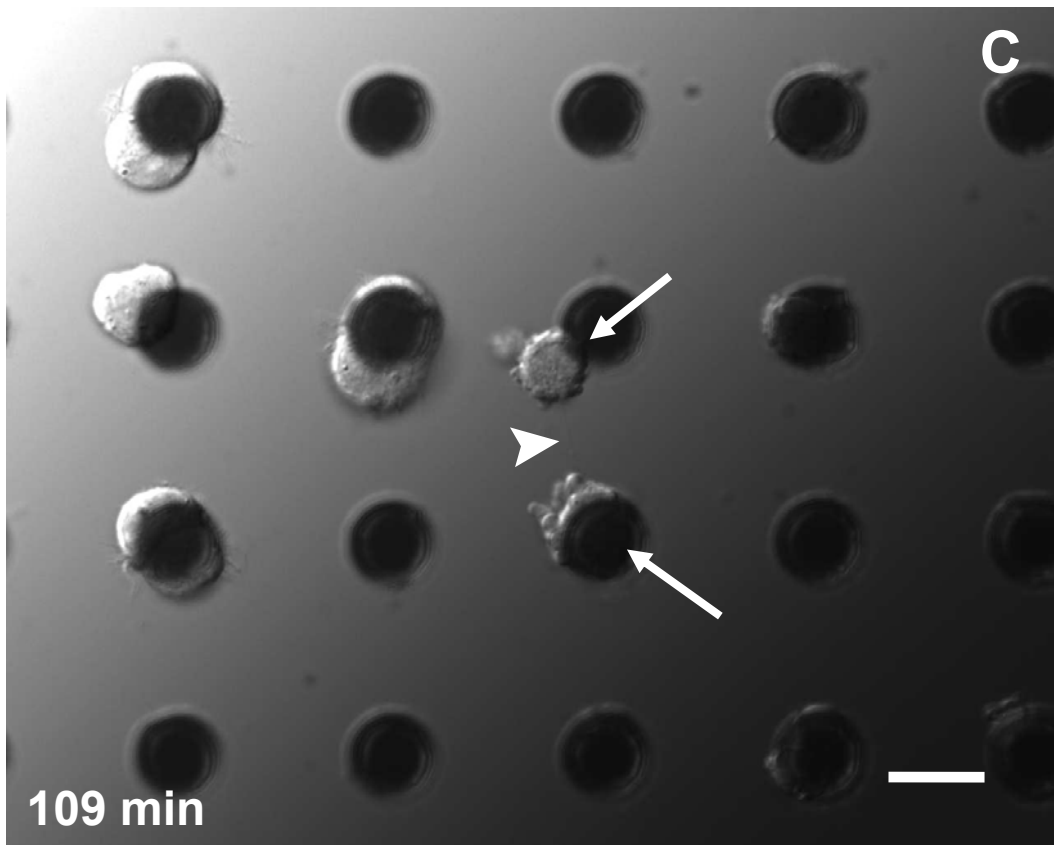


Abbildung 33: Durchlichtaufnahme zweier PC12-251 Zellen (weiße Pfeile), die durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbunden sind (Bild A). Rechts im Bild ist die Injektionsnadel sichtbar (Maßstabsbalken, 30 µm). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Bild B) der beiden Zellen (weiße Pfeile), in die erfolgreich Cytochrome C injiziert wurde (Maßstabsbalken, 30 µm). DIC-Aufnahme (Bild C) des TNTs (weiße Pfeilspitze) zwischen den apoptotischen PC12-251 Zellen (weiße Pfeile) (Maßstabsbalken, 15 µm). Das TNT (weiße Pfeilspitze) ist 2 Stunden nach der Injektion noch völlig intakt.

In Bild A der Abbildung 33 ist das Zellpaar (weiße Pfeile) eine Minute nach der Mikroinjektion gezeigt, welches durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) miteinander verbunden ist. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnten fünf Minuten nach der Injektion die Cytochrome C injizierten Zellen (weiße Pfeile) visualisiert werden (Bild B). Aufgrund ihrer morphologischen Veränderungen („Membranblebbing“) ist in Abbildung 33, Bild C zu erkennen, dass beide Zellen ca. 2 Stunden nach dem Injizieren der Cytochrome C-Lösung apoptotisch sind. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellen auch nach der Mikroinjektion auf den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen immobilisiert sind, und das Plattformsystem somit ideale Bedingungen für eine Mikroinjektion liefert. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass durch die Mikroinjektion das zwischen zwei Zellen aufgespannt TNT in seiner Stabilität nicht beeinflusst wird. Vielmehr ist es 2 Stunden nach der Injektion von Cytochrome

C in beide Zellen noch intakt, selbst wenn die Zellen durch diesen Apoptoseinitiator apoptotisch geworden sind. Aufgrund der recht überraschenden Tatsache, dass das TNT dieser mechanischen Beanspruchung durch die Mikroinjektionsnadel standhielt, soll der Einfluss von mechanischem Stress in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

6.2.7 Auswirkungen eines mechanischen Einflusses auf die TNT-Bildung

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass chemische Stimulationen sowohl mit Fentons Reagenz, als auch mit M β CD einen signifikant inhibierenden Einfluss auf die TNT-Bildung zeigen, wird im Folgenden ein mechanischer Einfluss in Bezug auf die TNT-Bildung untersucht. Hierzu werden PC12-251 Zellen einem konstanten Mediumfluss in einer *Flow Cell* (siehe Methoden 5.6) ausgesetzt und das Verhältnis von TNTs zu Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten und unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu werden PC12-251 Zellen für eine oder zwei Stunden auf den mikrostrukturierten Oberflächen inkubiert. Im Anschluss wird ein konstanter Mediumfluss für eine weitere Stunde angelegt, wobei der Einfluss verschiedener Flussgeschwindigkeiten auf die TNT-Bildung und Stabilität getestet werden.

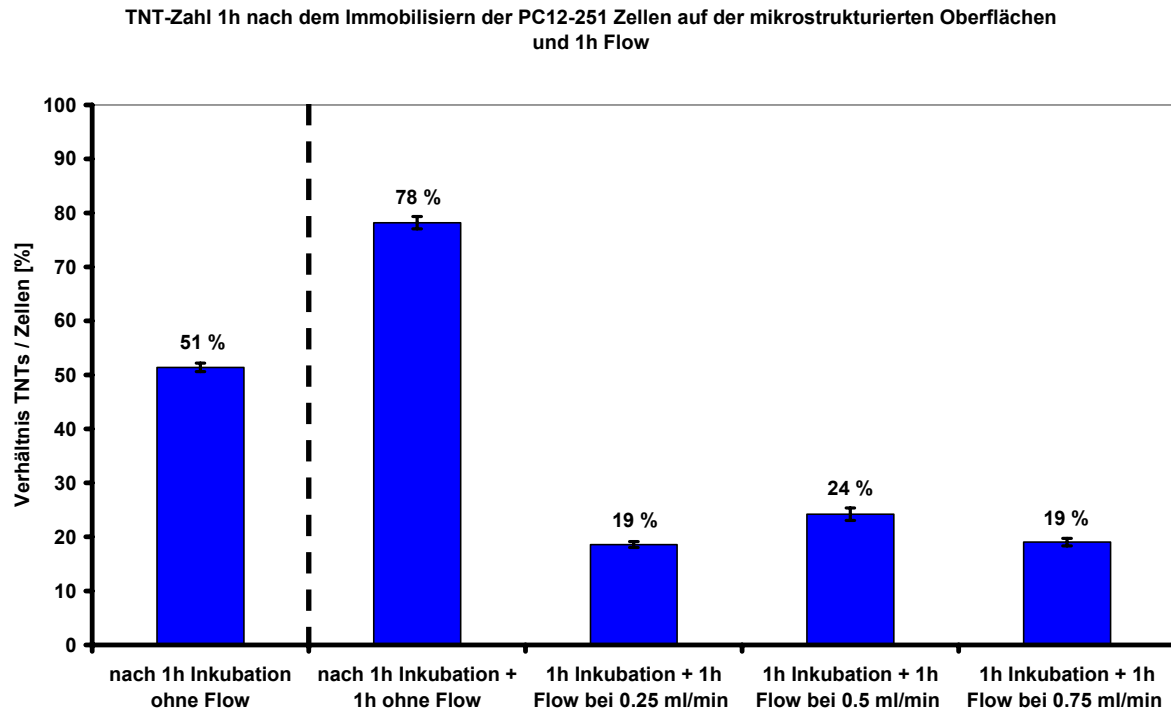


Abbildung 34: Vergleich unterschiedlicher Geschwindigkeiten des Mediumflusses und deren Effekt auf die TNT-Bildung nach 1h Inkubation.

Bei den Experimenten zeigt sich, dass das Verhältnis von TNTs zu Zellen eine Stunde nach dem Ausplattieren der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen ohne Fluss 51 % beträgt. 2 Stunden nach Ausplattieren steigt es ohne Fluss auf 78 % an (Abbildung 34). Diese Beobachtung deckt sich mit den Studien von Rustom et al [32], wo gezeigt werden konnte, dass die Mehrheit der TNTs in diesem Zeitrahmen gebildet wird. Nach einem einstündigen Mediumfluss mit einer Flussrate von 0.25 ml/min sinkt das Verhältnis von TNTs zu Zellen auf unter 20 % ab, ebenso bei einer Flussrate von 0.75 ml/min. Bei einem einstündigen Mediumfluss mit einer Flussrate von 0.5 ml/min wird eine Abnahme auf 24 % beobachtet. Die unterschiedlichen Flussraten im analysierten Bereich spielen also eine untergeordnete Rolle hinsichtlich ihres zerstörerischen Einflusses auf TNTs. Aufgrund der Beobachtung, dass keine langen TNTs mehr im Mediumfluss detektiert werden können (Daten nicht gezeigt), lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass gerade längere TNTs durch den Mediumfluss zerstört werden, da gerade diese vermutlich besonders sensitiv auf mechanische Einflüsse reagieren. Außerdem wird vermutlich auch die TNT-Neubildung durch den Fluss inhibiert, was das rapide

Absinken des TNT zu Zellen Verhältnisses um 27 % bei einer Flussrate von 0.5 ml/min erklärt (Abbildung 34). Diese Neubildung ist gerade für die TNT-Bildung zu frühen Zeitpunkten relevant.

Um in der Folge die TNT-Bildung zu späteren Zeitpunkten zu analysieren, wird nach gleichem Muster verfahren. Dazu werden PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen ausplattiert und 3 bzw. 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss wird ein Mediumfluss mit der Flussrate von 0.5 ml/min für eine Stunde angelegt und anschließend die TNT-Zahl ermittelt (Abbildung 35).

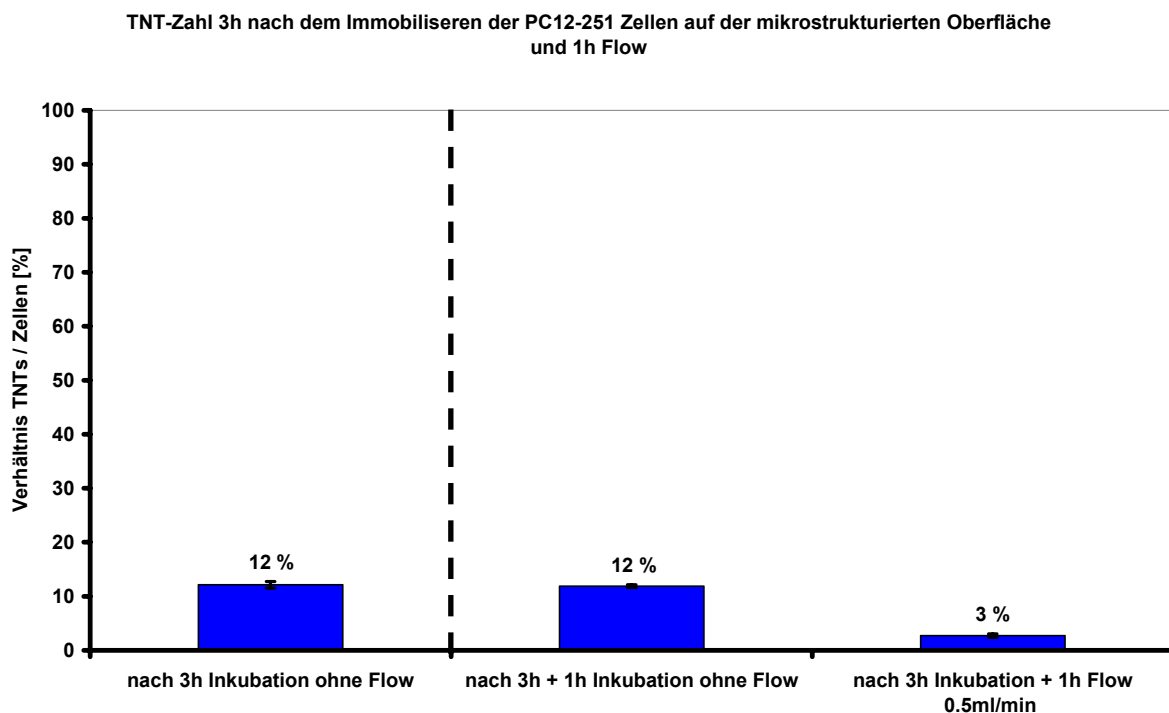


Abbildung 35: Effekt eines konstanten Mediumflusses von 0.5 ml/min auf die TNT-Bildung 3h nach dem Ausplattieren der PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen.

Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis von TNTs zu Zellen 3 Stunden nach dem Ausplattieren und einer weiteren Stunde ohne angelegten Mediumfluss 12 % beträgt. Ein Absinken auf 3 % wird beobachtet, wenn man die Anzahl vorhandener TNTs 3 Stunden nach Ausplattieren und einer weiteren Stunde im Mediumfluss betrachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen die TNT-Zahl bereits 12 % beträgt. Im

Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die meisten TNTs innerhalb der ersten zwei Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen gebildet werden. Nach einer Stunde im Mediumfluss sinkt die TNT-Zahl auf 3 % ab. Der Grund hierfür ist wie bei den früheren Zeitpunkten vermutlich das Zerstören gerade langer TNTs durch den Fluss. Interessanterweise konnten trotz Anlegen des Flusses TNTs detektiert werden, die sich orthogonal zur Flussrichtung befanden. Diese TNTs blieben über einen längeren Zeitraum stabil, sie wurden nicht durch den Fluss zerstört.

6.2.8 Kraftmessungen an TNTs mittels Atomic-Force-Microscopy (AFM)

Betrachtet man den molekularen Aufbau von TNTs, so zeigt sich, dass sich ein F-Aktin Bündel bei PC12-251 Zellen durch die gesamte Länge des TNTs zieht [32]. Es wird vermutet, dass diese Bündel an der Ausbildung beteiligt sind, sowie dem Transport von kleinen Molekülen und Zellorganellen dienen [32,37]. Dies wurde unter anderem über immunocytochemische Methoden, sowie über die Zugabe von Latrunculin-B, einer Substanz, die F-Aktin depolymerisiert, gezeigt. Werden PC12-251 Zellen damit behandelt, wird die TNT-Bildung blockiert [32,79,80]. Von großem Interesse, auch im Hinblick auf die Flussexperimente, ist daher die Frage nach der Kraft, die nötig ist, diese F-Aktin Bündel zum Reißen zu bringen und in der Folge ein TNT im Ganzen abzureißen.

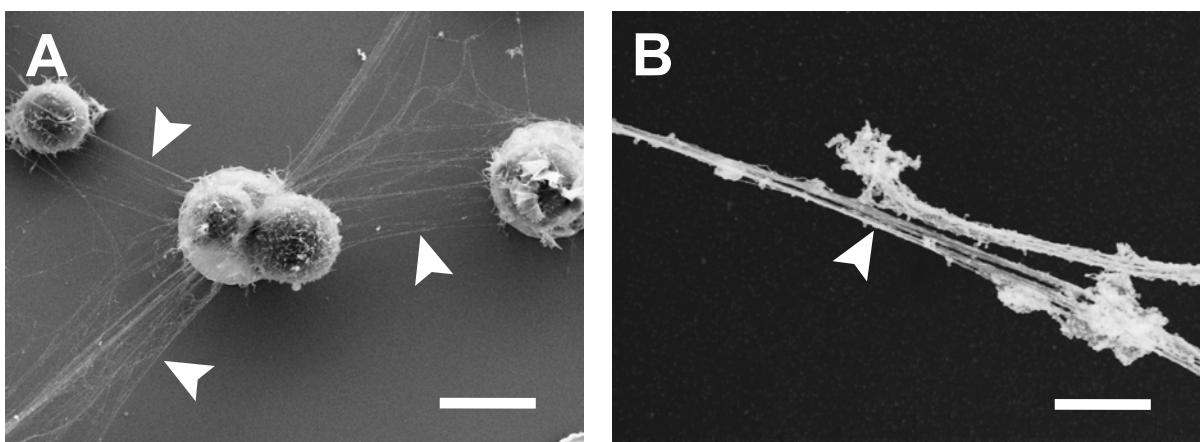


Abbildung 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines TNT-Netzwerkes (weiße Pfeilspitzen) auf einer mikrostrukturierten Oberfläche (Bild A, bei 2300x-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 10 µm) und von F-Aktinbündeln (weiße Pfeilspitze) (Bild B, bei 24700x-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 600 nm).

Abbildung 36 A zeigt mehrfach verzweigte TNT-Netzwerke, aufgespannt zwischen PC12-251 Zellen. Man kann davon ausgehen, dass es sich bei den faserigen Strukturen in der sehr hochauflösenden rasterelektronischen Aufnahme (B) um einzelne in den TNTs enthaltenen F-Aktin Bündel handelt, die an jenen Stellen sichtbar sind, an denen die Plasmamembran fehlt. Diese Art Aufnahmen können aufgrund der besonders schonenden Probenpräparation dargestellt werden.

Zur Beantwortung der Frage nach der Kraft, die nötig ist, ein TNT zum Reißen zu bringen (siehe Methoden 5.4.3), werden PC12-251 Zellen auf mit PLL beschichteten Deckgläschen ausplattiert und 1 Stunde bei 37° C und 10 %CO₂ inkubiert. Zur Erleichterung der TNT-Detektierung wird die Zellmembran und folglich die TNTs mit dem *in vivo* Farbstoff WGA 488 angefärbt. Es wird nun nach Zellen gesucht, zwischen denen genau ein TNT aufgespannt ist. Ein ebenfalls mit PLL beschichteter *Cantilever* wird so über einer der beiden Zellen positioniert und auf selbige mit einem Abpressdruck von 4 nN 1800 s angedrückt, so dass die Zelle auf dem *Cantilever* immobilisiert wird. Aufgrund der großen Kontaktfläche ist die Zelle stärker am PLL beschichteten *Cantilever* als auf dem mit PLL beschichtetem Glas immobilisiert. Der *Cantilever*, und somit die an ihm immobilisierte Zelle, wird nun so lange nach oben gezogen, bis das TNT im Ganzen abgerissen ist. Für diesen Versuchsaufbau ist es unmöglich, mit IKVAV biofunktionalisierte mikrostrukturierte Oberflächen als Substrat für die Zellen zu verwenden, da die Affinität der Zellen zu dem IKVAV-Peptid auf den Goldflächen ungleich stärker ist (Abrisskraft größer 50 nN) als die zu den PLL beschichteten *Cantilevern*. Als Folge lassen sich die Zellen nicht an den *Cantilevern* immobilisieren und nicht von den Goldflächen ablösen.

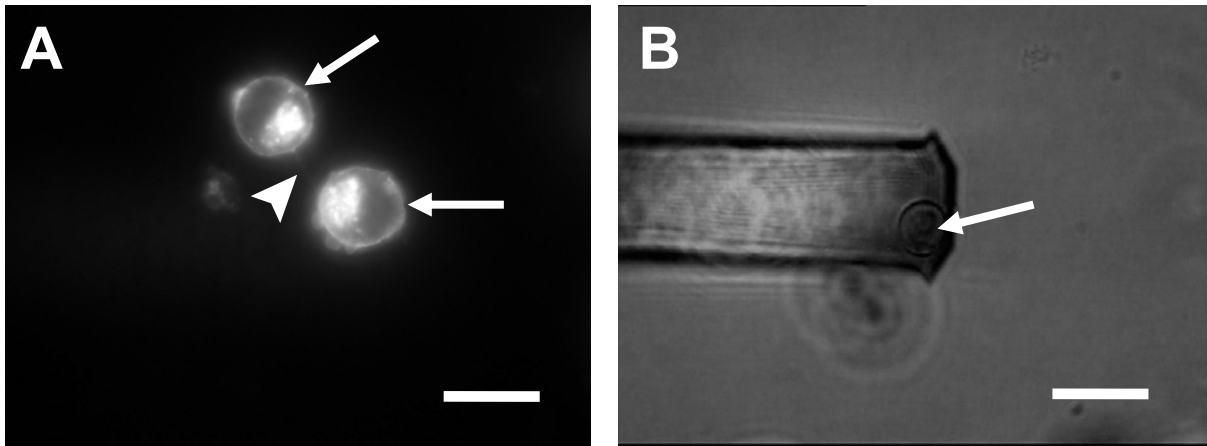


Abbildung 37: A: Fluoreszenzbild zweier durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbundener PC12-251 Zellen (weiße Pfeile). B: Durchlichtbild eines *Cantilevers*, an dem eine mit PLL immobilisierte PC12-251 Zelle (weißer Pfeil) zu sehen ist (Maßstabsbalken je 15 μm).

Die Fluoreszenzaufnahme A der Abbildung 37 zeigt die Ausgangssituation der Experimente. Hier sind zwei durch den *in vivo* Farbstoff WGA 488 angefärbte PC12-251 Zellen abgebildet, die durch ein TNT miteinander verbunden sind. Vor der Kraftmessung wird der PLL beschichtete *Cantilever* über eine dieser beiden verbundenen PC12-251 Zellen positioniert (Abbildung 37, Bild B). Dies geschieht zur der besseren Orientierung mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie (B).

In den nachfolgenden Schaubildern werden die Ergebnisse dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente dargestellt. Die in den Abbildungen 38, 39 und 41 dargestellte schwarze Kurve (*Approach*) beschreibt jeweils die Positionierung des *Cantilevers* und den Verbleib von 1800 s auf den jeweils ausgewählten Zellen.

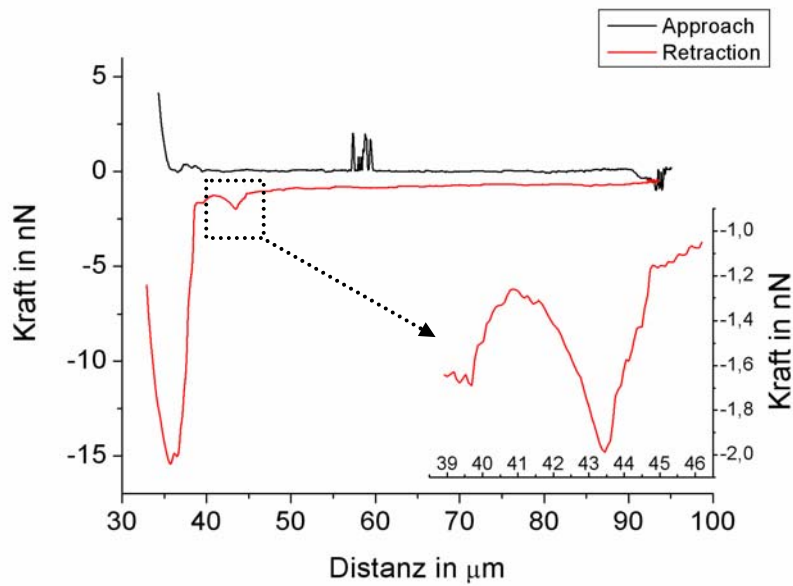


Abbildung 38: Kraftspektrum eines TNT-Abrisses.

Der erste *Peak* der roten Kurve (*Retraction*) in Abbildung 38 beschreibt den Abriss der Zelle vom Substrat (Abrisskraft 15 nN) und das anschließende senkrechte Abheben der Zelle von der Oberfläche mit einer Geschwindigkeit von 1 µm/s. Nachdem die Zelle 45 µm senkrecht von der Oberfläche weggezogen wurde folgt der Abriss des TNTs (zweiter *Peak*) mit einer Kraft von 836 pN. Die Vergrößerung in der rechten unteren Ecke des Schaubildes zeigt eine Detailansicht des TNT-Abrisses. Die Stufen, die im rechten Ast der Kurve zu sehen sind, lassen darauf schließen, dass es sich hierbei möglicherweise um die Risse einzelner F-Aktinbündel innerhalb des TNTs handeln könnte.

Im zweiten Experiment werden zwei Zellen ausgesucht, die durch zwei TNTs miteinander verbunden sind. Die Kraft, die nötig ist, eine der Zellen von der mit PLL beschichteten Oberfläche zu reißen, beträgt 15 nN (Abbildung 39).

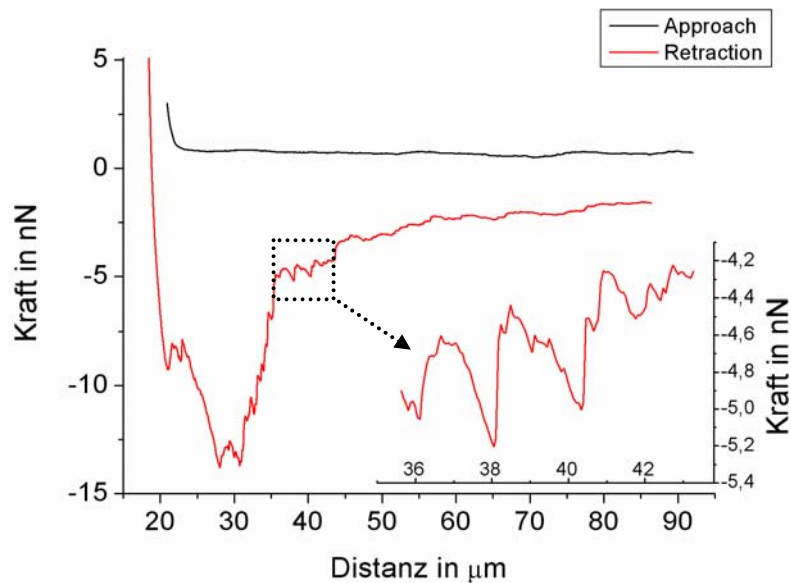


Abbildung 39: Kraftspektrum von zwei TNT-Abrissen zwischen zwei PC12-251 Zellen.

Im Gegensatz zum vorherigen Schaubild wird hier jedoch der Abriss zweier TNTs beschrieben (Vergrößerung unten rechts im Schaubild). Wie dem Schaubild zu entnehmen ist, reißt das erste TNT bei einer angewendeten Kraft von 758 pN, das zweite bei 752 pN. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser und vier weiterer durchgeführter Experimente (Daten nicht gezeigt) den Schluss zu, dass die durchschnittliche Kraft, die nötig ist, ein TNT an einem Punkt abzureißen, $767.6 \text{ pN} \pm 44.4 \text{ pN}$ (Abweichung 6 %) beträgt.

Im Zuge der für die Berechnung der Abrisskraft durchgeführten Experimente wurde das Interesse auf Verdickungen innerhalb der TNTs gelenkt, die frequent beobachtet werden konnten. Um die Beschaffenheit dieser Strukturen genauer zu analysieren, wird folgendes Experiment vollzogen. Eine PC12-251 Zelle, die durch ein TNT mit einer solchen Struktur mit einer zweiten PC12-251 Zelle verbunden ist, wird unter einem PLL-beschichteten *Cantilever* immobilisiert. Der *Cantilever* wird nun mit der Zelle von der mit der durch dieses TNT verbundenen Zelle so lange mit einer Geschwindigkeit von 1 µm/s weggezogen, bis das TNT reißt.

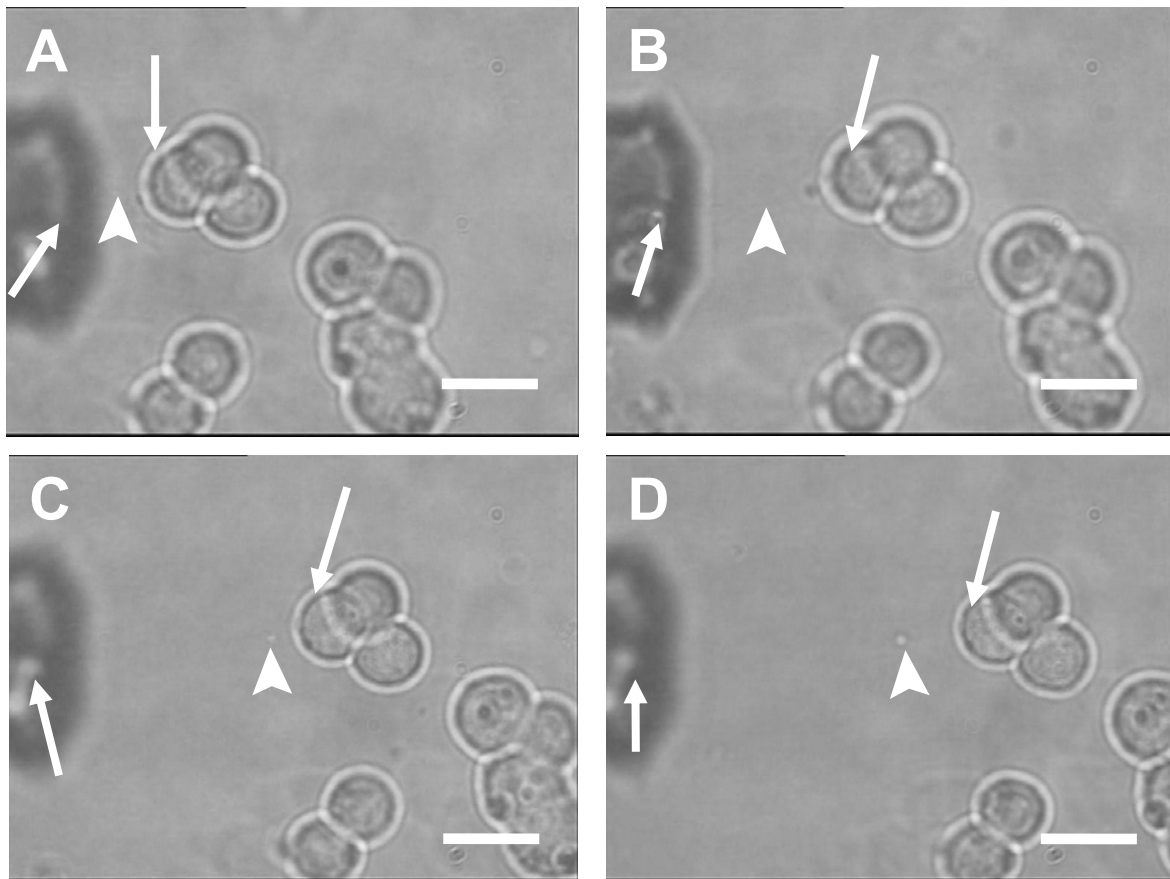


Abbildung 40: Die Bilder A-D zeigen den zeitlichen Verlauf des Dehnvorgangs eines TNTs zwischen zwei PC12-251 Zellen über eine Gesamtdistanz von $45\mu\text{m}$ (Maßstabsbalken je $15\mu\text{m}$). Die weißen Pfeile zeigen die TNT-Ansatzstellen an den Zellen, die weißen Pfeilspitzen die Membranverdickung im TNT.

Abbildung 40 zeigt ein TNT (weiße Pfeilspitze), welches zwischen zwei PC12-251 Zellen (weiße Pfeile) aufgespannt ist, wobei eine der beiden Zellen an einem mit PLL beschichteten *Cantilever* immobilisiert ist. Mit zunehmendem Abstand der beiden PC12-251 Zellen zueinander, d.h. mit zunehmender Dehnung des TNTs, verringert sich der Durchmesser der sich im TNT befindenden Membranverdickung (siehe weiße Pfeilspitze in Bild C und D). Bemerkenswert hierbei ist, dass über einen Zeitraum von 12 min die an dem *Cantilever* immobilisierte Zelle $45\mu\text{m}$ von ihrer Ausgangsposition entfernt werden kann, ohne das TNT, das sie mit der zweiten Zelle verbindet, zu zerstören (Abbildung 40, Bilder A-D). Gleichzeitig nimmt der Durchmesser der Verdickung, die in diesem TNT zu sehen ist, stetig ab. Möglicherweise handelt es sich also bei dieser Verdickung nicht um einen zellulären Vesikel, der unidirektional von der einen Zelle zur anderen transportiert wird. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die Verdickung eine Aufstülpung der Zellmembran an dieser Stelle des TNTs ist [81,82,83].

Zusätzlich vorhandene Zellmembran aus diesem Membranreservoir wird möglicherweise dazu verwendet, das TNT bei Bedarf zu verlängern. Ist alle Membran aus dem Reservoir verbraucht, kann das TNT aufgrund der Membranelastizität bis zu einem gewissen Punkt gedehnt werden. Ist dieser überschritten, reißt das TNT.

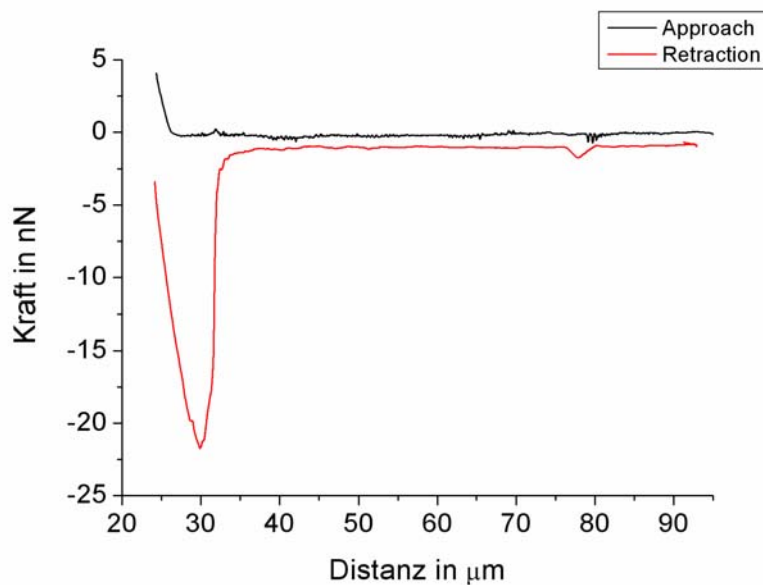


Abbildung 41: Kraftspektrum eines TNT-Abrisses nach Dehnung des TNTs über eine Distanz von 45 μm .

Diese Vermutung wird durch das korrespondierende Kraftspektrum des TNT-Abrisses bestätigt, welches in der Abbildung 41 graphisch dargestellt ist. Ähnlich den Ergebnissen der vorherigen Kraftspektren (Abbildung 38 und 39) beträgt die Kraft, die die Zelle von ihrem Substrat ablöst, 20 nN. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass die Zelle 45 μm senkrecht von der Oberfläche weggezogen werden konnte, bevor der Abriss des TNTs (zweiter Peak) mit einer Kraft von 777 pN erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass das TNT über eine Strecke von 45 μm gedehnt werden konnte, bevor alle zusätzlich vorhandene Membran aufgebraucht wurde. Dies führt in der Konsequenz zu dem späten Abriss des TNTs.

6.3 Experimente mit primären embryonalen neuronalen Rattenzellen auf biofunktionalisierten Oberflächen

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde versucht, das Plattformsystem der entwickelten biofunktionalisierten Oberflächen auf ein weiteres, physiologisch sehr relevantes Zellsystem zu erweitern: einer primären Kokultur von Astrozyten und Neuronen präpariert aus Rattenembryonen. Bei diesem Zellsystem finden dieselben Parameter der mikrostrukturierten Oberflächen (Abstand der Goldflächen zueinander und Durchmesser der Goldflächen) Anwendung, die auch bei den PC12-251 Zellen eingesetzt wurden (vgl. Ergebnisse 6.1), da sich diese Parameter in entsprechenden Vorversuchen auch bei diesem Zellsystem als optimal erwiesen (Daten nicht gezeigt).

6.3.1 Zellvereinzelung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen

Zunächst werden, analog zu den vorausgegangenen Experimenten mit PC12-251 Zellen, die in Frage kommenden Liganden zur Biofunktionalisierung der mikrostrukturierten Oberfläche auf ihre Fähigkeit getestet, die Astrozyten und Neurone vereinzelt auf den Goldpunkten zu immobilisieren. Nach der kovalenten Anbindung an die Goldflächen der mikrostrukturierten Oberflächen werden die primären Astrozyten und Neurone in Kokultur auf den biofunktionalisierten Oberflächen ausplattiert. Die Zellvereinzelung wird nach einer vierstündigen Inkubation mit Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Um die einzelnen Zelltypen der Kokultur besser unterscheiden zu können, werden die Astrozyten mit dem *in vivo* Farbstoff Dil rot angefärbt. Die Zellmembran wird zur erleichterten TNT-Detektion zusätzlich durch Zugabe des Farbstoffes WGA 488 grün angefärbt (Abbildung 42, C und D).

Im Fall der 11-Mercaptoundecansäure war die Affinität von sowohl den Astrozyten, als auch der Neurone zu den funktionalisierten Goldflächen ungenügend. Die beiden Zelltypen zeigten keinerlei Vereinzelnung, sie lagen vielmehr in Zellhaufen auf den Oberflächen vor (Daten nicht gezeigt). Das IKVAV-Peptid vermittelte bei den Neuronen eine sehr gute Adhäsion auf den funktionalisierten Goldflächen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deckt sich weitgehend mit Arbeiten, die eine IKVAV-vermittelte Adhäsion von Neuronen zeigen [64,84,85]. Allerdings zeigten die Astrozyten in der Kokultur keine Affinität zu den IKVAV funktionalisierten Goldflächen (Daten nicht gezeigt).

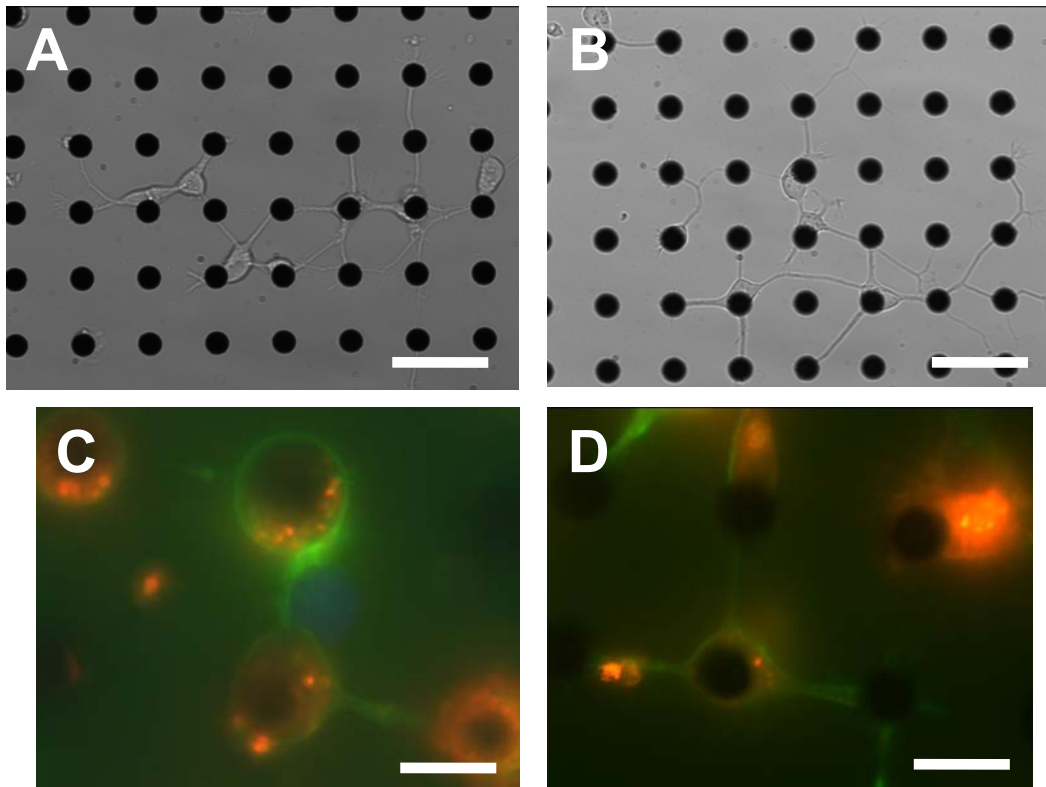
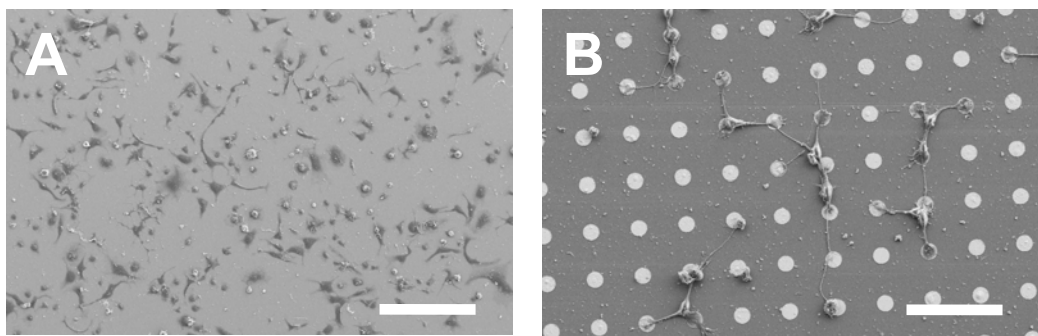


Abbildung 42: Hippokampale Kokulturen auf mit 10-Aminodecan-1-thiol funktionalisierten Oberflächen (A und B) (Maßstabsbalken je 40 μm). Beide Durchlichtaufnahmen zeigen die sehr gute Zellvereinzelnung und Affinität der Zellen zu den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen. C und D: Die Astrozyten wurden mit dem *in vivo* Farbstoff Dil angefärbt (rot), die Zellmembran durch Zugabe des Farbstoffes WGA 488 grün. Auch auf diesen Fluoreszenzaufnahmen ist die sehr gute Zellvereinzelnung und Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen gezeigt (Maßstabsbalken, 20 μm).

Die Funktionalisierung der Goldflächen mit 10-Aminodecan-1-thiol zeigte hingegen sowohl eine gute Zellvereinzelung, als auch eine gute Affinität beider Zelltypen zu den mit diesem Liganden funktionalisierten Goldflächen (siehe Abbildung 42). Die Fluoreszenzbilder C und D der Abbildung 42 zeigen deutlich die sehr gute Zellvereinzelung von Astrozyten (rot) auf den mikrostrukturierten Oberflächen und die hohe Affinität der Astrozyten zu den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl die 11-Mercaptoundecansäure, als auch der IKVAV-Ligand ungeeignet ist, die gewünschte Zellvereinzelung und Affinität von hippokampalen primären Kokulturen zu den damit biofunktionalisierten Goldflächen der mikrostrukturierten Oberflächen herzustellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle weiteren Experimente die mikrostrukturierten Oberflächen mit 10-Aminodecan-1-thiol als Ligand biofunktionalisiert.

Um die Charakteristika hippokampaler Zellkulturen auf den Oberflächen auch auf ultrastruktureller Ebene zu analysieren, wurden die Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dazu werden die primären Astrozyten und Neurone auf den mikrostrukturierten Oberflächen ausplattiert, nach vierstündiger Inkubation Kritisch-Punkt getrocknet und mit einer Graphitschicht zur nötigen Leitfähigkeit versehen. Im Anschluss werden die Proben hinsichtlich der Zellvereinzelung und der Affinität der Zellen zu den funktionalisierten Goldflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die bereits durch Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie gezeigte, sehr gute Zellvereinzelung und Affinität (Abbildung 43).



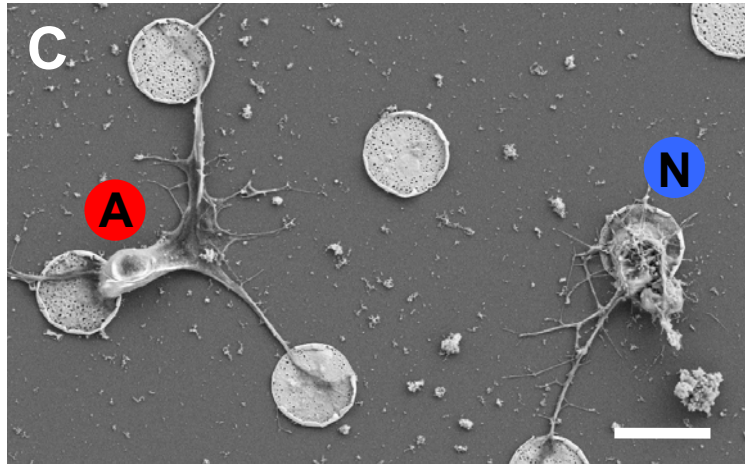


Abbildung 43: Rasterelektronenmikroskopische Analyse von hippocampalen Kokulturen. A: Referenzprobe der Kokultur aus Astrozyten und Neurone auf einem Glassubstrat 100x-fach (Maßstabsbalken, 250 μm). B: Astrozyten und Neurone der Kokultur auf einer mit 10-Aminodecan-1-thiol funktionalisierten Oberfläche (Maßstabsbalken, 50 μm). C: Astrozyt und Neuron auf einer biofunktionalisierten Oberfläche 1400x-fach (Maßstabsbalken, 20 μm).

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme B der Abbildung 43 zeigt deutlich die sehr gute Zellvereinzelung der Astrozyten und Neuronen in Vergleich zu der ungeordneten Zellanordnung auf einem Glassubstrat (Abbildung 43, Bild A). Bild C zeigt eine Detailaufnahme eines Astrozyts und eines Neurons auf einer biofunktionalisierten Oberfläche. Die Zellen weisen eine abgeflachte Morphologie auf und sie sind auf dem Substrat ausgebreitet. Die Ansatzpunkte der Zellen zum Substrat befinden sich ausschließlich auf den biofunktionalisierten Goldflächen der Oberfläche. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass sich die Ausläufer des Neurons auch über größere Entfernungen an den funktionalisierten Goldflächen anheften (Abbildung 43, Bild C). Nach der erfolgreichen Zellvereinzelung auf den mikrostrukturierten Oberflächen und der sehr guten Affinität der Astrozyten und Neuronen zu den biofunktionalisierten Goldflächen sollen im folgenden Abschnitt die möglicherweise zwischen den Zelltypen der Kokultur aufgespannten TNTs visualisiert werden.

6.3.2 Visualisierung der TNTs durch Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie

Entsprechend den Experimenten bei PC12-251 Zellen sollen in der Folge auch TNTs bei embryonalen Astrozyten und Neuronen in Kokulturen mit Hilfe von Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Dazu werden die Zellen wie in den vorausgegangenen Experimenten auf den funktionalisierten Mikrostrukturen ausplattiert und die TNTs nach vierstündiger Inkubation mittels verschiedener mikroskopischer Verfahren visualisiert. Hierbei werden jeweils TNTs analysiert, die auf einer mikrostrukturierten Oberfläche detektiert werden können und einen Astrozyten mit einem Neuron, zwei Astrozyten, bzw. zwei Neurone miteinander verbinden. Zunächst werden die TNTs mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Zelltypen der Kokultur werden die Astrozyten mit dem *in vivo* Farbstoff Dil rot und die Neuronen mit dem Farbstoff *CelltrackerTM-Blue* blau angefärbt. Zur erleichterten Visualisierung der TNTs während des *Life-Cell-Imagings* werden zusätzlich die Zellmembranen mit WGA 488 grün angefärbt.

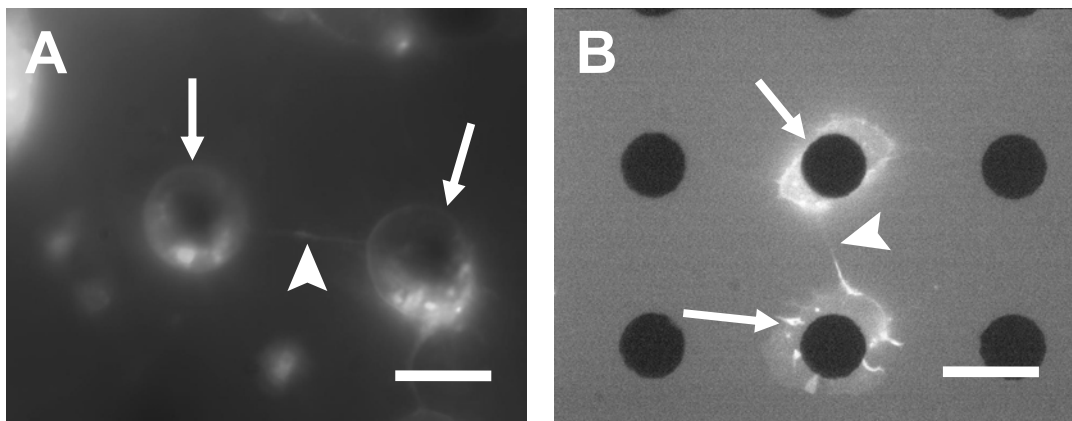


Abbildung 44: Fluoreszenzaufnahmen (A und B) von Astrozyten (weiße Pfeile), die durch ein TNT (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind, auf mikrostrukturierten Oberflächen (Maßstabsbalken, 20 µm).

Als erstes werden TNTs analysiert, die zwei Astrozyten auf der mikrostrukturierten Oberfläche miteinander verbinden. Dazu werden Bereiche auf der mikrostrukturierten Oberfläche ausgewählt, die lediglich durch ein TNT verbundene Astrozyten zeigen (Abbildung 44 A und B). Dabei fällt auf, dass die Länge, sowie die Morphologie dieser TNTs derer bei den PC12-251 Zellen entsprechen. Nach der erfolgreichen Visualisierung von TNTs, die zwischen Astrozyten aufgespannt sind, sollen nun TNTs detektiert werden, die jeweils einen Astrozyten und ein Neuron auf derselben Oberfläche und unter gleichen Bedingungen miteinander verbinden.

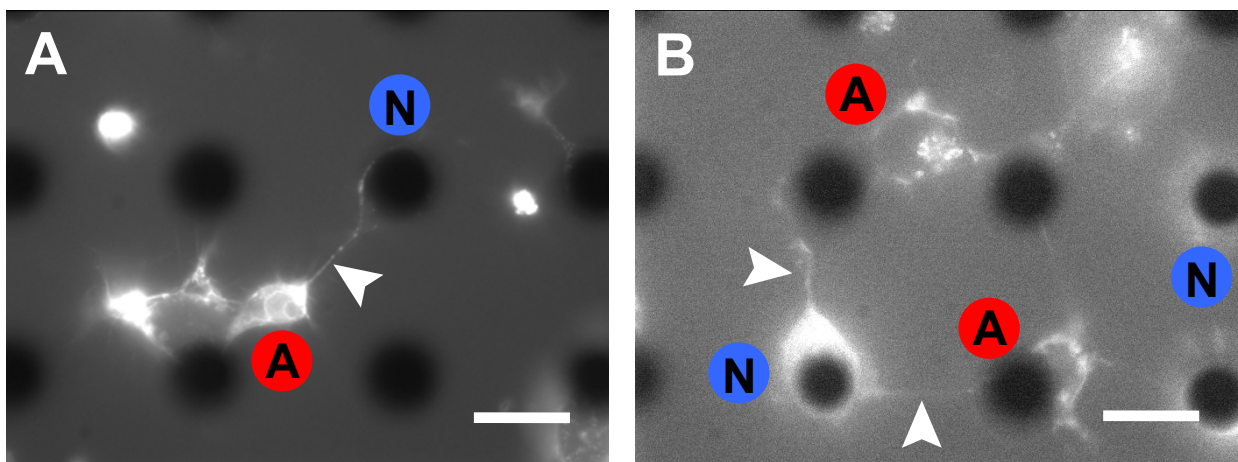


Abbildung 45: Fluoreszenzaufnahmen (A und B) von TNTs (weiße Pfeilspitzen), welche zwischen jeweils einem Astrozyt und einem Neuron aufgespannt sind (Maßstabsbalken, 20 μm). Beide Zelltypen zeigen eine sehr gute Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen der mikrostrukturierten Oberflächen.

Auch hier zeigte sich, dass die Länge und Morphologie der TNTs, die Astrozyten und Neuronen verbinden, mit denen, die zwischen den anderen Zellen detektiert wurden, konsistent sind (Abbildung 45 A und B). Die so detektierten TNTs weisen keinerlei Unterschiede auf. Als letztes werden TNTs analysiert, die zwei Neurone unter den gleichen Voraussetzungen verbinden.

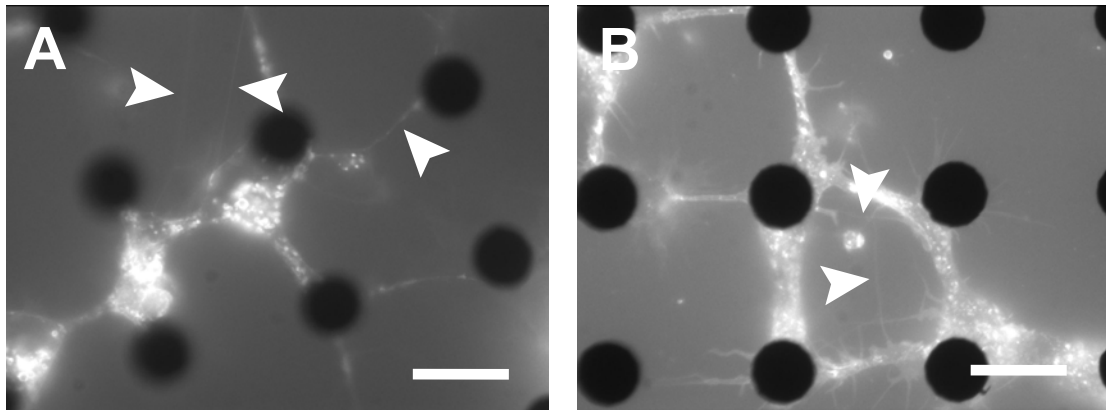


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Analysen von TNTs (weiße Pfeilspitzen) zwischen primären Neuronen auf mikrostrukturierten Oberflächen (A und B) (Maßstabsbalken, 20 µm). Die Neuronen weisen ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen auf.

Die Analyse ergab, dass auch bei den TNTs, die Neurone verbinden, keine Unterschiede zu den vorher detektierten TNTs bestehen (Abbildung 46 A und B). Da die Komplexität und Vielzahl von verschiedenen Ausläufern die TNT-Analysen erschweren, wurden rasterelektronenmikroskopische Messungen der Proben durchgeführt. Dazu wurden die auf den funktionalisierten Mikrostrukturen ausplattierten Zellen nach vierstündiger Inkubation mit einer Glutaraldehyd-Lösung fixiert, Kritisch-Punkt getrocknet und mit einer Graphitschicht versehen. Im Anschluss können die TNTs durch die rasterelektronischen Aufnahmen visualisiert werden.

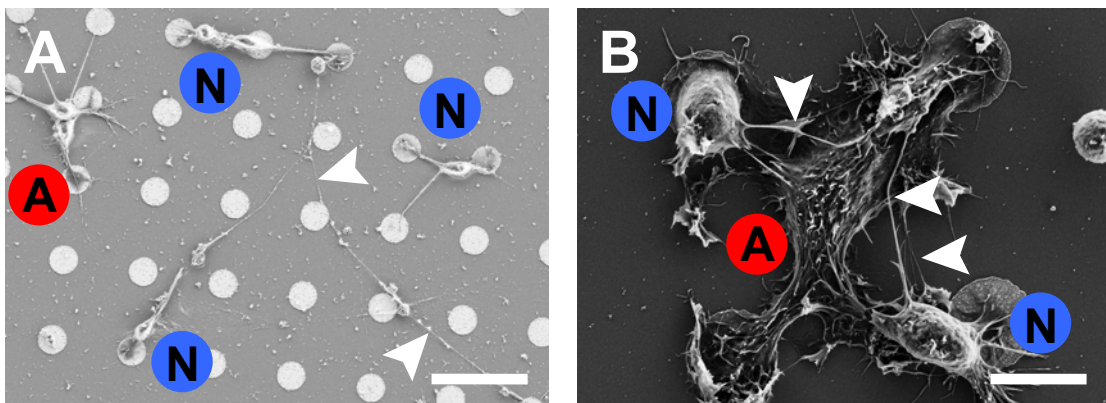


Abbildung 47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (A) von Astrozyten und Neuronen auf einer biofunktionalisierten Oberfläche 670x-fach (Maßstabsbalken, 40 µm). Die TNTs (weiße Pfeilspitzen), die in dieser Aufnahme detektiert werden können, sind zwischen den Neuronen auf der Oberfläche aufgespannt. B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Astrozyten, der eine hohe Affinität zu denen ihn umgebenden biofunktionalisierten Goldflächen zeigt 2000x-fach (Maßstabsbalken, 10 µm). Bei dieser Art von Kokultur ist es möglich, dass Neurone auf Astrozyten liegen, bzw. auf dem Astrozyt adhären. Die detektierten TNTs sind hier zwischen dem Astrozyt und den sich darauf befindenden Neuronen aufgespannt.

Die erhaltenen Bilder zeigen, dass TNTs zwischen primären Astrozyten und Neuronen durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen visualisiert werden können. Die ermittelte Länge der TNTs auf den mikrostrukturierten Oberflächen liegt hier zwischen 4 bis 18 μm , wobei auch längere TNTs von bis zu 500 μm Länge detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Der ebenfalls durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ermittelte Durchmesser der TNTs liegt bei den primären Kokulturen zwischen 35 und 270 nm (Daten nicht gezeigt).

6.3.3 Chemische Stimulation durch Fentons Reagenz

Die Experimente zur Stimulation von PC12-251 Zellen mit Fentons Reagenz [55,56] zeigten eine deutliche Reduktion der TNT-Anzahl. Um zu testen, ob gleiches auch für die primären Astrozyten und Neurone aus dem Kokultursystem gilt, werden die neuronalen Zellen auf den biofunktionalisierten Mikrostrukturen ausplattiert und drei Stunden inkubiert. Danach wird das Fentons Reagenz zugegeben und das Verhältnis TNTs zu Zellen analysiert. Da aufgrund von Beobachtungen vermutet wird, dass das Alter von Primärkulturen Einfluss auf die TNT-Bildung haben könnte, wurden zudem unterschiedlich alte Kulturen untersucht.

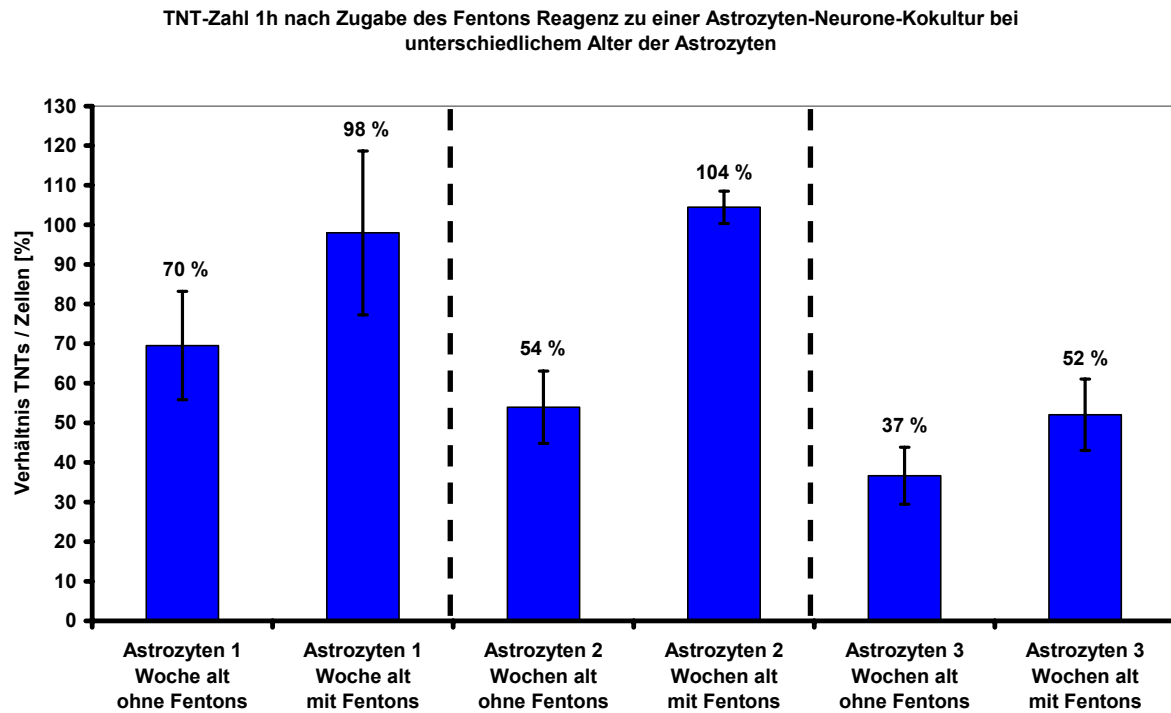


Abbildung 48: Gesamtübersicht über den Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung in einer Astrozyten-Neuronen-Kokultur in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten.

Die Experimente zeigen, dass die Zugabe des chemischen Agens im Fall der Astrozyten/Neuronen Kokultur eine Steigerung der TNT-Bildung bewirkt (Abbildung 48). Dies ist auch dann noch gültig, wenn man das ansteigende Alter der Astrozyten in der Kokultur mit einbezieht, wenngleich die TNT-Bildung generell im Vergleich zu den jüngeren Astrozyten in Kultur reduziert ist (Abbildung 48). So fällt das Verhältnis von TNTs zu Zellen von 70 % bei einem Alter der Astrozyten von 1 Woche auf 37 % bei Astrozyten mit dem Alter von 3 Wochen. Diese Werte gelten für die ermittelte TNT-Zahl ohne die Stimulation mit dem Fentons Reagenz. Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, werden TNTs generell zwischen Astrozyten, Astrozyten und Neuronen, sowie zwischen Neuronen ausgebildet. Daher wird in der Folge der stimulierende Effekt des Fentons Reagenz auf die TNT-Bildung zwischen den unterschiedlichen Zelltypen der Kokultur im Einzelnen untersucht.

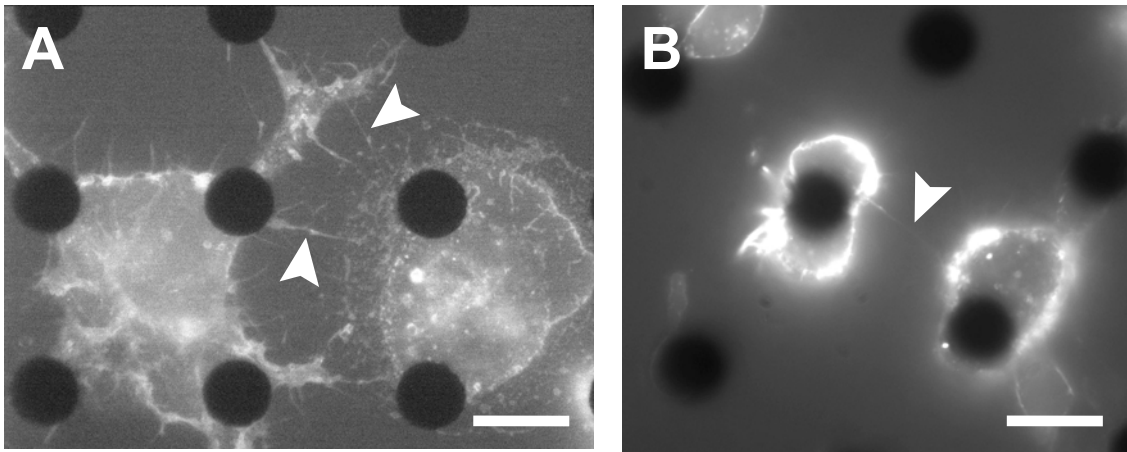


Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (A) mehrerer TNTs (weiße Pfeilspitzen), die zwei Astrozyten miteinander verbinden (Maßstabsbalken, 20 μm). Hier ist deutlich das durch das Fentons Reagenz verursachte fransige Aussehen der Zellmembran zu erkennen. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines TNTs, welches zwei Astrozyten miteinander verbindet (Maßstabsbalken, 20 μm).

Abbildung 49 zeigt zwei fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von durch Fentons Reagenz stimulierten Astrozyten, die durch TNTs miteinander verbunden sind. Den Einfluss der freien OH-Radikale [55] auf die Membran der Astrozyten ist in Bild A deutlich durch das fransige Aussehen der Membran zu erkennen, welches auch bei PC12-251 Zellen zu beobachten war. In der Folge wurde eine quantitative Analyse der TNT-Zahl durchgeführt.

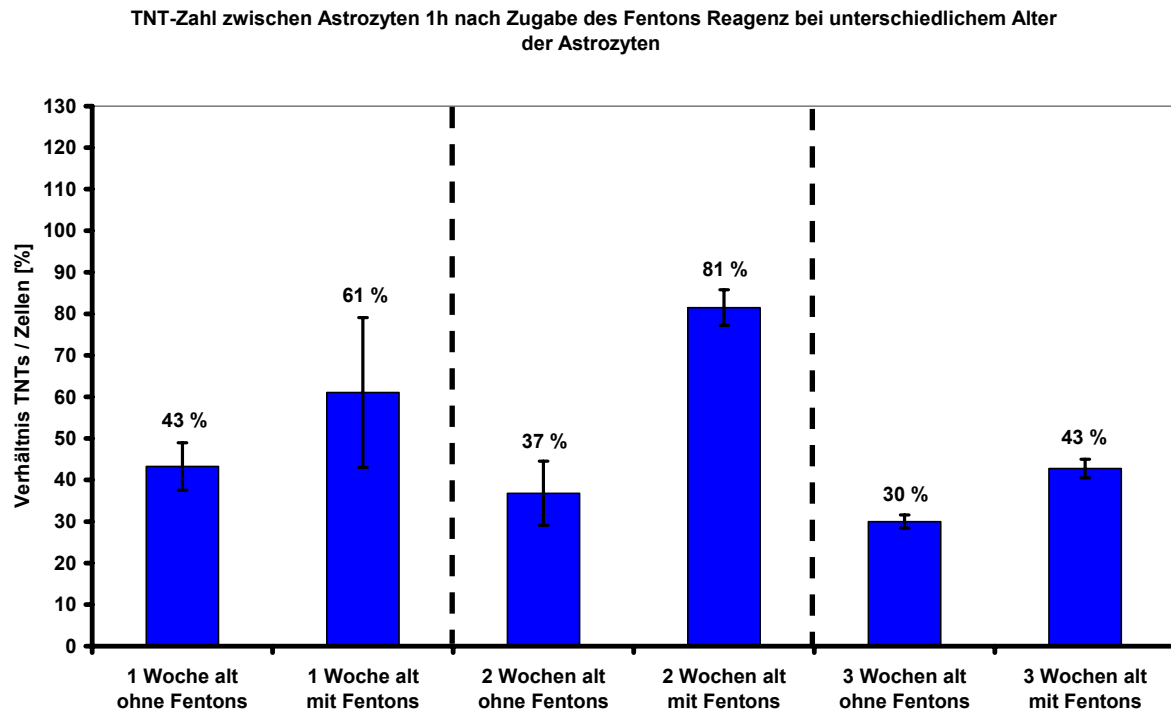


Abbildung 50: Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Astrozyten in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten.

Wird das Verhältnis von TNTs zu Zellen unter diesen Bedingungen analysiert, so fällt im Vergleich zu der Gesamtkokultur (Abbildung 48) auf, dass ein großer Teil (61 %) der TNTs in den Kokulturen zwischen Astrozyten ausgebildet wird (vgl. Abbildung 50). Auch hier werden zwei grundsätzliche Ergebnisse bestätigt. Zum einen nimmt die TNT-Bildung mit steigendem Alter der Astrozyten ab, zum anderen wird die TNT-Bildung zwischen Astrozyten durch die Zugabe des Fentons Reagenz stimuliert, wobei es dadurch bei zwei und drei Wochen alten Astrozyten zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses von TNTs zu Zellen kommt.

Nachdem der stimulierende Effekt des Fentons Reagenz auf die TNT-Bildung zwischen den Astrozyten untersucht wurde, wird im Folgenden der Effekt auf die TNT-Bildung zwischen Astrozyten und Neuronen untersucht.

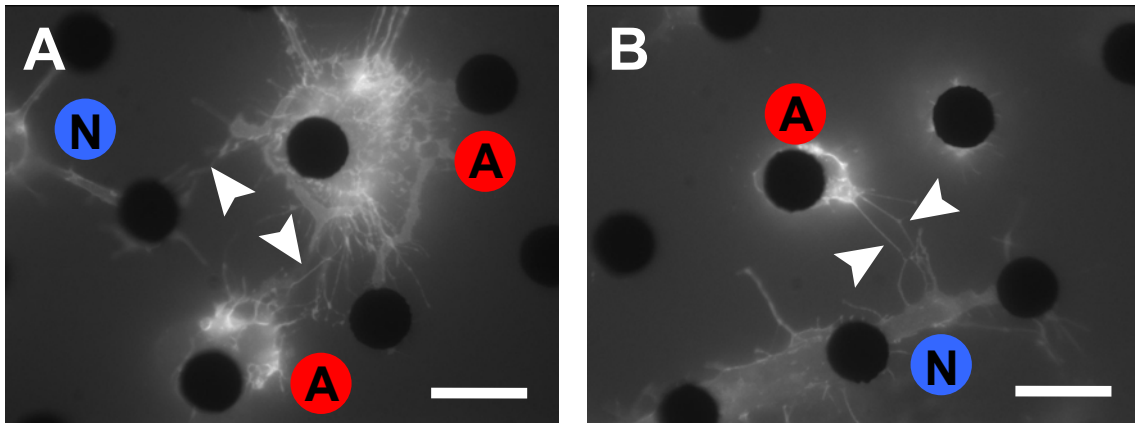


Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A und B) von TNTs (weiße Pfeilspitzen), die zwischen Astrozyten und Neuron aufgespannt sind (Maßstabsbalken, 20 μm). Auch hier ist die fransige Morphologie der Zellmembran zu erkennen, die auf die freien OH-Radikale zurückzuführen sind.

Die Abbildung 51 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Astrozyten und Neuronen, die aufgrund der mikrostrukturierten Oberflächen separiert auf den Goldflächen immobilisiert sind (Bild A und B). Die Detektion von TNTs, die zwischen diesen hippocampalen Zellen aufgespannt sind, wird durch die Separierung der Zellen entscheidend erleichtert. Auch hier wurde eine quantitative Analyse des TNT-Verhältnisses durchgeführt.

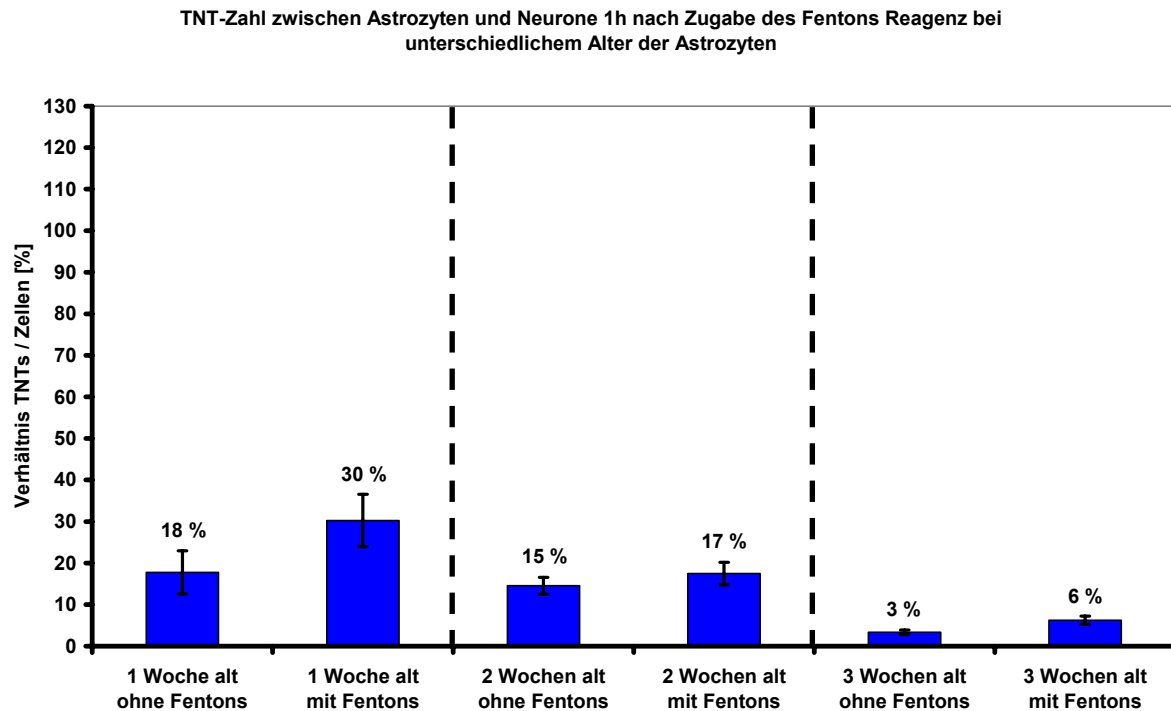


Abbildung 52: Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Astrozyten und Neuronen in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten.

Betrachtet man das Verhältnis von TNTs zu Zellen zwischen Astrozyten und Neuronen, so fällt auf, dass die Anzahl der ausgebildeten TNTs im Verhältnis zu denen zwischen Astrozyten stark reduziert ist (vgl. Abbildungen 50 und 52). Auch hier hat das Alter der Astrozyten in der Kokultur einen Einfluss auf die Anzahl der ausgebildeten TNTs. Die Zugabe des Fentons Reagenz führt wie im Falle der Astrozyten zu einem Anstieg der TNTs zwischen den Astrozyten und Neuronen. In diesem Zusammenhang kann jedoch nur von einem signifikanten Anstieg gesprochen werden, wenn man das Verhältnis von TNTs zu Zellen bei einer drei Wochen alten Kultur betrachtet.

Als letztes wird die Veränderung des Verhältnisses von TNTs zu Zellen bei Neuronen untersucht. Die Analysen ergeben, dass TNTs zwischen Neuronen den kleinsten Anteil aller zwischen den Zellen der Kokultur ausgebildeten TNTs ausmachen. Einige der TNTs, die dennoch zwischen Neuronen detektiert werden konnten, sind in Abbildung 53 dargestellt.

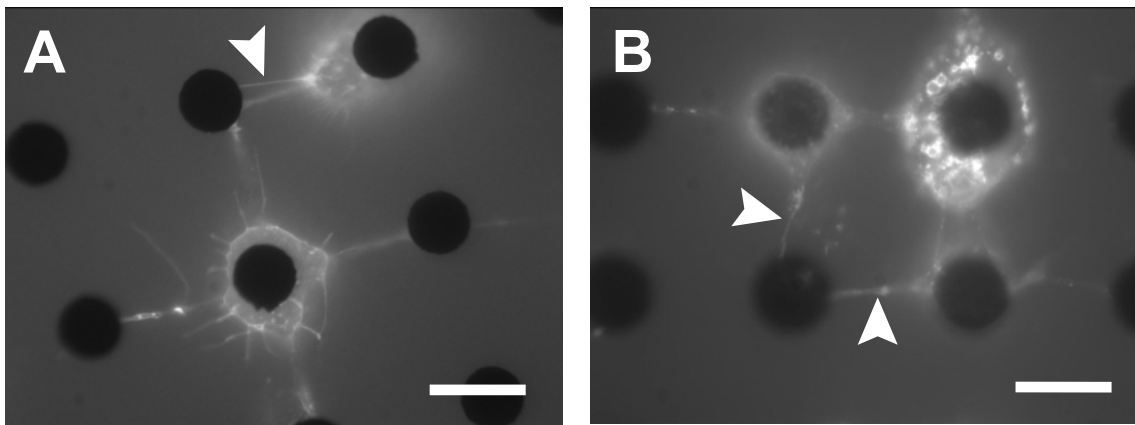


Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A und B) von Neuronen, die durch TNTs (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind (Maßstabsbalken, 20 µm). Hierbei konnten sogar TNT-Netzwerke zwischen Neuronen auf den Mikrostrukturen detektiert werden (B).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 53 A und B) zeigen TNTs, die ausschließlich zwischen Neuronen aufgespannt sind. Dabei konnten sogar TNT-Netzwerke beobachtet werden (B), die sich über mehrere Goldpunkte erstrecken. Diese Anordnung ist vergleichbar mit den TNT-Netzwerken bei PC12-251 Zellen. In diesen Fällen werden die auf den biofunktionalisierten Goldflächen einzeln immobilisierten Neurone durch TNTs miteinander verbunden.

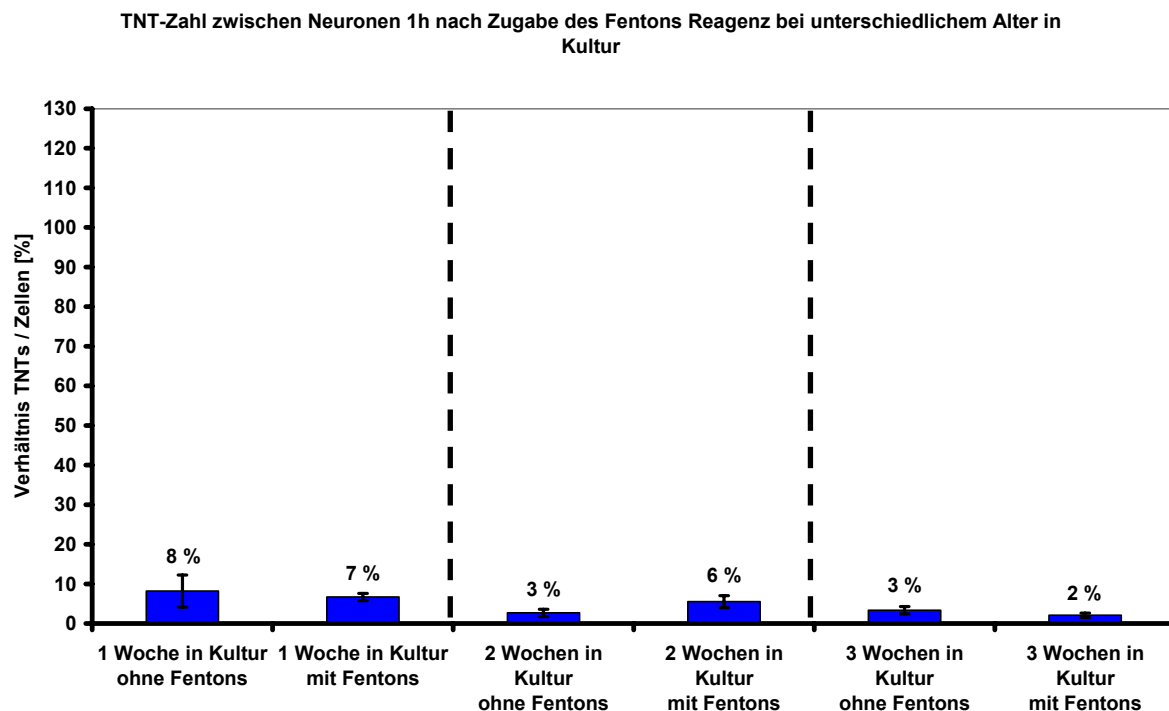


Abbildung 54: Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Neuronen.

Abbildung 54 zeigt die statistische Auswertung des Verhältnisses von TNTs zu Zellen in Prozent. Dabei fällt auf, dass dieses Verhältnis bei einem Alter der Kultur von einer Woche bei nur 8 % liegt. Die Ausbildung von TNTs wird zusätzlich durch das steigende Alter der Kultur reduziert. Bei einem Alter von drei Wochen sinkt das Verhältnis von Zellen zu TNTs auf 3 %. Betrachtet man die Werte, die durch die Zugabe des Fentons Reagenz erzielt werden, so findet man interessanterweise bei einem Alter der Kultur von ein und drei Wochen eine leichte Reduktion des Verhältnisses von TNTs zu Zellen. Lediglich ein tendenzieller Anstieg kann bei einem Alter von zwei Wochen beobachtet werden.

Abschließend verdeutlichen die Ergebnisse, dass durch Zugabe des Fentons Reagenz sowohl zwischen Astrozyten, als auch zwischen Astrozyten und Neuronen der Kokultur eine Stimulation der TNT-Bildung erzielt werden kann. Lediglich zwischen den Neuronen der Kokultur bewirkt die Zugabe des Fentons Reagenz keine Stimulation der TNT-Bildung.

Membranphänomene hervorgerufen durch das Fentons Reagenz

Ein interessanter Nebenbefund, der sich im Zuge der Experimente zur Stimulation der TNT-Bildung durch Zugabe des Fentons Reagenz [55,56] zu den primären neuronalen Zellen zeigte, ist eine stark veränderte Membranmorphologie bei sowohl einigen der primären Astrozyten, als auch Neuronen der Kokultur (Abbildung 54, A-D). Dieses Phänomen wird in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse bei etwa 10 % aller mit dem Fentons Reagenz behandelten hippokampal Zellen beobachtet.

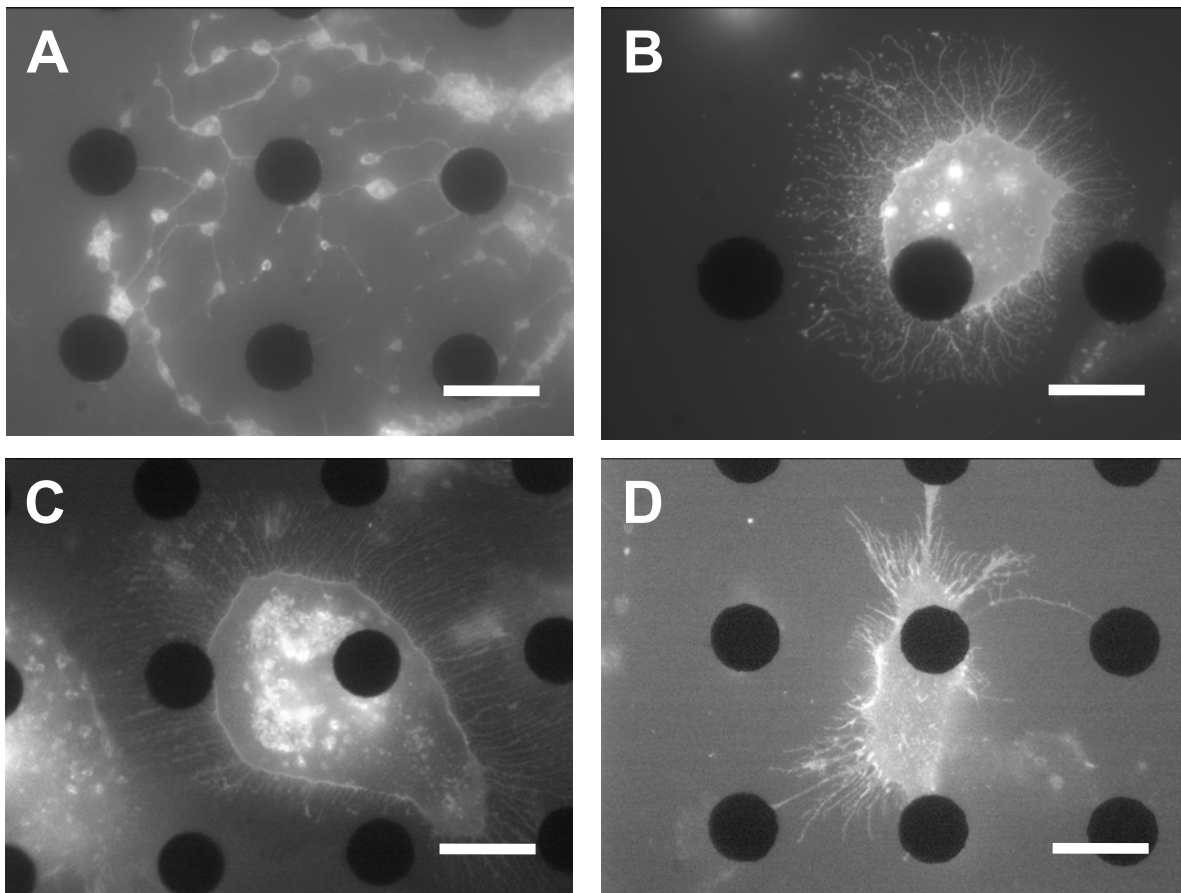


Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung (A) eines mit Fentons Reagenz behandelten Neurons. Hier sind deutlich die ausladenden Dendritenverzweigungen erkennbar. B, C und D: Fluoreszenzbilder von Membranverzweigungen von mit Fentons Reagenz stimulierten Astrozyten. Die Astrozyten zeigen deutlich lange Membranausläufer (Maßstabsbalken, 20 μm).

Vor allem einzelne Astrozyten zeigen bei der Behandlung mit dem Fentons Reagenz stark verzweigte und lange Membranausläufer (Abbildung 55, B - D), die mit dem Substrat assoziiert sind und sich dadurch deutlich von TNTs unterscheiden. Neurone weisen ausladende und verwinkelte Dendritenausläufer auf (Abbildung 55 A). Diese interessanten morphologischen Veränderungen scheinen durch die Zugabe des Fentons Reagenz erzeugten freien OH-Radikale hervorgerufen zu werden. Diese sind in der Lage, Wasserstoffatome von Molekülen zu abstrahieren, und diese zu aktivieren, mit Sauerstoff zu reagieren [56]. Auf diese Weise wird wahrscheinlich die Glykostruktur der Zellmembranen verändert, was bei Neuronen eine Vielzahl von Verzweigungen der Dendriten bedingt (Abbildung 55, A). Bei Astrozyten führt diese Veränderung zu dem weitaus auffälligeren Effekt der sonst für Astrozyten untypischen Membranverzweigungen (Abbildung 55, B-D).

7. Diskussion

Der Großteil der Analysen von eukaryotischen Zellkulturen erfolgte bisher auf Glassubstraten, die bestenfalls mit ganzen Molekülen, wie z.B. Fibronectin oder Laminin, homogen beschichtet wurden. Diese Beschichtung diente vor allem der verbesserten Adhäsion der Zellen auf den verwendeten Substraten. Diese Vorgehensweise hat jedoch den Nachteil, dass die Moleküle auf der Substratoberfläche ungeordnet und unkontrollierbar vorliegen. Ebenso lässt sich die Orientierung der Moleküle nicht vorhersagen, geschweige denn beeinflussen. Unkontrollierbar bleibt ebenfalls die Schichtdicke der Moleküle. Neuerdings halten jedoch auch andere Substrate bei zellbiologischen Anwendungen Einzug. So wurden bereits Peptid-beschichtete Goldoberflächen als Substrat für strukturierte Netzwerke hippokampaler Neuronen herangezogen [84]. Ebenso wurden biofunktionalisierte Oberflächen verwendet, um die Bildung und Organisation neuronaler Netzwerke zu untersuchen [64]. Mikrostrukturierte Oberflächen wurden ebenfalls bereits erfolgreich zur Analyse von neuronalen Netzwerken verwendet. So wurde ein System beschrieben, welches es erlaubt, Netzwerke bestehend aus embryonalen cortikalen Neuronen der Ratte in einer kontrollierten Geometrie anzuordnen [86]. Der entscheidende Vorteil dieser Substrate liegt in der Kontrollierbarkeit der auf selbigen angebundene Moleküle.

Auch die in dieser Arbeit als Substrat zur Zellkultivierung verwendeten mikrostrukturierten Oberflächen fanden ebenfalls bereits erfolgreiche Anwendung [70]. So ermöglichen diese eine Kultivierung verschiedenster Zelltypen, wie z.B. in dieser Arbeit PC12-251 Zellen, sowie primäre Astrozyten und Neurone. Weiterhin offeriert das in dieser Arbeit geschaffene mikrostrukturierte Plattformsystem kontrollierte und reproduzierbare Bedingungen. In der vorliegenden Arbeit diente es der Analyse zellkommunikativer Prozesse in unterschiedlichen Zellsystemen, wobei sich zeigte, dass es für die Analyse komplexer biologischer Fragestellungen, die bislang nur schwer oder gar nicht zu adressieren waren, wie z.B. verschiedene Aspekte bezüglich der Bildung bzw. Funktion von TNTs, ideale Voraussetzungen bietet.

7.1 Anwendung von mikrostrukturierten Oberflächen als Plattform zur TNT-Analyse

Seit der Entdeckung und Beschreibung von *Tunneling Nanotubes* (TNTs) durch Rustom et al. [32] bezieht sich die Großzahl der Untersuchungen von TNTs auf Zellen, die auf Substraten wie Glas oder beschichtetem Glas kultiviert wurden [32,69]. Dabei erwies sich der großflächige Kontakt der Zellen zueinander für die Detektion der TNTs als sehr problematisch. Wie bereits in den Studien zur Entdeckung wurde auch in dieser Arbeit die TNT-Bildung am Beispiel der phäochromozytomen Zelllinie PC12-251 untersucht. Ein großer Vorteil des PC12-251 Zellsystems ist ihrer kugeligen Morphologie und ihre geringe Größe mit einem Durchmesser von ca. 15 µm. Die Zellen sind auch zur Kultivierung auf den mikrostrukturierten Oberflächen bestens geeignet, was in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden konnte [70]. Zusätzlich zum permanenten PC12-251 Zellsystem wurde die TNT-Bildung auch bei primären hippocampalen Astrozyten und Neuronen der Ratte analysiert.

Die durch Photolithographie hergestellten Oberflächen dienen dabei als standardisierte Plattformen, die eine präzise Analyse verschiedenster TNT-Parameter, wie zum Beispiel ihrer Länge, erlauben. Durch die definierten Abstände der Goldflächen auf den Oberflächen zueinander wird ein großflächiger Zellkontakt der Zellen verhindert, die auf den mikrostrukturierten Goldflächen immobilisiert sind. Dies ermöglicht eine verbesserte Detektierbarkeit von zwischen den Zellen ausgebildeten TNTs, die bei einem direkten Zellkontakt nicht visualisiert werden können.

Da die verwendeten Zellen auf den Goldflächen der mikrostrukturierten Oberflächen und nicht auf den Glasflächen zwischen den Goldstrukturen immobilisiert werden sollen, wurde die Affinität der Zellen zu den Goldflächen durch deren Biofunktionalisierung erhöht. Zu diesem Zweck standen unterschiedliche Liganden zur Auswahl: 11-Mercaptoundecansäure, 10-Aminodecan-1-thiol, und das IKVAV-Peptid [87]. QCM-Messungen ergaben, dass alle drei möglichen Liganden

kovalent an eine Goldoberfläche angebunden werden können und nicht unspezifisch an Glas adsorbieren (siehe Abschnitt 6.1.3). Bei den Experimenten zur Anbindung der Zellen zeigte sich jedoch, dass der IKVAV-Ligand die höchste Affinität der PC12-251 Zellen zu den damit biofunktionalisierten Oberflächen herstellt und zusätzlich dafür sorgt, dass die Zellen vereinzelt auf den Goldflächen immobilisiert werden (siehe Abschnitt 6.2.1). Das Pentapeptid IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) ist eine Zell-Bindungs-Domäne der A-Kette von Laminin [64], die Zelladhäsion und neuronales Zellwachstum vermittelt [65]. Der in dieser Arbeit verwendete Ligand ist ein Peptid aus 19 Aminosäuren. Es enthält die IKVAV-Zell-Bindungs-Domäne und entspricht dem Bereich 2091 - 2108 der Laminin A Kette [66]. Es weist zusätzlich ein N-terminales Cystein auf, aufgrund dessen es kovalent an die Goldflächen auf den mikrostrukturierten Oberflächen angebunden werden kann. Im Gegensatz dazu wurden die Goldflächen der Mikrostrukturen für die Kultivierung der hippokampalen Zellen mit 10-Aminodecan-1-thiol biofunktionalisiert, welches durch die kovalente Bindung an die Goldflächen laut Zellexperimenten für die Anbindung der Zellen am besten geeignet ist. Zwar konnte für das IKVAV-Peptid die Fähigkeit nachgewiesen werden, bei Neuronen Adhäsion zu vermitteln, jedoch zeigte sich in den Experimenten, dass die sich ebenfalls in der Kokultur befindenden Astrozyten keine Affinität zu den mit dem IKVAV-Peptid funktionalisierten Goldflächen aufwiesen. Dieses Ergebniss ist konsistent mit Resultaten aus vorangegangenen Studien [64].

Zur Visualisierung einzelner und sogar mehrfach-TNTs zwischen den Zellen fanden Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie Anwendung. Die Existenz von mehrfach-TNTs zwischen zwei Zellen (Abbildung 15) wirft die Frage auf, ob in diesem Fall von einer gegenseitigen Kommunikation beider Zellen ausgegangen werden kann. Dies setzt allerdings voraus, dass die Bildung der TNTs von beiden Zellen ausgeht und somit beide Zellen Sender- und Empfängerzelle zur selben Zeit sind. Dies experimentell zu klären wird eine wichtige Aufgabe zukünftiger Experimente darstellen. Generell konnte sowohl bei Fluoreszenz-, als auch bei Rasterelektronenmikroskopie beobachtet werden, dass sich die Gesamtzahl

der TNT-Strukturen zwischen Zellen, die auf einem Glassubstrat kultiviert werden, nur unwesentlich von der zwischen Zellen, die auf den strukturierten Oberflächen kultiviert werden, unterscheidet (siehe Abbildung 22). Dies zeigt, dass die Zellen durch die Kultivierung auf den mikrostrukturierten Oberflächen nicht in ihrer Fähigkeit, TNTs auszubilden, beeinflusst werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch die Morphologie der Zellen und TNTs nicht verändert wird, wenn diese auf den funktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen immobilisiert sind, zeigt sich, dass das Plattformsystem für TNT-Analysen sehr gut geeignet ist.

Durch die über die mikrostrukturierten Oberflächen vorgegebenen Abstände der Zellen zueinander wurde auch eine genaue Analyse der unterschiedlichen Längen von TNTs ermöglicht, die zwischen den separierten Zellen aufgespannt werden. Die TNT-Länge, die dabei am häufigsten beobachtet werden konnte, war 4 μm . Die kürzesten detektierbaren TNTs weisen eine Länge von 2 μm auf. Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist es gelungen, TNTs mit einer Länge von über 500 μm zu visualisieren (Daten nicht gezeigt). Diese besonders langen TNTs blieben sowohl bei Durchlicht-, als auch bei Fluoreszenzaufnahmen unentdeckt. Interessanterweise verbinden diese langen TNTs auf den mikrostrukturierten Oberflächen nicht zwei Zellen auf dem direkten Weg, sie überspannen vielmehr mehrere Zellen und bilden so ganze TNT-Netzwerke aus (siehe Abbildung 24 A). Möglicherweise werden diese TNTs aufgrund der Fixierung der Proben mit einer 2.5 %igen Glutaraldehydlösung bei der Probenvorbereitung konserviert. Auch Rustom et al. beschrieb bei PC12-251 Zellen TNTs mit einer Länge von über 150 μm [32]. Diese Beobachtungen zur Längenverteilung variieren in anderen Studien und verschiedenen Zellsystemen [32,37]. So wurden z.B. bei natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) durchschnittliche TNT-Längen von 30 μm beobachtet. Die hier ermittelte Länge, die etwas vom erwarteten Wert abweicht, lässt sich dadurch erklären, dass nicht alle PC12-251 Zellen zentriert auf den Goldflächen immobilisiert sind.

Die Untersuchung der Höhendifferenz der Ansatzpunkte eines TNTs hatte zum Ziel zu klären, ob TNTs horizontal zwischen den Zellen aufgespannt sind, oder einen Neigungswinkel aufweisen. Die Ergebnisse zeigen bei PC12-271 Zellen, dass die TNTs im geringsten Abstand zwischen den Zellen aufgespannt sind und somit in den meisten Fällen parallel zur Substratebene vorliegen. Diese Beobachtung bestätigt damit Ergebnisse früherer Studien [32].

Um die Detektion von TNTs zwischen PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen auch über molekulare Markerproteine zu realisieren, wurden diese mit pEGFP-F transient transfiziert. Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass die Zellen dieses Markerprotein zwar exprimieren und zur Plasmamembran transportieren (siehe Abbildung 27), die TNT-Bildung dadurch jedoch vermutlich vollständig inhibiert wird. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Studien, in denen TNTs bei pEGFP-F transfizierten Zellen eindeutig detektiert werden konnten [32]. Ein weiterer Ansatz, die TNT-Bildung bei PC12-251 Zellen zu visualisieren, war die Transfektion der Zellen mit dem viralen Fusogen VSV-G. Die Transfektion zeigte allerdings keine Stimulation der TNT-Bildung, vielmehr wurde die TNT-Bildung, wie bei der Transfektion mit pEGFP-F, offenbar vollständig inhibiert. Ein interessanter Nebeneffekt waren jedoch die durch das VSV-G Protein ausgelösten morphologischen Veränderungen der PC12-251 Zellen, die wahrscheinlich auf die zytoskeletalen Veränderungen der Zellen durch die Transfektion mit dem Fusogen zurückzuführen sind (siehe Abbildung 28). Die transfizierten Zellen waren ausserdem deutlich größer als die nicht transfizierten Zellen, was möglicherweise auf Zellfusionen aufgrund der fusogenen Eigenschaften des VSV-G zurückzuführen sein könnte. Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen, dass sowohl die Transfektion der PC12-251 Zellen mit pEGFP-F, als auch mit VSV-G zu einer vollständigen Inhibition der TNT-Bildung führte. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Ergebnissen aus Studien, die auf Glassubstraten durchgeführt wurden. Der Grund für diese Unterschiede ist bislang weitgehend unklar.

In einer Kooperationsarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Gerdes (Institut für Biomedizin, Universität Bergen und Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften, Universität Heidelberg) konnte gezeigt werden, dass die entwickelten mikrostrukturierten Oberflächen auch zur Analyse von TNT-ähnlichen Strukturen zwischen primären embryonalen Astrozyten und Neuronen herangezogen werden können. Primäre Astrozyten und Neurone sind deshalb von großem Interesse, da bekannt ist, dass für diese Zelltypen auch im physiologischen Kontext interzelluläre Kommunikation von essentieller Bedeutung ist [88,89]. So sind Astrozyten unter anderem über *Gap Junctions* miteinander vernetzt. Signale können sich so in Form einer Kalziumwelle über mehrere Astrozytenzellkörper ausbreiten [90,91,92]. Außerdem konnten Neurotransmitterrezeptoren (z.B. Glutamat-Rezeptoren) in Astrozyten nachgewiesen werden [93,94]. Über Neurotransmitter, die die Astrozyten selbst exprimieren, könnten sie auch mit anderen neuronalen Zellen kommunizieren. In diesem Zusammenhang konnten bereits TNT-ähnliche Strukturen in einer Kokultur von Astrozyten und Neuronen nachgewiesen werden [95]. Die Frage, der hier nachgegangen werden sollte, war die nach dem Verhalten der neuronalen Zellen der Kokultur, wenn sie aufgrund der vorgegebenen Abstände auf mikrostrukturierten Oberflächen gezielt separiert würden. Dabei konnten TNTs ebenfalls zwischen Astrozyten und Neuronen hippokampaler Kokulturen visualisiert werden (siehe 6.3.2). Hierbei wurde gefunden, dass TNTs zwischen Astrozyten, Neuronen und Astrozyten, sowie zwischen Neuronen aufgespannt sind (siehe 6.3.2). Dabei war auffällig, dass zwischen Neuronen nur sehr wenige TNTs gefunden werden konnten. Sowohl in diesem Fall, als auch bei der TNT-Bildung zwischen Astrozyten, bleibt jedoch die Frage offen, von welcher Zelle diese Bildung initiiert wird. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Die Existenz von TNTs zwischen Astrozyten und Neuronen macht zum Beispiel im Kontext der Versorgungsfunktion von Astrozyten, zum Beispiel mit Cholesterol, auf jeden Fall Sinn. Gleichzeitig eröffnet es aber Fragen nach einer Beteiligung von TNTs an den bereits beschriebenen Kommunikationssystemen [39].

7.2 Untersuchungen zur chemischen Beeinflussung der TNT-Bildung

Die einzigartigen Charakteristiken der biofunktionalisierten Oberflächen ermöglichten auch präzise, reproduzierbare Untersuchungen zur chemischen Beeinflussung der TNT-Bildung. Die Zugabe einer Eisen(II)sulfat/H₂O₂-Lösung (Fentons Reagenz) zu PC12-251 Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen führte zu einer dramatischen Reduktion der TNT-Anzahl. Das Wasserstoffperoxyd in der Lösung reagiert in einer Fentons Reaktion zu OH-Radikalen, welche in der Lage sind, Wasserstoffatome von Molekülen, wie z.B. Proteinen, zu abstrahieren [56]. Dieser Vorgang verändert die Beschaffenheit der Zellmembran derart, dass davon ausgegangen werden kann, dass bereits dadurch die TNT-Neubildung dramatisch reduziert wird.

Da die Zusammensetzung und Beschaffenheit von Zellmembranen offenbar entscheidend für die TNT-Bildung und TNT-Stabilität sind, wurde in einem weiteren Experiment der Cholesterolgehalt der Zellmembranen von PC12-251 Zellen durch die Zugabe einer Methyl- β -Cyclodextrin-Lösung künstlich verändert. Cholesterol ist essentiell für die Fluidität von Zellmembranen. Die Stabilität und Verformbarkeit der Membranen wird also stark von Gehalt an Cholesterol beeinflusst. Senkt man den Cholesterolgehalt der Zellmembran durch Behandlung der Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD), einem Cholesterol-extrahierenden Reagenz, so wird die Zellmembran fluider. Die Versuche mit PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen ergaben eine Reduktion der TNT-Anzahl von 3 %, wenn die Zellen mit M β CD behandelt werden. Dies deckt sich mit vorangegangenen Studien, jedoch konnte hier die bereits von A. Rustom beobachtete Reduktion der TNT-Anzahl von 38 % bei einer M β CD-Konzentration von 5 mM nicht erreicht werden [69]. Die beobachtete Reduktion der TNT-Anzahl um lediglich 3 % auf den mikrostrukturierten Substraten lässt sich allerdings durch die Durchführung des Experiments erklären. So verbleibt M β CD für die gesamte Inkubationszeit von 2 Stunden im Zellkulturmedium, die Zellen werden nicht wie in der vorausgegangenen Arbeit beschrieben vor dem Ausplattieren mit M β CD inkubiert [69]. Der mikroskopische

TNT-Nachweis erfolgt nach dieser 2 stündigen Inkubation. Diese Inkubationsphase könnte womöglich zu lange sein, sodass nach dieser Zeit die TNT-Bildung wieder stattfindet und als Resultat TNTs, wenn auch in leicht reduzierter Zahl, detektiert werden können.

Vergleicht man die Ergebnisse aus beiden Experimenten zur Plasmamembranveränderung, so stellt man fest, dass sowohl oxidativer Stress, als auch der Entzug von Cholesterol aus der Zellmembran von PC12-251 Zellen zu einer dramatischen Abnahme der TNT-Anzahl führen. Der Entzug von Cholesterol aus Zellmembranen führt zu einer Zunahme der Fluidität der Membran [96], was sich offenbar negativ auf die TNT-Bildung auswirkt. Da diese negative Auswirkung auch bei oxidativem Stress der Zellen beobachtet wurde, kann der Schluss gezogen werden, dass die freien OH-Radikale bei PC12-251 Zellen ebenfalls dazu führen, dass die Zellmembran fluider wird und somit die TNT-Bildung inhibiert wird. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die freien OH-Radikale auch Einfluß auf andere Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Aktinpolymerisation, haben.

Überraschenderweise führt in der Kokultur aus Astrozyten und Neuronen, die auf den mikrostrukturierten Oberflächen kultiviert wurden, die Zugabe des Fentons Reagenz und somit die dadurch erzeugten freien OH-Radikale, zu einer Zunahme der TNT-Bildung. Diese korreliert mit vorangegangenen Studien [40]. Differenziert man bei dieser Beobachtung nun zwischen den verschiedenen Zelltypen, bei denen die TNTs ausgebildet werden, so wird deutlich, dass die Zunahme der TNT-Bildung am signifikantesten zwischen Astrozyten ist. Betrachtet man den Anstieg der TNT-Bildung zwischen Astrozyten und Neuronen auf den mikrostrukturierten Oberflächen, so ist zwar eine stimulierende Veränderung der TNT-Bildung zu beobachten, diese bleibt jedoch wesentlich hinter der zwischen Astrozyten zurück. Der geringste Effekt wurde zwischen den Neuronen der Kokultur beobachtet. Vielmehr wurde hier sogar ein Rückgang der TNT-Bildung beobachtet, der in etwa dem bei PC12-251 Zellen entspricht.

Wird nun der Einfluss von oxidativem Stress auf die Zellen der unterschiedlichen Zellsysteme verglichen, so lässt sich sagen, dass die Auswirkungen auf die TNT-Bildung grundlegend verschieden sind. Freie OH-Radikale führen bei PC12-251 Zellen zu einer Zunahme der Fluidität der Zellmembranen, was zu einer Reduktion der TNT-Bildung führt. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass freie OH-Radikale bei primären Astrozyten und Neuronen in Kokultur dazu führen, dass die TNT-Bildung zwischen Astrozyten und Neuronen stark zunimmt. Diese Zunahme resultiert unter anderem daraus, dass die Zellmembran der Astrozyten eine gelartige Struktur annimmt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die Zugabe des Fentons Reagenz die Aktinpolymerisation bei primären Astrozyten induziert wird, was mit einer vermehrten TNT-Bildung der Astrozyten korreliert [40]. Dies wird gestützt durch den Befund, dass TNTs in ihrer gesamten Länge von F-Aktin-Bündeln durchzogen sind und ihre Ausbildung vermutlich von der Aktinpolymerisation abhängig ist [32]. Zusätzlich zu der gesteigerten Aktinpolymerisation kommt weiterhin die durch die freien OH-Radikale verursachte gelartige Struktur der Membran. Diese Veränderung der Beschaffenheit der Zellmembran zeigt sich deutlich auch in den morphologischen Veränderungen der primären Zellen (vgl. Abbildungen 55ff.), die während der Mikroskopie beobachtet werden konnten.

Die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf denselben oxidativen Stress lassen vermuten, dass die Zusammensetzung und Beschaffenheit der Zellmembranen bei den unterschiedlichen Zellen prinzipiell variiert, wenn nicht sogar vollkommen unterschiedlich ist. So lassen Studien an Primärkulturen aus Neuronen vermuten, dass Neuronen während der Entwicklung die Cholesterolsynthese reduzieren oder sogar unterlassen, um Energie zu sparen. Stattdessen importieren sie Cholesterol von Astrozyten zum Beispiel durch Lipoproteine [26].

Ein weiterer interessanter Befund der Studien war, dass das Alter der Astrozyten offenbar einen deutlichen Einfluss auf die TNT-Bildung hat, und zwar unabhängig davon, ob die Zellen den freien OH-Radikalen ausgesetzt sind oder nicht. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob möglicherweise zu verschiedenen

Zeiten der Entwicklung eines Organismus unterschiedliche TNT-Zahlen auftreten. Dies macht im Hinblick entwicklungsbiologischer Modelle, zum Beispiel der Musterbildung im Embryo, durchaus Sinn.

7.3 Untersuchung zur mechanischen Beeinflussung der TNT-Bildung

Bei Tunneling Nanotubes handelt es sich um extrem sensitive Strukturen, die sogar bei leichten Bewegungen des Zellkulturmediums, das sie umgibt, zerstört werden können [69]. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die TNT-Anzahl zwischen Zellen durch chemische Einflüsse stark beeinflusst werden kann. So führt der zuvor beschriebene oxidativer Stress durch Zugabe von Fentons Reagenz, bzw. die Zugabe von Methy- β -Cyclodextrin, dazu, dass die TNT-Anzahl zwischen PC12-251 Zellen reduziert wird (siehe Abschnitt 6.2.5).

Die Resultate der Versuche zur Auswirkung von physikalischem Stress auf die TNT-Bildung zeigen, dass ein angelegter konstanter Mediumfluss zu einer Reduktion des Verhältnisses von TNTs zu Zellen auf unter 20 % führt. Dieser Fluss wird genau eine Stunde nach dem Ausplattieren der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen gestartet. Gerade in dieser kritischen TNT-Bildungsphase führt der Fluss entweder zu der Zerstörung einer Vielzahl der bestehenden TNTs, sodass diese nicht mehr durch die mikroskopischen Verfahren detektiert werden können, oder zu einer Inhibierung der TNT-Neubildung. Die Beobachtungen der Versuche bestätigen also, dass TNTs mechanosensitiv auf physikalischen Stress reagieren, d.h. die TNT-Anzahl durch den angelegten Mediumfluss merklich abnimmt. Des Weiteren kann spekuliert werden, dass Gradienten potentieller Signalmoleküle, die das zielgerichtete Wachstum der TNTs steuern, durch den angelegten Fluss des Zellkulturmediums derart in ihrer Konzentration sinken, dass dies zu dieser dramatischen Reduktion der TNT-Anzahl führt. Um welche Moleküle es sich dabei handeln könnte, konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. Jedoch

stellt das entwickelte System bestehend aus der eigens konstruierten *Flow Cell* und den mikrostrukturierten Oberflächen ideale Plattformen für weitere Experimente in diese Richtung dar.

Interessant ist die Tatsache, dass die TNTs, die im Fluss detektiert werden können, nicht ausschließlich in Flussrichtung zwischen den PC12-251 Zellen ausgebildet werden. Vielmehr konnten TNTs im Fluss detektiert werden, die orthogonal und auch diagonal zur Flussrichtung zwischen den Zellen aufgespannt sind. Die Scherkraft der Flüssigkeit ist offenbar nicht groß genug, diese TNTs zum Reißen zu bringen. Da TNTs vermutlich zielgerichtet ausgebildet werden, müsste man erwarten, dass, wenn lösliche Signalmoleküle beteiligt sind, durch den angelegten Fluss die Bildungsrichtung vorgeben scheint. Aufgrund dieser Beobachtung liegt die Vermutung nahe, dass bereits geringste Konzentrationen von Signalmolekülen ausreichend sein könnten, um das zielgerichtete Ausbilden von TNTs veranlassen zu können. Allerdings kann bislang nicht zwischen im Mediumfluss neu gebildeten, bzw. bereits bestehenden TNTs unterschieden werden. Die Experimente zeigen jedoch sicher, dass einzelne TNTs durchaus größeren mechanischen Einflüssen widerstehen können. An diesem Punkt kann über die Existenz verschiedener Arten von TNTs spekuliert werden. In diesem Zusammenhang beschrieb bereits Davis et al. die Existenz zweier unterschiedlicher Arten von TNTs, die sich in ihrer zytoskeletalen Struktur und in ihren funktionalen Eigenschaften unterscheiden [38]. Bezogen auf die Ergebnisse der Experimente zur mechanischen Beeinflussung von TNTs könnte also spekuliert werden, dass auch bei PC12-251 Zellen unterschiedliche TNT-Arten existieren, die unterschiedliche Stabilitäten besitzen. Dies bedeutet, dass genau der Teil TNTs dem Mediumfluss standhalten kann, der gegenüber dem anderen Teil in seinen strukturellen Eigenschaften stabiler ist. Mechanosensitive TNTs könnten aufgrund dieser Annahme dem Fluss nicht widerstehen und würden infolgedessen zerreißen. Letztendlich könnte davon ausgegangen werden, dass die trotz des Flusses detektierbaren TNTs jener Gruppe angehören, die sich durch ihre strukturelle Standfestigkeit von den restlichen TNTs abgrenzen.

Ein interessanter Beweis für die Stabilität von einzelnen TNTs gegenüber mechanischen Einflüssen wurde ebenfalls während der Mikroinjektion von Cytochrome C in zwei durch ein TNT verbundenen Zellen erbracht. Zunächst konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass das TNT nicht durch die Injektion der Cytochrome C Lösung in die Zellen zerstört wird (siehe Abschnitt 6.2.6). Des Weiteren bleibt die Stabilität des TNTs auch dann über einen Zeitraum von bis zu zwei Stunden erhalten, wenn die beiden Zellen aufgrund des injizierten Apoptoseinitiators apoptotisch werden. Dies ist insofern bemerkenswert, da die Zellen aufgrund der Apoptose schrumpfen und auf der Oberfläche massiv apoptotische Vesikel gebildet werden (siehe Abbildung 33).

Aufgrund der Tatsache, dass TNTs nicht zerreißen, wenn Zellen Substanzen durch Mikroinjektion injiziert werden, ist diese Methode in Kombination mit den mikrostrukturierten Oberflächen prädestiniert, künftig einen möglichen TNT-basierten Transfer von Molekülen zu untersuchen [32]. Dabei könnte zunächst eine Substanz der einen von zwei durch ein TNT verbundenen Zellen injiziert werden. Der mögliche Transport dieser Substanz durch das TNT kann dann zum Beispiel verfolgt werden, indem die eingebrachte Substanz fluoreszenzmarkiert ist. Gerade bei der Injektion eines Apoptoseinitiators wie Cytochrome C wäre es interessant zu beobachten, ob die Substanz durch den Transport durch das TNT ebenfalls in der Empfängerzelle die Induktion von Apoptose veranlasst.

Die überraschende Stabilität einzelner TNTs warf die Frage nach der Kraft auf, die nötig ist, ein zwischen zwei Zellen aufgespanntes TNT zum Reißen zu bringen. Diese Kraft wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM) ermittelt. Das AFM wurde ursprünglich entwickelt, um Oberflächen von nicht leitenden Materialien durch das Verfolgen der Deformation eines Mikrometer kleinen Cantilevers während des Scannens über eine Probe darzustellen [97]. Der Cantilever kann jedoch auch als Kraftsensor verwendet werden. Auf diese Weise ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gelungen, die Kraft zu ermitteln, die für das Zerreißen eines TNTs aufgebracht werden muss.

Die aus den Versuchen gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Abriss eines TNTs stufenweise erfolgt. Zusammen mit Studien, die zeigen, dass ein TNT in seiner gesamten Länge von einem prominenten F-Aktinbündel durchspannt wird [32], kann spekuliert werden, dass die F-Aktin Bündel solange nacheinander reißen, bis schließlich der „leere“ Membranschlauch reißt. Die aus den Versuchen ermittelte mittlere Kraft, die aufgebracht werden muss, um ein TNT abzureißen, beträgt $767.6 \text{ pN} \pm 44.4 \text{ pN}$. Die Kraft, die nötig ist, die Bindung zwischen zwei Aktin Monomeren aufzubrechen, ist für F-Aktin $108 \pm 5 \text{ pN}$ und fast unabhängig von der Länge des Filaments [98]. Der Vergleich dieses Wertes mit dem für das Reißen eines TNTs in dieser Arbeit ermittelten Wertes lässt spekulieren, dass möglicherweise bis zu sieben F-Aktin Filamente in einem TNT vorkommen könnten. Aufgrund der Dicke eines TNTs von ca. 50 nm [32] im Vergleich zur ungefähren Dicke eines Aktinbündels von 7 nm ist die ermittelte Anzahl von Aktin-Filamenten also durchaus realistisch.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass die frequent in TNTs zu beobachtete Ausstülpung eines TNTs als Reservoir für zusätzliche Membran genutzt werden kann. Dieses Membranreservoir stellt offensichtlich zusätzliche Zellmembran bereit, auf die bei Bedarf zurückgegriffen werden kann. Wird ein TNT künstlich gedehnt, z.B. im Zuge dieser Arbeit durch Wegziehen der Zellen, zwischen denen das TNT befestigt ist, so reißt das TNT erst dann, wenn die gesamte zusätzlich vorhandene Membran des Reservoirs aufgebraucht ist (siehe Ergebnisse 6.2.8). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch D. Raucher und M. P. Sheetz [81]. Sie kamen aufgrund der Resultate ihrer Versuche zu dem Schluss, dass Zellen ein Plasmamembran-Reservoir aufrechterhalten, um Änderungen in der Membranspannung auszugleichen. Dieses Phänomen konnte jedoch nicht bei allen TNTs beobachtet werden, und es ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, warum solche Membranreservoirs nicht bei allen TNTs vorhanden sind. Bisher wurden solche Ausstülpungen der TNTs als Membranausstülpungen, bedingt durch Organellen, zum Beispiel Endosomen, angesehen [69].

Diese und auch ähnliche komplexe Fragestellungen können in Zukunft durch die entwickelten mikrostrukturierten Oberflächen als standardisiertes Plattformsystem in idealer Weise adressiert werden. Die immer gleichen Konditionen könnten künftig sogar auch bei der automatisierten Detektion von TNTs von großem Vorteil sein [99].

8. Literatur

- [1] Forschungszentrum Karlsruhe. *Mikrotechnologie*, www.fzk.de, November 2004.
- [2] Bundesministerium für Bildung und Forschung. *Rahmenprogramm zur Förderung 2004-2009 Mikrosysteme*, Januar 2004.
- [3] J.L. Wilbur, A. Kumar, H.A. Biebuyck, E. Kim, G.M. Whitesides (1996). Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology* **7**, 452-457.
- [4] C. K. Yeung, L. Lauer, A. Offenhäusser, W. Knoll (2001). Modulation of the growth and guidance of rat brain stem neurons using patterned extracellular matrix proteins. *Neuroscience Letters* **301**, 147-150.
- [5] T. Steinberg, S. Schulz, J.P. Spatz, N. Grabe, E. Mussig, A. Kohl, G. Komposch, P. Tomakidi (2007). Early keratinocyte differentiation on micropillar interfaces. *Nano Lett.* **7**, 287-294.
- [6] W. Roos, J. Ulmer, S. Gräter, T. Surrey, J.P. Spatz (2005). Microtubule Gliding and Cross-Linked Microtubule Networks on Micropillar Interfaces. *Nano Lett.* **5**, 2630-2634.
- [7] H.J. Müller, T. Röder. *Der Experimentator: Microarrays*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2004.
- [8] B. Bhushan. *Handbook of Nanotechnology*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2004.
- [9] Universität Stuttgart. Institut für Zeitmesstechnik, Fein- und Mikrotechnik, www.uni-stuttgart.de/izfm, November 2004.
- [10] L.F. Thompson, C.G. Willson, M.J. Bowden. *Introduction to Microlithography*. American Chemical Society, 1983.
- [11] M. Mrksich, C.S. Chen, Y. Xia, L.E. Dike, D.E. Ingber, G.M. Whitesides (1996). Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10775-10778.
- [12] A. Ulman. *An Introduction to Ultrathin Organic Films*. Academic Press, Boston, 1991.

- [13] A. Ulmann (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554.
- [14] C.D. Bain, G.M. Whitesides (1989). Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7164-7175.
- [15] O. Dannenberg, M. Buck, M. Grunze (1999). Self-assembly of n-Alkanethiols: A kinetic study by second harmonic generation. *J. Phys. Chem. B* **103**, 2202-2213.
- [16] H.T. Rong, S. Frey, Y.J. Yang, M. Zharnikov, M. Buck, M. Wühn, C. Wöll, G. Helmchen (2001). On the importance of the headgroup substrate bond in thiol monolayers: A study of biphenyl-based thiols on gold and silver. *Langmuir* **17**, 1582-1593.
- [17] H. M. Langevin, C. J. Cornbrooks, D. J. Taatjes. Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochem Cell Biol.* **122** (2004), 7-15.
- [18] B.Z. Shilo (2001). The organizer and beyond. *Cell* **106**, 17-22.
- [19] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- [20] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: Wiley-VCH, 2004.
- [21] F.A. Ramirez-Weber, T.B. Kornberg (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **97**, 599-607.
- [22] G. Raposo, H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, H. J. Geuze. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183** (1996), 1161-1172.
- [23] A.L. Hodgkin (1964). The conduction of the nervous impulse. *University Press, Liverpool*.
- [24] V. O'Connor, G.J. Augustine, H. Betz (1994). Synaptic vesicle exocytosis: molecules and models. *Cell.* **76**, 785-787.
- [25] E.R. Kandel. *Neurowissenschaften: eine Einführung*, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1995.

- [26] F.W. Pfrieger (2002). Outsourcing in the brain: Do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *BioEssays* **25**, 72 – 78.
- [27] A. Verkhratsky, H. Kettenmann (1996). Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci.* **19**, 346-351.
- [28] A. Verkhratsky, R.K. Orkand, H. Kettenmann (1998). Glial calcium: homeostasis and signalling function. *Physiol. Rev.* **78**, 99-141.
- [29] N.M. Kumar, N.B. Gilula (1996). The gap junction communication channel. *Cell.* **84**, 381-388.
- [30] D. Volkmann, T. Mori, U.K. Tirlapur, K. König, T. Fujiwara, J. Kendrick-Jones, F. Baluska (2003). Unconventional myosins of the plant-specific class VIII: endocytosis, cytokinesis, plasmodesmata/pit-fields, and cell-to-cell coupling. *Cell Biol Int.* **27**, 289-291.
- [31] M.L. Cilia, D. Jackson (2004). Plasmodesmata form and function. *Curr Opin Cell Biol.* **16**, 500-506.
- [32] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, H.H. Gerdes (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007-1010.
- [33] H.H. Gerdes, A. Rustom. 14. Tunneling nanotubes: Membranous channels between animal cells (200-207). In: Cell-cell channels. Eds. F. Baluska, D. Volkmann, P.W. Barlow, New York: Springer Verlag (2005).
- [34] B. Onfelt, S. Nedvetzki, K. Yanagi, D. M. Davis (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* **173**, 1511-1513.
- [35] B. Önfelt, D.M. Davis (2004). Can membrane nanotubes facilitate communication between immune cells? *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 676–678.
- [36] S.C. Watkins, R.D. Salter (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity.* **23**, 309-318.
- [37] H.H. Gerdes, N.V. Bukoreshtliev, J.F.V. Barroso (2007). Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Letters* **11**, 2194-2201.
- [38] B. Onfelt, S. Nedvetzki, R.K. Benninger, M.A. Purbhoo, S. Sowinski, A.N. Hume, M.C. Seabra, M.A. Neil, P.M. French, D.M. Davis (2006). Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol.* **177**, 8476-8483.

- [39] B. Onfelt, M.A. Purbhoo, S. Nedvetzki, S. Sowinski, D.M. Davis (2005). *Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubes*, *Sci STKE*. **313**, 55-57.
- [40] D. Zhu, K.S. Tan, X. Zhang, A.Y. Sun, G.Y. Sun, J.C. Lee (2005). Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci*. **118**, 3695-3703.
- [41] B. Pontes, N.B. Viana, L. Campanati, M. Farina, V. Moura Neto, H. Moysés Nussenzveig (2007). Structure and elastic properties of tunneling nanotubes. *Eur Biophys J*.
- [42] A. Karlsson, R. Karlsson, M. Karlsson, A.S. Cans, A. Strömberg, F. Ryttsén, O. Orwar (2001). Networks of nanotubes and containers. *Nature* **409**, 150-152.
- [43] M. Koyanagi, R.P. Brandes, J. Haendeler, A.M. Zeiher, S. Dimmeler (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?. *Circ Res*. **96**, 1039-1041.
- [44] A. Rustom, M. Bajohrs, C. Kaether, P. Keller, D. Toomre, D. Corbeil, H.H. Gerdes (2002). Selective delivery of secretory cargo in golgi-derived carriers of nonepithelial cells. *Traffic* **3**, 279–288.
- [45] L.A. Greene, A.S. Tischler (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2424-2428.
- [46] R. Heumann, V. Kachel, H. Thoenen (1983). Relationship between NGF-mediated volume increase and “priming effect” in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAmp. *Exp. Cell Res*. **145**, 179-190.
- [47] G. Banker, K. Goslin (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature* **336**, 185-186.
- [48] H. Zimmer, S. Riese, A. Regnier-Vigouroux (2003). Functional characterization of mannose receptor expressed by immunocompetent mouse microglia. *Glia*. **42**, 89-100.
- [49] D. Hanahan (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**, 557-580.

- [50] Kien B. Lam, E.F. Irwin, K.E. Healy, L. Lin (2006). Bioelectrocatalytic self-assembled thylakoids for micro-power and sensing applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **117**, 480-487.
- [51] R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson (2003). Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophysical Journal* **85**, 3035-3047.
- [52] F Hook, C Larsson, C Fant (2002). Biofunctional surfaces studied by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, 774-791.
- [53] E. Neumann, A.E Sowers, C.A Jordan. *Electroporation and electrofusion in cell biology*, New York: Plenum Press, 1989.
- [54] P.T Lynch, M.R. Davey. *Electrical manipulation of cells*, New York: Chapman & Hall, 1996.
- [55] K.H. Cheeseman, T.F. Slater (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* **49**, 481-493.
- [56] G. Spiteller (2002). Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **959**, 30-44.
- [57] H.C. Berg, S.M. Block (1984). A miniature flow cell designed for rapid exchange of media under high-power microscope objectives. *J Gen Microbiol.* **130**, 2915-2920.
- [58] J.P. Spatz, S. Sheiko, M. Möller (1997). Tapping Scanning Force Microscopy in Air-Theory and Experiment. *Langmuir* **13**, 4699-4703.
- [59] E. A-Hassan, W.F. Heinz, M.D. Antonik, N.P. D'Costa, S. Nageswaran, C.A. Schoenenberger, J.H. Hoh (1998). Relative Microelastic Mapping of Living Cells by Atomic Force Microscopy. *Biophys J* **74**, 1564-1578.
- [60] D.P. Allison, P. Hinterdorfer, W. Hanb (2002). Biomolecular force measurements and the atomic force microscope. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 47-51.
- [61] D. Bar-Sagi, J.R. Feramisco (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* **42**, 841-848.
- [62] M.R. Capecchi (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**, 479-488.

- [63] F. Li , A. Srinivasan , Y. Wang , R.C. Armstrong , K.J. Tomaselli, L.C. Fritz (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of Cytochrome c. *J. Cell Biol.* **272**, 30299-30305.
- [64] C.L. Klein, M. Scholl, A. Maelicke (1999). Neuronal networks in vitro: formation and organization on biofunctionalized surfaces. *J. Mat. Sci.* **10**, 721-727.
- [65] K. Tashiro, G.C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G.R. Martin, H.K. Kleinman, Y. Yamada (1989). A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the a chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem* **264**, 16174-16182.
- [66] G.C. Sephel, K. Tashiro; M. Sasaki, S. Kandel, Y. Yamada, H.K. Kleinman (1989). A laminin-pepsin fragment with cell attachment and neurite outgrowth activity at distinct sites. *Dev. Biol.* **135**, 172-181.
- [67] K.J. Tomaselli, C.H. Damsky, L.F. Reichardt (1987). Interactions of a neuronal cell line (PC12) with laminin, collagen IV, and fibronectin: identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth. *The Journal of Cell Biology* **105**, 2347-2358.
- [68] C.S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber (1998). Micropatterned Surfaces for Control of Cell Shape, Position, and Function. *Biotechnol. Prog.* **356**, 356-363.
- [69] A. Rustom. Analyse interzellulärer Transportvorgänge: Das TNT-Konzept. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, (2001).
- [70] M.P. Abel. Zelluläre Netzwerke auf Mikrostrukturen. *Diplomarbeit*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, (2005).
- [71] D.Z. Cleverley, J. Lenard (1998). The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3425-3430.
- [72] D. Langosch, B. Brosig, R. Pipkorn (2001). Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J Biol Chem* **276**, 32016-32021.
- [73] S. Dennison, N.J. Greenfield, J. Lenard, B.R. Lentz (2002). VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion. *Biophys. J.* **82**, 14925-14934.

- [74] E. Jeetendra, K. Ghosh, D. Odell, J. Li, H.P. Ghosh, M.A. Whitt (2003). The membrane-proximal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein g ectodomain is critical for fusion and virus infectivity. *J Virol.* **77**, 12807–12818.
- [75] S.B. Taner, B. Önfelt, N.J. Pirinen, F.E. McCann, A.I. Magee, D.M. Davis (2004). Control of Immune Responses by Trafficking Cell Surface Proteins, Vesicles and Lipid Rafts to and from the Immunological Synapse. *Traffic* **5**, 651-661.
- [76] F. Acartürk, T. Imai, H. Saito, M. Ishikawa, M. Otagiri (1993). Comparative study on inclusion complexation of maltosyl-beta-cyclodextrin, heptakis(2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin and beta-cyclodextrin with fucosterol in aqueous and solid state. *J Pharm Pharmacol.* **45**, 1028-1032.
- [77] R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, D.D. Newmeyer (1997). The release of Cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- [78] E. Margoliash, A. Schejter (1996). Cytochrome c. *Adv. Protein Chem.* **21**, 113-286.
- [79] W.M. Morton, K.R. Ayscough, P.J. McLaughlin (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol.* **2**, 376-378.
- [80] K. Ayscough (1998). Use of latrunculin-A, an actin monomer-binding drug. *Methods Enzymol.* **298**, 18-25.
- [81] D. Raucher, M.P. Sheetz (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys J* **77**, 1992-2002.
- [82] G. Koster, M. VanDuijn, B. Hofs, M. Dogterom (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 15583-15588.
- [83] R. Bar-Ziv, E. Moses, P. Nelson (1998). Dynamic excitations in membranes induced by optical tweezers. *Biophys J* **75**, 294-320.
- [84] D.A. Heller, V. Garga, K.J. Kelleher, T.C. Lee, S. Mahbubani, L.A. Sigworth, T.R. Lee, M.A. Rea (2005). Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces. *Biomaterials.* **26**, 883-889.

- [85] M. Scholl, C. Sprössler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, A. Offenhäusser (2000). Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *Journal of Neuroscience Methods* **104**, 65-75.
- [86] A.K. Vogt, L. Lauer, W. Knoll, A. Offenhäusser (2003). Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1562-1568.
- [87] H.K. Kleinman, J. Graft, Y. Iwamoto, M. Sasaki, C.S. Schasteen, Y. Yamada, G.R. Martin, F.A. Robey (1989). Identification of a second active site in laminin for promotion of cell adhesion and migration and inhibition in vivo melanoma lung colonization. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 39-45.
- [88] A. Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**, 208-215.
- [89] A. Araque, G. Carmignoto, P.G. Haydon (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 795-813.
- [90] A.H. Cornell-Bell; S.M. Finkbeiner; M.S. Cooper; S.J. Smith (1990). Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling. *Science* **247**, 470-473.
- [91] S. Cotecchia, B.K. Kobilka, K.W. Daniel, R.D. Nolan, E.Y. Lapetina, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, John W. Regan (1989). Multiple second messenger pathways of cu-adrenergic receptor, subtypes expressed in eukaryotic cells. *JBC* **265**, 63-69.
- [92] A.H. Cornell-Bell, S.M. Finkbeiner (1991). Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell calcium* **12**, 185-204.
- [93] D.D. Fraser, L.A. Mudrick-Donnon, B.A. Macvicar (1994). Astrocytic GABA receptors. *Glia* **11**, 83-93.
- [94] L.E. Rabow, S.J. Russek, D.H. Farb (1995). From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* **21**, 189-274.
- [95] O. Schlicker. Untersuchungen zum differentiellen Transport der α_1 - und α_2 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors und zur TNT-vermittelten interzellulären Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, (2007).

- [96] J.L. Rubenstein, B.A. Smith, H.M. McConnell (1979). Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 15-18.
- [97] G. Binning, C.F. Quate, C. Gerber (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- [98] A. Kishino, T. Yanagida (1988). Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**, 74-76.
- [99] E. Hodneland, A. Lundervold, S. Gurke, X.C. Tai, A. Rustom, H.H. Gerdes (2006). Automated detection of tunneling nanotubes in 3D images. *Cytometry A*. **69**, 961-972.

9. Abbildungen

- Abbildung 1:** Schema der Prozessführung in der optischen Photolithographie. ____ 7
- Abbildung 2:** Generierung von *self assembling monolayers* (SAMs) auf Substraten. 9
- Abbildung 3:** Schematischer Aufbau eines zur SAM-Bildung befähigten Moleküls. 9
- Abbildung 4:** Signalweiterleitung zwischen Neuronen an einer chemischen Synapse. _____ 13
- Abbildung 5:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zweier PC12-Zellen, die über ein TNT miteinander verbunden sind (aus Rustom et al. 2004 [32]). Der Pfeil kennzeichnet das TNT, die Boxen 1-3 sind in den rechten Bildern (1-3) vergrößert dargestellt. Man beachte, dass das TNT zwischen zwei Zellen aufgespannt ist und keinen Kontakt zum Substrat hat. Die TNT-Membran geht scheinbar übergangslos in die Plasmamembranen der verbundenen Zellen über (1, 3). _____ 16
- Abbildung 6:** *Flow Cell* Eigenkonstruktion mit Anschlusschläuchen zum Durchfluss des Zellmediums (Bild A) (Maßstabsbalken, 2 cm). Die mikrostrukturierte Oberfläche wird mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers an das Teflongehäuse der *Flow Cell* angebracht. Die transparente Plexiglasscheibe ermöglicht das Visualisieren der Zellen unter dem Mikroskop unter dem Mikroskop, Bild B. ____ 48
- Abbildung 7:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von der durch Photolithographie hergestellten Chrommaske (A), und des mikrostrukturierten Deckgläschens (B), (Maßstabsbalken, 40 μm). _____ 49
- Abbildung 8:** Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines mikrostrukturierten Deckgläschens. (A): 45° Seitenansicht in 200x-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken, 120 μm). B zeigt die Aufsicht auf das Substrat bei 500x-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken, 40 μm). _____ 50
- Abbildung 9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von μ -Goldschüsseln 3700x-fach vergrößert. _____ 51
- Abbildung 10:** Oberflächenabbildung einer μ -Goldschüssel mittels Rasterkraftmikroskopie. A: Aufsichtsbild der Goldschüssel, B: Seitenansicht (Neigungswinkel 45°) einer Goldschüssel. _____ 52
- Abbildung 11:** Höhenprofil einer μ -Goldschüssel. _____ 52

- Abbildung 12:** Bild A zeigt das Schaubild zur Frequenzänderung von 11-Mercaptoundecansäure auf SiO₂-Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von 11-Mercaptoundecansäure auf Au-Kristall. _____ 54
- Abbildung 13:** Bild A zeigt Schaubild der Frequenzänderung von 10-Aminodecan-1-thiol auf SiO₂-Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von 10-Aminodecan-1-thiol auf Au-Kristall. _____ 55
- Abbildung 14:** Bild A zeigt das Schaubild der Frequenzänderung von IKVAV-Peptid auf SiO₂-Kristall, Bild B das entsprechende Schaubild von IKVAV-Peptid auf Au-Kristall. _____ 55
- Abbildung 15:** A: Fluoreszenzbild WGA-gefärbter PC12-251 Zellen auf einer biofunktionalisierter Oberfläche, die durch ein TNT miteinander verbunden sind (weiße Pfeilspitze). B: Fluoreszenzbild WGA-gefärbter PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche, die durch mehrere TNTs miteinander verbunden sind (weiße Pfeilspitze), (Maßstabsbalken je 10 µm). _____ 57
- Abbildung 16:** Die Durchlichtbilder A und B zeigen die Anordnung von PC12-251 Zellen auf mit 10-Aminodecan-1-thiol biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 µm). _____ 58
- Abbildung 17:** Die Durchlichtbilder A und B zeigen PC12-251 Zellen auf mit 11-Mercapto-undecansäure biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 µm). _____ 59
- Abbildung 18:** Die Durchlichtaufnahmen A und B zeigen vereinzelte PC12-251 Zellen auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen (Maßstabsbalken je 15 µm). _____ 59
- Abbildung 19:** Fluoreszenzbild von PC12-251 Zellen (WGA 488) auf einer IKVAV-biofunktionalisierten Oberfläche (Maßstabsbalken, 20 µm). _____ 60
- Abbildung 20:** A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Anordnung von PC12-251 Zellen auf einer IKVAV-funktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche 720x-fach (Maßstabsbalken, 30 µm). B: REM-Aufnahme der Affinität einer PC12-251 Zelle zu einer IKVAV-funktionalisierten µ-Goldschüssel 3200x-fach (Maßstabsbalken, 6 µm). _____ 60
- Abbildung 21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PC12-251 Zellen auf einer PLL-beschichteten Glasoberfläche (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PC12-251 Zellen 2h auf einer IKVAV-biofunktionalisierten mikrostrukturierten Oberfläche (B) (Maßstabsbalken je 20 µm). _____ 61

- Abbildung 22:** Vergleich des Verhältnisses von TNTs zu Zellen auf Gas und mikrostrukturierter Oberfläche. _____ 62
- Abbildung 23:** A: Visualisierung von TNTs (weiße Pfeilspitzen) zwischen PC12-251 Zellen (Maßstabsbalken, 30 µm). B: Ausbildung eines TNT-Netzwerkes (weiße Pfeilspitzen) zwischen PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche (Maßstabsbalken, 10 µm). C: Mehrfach-TNTs (weiße Pfeilspitzen) aufgespannt zwischen zwei PC12-251 Zellen. D: Zwei PC12-251 Zellen, die durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) miteinander verbunden sind (Maßstabsbalken je 20 µm). _ 63
- Abbildung 24:** A: Übersichtsaufnahme von PC12-251 Zellen, die durch ausgebildete TNT-Netzwerke (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind 680x-fach (Maßstabsbalken, 30 µm). B: Detailaufnahme zweier durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbundener PC12-251 Zellen 2300x-fach (Maßstabsbalken, 10 µm). _____ 64
- Abbildung 25:** TNT-Längenverteilung bei PC12-251 Zellen der Passage 15 auf mikrostrukturierten Oberflächen. _____ 66
- Abbildung 26:** Verteilung der Höhendifferenz der TNT-Ansatzstellen bei PC12-251 Zellen der Passage 13 auf mikrostrukturierten Oberflächen. _____ 67
- Abbildung 27:** pEGFP-F transfizierte PC12-251 Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen (A und B), (Maßstabsbalken je 15 µm). Man beachte, dass zu keinem Zeitpunkt TNTs zwischen den Zellen detektiert werden konnten. ____ 68
- Abbildung 28:** A: Übersichtsaufnahme VSV-G transfizierter PC12-251 Zellen auf einer mikrostrukturierten Oberfläche. Hierbei wird die strukturierte Anordnung der PC12-251 Zellen auf der Oberfläche besonders deutlich (200x-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 µm). Bild B zeigt Details der morphologischen Veränderungen von Zellen, die VSV-G exprimieren (blaue Box) und nicht VSV-G exprimierende Zellen (rote Box) (Vergrößerung: 600x-fach, Maßstabsbalken 30 µm). _____ 69
- Abbildung 29:** Fluoreszenzbilder von Fentons-stimulierten PC12-251 Zellen (WGA 488) auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen (A und B). Man beachte, dass die Zellmembranen eine deutlich fransige Struktur aufweisen. Vereinzelt können jedoch TNTs detektiert werden (B, Pfeilspitze), (Maßstabsbalken je 25 µm). _____ 70

- Abbildung 30:** Einfluss des Fentons Reagenz auf die TNT-Bildung unter Berücksichtigung des Alters der Kultur auf mikrostrukturierten Oberflächen. _ 71
- Abbildung 31:** Fluoreszenzbilder von mit M β CD-behandelten PC12-251 Zellen (WGA 488) (A) und nicht behandelten PC12-251 Zellen (B) auf mit IKVAV-biofunktionalisierten Oberflächen. Detektierte TNTs sind durch weiße Pfeilspitzen markiert (Maßstabsbalken je 20 μ m). _____ 72
- Abbildung 32:** Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die TNT-Bildung. _____ 73
- Abbildung 33:** Durchlichtaufnahme zweier PC12-251 Zellen (weiße Pfeile), die durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbunden sind (Bild A). Rechts im Bild ist die Injektionsnadel sichtbar (Maßstabsbalken, 30 μ m). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Bild B) der beiden Zellen (weiße Pfeile), in die erfolgreich Cytochrome C injiziert wurde (Maßstabsbalken, 30 μ m). DIC-Aufnahme (Bild C) des TNTs (weiße Pfeilspitze) zwischen den apoptotischen PC12-251 Zellen (weiße Pfeile) (Maßstabsbalken, 15 μ m). Das TNT (weiße Pfeilspitze) ist 2 Stunden nach der Injektion noch völlig intakt. _____ 75
- Abbildung 34:** Vergleich unterschiedlicher Geschwindigkeiten des Mediumflusses und deren Effekt auf die TNT-Bildung nach 1h Inkubation. _____ 77
- Abbildung 35:** Effekt eines konstanten Mediumflusses von 0.5 ml/min auf die TNT-Bildung 3h nach dem Ausplattieren der PC12-251 Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen. _____ 78
- Abbildung 36:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines TNT-Netzwerkes (weiße Pfeilspitzen) auf einer mikrostrukturierten Oberfläche (Bild A, bei 2300x-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 10 μ m) und von F-Aktinbündeln (weiße Pfeilspitze) (Bild B, bei 24700x-facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 600 nm). _____ 79
- Abbildung 37:** A: Fluoreszenzbild zweier durch ein TNT (weiße Pfeilspitze) verbundener PC12-251 Zellen (weiße Pfeile). B: Durchlichtbild eines *Cantilevers*, an dem eine mit PLL immobilisiert PC12-251 Zelle (weißer Pfeil) zu sehen ist (Maßstabsbalken je 15 μ m). _____ 81
- Abbildung 38:** Kraftspektrum eines TNT-Abrisses. _____ 82
- Abbildung 39:** Kraftspektrum von zwei TNT-Abrissen zwischen zwei PC12-251 Zellen. _____ 83

- Abbildung 40:** Die Bilder A-D zeigen den zeitlichen Verlauf des Dehnvorgangs eines TNTs zwischen zwei PC12-251 Zellen über eine Gesamtdistanz von $45\ \mu\text{m}$ (Maßstabsbalken je $15\ \mu\text{m}$). Die weißen Pfeile zeigen die TNT-Arsatzstellen an den Zellen, die weißen Pfeilspitzen die Membranverdickung im TNT. _____ 84
- Abbildung 41:** Kraftspektrum eines TNT-Abrisses nach Dehnung des TNTs über eine Distanz von $45\ \mu\text{m}$. _____ 85
- Abbildung 42:** Hippokampale Kokulturen auf mit 10-Aminodecan-1-thiol funktionalisierten Oberflächen (A und B) (Maßstabsbalken je $40\ \mu\text{m}$). Beide Durchlichtaufnahmen zeigen die sehr gute Zellvereinzelung und Affinität der Zellen zu den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen. C und D: Die Astrozyten wurden mit dem *in vivo* Farbstoff Dil angefärbt (rot), die Zellmembran durch Zugabe des Farbstoffes WGA 488 grün. Auch auf diesen Fluoreszenzaufnahmen ist die sehr gute Zellvereinzelung und Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen gezeigt (Maßstabsbalken, $20\ \mu\text{m}$). _____ 87
- Abbildung 43:** Rasterelektronenmikroskopische Analyse von hippokampalen Kokulturen. A: Referenzprobe der Kokultur aus Astrozyten und Neurone auf einem Glassubstrat 100x-fach (Maßstabsbalken, $250\ \mu\text{m}$). B: Astrozyten und Neurone der Kokultur auf einer mit 10-Aminodecan-1-thiol funktionalisierten Oberfläche (Maßstabsbalken, $50\ \mu\text{m}$). C: Astrozyt und Neuron auf einer biofunktionalisierten Oberfläche 1400x-fach (Maßstabsbalken, $20\ \mu\text{m}$). _____ 89
- Abbildung 44:** Fluoreszenzaufnahmen (A und B) von Astrozyten (weiße Pfeile), die durch ein TNT (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind, auf mikrostrukturierten Oberflächen (Maßstabsbalken, $20\ \mu\text{m}$). _____ 90
- Abbildung 45:** Fluoreszenzaufnahmen (A und B) von TNTs (weiße Pfeilspitzen), welche zwischen jeweils einem Astrozyt und einem Neuron aufgespannt sind (Maßstabsbalken, $20\ \mu\text{m}$). Beide Zelltypen zeigen eine sehr gute Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen der mikrostrukturierten Oberflächen. _____ 91
- Abbildung 46:** Fluoreszenzmikroskopische Analysen von TNTs (weiße Pfeilspitzen) zwischen primären Neuronen auf mikrostrukturierten Oberflächen (A und B) (Maßstabsbalken, $20\ \mu\text{m}$). Die Neuronen weisen ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu den biofunktionalisierten Goldflächen der Mikrostrukturen auf. ____ 92

- Abbildung 47:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (A) von Astrozyten und Neuronen auf einer biofunktionalisierten Oberfläche 670x-fach (Maßstabsbalken, 40 µm). Die TNTs (weiße Pfeilspitzen), die in dieser Aufnahme detektiert werden können, sind zwischen den Neuronen auf der Oberfläche aufgespannt. B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Astrozyten, der eine hohe Affinität zu denen ihn umgebenden biofunktionalisierten Goldflächen zeigt 2000x-fach (Maßstabsbalken, 10 µm). Bei dieser Art von Kokultur ist es möglich, dass Neurone auf Astrozyten liegen, bzw. auf dem Astrozyt adhäreren. Die detektierten TNTs sind hier zwischen dem Astrozyt und den sich darauf befindenden Neuronen aufgespannt. _____ 92
- Abbildung 48:** Gesamtübersicht über den Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung in einer Astrozyten-Neuronen-Kokultur in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten. _____ 94
- Abbildung 49:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (A) mehrerer TNTs (weiße Pfeilspitzen), die zwei Astrozyten miteinander verbinden (Maßstabsbalken, 20 µm). Hier ist deutlich das durch das Fentons Reagenz verursachte fransige Aussehen der Zellmembran zu erkennen. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines TNTs, welches zwei Astrozyten miteinander verbindet (Maßstabsbalken, 20 µm). _____ 95
- Abbildung 50:** Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Astrozyten in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten. _____ 96
- Abbildung 51:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A und B) von TNTs (weiße Pfeilspitzen), die zwischen Astrozyten und Neuron aufgespannt sind (Maßstabsbalken, 20 µm). Auch hier ist die fransige Morphologie der Zellmembran zu erkennen, die auf die freien OH-Radikale zurückzuführen sind. _____ 97
- Abbildung 52:** Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Astrozyten und Neuronen in Abhängigkeit des Alters der Astrozyten. _____ 98
- Abbildung 53:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (A und B) von Neuronen, die durch TNTs (weiße Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind (Maßstabsbalken, 20 µm). Hierbei konnten sogar TNT-Netzwerke zwischen Neuronen auf den Mikrostrukturen detektiert werden (B). _____ 99

Abbildung 54: Einfluss chemischer Stimulation auf die TNT-Bildung zwischen Neuronen. _____ 99

Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung (A) eines mit Fentons Reagenz behandelten Neurons. Hier sind deutlich die ausladenden Dendritenverzweigungen erkennbar. B, C und D: Fluoreszenzbilder von Membranverzweigungen von mit Fentons Reagenz stimulierten Astrozyten. Die Astrozyten zeigen deutlich lange Membranausläufer (Maßstabsbalken, 20 µm).
_____ 101

10. Abkürzungen

∅	Durchmesser, Durchschnitt
(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewicht-Volumen-Verhältnis
Abb.	Abbildung
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	kompletäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DIC	Differential Interference Contrast
DME-Medium	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E18	Embryonaltag 18
ECFP	<i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde/n
HEK-Zellen	humane, embryonale Nierenzellen

HMDS	Hexamethyldisilazan
HS	Pferdeserum
Hz	Hertz
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliampère
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NMP	N-Methyl-Pyrolidin
nN	Nanonewton
NRK-Zellen	normale Rattennierenzellen
PB-Puffer	<i>Phosphate Buffer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC12-Zellen	Phäochromozytomatumorzellen der Ratte
PLL	Poly-L-Lysin
pN	Pikonewton
QCM	Quarz Crystal Microbalance
REM	Rasterelektronenmikroskop
s	Sekunde/n
SAM	<i>self assembling monolayer</i>

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
TBE	Transferpuffer
TE	Tris / EDTA
TFB	Transformationspuffer
TNT	<i>tunneling nanotube</i>
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VSV-G	vesikuläres Stomatitis Virus- Glykoprotein
W	Watt
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim P. Spatz für die interessante Aufgabenstellung, das Vertrauen, diese Aufgabe zu erfüllen, für die Unterstützung und Beratung, sowie die mir gewährte Eigenständigkeit und Freiheit bei der Gestaltung und Durchführung meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Reiner Dahint danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Hermann Gerdes danke ich für die gute und erfolgreiche Kooperation, sowie für den Forschungsaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe an der Universität in Bergen.

Bei Herrn Dr. Amin Rustom möchte ich mich für seine große und hilfreiche Unterstützung bezüglich der Planung und Realisierung des Projektes und besonders für die sehr wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Oliver Schlicker für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit beim Umgang mit den Primärkulturen.

Iliia Louban danke ich für die zahlreichen AFM-Messungen.

Eva Bock und Theobald Lohmüller danke ich für die Hilfe bei den QCM- und REM-Messungen.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Spatz für die kollegiale und angenehme Zusammenarbeit im Labor. Dank geht an Theresa Pohl, Nadine Perschmann und Nicole Plath für das „Versüßen“ des Laboralltags.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerdes in Bergen danke ich für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit in ihrem Labor, in diesem Zusammenhang besonderer Dank an Nickolay Bukoreshtliev für die Mikroinjektions-Experimente, Steffen Gurke für die Aufnahmen mit dem Spinning Disk Mikroskop, sowie Tilo Eichler und Erlend Hodneland.

Sigrid Riese danke ich für ihre große Unterstützung bei der Vorbereitung der Zellexperimente.

Bei Herrn Rheinhold Jehle möchte ich mich für technische Durchführung beim Bau der *Flow Cell*, sowie das Aufnehmen der Fotos selbiger bedanken.

Herrn Thomas Wolf danke ich für die vielfache Unterstützung, Hilfestellung und Beratung zu praktischen Fragen im Bereich der Photolithographie.

Ebenso möchte ich dem Nikon Imaging Center der Universität Heidelberg, insbesondere Frau Dr. Ulrike Engel und Herrn Dr. Christian Ackermann, für die Möglichkeit, das dort zur Verfügung gestellte Spinning Disk Mikroskop benutzen zu dürfen, danken.

Mein besonderer Dank gilt Julia Ranzinger für ihre qualifizierte biologische Beratung, ihre Anregungen und Kommentare, sowie das kritische und sorgfältige Lesen dieser Arbeit.

Meiner Familie und allen Lieben danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung und ausdauernde Motivation während meines gesamten Studiums und der Promotion.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Heidelberg, den 19. Februar 2008

Marcus Patrick Abel