

Detektion der Ausschüttung von NO an einzelnen Zellen mit elektrochemischer Rastermikroskopie in konstantem Abstand**

Sonnur Isik und Wolfgang Schuhmann*

Stickstoffmonoxid (NO) ist Teil vieler wichtiger physiologischer Prozesse und wurde als der Endothel-abhängige Relaxationsfaktor (endothelium-derived relaxing factor; EDRF) identifiziert.^[1] Ein Mangel an NO spielt eine Rolle bei Bluthochdruck, erhöhtem Blutzucker, Arteriosklerose sowie der Parkinson- und der Alzheimer-Krankheit;^[2] dagegen tragen erhöhte NO-Konzentrationen beispielsweise zu Arthritis und Krebs bei.^[3] Dementsprechend wichtig ist die Aufklärung der Details der NO-Produktion in biologischen Matrices für ein besseres Verständnis physiologischer und pathologischer Prozesse, die mit der Produktion und Ausschüttung von NO zusammenhängen.

Dazu wurden elektrochemische NO-Sensoren vorgeschlagen, die auf platinieren oder mit Elektrokatalysatoren modifizierten Mikroelektroden in Kombination mit einer permselektiven, geladenen Membran zur Interferenzeliminierung beruhen.^[4] Des Weiteren wurde über die Bestimmung von NO mit elektrochemischen NO-Sensoren nach Stimulation adhärent wachsender Zellpopulationen oder einzelner Zellen berichtet.^[5] Kürzlich wurde die Ausschüttung von NO zusammen mit Sauerstoffradikalen unter Verwendung positionierter Mikroelektroden im Detail untersucht.^[6]

Obwohl NO in geringen Konzentrationen nur sehr langsam mit molekularem Sauerstoff reagiert, bildet sich eine Diffusionsschicht mit nichtstationärer NO-Konzentration über der Zelle. Unter der Annahme, dass die Zelle eine Punktquelle für NO darstellt, wird von der Zelle freigesetztes NO schnell in das Volumen des Elektrolyten diffundieren. Dies macht es unmöglich, exakte Werte für die NO-Konzentration anzugeben. Zudem wird offensichtlich, dass das NO-Signal stark distanzabhängig sein wird,^[5,6] sodass eine exakte Positionierung des NO-Sensors eine Voraussetzung für ein auswertbares Experiment ist (Abbildung 1). Unter Berücksichtigung der exponentiellen Abnahme des NO-

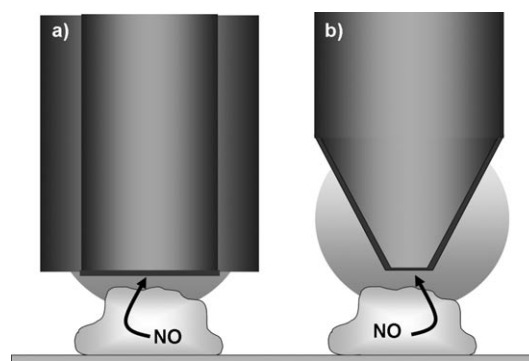


Abbildung 1. Diffusionsprofil von NO nach Stimulation einer Einzelzelle. Detektion mit einer in unmittelbarer Nähe positionierten a) Mikroscheibenelektrode oder b) konischen Mikroelektrode.

Stromes mit wachsendem Abstand zwischen Sensor und Zelle wurden Mikrosensoren mithilfe von Mikromanipulatoren positioniert; dieser Vorgang wurde mit einem optischen Mikroskop verfolgt. Im Allgemeinen wird der Sensor dabei in Kontakt mit der Zellmembran gebracht und dann bis auf einen vordefinierten Abstand zurückgezogen. Diese Vorgehensweise bringt einen Positionierungsfehler von typischerweise 1–2 µm mit sich. Der Kontakt zwischen Sensor und Zellmembran kann zu einer Kontamination der Sensoroberfläche oder zur ungewollten Stimulation der Zelle mit resultierender NO-Ausschüttung durch Scherkräfte Wechselwirkungen führen. Konisch geformte Sensoren (Abbildung 1 b) zeigen daher Stromwerte, die über das NO-Diffusionsprofil über der Zelle mitteln. Scheibenförmige Sensoren, die in sehr geringem Abstand zur Zelle positioniert sind (Abbildung 1 a), wirken hingegen als Senke für NO, und alles NO, das in den engen Spalt zwischen Zelle und Sensoroberfläche ausgeschüttet wird, wird rasch und mit hoher Kollektoreffizienz am Sensor oxidativ verbraucht. Ist die aktive Elektrodenoberfläche ähnlich groß wie die Zelle, kann eine Kollektoreffizienz von nahezu 100 % angenommen werden.

Kürzlich haben wir demonstriert, dass sich ein elektrochemisches Rastermikroskop (SECM) zur exakten Positionierung von scheibenförmigen NO-Mikrosensoren in bekanntem Abstand von NO freisetzenden Zellen eignet. Die Positionierung erfolgte dabei unter Verwendung des negativen Feedback-Modus des SECM, der zu einer Verringerung des Stromes der O₂-Reduktion bei zunehmender Annäherung der Mikroelektrode an die Probe führt.^[7] Darüber hinaus haben wir über die Scherkraft-abhängige Positionierung von Mikroelektroden in konstantem Abstand im SECM berichtet^[8] und haben beschrieben, wie sich dieser Positionierungsmodus zur Visualisierung der Topographie einzelner adhärent wachsender Zellen sowie zur Detektion der Ausschüttung von Neurotransmittern nach Depolarisation der Zellmembran verwenden lässt.^[9] Die Scherkraft-abhängige Positionierung wird durch eine konstante Dämpfung der Vibration des in Resonanz schwingenden Mikrosensors mithilfe eines rückgekoppelten Regelkreises ermöglicht, wobei Abstände zwischen schwingender Mikroelektrode und Zelloberfläche von weniger als 300 nm eingestellt werden können. Die Wechselwirkungen zwischen der SECM-Spitze

[*] Dr. S. Isik, Prof. Dr. W. Schuhmann
Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik
Ruhr-Universität Bochum
NC 04/788
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
Fax: (+49) 234-321-4683
E-Mail: wolfgang.schuhmann@rub.de
Homepage: <http://www.rub.de/elan>

[**] Die Untersuchungen wurden durch das BMBF im Rahmen des thematischen Programms „Nanobiotechnologie“ (NBT066) gefördert. Wir danken Priv.-Doz. Dr. A. Blöchl, Lehrstuhl für Molekulare Neurobiochemie, Ruhr-Universität Bochum, für die Bereitstellung der Zellen und wertvolle Diskussionen.

und der Probe sind ausreichend schwach, um eine Schädigung der Zelle zu vermeiden. Wegen ihrer Flexibilität^[10] erwiesen sich dabei Carbonfaserelektroden, die mit Elektrodepositionslacken isoliert waren, als besonders vorteilhaft für Messungen an Zellen.^[9]

Hier berichten wir über die Positionierung von hochempfindlichen, scheibenförmigen NO-Mikrosensoren an einzelnen Zellen unter Anwendung von Scherkraft-abhängiger Abstandskontrolle im SECM. Nach der Stimulation lässt sich die Ausschüttung von NO aus der Einzelzelle detektieren. Zunächst wurden scheibenförmige, schwingungsfähige nadelförmige Carbonfaser(CF)-Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 7–9 μm nach literaturbekannten Verfahren hergestellt.^[9b,10] Um nun hochempfindliche und hochselektive NO-Sensoren zu erhalten, wurde die CF-Mikroelektrode durch reduktive Multisweep-Abscheidung aus einer wässrigen $\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$ -Lösung mit Pt-Clustern modifiziert. Eine derartige Platinierung erhöht signifikant die aktive Elektrodenoberfläche und damit die Empfindlichkeit des NO-Sensors. Im Anschluss wurde eine Schicht Ni-Tetranatriumphthalocyanintetrakisulfonat (Ni-TSPc) aus einer 1M NaOH-Lösung durch cyclovoltammetrische Abscheidung in einem Potentialbereich von 0 bis 1.2 V^[11] auf der Mikroelektrodenoberfläche polymerisiert. Schließlich wurde die elektrokatalytisch aktive Oberfläche durch Tauchbeschichtung mit einer permselektiven Nafionmembran modifiziert, um die Selektivität des NO-Sensors bei Gegenwart negativ geladener, störender Substanzen zu verbessern. Es ist bekannt, dass der Polyelektrolyt Nafion Anionen wie NO_2^- abstößt und gleichzeitig Kationen wie NO^+ (das primäre Oxidationsprodukt von NO) stabilisiert. Abbildung 2 zeigt das Differenz-Puls-Voltammo-

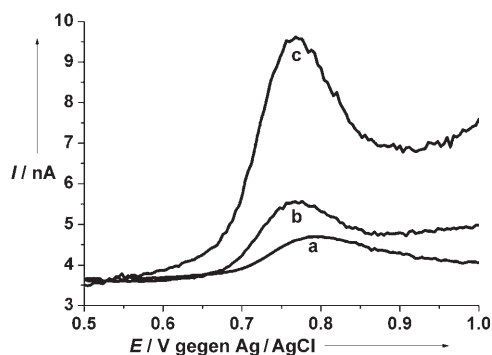


Abbildung 2. DPV a) einer unmodifizierten CF, b) einer platinierter CF und c) einer platinierter CF, auf der elektrochemisch induziert eine Schicht von Ni-TSPc abgeschieden wurde, jeweils in Gegenwart von 9.9 μM NO.

gramm (DPV) einer unbeschichteten CF-Scheibenelektrode, einer platinierter CF-Mikroelektrode sowie einer platinierter CF-Mikroelektrode nach Modifizierung mit der Metallphthalocyaninschicht in Gegenwart von 9.9 μM NO. Alle Elektroden waren durch Tauchabscheidung mit einer Nafionschicht modifiziert.

Die deutliche Zunahme des Peakstroms, die im DPV der platinierter und Ni-TSPC-modifizierter CF-Scheibenelektrode in Gegenwart von NO zu sehen ist, belegt klar die

verbesserte Empfindlichkeit der neuen NO-Mikrosensoren. Ihre Nachweisgrenze wurde zu 143 nM (DPV) und 25 nM (Amperometrie bei konstantem Potential) bestimmt. Die Selektivität wurde im Hinblick auf die Cooxidation des wegen seines ähnlichen Oxidationspotentials wichtigsten Störfaktors, NO_2^- , ermittelt; die Reaktion auf NO_2^- wurde dabei unter Verwendung von NO-Mikrosensoren mit und ohne Nafionmembran untersucht.

Abbildung 3 belegt die verbesserte Selektivität des Nafion-beschichteten NO-Mikrosensors. Nach Beschichtung

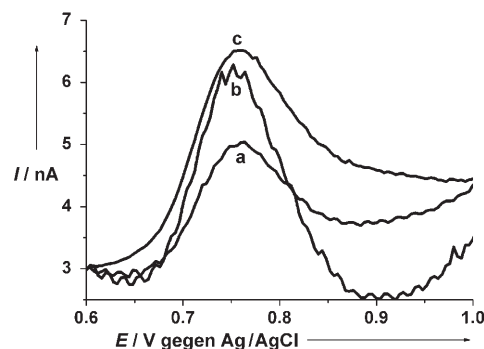


Abbildung 3. DPV an einer platinierter und mit Ni-TSPc modifizierter CF-Scheibenelektrode. In Gegenwart von 333 μM NO_2^- a) nach Beschichtung mit einer Nafionmembran, b) ohne Nafionmembran, c) in Gegenwart von 4.9 μM NO nach Beschichtung mit Nafion.

mit der permselektiven Nafionmembran ist der Peakstrom im DPV in Gegenwart von 333 μM NO_2^- um den Faktor 2 herabgesetzt, während eine 70fach geringere Konzentration an NO mit deutlich höherem Peakstrom angezeigt wird. Da möglicherweise störende Verbindungen wie Dopamin oder Ascorbinsäure im untersuchten In-vitro-System nicht erwartet wurden, wurde auf entsprechende Selektivitätsuntersuchungen verzichtet.

Anschließend wurden die NO-Mikrosensoren auf ihre Eigenschaften als schwingungsfähige SECM-Spitzen in Kombination mit der Scherkraft-abhängigen Positionierung untersucht. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für einen topographischen Linienscan mit einem NO-Mikrosensor über eine einzelne adhären wachsende menschliche Nabelschnur-Endothelzelle (T-HUVEC). Dazu wurde der Sensor mithilfe eines inversen optischen Mikroskops links von der Zelle vorpositioniert. z-Annäherungskurven führten zur Detektion der Dämpfung der Vibration der Mikroelektrode in unmittelbarer Nähe zur Glasoberfläche neben der Zelle. Ein Linienscan nach rechts folgte der Topographie der Zelle und führte letztlich zu einer Position des Sensors rechts von der Zelle. Abbildung 4a zeigt Aufnahmen mit dem optischen Mikroskop, aus denen die Positionen des NO-Sensors vor und nach dem Linienscan ersichtlich sind, und Abbildung 4b gibt die mittels Scherkraft-abhängiger Höhenkontrolle detektierte Topographie der Zelle wieder.

Eine einzelne T-HUVEC wurde nun mithilfe des inversen optischen Mikroskops ausgewählt, und der NO-Mikrosensor wurde in unmittelbarer Nachbarschaft der Zelle mittels z-Annäherungskurven unter Scherkraft-abhängiger Dämpfung

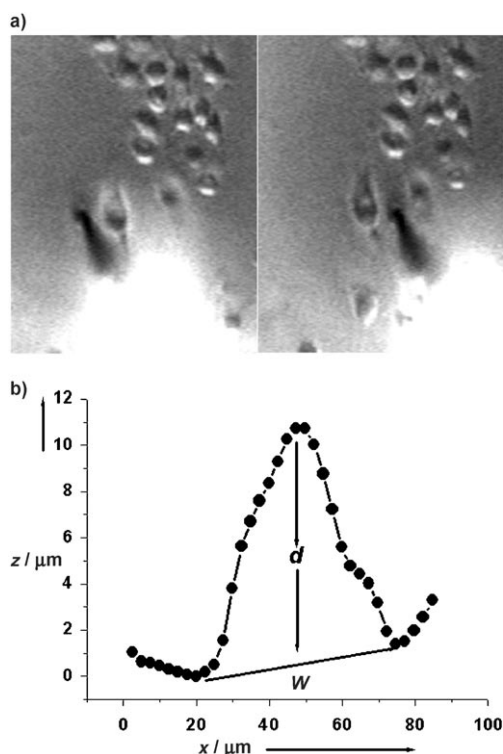


Abbildung 4. a) Mikroskopieaufnahmen der Positionen des NO-Mikrosensors vor und nach dem Linienscan. b) Topographischer Linienscan über eine einzelne T-HUVEC unter Nutzung des Scherkraft-abhängigen Positionierungsmodus des SECM. d = Höhe der Zelle, W = Breite der Zelle.

der Vibration der in Resonanz schwingenden SECM-Spitze vorpositioniert. Wie zuvor wurde nun ein Linienscan unter Wahrung eines konstanten Abstands zwischen NO-Mikrosensor und Zelle durchgeführt, allerdings wurde der Scan beendet, als der NO-Sensor exakt über der Zelle in einem Abstand von 100 bis 300 nm positioniert war (Abbildung 5).

Nach genauer Positionierung des NO-Mikrosensors über der Zelle wurde zunächst der Sensor auf sein Arbeitspotential

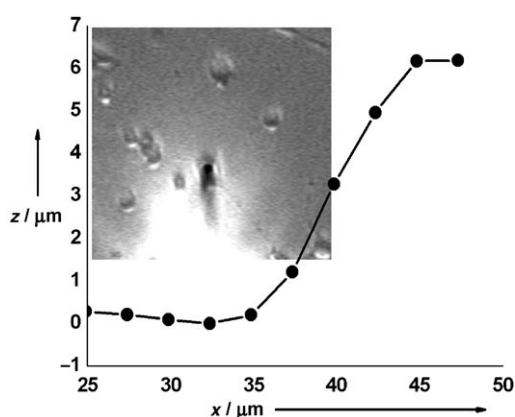


Abbildung 5. Positionierung des NO-Mikrosensors über einer einzelnen T-HUVEC mittels Scherkraft-abhängiger Registrierung der Zelltopographie unter gleichzeitiger visueller Kontrolle. Der Abstand zwischen Sensoroberfläche und Zellmembran ($< 300 \text{ nm}$) wird durch das Scherkraft-abhängige Signal der Vibration der SECM-Spitze definiert.

von +750 mV gegen Ag/AgCl polarisiert und anschließend die NO-Ausschüttung durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Bradykinin stimuliert. Der Strom durch den Sensor wurde mithilfe eines hochempfindlichen Potentiostaten verfolgt. Ein Beispiel für eine solche amperometrische Stromantwort zeigt Abbildung 6. Unmittelbar nach Stimulation der Zelle durch

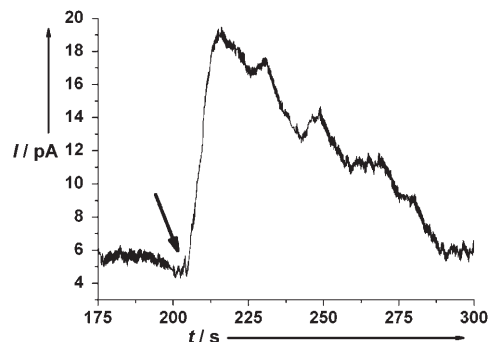


Abbildung 6. Amperometrische Stromantwort eines exakt über einer einzelnen T-HUVEC positionierten scheibenförmigen NO-Mikrosensors nach Stimulation der Zelle durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Bradykinin. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Stimulation.

Zugabe von Bradykinin führt die Ausschüttung von NO zu einer Erhöhung des Oxidationsstroms mit einem Maximum von 13.9 pA nach einer Zeit von 5 bis 8 s. Man kann davon ausgehen, dass der Strom durch den Sensor die Gesamtmenge an durch die Zelle generiertes und ausgeschüttetes NO repräsentiert, wenn man eine 100-proz. Kollektoreffizienz an der SECM-Spitze annimmt. Damit entspricht – unter Annahme einer Ein-Elektronen-Oxidation von NO zu NO^+ an der Sensoroberfläche – die übertragene Ladung der von der Zelle produzierten NO-Menge. Für das Beispiel aus Abbildung 6 ergibt sich eine Ladung von 655 pC und somit eine NO-Menge von 6.8 fmol .

Kontrollexperimente, bei denen Puffer anstatt Bradykinin zugegeben wurde, und Experimente in Abwesenheit von Zellen belegten, dass die beobachteten Ströme durch eine aus den Zellen ausgeschüttete Substanz hervorgerufen werden. Darüber hinaus hatten frühere Befunde^[7] bei der Stimulation der gleichen Zellen in Gegenwart eines NO-Synthase-Inhibitors gezeigt, dass Bradykinin-Stimulation zu einer Ausschüttung von NO führt. Die Stromschwankungen, die die Strom-Zeit-Kurve überlagern, können möglicherweise auf die Ausschüttung von NO über Öffnungen von Vakuolen anstatt auf Diffusion durch die Zellmembran zurückgeführt werden. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Annahme zu bestätigen.

Bei einer Reihe unabhängiger Experimente an verschiedenen T-HUVEC wurden NO-Mikrosensoren an einzelnen Zellen in der beschriebenen Weise mithilfe des Scherkraft-abhängigen Positionierungsmodus positioniert, und es wurde der NO-Oxidationsstrom nach Stimulation mit Bradykinin aufgezeichnet. Der Maximalstrom von sechs Einzelzellmessungen variierte zwischen 5.7 und 13.9 pA und die aus der übertragenen Ladung berechnete NO-Menge zwischen 1.4 und 10 fmol .

Wir haben hier demonstriert, dass die Detektion der stimulierten NO-Ausschüttung aus individuellen Zellen mit hochempfindlichen, hochselektiven, scheibenförmigen NO-Mikrosensoren möglich ist, die durch Platinierung von CF-Mikroelektroden mit nachfolgender Modifizierung durch eine Ni-TSPc-Schicht erhalten wurden. Die exakte Positionierung dieser Mikrosensoren mittels Scherkraft-abhängiger Abstandskontrolle im SECM ist eine wesentliche Voraussetzung für die reproduzierbare Einstellung eines extrem kleinen Abstands von weniger als 300 nm zwischen Sensor und Zellmembran, ohne dabei die Zelle zu berühren.

Experimentelles

Cyclovoltammetrie (CV), Platinierung und Abscheidung der NO-sensitiven Schichten auf der CF-Mikroelektrode erfolgten mit einem CHI1030-Potentiostat (CH Instruments). Amperometrische Messungen für die Detektion der NO-Ausschüttung nach Stimulation einzelner T-HUVEC wurden in einem früher beschriebenen Bio-SECM^[8b] unter Verwendung eines VA10-Potentiostats (npi electronics) durchgeführt. Aktive Schwingungsdämpfung (TS-140, HWL) wurde genutzt, um die Positionierung mittels Scherkraft-Detektion in Abständen von weniger als 300 nm zu realisieren.

Für das Überleben der Zellen wurde ein Ringer-Puffer aus NaOH, KOH, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃, Glucose und HEPES (Riedel-de Haën) verwendet, dessen pH-Wert auf 7.4 eingestellt wurde. Bradykinin und Ni-TSPc wurden von Aldrich bezogen.

Spontan transformierte menschliche Nabelschnur-Endothelzellen (T-HUVEC, freundlicherweise von G. Neufeld, Haifa, überlassen) wurden gemäß Standardzellkulturvorschriften kultiviert. Die T-HUVEC wurden auf Glasdeckgläschen in geringer Dichte ausgesät und in RPM-1641 unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C in 10-proz. CO₂-Atmosphäre kultiviert. Unmittelbar vor den elektrochemischen Experimenten wurde das Wachstumsmedium mit Pufferlösung, pH 7.4, ersetzt.

Eingegangen am 30. April 2006,
veränderte Fassung am 9. August 2006
Online veröffentlicht am 13. Oktober 2006

Stichwörter: Einzelzelluntersuchungen · Elektrochemie · Rastersondenverfahren · Sensoren · Stickstoffoxide

- W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* **2001**, *47*, 265–273; g) F. Bedioui, N. Villeneuve, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 5–18; h) V. Ryabova, A. Schulte, T. Erichsen, W. Schuhmann, *The Analyst* **2005**, *130*, 1245–1252.
- [5] a) K. Shibuki, *Neurosci. Res.* **1990**, *9*, 69–76; b) K. Shibuki, D. Okada, *Nature* **1991**, *349*, 326–328; c) T. Malinski, Z. Taha, *Nature* **1992**, *358*, 676–678; d) T. Malinski, M. W. Radomski, Z. Taha, S. Moncada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 960–965; e) T. Malinski, Z. Taha, S. Grunfeld, A. Burewicz, P. Tomboulis, F. Kiechle, *Anal. Chim. Acta* **1993**, *279*, 135–140; f) A. J. Kanai, H. C. Strauss, G. A. Truskey, A. L. Crews, S. Grunfeld, T. Malinski, *Circ. Res.* **1995**, *77*, 284–293; g) P. Vallance, S. Patton, K. Bhagat, R. MacAllister, M. Radomski, S. Moncada, T. Malinski, *Lancet* **1995**, *346*, 153–154; h) C. Amatore, C. R. Acad. Sci. Ser. IIb **1996**, *323*, 757–771; i) F. Bedioui, S. Trevin, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 227–230.
- [6] a) S. Arbault, P. Pantano, J. A. Jankowski, M. Vuillaume, C. Amatore, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3382–3390; b) C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J. C. Drapier, H. Ghandour, Y. Tong, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 653–661; c) C. Amatore, S. Arbault, Y. Bouret, B. Cauli, M. Guille, A. Rancillac, J. Rossier, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 181–187.
- [7] a) A. Pailleret, J. Oni, S. Reiter, S. Isik, M. Etienne, F. Bedioui, W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 847–852; b) S. Isik, M. Etienne, J. Oni, A. Blöchl, S. Reiter, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6389–6394; c) S. Isik, M. Etienne, J. Oni, A. Blöchl, S. Reiter, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6389–6394; d) S. Borgmann, I. Radtke, T. Erichsen, A. Blöchl, R. Heumann, W. Schuhmann, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 669–672.
- [8] a) A. Hengstenberg, A. Blöchl, I. D. Dietzel, W. Schuhmann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 942–946; b) L. Pitta Bauermann, W. Schuhmann, A. Schulte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4003–4008.
- [9] a) M. Ludwig, C. Kranz, W. Schuhmann, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 2857–2860; b) A. Hengstenberg, C. Kranz, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1547–1554; c) B. Ballesteros Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 60–65.
- [10] a) A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3054–3058; b) A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 985–990.
- [11] a) F. Bedioui, S. Trevin, J. Devynck, F. Lantoine, A. Brunet, M. A. Devynck, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 205–212; b) S. Isik, L. Berdondini, J. Oni, A. Blöchl, M. Koudelka-Hep, W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1566–1572.

- [1] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* **1987**, *327*, 524–526.
- [2] a) L. J. Ignarro in *Nitric Oxide Biology and Pathology* (Hrsg.: L. J. Ignarro), Academic Press, San Diego, **2000**; b) L. Linder, W. Kiowski, F. R. Buhler, T. F. Luscher, *Circulation* **1990**, *81*, 1762–1767; c) H. H. Schmidt, T. D. Warner, K. Ishii, H. Sheng, F. Murad, *Science* **1992**, *255*, 721–723; d) P. M. Vanhoutte, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1990**, *16*, 15–19; e) S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs, *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1709–1715.
- [3] a) D. D. Rees, S. Cellek, R. M. Palmer, S. Moncada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 541–547; b) T. M. Dawson, V. L. Dawson, *Annu. Rev. Med.* **1996**, *47*, 219–227; c) S. Moncada, E. A. Higgs, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1319–1330.
- [4] a) F. Bailey, T. Malinski, F. Kiechle, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 395–398; b) M. N. Friedemann, S. W. Robinson, G. A. Gerhardt, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2621–2628; c) S. Trevin, F. Bedioui, J. Devynck, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *408*, 261–265; d) F. Bedioui, S. Trevin, J. Devynck, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 1085–1091; e) M. Pontie, F. Bedioui, *Analisis* **2000**, *28*, 465–469; f) N. Diab,