

CHARAKTERISIERUNG DER WECHSELWIRKUNGEN
ZWISCHEN NANOPARTIKELN UND ZELLEN

DIPLOMARBEIT

VON

SEBASTIAN ZÜNKELER

GEBOREN AM 16. DEZEMBER 1980 IN OELDE

19. FEBRUAR 2009

GUTACHTER:

PROF. DR. DARIO ANSELMETTI

PROF. DR. GÜNTER REISS

FAKULTÄT FÜR PHYSIK
UNIVERSITÄT BIELEFELD

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, 19. Februar 2009

Sebastian Zünkeler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
2.1	Das Rasterkraftmikroskop	2
2.1.1	Kraftspektroskopie	3
2.1.2	Cantilever	4
2.1.3	Federkonstante	5
2.2	Die Zelle	9
2.2.1	Zellmembran	10
2.2.2	Cytoskelett	11
2.2.3	Zell-Zell-Verbindungen	13
2.2.4	Mechanische Eigenschaften lebender Zellen	15
2.2.5	Endocytose	15
2.3	Nanopartikel	16
2.3.1	Aufnahme in Zellen	17
2.3.2	Cytotoxizität	17
3	Experimenteller Aufbau und verwendete Materialien	21
3.1	AFM	21
3.1.1	Cantilever	22
3.2	Nanopartikel	23
3.2.1	Nanopartikel	23
3.2.2	Herstellung von Suspensionen	24
3.2.3	Fixierung der Nanopartikel	25
3.3	Zellen	25
3.3.1	Präparation	25
4	Ergebnisse und Auswertung	27
4.1	Funktionalisierung von Cantilevern mit Nanopartikeln	27
4.1.1	Funktionalisierung von Cantilevern mit einem Epoxidharz-Kleber	27
4.1.2	Charakterisierung der Cantilever	29

4.1.3	Nachweis eines einzelnen Ceroxid-Nanopartikels mit Hilfe des pH-Werts	32
4.2	Wechselwirkungen zwischen Zellen und Nanopartikeln	37
4.2.1	Lebende Zellen	38
4.2.2	Fixierte Zellen	53
4.2.3	z-Drift des AFMs	56
4.2.4	Nanonadeln	59
4.3	Untersuchungen an einfacheren Systemen	60
4.3.1	Lipiddoppelschichten	61
5	Zusammenfassung und Ausblick	63
A	IGOR Programm-Code	71
A.1	Auswertung von Abrisskräften	71
A.2	Auswertung von Eintauchtiefen	74
B	Danksagung	76

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau des ersten AFMs vgl. [1].	2
2.2	Kraftdistanzkurve eines Siliziumnitrid-Cantilevers mit der Federkonstante $k \approx 0,06 \frac{N}{m}$ auf APTES und die Einteilung der Messung in unterschiedliche Phasen.	3
2.3	Herstellung von Si_3N_4 -Cantilevern vgl. [2].	5
2.4	Korrekturfaktor χ für verschiedene Durchmesser des Laserstrahls entlang des Cantilevers [3].	8
2.5	Effekt der Neigung eines Cantilevers auf die Federkonstante [4].	8
2.6	Schematischer Aufbau einer Zelle [5].	9
2.7	Das Bild zeigt den Aufbau der Zellmembran mit Hilfe eines Elektronenmikroskops sowie in einer zwei- und dreidimensionalen schematischen Zeichnung [5].	10
2.8	Das Bild zeigt von links: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente vgl. [6].	11
2.9	Struktur eines Aktinfilaments [6].	12
2.10	Unterschiedliche Zellverbindungen von Epithelzellen [5].	14
2.11	Herstellung von Nanopartikeln mit Hilfe der Gasphasensynthese [7].	17
2.12	Effekt von Ceroxid-Nanopartikeln auf die Lebensfähigkeit von Zellen [8].	18
2.13	(A) Die Größe von c50 Nanopartikeln (Carboxylierte und fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen mit $d = 50$ nm von Polysciences) bzw. Agglomeraten in verschiedenen Medien (Phosphate Buffer (PB), Krebs-Ringer-Buffer (KRB) ohne/mit Bovine Serum Albumin (BSA)) wurde mit Hilfe von Dynamic Light Scattering (DLS) und Analytical Ultracentrifugation (AUC) bestimmt. (B) Das ζ -Potenzial der Partikel in den gleichen Medien [9].	19
3.1	Verwendeter Messaufbau und Aufbau des AFM-Kopfes vgl. [10].	21
3.2	Abmessungen des Silizium-Cantilevers Tap300 von Budget Sensors [11].	22

3.3	Die linke Abbildung zeigt eine TEM-Aufnahme von Ceroxid Mod. A-Nanopartikeln (mit freundlicher Genehmigung von Evonik Industries), während auf der rechten Seite Ceroxid Mod. D-Nanopartikel mit Hilfe eines AFMs abgebildet wurden.	24
3.4	Phasenkontrastbild einer Lungen-Epithelzelle (RLE-6TN) in einer Petrischale mit Glasboden.	25
4.1	Eintauchen eines Siliziumnitrid-Cantilevers in 1) Epoxidharz und anschließendes Annähern an ein 2) TiO_2 -Aggregat. . . .	28
4.2	Kontrolle der einzelnen Präparationsschritte eines Siliziumnitrid-Cantilevers mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops.	29
4.3	Charakterisierung der Spitzengeometrie mit Hilfe eines inversen Gitters (TGT1 NT-MDT).	30
4.4	Funktionalisierte Siliziumnitrid-Cantilever, deren Spitze aus einzelnen Nanopartikeln besteht.	31
4.5	Adhäsion zwischen SiO_2 und verschiedenen Materialien in Abhängigkeit des pH-Werts. In Abbildung (a) ist die Adhäsion auf den effektiven Spitzenradius normalisiert [12].	33
4.6	Adhäsion zwischen SiO_2 und einem mit CeO_2 funktionalisierten Cantilever.	33
4.7	pH-Abhängigkeit der Adhäsion auf SiO_2 für drei mit CeO_2 Mod. D funktionalisierte Cantilever und einen Kraftsensor mit Epoxidharz.	35
4.8	Kraftdistanzkurven (das Bild zeigt nur die Annäherung, die Rückzugsbewegungen sind nicht dargestellt) eines Siliziumnitrid-Cantilevers auf SiO_2 bei pH-Werten zwischen 4 und 9 und die rekonstruierte Spitzengeometrie von zwei Kraftsensoren, die mit CeO_2 Mod. D funktionalisiert wurden.	36
4.9	Typische Kraftdistanzkurve zwischen einem mit CeO_2 Mod. B funktionalisierten Cantilever und einer RLE-6TN Zelle. . .	37
4.10	Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit TiO_2 funktionalisierten Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.	39
4.11	Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit CeO_2 funktionalisierten Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.	40
4.12	Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit einem unmodifizierten Si_3N_4 -Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.	41
4.13	Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen mit TiO_2 funktionalisierten Cantilever. . . .	43
4.14	Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen mit CeO_2 Mod. D funktionalisierten Cantilever.	44

4.15	Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen unmodifizierten Siliziumnitrid-Cantilever. . .	45
4.16	Mittlere Abrisskräfte für verschiedene modifizierte und unmodifizierte Cantilever in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. . .	47
4.17	Kraftdistanzkurven mit einem funktionalisierten Cantilever (CeO ₂ Mod. A), Bild A zeigt das Phasenkontrastbild lebender Lungen-Epithelzellen, Bild B gibt den größten z-Wert während jeder einzelnen Kraftdistanzkurve an und liefert somit ein Höhensignal und Bild C zeigt die mit IGOR bestimmte Adhäsion.	48
4.18	Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. B funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. Die Graphen wurden für eine bessere Darstellung horizontal verschoben.	49
4.19	Histogramme der Eintauchtiefen eines mit TiO ₂ P25 funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit und das Profil des verwendeten Kraftsensors für zwei verschiedene Richtungen. Für eine bessere Darstellung sind für $t = 5$ s zwei Eintauchtiefen nicht dargestellt ($\pm 2,5 \mu\text{m}$) und für $t = 30$ s wurde ein Wert ($-8 \mu\text{m}$) nicht abgebildet.	50
4.20	Histogramme der Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. D funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.	51
4.21	Histogramme der Eintauchtiefen eines unmodifizierten Siliziumnitrid-Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. . .	52
4.22	Typische Kraftdistanzkurve auf einer mit 0,5% Glutaraldehyd fixierten Zelle.	54
4.23	Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. B funktionalisierten Cantilevers in eine fixierte Zelle (0,5% Glutaraldehyd) für verschiedene Kontaktzeiten t und die Bewegung des z-Piezos für $t = 2$ s.	55
4.24	Drift des z-Piezos [μm], Temperaturen im Kopf des AFMs, im Scanner und im Labor [$^{\circ}\text{C}$].	57
4.25	Immobilisieren eines TiO ₂ -Aggregats an einem Si-Cantilever und anschließendes Ätzen der Flanken mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls.	59
4.26	Vergleich von Kraftdistanzkurven auf Melanocyten mit (A) pyramidalen Cantilevern und (B) Nanonadeln [13].	60
4.27	Das linke Bild zeigt das Phasensignal einer Lipiddoppelschicht auf SiO ₂ . Der schwarze Balken gibt die Stelle für das Höhenprofil an, das auf der rechten Seite abgebildet ist.	61
4.28	Adhäsionskarte für 40×20 Datenpunkte und einen Scanbereich von $4 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$	62

Kapitel 1

Einleitung

Den Grundstein für die Nanotechnologie legte Richard P. Feynman 1959 mit dem Vortrag „There’s plenty of room at the bottom“. Heute zählt die Nanotechnologie zu den Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Das Besondere liegt dabei nicht einfach in einer weiteren Miniaturisierung, sondern vielmehr in neuen Materialeigenschaften, die sich aufgrund der kleinen Abmessungen eines Nanopartikels (≤ 100 nm) ergeben. Den Anwendungsmöglichkeiten sind dabei kaum Grenzen gesetzt, sie reichen von UV-Filtern in Sonnencremes über selbstreinigende- und kratzresistente Oberflächen, bis hin zu Trägersystemen, die einen gezielten Transport von Arzneimitteln gewährleisten.

Vermehrt stellt sich aber auch die Frage nach gesundheitlichen Folgen für den Menschen und die Umwelt. Das größte Gefährdungspotenzial spricht man dabei dem Nanopartikel zu, der biologische Barrieren überwinden und in den Blutkreislauf gelangen kann. Von dort aus können Nanopartikel in Organe übergehen und sogar die Blut-Hirn-Schranke durchdringen [14].

Weitere Nachforschungen über die Risiken sind also unbedingt erforderlich und werden im Rahmen des Projekts NanoCare, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wird, durchgeführt. An der Universität Bielefeld werden keine toxikologischen Tests, sondern Untersuchungen zum Aggregations- und Agglomerationsgrad von Nanopartikeln in Abhängigkeit des umgebenden Mediums durchgeführt. Außerdem werden lebende Zellen, die mit Nanopartikeln inkubiert wurden, mit Hilfe eines AFMs abgebildet.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen mit Hilfe von kraftspektroskopischen Methoden.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Das Rasterkraftmikroskop

Das Rasterkraftmikroskop bzw. Atomic Force Microscope (AFM) zählt zu den Scanning Probe Microscopes (SPM), bei denen eine scharfe Spitze die zu scannende Oberfläche abrastert. Ein Bild entsteht dabei nicht mit Hilfe von Linsen, sondern einzig und allein durch Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe. Dabei sind Messungen nicht auf das Vakuum beschränkt, sondern auch an Luft und sogar in Wasser oder Kulturmedien möglich, was das AFM insbesondere in der Biologie unverzichtbar macht.

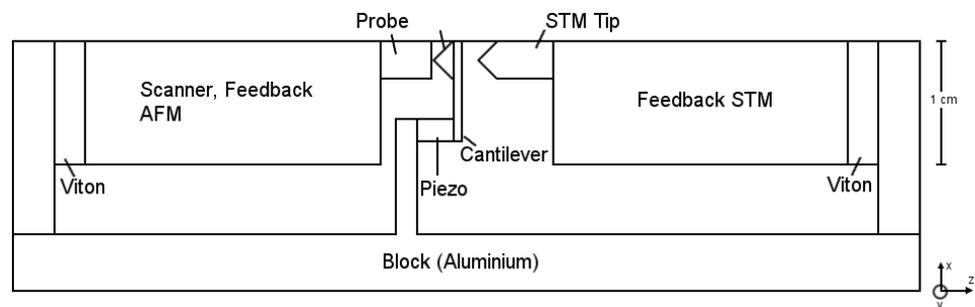


Abbildung 2.1: Aufbau des ersten AFMs vgl. [1].

Der Aufbau in Abbildung 2.1 zeigt das erste AFM, das von G. Binnig, H. Rohrer und C. F. Quate im Jahr 1986 entwickelt wurde. Die Verbiegung und damit die auf den Cantilever wirkende Kraft wurde bei diesem AFM mit einem Scanning Tunneling Microscope (STM) gemessen und ermöglichte so eine Detektion bis in den subatomaren Bereich. Mit dieser Methode waren zum einen aber hohe Kosten durch das zusätzliche STM verbunden und zum anderen reagierte das STM sehr sensibel auf Rauigkeiten des Kraftsensors.

Moderne Geräte nutzen zur Detektion der Verbiegung fast ausschließlich eine Laserdiode, deren Strahl auf den Cantilever fokussiert wird. Die Größe des Laserspots liegt dabei im Bereich von $10 \mu\text{m}$ - $50 \mu\text{m}$ [3]. Der

vom Kraftsensor reflektierte Laserstrahl fällt auf eine Photodiode, die aus 4 Segmenten besteht. Jedes Segment liefert dabei ein Spannungssignal und aus den Differenzen der einzelnen Signale ergibt sich dann die Verbiegung des Sensors.

2.1.1 Kraftspektroskopie

Neben der Möglichkeit, die Topografie einer Oberfläche mit einem Rasterkraftmikroskop abzubilden, ist es auch möglich, Wechselwirkungs- und Bindungskräfte zu bestimmen. Die Sensitivität ist dabei durch den verwendeten Cantilever begrenzt, der im Idealfall möglichst weich, kurz und leicht ist.

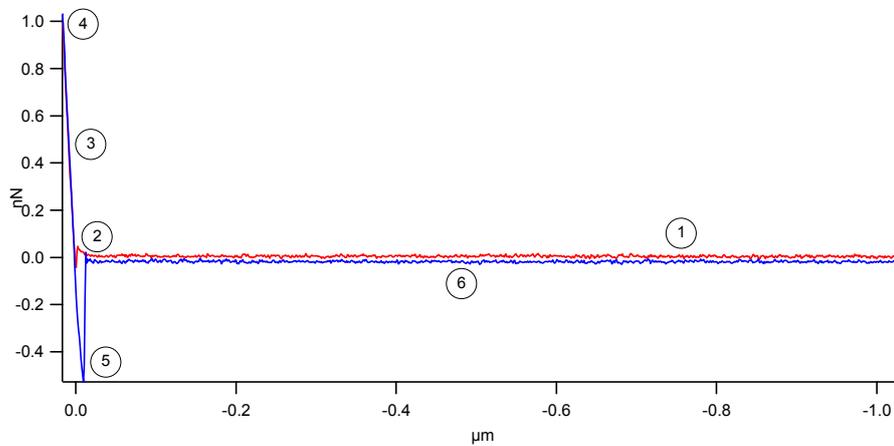


Abbildung 2.2: Kraftdistanzkurve eines Siliziumnitrid-Cantilevers mit der Federkonstante $k \approx 0,06 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ auf APTES und die Einteilung der Messung in unterschiedliche Phasen.

Die rote Kurve in Abbildung 2.2 beschreibt die Annäherung des Kraftsensors an die Oberfläche, während die blaue Kurve die Rückzugsbewegung wiedergibt. Bei Punkt (1) ist der Cantilever noch fast einen Mikrometer von der Probe entfernt und es sind keine Wechselwirkungskräfte messbar. Beim Erreichen von Punkt (2) kommen Spitze und Oberfläche in Kontakt, man spricht vom *Snap-in*. Es wirkt eine kleine anziehende Kraft zwischen Spitze und Probe. Ein weiteres Annähern des Cantilevers (3), führt bei einer harten Probe zu einer großen Änderung der Kraft. Diese nimmt dabei aufgrund der Überlappung der Orbitale und des Pauli-Verbots positive, also abstoßende Werte an. Punkt (4) beschreibt den *trigger point*. Erreicht die Kraft einen vorher festgelegten Wert, wird der Kraftsensor nicht weiter angenähert, sondern zurückgezogen. Bei der Rückzugsbewegung fällt auf, dass die Spitze über den Snap-in Punkt hinaus in Kontakt mit der Oberfläche bleibt. Wird die Rückstellkraft größer als die Adhäsion (5), lässt sich ein scharfer Abriss beobachten und die Kraft steigt auf den Wert 0. Von diesem Punkt

an sind keine Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze messbar.

Die Adhäsion des Cantilevers setzt sich dabei aus verschiedenen Komponenten zusammen. Es gilt

$$F_{Ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{Kap} + F_{chem}. \quad (2.1)$$

Dabei beschreibt F_{el} die elektrostatische Kraft, F_{vdW} die van der Waals Kraft, F_{Kap} die Kapillarkraft und F_{chem} Kräfte die durch chemische Wechselwirkungen oder Bindungen entstehen und oftmals den größten Anteil für F_{Ad} liefern. Die elektrostatische Kraft ist langreichweitig und spielt insbesondere dann eine große Rolle, wenn die Ladungen nicht durch Ionen abgeschirmt werden können, also an Luft oder in deionisierten Flüssigkeiten. Bei der van der Waals Kraft handelt es sich um eine kurzreichweitige Kraft, die zwischen kondensierter Materie stets attraktiv ist. Unter Normalbedingungen und bei kleinen Entfernungen wirkt zwischen Cantilever und Probe eine starke Meniskuskraft bzw. Kapillarkraft die durch Kapillarkondensation entsteht. Bei empfindlichen Proben sind aus diesem Grund Messungen in Flüssigkeit notwendig [15].

2.1.2 Cantilever

Von besonderer Wichtigkeit bei der Rasterkraftmikroskopie ist die Herstellung der Cantilever, an die unterschiedliche Anforderungen gestellt werden. Für Kraftmessungen ist eine möglichst kleine Federkonstante entscheidend, eine hohe Resonanzfrequenz ermöglicht schnellere Scangeschwindigkeiten und macht das System unempfindlicher gegen Gebäudeschwingungen. Für eine genaue Bestimmung der Resonanzfrequenz ist ein hoher Q-Faktor wichtig. Beim Scannen von Oberflächen führt die laterale Steifigkeit zu Artefakten, während man diese bei Reibungsmessungen gerade ausnutzt. Wird die Verbiegung des Sensors mit Hilfe eines Lasers detektiert, der von der Rückseite des Cantilevers auf eine Photodiode fällt, erhöhen möglichst kurze Kraftsensoren die Sensitivität dieser Messmethode. Eine Metallbeschichtung kann dabei die Reflektivität erhöhen. Eine Spitze am Ende des Cantilevers bestimmt die erreichbare Auflösung und sollte aus diesem Grund in den meisten Fällen so scharf wie möglich sein.

Zu Beginn der Rasterkraftmikroskopie wurden die Cantilever aus dünnen Metalldrähten hergestellt, an deren Enden Diamantsplitter geklebt wurden. Die Herstellung dieser Spitzen war jedoch sehr zeitintensiv und wenig reproduzierbar. Zusätzlich machte der Bedarf an kleineren Kraftsensoren mit höheren Resonanzfrequenzen andere Herstellungsverfahren notwendig.

Siliziumnitrid-Cantilever

Zur Herstellung von Siliziumnitrid-Cantilevern wird die Oberfläche eines Si-(100)-Wafers bis auf einen kleinen runden oder quadratischen Bereich

(typischerweise ca. 3 μm groß) mit SiO_2 beschichtet, das die Funktion einer Maske übernimmt. Das exponierte Silizium wird anschließend mit KOH anisotropisch geätzt. Dieser Ätzvorgang stoppt beim Erreichen einer (111)-Ebene, wodurch eine pyramidale Form entsteht. Die SiO_2 -Schicht wird bei diesem Vorgang jedoch nicht angegriffen.

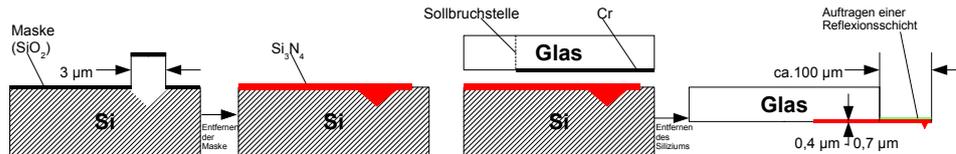


Abbildung 2.3: Herstellung von Si_3N_4 -Cantilevern vgl. [2].

Nach diesem Schritt wird die Maske entfernt, der Wafer mit Si_3N_4 beschichtet und das Siliziumnitrid in die richtige Form gebracht (Balken- oder V-Form). Für eine bessere Handhabbarkeit wird Borosilikatglas anodisch auf dem Si_3N_4 gebunden. Eine dünne Cr -Schicht verhindert die Bindung in dem Bereich des Cantilevers, der frei schwingen soll. Anschließend wird das Silizium mit Hilfe einer Säure entfernt und die Rückseite mit Metall beschichtet [2]. Durch die verschiedenen Bedampfungsschritte lässt sich die Dicke eines Cantilevers nur abschätzen und nicht genau bestimmen.

2.1.3 Federkonstante

Die Hersteller von Cantilevern ermitteln die Federkonstanten mit Hilfe von theoretischen Betrachtungen der Balkenbiegung [16]. Für einen balkenförmigen Cantilever ergibt sich dann

$$z = 4 \frac{Fl^3}{Ebd^3} \quad \Rightarrow \quad k = \frac{Ebd^3}{4l^3}. \quad (2.2)$$

Dabei gibt z die Auslenkung, F die Kraft, l die Länge, b die Breite, d die Dicke, E das Elastizitätsmodul und k die Federkonstante des Cantilevers an. Die Ungenauigkeit bei dieser Methode ist allerdings sehr groß und liefert nur einen ungefähren Wert für die Federkonstante. Das liegt im Wesentlichen an der Tatsache, dass die Cantilever oftmals noch mit Gold oder anderen Materialien beschichtet sind und sich die Dicke, welche mit der dritten Potenz eingeht, nicht genau bestimmen lässt. Daraus entsteht die Notwendigkeit, vor kraftspektroskopischen Messungen die Federkonstante genau zu bestimmen.

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Techniken zur Bestimmung der Federkonstante wurde entwickelt. Beispielsweise kann eine bekannte Masse auf dem Cantilever platziert und k aus der Änderung der Resonanzfrequenz bestimmt werden [17]. Cleveland et al. haben ursprünglich Kugeln aus Wolfram benutzt, eine elegantere Methode beschreiben Bonaccorso und Butt, sie

verwenden anstelle des Wolframs Mikrotropfen, die nach einigen Sekunden rückstandsfrei verdunstet sind [18]. Eine andere Methode beschreiben Sader et al., sie benötigen zur Bestimmung der Federkonstanten die Resonanzfrequenz, den Q -Faktor und die Dimensionen des Cantilevers in der Draufsicht, also nur Länge und Breite [19]. Genauer eingegangen wird im Folgenden nur auf die *Thermal Tune Method* [20], weil diese Methode in vielen AFMs integriert und sehr einfach und schnell in der Anwendung ist.

Thermal Tune Method

1993 veröffentlichten Hutter und Bechhoefer die *Thermal Tune Method* [20]. Dabei gehen sie davon aus, dass ein Cantilever, der nur aufgrund des thermischen Rauschens anfängt zu schwingen, als harmonischer Oszillator betrachtet werden kann, da die Auslenkungen in diesem Fall klein sind. Der Hamiltonoperator eines solchen Systems ist dann gegeben durch

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2 z^2. \quad (2.3)$$

Dabei beschreibt z die Auslenkung, p den Impuls, m die Masse und ω_0 die Eigenfrequenz des Systems. Mit dem Gleichverteilungssatz ergibt sich

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2 z^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad \Rightarrow \quad k = \frac{k_B T}{\langle z^2 \rangle} \quad \text{mit} \quad \omega_0^2 = \frac{k}{m}. \quad (2.4)$$

k_B ist hier die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und k die Federkonstante des Cantilevers. Um den Fehler dieser Methode klein zu halten, ist es wichtig, dass in die Berechnung der Federkonstante nur das thermische Rauschen eingeht. Zur Bestimmung der Auslenkung wird ein Leistungsdichtespektrum in $[V^2 Hz^{-1}]$ aufgenommen. Um das Spektrum in $[m^2 Hz^{-1}]$ angeben zu können, wird aus der Steigung einer Kraftdistanzkurve im Kontaktbereich ein Umrechnungsfaktor, der auch InvOLS (Inverse optical lever sensitivity) genannt wird, ermittelt. Im Leistungsdichtespektrum können dann Störeinflüsse, die nicht in der Nähe der Resonanzfrequenz liegen, ignoriert werden und Hintergrundrauschen lässt sich subtrahieren. Andere Fehlerquellen wie elektronisches Rauschen lassen sich vermeiden bzw. reduzieren, indem die ermittelten Messdaten mit einer Lorentz-Kurve gefittet werden. Die Fläche unter dieser Kurve gibt dann die Auslenkung des Cantilevers an, mit der sich dann die Federkonstante berechnen lässt.

Butt und Jaschke haben diese Methode korrigiert [21]. Sie haben mit Hilfe der Balkentheorie die Amplituden der einzelnen Schwingungsmodi bestimmt, die durch das thermische Rauschen verursacht werden. Vernachlässigt man bei der Berechnung der Federkonstante die höheren Harmonischen, muss mit einem Fehler von bis zu 30 % gerechnet werden [22].

$$\langle z_i^2 \rangle = \frac{12k_B T}{k\alpha_i^4} \quad (2.5)$$

Dabei bezeichnet der Index i die einzelnen Schwingungsmodi. Für einen Cantilever, der an einer Seite fest eingespannt ist und auf der anderen Seite frei schwingen kann, sind aufgrund von Randbedingungen nicht beliebige Lösungen möglich, dies wird durch die Werte von α_i berücksichtigt:

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= 1,88 & \alpha_2 &= 4,69 & \alpha_3 &= 7,85 & \alpha_4 &= 11 \\ \alpha_i &= \left(i - \frac{1}{2}\right) \pi & & \text{für } i \geq 5. \end{aligned} \quad (2.6)$$

Die Summation über alle Modi führt zu dem Ausdruck, den Hutter und Bechhoefer gefunden haben [20]:

$$\langle z^2 \rangle = \frac{12k_B T}{k} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{\alpha_i^4} = \frac{k_B T}{k}. \quad (2.7)$$

Die Gleichung (2.5) kann dann dafür benutzt werden, die Federkonstante zu bestimmen, und zwar sowohl mit Hilfe des Resonanzpeaks, als auch mit den höheren Harmonischen.

Wird die Verbiegung des Cantilevers mit Hilfe eines Lasers gemessen, der von der Rückseite des Kraftsensors reflektiert wird, ist eine weitere Korrektur erforderlich, da diese Messmethode nicht die tatsächliche Auslenkung, sondern die Steigung am Ende des Cantilevers angibt, welche von den Schwingungsmodi abhängt. Für die virtuelle Auslenkung z_i^* ergibt sich dann

$$\langle z_i^{*2} \rangle = \frac{16k_B T}{3k\alpha_i^2} \left(\frac{\sin \alpha_i \sinh \alpha_i}{\sin \alpha_i + \sinh \alpha_i} \right)^2. \quad (2.8)$$

Die Summation über z_i^{*2} ergibt

$$\langle z^{*2} \rangle = \frac{4k_B T}{3k} = \frac{4}{3} \langle z^2 \rangle. \quad (2.9)$$

Für beide Korrekturen und für $i = 1$ folgt

$$k = 0,971 \frac{1}{\chi^2} \frac{k_B T}{\langle z_1^{*2} \rangle} \quad \text{mit} \quad \chi = 1,09. \quad (2.10)$$

Der Korrekturfaktor χ gilt allerdings nur für rechteckige Cantilever. Stark et al. haben mit Hilfe einer Finite-Element-Analyse numerisch die Federkonstante eines v-förmigen Cantilevers ermittelt und mit der Thermal Tune Method verglichen ($\chi = 1,09$), die in diesem Fall einen um ca. 7 % zu großen Wert für die Federkonstante liefert [23]. Des Weiteren muss die Größe und Position des Laserstrahls auf dem Cantilever berücksichtigt werden [3]. Wird der Spot des Lasers von der Basis des Cantilevers bis zur Spitze verschoben, so wird die gemessene Federkonstante größer. Für einen Kraftsensor mit $l = 225 \mu\text{m}$ beträgt die Zunahme 50 % und für einen kurzen Cantilever mit

$l = 60 \mu\text{m}$ noch 15 %. Der Faktor $\chi = 1,09$ gilt außerdem nur, wenn der Laserspot im Vergleich zum verwendeten Kraftsensor klein ist. Bei kurzen Cantilevern ist diese Bedingung nicht oder nur schlecht erfüllt. Ist der Laserspot so groß wie der gesamte Cantilever, gilt nicht mehr $\chi = 1,09$, sondern $\chi = 0,984$. Der Fehler in der Sensitivität beträgt somit 10 %, was zu einem 20 %igen Fehler bei der Bestimmung der Federkonstanten führt.

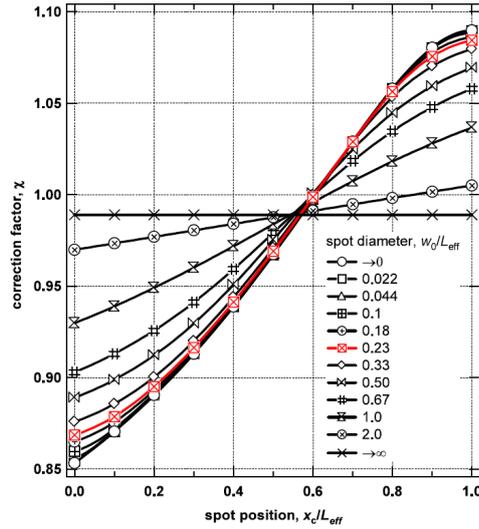


Abbildung 2.4: Korrekturfaktor χ für verschiedene Durchmesser des Laserstrahls entlang des Cantilevers [3].

Heim et al. [4] haben festgestellt, dass der Winkel α unter dem der Cantilever im AFM eingebaut ist (üblicherweise 7° - 20°), einen Effekt auf die Federkonstante und somit auf die Messwerte hat.

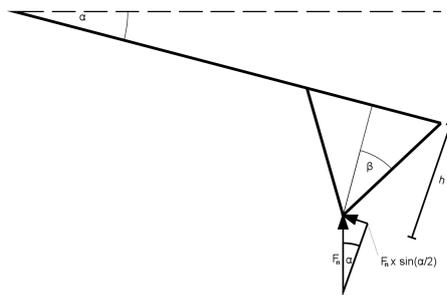


Abbildung 2.5: Effekt der Neigung eines Cantilevers auf die Federkonstante [4].

Eine am Cantilever angreifende Kraft lässt sich aufteilen in die Normalkraft F_n und eine Kraftkomponente parallel zum Kraftsensor. Die parallele

Komponente führt zu einem Drehmoment, das zwar keine große Auswirkung auf die Auslenkung hat, aber auf die Verbiegung am Ende des Cantilevers und diese wird mit einem Laser, der von der Rückseite des Cantilevers reflektiert wird, gerade detektiert (siehe Abbildung 2.5). Deshalb ist es wichtig, dass der Kraftsensor bei Kalibration und Messung unter dem gleichen Winkel eingebaut ist [24].

2.2 Die Zelle

Auf der Erde leben schätzungsweise an die 100 Millionen Arten, die sich zum Teil sehr stark voneinander unterscheiden. Es fällt jedoch auf, dass die Fortpflanzung bei allen Arten extrem präzise geregelt ist. Der Elternorganismus vererbt dabei Informationen an die Nachkommen. Egal, ob der Organismus ein Einzeller oder ein Vielzeller ist, er ist dabei in jedem Fall durch Zellteilung aus einer einzelnen Zelle entstanden, die die Erbinformation in Form der DNA an die anderen Zellen weitergibt [5]. Haben Nanopartikel jedoch

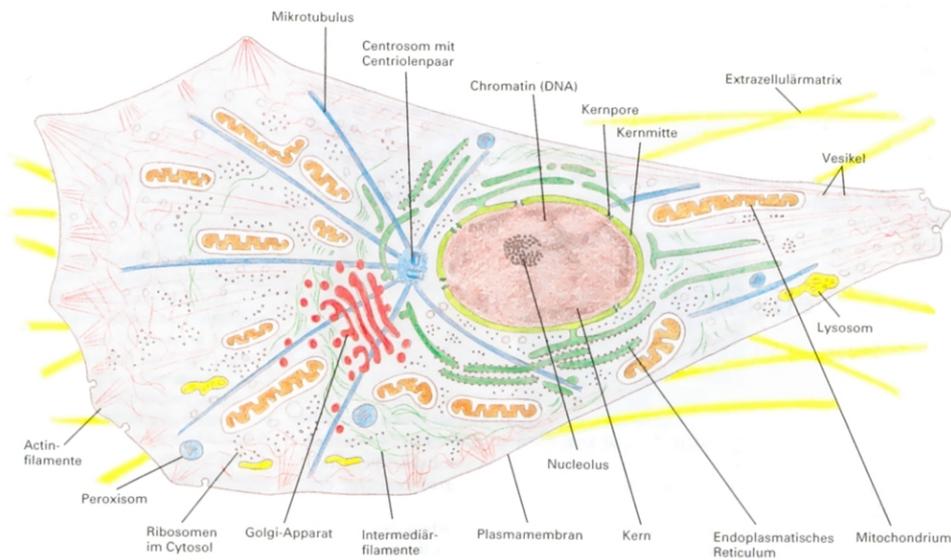


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau einer Zelle [5].

einen Einfluss auf diesen Zyklus, indem sie mit Zellorganellen wechselwirken, kann dies unter Umständen erhebliche Folgen für den Organismus haben, die noch nicht hinlänglich erforscht wurden. Aus diesem Grund sind Einzelzelleexperimente von außerordentlicher Bedeutung, um beurteilen zu können, wie Nanopartikel auf den menschlichen Körper wirken.

2.2.1 Zellmembran

Jede Zelle ist von einer äußeren Hülle umgeben, die man als Zellmembran bezeichnet. Diese Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen, die sowohl integral, als auch peripher gebunden auftreten. Die typische Schichtdicke liegt im Bereich von 5 nm.

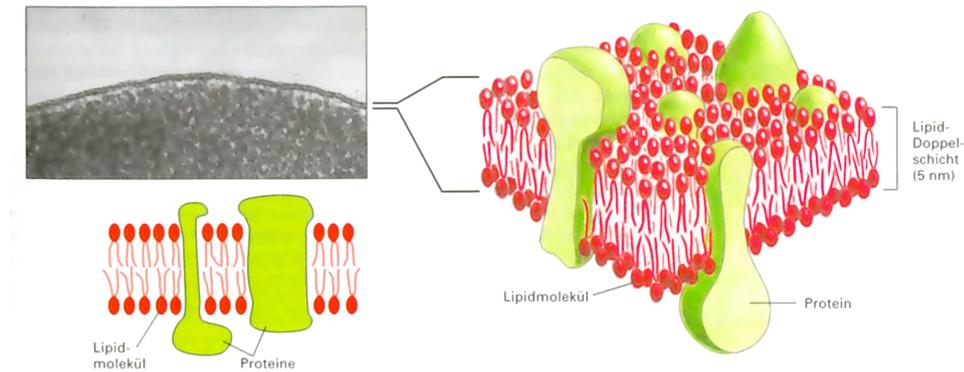


Abbildung 2.7: Das Bild zeigt den Aufbau der Zellmembran mit Hilfe eines Elektronenmikroskops sowie in einer zwei- und dreidimensionalen schematischen Zeichnung [5].

Phospholipide bilden den größten Teil der Membranlipide. Sie sind amphiphil und haben eine hydrophile (polare) Kopfgruppe und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffschwänze, diese bestehen aus unterschiedlich langen Fettsäuren (14 - 24 Kohlenstoffatome). In wässriger Lösung bilden sie spontan Doppelschichten, da aus energetischen und entropischen Gründen eine möglichst kleine wasserexponierte Fläche der hydrophoben Schwänze günstig ist. Aus diesem Grund besitzt eine Lipiddoppelschicht die Fähigkeit, kleine Schäden in der Membran selbst zu heilen. Es wird zwischen gesättigten (ohne Doppelbindung) und ungesättigten (mit Doppelbindung) Fettsäuren unterschieden. Eine Doppelbindung führt zu einem Knick des Fettsäureschwanzes, der, genauso wie die Temperatur, die Fluidität der Membran beeinflusst. Diese ist von entscheidender Bedeutung für Membrantransportprozesse.

Weitere Bausteine der Zellmembran sind Cholesterin und Glykolipide. Cholesterin lagert sich dabei so in die Zellmembran ein, dass die Hydroxylgruppen zu den polaren Kopfgruppen der Phospholipide gerichtet sind. Dadurch beeinflusst sein starrer Steroidring die Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten, die den polaren Kopfgruppen am nächsten sind, und führt zu einer teilweisen Immobilisierung. Dadurch wird die Membranbeweglichkeit reduziert, aber gleichzeitig eine Kristallisation der Kohlenwasserstoffketten verhindert. Glykolipide treten nur in der äußeren Lipidschicht auf. Ihre Zuckerreste befinden sich auf der Zelloberfläche und sind bei der Zell-

Zell-Kommunikation von Bedeutung.

Ein weiterer wichtiger Punkt beim Aufbau der Lipiddoppelschicht ist die Asymmetrie zwischen den beiden Schichten. Diese unterscheiden sich nicht nur in der Verteilung der Lipide, sondern z.B. auch in der Ladung. Enzyme benötigen für ihre Aktivität bestimmte Eigenschaften der Kopfgruppen. Auf diese Weise wird eine unterschiedliche Funktion auf beiden Seiten der Membran möglich [5, 6].

Membranproteine

Die spezifischen Funktionen der Zellmembran werden durch Proteine bestimmt, die zwischen 25 % und 75 % der Membranmasse ausmachen. Transmembranproteine bestehen, so wie Phospholipide, aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil. Der hydrophobe Teil durchspannt dabei, in Form einer α -Helix oder eines β -Faltblatts, die Lipiddoppelschicht und wechselwirkt mit den Kohlenwasserstoffketten der Lipide. Die hydrophilen Teile hingegen liegen außerhalb der Membran, also zum Wasser gerichtet und sind in den meisten Fällen glykosyliert.

Die Bindung von peripheren Proteinen an die Membran kann auch mit α -helikalen Strukturen, die in diesem Fall nur in der äußeren Schicht der Plasmamembran verlaufen, erfolgen. Möglich sind aber auch kovalente Bindungen zur Membran über ein Oligosaccharid und hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen ohne eine direkte Verbindung zur Lipidschicht [5].

2.2.2 Cytoskelett

Das Cytoskelett ist ein Filamentsystem, das von entscheidender Bedeutung für die Lebensfähigkeit der meisten Organismen ist. Es ist für die Form der

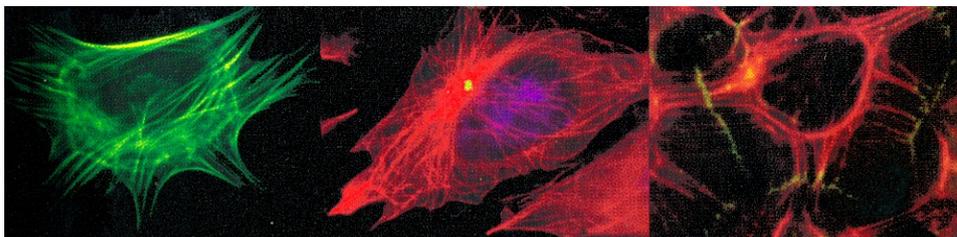


Abbildung 2.8: Das Bild zeigt von links: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente vgl. [6].

einzelnen Zellen, deren Stabilität, Elastizität und Beweglichkeit, aber auch für die Bewegung von Motorproteinen von entscheidender Bedeutung und ermöglicht dadurch Prozesse wie die Zellteilung oder die Muskelbewegung.

Man unterscheidet zwischen Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten [6].

Aktinfilamente

Aktin bildet quervernetzte Filamente, die die gesamte Zelle durchspannen und 5 nm - 9 nm dick sind. Diese Filamente liegen zum größten Teil direkt unter der Plasmamembran und sind deshalb für die Form der Zelle verantwortlich. Des Weiteren ermöglicht Aktin die Bewegung von Zellen und Organellen. Für diese Bewegung sind aber noch eine Vielzahl anderer Proteine nötig, insbesondere Motorproteine, die sich entlang der Filamente bewegen.

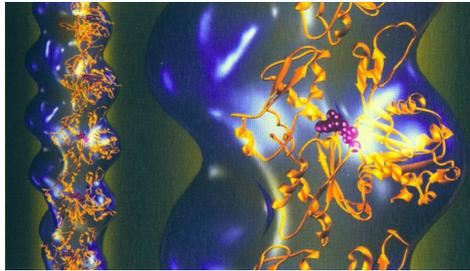


Abbildung 2.9: Struktur eines Aktinfilaments [6].

Aktin besteht aus 375 Aminosäuren und bildet zwei Domänen, die in der Mitte ein Nukleotid ATP einschließen. Damit die entstehenden Strukturen dynamisch und gleichzeitig stabil sein können, bestehen die Filamente aus mehr als einem Protofilament (das vor Brüchen schützt) und werden an den Enden ständig auf- und abgebaut, da kleinere Untereinheiten schneller diffundieren. Für die Entstehung eines Filaments ist ein Keim bzw. eine Keimzelle notwendig. Eine Bindung zwischen den einzelnen Untereinheiten ist schwach, um eine hohe und schnelle Anpassungsfähigkeit der Filamente zu gewährleisten. Aus diesem Grund sind kleine Aggregate instabil und die Bildung eines Filaments wird erst ab einer gewissen Aggregatgröße möglich. Proteine katalysieren den Prozess der Keimbildung, was einen gezielten Aufbau von Aktinfilamenten in bestimmten Bereichen der Zelle ermöglicht.

Bei Aktinfilamenten wird zwischen einem Plus- und einem Minusende unterschieden, die verschiedene Polymerisationsgeschwindigkeiten aufweisen. Diese Geschwindigkeitsunterschiede werden durch eine Konformationsänderung während des Einbaus ins Filament möglich. Ohne eine Nucleotidhydrolyse würden allerdings beide Enden in Abhängigkeit von der Aktinkonzentration entweder wachsen oder schrumpfen. Bindet Aktin allerdings an ein Polymer, wird das eingeschlossene ATP zu ADP hydrolysiert und verringert so die Affinität zu den benachbarten Molekülen. Dadurch wird eine Abspaltung erleichtert. Bei einer hohen Aktinkonzentration erfolgt die Anlagerung allerdings schneller als die Hydrolyse und es kommt zur Bil-

dung einer ATP-Kappe, was zu einem fest gebundenen Ende und damit zum Wachstum des Polymers führt [5].

Mikrotubuli

Mikrotubuli bilden ca. 25 nm dicke Röhren und sind wesentlich starrer als Aktinfilamente. Das Centrosom ist in der Regel der Ausgangspunkt der Mikrotubuli, was in Abbildung 2.8 gut zu erkennen ist. Sie bilden während der Zellteilung die Mitosespindel, aber auch Cilia bzw. Flagella, die zur Fortbewegung dienen, und sind an Transportprozessen beteiligt.

Mikrotubuli bestehen aus dem Protein Tubulin. Dieses teilt sich auf in α - und β -Tubulin, die aber nur als Komplex auftreten und über kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Beide binden GTP, allerdings kann nur das am β -Tubulin gebundene GTP zu GDP hydrolysiert werden und hat wie beim Aktin einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik [5].

Intermediärfilamente

Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von ungefähr 10 nm und bilden seilartige Strukturen, die flexibel, aber zugfest sind. Häufig sind sie in Zellen, die mechanischem Stress ausgesetzt sind, zu finden. Über Desmosomen bilden sie dabei feste Zell-Zell-Verbindungen.

Anders als bei Aktinfilamenten und Mikrotubuli hängt ihr Aufbau vom Zelltyp ab. Allen gemein ist allerdings eine α -helikale Struktur der einzelnen Polypeptide, die mit anderen Monomeren Doppelwendeln bilden. Zwei Dimere lagern sich antiparallel zusammen und bilden Tetramere, die die kleinsten löslichen Einheiten darstellen. Aufgrund dieser Struktur sind beide Seiten der Intermediärfilamente gleich und sie besitzen keine Gesamtpolarität [5].

2.2.3 Zell-Zell-Verbindungen

Die äußersten Zellschichten der Lunge oder des Darms bestehen aus Epithelzellen, die sowohl eine mechanische Schutzfunktion übernehmen, als auch verschiedene Kompartimente voneinander trennen und so z.B. den Nährstofftransport nur in eine Richtung zulassen. Um diese Eigenschaften gewährleisten zu können, sind neben den Zellmembranen die Zell-Zell-Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Diese Verbindungen werden in unterschiedliche Klassen unterteilt. Man spricht von *undurchlässigen Verbindungen*, die durch „Tight Junctions“ realisiert werden, von *Ankerverbindungen*, die durch Aktin- oder Intermediärfilamenten mit Hilfe von Proteinen gebildet werden, und von *kommunizierenden Verbindungen* wie z.B. „Gap Junctions“ [5].

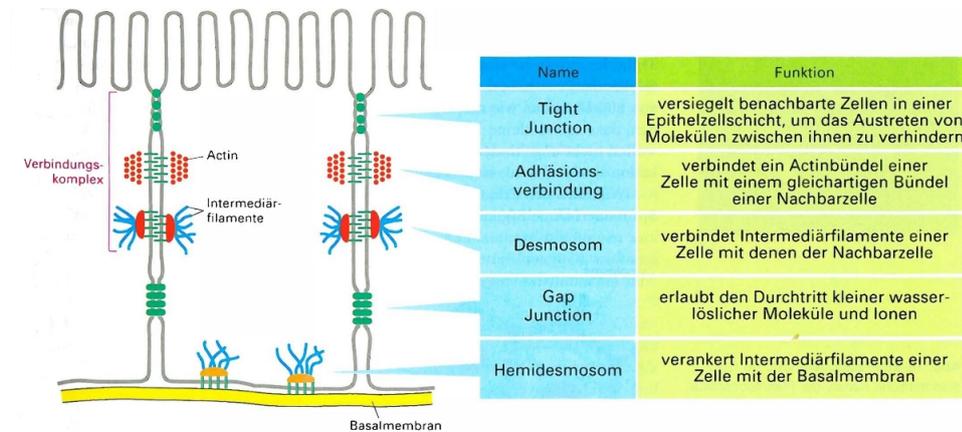


Abbildung 2.10: Unterschiedliche Zellverbindungen von Epithelzellen [5].

Tight Junctions

Tight Junctions bilden eine undurchlässige Verbindung zwischen den Zellmembranen benachbarter Epithelzellen und sind mit den Aktinfilamenten der Zellen verbunden. Sie bilden eine Barriere und verhindern, dass Transportproteine von der basolateralen zur apikalen Seite gelangen können und ermöglichen damit einen gerichteten Transport.

Die Tight Junctions werden durch verschiedene Transmembranproteine gebildet. Die Gruppe der *Claudine* umfasst dabei eine Familie von mindestens 24 unterschiedlichen Proteinen und es wird vermutet, dass sie maßgeblich für die Struktur der Bindung verantwortlich sind und außerdem die Ionenselektivität des parazellulären Transports bestimmen. Die meisten biochemischen Wechselwirkungen der *Occludine* sind noch unbekannt, aber es kann davon ausgegangen werden, dass sie unter anderem das Eindringen von Neutrophilen regulieren [25].

Ankerverbindungen

Die Zellmembranen der Epithelzellen allein könnten den äußeren mechanischen Beanspruchungen nicht standhalten. Dafür sind Ankerverbindungen erforderlich, die Kräfte auf benachbarte Zellen verteilen, indem sie an Aktin- oder Intermediärfilamente binden. Die Cytoskelettfilamente von nebeneinander liegenden Zellen interagieren dabei über Adhäsionsverbindungen. Diese liegen direkt unter den Tight Junctions und bilden eine Art Gürtel um die Epithelzellen. Die Bindung ermöglichen dabei Cadherine, die über Ankerproteine mit dem Cytoskelett verbunden sind. Es wird vermutet, dass die Bildung der Tight Junctions erst möglich ist, wenn sich zuvor Adhäsionsverbindungen gebildet haben.

Desmosomen gehören zu den Adhäsionsverbindungen und verbinden die

Intermediärfilamente von unterschiedlichen Zellen miteinander. Auf diese Weise entsteht ein Netz aus seilartigen und zugleich sehr zugfesten Filamenten. Bei Ankerverbindungen, die über Integrine Zellen und deren Aktinfilamente an die extrazelluläre Matrix binden, spricht man von *Fokaladhäsion*. *Hemidesmosomen* sind wie die Desmosomen mit den Intermediärfilamenten verknüpft. Sie verbinden aber nicht einzelne Zellen, sondern die Unterseite von Epithelzellen mit der Basallamina [5].

Gap Junctions

Benachbarte Zellen kommunizieren über Gap Junctions miteinander. Dabei bilden Kanalproteine ca. 2-4 nm breite Verbindungen, die so den Transport von Ionen, Zucker, Aminosäuren, Nucleotiden, Vitaminen und intrazellulären Signalüberträgern direkt vom Cytoplasma einer Zelle ins Cytoplasma einer anderen Zelle ermöglichen. Die Gap Junctions bilden also eine metabolische und elektrische Verbindung, verhindern aber den Austausch von Makromolekülen wie Proteinen, Nucleinsäuren und Polysacchariden [5].

2.2.4 Mechanische Eigenschaften lebender Zellen

Die mathematischen Grundlagen der Berührung elastischer Körper gehen auf H. Hertz zurück. Dabei beschreibt er den Kontakt zwischen zwei gewölbten Flächen bzw. zwischen einer Kugel und einer Ebene [26]. Bei Elastizitätsmessungen an Zellen mit Hilfe eines Cantilevers muss jedoch die Form des Kraftsensors berücksichtigt werden. Ein Kontaktmodell für pyramidale Cantilever lässt sich mit numerischen Methoden entwickeln [27, 28]. Leonenko et al. beschreiben die Spitze des Cantilevers in Abhängigkeit von der Eindringtiefe h . Dabei betrachten sie diese für $0 \leq h \leq 10$ nm näherungsweise als Halbkugel [29]. Damit folgt für das Elastizitätsmodul

$$E_{Kugel} = \frac{3}{4\sqrt{R}} \frac{F}{h^{3/2}}. \quad (2.11)$$

Für $10 \text{ nm} \leq h \leq 300 \text{ nm}$ betrachten sie die Spitze als Kegel, dessen halber Öffnungswinkel sich linear von $\alpha_1 = 25^\circ$ bis $\alpha_2 = 45^\circ$ ändert:

$$E_{Kegel} = \frac{\sqrt{2}}{\tan \alpha} \frac{F}{h^2}. \quad (2.12)$$

Sinkt die Spitze noch weiter in die Zelle ein, bleibt der halbe Öffnungswinkel konstant bei dem Wert α_2 . Mit diesem Ansatz ist es möglich, das Elastizitätsmodul der Zelle in Abhängigkeit der Eintauchtiefe zu bestimmen.

2.2.5 Endocytose

Kleine Moleküle wie Ionen, Aminosäuren und Zucker gelangen mit Hilfe von Kanälen, Ionenpumpen oder Carriern ins Innere einer Zelle. Bei Makromolekülen scheiden diese Transportwege aus, sie können nur von der Zelle

aufgenommen werden, indem sie von der Zellmembran umschlossen und abgeschnürt werden. Diesen Vorgang nennt man Endocytose. Man unterscheidet jedoch zwischen vielen unterschiedlichen Arten bzw. Mechanismen der Endocytose.

Die Phagocytose beschreibt die Aufnahme von großen Partikeln wie Bakterien oder toten Zellen. Man unterteilt sie in vier Schritte. Im ersten Schritt muss der Partikel erkannt werden, das geschieht im Fall von Bakterien durch das Andocken von Antikörpern, die das Bakterium markieren und auf diese Weise die Phagocytose durch Makrophagen induzieren. Binden die Makrophagen an ein markiertes Bakterium, werden im zweiten Schritt GTPasen aktiviert, die das Cytoskelett stimulieren und auf diese Weise eine Neuordnung der Aktinfilamente um das Bakterium herum einleiten. Ist dieser Vorgang abgeschlossen und das Bakterium vollständig von einer Membran umgeben, spricht man von einem Phagosom, das im dritten Schritt an Mikrotubuli ins Zellinnere befördert wird. Dort werden einzelne Teile des Phagosoms entfernt und durch Lysosomen ersetzt, wodurch die meisten eingeschlossenen Partikel im letzten Schritt in ihre Grundbausteine wie Aminosäuren, Monosaccharide und Lipide zersetzt werden [6].

2.3 Nanopartikel

Die Frage, ab wann von einem Nanopartikel gesprochen wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. In der Regel wird aber der Terminus so verstanden, dass ein Teilchen in mindestens einer Dimension eine Kantenlänge ≤ 100 nm haben muss. Die im Rahmen des BMBF-Projekts NanoCare untersuchten Nanopartikel sind fast ausschließlich Metalloxide, aufgrund ihrer großen Relevanz und Verbreitung. Die jährliche Produktion von nanoskaligen Metalloxiden liegt mittlerweile im Bereich von mehreren Millionen Tonnen pro Jahr [30]. Diese Zahlen verdeutlichen auf der einen Seite eindrucksvoll die Wichtigkeit dieser Partikel und die damit verbundenen neuen Möglichkeiten. Auf der anderen Seite zeigen sie jedoch auch, dass eine genaue Untersuchung und Einschätzung des Gefährdungspotenzials unabdingbar ist.

Die Herstellung von nanoskaligen Metalloxiden findet hauptsächlich in Flammenreaktoren statt, da sie eine gute Prozesskontrolle und eine kosteneffiziente Herstellung ermöglichen.

Charakteristisch für Flammenreaktoren sind Temperaturen im Bereich von 1000 °C bis 2400 °C. Die Präkursoren werden dabei pulverförmig, flüssig oder gasförmig in die Brennkammer gegeben. Die Verweildauer im heißesten Bereich der Flamme liegt dabei nur zwischen 10 ms und 100 ms. In dieser Zeit ist die Bildung der Primärpartikel abgeschlossen und reicht von einigen nm bis zu 500 nm. Anschließend lässt sich nur noch die Größe und Form der Aggregate beeinflussen. Die typische Oberfläche der auf diese Weise hergestellten Partikel beträgt bis zu 400 m²/g [31].

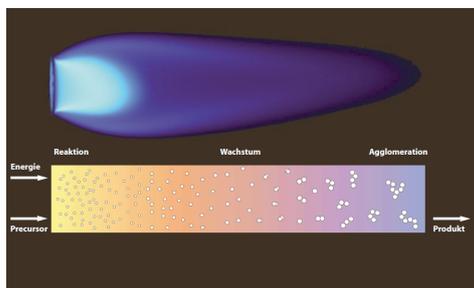


Abbildung 2.11: Herstellung von Nanopartikeln mit Hilfe der Gasphasensynthese [7].

2.3.1 Aufnahme in Zellen

Innerhalb weniger Stunden nach dem Einatmen von Nanopartikeln sind diese in Organen wie der Leber oder dem Herzen nachweisbar [32, 33]. Außerdem berichten Oberdörster et al. über das Eindringen von nanoskaligen Teilchen in das zentrale Nervensystem über den Riechnerv [34].

Im Abschnitt 2.2.5 wurde die Aufnahme größerer Partikel durch Zellen beschrieben. Bei diesen Prozessen umschließt die Zellmembran das Teilchen, das dann in einem Vesikel ins Innere der Zelle gelangt. Nanopartikel hingegen können die Zellmembran überwinden, ohne von dieser umschlossen zu werden. Geiser et al. haben, um diese Beobachtung zu bestätigen, Tests an Makrophagen und Erythrozyten durchgeführt. Die Makrophagen dienen dabei als Modell für phagozytische Zellen, während die Erythrozyten Zellen beschreiben sollen, die keine Phagozytose betreiben. Des Weiteren wurde die Phagozytose der Makrophagen in den folgenden Experimenten mit Cytochalasin D unterbunden. Durch diese Behandlung konnte eine Aufnahme von 1 μm großen Partikeln unterbunden werden, während Partikel, die kleiner als 0,2 μm waren, weiterhin in die Makrophagen eindringen konnten. Über die genauen Transportmechanismen bei diesen Prozessen ist bis jetzt wenig bekannt [33]. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen, indem sie die Bindung zwischen Nanopartikeln und Zellen beeinflussen [35, 36].

2.3.2 Cytotoxizität

Von besonderem Interesse sind die Mechanismen, die zur Aufnahme von Nanopartikeln führen, und die Frage, ob Nanopartikel eine cytotoxische Wirkung haben. Nicht zuletzt aufgrund der Menge an synthetisch hergestellten und bereits verwendeten Nanopartikeln beschäftigen sich derzeit viele Wissenschaftler, unter anderem auch das BMBF-Projekt NanoCare, mit der Cytotoxizität. Eine allgemeingültige Antwort zu dieser Fragestellung lässt sich aber noch nicht geben und bei der Vielzahl an unterschiedlichen Parti-

keln und Testbedingungen ist der damit verbundene Aufwand äußerst groß. Selbst bei der Beschränkung auf einen bestimmten Partikel z.B. Ceroxid gibt es kontroverse wissenschaftliche Arbeiten zur Cytotoxizität. Aus diesem Sachverhalt lässt sich schließen, dass kleine Veränderungen einzelner Parameter einen starken Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Die verwendeten Nanopartikel haben zwar identische chemische Zusammensetzungen, können aber trotzdem unterschiedlich große Oberflächen haben. Park et al. haben Experimente mit BEAS-2B-, T98G- und H₉C₂-Zellen durchgeführt [8].¹ Dabei haben sie die Lebensfähigkeit der drei Zelllinien nach der Behandlung mit Ceroxid-Nanopartikeln (5 µg/ml) untersucht und nur bei den BEAS-2B-Zellen eine cytotoxische Wirkung festgestellt, die dabei auf der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beruht (vgl. Abbildung 2.12).

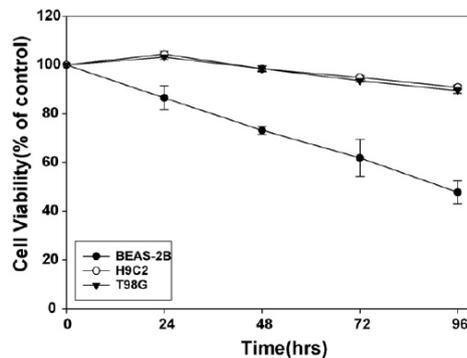


Abbildung 2.12: Effekt von Ceroxid-Nanopartikeln auf die Lebensfähigkeit von Zellen [8].

Weiter haben sie festgestellt, dass die Lebensfähigkeit der BEAS-2B-Zellen nur im geringen Maße von der Partikelkonzentration abhängt. So führt eine Erhöhung der Konzentration von 20 µg/ml auf 40 µg/ml zu keiner größeren Cytotoxizität. Eine Änderung der Partikelgrößen von 15 nm bis zu 40 nm führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Messergebnisse, obwohl die Änderung der Partikeloberfläche einen wesentlichen Einfluss auf die Toxizität hat [37]. Park et al. vermuten, dass die Entstehung von Aggregaten für diesen Effekt verantwortlich ist.

Die Aggregation bzw. die Deaggregation von Nanopartikel-Suspensionen hängt stark vom pH-Wert und der Ionenkonzentration ab. Bei synthetisch hergestellten Nanopartikeln liegen diese Parameter aber oft außerhalb des physiologischen Bereichs, um die Partikel in Suspensionen zu stabilisieren. Für Versuche an lebenden Zellen sind aber isotonische Kulturmedien mit

¹BEAS-2B-Zellen sind Epithelzellen, die aus den Bronchien von Menschen gewonnen werden. Bei den T98G-Zellen handelt es sich um Fibroblasten aus dem menschlichen Gehirn und H₉C₂-Zellen sind Kardiomyozyten von Ratten.

einem pH-Wert von 7,4 erforderlich, in denen positive und negative Ionen und eventuell noch verschiedene Proteine vorhanden sind. In dieser Vielzahl an Komponenten, die mit den Partikeln wechselwirken können, liegt eine Schwierigkeit der Nanotoxikologie [9].

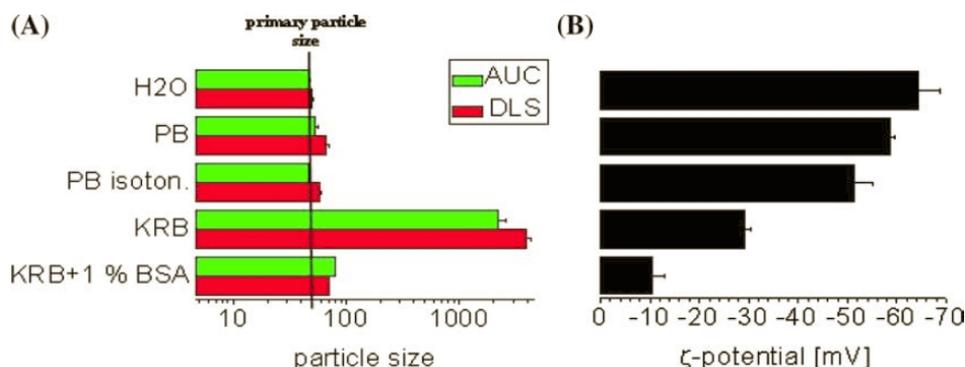


Abbildung 2.13: (A) Die Größe von c50 Nanopartikeln (Carboxylierte und fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen mit $d = 50$ nm von Polysciences) bzw. Agglomeraten in verschiedenen Medien (Phosphate Buffer (PB), Krebs-Ringer-Buffer (KRB) ohne/mit Bovine Serum Albumin (BSA)) wurde mit Hilfe von Dynamic Light Scattering (DLS) und Analytical Ultracentrifugation (AUC) bestimmt. (B) Das ζ -Potenzial der Partikel in den gleichen Medien [9].

Schulze et al. haben die Größen von c50 Nanopartikeln in verschiedenen Medien bestimmt. Abbildung 2.13 zeigt, dass die verwendeten Partikel in Krebs-Ringer-Puffer Agglomerate mit einer Größe von über 3000 nm bilden. Gleichzeitig zeigt das ζ -Potenzial eine große nicht-lineare Zunahme. Verantwortlich für die Agglomeratbildung sind Ca^{2+} -Ionen. Dabei wechselwirken die deprotonierten Carboxylgruppen, der elektrostatisch stabilisierten Nanopartikel, mit den Calcium-Ionen. Durch Hinzufügen von Albumin lösen sich die Agglomerate. Eine erneute Bestimmung der Größe führt zu Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 70 nm, was darauf schließen lässt, dass die Partikel von einer Proteinhülle umgeben sind. Diese Hülle stabilisiert die c50-Teilchen [9].

Wie bereits erwähnt, wird die Cytotoxizität kontrovers diskutiert. Schubert et al. haben die Zelllinie HT22² untersucht, die durch die endogene Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sterben. Glutathion (GSH) ist ein Peptid und zählt zu den Antioxidantien der Zelle. In Gegenwart von Glutaminsäure wird die Aufnahme der essentiellen Aminosäure Cystin geblockt, die der Hauptbestandteil von GSH ist. Durch diesen Prozess kommt es zum programmierten Zelltod, der Oxytose genannt wird. Die Oxytose erfordert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Mitochondrien

²Die Zelllinie Ht22 wird aus dem Nervensystem von Nagern gewonnen.

und die Einfuhr von Calcium. Schubert et al. haben untersucht, ob Nanopartikel einen Einfluss auf den durch Glutaminsäure induzierten Zelltod haben [38]. Dabei haben sie unter anderem Ceroxid untersucht, das aufgrund seiner Redoxchemie für katalytische Prozesse interessant ist und kommen zu dem Ergebnis, dass bei 6 nm - 1000 nm großen Ceroxidpartikeln nur die Partikel mit einem Durchmesser von $d = 1 \mu\text{m}$ ($20 \mu\text{g/ml}$) zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit der HT22-Zellen nach 20 h führen.

Kapitel 3

Experimenteller Aufbau und verwendete Materialien

3.1 AFM

Das wichtigste Instrument, um die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen untersuchen zu können, ist das AFM. Dieses ermöglicht kraftspektroskopische Messungen bis in den Bereich weniger pN.

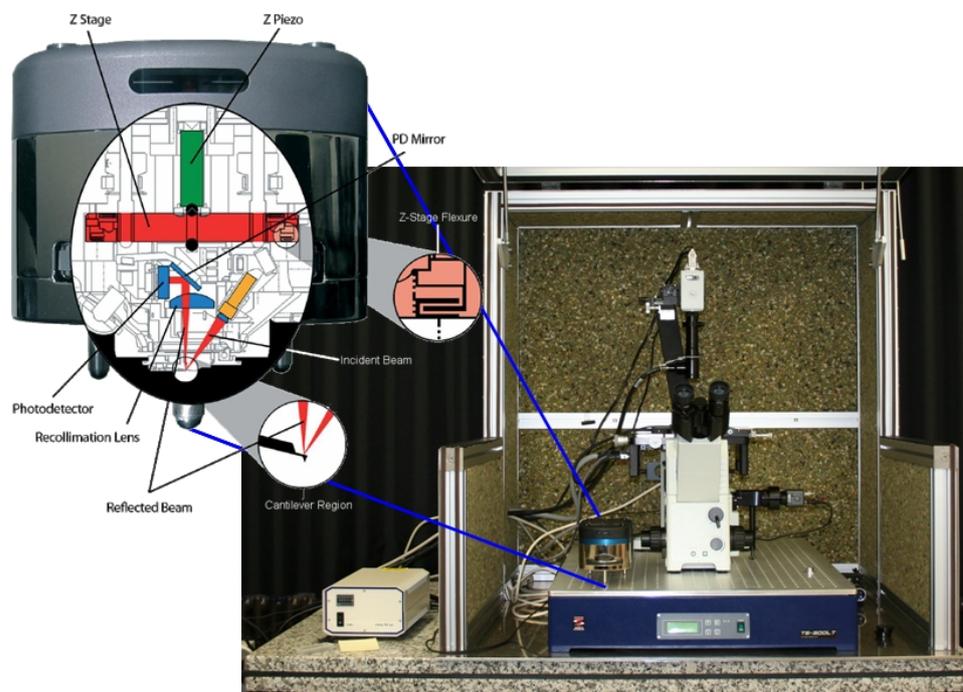


Abbildung 3.1: Verwendeter Messaufbau und Aufbau des AFM-Kopfes vgl. [10].

Gleichzeitig sind Abbildungen bis in den Subnanometerbereich möglich. Das verwendete Rasterkraftmikroskop ist ein MFP-3D-BIOTM (Asylum Research, Santa Barbara, USA) mit einem erweiterten z-Piezo (35 μm Hub). Der closed loop xy-Scanner hat einen Scanbereich von 90 μm und ist für biologische Untersuchungen auf einem inversen Mikroskop installiert. Für Messungen an lebenden Zellen wurde der Petri Dish HeaterTM von Asylum Research verwendet, der eine Temperierung der Probe auf 37 °C erlaubt. Die Verbiegung des Cantilevers wird mit Hilfe einer superlumineszierenden Diode gemessen, die im Wellenlängenbereich von $\lambda = 860 \text{ nm}$ emittiert.

Die MFP-3D-Software ist in IGOR Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, USA) integriert. Benutzt wurden die Versionen IGOR Pro 6.03, 6.03A und 6.04. Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine in die Software integrierte Methode, um Messungen im Force Volume Mode durchzuführen. Aus diesem Grund wurde aktiv an der Erprobung von Beta-Versionen teilgenommen und Fehler zurückgemeldet. Die Testphase endete mit der stabil laufenden Version „MFP3D 080501+0410“ von Asylum Research.

3.1.1 Cantilever

Für Abbildungen an Luft und im Tapping-Mode wurden die Silizium-Cantilever Tap300 (Budget Sensors, Sofia, Bulgarien) verwendet. Die Abbildung 3.2 zeigt die Maße der Sensoren.

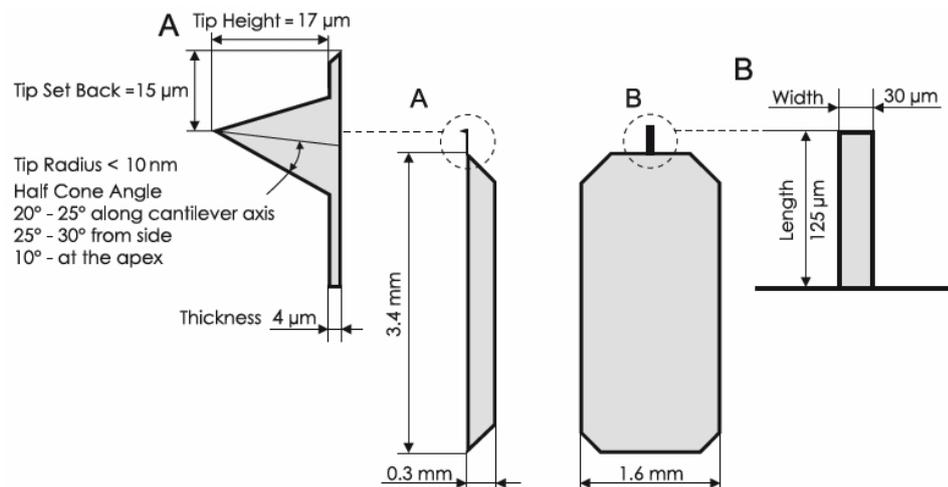


Abbildung 3.2: Abmessungen des Silizium-Cantilevers Tap300 von Budget Sensors [11].

Der Hersteller gibt für die Resonanzfrequenz f und die Federkonstante

k die folgenden Werte an

$$f = 300 \text{ kHz} \pm 100 \text{ kHz} \quad 20 \text{ N/m} \leq k \leq 75 \text{ N/m}. \quad (3.1)$$

Für alle kraftspektroskopischen Messungen wurden die Siliziumnitrid-Cantilever NP (Veeco Probes, Camarillo, USA) verwendet. Diese sind v-förmig und an jedem Trägerchip befinden sich vier Cantilever mit unterschiedlichen Federkonstanten. Im Vergleich zu den Tap300 Spitzen sind diese wesentlich weicher, um auch kleinere Kräfte detektieren zu können. Tabelle 3.1 gibt die wichtigsten Kenngrößen der Kraftsensoren wieder.

Form	Länge l [μm]			Breite w [μm]		
	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.
A)	115	100	130	25	20	30
B)	196	180	212	41	33	49
C)	115	100	130	17	13	21
D)	196	180	212	23	18	28
	Resonanzfrequenz f [kHz]			Federkonstante k [N/m]		
A)	57	40	75	0,58	0,3	1,2
B)	20	14	26	0,12	0,06	0,024
C)	56	40	75	0,32	0,16	0,64
D)	18	12	24	0,06	0,03	0,12

Tabelle 3.1: Kenngrößen der NP-Cantilever von Veeco vgl. [39]

Die Spitze selber hat eine pyramidale Form, ist ungefähr $3 \mu\text{m}$ lang und hat einen Öffnungswinkel von 70° . Um die Reflektivität und damit das Signal der Cantilever zu erhöhen, sind sie auf der Oberseite mit Gold beschichtet.

3.2 Nanopartikel

Im Projekt NanoCare befindet sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Nanopartikeln, die eine große Bedeutung für die Industrie haben. Darunter sind: TiO_2 , Carbon Black, CeO_2 , Böhmit (AlOOH), ZrO_2 , ZnO , BaSO_4 , SrCO_3 und Hydroxylapatit. Aufgrund der zeitintensiven Präparationen und Messungen war eine Einschränkung auf TiO_2 und vier verschiedene Ceroxide erforderlich.

3.2.1 Nanopartikel

Die Ceroxide CeO_2 Mod. A (CH000440 - PR 000450), CeO_2 Mod. B (CH000441 - PR 000458), CeO_2 Mod. C (CH000442 - PR 000472), CeO_2 Mod. D (CH000443 - PR 000480) und das Titanoxid TiO_2 P25 (LO-000382) wurden

von Evonik Industries zur Verfügung gestellt. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

	CeO ₂ A.	CeO ₂ B.	CeO ₂ C.	CeO ₂ D.	TiO ₂
Teilchenstruktur	kristallin				
Oberfläche [m ² /g]	63	44	38	63	52
pH-Wert	6,2	5,4	3,4	3,4	
Partikelgröße [nm]	≈ 27				22

Tabelle 3.2: Eigenschaften der verwendeten Nanopartikel. Der angegebene pH-Wert stellt sich mit 4% Partikeln in Wasser ein.

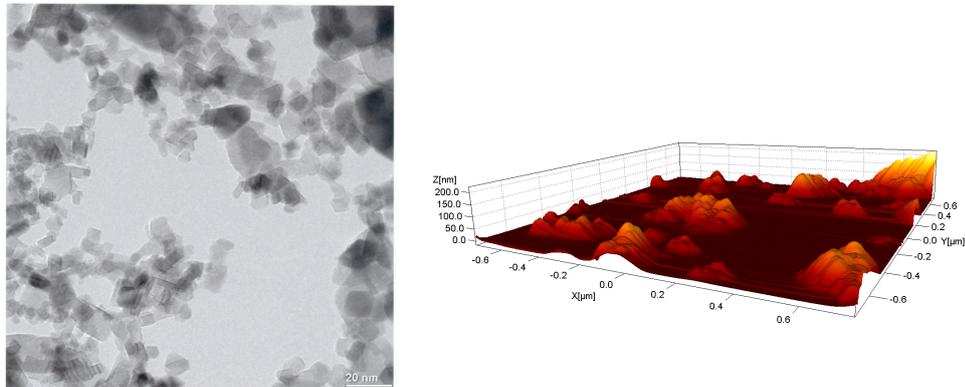


Abbildung 3.3: Die linke Abbildung zeigt eine TEM-Aufnahme von Ceroxid Mod. A-Nanopartikeln (mit freundlicher Genehmigung von Evonik Industries), während auf der rechten Seite Ceroxid Mod. D-Nanopartikel mit Hilfe eines AFMs abgebildet wurden.

3.2.2 Herstellung von Suspensionen

Die Massenkonzentrationen von Stammsuspensionen liegen in der Regel zwischen 1 g/l und 10 g/l. Die Testsubstanz wird in ein Schnappdeckelglas mit einem Fassungsvermögen von 10 ml eingewogen und mit höchstens 6 ml eines geeigneten Lösungsmittels bei 900 U/min gerührt. Anschließend kann ein Teil der Suspension zur Herstellung von verdünnten Suspensionen entnommen werden. Vor der Charakterisierung müssen diese für 24 h mit 900 U/min gerührt werden.

Zur Charakterisierung von Suspensionen wird die folgende Größeneinteilung definiert: Ultrafein-Anteil (< 100 nm), Feinanteil (100 nm - 1 µm) und Agglomerate (> 1 µm) [40].

3.2.3 Fixierung der Nanopartikel

Um die Nanopartikel an den Kraftsensoren zu immobilisieren, wurde der Zweikomponenten-Klebstoff *UHU plus endfest 300* auf Epoxidharz-Basis verwendet. Dieser Klebstoff hat eine Tropfzeit von 2 h und härtet bei Raumtemperatur innerhalb von 12 h aus. Die Festigkeit beträgt bei diesen Bedingungen 1200 N/cm^2 [41].

3.3 Zellen

Für die Messungen an Zellen wurde die Zelllinie RLE-6TN (ATCC-LGC Standards, Wesel, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um Alveolar Typ II Zellen aus den Lungen von 56 Tage alten Fischer 344 Ratten, die mit Hilfe einer Pronase-Lösung isoliert und anschließend kultiviert werden können [42].

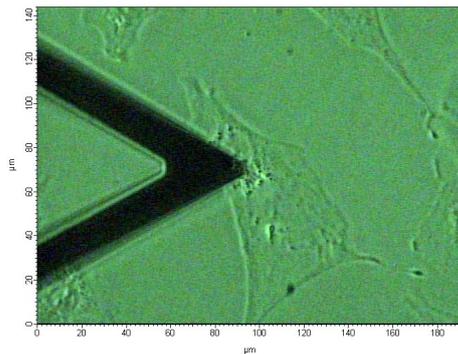


Abbildung 3.4: Phasenkontrastbild einer Lungen-Epithelzelle (RLE-6TN) in einer Petrischale mit Glasboden.

3.3.1 Präparation

Zur Subkultivierung der Zellen wird das alte Kulturmedium entnommen und mit 2 ml PBS-Puffer gespült¹, um Reste des Trypsin-Inhibitors, der sich im Serum befindet, zu entfernen. Anschließend wird die Zellschicht durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA (Lonza, Verviers, Belgien) gelöst ($\approx 5 \text{ min} - 10 \text{ min}$) und 0,1 ml dieser Lösung werden zu 5 ml Kulturmedium gegeben.² Für eine dauerhafte Kultivierung werden Kulturflaschen verwendet und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 gelagert.

¹PBS-Puffer BioChemika (Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz): 1 Tablette in 200 ml H_2O enthält 137 mM NaCl, 10 mM Phosphat Puffer Lösung (pH 7,4 bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

²Das Kulturmedium besteht aus RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgien) und 10% FBS Gold (PAA, Pasching, Österreich).

Für alle kraftspektroskopischen Messungen an Zellen wurden WillCo-dishTM GWSt-5040 [43] mit 2,5 ml RPMI³ verwendet und auf 37 °C geheizt. Diese Petrischalen haben einen Glasboden mit einem Durchmesser von 40 mm. Für eine bessere Wärmeübertragung zwischen dem Petri Dish Heater und den Petrischalen wurde ein dünnflüssiges Immersionsöl benutzt.

³Zellkulturmedium mit einem Hydrogencarbonat Puffer und L-Glutamin, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde [44].

Kapitel 4

Ergebnisse und Auswertung

4.1 Funktionalisierung von Cantilevern mit Nanopartikeln

Um die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen untersuchen zu können, ist es erforderlich, die Kraftsensoren mit Nanopartikeln zu funktionalisieren. An die Funktionalisierung werden dabei verschiedene Anforderungen gestellt. Zum einen sollte die Methode universell für alle Partikel einsetzbar sein, damit eine Vergleichbarkeit der Messungen gewährleistet ist und zum anderen sollte sichergestellt sein, dass während der Messung nicht Teile des unmodifizierten Cantilevers mit der Zelle in Kontakt kommen, sondern nur die zu untersuchenden Nanopartikel.

Gelungen ist das mit einem Ansatz, den Q. K. Ong und I. Sokolov beschreiben [12]. Dabei wird zuerst eine kleine Menge eines Epoxidharz-Klebers auf die Spitze des Kraftsensors aufgetragen und dieser anschließend in Kontakt mit einem Aggregat aus Nanopartikeln gebracht.

4.1.1 Funktionalisierung von Cantilevern mit einem Epoxidharz-Kleber

Der erste Schritt bei der Funktionalisierung eines Cantilevers besteht darin, eine passende Menge eines Epoxidharz-Klebers auf die Spitze des Kraftsensors aufzutragen. Wird zu wenig Kleber verwendet, ist keine sichere Verbindung gewährleistet. Bei einer zu großen Menge hingegen verändern sich die mechanischen Eigenschaften des Sensors und es ist möglich, dass sich die Verbiegung des Cantilevers nicht mehr messen lässt, wenn die Oberseite des Sensors mit einer dicken Schicht Epoxidharz bedeckt ist. Es ist also von entscheidender Bedeutung, die Bewegung des Cantilevers und damit die aufgetragene Menge Epoxidharz bei diesem Arbeitsschritt möglichst genau kontrollieren zu können. Reproduzierbare Ergebnisse und eine gute Prozesskontrolle sind möglich, wenn der Cantilever mit Hilfe des AFMs an einen

Klebstofftropfen angenähert und dieser Vorgang gleichzeitig mit Hilfe eines inversen Mikroskops beobachtet wird. Der Klebstofftropfen sollte dabei nicht größer als einige μm sein. Nähert man die Spitze im Tapping-Mode an, mit einem Setpoint, der nur 10 % - 20 % kleiner ist als die freie Amplitude, bleibt kein Epoxidharz am Kraftsensor haften. Das geschieht erst, wenn die Spitze anschließend für einige Sekunden mit dem Epoxidharz-Kleber in Kontakt kommt (Wechsel in den Contact-Mode). Wird der Cantilever anschließend zurückgezogen, lässt sich durch das Mikroskop beobachten, dass der Kraftsensor haften bleibt, sich stark verbiegt und erst dann den Kontakt zum Epoxidharz verliert.

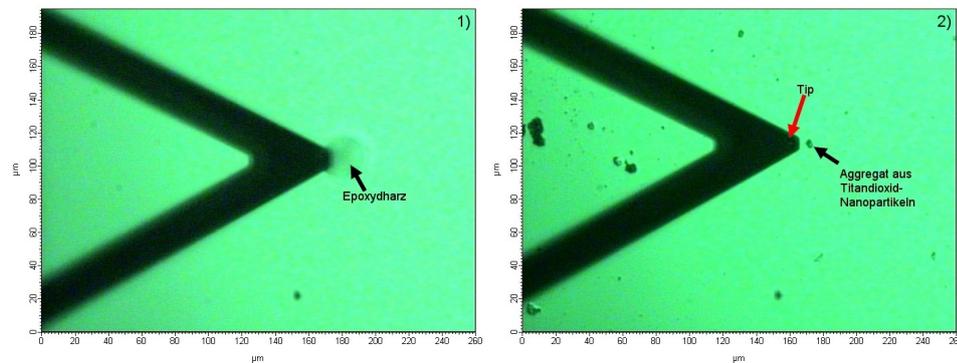


Abbildung 4.1: Eintauchen eines Siliziumnitrid-Cantilevers in 1) Epoxidharz und anschließendes Annähern an ein 2) TiO_2 -Aggregat.

Anschließend ist es wichtig, den Epoxidharz-Kleber antrocknen zu lassen. Bei zu flüssigem Harz ist es möglich, dass ein angeklebtes Aggregat aus Nanopartikeln einsinkt und vollständig von einer dünnen Schicht des Klebstoffs umgeben ist. In diesem Fall würden aber nicht mehr die Wechselwirkungen zwischen den Metalloxid-Nanopartikeln und Zellen untersucht, was unter Umständen zu falschen Schlussfolgerungen führen könnte.

Um Nanopartikel-Aggregate an den Spitzen der Kraftsensoren zu immobilisieren, müssen die Partikel zuerst auf einen Glasobjektträger aufgetragen werden. Dazu können die pulverförmigen Metalloxide direkt verwendet werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, zuerst eine Suspension herzustellen, um eine homogenere Größenverteilung der Aggregate zu erhalten (die Herstellung wird in Abschnitt 3.2.2 beschrieben). Das Ankleben eines geeigneten Partikels bzw. Aggregats erfolgt dann auf ähnliche Art und Weise wie das Auftragen des Epoxidharzes. Der Cantilever wird mit Hilfe des AFMs angenähert, während der Vorgang mit dem Mikroskop beobachtet wird. Bei der Auswahl eines geeigneten Aggregats können verschiedene Strategien zum Erfolg führen. Möglichst kleine Aggregate sind prinzipiell vorzuziehen, erschweren aber die Befestigung an der Spitze des Sensors. Klebt das kleine Aggregat an der Seite der Spitze und bildet nicht den tiefsten Punkt, ist der

Cantilever unbrauchbar. Große Aggregate sind leicht an die Spitze zu kleben, haben am tiefsten Punkt jedoch selten einen einzelnen Primärpartikel, sondern bilden eine Spitze, die über die Abmessungen eines Nanopartikels hinausgehen und sind deshalb nicht von Interesse. Das Annähern in größere Agglomerate kann jedoch ebenfalls zum Erfolg führen, wenn beim Zurückziehen des Cantilevers nur ein kleines Aggregat an der Spitze hängen bleibt. Bei dieser Methode fehlt zwar die direkte optische Kontrolle, die man beim Ankleben eines kleinen Aggregats hat, aber eine Massenänderung des Kraftsensors lässt sich über eine Änderung der Resonanzfrequenz erkennen. Der Klebevorgang selber hängt davon ab, wie viel Epoxidharz an der Spitze haftet, wie lange das Harz antrocknen konnte und wie fest das Aggregat auf dem Glasobjektträger gebunden ist. Deshalb binden einige Aggregate schon nach dem Annähern im Tapping-Mode, während andere erst an der Spitze kleben, nachdem sie mit Hilfe der Mikrometerschrauben des xy-Tisches an die Spitze des Cantilevers, der sich in Kontakt mit dem Glasobjektträger befindet, geschoben wurden.

4.1.2 Charakterisierung der Cantilever

Ist das Epoxidharz vollständig ausgehärtet, lässt sich mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) die Größe und Position des angeklebten Aggregats überprüfen.

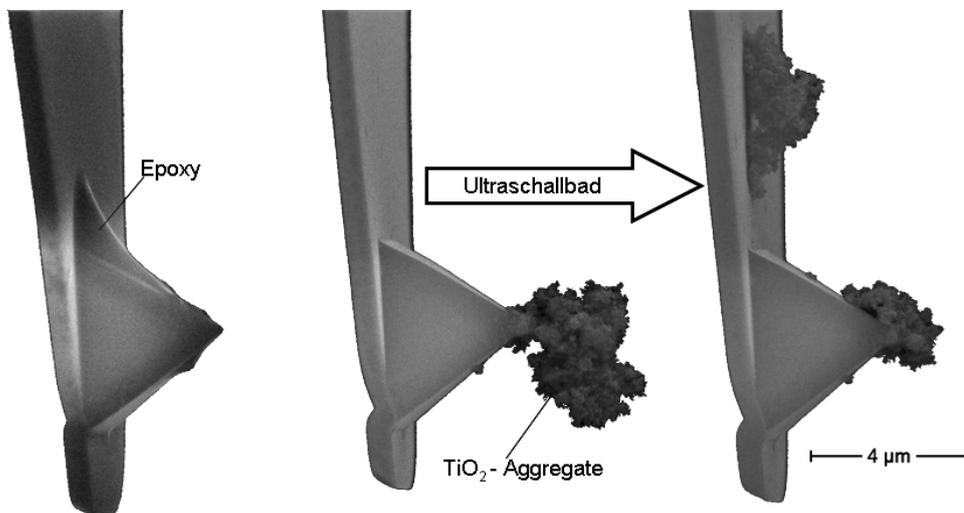


Abbildung 4.2: Kontrolle der einzelnen Präparationsschritte eines Siliziumnitrid-Cantilevers mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops.

Erschwert wird das Abbilden durch die schlechte Leitfähigkeit der Cantilever, die aus Si₃N₄ bestehen. Eine Beschichtung mit Gold würde die Leitfähigkeit erhöhen, aber auch gleichzeitig die spätere Verwendung des Kraftsen-

sors verhindern. Aus diesem Grund eignet sich das REM nicht um die Geometrie des Aggregats an der Spitze des Cantilevers aufzulösen. Es lässt sich auf diese Weise also nicht entscheiden, ob ein einzelner Primärpartikel die Spitze des Kraftsensors bildet. Trotzdem bietet es eine einfache und schnelle Möglichkeit die Qualität der Spitze nach verschiedenen Arbeitsschritten zu kontrollieren.

Alle Cantilever, an deren Spitze ein Aggregat klebt, kommen anschließend in ein mit Milli-Q Wasser gefülltes Ultraschallbad. Dabei werden Partikel, die nicht fest gebunden sind, vom Kraftsensor gelöst. Im Idealfall verbleibt ein kleines Aggregat am Cantilever. Es ist jedoch auch möglich, dass bei zu großer Intensität des Ultraschallbads der Siliziumnitrid-Cantilever vom Trägerchip abgetrennt wird oder das ganze Aggregat von der Spitze gelöst wird. Eine erneute Abbildung mit dem REM ist also zwingend erforderlich. Die exakte Spitzengeometrie lässt sich dann bestimmen, indem der zu untersuchende Cantilever ins AFM eingebaut wird und das inverse Gitter TGT1 (NT-MDT, Selenograd, Russland) scannt.

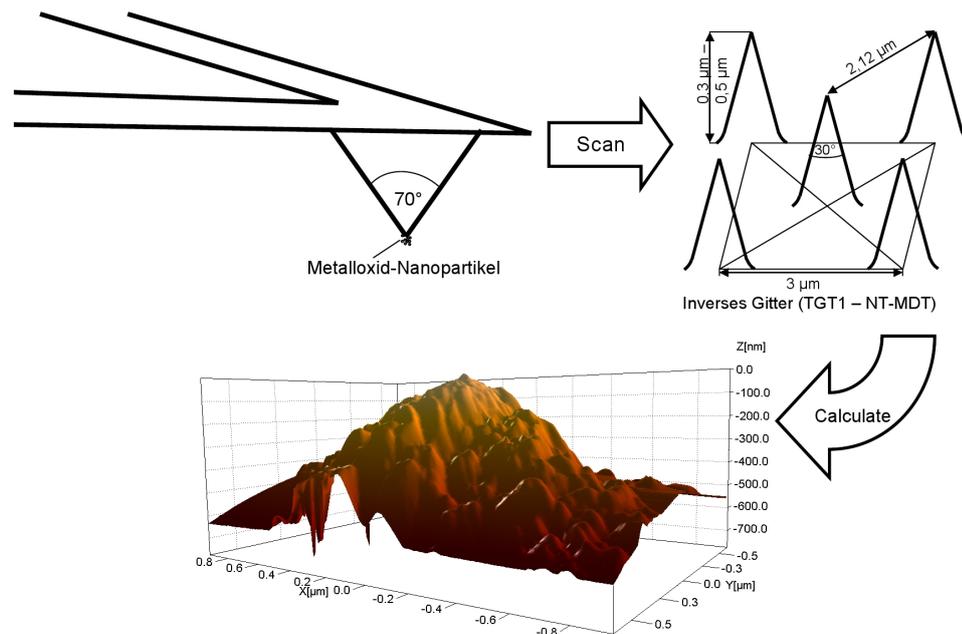


Abbildung 4.3: Charakterisierung der Spitzengeometrie mit Hilfe eines inversen Gitters (TGT1 NT-MDT).

Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, hat der Cantilever einen Öffnungswinkel von 70° , während die Spitzen auf dem inversen Gitter einen Öffnungswinkel von nur 30° haben. Außerdem sind sie wesentlich schärfer als die verwendeten Kraftsensoren und für ihre Länge gilt: $l_{\text{Gitter}} \approx l_{\text{Cantilever}} \cdot 1/8$. Beim Scannen stößt also die Flanke des Cantilevers gegen eine Spitze des Gitters und wird anschließend über diese hinweg bewegt. Der Öffnungswinkel

im Scan ist also gerade der des Kraftsensors, während die Spitzengeometrie eine mathematische Faltung aus Gitter und Probe beschreibt. Mit der Software Scanning Probe Image Processor 4.6.0 (Image Metrology, Hørsholm, Dänemark) ist es möglich, die Faltung aus dem Bild herauszurechnen und die tatsächliche Gestalt des Cantilevers zu ermitteln.

Damit die Berechnungen in SPIP zuverlässige Daten liefern, müssen mehrere Dinge beachtet werden. Zum einen muss das Testgitter sauber und frei von Rückständen sein und die Spitzen sollten scharf und unbeschädigt bleiben, um auch bei zukünftigen Messungen verlässliche Daten zu liefern. Diese Bedingungen beschränken das Einsatzgebiet eigentlich auf Messungen in Trockenheit (das Gitter bleibt sauberer), die im Tapping-Mode (die Spitzen des Gitters werden nicht so schnell beschädigt) durchgeführt werden. Beides ist mit den langen und weichen Veeco NP-Cantilevern, die für kraftspektroskopische Messungen ausgelegt sind, nicht möglich. Bei Messungen mit weichen Kraftsensoren im Tapping-Mode kann die Adhäsion größer als die Rückstellkraft des schwingenden Cantilevers werden und führt so zum Hängenbleiben des Sensors und zur Entstehung von Bildfehlern. Ein dünner Wasserfilm auf Oberflächen, der für eine starke und anziehende Meniskuskraft zwischen Probe und Spitze verantwortlich ist, verhindert Messungen in Trockenheit, da weder die funktionalisierten Cantilever noch das inverse Gitter größeren Belastungen ausgesetzt werden sollen.

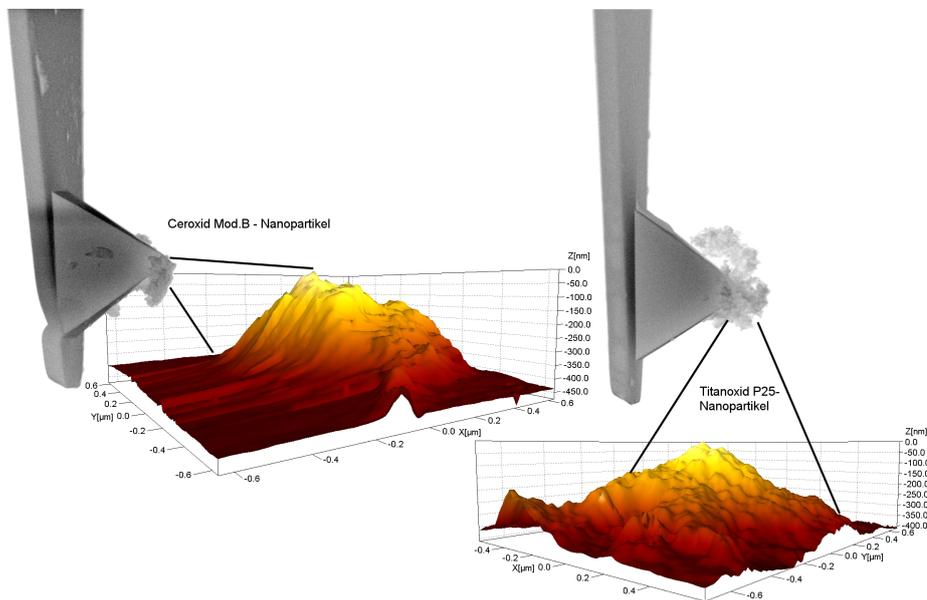


Abbildung 4.4: Funktionalisierte Siliziumnitrid-Cantilever, deren Spitze aus einzelnen Nanopartikeln besteht.

Der einzige Modus, in dem Abbildungen möglich sind, ist folglich der Contact-Mode in Flüssigkeit. Beim Verdunsten des Milli-Q Wassers auf dem

Testgitter sammeln sich auf diesem jedoch deutlich mehr Rückstände, als bei Messungen in Trockenheit. Der größte Nachteil des Contact-Modes ist jedoch der direkte Kontakt zwischen Spitze und Probe und die damit verbundenen Kräfte. Dadurch können einzelne Primärpartikel während des Scans abbrechen. Das führt nicht nur zu Abbildungsfehlern, sondern ändert auch die tatsächliche Spitzengeometrie und macht die laufende Messung unbrauchbar. Es sollte daher bei möglichst kleinen Verbiegungen des Cantilevers gescannt werden, um die wirkenden Kräfte gering zu halten. Aus diesem Grund und damit der Kraftsensor bei den steilen Strukturen bzw. harten Kanten nicht den Kontakt zur Probe verliert, ist eine Reduktion der Scangeschwindigkeit erforderlich, so dass eine Abbildung mit der Kantenlänge von $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ungefähr 1 h beansprucht.

Um die tatsächliche Spitzengeometrie mit SPIP berechnen zu können, sind störungsfreie Bilder erforderlich. Die Charakterisierung von Cantilevern mit einem inversen Gitter ist somit sehr zeitintensiv und führt trotzdem in einigen Fällen zum Abbrechen des angeklebten Aggregats. Abbildung 4.3 zeigt die Geometrie eines Ceroxid Mod. D-Aggregats an der Spitze eines Siliziumnitrid-Cantilevers.

4.1.3 Nachweis eines einzelnen Ceroxid-Nanopartikels mit Hilfe des pH-Werts

Wenn weder das Elektronenmikroskop noch Abbildungen mit dem inversen Gitter Aufschluss darüber geben können, ob ein einzelner Ceroxid-Nanopartikel die Spitze eines Cantilevers bildet, kann dieser Nachweis mit Hilfe von kraftspektroskopischen Messungen bei verschiedenen pH-Werten erfolgen [12].

Als Probe wird ein Stück eines Silizium-Wafers benutzt, das bei einem pH-Wert ≥ 3 negativ geladen ist [45]. Bei niedrigen pH-Werten zeigt die Annäherung des Cantilevers einen attraktiven Bereich kurz vor dem Erreichen der Oberfläche. Bei höheren pH-Werten wird diese Wechselwirkung repulsiv. Aus dem Übergang zwischen attraktivem und repulsivem Bereich ergibt sich der isoelektrische Punkt des Ceroxids.

Ong et al. haben gezeigt, dass die Adhäsion von CeO_2 -Nanopartikeln auf Silizium bei einem pH-Wert von 7 minimal wird. Ein 2-Komponentenkleber auf Epoxidharzbasis hat ein Minimum bei einem pH-Wert von 5, Siliziumnitrid besitzt kein Minimum und größere Ceroxid-Partikel zeigen keine pH-Abhängigkeit. Darüber hinaus betonen sie, dass die Absolutwerte unterschiedlicher Proben stark variieren. Die relative Abhängigkeit vom pH-Wert ermöglicht aber eine Unterscheidung zwischen Ceroxid, Siliziumnitrid und Epoxidharz.

Insbesondere organische Verunreinigungen des Siliziums führen zu einer signifikanten Vergrößerung der Adhäsion zwischen Cantilever und Probe. Eine Reinigung im Sauerstoffplasma hingegen führt dazu, dass in einem Teil

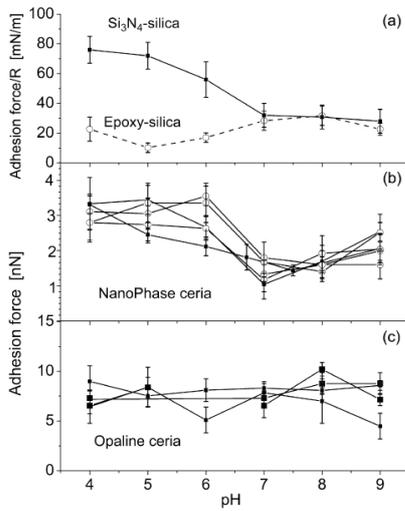


Abbildung 4.5: Adhäsion zwischen SiO_2 und verschiedenen Materialien in Abhängigkeit des pH-Werts. In Abbildung (a) ist die Adhäsion auf den effektiven Spitzenradius normalisiert [12].

der Kraftdistanzkurven gar keine Adhäsion mehr messbar ist. Bei Messungen im Force Volume Mode mit 15×15 Datenpunkten über $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ zeigten nur gut die Hälfte der Kurven Adhäsion und der Mittelwert für $F_{\text{Adhäsion}}$ lag bei 80 pN. Nach 24 h wurde die Messung wiederholt und $F_{\text{Adhäsion}}$ hatte einen Wert von 1200 pN.

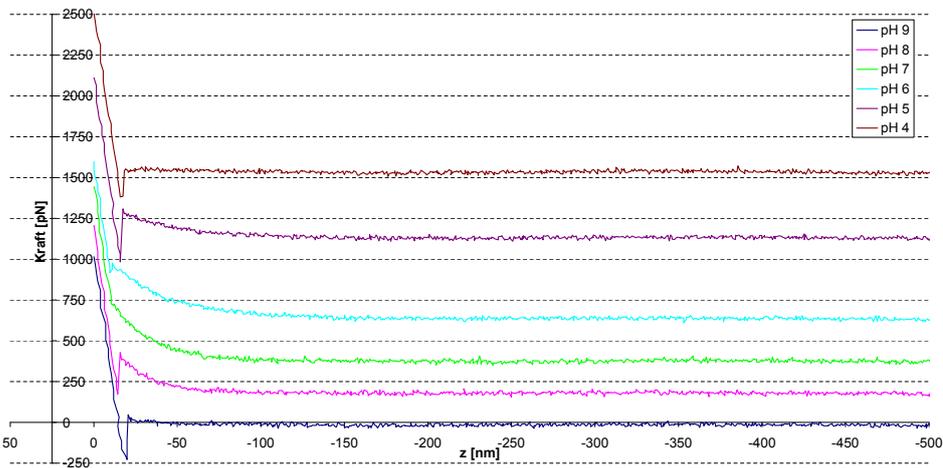


Abbildung 4.6: Adhäsion zwischen SiO_2 und einem mit CeO_2 funktionalisierten Cantilever.

Um nicht die Wechselwirkungen zwischen Verunreinigungen und Cantilevern zu untersuchen, sondern die Kräfte zwischen SiO_2 und CeO_2 , wurde

vor jeder Messreihe das Silizium im Sauerstoffplasma gereinigt. Ein weiterer Vorteil dieser Behandlung ist, dass die Kontamination der Kraftsensoren mit organischen Verunreinigungen möglichst klein gehalten wird.

Abbildung 4.6 zeigt typische Kraftdistanzkurven bei unterschiedlichen pH-Werten. Der verwendete Cantilever ist mit Ceroxid Mod. D funktionalisiert. Für eine bessere Visualisierung sind die einzelnen Kurven vertikal verschoben, d.h. die angegebenen Werte sind relativ zu verstehen. Auffällig ist das Verschwinden der Adhäsion bei den pH-Werten 6 und 7. Nach Ong et al. ist das ein Indiz für eine nanoskalige Spitze aus Ceroxid. Für pH-Werte zwischen 5 und 8 sind in den Kraftdistanzkurven langreichweitige repulsive Kräfte sichtbar. Dieses Phänomen lässt sich mit den Ionenkonzentrationen der Lösungen erklären. Für die Testreihe wurden Lösungen mit pH-Werten zwischen 4 und 9 hergestellt, die aus Milli-Q Wasser und Salzsäure bzw. Natronlauge bestanden. Wie bereits erwähnt, hat Silizium in wässrigen Lösungen mit pH-Werten ≥ 3 eine negative Oberflächenladung, die auf den sauren Eigenschaften der Silanol-Gruppen beruht



Bei niedrigeren pH-Werten kann die natürliche Siliziumoxidschicht durch die Reaktion



eine positive Oberflächenladung annehmen [15]. In wässriger Lösung treten deshalb in der Nähe der geladenen Oberfläche vermehrt Gegenionen auf und bilden eine elektrische Doppelschicht. Die Gouy-Chapman Theorie [46, 47] beschreibt die Wechselwirkungen der Ionen und liefert unter der Annahme, dass das Potenzial ϕ_0 an der Oberfläche klein ist, das Resultat

$$\phi(x) = \phi_0 \cdot e^{-x/l_D}. \quad (4.3)$$

Dabei beschreibt $\phi(x)$ das Potenzial an der Stelle x und l_D den Abstand, in dem das Potenzial auf den $1/e$ -Teil von ϕ_0 abgefallen ist. Die Debye-Länge ist gegeben durch

$$l_D = \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon RT}{2c}}. \quad (4.4)$$

F ist hier die Faraday-Konstante, ϵ die Dielektrizitätskonstante der Lösung, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante, R die Gaskonstante und c die Konzentration des Elektrolyten.¹ Aus dieser Gleichung folgt, dass die Debye-Länge mit $1/\sqrt{c}$ von der Konzentration der Ionen abhängt [48]. In Milli-Q Wasser und bei neutralem pH-Wert (ohne Zugabe von Säure oder Base) nimmt die

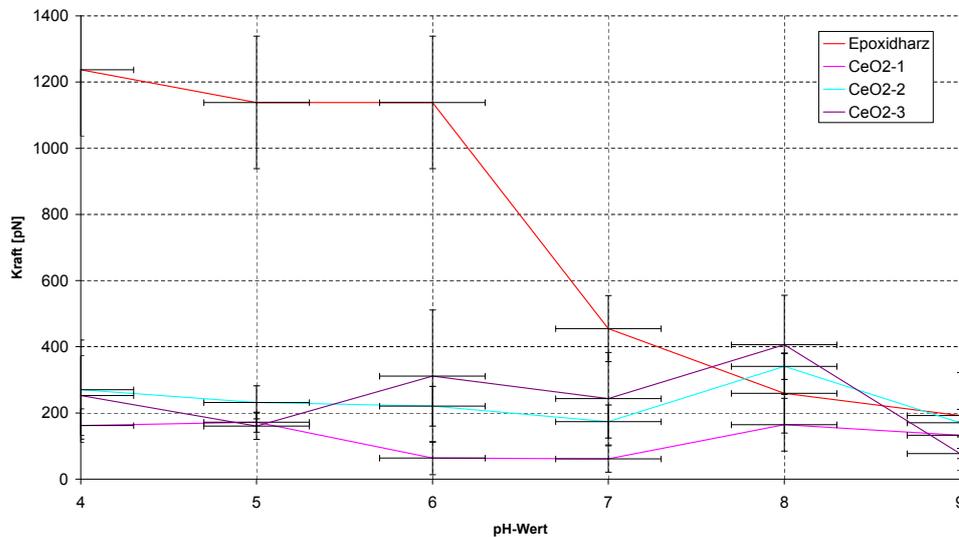


Abbildung 4.7: pH-Abhängigkeit der Adhäsion auf SiO_2 für drei mit CeO_2 Mod. D funktionalisierte Cantilever und einen Kraftsensor mit Epoxidharz.

Debye-Länge große Werte an und in den Kraftdistanzkurven ist eine lange repulsive Wechselwirkung zwischen Silizium und Ceroxid zu sehen.

Die Abbildung 4.7 zeigt die Adhäsion verschiedener Cantilever in Abhängigkeit des pH-Werts.² Jeder Datenpunkt berechnet sich dabei aus 225 Kraftdistanzkurven, die im Force Volume Mode aufgenommen wurden. Für die Auswertung wurde zunächst die Built-in Software des AFM-Herstellers verwendet. Diese Routine zur Berechnung der Adhäsion liefert aber bei langreichweitigen repulsiven Kraftdistanzkurven falsche Ergebnisse. Die Prozedur bestimmt den Punkt mit der kleinsten Kraft und bildet die Differenz zum Mittelwert. Liegt der kleinste Punkt des Adhäsionspeaks aber oberhalb der Nulllinie, wie in Abbildung 4.6, wird keine Adhäsion detektiert. Die Software konnte also nicht zur Auswertung der Daten benutzt werden. Aus diesem Grund wurde ein eigenes Auswertprogramm erstellt, dessen Quellcode im Anhang zu finden ist. Um nur die Adhäsion zu messen und nicht alle auftretenden Abrisse, wurden die pro Kurve auszuwertenden Peaks auf eins reduziert. Der in Epoxidharz getauchte Cantilever in Abbildung 4.7 hat jedoch kein Minimum bei einem pH-Wert von 5, sondern eine kleiner werdende Adhäsion für zunehmende pH-Werte, was für Siliziumnitrid spricht. Betrachtet man darüber hinaus in Abbildung 4.8 die Annäherung des Cantilevers, ist bei einem pH-Wert von 6-7 der Übergang von einer attraktiven zu einer

¹Bei unterschiedlichen Ionen ist die Konzentration c durch die Ionenstärke J zu ersetzen [48].

²Das Diagramm zeigt keine Fehlerbalken, sondern Variabilitäten bei Vergleichsmessungen.

repulsiven Wechselwirkung zu erkennen. Dieses steht in guter Übereinstimmung mit dem isoelektrischen Punkt von Siliziumnitrid, der durchschnittlich bei einem pH-Wert von 6 liegt [49]. Eine REM-Aufnahme des verwendeten Cantilevers ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Rückstände des Epoxidharzes sind gut zu erkennen, jedoch lässt sich hier nicht mit Sicherheit sagen, ob die Spitze mit dem Klebstoff bedeckt ist oder nicht.

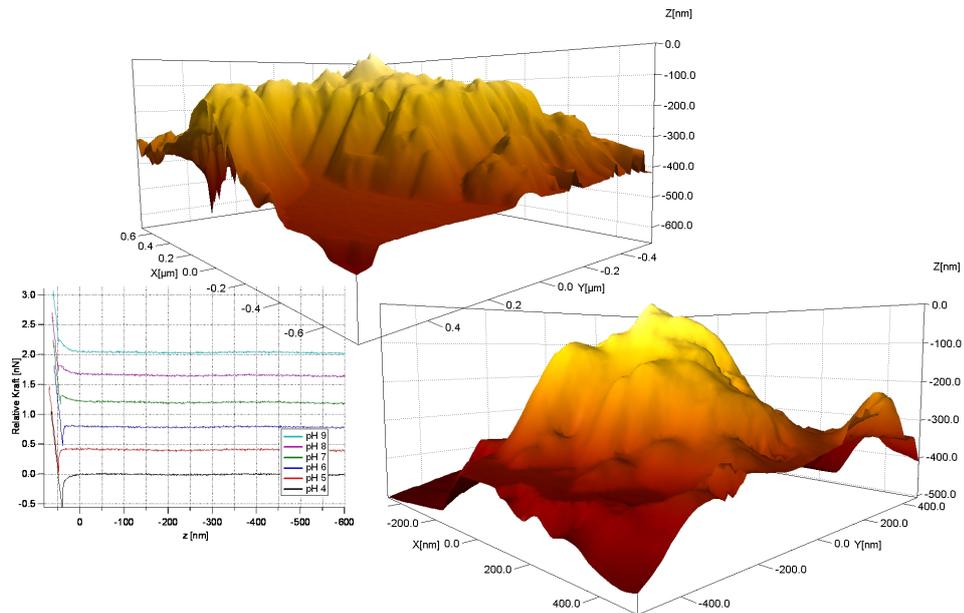


Abbildung 4.8: Kraftdistanzkurven (das Bild zeigt nur die Annäherung, die Rückzugsbewegungen sind nicht dargestellt) eines Siliziumnitrid-Cantilevers auf SiO_2 bei pH-Werten zwischen 4 und 9 und die rekonstruierte Spitzengeometrie von zwei Kraftsensoren, die mit CeO_2 Mod. D funktionalisiert wurden.

Bei den mit Ceroxid modifizierten Kraftsensoren ist eine Unterscheidung zwischen einer nanoskaligen Spitze und größeren Partikeln nicht so einfach möglich. Nur einer der drei funktionalisierten Cantilever zeigt die von Ong et al. beschriebene pH-Abhängigkeit, obwohl die Abbildung mit dem inversen Gitter Spitzen im Nanometerbereich zeigt. Die Methode ist also insbesondere dann sinnvoll, wenn mit Hilfe des Elektronenmikroskops und des inversen Gitters keine eindeutige Charakterisierung möglich ist. Das ist z.B. bei einer relativ großen Menge Epoxidharz und kleinen Aggregaten der Fall. Dann besteht die Gefahr, dass die Partikel in den Epoxidharz-Kleber einsinken.

4.2 Wechselwirkungen zwischen Zellen und Nanopartikeln

In Abschnitt 4.1 wurde die Herstellung von funktionalisierten Cantilevern beschrieben. Diese bilden die Grundlage für die Untersuchung von Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, müssen die Testbedingungen vor jeder Messung gleich sein. Aus diesem Grund wurden alle Kraftdistanzkurven mit einer Geschwindigkeit $v = 3 \mu\text{m/s}$ durchgeführt und die Cantilever vor einer Messung für 10 s einem Sauerstoffplasma ausgesetzt, da organische Verunreinigungen einen großen Einfluss auf die Adhäsion haben können. Des Weiteren wurden die Kraftdistanzkurven als Force Maps gespeichert. Dabei wird über einen einstellbaren Scanbereich (hier: $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$, im Bereich des Zellkerns) ein Gitter gelegt und an jedem Punkt eine Kraftdistanzkurve aufgenommen.

Die Abbildung 4.9 zeigt eine typische Kraftdistanzkurve für Kontaktzeiten ≥ 30 s. Während dieser Zeit wird die Verbiegung des Cantilevers und damit die Kraft konstant gehalten. Dadurch sinkt der Kraftsensor bis zum Erreichen des trigger points ungefähr 300 nm - 500 nm tief in die Zelle ein, was mit Messungen, die Leonenko et al. durchgeführt haben, übereinstimmt [29]. Die anschließende Rückzugsbewegung zeigt nicht nur einen einzelnen Adhäsionspeak, sondern noch eine Vielzahl anderer Abrisse. Dabei gilt grundsätzlich, dass umso mehr Abrisse in einer einzelnen Kurve auftreten, je länger der Cantilever mit der Zellmembran in Kontakt war.

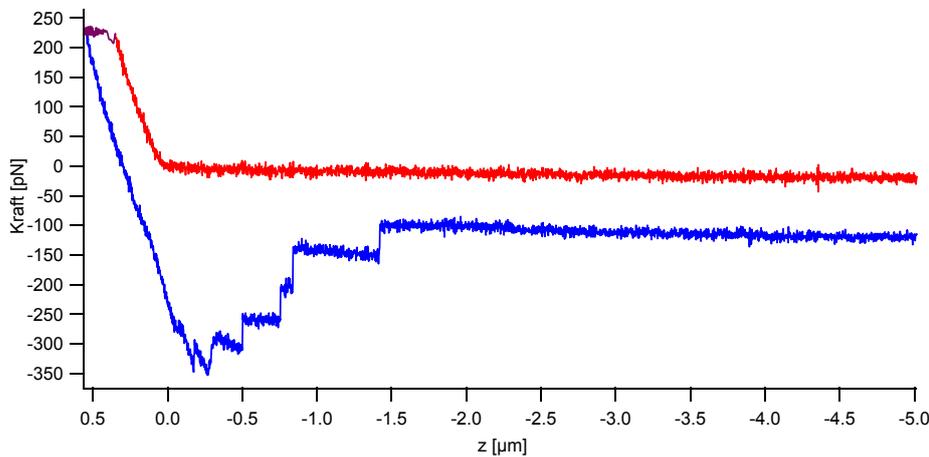


Abbildung 4.9: Typische Kraftdistanzkurve zwischen einem mit CeO_2 Mod. B funktionalisierten Cantilever und einer RLE-6TN Zelle.

Die Kraftdistanzkurve zeigt neben der Annäherung und der Rückzugsbewegung noch eine weitere Kurve (zwischen den beiden Kurven am trigger point), die die Bewegung des z-Piezos während der Kontaktzeit beschreibt.

Auffällig ist auch die Differenz der Nulllinien zwischen Hin- und Rückspur, die in vielen Messungen auftritt. Eine mögliche Erklärung beruht auf dem Widerstand, den ein sich bewegendes Cantilever in einer viskosen Flüssigkeit erfährt. Eine Reduzierung der Geschwindigkeit führt in diesem Fall zu einer kleineren Differenz der Nulllinien [50]. Bei dieser Kraftdistanzkurve wurde der Cantilever aber nur mit einer Geschwindigkeit von $v = 3 \mu\text{m/s}$ bewegt und ist somit weit entfernt von Hochgeschwindigkeitsmessungen. Die in Abschnitt 4.2.3 beschriebene Drift oder noch bestehende Bindungen zwischen Spitze und Zelle (Tetherbildung) liefern ebenfalls mögliche Erklärungen.

Für die Auswertung der Kraftdistanzkurven müssen die Kräfte aller Abrisse und die Eintauchtiefen der Cantilever in die Zellen bestimmt werden. Bei der Menge an Daten ist das nur mit automatisierten Methoden möglich. Aus diesem Grund war die Erstellung einer Auswertsoftware Teil dieser Arbeit.³

4.2.1 Lebende Zellen

Messungen an lebenden Zellen wurden mit funktionalisierten und unmodifizierten Cantilevern durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen zu beschreiben und eventuell auftretende Unterschiede aufzuzeigen. Bei einer Kraftdistanzkurve wird der Sensor in der Regel direkt nach dem Annähern wieder zurückgezogen, um aber mögliche aktive Aufnahmeprozesse der Zellen beobachten zu können, ist eine Haltezeit während des Kontakts erforderlich. Diese Haltezeiten wurden für alle Messungen zwischen 1 s und 120 s variiert. Dabei ist es möglich, den z-Piezo auf einer konstanten Höhe zu halten oder mit einer konstanten Kraft auf die Zelle zu drücken (konstante Verbiegung des Kraftsensors). Bei den folgenden Messdaten wurde während der Kontaktzeit stets die Kraft, mit der der Cantilever auf die Zelle drückt, konstant gehalten (200 pN).

Abrisskräfte

Die Abbildung 4.10 zeigt die Rückzugsbewegungen einzelner Kraftdistanzkurven zwischen einem mit TiO_2 funktionalisierten Cantilever und einer lebenden Lungen-Epithelzelle (RLE-6TN) in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.

Dabei wird deutlich, dass die Zahl der Mehrfachabrisse mit steigender Kontaktzeit zunimmt. Das liegt an der Tatsache, dass sich die Membran besser an die Form des Sensors anpassen kann und dieser gleichzeitig tiefer in die Zelle eindringt. Beide Effekte führen somit zu einer Vergrößerung der

³Die Software wurde für eine direkte Auswertung mit IGOR 6.04 von WaveMetrics erstellt, da das verwendete AFM Kraftdistanzkurven in einem IGOR-Dateiformat speichert. Der Quellcode befindet sich im Anhang.

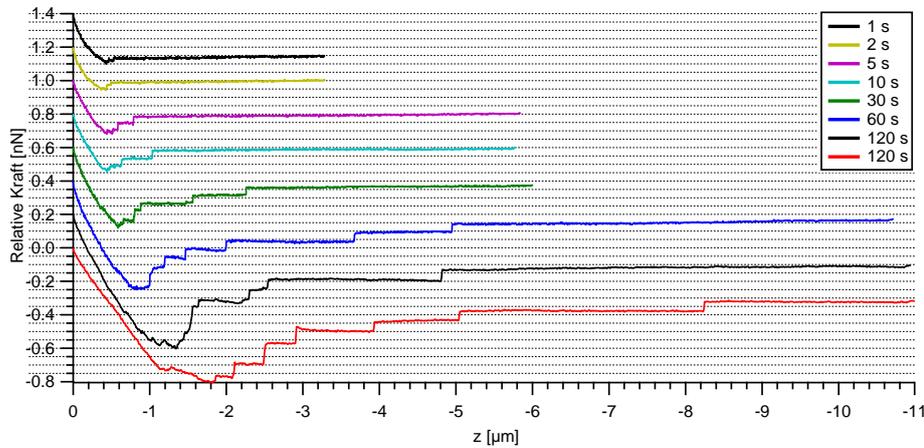


Abbildung 4.10: Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit TiO_2 funktionalisierten Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.

Kontaktfläche, was zu Mehrfachabrissen und einer größeren Adhäsion führt. Wird der Cantilever anschließend zurückgezogen, passt sich die Membran nicht kontinuierlich an den Sensor an, sondern bindet an den Cantilever, reißt ab und bindet anschließend wieder an einer anderen Stelle [51]. Die dabei auftretenden Kräfte liegen im Bereich von ungefähr 40 pN. Abrisse treten jedoch auch noch ca. 10 μm von der Oberfläche entfernt auf. Bei diesen Distanzen ist eine direkte Wechselwirkung zwischen Spitze und Zelle ausgeschlossen. Selbst die in Abbildung 4.6 gezeigten langreichweitigen und repulsiven Kräfte in Milli-Q Wasser haben nur eine Reichweite von ungefähr 100 nm. Diese Abrisse lassen sich also durch das Herausziehen von Zellbestandteilen, die am Cantilever gebunden sind, erklären. In diesem Fall erwartet man, dass die auftretenden Kräfte die Eigenschaften der Membran beschreiben und unabhängig von der exakten Spitzengeometrie und den verwendeten Nanopartikeln gleich groß sind.

Sun et al. haben mit Hilfe eines AFMs *Membrane Tethers* untersucht [52], dabei handelt es sich um dünne Membran-Nanoröhren, die entstehen können, wenn ein Cantilever in die Zellmembran einsinkt, diese stark verbiegt und anschließend zurückgezogen wird. Wenn sich eine unspezifische Bindung zwischen Spitze und Membran gebildet hat, können Tether bis zu einer Länge von 10 μm entstehen, die für die Plateaus in den Kraftdistanzkurven verantwortlich sind. In diesen Bereichen bleibt die Kraft über mehrere μm konstant bis ein scharfer Abriss auftritt, der nach Sun et al. im Bereich von 30 pN liegt. Die Bereiche konstanter Kraft sind dabei nur möglich, wenn eine Art Reservoir zur Verfügung steht, aus dem Teile der Membran herausgezogen werden können, ohne diese dabei zu spannen oder zu dehnen [53]. Bleibt der Kraftsensor für längere Zeit mit der Zelle in Kontakt, können sich

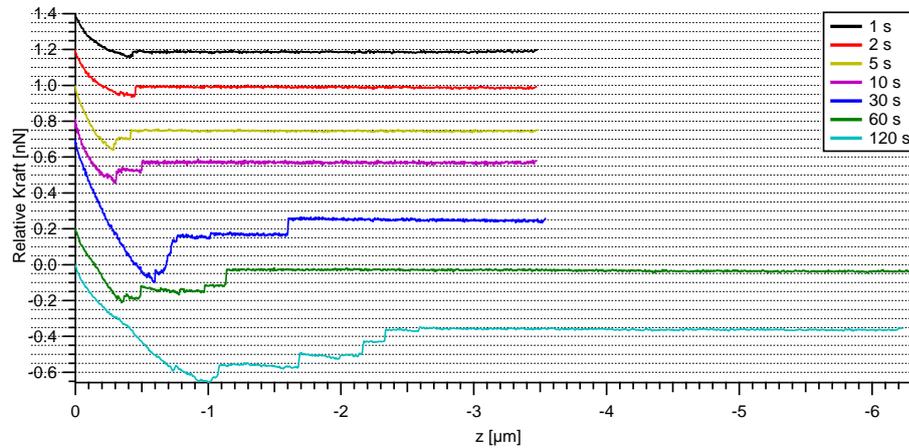


Abbildung 4.11: Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit CeO_2 funktionalisierten Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.

mehr Bindungen bilden, was in der anschließenden Rückzugsbewegung zur Ausbildung von zusätzlichen Tethern führt. Dazu ist aber erst ein Bereich höherer Kraft erforderlich, um den Tether-Prozess in Gang zu setzen. Die Entfernung der ersten Plateaus zur Nulllinie ist dabei ein Maß für die Anzahl der gebundenen Tether. Reißt ein Tether von der Spitze des Kraftsensors ab und gelangt zurück in die Zellmembran, kann er dort zur Verlängerung der noch bindenden Tether dienen. D.h., wenn zwei Tether an den Cantilever binden und einer abreißt, kann der zweite im Idealfall auf die doppelte Länge anwachsen [52].

Die Abbildung 4.10 zeigt genau dieses Verhalten. Ab Kontaktzeiten von ungefähr 5 s treten Abrisse im Bereich von ungefähr 40 pN auf, die sich einzelnen Tethern zuordnen lassen. Wird die Kontaktzeit zwischen Spitze und Zelle verlängert, bilden sich mehrere Tether und folglich ist auch eine größere Kraft erforderlich, um den Tetherprozess zu starten und den Cantilever wieder von der Zelle zu trennen.

Die Wechselwirkungen zwischen einem mit Ceroxid funktionalisierten Cantilever und lebenden Zellen sind in Abbildung 4.11 angegeben. Die Kraftdistanzkurven bis zu einer Kontaktzeit von 10 s ähneln denen in Abbildung 4.10 sehr stark. Für $t \geq 30$ s sind zwar auch einzelne Tetherabriss mit vergleichbaren Kräften zu erkennen, trotzdem sind kleinere Unterschiede sichtbar. Diese lassen sich jedoch nicht direkt mit Ceroxid oder Titanoxid in Verbindung bringen. Je größer die Kontaktzeit wird, desto kritischer wird die Bewegung der Zelle und auch die Drift des AFMs darf nicht außer Acht gelassen werden.⁴ Beide Effekte bedingen starke Unterschiede in den Kraft-

⁴Die Drift des AFMs wird in Abschnitt 4.2.3 ausführlich behandelt.

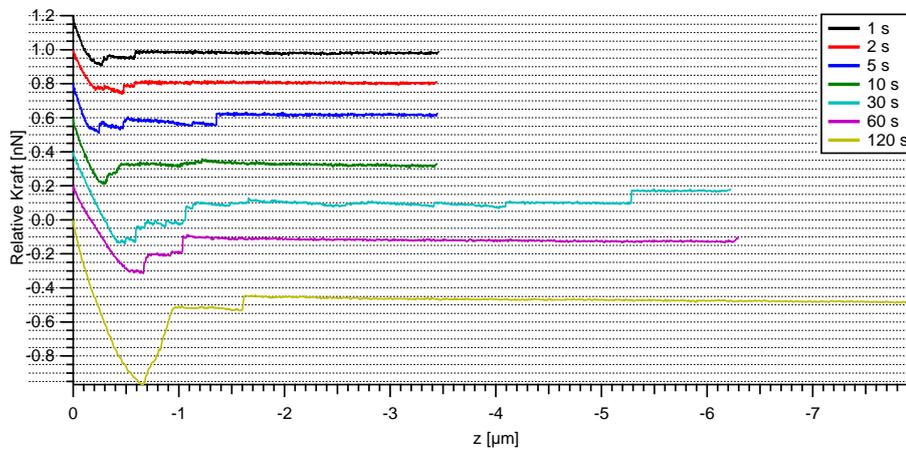


Abbildung 4.12: Kraftdistanzkurven (Rückzugsbewegungen) auf lebenden Zellen (RLE-6TN) mit einem unmodifizierten Si_3N_4 -Cantilever bei verschiedenen Kontaktzeiten.

distanzkurven, bis hin zu unauswertbaren Daten und sind somit ein Grund für die schwer zu interpretierenden Messergebnisse.

Die Kraftdistanzkurven mit einem Si_3N_4 Cantilever zeigen deutliche Unterschiede zu den bisherigen Messergebnissen. Aus Abbildung 4.12 ist ersichtlich, dass schon bei Kontaktzeiten mit $t = 1$ s Plateaus gefolgt von typischen Tetherabrissen auftreten können. Prinzipiell könnte das Material ausschlaggebend für diesen Sachverhalt sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Spitze der unmodifizierten Cantilever einen kleineren Durchmesser hat als ein an den Kraftsensor geklebtes Nanopartikel-Aggregat. Das führt insbesondere bei kurzen Kontaktzeiten zu einer stärkeren Verformung der Zellmembran, wodurch die Entstehung von Tethern begünstigt wird. Für längere Kontaktzeiten hingegen kehrt sich das Verhältnis um und die Kraftdistanzkurven mit den Partikeln zeigen mehr Abrisse. Auch für dieses Phänomen kann die Kontaktfläche verantwortlich sein. Sinkt ein Aggregat tief in die Zelle ein, entstehen durch die unregelmäßige Struktur und die große Oberfläche der Nanopartikel viele Ansatzpunkte für Bindungen zwischen Zelle und Membran, was bei einem pyramidalen Cantilever mit geraden Kanten nicht in diesem Maße der Fall ist. Auffällig ist außerdem die Kraftdistanzkurve für $t = 30$ s, die sich durch eine Vielzahl kleiner Abrisse von den anderen unterscheidet. Diese lassen sich mit dem eingeleiteten Zelltod erklären. Ein Anzeichen für diesen ist das Lösen der Zellausläufer vom Glasboden und das anschließende Zusammenziehen. Die Messung wurde daraufhin an einer anderen Zelle fortgesetzt.

Für eine Messreihe mit Kontaktzeiten von 1 s bis 120 s musste ungefähr zwei- bis dreimal die Zelle gewechselt werden. Die reine Messzeit ohne Unterbrechungen würde knapp 5 h betragen. In dieser Zeit sterben jedoch

auch Zellen, auf denen nicht gemessen wird. Lösen sich diese vollständig vom Glasboden und treiben durch die Flüssigkeitszelle, kann durch die Bewegung in der Flüssigkeit eine Drift des Cantilevers erzeugt werden. Einen ganz erheblichen Einfluss auf die Messungen haben jedoch tote Zellen, die gegen den Cantilever stoßen. Bleiben sie nicht am Kraftsensor hängen, können die Messungen nach einigen Minuten fortgesetzt werden. Aus diesem Grund und weil durch den Kontakt zwischen Spitze und Zelle größere Zellbestandteile am Cantilever hängen bleiben können, ist es wichtig, dass nach jeder Messung der Cantilever mit einem Elektronenmikroskop abgebildet wird. Nur wenn dort keine Zellrückstände zu sehen sind, können die Daten ausgewertet werden, da diese andernfalls nicht die Wechselwirkungen zwischen den zu untersuchenden Nanopartikeln und Zellen beschreiben würden.

Die Histogramme 4.13, 4.14, 4.15 liefern eine quantitative Auswertung der Messdaten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet, Histogramme für eine Vielzahl verschiedener Cantilever anzugeben. Stattdessen ist exemplarisch für TiO_2 , CeO_2 und Si_3N_4 eine Messreihe angegeben. Mit Hilfe eines Auswertprogramms (siehe Anhang) wurden die Abrisse detektiert und die auftretenden Kräfte bestimmt. Das thermische Rauschen der verwendeten Cantilever bildet dabei einen limitierenden Faktor für die kleinste detektierbare Kraft. Um zu vermeiden, dass die Software Rauschen als Abriss wertet, muss eine minimale Abrisskraft definiert werden. Sind die gemessenen Kräfte kleiner, werden die Daten verworfen. Als guter Kompromiss zwischen Sensitivität und verlässlicher Detektion hat sich $F_{min} = 20$ pN erwiesen. In den Histogrammen ist neben der Anzahl der Kraftdistanzkurven und der detektierten Abrisse zusätzlich das arithmetische Mittel F_0 angegeben.⁵

Ein Vergleich zwischen TiO_2 und CeO_2 bei kleinen Kontaktzeiten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung bei der durchschnittlichen Abrisskraft F_0 , die in beiden Fällen bei ca. 40 pN liegt. Die Anzahl der Abrisse unterscheidet sich aber für die Kontaktzeit $t = 1$ s um den Faktor 2. Dieser Unterschied wird jedoch für größere Zeiten kleiner und für $t \geq 5$ s treten für Titan- und Ceroxid gleich viele Abrisse auf. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass dieser Sachverhalt auf unterschiedlichen Partikeleigenschaften beruht. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass für kleine t die Spitzengeometrie des Cantilevers einen großen Einfluss auf die Zahl der Abrisse hat. Eine Spitze mit kleinem Durchmesser und einem hohen Aspektverhältnis sinkt tiefer in die Zelle ein und führt zu einer größeren Verbiegung der Zellmembran, was eine Bildung von Tethern begünstigt. Ist t hingegen groß, taucht der Kraftsensor wesentlich tiefer in die Zelle ein und die Membran kann sich an die Struktur des Aggregats anpassen. Die Fläche der Spitze ist bei diesen Bedingungen aber klein im Vergleich zur gesamten Kontaktfläche und spielt somit nur

⁵Nicht alle Histogramme lassen sich mit einer Gaußverteilung fitten, deshalb wurde für eine bessere Vergleichbarkeit das arithmetische Mittel gewählt.

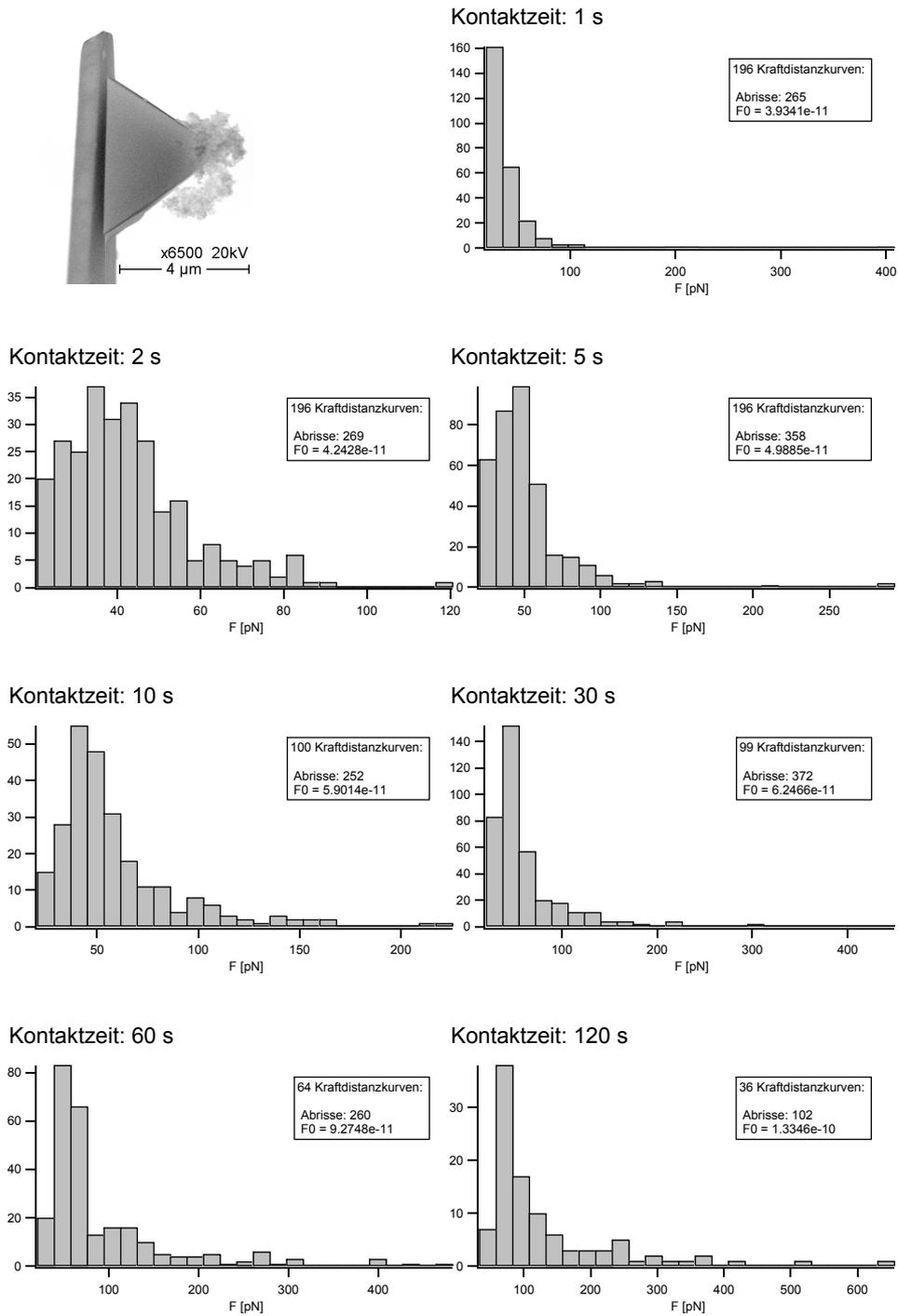


Abbildung 4.13: Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen mit TiO₂ funktionalisierten Cantilever.

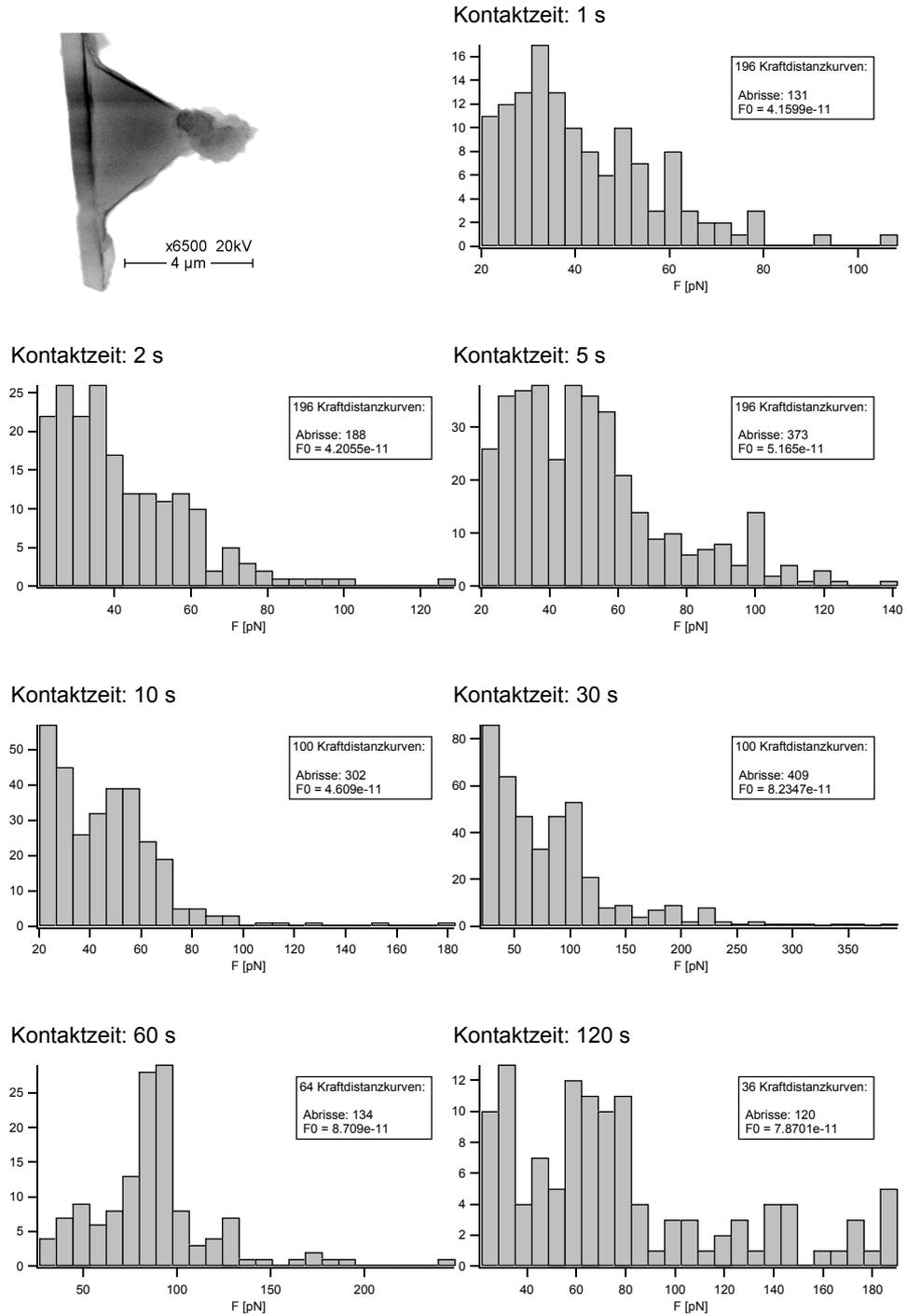


Abbildung 4.14: Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen mit CeO_2 Mod. D funktionalisierten Cantilever.

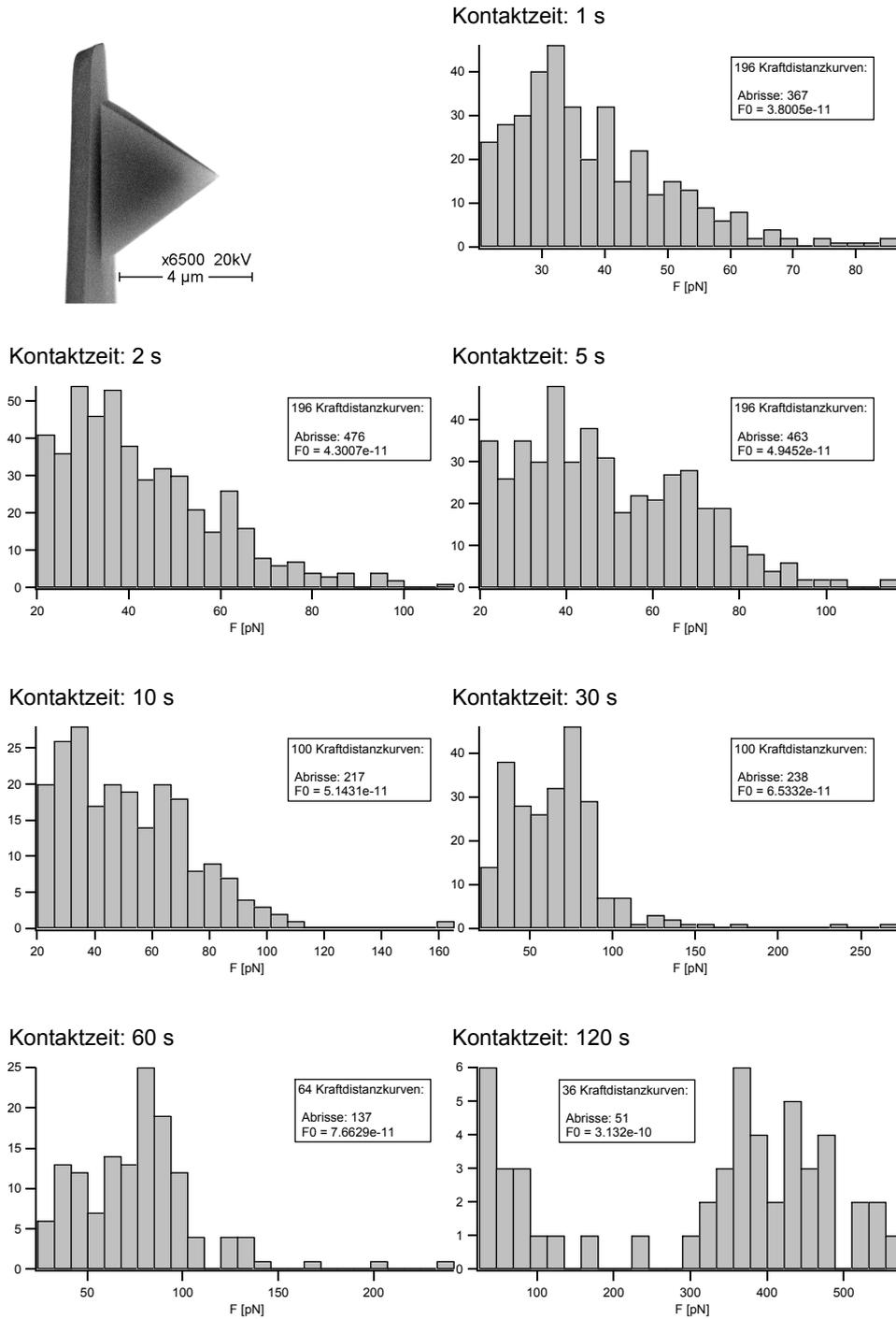


Abbildung 4.15: Histogramme der Abrisskräfte in Abhängigkeit von der Kontaktzeit für einen unmodifizierten Siliziumnitrid-Cantilever.

noch eine untergeordnete Rolle.

Wie bereits erwähnt, ist die Interpretation der Daten bei längeren Kontaktzeiten schwieriger. Äußere Einflüsse und die Bewegung der Zellen erschweren die Messungen. Trotzdem bestätigen die Histogramme das zuvor besprochene Verhalten. Je mehr Tether an den Cantilever binden, desto größer muss die Kraft sein, um diese aus der Zelle zu ziehen, was zu einer größeren Adhäsion führt und die Verschiebung von F_0 erklärt. Aber eine Vielzahl der auftretenden Kräfte bleibt in einem Bereich zwischen 40 pN - 60 pN und deutet auf Tetherabriss hin.

Sun et al. [52] haben für einzelne Abrisskräfte im Bereich von 30 pN gemessen und sind zu dem Schluss gekommen, dass diese Kräfte auftreten, wenn ein Tether vom Cantilever abreißt und nicht von der Zelle. Die Histogramme zeigen jedoch für lange Kontaktzeiten viele Abrisse um 100 pN. Bei diesen Kräften erreicht die Membranspannung jedoch so große Werte, dass nicht nur das Abreißen des Tethers vom Cantilever in Frage kommt, sondern auch ein Reißen der Lipidschicht möglich ist [54, 52]. Die Membranspannung T_m und die zu einem Tether gehörende Kraft F hängen dabei wie folgt zusammen [55]

$$F = 2\pi (2BT_m)^{1/2} \quad \text{Mit } B = 2,7 \cdot 10^{-19}\text{Nm (Biegesteifigkeit)}. \quad (4.5)$$

Da dieses Phänomen aber ansatzweise bei allen Proben zu beobachten ist, lässt sich auch hier kein direkter Unterschied zwischen den verschiedenen Partikeln nachweisen. Einzig die Abrisskräfte des unmodifizierten Siliziumnitrid-Cantilevers weichen von den bisherigen Ergebnissen ab. Neben Kräften ≤ 100 pN zeigt das Histogramm weitere Abrisse im Bereich von 400 pN - 500 pN. Afrin et al. [56] vermuten, dass es sich bei diesen Kräften um ein Herausziehen von Membranproteinen handelt. Die Tatsache, dass nach der Messung mit dieser Kontaktzeit die Zelle gewechselt werden musste, deutet darauf hin, dass die Zellmembran irreparabel verletzt wurde und stützt somit diese These.

Die Abbildung 4.16 zeigt die mittleren Abrisskräfte F_0 von modifizierten und unmodifizierten Cantilevern bei verschiedenen Kontaktzeiten.⁶

Bei allen bis jetzt gezeigten Messungen hat der Cantilever während der Kontaktzeit mit einer konstanten Kraft $F = 200$ pN auf die Zelle gedrückt. Um die Abhängigkeit der Abrisse von dieser Kraft zu untersuchen, beinhaltet das Diagramm jeweils eine Messreihe für $F = 400$ pN und $F = 600$ pN. Des Weiteren wurde ein Cantilever über 20 Minuten mit FCS (Fetales Kälberserum) inkubiert. Diese Messung sollte zeigen, ob eine Proteinschicht auf einem Cantilever eine Art „Tarnmantel“ bildet, die Zelle also das Protein erkennt und den Cantilever aufgrund dessen schneller aufnimmt. Die Abbildung 4.16 zeigt aber, dass die mittleren Abrisskräfte aller unterschiedlich

⁶Der Messfehler, der durch die Bestimmung der Federkonstanten und die automatische Auswertung der Abrisse entsteht, liegt dabei im Bereich von 10%.

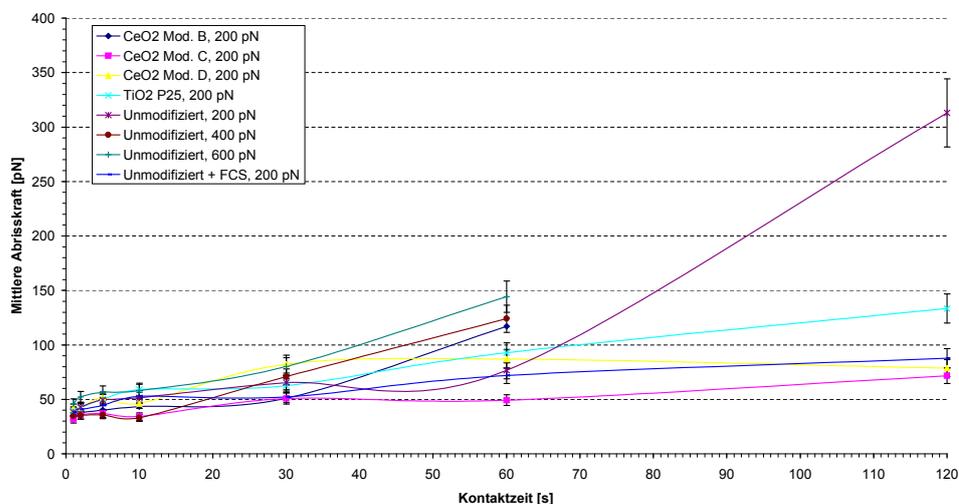


Abbildung 4.16: Mittlere Abrisskräfte für verschiedene modifizierte und unmodifizierte Cantilever in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.

modifizierten Cantilever, insbesondere für kleine Kontaktzeiten t , eng beieinander liegen und auch für größere t nicht weiter als 100 pN auseinander liegen, wenn der Wert für $t = 120$ s aus Abbildung 4.15 nicht berücksichtigt wird. Dieses scheint jedoch gerechtfertigt zu sein, da bei keiner anderen Messung mit einem unmodifizierten Cantilever Abrisskräfte im Bereich von 400 pN - 500 pN aufgetreten sind. Gleichzeitig verdeutlicht dieses Messergebnis jedoch die Schwierigkeiten dieser Versuchsreihen.

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Metalloxiden nachweisen zu können, müssten diese sich entweder signifikant voneinander unterscheiden, oder die Eigenschaften der Zelle wie Dicke, Verteilung der Membranproteine und Verknüpfungen mit dem Cytoskelett sowie im besonderen Maße die Bewegung der Zellmembran müssten für jede Kraftdistanzkurve genau definiert sein. Das ist jedoch nicht möglich und solange die Zelle einen größeren Einfluss auf die Messergebnisse hat als die verwendeten Materialien, lassen sich keine verlässlichen Angaben über deren Unterschiede machen.

Adhäsionskarte

Die bisherigen Messungen im Force Volume Mode wurden in einem $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$ großen Scanausschnitt im Bereich des Zellkerns durchgeführt. Der Zellkern bildet den höchsten Punkt der Zelle, so dass bei kraftspektroskopischen Messungen die Einflüsse des harten Glasbodens vernachlässigbar sind. Außerdem wird auf diese Weise eine bessere Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet, da verschiedene Regionen der Zelle unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können. Genau diese Unterschiede sollten, falls sie vorhanden sind, mit Hilfe einer Adhäsionskarte nachgewiesen werden.

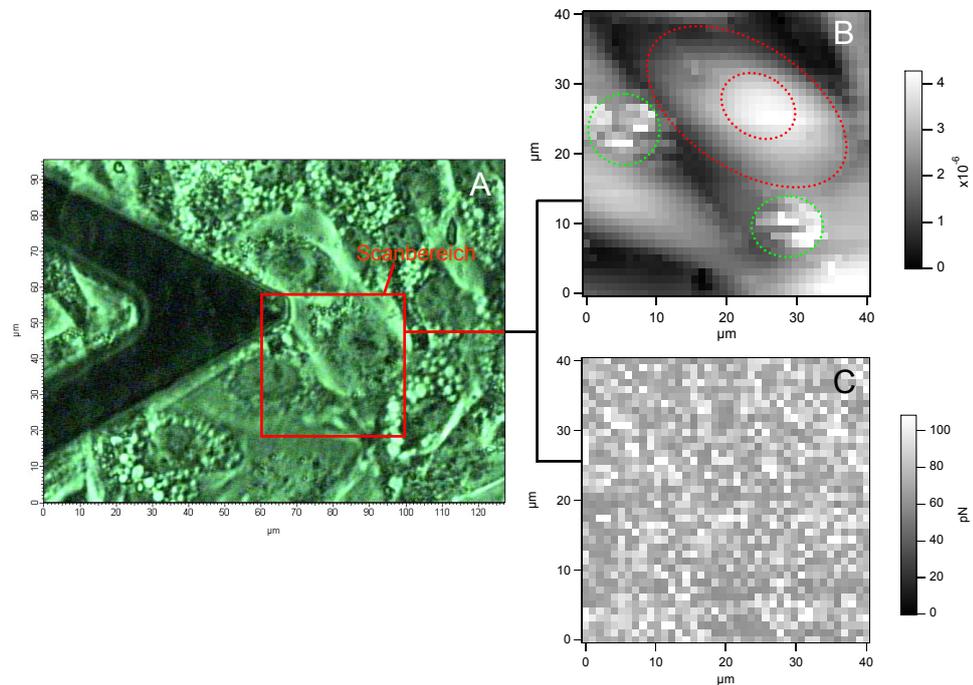


Abbildung 4.17: Kraftdistanzkurven mit einem funktionalisierten Cantilever (CeO_2 Mod. A), Bild A zeigt das Phasenkontrastbild lebender Lungen-Epithelzellen, Bild B gibt den größten z-Wert während jeder einzelnen Kraftdistanzkurve an und liefert somit ein Höhensignal und Bild C zeigt die mit IGOR bestimmte Adhäsion.

Der Scanbereich wurde für diese Messungen auf $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ mit 40×40 Datenpunkten vergrößert und die Kontaktzeit auf $0,1 \text{ s}$ reduziert. Das AFM benötigt bei einer Geschwindigkeit von $3 \mu\text{m/s}$ ungefähr 50 Minuten für die 1600 Kraftdistanzkurven. Bei dieser Anzahl an Kraftdistanzkurven kann jedoch die Zellmembran verletzt werden und zum Tod der Zelle führen. Darüber hinaus lässt sich oft beobachten, dass die Zelle dem Cantilever aktiv ausweicht und sich während der Messung ungefähr $10 \mu\text{m}$ bewegt. Diese Effekte begrenzen die Anzahl der Kraftdistanzkurven sowie die Scanzeit und verhindern hochauflösende Force Maps.

Der rechte Teil der Abbildung 4.17 zeigt zwei Force Maps, die die Höhe und die Adhäsion während des Scans angeben. Mit Hilfe des Höhensignals ist es möglich, die Umrisse einzelner Zellen und die Zellkerne aufzulösen (rote Markierungen in Bild B). Ein limitierender Faktor sind Bewegungen der Zellmembran, die zu Daten wie in den grün markierten Bereichen führen können. Die Adhäsionskarte zeigt im Vergleich jedoch keine erkennbaren Strukturen. D.h. es wurden keine unterschiedlichen Bindungskräfte in den verschiedenen Bereichen der Zelle festgestellt. Dieses Ergebnis wurde für

Siliziumnitrid-Cantilever und für Kraftsensoren, die mit TiO_2 P25 Nanopartikeln funktionalisiert wurden, bestätigt.

Eintauchtiefen

Neben den Abrisskräften wurde bei allen Messungen auch die Eintauchtiefe des Cantilevers nach dem Erreichen des trigger points in die Zelle ermittelt. Diese Daten sollten zeigen, ob die verschiedenen Metalloxid-Nanopartikel unterschiedlich schnell in die Zelle eintauchen bzw. von ihr aufgenommen werden. Die Auswertung erfolgte dabei ebenfalls mit einem selbst geschriebenen Programm, dessen Quellcode sich im Anhang befindet. Die Software ermittelt die Differenz der größten und der kleinsten Höhe des z-Piezos während der Kontaktzeit (lila Kurve in Abbildung 4.9). Es wurde darauf verzichtet, die Eintauchtiefe bis zum Erreichen des trigger points zu berücksichtigen, da sich der Punkt des ersten Kontakts nicht genau bestimmen lässt. Auf diese Weise wurde eine weitere Fehlerquelle vermieden. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die absolute Eintauchtiefe ungefähr 500 nm größer ist als die angegebenen Werte.⁷

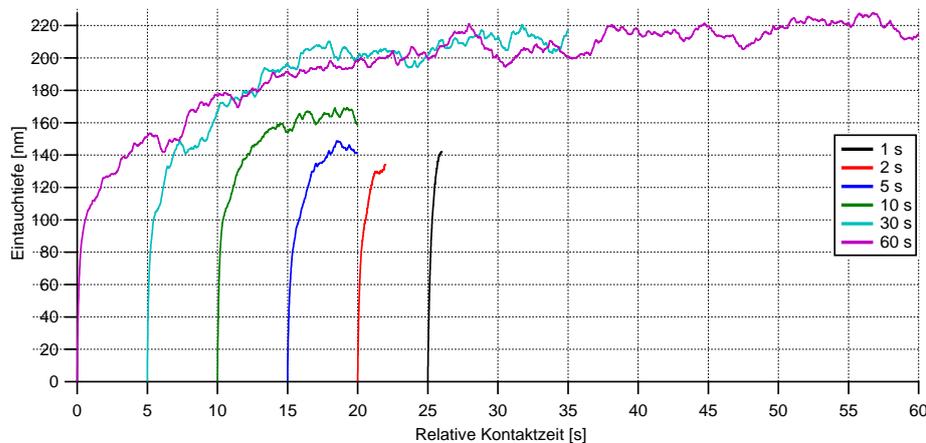


Abbildung 4.18: Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. B funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. Die Graphen wurden für eine bessere Darstellung horizontal verschoben.

Die Daten in Abbildung 4.18 zeigen, dass der verwendete Cantilever innerhalb der ersten Sekunde nach dem Erreichen des trigger points ungefähr 100 nm - 140 nm in die Zelle eintaucht. Für Kontaktzeiten $t \geq 5$ s ändert sich die Eintauchtiefe nur noch langsam und erreicht für $t = 60$ s gut 200 nm. Mit der Abnahme der Eintauchgeschwindigkeit und längeren Kontaktzeiten

⁷Ist $F_{trigger} = 200$ pN, sinkt der Cantilever bis zum Erreichen des trigger points und bei Messungen über dem Zellkern ungefähr 500 nm in die Zelle ein.

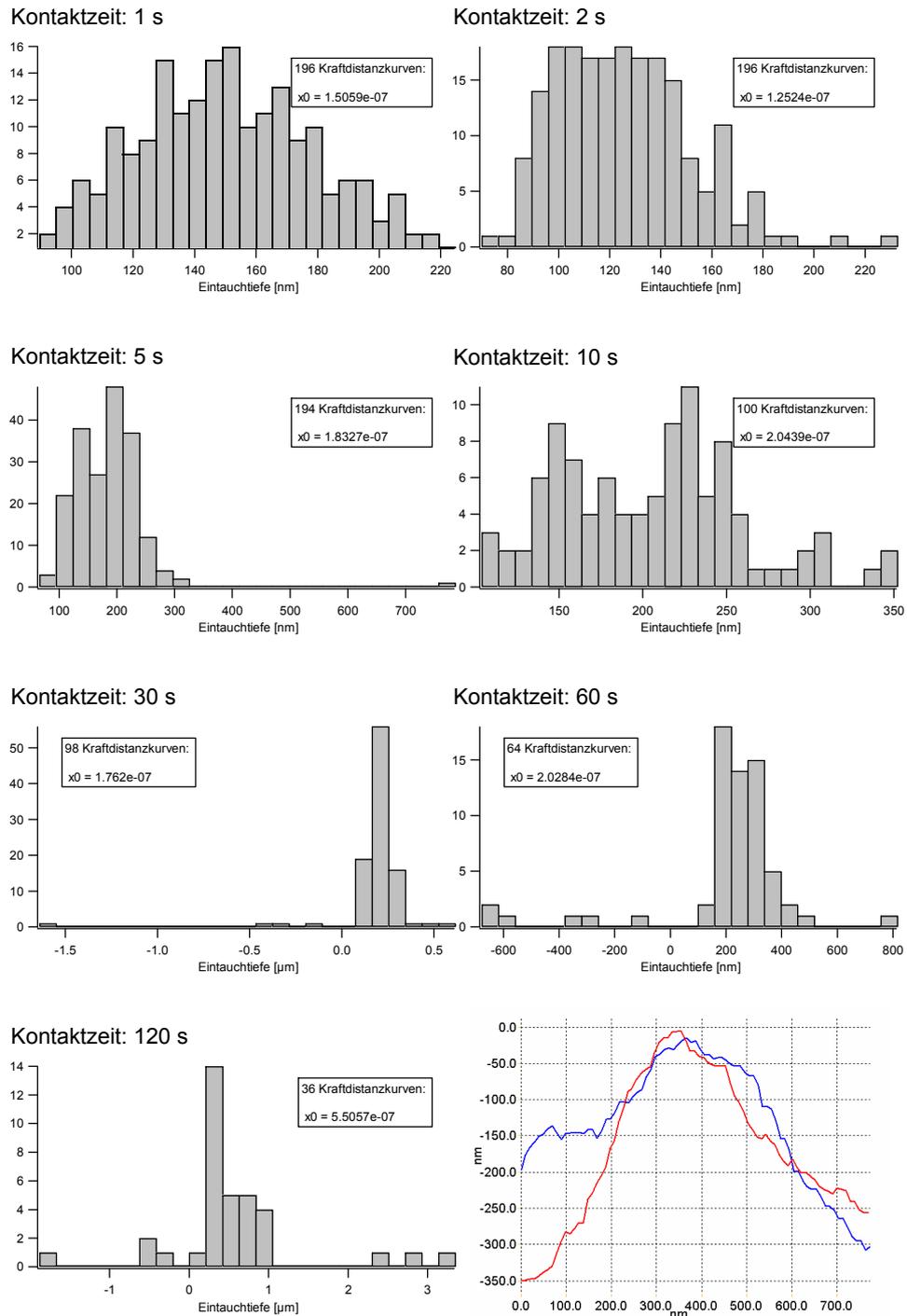


Abbildung 4.19: Histogramme der Eintauchtiefen eines mit TiO_2 P25 funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit und das Profil des verwendeten Kraftsensors für zwei verschiedene Richtungen. Für eine bessere Darstellung sind für $t = 5$ s zwei Eintauchtiefen nicht dargestellt ($\pm 2,5 \mu\text{m}$) und für $t = 30$ s wurde ein Wert ($-8 \mu\text{m}$) nicht abgebildet.

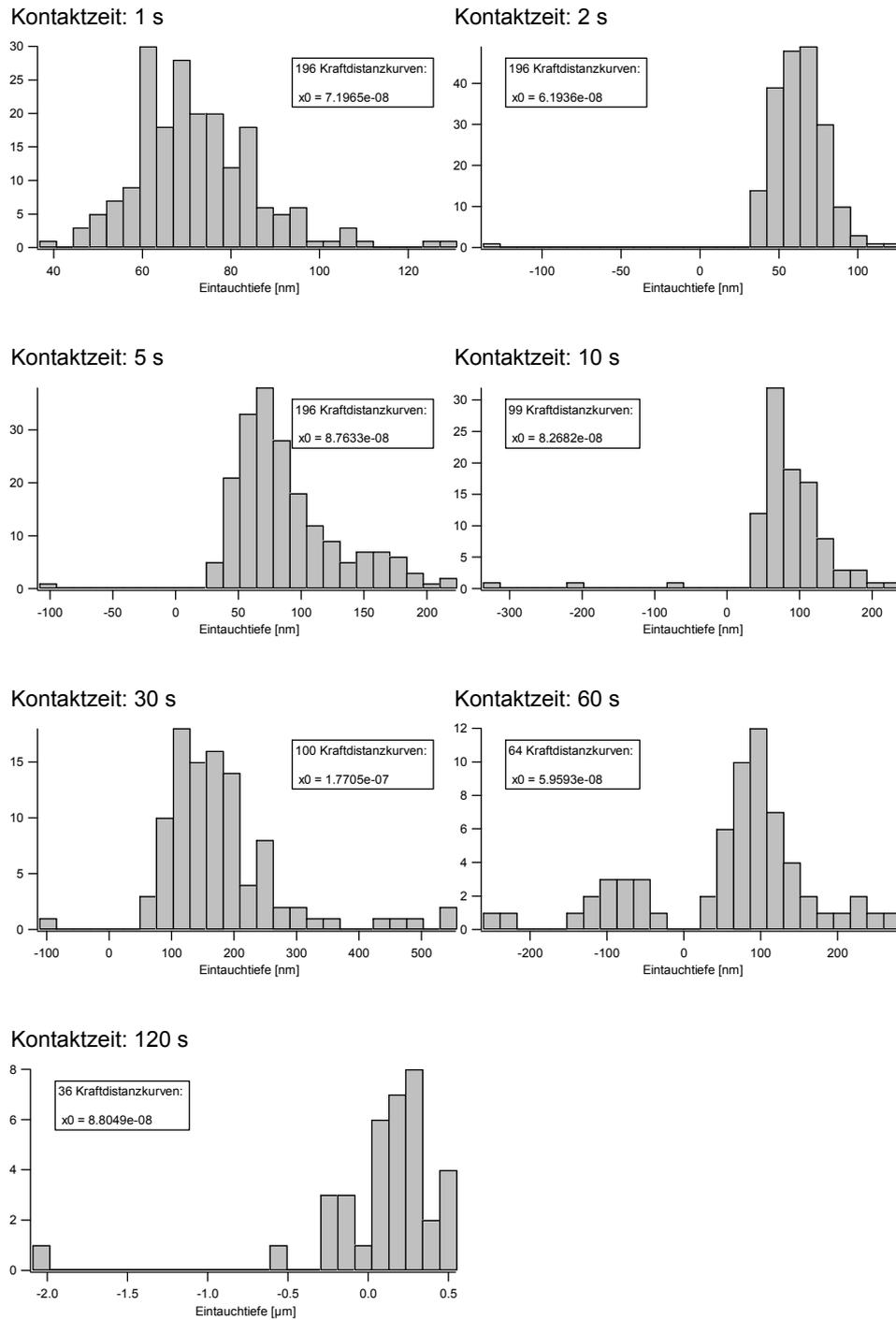


Abbildung 4.20: Histogramme der Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. D funktionalisierten Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.

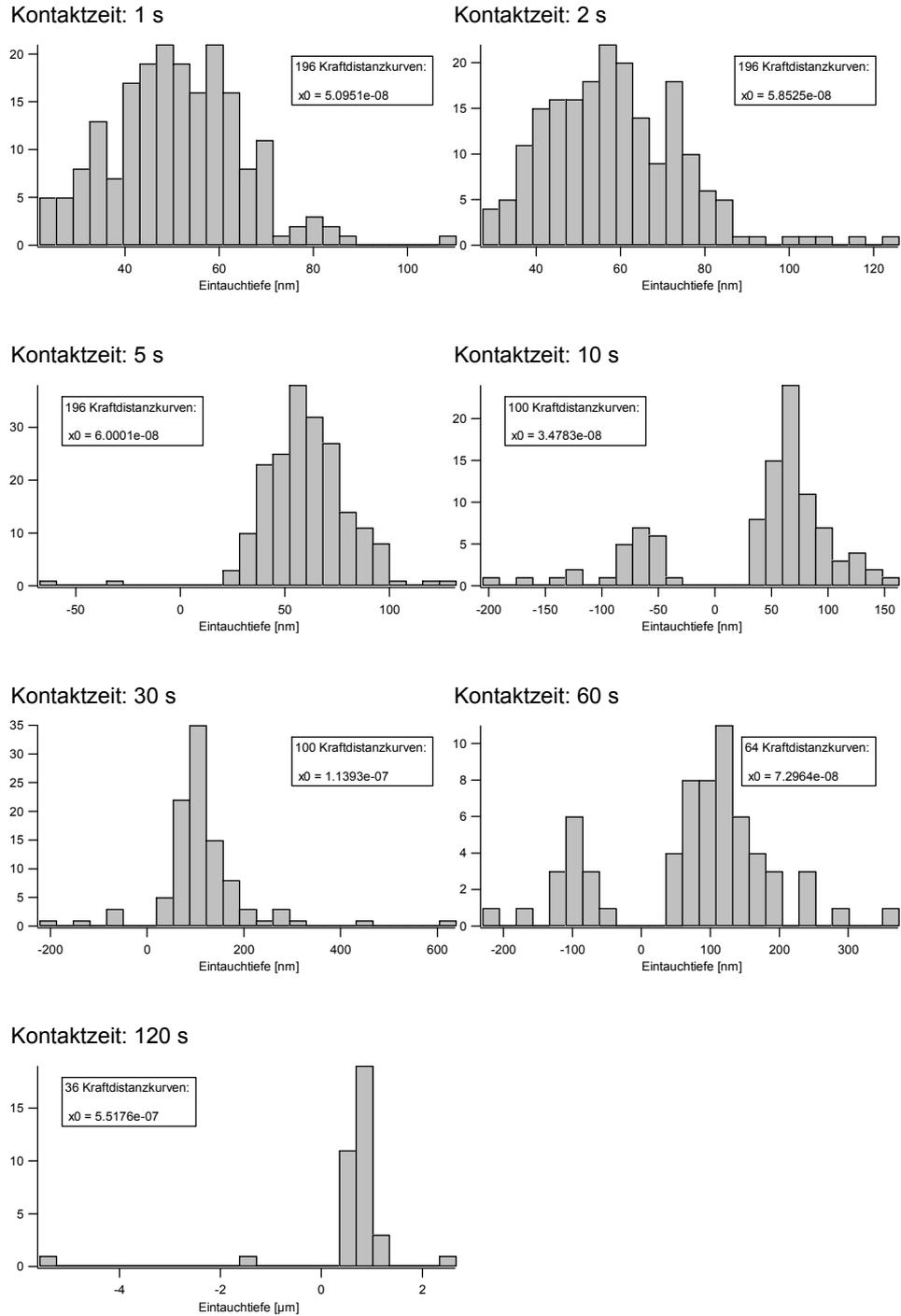


Abbildung 4.21: Histogramme der Eintauchtiefen eines unmodifizierten Siliziumnitrid-Cantilevers in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.

ist jedoch ein größerer Fehler durch die z-Drift des AFMs verbunden.⁸ Diese kann, wie in Abbildung 4.24 dargestellt ist innerhalb weniger Minuten die Richtung umkehren und Geschwindigkeiten von $v_{\text{Drift}} = 10 \text{ nm/s}$ erreichen. Die Daten sind somit fehlerbehaftet und insbesondere für lange Kontaktzeiten nur bedingt aussagekräftig.

Die Histogramme 4.19, 4.20, 4.21 zeigen die statistische Auswertung der Eintauchtiefen verschieden modifizierter Cantilever in Lungen-Epithelzellen. Zusätzlich angegeben ist neben der Zahl der ausgewerteten Kraftdistanzkurven das arithmetische Mittel der Eintauchtiefen x_0 . Bei Kontaktzeiten $\leq 2 \text{ s}$ fällt auf, dass sich die Eintauchtiefen um den Faktor 2,5 voneinander unterscheiden. Für den mit TiO_2 funktionalisierten Cantilever gilt $x_0 \approx 138 \text{ nm}$, während für den unmodifizierten Kraftsensor aus Siliziumnitrid eine mittlere Eintauchtiefe von $x_0 \approx 55 \text{ nm}$ ermittelt wurde. Vergleicht man das Profil für Titanoxid, das in Abbildung 4.19 für zwei unterschiedliche Richtungen über den Apex angegeben ist, lässt sich eine Verbreiterung der Spitzegeometrie ab einer Höhe von 150 nm feststellen. Die Spitzegeometrie allein kann jedoch nicht die unterschiedlichen Eintauchtiefen erklären. In diesem Fall hätte der unmodifizierte Siliziumnitrid-Cantilever am tiefsten in die Zelle einsinken müssen. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die Eigenschaften der Zellen für diese Unterschiede verantwortlich sind. Die Strukturen des Cytoskeletts sind nicht homogen über die Zelle verteilt und dadurch bedingt verändern sich auch die elastischen Eigenschaften. Sirghi et al. [51] haben das Elastizitätsmodul für Maus-Fibroblasten untersucht und kommen zu dem Ergebnis, dass sich die Werte über dem Zellkern relativ stark voneinander unterscheiden und zwischen $0,5 \text{ kPa}$ und $1,6 \text{ kPa}$ liegen. Wären hingegen verschiedene Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen für die unterschiedlichen Eintauchtiefen verantwortlich, müssten diese auch bei den Abrisskräften auftreten, was aber nicht der Fall ist.

Die Mittelwerte x_0 bei längeren Kontaktzeiten zeigen eine grundsätzliche Zunahme der Eintauchtiefen. Darüber hinaus sind den Histogrammen auch negative Werte zu entnehmen. Diese lassen sich einerseits mit Bewegungen der Zellmembran während der Kontaktzeit erklären, sind andererseits aber auch auf die Drift des AFMs zurückzuführen, der erst bei Messungen an fixierten Zellen deutlich wurde.

4.2.2 Fixierte Zellen

Die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen an lebenden Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Siliziumnitrid und funktionalisierten Cantilevern. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die gemessenen Daten spezifische Eigenschaften der Membran bzw. der Zellen angeben und die verschiedenen Partikel nur eine untergeordnete Rolle spielen. Aus diesem

⁸Die Drift wird in Abschnitt 4.2.3 genauer untersucht, dabei handelt es sich um einen im Vorfeld unbekanntem Fehler.

Grund wurden die Membraneigenschaften gezielt verändert und der Einfluss auf die Ergebnisse ausgewertet.

Glutardialdehyd

Glutardialdehyd besteht aus einer Kette von fünf Kohlenstoffatomen, an deren Enden je eine reaktive Aldehydgruppe gebunden ist. Durch diese reaktiven Gruppen kann es über Aminogruppen die Proteine auf einer Zellmembran vernetzen, was zur Fixierung der Zelle führt.

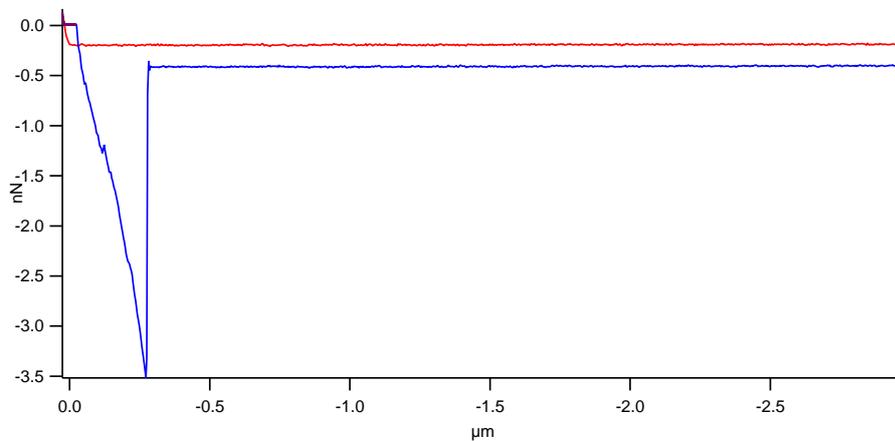


Abbildung 4.22: Typische Kraftdistanzkurve auf einer mit 0,5% Glutardialdehyd fixierten Zelle.

Die Kraftdistanzkurven auf fixierten Zellen unterscheiden sich deutlich von denen auf lebenden Zellen. Bei einem Teil der Kurven tritt keine Adhäsion auf, während die Abbildung 4.22 repräsentativ für den anderen Teil ist. Bei kurzen Kontaktzeiten zwischen Zelle und Siliziumnitrid-Cantilever überwiegen die Kurven ohne Abrisse. Je länger Probe und Spitze aber in Kontakt bleiben, desto mehr Kraftdistanzkurven zeigen den in Abbildung 4.22 beschriebenen Verlauf. Bei den Abrisskräften im Bereich von 3 nN handelt es sich wahrscheinlich um kovalente Bindungen. Da diese bei Messungen an lebenden Zellen nicht zu beobachten sind, ist anzunehmen, dass es sich um eine Bindung zwischen Siliziumnitrid-Cantilever und Glutardialdehyd handelt. Man kann also davon ausgehen, dass der Cantilever keinen direkten Kontakt mehr zur Zellmembran hat und es deshalb auch nicht zur Bildung von Tethern kommt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine freie Aldehydgruppe des Glutardialdehyds mit dem Kraftsensor in Kontakt kommt und kovalent an diesen bindet, steigt mit der Zeit.

Bei der Kraftdistanzkurve in Abbildung 4.22 waren Cantilever und Zelle 60 s in Kontakt. Den Messdaten des AFMs zufolge hat sich der Kraftsensor in dieser Zeit um 42 nm nach oben bewegt, obwohl der Sensor mit einer

Kraft von 200 pN nach unten, also auf die Zelle gedrückt wurde. Die Untersuchungen im Abschnitt 4.2.3 haben letztlich gezeigt, dass es sich hierbei um eine Drift des AFMs handelt. Bei den zuvor durchgeführten Messungen auf lebenden Zellen ist diese Drift nicht in diesem Maße aufgefallen, da die Eintauchtiefen hier zum einen wesentlich größer sind und zum anderen ähnliche Effekte durch die Bewegungen der Zellen auftreten können.

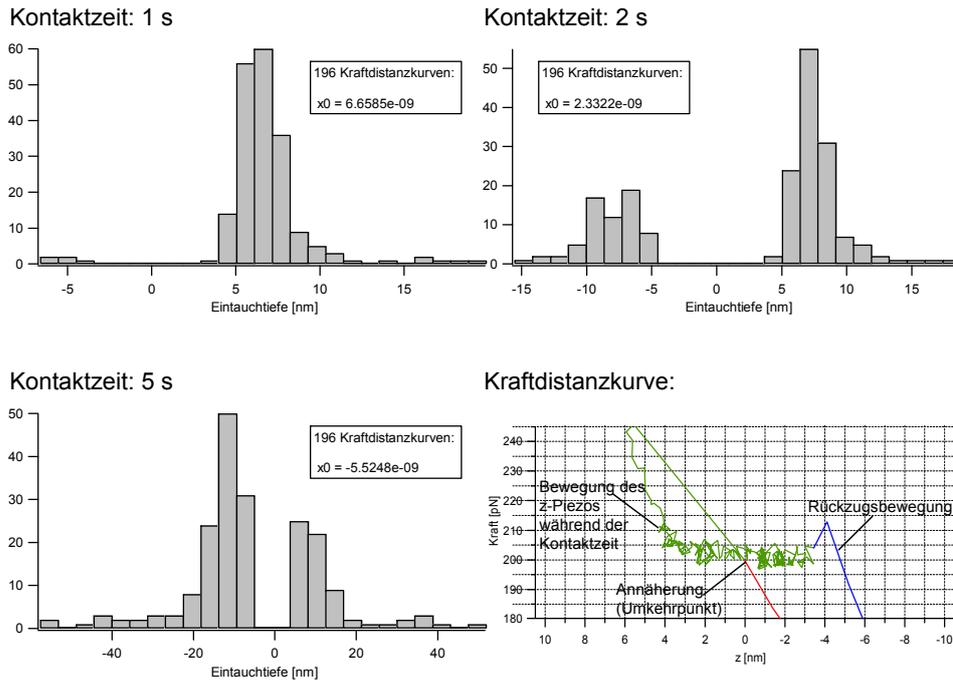


Abbildung 4.23: Eintauchtiefen eines mit Ceroxid Mod. B funktionalisierten Cantilevers in eine fixierte Zelle (0,5% Glutaraldehyd) für verschiedene Kontaktzeiten t und die Bewegung des z-Piezos für $t = 2$ s.

Die Abbildung 4.23 zeigt die Histogramme der Eintauchtiefen (14×14 Kraftdistanzkurven im Force Volume Mode über $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$) für Kontaktzeiten zwischen 1 s und 5 s. Die Histogramme zeigen neben den negativen Eintauchtiefen noch eine weitere Auffälligkeit und zwar das Fehlen von Messergebnissen um $z = 0$ nm. Die Kraftdistanzkurve in Abbildung 4.22 verdeutlicht, warum keine Daten in diesem Bereich gemessen wurden. Beim Erreichen des trigger points (rote Kurve bei $F = 200$ pN) sollte die Kraft, die über den z-Piezo variiert wird, für eine zuvor bestimmte Zeit konstant gehalten werden. Die Bewegung des Piezos wird aber nicht unmittelbar nach dem Erreichen des trigger points gestoppt, was zu einer weiteren Verkleinerung des Abstands zwischen Probe und Cantilever und damit auch zu einer Erhöhung der Kraft führt (Übergang von der roten zur grünen Kurve). Anschließend wird die Kraft auf 200 pN geregelt und Probe und Spitze

driften scheinbar (siehe Abschnitt 4.2.3) bis zur Rückzugsbewegung auseinander (Übergang von der grünen zur blauen Kurve). Die Auswertsoftware bestimmt zur Berechnung der Eintauchtiefe die Differenz des größten und kleinsten z -Werts während der Kontaktzeit. Da der z -Piezo aber nicht sofort nach dem Erreichen des trigger points stoppt, sondern noch ungefähr 5 nm weiter auf die Probe zufährt, können die bestimmten Eintauchtiefen nicht kleiner als dieser Wert sein. Dieser Fehler ist jedoch auf weicheren Proben und insbesondere bei längeren Kontaktzeiten zu vernachlässigen.

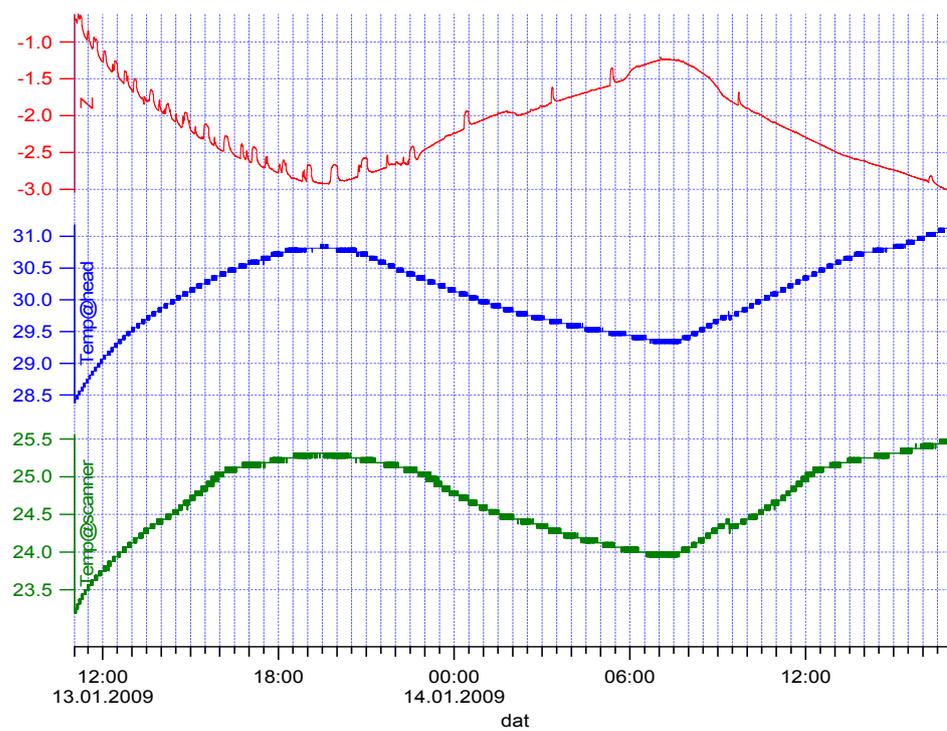
4.2.3 z -Drift des AFMs

Bei allen kraftspektroskopischen Messungen an Zellen wurde die Kontaktzeit zwischen Spitze und Probe zwischen 1 s und 120 s variiert. Während dieser Zeit hält die Elektronik des AFMs die Verbiegung des Cantilevers konstant und regelt den z -Piezo, also den Abstand zwischen Probe und Kraftsensor. Dadurch ist es möglich, in der Kontaktzeit mit konstanter Kraft auf die Zelle zu drücken (hier: 200 pN). Man erwartet, dass die Spitze die Zelle deformiert und sich somit weiter auf diese zubewegt. Wie in dem Abschnitt 4.2.2 erwähnt, geht aus den Messdaten für fixierte Zellen eine Bewegung in die entgegengesetzte Richtung hervor. Das würde bedeuten, dass sich der Cantilever in der Kontaktzeit nach oben bewegt, obwohl eine Kraft nach unten auf die Zelle wirkt.

Dieses Phänomen lässt sich nicht mit den Eigenschaften fixierter Zellen erklären, sondern eher mit einer z -Drift des AFMs. Aus diesem Grund wurden zunächst Kraftdistanzkurven mit unterschiedlichen Kontaktzeiten auf Glas aufgezeichnet. Auf der harten Glasoberfläche sollte weder eine Drift in positive noch in negative z -Richtung auftreten. Denn zum einen ist Glas sehr hart, so dass der Cantilever nicht einsinken kann und zum anderen lässt sich ausschließen, dass sich Moleküle wie z.B. Lipide an der Spitze ansammeln und so zum Auseinanderdriften von Probe und Sensor führen. Die Messdaten zeigen jedoch auch auf Glas eine Drift von der Oberfläche weg und machen so deutlich, dass es sich um ein Artefakt des AFMs handeln muss.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines Loggers die Drift bzw. die Bewegung des z -Piezos über einen Zeitraum von 24 h aufgezeichnet. Um eine Messung über 24 h in Flüssigkeit zu ermöglichen, wurde eine geschlossene Flüssigkeitszelle verwendet. Diese bestand aus einer Petrischale mit Glasboden und wurde mit 2,5 ml Milli-Q Wasser gefüllt und auf 37 °C temperiert. Die verwendeten Veeco NP-Cantilever bestehen aus Siliziumnitrid und sind mit Chrom und Gold bedampft. Durch das Heizen der Probe auf 37 °C wird eine konstante Temperatur des Cantilevers gewährleistet und man kann bimetallisches Verhalten ausschließen. Neben der Bewegung des z -Piezos wurden außerdem die Raumtemperatur, die Temperatur im Scanner und die Temperatur im Kopf des AFMs über 24 h aufgezeichnet.

Die Abbildung 4.24 zeigt, dass das z -Signal über mehr als 2 μm driftet.

Z-Drift in μm + AFM-Temperatur:

Raumtemperatur:

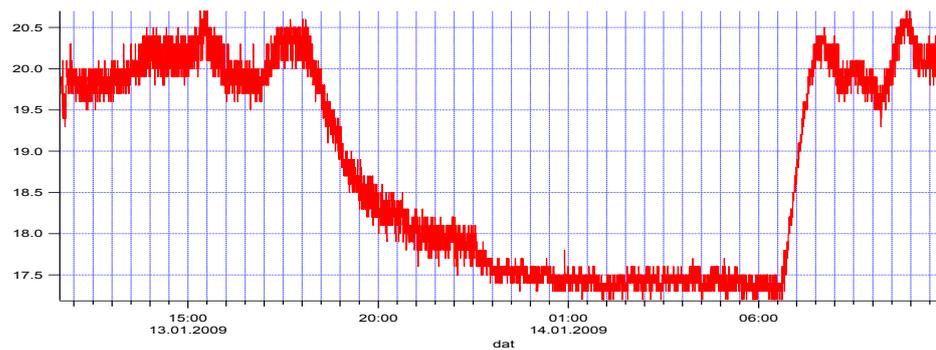


Abbildung 4.24: Drift des z-Piezos [μm], Temperaturen im Kopf des AFMs, im Scanner und im Labor [$^{\circ}\text{C}$].

Wie in den Messungen zuvor suggerieren die Daten eine Bewegung des Cantilevers von der Probe weg. Diese scheinbare Bewegung lässt sich mit der Temperatur im Kopf des AFMs erklären, die zum Start der Messung bei ungefähr 28,5 °C lag und nach 6 Stunden Betrieb bis auf 31 °C gestiegen ist und zu einer Ausdehnung des Piezos führt. Da die Elektronik aber die Verbiegung des Cantilevers konstant hält, wird der z-Piezo angesteuert und von der Probe weg bewegt.

Zwischen 18 Uhr und 7 Uhr wird die Vorlauftemperatur der Heizung abgesenkt und die Raumtemperatur sinkt innerhalb von 5 Stunden bis auf 17,5 °C. Der z-Piezo wird abgekühlt, zieht sich zusammen und driftet somit scheinbar in die entgegengesetzte Richtung. Eine über 24 h konstante Temperatur würde das Problem nur zum Teil lösen, da durch das Heizen der Probe auf 37 °C und den Betrieb des AFMs die Temperatur im Kopf steigt und dieser Prozess länger als 6 h andauert, wie im Diagramm zu sehen ist. Aber gerade in dieser Zeit sollten die Messungen an lebenden Zellen durchgeführt werden, weil deren Lebenserwartung trotz Temperierung begrenzt ist.

Eine nachträgliche Korrektur der Eintauchtiefen wäre nur ohne die Peaks in der z-Drift möglich. Diese erstrecken sich über mehrere Minuten und liegen somit im Bereich der Kontaktzeiten, die bei den Messungen zwischen 1 s und 120 s variiert wurden. So lässt sich aber nicht mit Sicherheit sagen, in welche Richtung und wie stark das z-Signal in der Kontaktzeit gedriftet ist. Die Peaks treten innerhalb der ersten 6 h besonders häufig auf und verschwinden fast vollständig gegen Ende des 24 h langen Testlaufs. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich vermuten, dass dieses Phänomen mit dem Petri Dish Heater und der Flüssigkeitsmenge in der geschlossenen Flüssigkeitszelle zusammenhängt. Während der Messung verdunstet das Wasser in der Petrischale und kondensiert an der Gummidichtung des Dish Heaters. Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Peaks in der z-Drift sind Tropfen, die von der Gummidichtung zurück in die Flüssigkeit fallen. Die Abnahme der Häufigkeit hängt dabei direkt mit der Oberfläche der Flüssigkeit zusammen, die sich erst nach einigen Stunden ändert, wenn nicht mehr der gesamte Glasboden mit Wasser bedeckt ist. Nach den 24 h war nur noch ein kleiner Teil des Glasbodens um den Cantileverhalter herum mit Wasser bedeckt. Die restliche Flüssigkeit konnte trotz der Gummidichtung entweichen.

Die Bestimmung der Eintauchtiefen mit Kontaktzeiten $t \geq 10$ s ist mit dem derzeitigen Setup nicht möglich bzw. mit einem großen Fehler verbunden. Um in Zukunft Messungen dieser Art gewährleisten zu können, muss die Raumtemperatur über 24 h konstant gehalten werden. Außerdem sollte die Temperatur im Kopf des AFMs separat geregelt werden. Diese erreicht selbst 6 h nach dem Start der Messung noch keinen konstanten Wert und führt somit zu einer Längenänderung des Piezos. Darüber hinaus wären Modifikationen an der Flüssigkeitszelle notwendig, um die Anzahl der Peaks in

Abbildung 4.24 zu reduzieren.

4.2.4 Nanonadeln

Aus Abschnitt 2.3.1 geht hervor, dass Nanopartikel ohne die üblichen Transportmechanismen in Zellen eindringen können, wohingegen größere Teilchen nur durch Endocytose ins Zellinnere gelangen können. Ein Nachteil, der durch das Ankleben von Partikelaggregaten entsteht, liegt in der Geometrie der Spitze. Die Zellmembran ist weich und der Cantilever sinkt direkt nach dem Kontakt mehrere hundert nm in die Zelle ein. Dabei verformt sich die Membran und passt sich der Spitzenform an und die Kontaktfläche, die dabei entsteht, überschreitet die Abmessungen eines einzelnen Nanopartikels um ein Vielfaches.

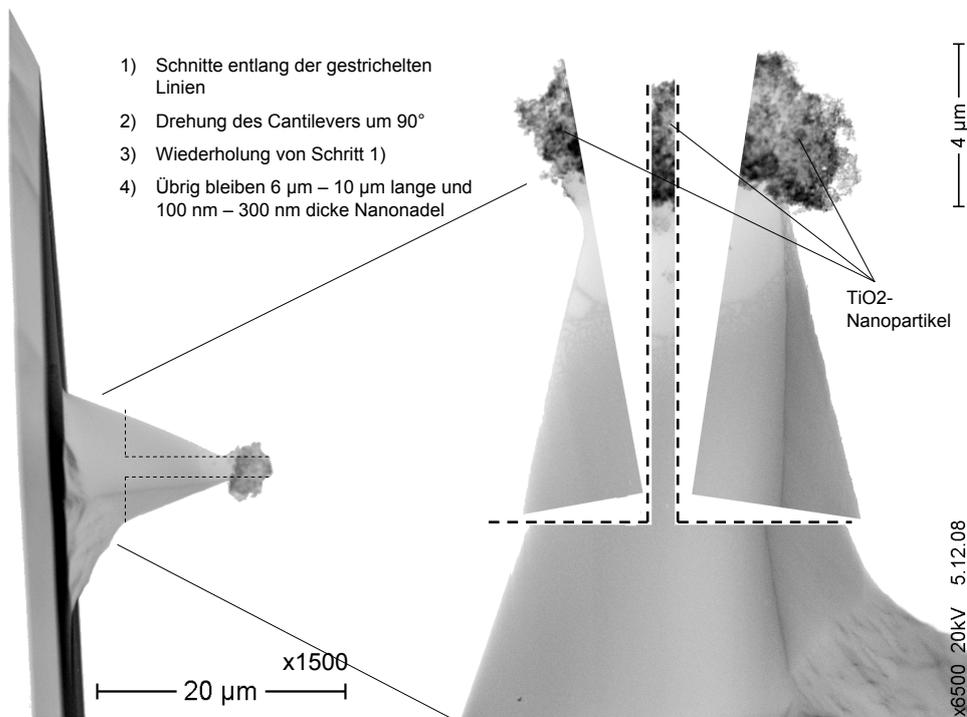


Abbildung 4.25: Immobilisieren eines TiO₂-Aggregats an einem Si-Cantilever und anschließendes Ätzen der Flanken mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls.

Obataya et al. haben Versuche mit Nanonadeln durchgeführt [57, 13]. Zur Herstellung der Nanonadeln werden aufgrund der besseren Leitfähigkeit dotierte Silizium-Cantilever verwendet. Die Spitzen der Kraftsensoren werden dann mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls (FIB) bearbeitet, was in Abbildung 4.25 dargestellt ist. Die auf diese Weise entstandenen Nanonadeln haben den Vorteil, dass die Kontaktfläche zur Zelle nicht wesentlich

größer werden kann, als die Grundfläche der Nadel. Aufgrund dieser Tatsache eignen sie sich besser als Modell eines einzelnen Nanopartikels. Im Vergleich zu normalen Cantilevern [58] reichen wesentlich kleinere Kräfte aus, um die Zellmembran zu durchdringen.

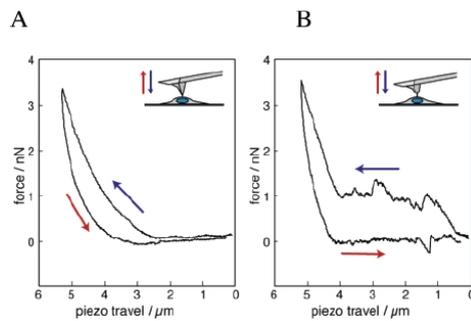


Abbildung 4.26: Vergleich von Kraftdistanzkurven auf Melanocyten mit (A) pyramidalen Cantilevern und (B) Nanonadeln [13].

Die Abbildung 4.26 zeigt die Unterschiede zwischen Kraftdistanzkurven, die mit Hilfe eines pyramidalen Cantilevers und im Vergleich dazu mit einer Nanonadel entstanden sind. Die Nanonadel dringt schon bei Kräften von ungefähr einem nN in die Zelle ein. Wird die Nadel weiter angenähert, ändert sich die Kraft erst wieder signifikant, wenn die wesentlich breitere Basis des Kraftsensors auf der Zellmembran aufliegt.

Experimente mit funktionalisierten Nanonadeln sind eine interessante Alternative zu den pyramidalen Cantilevern. Dazu muss jedoch erst das neue FIB an der Universität Bielefeld in Betrieb genommen werden und das Setup des MFP3Ds bedarf einiger Modifikationen, damit Messungen bei langen Kontaktzeiten möglich werden.

4.3 Untersuchungen an einfacheren Systemen

Um Kräfte zwischen unterschiedlich funktionalisierten Cantilevern messen und auswerten zu können, müssen sich einzelne Abrisse in den Kraftdistanzkurven bestimmten Ereignissen zuordnen lassen. Sind die Einflüsse des restlichen Systems genau bekannt und lassen sie sich klar von den gesuchten Wechselwirkungen abgrenzen, ist eine einfache Auswertung der Daten gewährleistet. Genau aus diesem Grund ist die Interpretation der Daten bei Messungen an lebenden Zellen schwierig. Die Zellen können sich während der Messung bewegen und dabei Geschwindigkeiten von $14,6 \mu\text{m}/\text{h}$ erreichen [59]. Je länger Cantilever und Zelle in Kontakt sind, desto größer sind die Einflüsse durch die Zellbewegung. Darüber hinaus sind die Cytoskelettstrukturen nicht homogen über die gesamte Zelle verteilt und die Membran ist mit Proteinen besetzt. Es handelt sich also um ein hoch komplexes Sys-

tem, das auf vielfältige Weise mit dem Kraftsensor wechselwirken kann. Um dieses zu vereinfachen, wurden Messungen an Lipiddoppelschichten durchgeführt.

4.3.1 Lipiddoppelschichten

Zur Herstellung von Lipiddoppelschichten wurden Lipidvesikel verwendet.⁹ Beim Spreiten auf einer hydrophilen SiO_2 -Oberfläche reißen die Vesikel ab einer kritischen Adhäsionskraft auf, fusionieren und bilden ausgedehnte Lipiddoppelschichten [60]. Abbildung 4.27 zeigt einen $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ großen Scanausschnitt einer Lipiddoppelschicht, der mit Hilfe eines AFMs abgebildet wurde. Es wird aber auch deutlich, dass nicht die gesamte Oberfläche

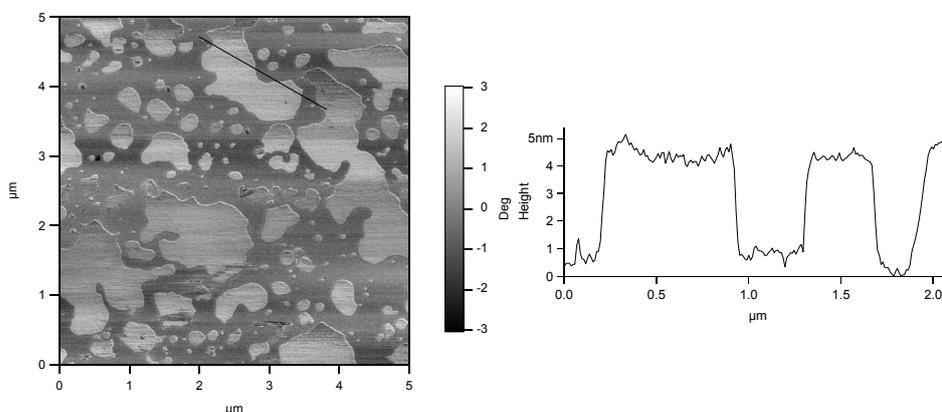


Abbildung 4.27: Das linke Bild zeigt das Phasensignal einer Lipiddoppelschicht auf SiO_2 . Der schwarze Balken gibt die Stelle für das Höhenprofil an, das auf der rechten Seite abgebildet ist.

mit einer Lipiddoppelschicht bedeckt ist. Für kraftspektroskopische Messungen ist es also wichtig, den zu untersuchenden Bereich abzubilden und anschließend nur an den Stellen, die mit Lipid bedeckt sind, Kraftdistanzkurven aufzunehmen. Mit den funktionalisierten Veeco NP Kraftsensoren sind nur Scans im Contact-Mode möglich. Eine Lipiddoppelschicht lässt sich allerdings nur im Tapping-Mode abbilden, d.h. eine Unterscheidung, ob kraftspektroskopische Messungen auf einer Lipiddoppelschicht, Vesikeln, Siliziumoxid oder Verunreinigungen durchgeführt wurden, ist nur mit Hilfe der Kraftdistanzkurven möglich. Bei einem großen trigger point (hier: 3 nN) lassen sich Durchstiche beobachten. Liegen diese im Bereich von 4,5 nm, ist anzunehmen, dass die Messung auf einer Lipiddoppelschicht durchgeführt

⁹Lipidgemisch von DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) und DOPS (dioleoylphosphatidylserine) im Verhältnis 2:1. Eine Stammlösung enthält 15 mg/ml des Lipidgemischs in einem Puffer, der aus HEPES (10 mM), NaCl (100 mM) und CaCl_2 (2 mM) besteht.

wurde, da deren Dicke gerade in diesem Bereich liegt [61]. Als weiterer Anhaltspunkt kann die Adhäsion bei Force Volume Messungen dienen. Andre et al. haben gezeigt, dass die Adhäsion in Bereichen, die mit einer Lipiddoppelschicht bedeckt sind, größer ist als auf Siliziumoxid [62]. Erste Messungen im Force Volume Mode mit einem großen trigger point bestätigen dieses Ergebnis. Abbildung 4.28 zeigt dieses Verhalten. Die helleren Gebiete reprä-

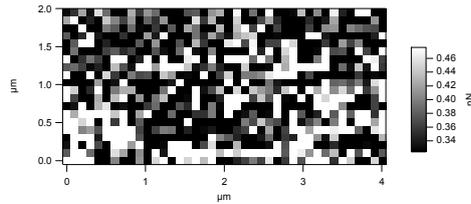


Abbildung 4.28: Adhäsionskarte für 40×20 Datenpunkte und einen Scanbereich von $4 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$.

sentieren Bereiche größerer Adhäsion, bei denen es sich wahrscheinlich um Lipiddoppelschichten handelt. Die Zunahme der Adhäsion lässt sich dabei durch das Eintauchen und die anschließenden Wechselwirkungen zwischen der Lipidschicht und dem Cantilever erklären. Für eine verlässliche und automatische Auswertung ist jedoch eine Anpassung der Auswertsoftware erforderlich oder alternativ die Funktionalisierung von Cantilevern, die weich genug sind, um kraftspektroskopische Messungen durchführen zu können, aber gleichzeitig Abbildungen im Tapping-Mode erlauben.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Die Grundvoraussetzung, um Bindungskräfte und Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Zellen untersuchen zu können, war die Anbindung der Partikel an Kraftsensoren. Dieses Problem konnte mit der von Ong et al. beschriebenen Methode gelöst werden, bei der kleine Aggregate des zu untersuchenden Materials mit Hilfe eines Epoxidharz-Klebers an Cantilevern immobilisiert werden [12]. Der Nachweis, ob der Apex aus einem einzelnen Primärpartikel besteht und somit für Messungen der Nanopartikel-Zell-Wechselwirkungen geeignet ist, kann dabei mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und eines inversen Gitters erfolgen.

Mit einer selbst geschriebenen Software konnten die Bindungskräfte zwischen lebenden Zellen und Metalloxid-Nanopartikeln miteinander verglichen und ausgewertet werden. Dabei hat sich gezeigt, dass alle untersuchten Partikel, abhängig von der Kontaktfläche und der Kontaktzeit zur Zelle, unspezifisch an Teile der Membran binden. Dadurch kommt es zur Membran-Tetherbildung, die für charakteristische Abrisskräfte im Bereich von 40 pN verantwortlich ist. Darüber hinaus haben Experimente mit einem großen Scanbereich ($40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$) gezeigt, dass mit Hilfe des Höhsignals bei kraftspektroskopischen Messungen die Umrisse einzelner Zellen sowie deren Zellkerne aufgelöst werden können, diese Bereiche in einer Adhäsionskarte aber nicht sichtbar sind.

Die Messungen der Eintauchtiefen haben ergeben, dass alle funktionalisierten Cantilever direkt nach dem Kontakt mit einer lebenden Zelle ca. 500 nm tief in diese einsinken, die Eintauchgeschwindigkeit aber mit zunehmender Kontaktzeit kleiner wird. Es wurde jedoch auch deutlich, dass diese Experimente hohe Anforderungen an das AFM stellen und eine Drift, verursacht durch die Erwärmung des z-Piezos während des Betriebs, insbesondere bei langen Kontaktzeiten eine große Fehlerquelle darstellt.

Es bleibt festzuhalten, dass weder durch die Anzahl der Bindungen, noch

durch die Abrisskräfte oder Eintauchtiefen eine Unterscheidung der verwendeten Nanopartikel möglich ist. Das liegt zum einen an den ähnlichen Eigenschaften der Metalloxid-Partikel und zum anderen an den großen und unkalkulierbaren Einflüssen der lebenden Zellen auf die Messungen. Eine sichere Unterscheidung zwischen Zell-spezifischen und Partikel-spezifischen Ereignissen ist deshalb nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das komplexe System einer lebenden Zelle vereinfacht, indem Versuche an fixierten Zellen durchgeführt wurden. Das fast vollständige Fehlen von Tetherabrissen sowie das Auftreten von kovalenten Bindungen lässt jedoch darauf schließen, dass der Kraftsensor nach der Fixierung der Zelle (0,5% Glutardialdehyd) nicht mehr mit der Zellmembran wechselwirkt.

Einen weiteren Ansatz, das zu untersuchende System zu vereinfachen, bieten Lipiddoppelschichten. Diese wurden erfolgreich durch das Spreiten von Vesikeln hergestellt. Mit den funktionalisierten Cantilevern war es jedoch nicht möglich, die Lipidschicht abzubilden. Deshalb konnten nur die Kraftdistanzkurven selber Hinweise dafür liefern, ob Messungen auf Siliziumoxid, Lipid, Vesikeln oder Verunreinigungen durchgeführt wurden. Die Auswertsoftware dahingehend anzupassen, dass diese Unterscheidung automatisch möglich ist, geht genauso wie weiterführende Experimente zu den Eintauchtiefen der Kraftsensoren in lebende Zellen über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Diese Versuche erfordern zuerst eine Anpassung des Setups, insbesondere des Petri Dish Heaters, um die Probleme mit der Drift zu beseitigen. Sollte das erreicht sein, bieten die Nanonadeln aufgrund ihrer wesentlich kleineren Kontaktfläche zur Zelle eine interessante Ergänzung zu den bereits bestehenden Messergebnissen.

Literaturverzeichnis

- [1] BINNIG, G., C. F. QUATE und CH. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Phys. Rev. Lett., 56(9):930–933, März 1986.
- [2] ALBRECHT, T. R., S. AKAMINE, T. E. CARVER und C. F. QUATE: *Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope*. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 8(4):3386–3396, 1990.
- [3] PROKSCH, R., T. E. SCHAFFER, J. P. CLEVELAND, R. C. CALLAHAN und M. B. VIANI: *Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration*. Nanotechnology, 15(9):1344–1350, 2004.
- [4] HEIM, L.-O., M. KAPPL und H.-J. BUTT: *Tilt of Atomic Force Microscope Cantilevers: Effect on Spring Constant and Adhesion Measurements*. Langmuir, 20(7):2760–2764, 2004.
- [5] ALBERTS, BRUCE, ALEXANDER JOHNSON und JULIAN LEWIS: *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH, 2004.
- [6] POLLARD, THOMAS D. und WILLIAM C. EARNSHAW: *Cell Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [7] MÜHLENWEG, HEIKE; ZIMMERMANN, GUIDO: *Gasphasenreaktionen ermöglichen*. degussa ScienceNewsletter, 2004.
- [8] PARK, EUN-JUNG, JINHEE CHOI, YOUNG-KWON PARK und KWANGSIK PARK: *Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells*. Toxicology, 245(1-2):90–100, März 2008.
- [9] SCHULZE, CHRISTINE, ALEXANDRA KROLL, CLAUS-MICHAEL LEHR, ULRICH F. SCHÄFER, KARSTEN BECKER, JÜRGEN SCHNEKENBURGER, CHRISTIAN SCHULZE ISFORT, ROBERT LANDSIEDEL und WENDEL WOHLLEBEN: *Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media*. Nanotoxicology, 2(2):51–61, 2008.

-
- [10] ASYLUM RESEARCH: *MFP-3D Manual*. Version 04_08.
- [11] BUDGET SENSORS, [www.budgetsensors.com/downloads/Tap300_Data sheet.pdf](http://www.budgetsensors.com/downloads/Tap300_Data_sheet.pdf): *AFM probe Model: Tap300*.
- [12] ONG, QUY K. und IGOR SOKOLOV: *Attachment of nanoparticles to the AFM tips for direct measurements of interaction between a single nanoparticle and surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 310(2):385–390, Juni 2007.
- [13] OBATAYA, IKUO, CHIKASHI NAKAMURA, HAN, NORIYUKI NAKAMURA und JUN MIYAKE: *Nanoscale Operation of a Living Cell Using an Atomic Force Microscope with a Nanoneedle*. Nano Letters, 5(1):27–30, 2005.
- [14] *Sicherheit der Nanotechnologie*. Themenreihe NanoBioNet, Band 2.
- [15] BUTT, H.-J., B. CAPPELLA und M. KAPPL: *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surface Science Reports, 59:1–152, 2005.
- [16] GROSS, D., W. HAUGER, J. SCHRÖDER und W. A. WALL: *Technische Mechanik 2*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [17] CLEVELAND, J. P., S. MANNE, D. BOCEK und P. K. HANSMA: *A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy*. Review of Scientific Instruments, 64(2):403–405, 1993.
- [18] BONACCURSO, E. und H.-J. BUTT: *Microdrops on Atomic Force Microscope Cantilevers: Evaporation of Water and Spring Constant Calibration*. J. Phys. Chem. B, 109(1):253–263, 2005.
- [19] SADER, JOHN E., JAMES W. M. CHON und PAUL MULVANEY: *Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers*. Review of Scientific Instruments, 70(10):3967–3969, 1999.
- [20] HUTTER, JEFFREY L. und JOHN BECHHOEFER: *Calibration of atomic-force microscope tips*. Review of Scientific Instruments, 64(7):1868–1873, 1993.
- [21] BUTT, H. J. und M. JASCHKE: *Calculation of thermal noise in atomic force microscopy*. Nanotechnology, 6(1):1–7, 1995.
- [22] LEVY, R. und M. MAALOU: *Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods*. Nanotechnology, 13(1):33–37, 2002.

- [23] STARK, ROBERT W., TANJA DROBEK und WOLFGANG M. HECKL: *Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy*. Ultramicroscopy, 86(1-2):207–215, Januar 2001.
- [24] EDWARDS, SCOTT A., WILLIAM A. DUCKER und JOHN E. SADER: *Influence of atomic force microscope cantilever tilt and induced torque on force measurements*. Journal of Applied Physics, 103(6):064513, 2008.
- [25] BALDA, MARIA S. und KARL MATTER: *Tight junctions at a glance*. J Cell Sci, 121(22):3677–3682, 2008.
- [26] HERTZ, H.: *Über die Berührung fester elastischer Körper*. Journal für die reine und angewandte Mathematik, 92:156–171, 1881.
- [27] BILODEAU, G. G.: *Regular Pyramid Punch Problem*. Journal of Applied Mechanics, 59(3):519–523, 1992.
- [28] RICO, FELIX, PERE ROCA-CUSACHS, NURIA GAVARA, RAMON FARRE, MAR ROTGER und DANIEL NAVAJAS: *Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips*. Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics), 72(2):021914, 2005.
- [29] LEONENKO, ZOYA, ERIC FINOT und MATTHIAS AMREIN: *Adhesive interaction measured between AFM probe and lung epithelial type II cells*. Ultramicroscopy, 107(10-11):948–953, Oktober 2007.
- [30] FLEISCHER, T. und C. QUENDT: *Unsichtbar und unendlich - Bürgerperspektiven auf Nanopartikel*. Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft, 2007.
- [31] MÜHLENWEG, HEIKE: *Special effects from nanostructured materials*. Speciality Chemicals Magazine, 2005.
- [32] KREYLING, W.G., M. SEMMLER, F. ERBE, P. MAYER, S. TAKENAKA, H. SCHULZ, G. OBERDORSTER und A. ZIESENIS: *Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low*. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 65:1513–1530(18), 12 October 2002.
- [33] GEISER, M., B. ROTHEN-RUTISHAUSER, N. KAPP, S. SCHÜRCH, W. KREYLING, H. SCHULZ, M. SEMMLER, V. IM HOF, J. HEYDER und P. GEHR: *Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells*. Environmental Health Perspectives, 113:1555–1560, 2005.

- [34] OBERDÖRSTER, G., Z. SHARP, V. ATUDOREI, A. ELDER, R. GELEIN und W. KREYLING: *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. *Inhal Toxicol*, 16:437–445, 2004.
- [35] PATIL, SWANAND, AMANDA SANDBERG, ERIC HECKERT, WILLIAM SELF und SUDIPTA SEAL: *Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential*. *Biomaterials*, 28(31):4600–4607, November 2007.
- [36] LORENZ, MYRIAM RICARDA, VERENA HOLZAPFEL, ANNA MUSYANOVYCH, KARIN NOTHELPER, PAUL WALTHER, HENDRIK FRANK, KATHARINA LANDFESTER, HUBERT SCHREZENMEIER und VOLKER MAILÄNDER: *Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells*. *Biomaterials*, 27(14):2820–2828, Mai 2006.
- [37] OBERDÖRSTER, G., E. OBERDÖRSTER und J. OBERDÖRSTER: *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. *Environmental Health Perspectives*, 113, 2005.
- [38] SCHUBERT, DAVID, RICHARD DARGUSCH, JOAN RAITANO und SIU-WAI CHAN: *Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1):86–91, März 2006.
- [39] VEECO INSTRUMENTS, www.veecoprobes.com/p-3369-np.aspx: *NP - Cantilever Specification*.
- [40] LANDSIEDEL, R., H. HISGEN, A. HÜNER, J. KÖHLER und S. ZOK: *Ansetzen von Suspensionen aus nanoskaligen Materialien für biologische Testung*. *NanoCare*, 2007.
- [41] UHU: *UHU plus endfest 300*. www.uhu.de.
- [42] ATCC: *RLE-6TN (Product Description)*. www.lgcstandards-atcc.org.
- [43] WILLCO WELLS: *WillCo-dish*. www.willcowells.com.
- [44] SIGMA-ALDRICH: *RPMI Media*. www.sigmaaldrich.com.
- [45] SOKOLOV, IGOR, QUY K. ONG, HASAN SHODIEV, NINA CHECHIK, DAVID JAMES und MIKE OLIVER: *AFM study of forces between silica, silicon nitride and polyurethane pads*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300(2):475–481, August 2006.
- [46] GOUY, M.: *Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte*. *Journal de Physique Théorique et Appliquée*, 9(1):457–468, 1910.

- [47] CHAPMAN, D. L.: *A contribution to the theory of electrocapillarity*. Philosophical Magazine, 25:475–481, 1913.
- [48] ADAM, G., P. LÄUGER und G. STARK: *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Berlin Heidelberg, Vierte, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage Auflage, 2003.
- [49] CEROVIC, LJILJANA S., SLOBODAN K. MILONJIC, DJAMILA BAHLOUL-HOURLIER und BENOIT DOUCEY: *Surface properties of silicon nitride powders*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 197(1-3):147–156, Februar 2002.
- [50] HEINZ, WILLIAM F. und JAN H. HOH: *Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope*. Trends in Biotechnology, 17(4):143–150, April 1999.
- [51] SIRGHI, L., J. PONTI, F. BROGGI und F. ROSSI: *Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation*. European Biophysics Journal, 37(6):935–945, Juli 2008.
- [52] SUN, MINGZHAI, JOHN S. GRAHAM, BALAZS HEGEDÜS, FRANÇOISE MARGA, YING ZHANG, GABOR FORGACS und MICHEL GRANDBOIS: *Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy*. Biophysical Journal, 89(6):4320–4329, Dezember 2005.
- [53] RAUCHER, DRAZEN und MICHAEL P. SHEETZ: *Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension*. Biophysical Journal, 77(4):1992–2002, Oktober 1999.
- [54] DAI, JIANWU, MICHAEL P. SHEETZ, XIAODONG WAN und CATHERINE E. MORRIS: *Membrane Tension in Swelling and Shrinking Molluscan Neurons*. J. Neurosci., 18(17):6681–6692, 1998.
- [55] SHEETZ, MICHAEL P. und JIANWU DAI: *Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension*. Trends in Cell Biology, 6(3):85–89, März 1996.
- [56] AFRIN, REHANA, TAKAFUMI YAMADA und ATSUSHI IKAI: *Analysis of force curves obtained on the live cell membrane using chemically modified AFM probes*. Ultramicroscopy, 100(3-4):187–195, August 2004.
- [57] OBATAYA, IKUO, CHIKASHI NAKAMURA, SUNGWOONG HAN, NORIYUKI NAKAMURA und JUN MIYAKE: *Mechanical sensing of the penetration of various nanoneedles into a living cell using atomic force microscopy*. Biosensors and Bioelectronics, 20(8):1652–1655, Februar 2005.
- [58] HATEGAN, ALINA, RICHARD LAW, SAMUEL KAHN und DENNIS E. DISCHER: *Adhesively-Tensed Cell Membranes: Lysis Kinetics and Atomic Force Microscopy Probing*. Biophys. J., 85(4):2746–2759, 2003.

- [59] HAGA, HISASHI, CHIKAKO IRAHARA, RYO KOBAYASHI, TOSHIYUKI NAKAGAKI und KAZUSHIGE KAWABATA: *Collective Movement of Epithelial Cells on a Collagen Gel Substrate*. Biophys J., 88:2250, 2005.
- [60] STEINEM, CLAUDIA und ANDREAS JANSHOFF: *Modellmembranen auf Oberflächen. Verankert und doch mobil*. Chemie in unserer Zeit, 42(2):116–127, 2008.
- [61] GARCIA-MANYES, SERGI, GERARD ONCINS und FAUSTO SANZ: *Effect of Ion-Binding and Chemical Phospholipid Structure on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy*. 89(3):1812–1826, September 2005.
- [62] ANDRE, GUILLAUME, ROBERT BRASSEUR und YVES F. DUFRÊNE: *Probing the interaction forces between hydrophobic peptides and supported lipid bilayers using AFM*. Journal of Molecular Recognition, 20(6):538–545, 2007.

Anhang A

IGOR Programm-Code

A.1 Auswertung von Abrisskräften

```
#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.
#include " :AsylumResearch:Code3D:Initialization "
#include <ProcedureBrowser>

StartMeUp()

//Name der Funktion und Definition der zugehörigen Parameter. Diese
//beschreiben v.l.: Anzahl der auszuwertenden Kraftdistanzkurven,
//minimale Kraft die detektiert wird [pN], minimale Steigung die zur
//Detektion führt, Steigung am Ende eines Abrisses, bei Add = 1 wird
//für jeden Punkt nach einem Abriss überprüft, ob minAbbruch unter-
//schritten ist, ansonsten werden Punkte übersprungen.
Function Abrisse (index, minF, minSteig, minAbbruch, Add)

Variable index
Variable minF
Variable minSteig
Variable minAbbruch
Variable Add

Variable y
y = 0
KillWaves/Z w, W_FindLevels, w_dif, w_dif2, w_smoth, ZAbrisse1, ZAbrisse2, ZAbrisse3,
ZAbrisse4, ZAbrisse5, ZAbrisse6, ZAbrisse7, ZAbrisse8, ZAbrisse9, ZAbrisse10,
ZAbrisse11, ZAbrisse12, ZAbrisse13, ZAbrisse14, ZAbrisse15, ZAbrisse16,
ZAbrisse17, ZAbrisse18, ZAbrisse19, ZAbrisse20, ZAbrisse21

//Einlesen und sortieren der Kraftdistanzkurven:
String MeineListe=WaveList("*,*;","")
String MeineListe2
MeineListe2 = SortList(MeineListe, ";", 0)
String CurrentWave, CurrentWave2
Make/N=0 ZAbrisse1, ZAbrisse2, ZAbrisse4, ZAbrisse6, ZAbrisse8, ZAbrisse10,
ZAbrisse12, ZAbrisse14, ZAbrisse16, ZAbrisse18
Variable indexy
indexy = 0

//Schleife, die für jede Kraftdistanzkurve durchlaufen wird:
do

CurrentWave = StringFromList(indexy, MeineListe2)
if (y==index)
    Edit ZAbrisse21
    //In ZAbrisse21 werden alle Abrisse gespeichert

    //Erstellen eines Histogramms
    Make/N=25/O ZAbrisse21_Hist; DelayUpdate
    Histogram/B=1 ZAbrisse21, ZAbrisse21_Hist; DelayUpdate
    Display ZAbrisse21_Hist
    ModifyGraph mode=5, usePlusRGB=1, hbFill=5, toMode=1, rgb=(0,0,0),
    plusRGB=(0,0,0)
    //Legende im Histogramm:
    Variable legende, anzahl
    WaveStats /Q/Z ZAbrisse21
    legende = sum(ZAbrisse21)/V_npnts
```

```

anzahl=V_npnts

Print Anzahl
Printf"x0 = ";Print legende
String eee,fff,ggg
eee = num2str(legende)
fff = num2str(anzahl)
ggg = num2str(index)

TextBox/C/N=text0/B=1 ggg + " Kraftdistanzkurven: \r\r
Abrisse: " + fff + "\r F0 = " + eee

break
endif

//Einlesen einer einzelnen Kraftdistanzkurve
wave w = $CurrentWave
Duplicate/O w, w_smth
//Glätten der Kurve, um Rauschen zu verkleinern
Smooth 10, w_smth
//Differentiation der Funktion w_smth:
Differentiate w_smth/D=w_dif

//Finden der Maxima in w_smth:
FindLevels/Q/P/N=10/M=0.005 w_dif, minSteig*10^-9
// M=0.05 entspricht ca 0.17um im ForceGraph
Duplicate/O W_FindLevels, xpeaks
Variable a1,b1,c1,d1,e1,f1,a2,b2,c2,d2,e2,f2,a3,b3,c3,d3,e3,f3,a4,b4,c4,
d4,e4,f4,a5,b5,c5,d5,e5,f5,a6,b6,c6,d6,e6,f6,a7,b7,c7,d7,e7,f7,
a8,b8,c8,d8,e8,f8,a9,b9,c9,d9,e9,f9,a10,b10,c10,d10,e10,f10

//Es werden höchstens 10 Maxima bestimmt und gespeichert:
a1 = xpeaks [0] ;
a2 = xpeaks [1] ;
a3 = xpeaks [2] ;
a4 = xpeaks [3] ;
a5 = xpeaks [4] ;
a6 = xpeaks [5] ;
a7 = xpeaks [6] ;
a8 = xpeaks [7] ;
a9 = xpeaks [8] ;
a10 = xpeaks [9] ;
KillWaves W_FindLevels, xpeaks

//Untersuchung des 1. Maximums:
//Funktionswert an der Stelle x = a1:
c1=w[a1]
d1=a1+Add
b1 = 1
//Schleife wird durchlaufen, bis die Steigung minAbbruch unterschritten
//wird oder eine maximale Abrisslänge erreicht ist.
do
    if(w_dif[d1]<minAbbruch*10^-9 || (d1-a1) > 199 || b1 >100)
        break
    endif
    d1+=Add
    b1 += 1
while(1)
e1=w[d1]
f1=e1-c1
//Hat eine Welle x Punkte erhalten alle Punkte y > x den Funktionswert
//von x.
//Der Force Volume Mode führt oft zu einem Anzeigefehler mit großer
//Steigung (am Ende der Rückzugsbewegung). Ändern sich die Funktions-
//werte nach einem Abriss nicht mehr, weil y > x gilt, wird der Abriss
//verworfen.
if((f1)>minF*10^(-12) && w[d1] != w[d1+10] && w[d1+30] != w[d1+20])
    //ZAbrissel speichert den ersten Abriss, wenn dieser größer ist,
    //als die minimale Kraft, die detektiert werden soll.
    ZAbrisse1 = {f1}
endif

//Untersuchung des 2. Maximums:
c2=w[a2]
d2=a2+Add
b2 = 1
do
    if(w_dif[d2]<minAbbruch*10^-9 || (d2-a2) > 199 || b2 >100)
        break
    endif
    d2+=Add
    b2 +=1
while(1)
e2=w[d2]

```

```

//Die folgende Bedingung verhindert, dass ein 2.Abriss noch innerhalb
//des 1.Abrisses detektiert wird:
if(a2 < d1)
    c2=w[d2]
endif
f2=e2-c2
if((f2)>minF*10(-12) && w[d2] != w[d2+10] && w[d2+30] != w[d2+20])
    ZAbrisse2 = {f2}
    //Wenn das 2.Maximum ebenfalls ein Abriss ist, bildet ZAbrisse3
    //die Vereinigung des 1. und 2.Abrisses:
    if(c2!=c1 && c2!=0)
        Concatenate/O/NP {ZAbrisse1,ZAbrisse2}, ZAbrisse3
    else
        //Entspricht das 2.Maximum nicht den Kriterien für einen Abriss
        //wird in ZAbrisse3 nur der 1.Abriss gespeichert
        //(falls dieser existiert):
        Make/O/N=0 ZAbrisse3
        if((f1)>minF*10(-12))
            ZAbrisse3 = {f1}
        endif
    endif
else
    //Gibt es noch keinen Abriss wird ZAbrisse3 erstellt,
    //speichert aber keinen Wert:
    Make/O/N=0 ZAbrisse3
    if((f1)>minF*10(-12) && w[d2] != w[d2+10]
        && w[d2+30] != w[d2+20])
        ZAbrisse3 = {f1}
        //Print f1
    endif
    //ZAbrisse3 = {f1}
endif

//Untersuchung des 3.Maximums:
c3=w[a3]
d3=a3+Add
b3 = 1
do
    if(w_dif[d3]<minAbbruch*10-9 || (d3-a3) > 199 || b3 > 100)
        break
    endif
    d3+=Add
    b3 +=1
while(1)
e3=w[d3]
if(a3 < d2)
    c3=w[d3]
endif
f3=e3-c3
//In ZAbrisse5 werden alle Maxima gespeichert, die bis zu
//diesem Zeitpunkt existieren:
if((f3)>minF*10(-12) && w[d3] != w[d3+10]
    && w[d3+30] != w[d3+20])
    ZAbrisse4 = {f3}
    if(c3!=c2 && c3!=0)
        Concatenate/O/NP {ZAbrisse3,ZAbrisse4},ZAbrisse5
    else
        Duplicate/O ZAbrisse3, ZAbrisse5
    endif
else
    Duplicate/O ZAbrisse3, ZAbrisse5
endif

[...]

//Untersuchung des 10. Maximums:
c10=w[a10]
d10=a10+Add
b10 = 1
do
    if(w_dif[d10]<minAbbruch*10-9 || (d10-a10) > 199 || b10>100)
        break
    endif
    d10+=Add
    b10+=1
while(1)
e10=w[d10]
if(a10 < d9)
    c10=w[d10]
endif
f10=e10-c10
//ZAbrisse19 enthält alle Abrisse der aktuellen

```

```

//Kraftdistanzkurve:
if ((f10)>minF*10-12 && w[d10] != w[d10+10]
    && w[d10+30] != w[d10+20])
    ZAbrisse18 = {f10}
    if (c10!=c9 && c10!=0)
        Concatenate/O/NP {ZAbrisse17, ZAbrisse18},
            ZAbrisse19
    else
        Duplicate/O ZAbrisse17, ZAbrisse19
    endif
else
    Duplicate/O ZAbrisse17, ZAbrisse19
endif

//Die Abrisse der einzelnen Kraftdistanzkurven (ZAbrisse19)
//werden vereinigt und in ZAbrisse21 gespeichert:
Make/N=0/O ZAbrisse20
Concatenate {ZAbrisse19, ZAbrisse20}, ZAbrisse21
KillWaves/Z ZAbrisse20
y+=1
//Die Variable indexy ist für den Übergang zur nächsten Kraft-
//distanzkurve verantwortlich. Eine Erhöhung um 2 ist erforder-
//lich, da die Verbiegung des Cantilevers und die Kräfte
//separat gespeichert werden.
indexy += 2
while (1)
End

```

A.2 Auswertung von Eintauchtiefen

```

#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.
#include "AsylumResearch:Code3D:Initialization"
#include <ProcedureBrowser>

StartMeUp()

//index gibt die Zahl der auszuwertenden Kraftdistanzkurven an:
Function Indentcalc (index)

Variable index

Variable y
y = 0

KillWaves/Z Histo, DupHisto, DupHisto2, w, Histo_Hist, fit_Histo_Hist
//Einlesen und sortieren der Kraftdistanzkurven:
String MeineListe=WaveList("*,",",",",")
String MeineListe2
MeineListe2 = SortList(MeineListe, ",",0)
String CurrentWave, CurrentWave2
Wave Histo
Make/N=0 Histo

Variable indexy
indexy = 2

//Schleife, die für jede Kraftdistanzkurve durchlaufen wird:
do
//In der Kontaktzeit zwischen Cantilever und Probe werden zwei
//Datenreihen gespeichert (Dwell towards + Dwell away):
CurrentWave = StringFromList(indexy, MeineListe2)
CurrentWave2 = StringFromList(indexy+1, MeineListe2)

//Abbruchbedingung für die Schleife
if (y==index)
//Erstellen eines Histogramms:
Edit Histo
Make/N=25/O Histo_Hist; DelayUpdate
Histogram/B=1 Histo, Histo_Hist; DelayUpdate
Display Histo_Hist
ModifyGraph mode=5, toMode=1
ModifyGraph usePlusRGB=1, hbFill=5, rgb=(0,0,0), plusRGB=(0,0,0)
Variable legende
legende = sum(Histo)/index
Printf"x0 = "; Print legende
String eee, fff
eee = num2str(legende)
fff = num2str(index)

```

```

        TextBox/C/N=text0/B=1 fff +
            * Kraftdistanzkurven: \r\r x0 = " + eee

        break
    endif

    wave w = $CurrentWave
    wave v = $CurrentWave2

    //Vereinigung von Dwell towards + Dwell away zu einer Welle:
    Concatenate/NP/O{v,w},vw
    WaveStats/Q vw
    Variable dif, dir_of_ind

    //Die Variable dif gibt die Strecke an, die der Cantilever während der
    //Kontaktzeit zurückgelegt hat:
    dif = V_max - V_min
    //Die Variable dir_of_ind gibt an, in welche Richtung sich der Cantilever
    //bewegt hat:
    dir_of_ind = V_maxloc - V_minloc

    if (dir_of_ind < 0)
        dif = dif * (-1)
    endif

    //Zusammenfügen der Ergebnisse jeder einzelnen Kraftdistanzkurve zu
    //einer einzigen Welle
    Duplicate Histo, DupHisto
    Histo = {dif}
    Concatenate {Histo,DupHisto}, DupHisto2
    KillWaves Histo
    Duplicate/O DupHisto2 , Histo

    y+=1
    indexy += 4
while (1)
End

```


Anhang B

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Dario Anselmetti, der es mir ermöglicht hat, diese Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ zu schreiben. Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Günter Reiss, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit als zweiter Gutachter zu bewerten.

Darüber hinaus möchte ich ganz besonders Dr. Katja Tönsing sowohl für die Betreuung während des letzten Jahres als auch für viele gute Ratschläge und Hinweise danken. Bei Daniel Wesner möchte ich mich zusätzlich für die Einweisungen an Laborgeräten und insbesondere für die Kultivierung der lebenden Zellen bedanken. Christoph Pelargus danke ich für die Unterstützung bei allen technischen Problemen, insbesondere im Bereich der Rasterelektronenmikroskopie, Volker Walthorn für hilfreiche Diskussionen über die Kraftspektroskopie und Matthias Schürmann für die Hilfe bei der Präparation von Lipiddoppelschichten.

Mein Dank gilt weiter der ganzen Abteilung für das angenehme Arbeitsklima und besonders meinen Bürokollegen für hilfreiche Diskussionen und bei der Unterstützung mit L^AT_EX.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums danken und ganz besonders meiner Freundin Anja Katharina Heidkemper, die mir über manches Stimmungstief hinweggeholfen hat.