

Chemische Analyse tierischer Zellen und ihrer intrazellulären Kompartimente durch 3D-Massenspektrometrie**

Daniel Breitenstein, Christina E. Rommel, Rudolf Möllers, Joachim Wegener* und Birgit Hagenhoff

Experimentelle Methoden, die eine ortsaufgelöste chemische Analyse tierischer Zellen ermöglichen, sind für zahlreiche Bereiche der biomedizinischen Forschung von großem Interesse. Die dreidimensionale Mikrostrukturanalyse mit Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS) ist eine vergleichsweise junge Technik, mit deren Hilfe sich nun die molekulare Zusammensetzung biologischer Proben aufdecken lässt. In der Sekundärionenmassenspektrometrie wird die Probenoberfläche mit Primärionen beschossen, die beim Auftreffen auf die Probe eine Stoßkaskade auslösen. Ein Teil der Kollisionsenergie wird zur Oberfläche zurückgeleitet und verursacht die Desorption von elektrisch neutralen und geladenen chemischen Spezies, die im zweiten Fall als Sekundärionen bezeichnet werden. Diese können nachfolgend in Bezug auf ihr Masse/Ladungs-Verhältnis massenspektrometrisch analysiert werden.^[1]

Heutzutage sind die meisten SIMS-Instrumente, die für die Detektion organischer Substanzen verwendet werden, mit einem Flugzeitdetektor ausgestattet.^[2] Die ToF-SIMS ermöglicht die parallele Detektion sämtlicher Elemente und kleiner organischer Moleküle mit einer Empfindlichkeit im ppm/Femtomol-Bereich.^[3] Durch Abrastern der Probenoberfläche mit dem Primärionenstrahl lässt sich eine zweidimensionale Abbildung der chemischen Oberflächenzusammensetzung generieren. Des Weiteren kann durch anhaltenden Beschuss einer konstanten Probenposition ein Sputter-Abtrag von Material herbeigeführt werden. Über eine massenspektrometrische Analyse des erodierten Materials lässt

sich somit auf die vertikale Probenzusammensetzung rückschließen.^[1] Die laterale Verteilung organischer Oberflächenbestandteile kann mit den heute verfügbaren Geräten mit einer Auflösung zwischen 150 und 400 nm abgebildet werden,^[4-6] während in Untersuchungen an Polymerfilmen bereits eine vertikale Auflösung von 30 nm erzielt werden konnte.^[7]

Bislang wurde die Analyse biologischer Proben – wie Zellen oder Gewebe – durch die geringen Signalintensitäten und die mit der Sputter-Erosion einhergehende partielle Zerstörung organischer Moleküle unterhalb der Oberfläche limitiert. Die niedrigen Signalintensitäten und der Verlust der molekularen Information bei der Tiefenprofilierung konnten mittlerweile durch den Einsatz polyatomarer Primärionen wie etwa Au_3^+ oder Bi_3^+ überwunden werden.^[3,8] Eine weitere Verbesserung der Tiefenprofilierung brachte der Einsatz von Buckminster-Fullerenen als Sputter-Ionenspezies mit sich.^[9] So konnte nachgewiesen werden, dass der Einschlag eines C_{60}^+ -Ions weniger Zerstörung der organischen Struktur verursacht, als dies etwa bei den traditionellen Sputter-Ionen O_2^+ oder Cs^+ der Fall ist.^[10] Bei Sputter-Erosion mit C_{60}^+ bleiben zumindest einige organische Moleküle vollständig intakt nachweisbar.^[11]

Ziel der hier vorgestellten Studie war es somit, den molekularen Aufbau einer tierischen Zelle in drei Dimensionen massenspektrometrisch zu rekonstruieren. Dabei wurde die Probenoberfläche zunächst einer SIMS-Analyse unterzogen, bevor durch Sputter-Erosion eine dünne Probenschicht abgetragen und somit eine tiefere Probenschicht freigelegt und einer erneuten SIMS-Analyse zugänglich gemacht wurde. Die Wiederholung alternierender SIMS- und Sputter-Zyklen liefert schließlich eine vollständige massenspektrometrische Analyse der Probe (ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse). In einem Zweistrahlexperiment wurden Bi_3^+ -Primärionen zur abbildenden Analyse der chemischen Oberflächenzusammensetzung sowie C_{60}^+ -Ionen für den zwischenzeitlichen Sputter-Abtrag verwendet.^[12]

Im Rahmen dieser Studie wurden sechs konfluente Zellschichten der Epithelzelllinie NRK (normal rat kidney) zunächst unter herkömmlichen Zellkulturbedingungen auf Deckgläsern kultiviert und dann nach chemischer Fixierung einer ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse unterzogen. Die chemische Fixierung dient der Strukturerhaltung der Probe im Hochvakuum des Massenspektrometers und erfolgt routinemäßig bei allen Vakuumtechniken.^[13] Die Untersuchung aller sechs Proben ergab reproduzierbare Resultate, sodass an dieser Stelle nur die Ergebnisse eines Experiments exemplarisch vorgestellt werden.

[*] Dr. C. E. Rommel, PD Dr. J. Wegener

Institut für Biochemie

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Wilhelm-Klemm Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)

Fax: (+49) 251-833-3206

E-Mail: wegenej@uni-muenster.de

Dr. D. Breitenstein, Dr. B. Hagenhoff

Tascon GmbH

Heisenbergstraße 15, 48149 Münster (Deutschland)

Dr. R. Möllers

IonTof GmbH

Heisenbergstraße 15, 48149 Münster (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde finanziell im Rahmen der Förderrichtlinie Nanobiotechnologie des BMBF (Nr. 0312002A) sowie durch das sechste Rahmenprogramm der EU (FP6-513698/Toxdrop & FP6-005045/Nanobiomaps) unterstützt. Wir danken M. Fartmann für die Durchsicht des Manuskriptes, S. Grunewald für ihre Unterstützung bei der Zellpräparation, R. Kersting und E. Tallarek für technische Ratschläge, E. Niehuis für hilfreiche Diskussionen und J. Zehnpfenning für die Software-Unterstützung.

Zum besseren Verständnis wird in Abbildung 1 zunächst ein spezifischer Aspekt der ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse illustriert, der bei lichtmikroskopischen Verfahren nicht zu berücksichtigen ist. Zu Beginn einer Analyse liegt

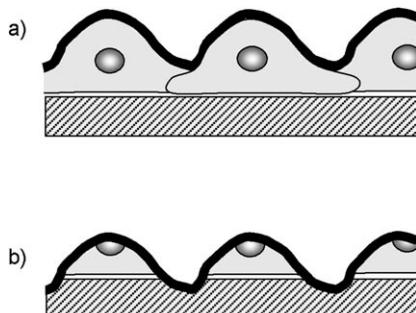


Abbildung 1. Adhäsente tierische Zellen auf einem Trägersubstrat zu Beginn (a) und im Verlauf (b) einer ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse unter der Annahme materialunabhängiger Sputter-Raten. Die dick gezeichnete Linie markiert die oberste chemische Monoschicht der Probe, die einer SIMS-Analyse zugänglich ist.

eine kontinuierliche Zellschicht auf dem Substrat vor. Die oberste Molekülschicht (dicke Linie in Abbildung 1 a), die für die SIMS-Analyse zugänglich ist, besteht aus chemischen Substanzen der Zelloberfläche. Im weiteren Verlauf des Experiments wird durch die wiederholten Sputter-Zyklen die Zelloberfläche sukzessive erodiert. Da die Zellkörper jedoch nicht gleichmäßig hoch sind, wird die SIMS-Analyse das Glassubstrat im Bereich der Zellperipherie eher erreichen als in zentralen Bereichen der Zelle (Abbildung 1 b), was eine Verzerrung der z -Achse mit sich bringt. Wie weiter unten beschrieben, kann diese Verzerrung der z -Achse durch eine nachgeschaltete Koordinatentransformation korrigiert werden.

Abbildung 2a–c zeigt massenaufgelöste Bilder von der Oberfläche der konfluenten NRK-Zell-Monoschicht, bevor der erste Sputter-Zyklus durchgeführt wurde. Dies entspricht der Situation in Abbildung 1a. Abbildung 2a zeigt die laterale Verteilung des Natriumsignals, das repräsentativ für das Glassubstrat ist (das vermeintlich spezifischere Siliciumsignal wird in der verwendeten Nominalmassenauflösung von organischen Fragment-Ionen überlagert und ist darum als Marker ungeeignet). Abbildung 2b zeigt die laterale Verteilung von Aminosäuren, die sich aus der Summation der Signale mehrerer charakteristischer Fragment-Ionen, die dieser Substanzklasse zugeordnet werden konnten, ergibt. Analog dazu ist in Abbildung 2c die laterale Verteilung der Phospholipide zu sehen, die auf dem Summensignal einiger charakteristischer Fragment-Ionen der Phospholipide basiert. Die zugrunde liegende Signalzuordnung wurde durch Referenzspektren von reinen Aminosäuren, Peptiden, Proteinen und Phospholipiden in hoher Massenauflösung verifiziert. Die individuellen Masse/Ladungs-Verhältnisse, die zu den Summensignalen für Aminosäuren oder Phospholipide beitragen, sind der Legende zu Abbildung 2 zu entnehmen.

Vor Durchführung des ersten Sputter-Abtrags zeigt die SIMS-Analyse der obersten Monoschicht der Probe kein

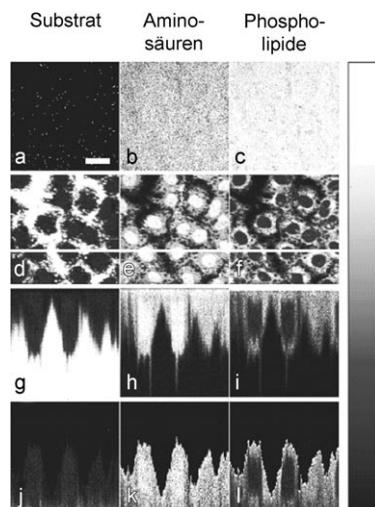


Abbildung 2. Massenaufgelöstes Sekundärionenbild der Probenoberfläche vor Einsatz des ersten Sputter-Abtrags (a–c) und nach dem 45sten Sputter-Zyklus (d–f). Die Intensitäten der Pixel sind in Graustufen codiert (weiß: höchste Intensität). Die Graustufenskala eines jeden Bildes wurde auf das intensivste Pixel normiert. Der Balken in (a) entspricht 20 μm . g)–i) xz -Schnitte durch den dreidimensionalen Datenstapel entlang der in (d)–(f) gezeigten, weißen Linie. Korrektur der z -Achse durch eine im Text beschriebene Koordinatentransformation liefert aus (g)–(i) die Teilabbildungen (j)–(l). Die massenaufgelösten Bilder basieren auf den nachfolgend aufgelisteten Sekundärionen: (a), (d), (g), (j): Na^+ . (b), (e), (h), (k): Fragment-Ionen der Aminosäuren (integriertes Signal der Massen 30 u, 44 u, 70 u, 101 u, 110 u, 136 u). (c), (f), (i), (l): Fragment-Ionen der Phospholipide (integriertes Signal der Massen 58 u, 166 u, 184 u, 760 u).

Signal des Substrates (Abbildung 2a). Dies unterstreicht, dass die Oberfläche vollständig mit bioorganischem Material bedeckt ist. Die Intensität der Phospholipid-Signale ist hoch, aber lateral homogen, sodass Zellgrenzen nicht zu identifizieren sind (Abbildung 2c). Das aufsummierte Fragment-Ionen-Bild der Aminosäuren (Abbildung 2b) zeigt geringere Signalintensitäten, als sie bei den Phospholipiden zu beobachten sind. Darüber hinaus sind jedoch auch hier keine strukturellen Merkmale zu erkennen, was für die hier gewählte Größe des Beobachtungsfeldes für eine zelluläre Plasmamembran zu erwarten war.

In massenaufgelösten Bildern der Probe nach 45 Sputter-Zyklen (Abbildung 2d–f, Situation wie in Abbildung 1b skizziert) kann das substratspezifische Na^+ -Signal in hoher Intensität in den dünneren Randbereichen der Zellen ausgemacht werden (Abbildung 2d). Offensichtlich wurde an diesen peripheren Stellen das organische Material bereits vollständig abgetragen. In den zentralen Bereichen der Zellkörper liefert die ToF-SIMS-Analyse nun markerfreie, molekulare Informationen aus dem Zellinneren. Phospholipid-spezifische Signale (Abbildung 2f) treten in höchster Intensität in ringförmiger Verteilung um ein zentrales Kompartiment auf, in dessen Inneren jedoch kaum Phospholipide, sehr wohl aber Aminosäuren in hohen Intensitäten nachweisbar sind (Abbildung 2e). Im Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation, die chemische Zusammensetzung und die Ausmaße entspricht dieses Kompartiment dem Zellkern.^[14] Die

intensiven Aminosäuresignale lassen sich möglicherweise auf die hohe Packungsdichte der Histonproteine zurückführen, die der Aufwicklung und Kompaktierung der DNS dienen. In Übereinstimmung hierzu konnten Arlinghaus et al. an tierischen Gewebeschnitten nach Kryofixierung mit der Laser-Sekundärneutralteilchen-Massenspektrometrie (ToF-SNMS) zentrale Zellbereiche ausmachen, in denen stickstoffhaltige Fragmente in hoher Intensität nachweisbar waren, während in peripheren Bereichen der Zellen vorwiegend Phospholipide detektiert wurden.^[15] Auch anderen Autoren gelang in zweidimensionalen, dynamischen SIMS-Oberflächenabbildungen die Identifizierung des Zellkerns anhand von stickstoffhaltigen Kohlenwasserstoff-Fragmenten.^[16] Die laterale Verteilung der Phospholipidsignale (Abbildung 2 f) impliziert, dass die nachgewiesenen Moleküle sowohl aus den inneren Organellmembranen als auch aus der die Zelle umschließenden Plasmamembran stammen.

Die ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse in der hier durchgeführten Form liefert eine enorme Informationsfülle. In den beschriebenen Experimenten wurde die untersuchte Probe in einem Raster von 256×256 Pixeln in 97 verschiedenen z -Ebenen untersucht, was sich insgesamt auf mehr als sechs Millionen Volumenpixel (Voxel) summiert. Der komplette Datensatz eines einzelnen Experimentes umfasst vollständige Massenspektren (mit nominaler Massenauflösung) jedes dieser individuellen Volumenelemente. Auf Basis dieses Datenpools, generiert aus den aufeinander folgenden Abbildungs- und Sputter-Zyklen, lässt sich auch die axiale Verteilung einer chemischen Spezies (senkrecht zur Probenoberfläche) rekonstruieren. Abbildung 2 g–i zeigt die axiale Verteilung (xz -Schnitt) der bereits oben diskutierten Fragment-Ionen-Familien in einer Ebene, die senkrecht zur Probenoberfläche in Höhe der weißen Linie der Abbildung 2 d–f verläuft. Wegen der Besonderheiten der ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse, wie sie bereits anhand von Abbildung 1 erläutert wurden, ergibt sich in diesen Darstellungen keine direkt interpretierbare z -Achse, wie man sie von anderen mikroskopischen Techniken gewohnt ist. Stattdessen steigt mit jeder Zeile des Bildes vom oberen zum unteren Bildrand die Zahl der durchgeführten Sputter-Zyklen an.

Wie nachfolgend erklärt, wurden die Teilabbildungen 2 g–i aus diesem Grunde mathematisch so transformiert, dass daraus die Teilabbildungen 2 j–l entstanden, die näherungsweise über eine direkt interpretierbare z -Achse verfügen. Bei dieser Transformation wird die scharfe Kante zwischen niedriger und hoher Intensität des Substratsignals (Abbildung 2 g) als Marker für das Erreichen der Substratoberfläche verwendet und als – in dieser Darstellung gekrümmte – Grundlinie der z -Skala definiert ($z=0$). Wenn die z -Positionen aller anderen Pixel dann relativ zu dieser Grundlinie angegeben werden, entstehen als Ergebnis dieser Transformation realistische Seitenansichten der Probe auf einem flachen Substrat (Abbildung 2 j–l). Es handelt sich hierbei um eine reine Koordinatentransformation – mögliche Korrekturen für inhomogene, materialspezifische Sputter-Ausbeuten wurden nicht durchgeführt, sodass die z -Achse noch eine geringe Verzerrung aufweisen kann.

Nach der Koordinatentransformation sind die dem Substrat zuzuordnenden Signale (Abbildung 2 j) wie erwartet auf

den unteren Teil des xz -Schnittes begrenzt. Signale, die auf Phospholipid-Fragment-Ionen zurückzuführen sind, ergeben eine ringförmige Verteilung (Abbildung 2 l), die den Zellkörper umschreibt, gerade so, wie es für Bestandteile der Plasmamembran zu erwarten ist. Das intrazelluläre Kompartiment mit hohen Intensitäten der Aminosäure-spezifischen SIMS-Signale (Abbildung 2 k) entspricht dem Zellkern. Die lateralen Dimensionen des Zellkörpers wie auch des Zellkerns in den SIMS-Abbildungen entsprechen denen, die wir durch lichtmikroskopische Studien bestimmen konnten (Durchmesser des Zellkörpers ca. $20 \mu\text{m}$, Durchmesser des Kerns $10\text{--}12 \mu\text{m}$). In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass die molekularen Informationen im Rahmen einer ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse ohne jegliche Markierung bestimmter Molekülklassen zugänglich sind, wie es beispielsweise in der Fluoreszenzmikroskopie notwendig wäre.

Abbildung 3 zeigt eine Korrelationsanalyse der in Abbildung 2 d–f vorgestellten Daten. Abbildung 3 a–c zeigt die individuelle laterale Verteilung des Substratmarkers sowie der

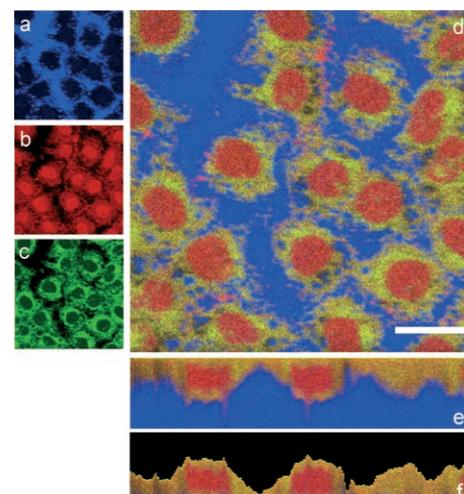


Abbildung 3. Rot-Grün-Blau-Überlagerungsdarstellung der Daten aus Abbildung 2 d–f für die Korrelationsanalyse. Die Summenintensität der Aminosäure-Fragment-Ionen (b) erscheint in Rot, die der Phospholipide (c) in Grün und die des Substrates (a) in Blau. Der Balken in (d) entspricht $20 \mu\text{m}$. a)–d) Horizontale xy-Schnitte und e)–f) vertikale xz -Schnitte durch die Probe (vor und nach Koordinatentransformation). Details siehe Text.

Aminosäure- und Phospholipid-Fragment-Ionen in der Probe. In Abbildung 3 d findet sich die überlagerte Darstellung aller drei Signalintensitäten. Im Falle einer Colokalisation von Sekundärionen aus den unterschiedlichen Gruppen – Substrat, Aminoäuren oder Phospholipide – erscheint das Pixel in der entsprechenden Mischfarbe. Darstellungen dieser Art ermöglichen somit Colokalisationsstudien für verschiedene chemische Spezies, wie man sie beispielsweise aus der Fluoreszenzmikroskopie kennt, jedoch ohne eine Limitierung durch die Verfügbarkeit von Fluorophoren mit ausreichend getrennten Absorptions- und Emissionscharakteristika. Abbildung 3 e,f zeigt analoge RGB-Überlagerungen für die untersuchten xz -Schnitte, einmal anhand der Rohdaten (Abbildung 3 e) und einmal nach Transformation der z -Koordinaten.

naten (Abbildung 3 f). Diese Mehrfarbenbilder geben die bekannte molekulare Architektur tierischer Zellen korrekt wieder und können nun in analoger Weise eingesetzt werden, um die Verteilung unbekannter oder exogener Moleküle in der Zelle zu studieren, solange sie einer SIMS-Analyse im hier gezeigten Sinne zugänglich sind.

In Abbildung 4 findet sich ein typisches SIMS-Spektrum der durch 45 Sputter-Zyklen freigelegten inneren Oberfläche

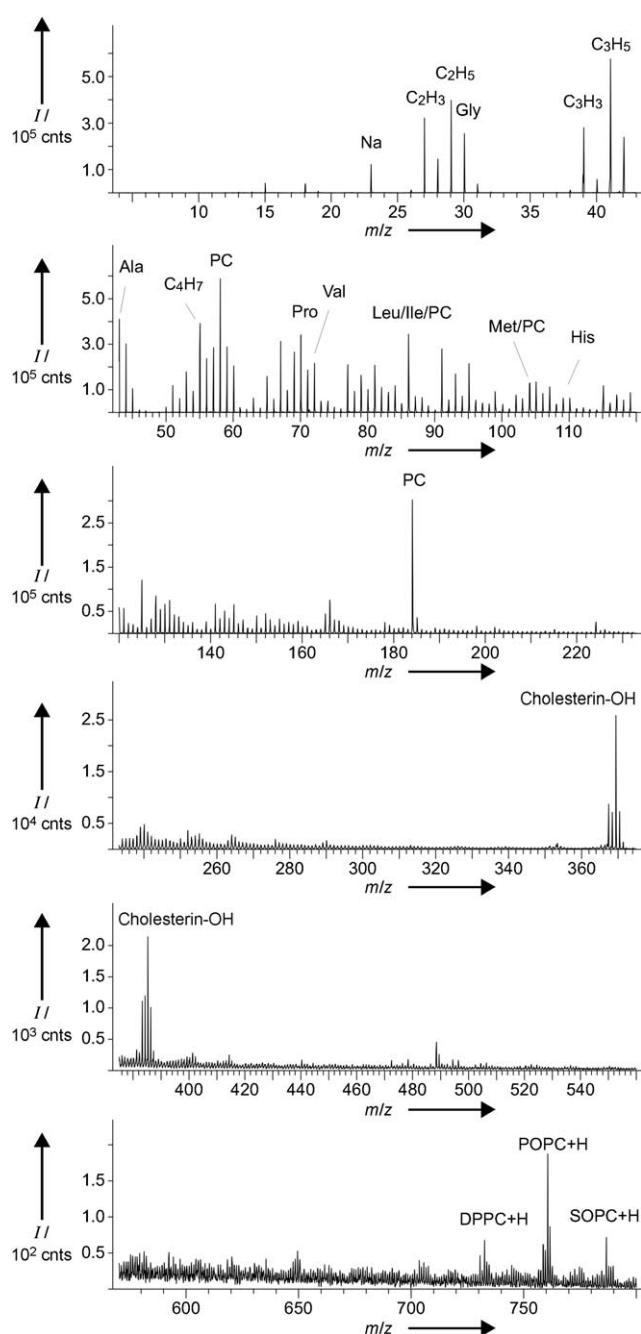


Abbildung 4. Exemplarisches Sekundärionenspektrum (positive Polarität), wie es mit hoher Massenauflösung im Sputter-Krater nach 45 Sputter-Zyklen aufgezeichnet wurde. Gly: Glycin, Ala: Alanin, PC: verschiedene Phosphatidylcholin-Fragmente, Pro: Prolin, Val: Valin, Leu: Leucin, Ile: Isoleucin, Met: Methionin, His: Histidin, DPPC: Di-palmitoylphosphatidylcholin, POPC: Palmitoylphosphatidylcholin, SOPC: Stearyloylphosphatidylcholin.

der Zellprobe in hoher Massenauflösung. Das Spektrum spiegelt somit die in Abbildung 2d–e gezeigte Situation wider. Im Bereich hoher Massen lassen sich die dominanten Signale den Phospholipiden und Cholesterin zuordnen. Bemerkenswerterweise können POPC und Cholesterin als intakte Molekülionen nachgewiesen werden, während die Aminosäuren hauptsächlich anhand der für sie charakteristischen Fragment-Ionen identifiziert werden. Die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Sekundärionen wurde mithilfe von Referenzspektren der Reinsubstanzen verifiziert. Das vorgestellte Massenspektrum belegt, dass die wiederholten C_{60}^+ -Sputter-Zyklen nicht die komplette molekulare Information auf der Probenoberfläche zerstören.

Durch alternierenden Einsatz der abbildenden ToF-SIMS-Analyse und eines schichtweisen Sputter-Abtrags der untersuchten Probe lässt sich die chemische Architektur tierischer Zellen dreidimensional rekonstruieren. Dabei werden mithilfe des wiederholten Abtrags dünner Probenenschichten immer tiefer liegende Teile der Probe einer ToF-SIMS-Oberflächenanalyse zugänglich gemacht. Moleküle können bis zu einem m/z -Verhältnis von etwa 800 intakt nachgewiesen werden. Größere Moleküle wie Proteine sind jedoch mit einer SIMS-Analyse nicht zu erfassen. Im Unterschied dazu ermöglicht es MALDI-MS, die Verteilung intakter Proteine in Gewebeschnitten offenzulegen.^[17–19] Folglich ist MALDI-MS der ToF-SIMS im Hinblick auf die maximal nachweisbare Molekülgröße deutlich voraus. Für abbildende Massenspektrometrie und dreidimensionale Rekonstruktionen jedoch erweist sich die ToF-SIMS als leistungsstärker.

Die laterale Auflösung in unseren Experimenten beträgt etwa 350 nm und ermöglicht somit die chemische Analyse weit hinunter bis in subzelluläre Dimensionen und ist sogar noch weiter optimierbar. So berichtete Kollmer über eine laterale Auflösung von 150 nm, wenn organische Farbstoffe durch abbildende ToF-SIMS nachgewiesen werden.^[3] Die axiale Auflösung in unseren Experimenten beträgt nähungsweise 100 nm. Dieser Wert basiert auf der aus mikroskopischen Studien bekannten Höhe von NRK-Zellen (6 µm) und der Zahl von Sputter-Zyklen, die zur vollständigen Erosion der Probe notwendig waren (60). Die beste bisher erreichte Axialauflösung wurde mit 30 nm bei der Tiefenprofilierung organischer Materialien erreicht.^[7] Mit abbildender MALDI-MS ist hingegen nur eine Lateralauflösung von 50 µm zugänglich, die aus dem Durchmesser des zur Desorption und Ionisierung eingesetzten Laserstrahls resultiert. Das axiale Auflösungsvermögen bei den MALDI-MS-Studien an Gewebeschnitten wird durch die Dicke der Schnitte bestimmt und beträgt ebenfalls nur 50 µm.^[20]

Die vorliegende Studie war darauf ausgerichtet, die dreidimensionale Verteilung der endogenen Bausteine tierischer Zellen zu untersuchen, um durch Vergleich mit der gut bekannten molekularen Architektur tierischer Zellen die Anwendbarkeit der ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse zur Untersuchung von Zellen und Geweben zu validieren. Hierauf aufbauend sollte es in der Zukunft möglich sein, auch die intrazellulären Depots von Pharmaka oder Xenobiotika aufzuspüren oder das Schicksal endogener Moleküle nach einer Pulsmarkierung zu verfolgen, vorausgesetzt die betrachteten

Moleküle sind in den vorliegenden Konzentrationen über ToF-SIMS nachzuweisen.

Experimentelles

Die Epithel-ähnlichen NRK-Zellen (normal rat kidney, Klon 52E) wurden in Dulbecco's Minimum Essential Medium (Biochrom) kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum (PAA Linz GmbH), 2 mm L-Glutamin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Penicillin und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Streptomycin (Seromed) zugesetzt wurden. Die Zellen wurden in mit Wasserdampf gesättigten Zellkulturbrutschränken in einer 5-proz. CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Zur Durchführung der ToF-SIMS-Experimente wurden die Zellen auf No.-1-Deckgläsern angezogen, die zuvor eine Minute lang einem Argonplasma zur Reinigung und Sterilisierung ausgesetzt worden waren.

Vor der SIMS-Analyse wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellschicht zweimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS⁺⁺; enthält 1 mm Ca^{2+} und 0.5 mm Mg^{2+}) gewaschen und anschließend mit 2.5% (v/v in PBS⁺⁺) Glutardialdehyd 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Aldehydlösung wurde anschließend durch Wasser ersetzt und die Probe dreimal mit Wasser gewaschen. Abschließend wurde das Wasser vollständig abgesaugt und die Probe bei 37 °C mindestens eine Stunde lang getrocknet.

Die ToF-SIMS-3D-Mikrostrukturanalyse wurde mit dem Gerät TOF.SIMS 5 (ION-TOF GmbH) durchgeführt, das mit einer Bismut-Primärionen-Quelle sowie einer C_{60}^+ -Sputter-Ionenquelle ausgerüstet ist. Im Sputter-Modus wurde eine Fläche von $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ durch Beschuss mit C_{60}^+ -Ionen (10 keV) erodiert. Der Strom auf dem Target betrug dabei 0.6–2.5 nA. Nach einem zweiseitigen Sputter-Zyklus wurde die Oberfläche des Sputter-Kraters mit sieben Scans im abbildenden SIMS-Modus analysiert. Die Oberflächenanalyse mit Bi_3^+ -Clusterionen (25 keV) war auf eine Fläche von $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ beschränkt. Jeder Scan ergab Bilder mit einer Auflösung von 256 × 256 Pixeln. Der Target-Strom im Abbildungsmodus betrug 0.1 pA. Der Primärionenstrahl wurde auf 300 nm fokussiert und ermöglichte den Nachweis von Sekundärionen im Massenbereich von 1–800 u. Massenaufgelöste Bilder wurden mit nomineller Massenauflösung aufgezeichnet, wohingegen das in Abbildung 4 dargestellte Spektrum mit einer hohen Massenauflösung von $m/\Delta m_{\text{FWHM}} > 5000$ aufgezeichnet wurde. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden zur eindeutigen Peakzuordnung eingesetzt. Die Datenanalyse wurde mit der Software TOFSIMS 4.1 (ION-TOF GmbH) durchgeführt.

Eingegangen am 31. Oktober 2006,
veränderte Fassung am 14. Februar 2007
Online veröffentlicht am 5. Juni 2007

Stichwörter: Analytische Methoden · Massenspektrometrie · Oberflächenanalyse · Zell-Imaging

- [1] A. Benninghoven, F. G. Rüdenauer, H. W. Werner, Wiley, New York, **1987**, S. 761.
- [2] J. C. Vickerman in *ToF-SIMS—Surface analysis by mass spectrometry* (Hrsg.: J. C. Vickerman, D. Briggs), IM Publications, Manchester/Chichester, **2001**.
- [3] F. Kollmer, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 231–232, 153.
- [4] A. M. Belu, D. J. Graham, D. G. Castner, *Biomaterials* **2003**, 24, 3635.
- [5] A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprevote, *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 985.
- [6] B. Hagenhoff, *Mikrochim. Acta* **2000**, 132, 259.
- [7] M. S. Wagner, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 911.
- [8] N. Davies, D. Weibel, P. Blenkinsopp, N. Lockyer, R. Hill, J. C. Vickerman, *Appl. Surf. Sci.* **2003**, 203–204, 223.
- [9] S. C. C. Wong, R. Hill, P. Blenkinsopp, N. P. Lockyer, D. Weibel, J. C. Vickerman, *Appl. Surf. Sci.* **2003**, 203–204, 219.
- [10] D. E. Weibel, N. Lockyer, J. C. Vickerman, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 231–232, 146.
- [11] J. Cheng, N. Winograd, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3651, 77.
- [12] E. Niehuis, T. Grell in *TOF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry* (Hrsg.: J. C. Vickerman, D. Briggs), IM Publications, Charlton, **2001**, S. 753.
- [13] M. Hoppert, A. Holzenburg, *Electron microscopy in microbiology*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, **1998**.
- [14] K. V. Prasanth, D. L. Spector in *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, Chichester, **2006**.
- [15] H. F. Arlinghaus, M. Fartmann, C. Kriegeskotte, S. Dambach, A. Wittig, W. Sauerwein, D. Lipinsky, *Surf. Interface Anal.* **2004**, 36, 698.
- [16] J.-L. Guerquin-Kern, T.-D. Wu, C. Quintana, A. Croisy, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2005**, 1724, 228.
- [17] P. Chaurand, M. E. Sanders, R. A. Jensen, M. Caprioli, *Am. J. Pathol.* **2004**, 165, 1057.
- [18] P. Chaurand, M. Stoeckli, R. M. Caprioli, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5263.
- [19] M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, R. M. Caprioli, *Nat. Med.* **2001**, 7, 493.
- [20] A. C. Crecelius, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant, B. Bodenheimer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16, 1093.