

Mikroelektrochemie an einzelnen Zellen

Albert Schulte und Wolfgang Schuhmann*

Stichwörter:

Elektrochemische Rastermikroskopie -

(SECM) · Exozytose ·

Lebende Zellen ·

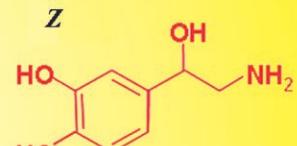
Ultramikroelektroden ·

Voltammetrie

Kohlenstofffaser – Ultramikroelektrode



elektrochemische Rastersonde



sekretorische Zelle

pA
S

Nadelförmige voltammetrische Ultramikroelektroden zeigen eine herausragende Empfindlichkeit bei der Detektion redoxaktiver Substanzen, eine schnelle Ansprechzeit und Gesamtspitzendurchmesser im unteren Mikrometerbereich. Durch diese Charakteristika sind sie ideal für die Analyse der chemischen Umgebung und der Aktivität isolierter lebender Zellen, die in ihren vielfältigen Ausgestaltungen die mikroskopischen Baueinheiten menschlicher, tierischer und weiterer Lebensformen bilden. Voraussetzungen für erfolgreiche lokale elektrochemische Messungen in der Nachbarschaft winziger biologischer Objekte sind eine sanfte, Stress-freie und akkurate Platzierung der Sondenspitze an der Zelle, eine genaue Kenntnis des Abstandes zwischen Sonde und Zelle und eine hinreichende Selektivität der Ultramikroelektrodenspitze für Substanzen, deren Konzentrationen sich als Folge zellulärer Vorgänge wie Wachstum, Atmung oder Transmitter-/Metabolitenaufnahme oder -abgabe verändern. Die Konzepte der Einzelzellmikroelektrochemie werden vorgestellt, und es wird ein Überblick gegeben über jüngste Ergebnisse zu fundamentalen Mechanismen von Zellfunktionen.

1. Einleitung

Große technische Entwicklungen auf den Gebieten integrierter elektronischer Schaltkreise, Mikroprozessoren und Software haben in den letzten Jahrzehnten zu wesentlichen Fortschritten bei elektrochemischen Messinstrumenten geführt. Dadurch konnten auf dem bereits gut etablierten Wissenschaftsgebiet der Elektrochemie bemerkenswerte Verbesserungen in fast allen Anwendungsfeldern erzielt werden. Einfach bedienbare und hoch präzise computergesteuerte Potentiostaten erschienen auf dem Markt und erlaubten es erstmals, winzige Ströme mit extrem geringem Rauschen und bester Genauigkeit zu messen. Parallel dazu gelang in vielen Labors die routinemäßige Herstellung und Positionierung extrem kleiner voltammetrischer Elektroden, sodass nun miniaturisierte elektrochemische Analyseverfahren für die Bestimmung redoxaktiver Substanzen mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung, ausgezeichneter Empfindlichkeit und niedrigen Nachweisgrenzen allgemein zugänglich sind.

Bei der Voltammetrie wird der Arbeitselektrode ein konstantes oder ein sich gezielt änderndes Potential aufgeprägt. Die Stromantwort wird als Funktion der Zeit und/oder des Potentials aufgezeichnet. Im Unterschied zu konventionellen Elektroden sind in voltammetrischen Ultramikroelektroden (UMEs) die charakteristischen geometrischen Abmessungen (Durchmesser/Radius einer Scheibenelektrode oder Breite einer Bandelektrode) von der makroskopischen auf die mikroskopische Dimension verringert.^[1] Die resultierenden extrem kleinen Elektrodenoberflächen führen jedoch zu intrinsisch sehr kleinen Mess-Strömen, sodass erst die Verfügbarkeit hoch empfindlicher elektrochemischer Verstärker und die Möglichkeit, Ströme bis hinunter zu einigen 100 fA präzise zu messen, den Weg ebneten, die Anwendungsbreite von voltammetrischen UMEs bei der Spu-

renanalytik und bei kinetischen Messungen, aber auch in den Oberflächenwissenschaften und in biomedizinischen Untersuchungen, zu erforschen.

Voltammetrische UMEs gibt es mittlerweile mit unterschiedlichen Geometrien (Zylinder, Halbkugel, Scheibe, Band oder Ring sowie Kombinationen davon), Dimensionen (μm bis nm) und einer Palette von Materialien (C, Pt, Au, Ag). Ihre Theorie, Herstellung und ihr Verhalten wurden in einer Monographie^[2] und einigen Übersichten^[3] zusammengefasst. Kurz gesagt sind die Vorteile von Mikroelektroden für voltammetrische und chronoamperometrische Experimente:

- 1) ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis im Wesentlichen aufgrund der Tatsache, dass der analytisch relevante Faraday-Strom signifikant erhöht ist. Dies ist Folge der hemisphärischen oder sphärischen statt planaren Diffusion in Richtung der UMEs und des daraus resultierenden erhöhten Massentransports der elektroaktiven Spezies zur Elektrodenoberfläche.
- 2) eine verringerte Verzerrung durch den Einfluss des Ohmschen Spannungabfalls iR (i : Strom durch die Messzelle, R : Widerstand der Messlösung) aufgrund der kleinen Ströme, die an UMEs gemessen werden. Damit verbunden ist die Möglichkeit, einfache elektrochemische

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8915
2. Voltammetrische Ultramikroelektroden für die Detektion an und in einzelnen lebenden Zellen	8918
3. Beispiele für intrazelluläre Voltammetrie	8920
4. Beispiele konventioneller extrazellulärer Voltammetrie	8921
5. Elektrochemische Rastermikroskopie (SECM) an einzelnen Zellen	8924
6. Zusammenfassung und Ausblick	8929

Messungen in Lösungen mit hohem Widerstand auszuführen.

- 3) eine schnelle Ansprechzeit aufgrund der geringen Doppelschichtkapazität und der damit verbundenen kleinen Zeitkonstante $\tau = RC$ (R : Lösungswiderstand, C : Doppelschichtkapazität der Elektrode). Diese Eigenschaft ermöglicht die schnelle Änderung der Konzentration von Redoxspezies, die mit einer Zeitauflösung im Nanosekundenbereich erfasst werden kann.
- 4) eine kleine Gesamtgröße. Diese Eigenschaft erlaubt elektrochemische Experimente in begrenzten Volumina und an mikroskopisch kleinen Objekten.

Mit ihren herausragenden elektroanalytischen und geometrischen Eigenschaften sind nadelförmige Mikroelektroden mit einigen Mikrometer großen Spitzen hervorragend für örtlich und zeitlich aufgelöste voltammetrische Experimente in biologischen Systemen geeignet. Daher wurden solche Elektroden häufig in den Lebenswissenschaften und der Medizin eingesetzt. Die höchsten wissenschaftlichen Aktivitäten verzeichnen dabei die Neurochemie und die Zellphysiologie, Disziplinen, bei denen miniaturisierte voltammetrische Sensoren häufig für die Beobachtung der Dynamik einer Reihe zellulärer Prozesse sowie der zeitlichen Änderungen der Zusammensetzung intra- und extrazellulärer Flüssigkeiten angewendet werden. Diese Änderungen können dann entweder mit Zellaktivitäten wie Wachstum, Atmung oder Zell-Zell-Kommunikation in Beziehung gesetzt werden, oder sie zeigen metabolische Reaktionen als Folge von Belastungen durch Nahrungsknappheit, Sport, Einnahme von Medikamenten oder ähnliche Einflüsse. Generell müssen In-vivo-Anwendungen, bei denen beispielsweise aktive Spitzen von UMEs unter möglichst geringen Schädigung in ausgewählte Gewebepartien von Labortieren implantiert werden, von In-vitro-Anwendungen an isolierten biologischen Zellen oder akuten Gewebeschnitten unterschieden werden.

In-vivo-Voltammetrie im zentralen Nervensystem lebender Tiere verfolgt das Ziel, neurochemische Abläufe in Zellen im Zusammenhang mit komplexem Verhalten aufzuklären, und gehört sicherlich zu den interessantesten Anwendungen dieser Art von Elektroanalyse. Dieses Forschungsgebiet wurde von Adams und Mitarbeitern zu Beginn der 1970er

Jahre bei Versuchen etabliert, Fluktuationen in der Konzentration von Catecholamin-Neurotransmittern in unterschiedlichen Regionen des Rattengehirns nach Stimulation ihrer synaptischen Ausschüttung zu beobachten.^[4] Seit diesen bahnbrechenden Arbeiten hat die In-vivo-Voltammetrie beträchtliche Fortschritte gemacht, was durch die Zahl der publizierten Übersichten belegt wird.^[5] Zwei neuere Errungenschaften sind beispielsweise die drahtlose Voltammetrie im Gehirn freilaufender Ratten durch Implementierung eines telemetrischen Systems^[6] und die natürlich auftretenden tonischen oder phasenartigen Dopaminsignale, die kürzlich in Echtzeit in der extrazellulären Flüssigkeit unterschiedlicher Gehirnregionen von wachen (nicht anästhesierten) Ratten aufgezeichnet wurden und mit Verhaltensmustern wie sexueller Erregung, Belohnung, Nahrung oder Neugier sowie der Aufnahme von Drogen in Beziehung gesetzt werden konnten.^[7,8]

Dieser Aufsatz behandelt die Einzelzelmikroelektrochemie oder, um es exakter zu definieren, elektrochemische Messungen, die mit voltammetrischen Ultramikroelektroden an den kleinsten lebensfähigen Einheiten ausgeführt werden – an isolierten biologischen Zellen in Zellkulturen. Obwohl sie nicht in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen, können einzelne isolierte oder kultivierte Zellen ihre charakteristischen metabolischen und (neuro)physiologischen Prozesse aufrechterhalten, sodass sie zu einem gewissen Grad den Zellen im Körper ähneln. Deshalb erwiesen sich einzelne Zellen als gute experimentelle Modellsysteme für die zielgerichtete Untersuchung komplexer biologischer Prozesse und Funktionen. Von Vorteil ist auch, dass solche Experimente nicht durch Interferenzen beeinflusst werden, wie sie häufig in hoch heterogenen intakten Geweben auftreten. Allerdings haben lebende Zellen mikroskopische Dimensionen; die Antworten auf ihre spezifischen Aktivitäten sind daher sehr klein, und sie ereignen sich auf einer sehr kurzen Zeitskala. Folglich erfordern das Screening und die Visualisierung der Aktivität einzelnen Zellen hoch entwickelte Analysetechniken mit der notwendigen Empfindlichkeit sowie örtlichen und zeitlichen Auflösung. Beispiele hierfür sind fortgeschrittene optische^[9] und elektrophysiologische Techniken^[10] und, nicht zuletzt, die Verwendung von voltammetrischen Ultramikroelektroden.



Albert Schulte promovierte 1994 an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Nach Forschungstätigkeiten am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen und an der University of Edinburgh wurde er 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität Bochum, wo er in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Schuhmann Projekte aus dem Bereich der Mikroelektrochemie und Elektroanalytik bearbeitete. Von Januar 2006 an war er Senior Lecturer an der University of the West Indies in Trinidad und Tobago, bis er im April 2007 eine Stelle als Associate Professor an der Suranaree University of Technology in Nakhon Ratchasima (Thailand) annahm. Dort untersucht er Themen aus den Bereichen Mikro-, Nano- und Bioelektrochemie.



Wolfgang Schuhmann promovierte 1986 an der Technischen Universität München mit einem Thema aus dem Bereich der Photoelektrochemie. Nach Beendigung seiner Habilitation an der TU München über amperometrische Biosensoren (1993) wurde er 1996 zum Professor für Analytische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum berufen. Seine Forschungsinteressen umfassen die Entwicklung reagensloser amperometrischer Biosensoren, Mikroelektrochemie, Miniaturisierung von Biosensoren, elektrochemische Rastermikroskopie (SECM), elektrochemische Robotik, miniaturisierte Sensoren für Untersuchungen an biologischen Zellen, lokalierte Korrosion und die mikroelektrochemische Untersuchung von Brennstoffzellenkatalysatoren.

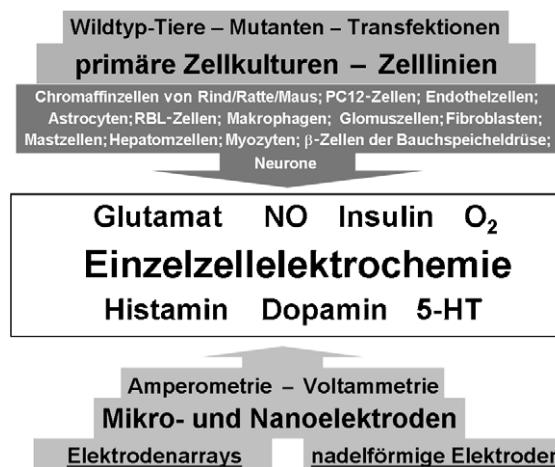


Abbildung 1. Das Zusammenspiel experimenteller Techniken und Zellmodelle in der Einzelzellmikroelektrochemie. Oben: Individuelle lebende Zellen werden entweder durch eine enzymatische Dissoziation aus dem explantierten Gewebe von Laboraggetieren oder Zuchttieren oder aus vielen kommerziell erhältlichen Zelllinien erhalten, die darüber hinaus für die spezifischen Zellaktivitätsmessungen genetisch modifiziert sein können. Unten: Einzelne kultivierte Zellen können mit den punktförmigen Spitzen von Mikro- oder Nanoelektronen, die unmittelbar an ihrer Plasmamembran positioniert werden, oder auf Mikroelektrodenarray untersucht werden. Für die Detektion der elektroaktiven Spezies in der Nachbarschaft aktiver Zellen dient entweder die Voltammetrie, bei der das Mikroelektrodenpotential E als Funktion der Zeit t mit definierter Spannungsvorschubgeschwindigkeit zwischen zwei geeigneten Werten verändert wird, oder die Amperometrie, bei der E auf einem konstanten Wert gehalten wird, der angepasst sein muss, um die interessierende Redoxspezies zu oxidieren oder zu reduzieren.

Abbildung 1 zeigt einige zelluläre Systeme, die einer Untersuchung durch Einzelzellmikroelektrochemie zugänglich sind. Die individuellen kultivierten lebenden Zellen können entweder aus einer der vielen (auch kommerziell) verfügbaren Zelllinien stammen oder aus primären Zellkulturen, die aus frischen Präparationen eines Tiergewebes etabliert werden. Genetisch modifizierte Zellen, die bestimmte physiologische Defekte aufweisen, können durch gut ausgearbeitete Prozeduren der Zelltransfektion an kultivierten Mutterzellen oder durch Verwendung von Zellpräparationen aus genetisch veränderten Tiermutanten (beispielsweise Knockout-Mäuse oder -Ratten) erhalten werden. Da es möglich ist, transfizierte oder transgene Zellen mit den entsprechenden Wildtyp-Zellen zu vergleichen, stellen sie Modelle für das Studium von Genfunktionen oder komplexen zellulären Prozessen dar (z.B. für die Ausschüttung vesikulärer Transmitter oder Hormone). Die Rollen eines (ausgeschalteten) Proteins oder der mit diesem assoziierten Proteine in bestimmten Prozessen kann so evaluiert werden.

Generell kann die voltammetrische Detektion entweder mit positionierbaren, nadelförmigen UMEs (Abbildung 2) oder mit Ultramikroelektrodenarrays, die aus vielen individuell ansprechbaren voltammetrischen Sensoreinheiten bestehen, ausgeführt werden. Die Arrays wurden durch Nano- und Mikrofabrikationsprozesse zugänglich,^[11] die aus der Siliciumtechnologie entlehnt wurden. Mikroelektrodenarrays benötigen im Unterschied zu den filigranen Sensorspitzen

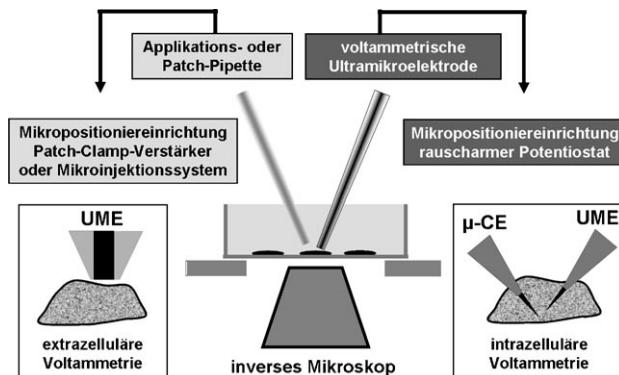


Abbildung 2. Ein Arbeitsplatz für elektrophysiologische Einzelzellexperimente mit nadelförmigen voltammetrischen Mikroelektroden (schematisch). Mithilfe eines inversen Mikroskops können eine Applikations- oder Patch-Pipette für die Zellstimulation und die voltammetrische UME für die elektrochemische Detektion der zellulären Antwort bedient werden. Beide Instrumente müssen an einem präzisen Mikropositionierelement befestigt sein, um die Sonden vorsichtig in der Nähe (extrazelluläre Voltammetrie) oder im Innern (intrazelluläre Voltammetrie) einer einzelnen lebenden Zelle zu positionieren. Die Verwendung von rauscharmen elektrochemischen Verstärkern mit der Fähigkeit, fA- oder pA-Ströme zu messen, garantiert die Empfindlichkeit, die notwendig ist, um die winzigen Konzentrationsänderungen der redoxaktiven Spezies als Folge zellulärer Aktivitäten wie Sekretion oder Atmung zu detektieren. μ -CE: nadelförmige Mikrogegentelektrode.

keine aufwendigen Positionierungstechniken. Stattdessen werden die zu untersuchenden Zellen auf der Mikroelektrodenanordnung ausgesät, wo dann zelluläre Prozesse wie die Ausschüttung oder der Verbrauch von elektroaktiven Substanzen mithilfe unterschiedlicher voltammetrischer Detektionsverfahren verfolgt werden. In Abhängigkeit der Größe eines einzelnen Sensorelementes des Mikroelektrodenarrays relativ zur Größe einer lebenden Zelle und dem Abstand zwischen den individuellen aktiven Elementen des Ultramikroelektrodenarrays wird die Information entweder von unterschiedlichen Bereichen einer einzelnen Zelle oder von einer Vielzahl von Zellen erhalten. Die Detektion der Catecholamin-Exozytose an sekretorischen Zellen,^[12] neuronaler Transmitter^[13] und der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO)^[14] sind Beispiele für das erfolgreiche Studium der Aktivität einzelner Zellen an Ultramikroelektrodenarrays. Durch die Verfügbarkeit multipler Teststellen auf streifenförmigen Sensorsystemen und die Möglichkeit einer automatisierten Beladung und Analyse tragen Ultramikroelektrodenarrays die Möglichkeit für die Hochdurchsatzuntersuchung zellulärer Aktivität in sich. So können mehrere Analyte gleichzeitig erfasst werden und komplexe Netzwerke neuronaler oder anderer Zellen chemisch abgefragt werden. Das Potenzial von Ultramikroelektrodenarrays für voltammetrische Untersuchungen an einzelnen Zellen ist derzeit aber bei Weitem nicht vollständig ausgeschöpft.

Der erste Abschnitt dieses Aufsatzes gibt einen Überblick über die Herstellungsmethoden von voltammetrischen Ultramikroelektroden mit Spitzendimensionen, die für voltammetrische In-vitro-Messungen im Zytoplasma (intrazelluläre Voltammetrie) oder in geringem Abstand von einzelnen biologischen Zellen (extrazelluläre Voltammetrie) geeignet

sind. Ausgewählte Veröffentlichungen über intrazelluläre Voltammetrie sowie über „konventionelle“ extrazelluläre voltammetrische Detektion von chemischen Botenstoffen wie Catecholaminen, Stickstoffmonoxid (NO) und Glutamat, die mit stationär in unmittelbarer Nähe der äußeren Membran einer sekretorischen Zelle positionierten Ultramikroelektroden erfasst werden, werden kurz zusammengefasst. Die elektrochemische Rastermikroskopie (scanning electrochemical microscopy, SECM), ein hochauflösendes Bildgebungsverfahren, das präzise bewegbare voltammetrische oder potentiometrische UMEs nutzt, wurde etabliert^[15] und für Studien an einzelnen Zellen verwendet, wobei simultan Bilder der Zellmorphologie und der zellulären (Redox)Aktivität erhalten wurden.^[16] Theoretische und praktische Aspekte, die für SECM-Messungen an lebenden Zellen relevant sind, werden vorgestellt. In diesem Abschnitt werden die Nachteile des Rasters der SECM-Spitze mit konstanter z-Position („constant-height mode“) und die Vorteile des Rasters der SECM-Spitze in konstantem Abstand zur Probenoberfläche („constant-distance mode“) bei der Visualisierung weicher dreidimensionaler biologischer Objekte diskutiert. Wesentliche apparative Entwicklungen der SECM werden zusammengefasst und SECM-Studien an einzelnen Zellen werden angeführt, um den Einfluss der Einzelzell-SECM in unterschiedlichen Disziplinen der Lebenswissenschaften und Medizin abzuschätzen. Schließlich werden einige Herausforderungen und Perspektiven der Einzelzellektrochemie angesprochen.

2. Voltammetrische Ultramikroelektroden für die Detektion an und in einzelnen lebenden Zellen

In einer Reihe von Publikationen wurde in den letzten Jahren die Herstellung von winzigen voltammetrischen Elektroden beschrieben, die unter anderem für örtlich begrenzte Messungen in unmittelbarer Nähe oder sogar innerhalb lebender Zellen geeignet sind. Die optimale Elektrode ist stark abhängig von der zu untersuchenden Zelle und dem betrachteten zellulären Prozess. In jedem Fall sollten jedoch voltammetrische UMEs für die Einzelzellektrochemie nicht nur eine geeignete Größe haben, sondern auch eine hervorragende Empfindlichkeit für den Analyten, einen geringen Grundstrom sowie eine gute Stabilität in physiologischen Pufferlösungen aufweisen. Zusätzlich müssen sie natürlich möglichst einfach herzustellen und anzuwenden sein. Als Materialien für UMEs werden vor allem Kohlenstoff und Platin genutzt. Kohlenstoff ist ein ideales Elektrodenmaterial für die Detektion der Ausschüttung von Catecholamin-Neurotransmittern in physiologischen Salzlösungen, da Kohlenstoffelektroden kaum zur Kontamination der Oberfläche („fouling“) neigen. Aufgrund seiner elektrokatalytischen Eigenschaften wird Platin vorgezogen, um beispielsweise extra- oder intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen zu messen.

Für Einzelzellmessungen im extrazellulären Raum in sehr geringem Abstand zu einer einzelnen lebenden Zelle sind scheibenförmige oder ähnliche Elektroden mit einer dünnen Isolierung an der Sensorspitze am besten geeignet, deren Dimensionen diejenigen der zu untersuchenden Zellen nicht

überschreiten sollten. Solche Elektroden können durch Einschmelzen von Kohlenstofffasern mit graphitähnlicher Leitfähigkeit oder Platinmikrodrähten mit Durchmessern bis hinab zu 5 µm in Glas oder Polymerüberzüge hergestellt werden, wodurch elektroaktive Mikroscheiben, die von einem isolierenden Schaft umgeben sind, entstehen, nachdem die Spitzen vorsichtig poliert (Glas) oder mit einem Skalpell geschnitten wurden (Polymer). Drei Arten von Kohlenstofffaser-Ultramikroelektroden (CF-UMEs) mit geringem Rauschen und mit Durchmessern von 5–10 µm werden routinemäßig zur Detektion der Neurotransmitterausschüttung an sekretorischen Zellen und einzelnen kultivierten Neuronen genutzt:

- 1) glasisierte CF-UMEs mit elliptischer Geometrie; „Wightman-CF-UMEs“,^[17]
- 2) mit Polyethylen (PE) oder Polypropylen (PP) isolierte CF-UMEs mit Scheibenform; „Chow-CF-UMEs“,^[18] und
- 3) mit Elektrotauchlack isolierte CF-UMEs mit Scheibenform; „Schulte-CF-UMEs“.^[19]

Glasisierte CF-UMEs werden durch Einkleben einzelner Kohlenstofffasern in fein ausgezogene Glaskapillaren mithilfe eines Epoxidklebstoffs hergestellt. Vorsichtiges Polieren unter einem Winkel von 45° auf einer Mikropipettenpoliermaschine führt zu einer ovalen Oberfläche. Die elektroaktive Fläche der polierten Kohlenstoffmikroellipse ist doppelt so groß wie bei einer Scheibenelektrode aus dem gleichen Material. Gleichzeitig ist der Hintergrundstrom nicht wesentlich erhöht,^[17] sodass eine bessere Empfindlichkeit resultiert. Polyethylen(PE)- oder Polypropylen(PP)-isierte CF-UMEs werden hergestellt, indem einzelne Kohlenstofffasern in kurze PE- oder PP-Röhrchen eingefädelt werden, die dann lokal geschmolzen und ausgezogen werden. So ist die Kohlenstofffaser in das ausgezogene Ende einer Plastikpipettenspitze eingeschmolzen und wird durch einen nahezu unsichtbar dünnen Polymerfilm umhüllt. Das Schneiden der Plastikspitze mit einem scharfen Skalpell unter dem Mikroskop legt schließlich die Kohlenstofffaserscheibe frei. Diese Herstellung von PE- oder PP-isolierten CF-UMEs ist jedoch diffizil.

Vergleichsweise einfach ist dagegen die Herstellung von scheibenförmigen CF-UMEs, die mit einem Elektrodepositionsslack isoliert sind. Elektrodepositionsslack werden häufig in der Automobilindustrie und zur Herstellung von Konserwendosen verwendet, um chemisch stabile Antikorrosionschichten effektiv abzuscheiden. Wasserbasierte Elektrodepositionsslacke (EDPs) sind kommerziell als anodische oder kathodische Systeme erhältlich. Ihre elektrochemische Abscheidung auf den Oberflächen leitender Werkstücke beruht auf der pH-Wert-abhängigen Löslichkeit der verwendeten Polymere. Beispielsweise liegt ein anodischer EDP in einer wässrigen Dispersion in Form „löslicher“, negativ geladener Micellen eines Polyacrylsäurecopolymers vor. Das mit dem Elektrotauchlack zu beschichtende Werkstück wird als Anode in einer elektrochemischen Zelle geschaltet, die den EDP als Elektrolytlösung enthält, und auf ein Potential polarisiert, das geeignet ist, die Spaltung von Wasser durch anodische Oxidation unter Bildung von Protonen an der Grenzfläche zwischen Anode und Elektrolyt auszulösen.

Negativ geladene EDP-Micellen erreichen durch Migration im elektrischen Feld die entgegengesetzt geladene Elektrode, wo das Ansäubern des Elektrolyten in unmittelbarer Nähe der Phasengrenze zur Protonierung der Carboxylatseitenketten führt und die Löslichkeit des Polymers senkt. Dieser gut kontrollierbare Prozess resultiert in der Abscheidung eines Polymerfilmes auf der gesamten eingetauchten aktiven Elektrodenoberfläche. Die EDP-Abscheidung ergibt ebene, dünne und defektfreie Schichten, die stark an der Oberfläche der Kohlenstofffaser haften. Um den noch immer mit Wasser beladenen Polymerfilm in ein gut isolierendes Dielektrikum zu überführen, das selbst der Zersetzung bei hohen Potentialen widersteht und die zylindrische Faserspitze isoliert, müssen die frisch abgeschiedenen Polymerfilme bei hoher Temperatur eingearbeitet werden. Direkt vor dem Gebrauch wird die Spitze mit einem Skalpell geschnitten, um die von einem dünnen Polymerfilm umgebene Kohlenstoffmikroscheibe freizulegen (Abbildung 3).

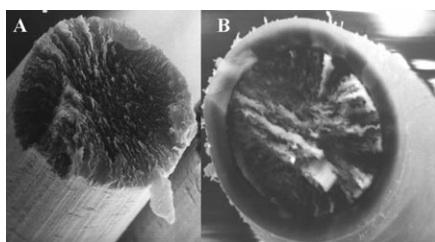


Abbildung 3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer nicht isolierten (A) und einer mit einer dünnen Schicht eines Elektrodepositions-lacks überzogenen Kohlenstofffaser (B). Die dicht vom elektrisch isolierenden Polymer umgebene scheibenförmige Kohlenstoffoberfläche in (B) wurde durch einen vorsichtigen Schnitt der lackierten Faser mit einem scharfen Scalpell freigelegt und bildet die aktive Sensoroberfläche einer Kohlenstofffaser-Ultramikroelektrode (CF-UME), wie sie typischerweise für die Messung der Freisetzung von Neurotransmittern oder Hormonen aus einzelnen sekretorischen Zellen genutzt wird. Der Durchmesser der Kohlenstofffaser beträgt ca. 10 µm.

Scheibenförmige CF-UMEs mit noch kleinerem Durchmesser sind eine Voraussetzung für eine verbesserte örtliche Auflösung bei der lokalen Detektion der Ausschüttung zellulärer Catecholamin-Transmitter. Allerdings werden Hochleistungskohlenstofffasern, die als Vorstufen für scheibenförmige CF-UMEs dienen, im Allgemeinen als Strukturkomponenten in faserverstärkten Kunststoffen verwendet und sind lediglich mit Durchmessern bis hinunter zu 5 µm kommerziell erhältlich. Dünnerne Kohlenstofffasern für die Herstellung sehr kleiner (scheibenförmiger) CF-UMEs konnten durch das Ausdünnen von Kohlenstofffasern mithilfe von elektrochemischen,[20] elektrischen,[21] Flammen-[20c,22] oder Ionenstrahl-Ätzverfahren[23] erhalten werden. Wenn man konisch oder zylindrisch geätzte Kohlenstofffaserspitzen in einem zweiten Schritt gemäß einer verfügbaren Isolierungsstrategie, beispielsweise der elektrochemisch induzierten Polymerabscheidung, weiter bearbeitet, können CF-UMEs mit effektiven Radien unter 1 µm hergestellt werden.[20a,22c,24] In einem weiteren Ansatz wurde die Pyrolyse kurzkettiger Alkane an den Innenwänden der Spitzen erhitzt Quarzmikropipetten verwendet, um sehr kleine Koh-

lenstoffscheibenelektroden herzustellen. Die Pipettenöffnungen waren vollständig mit dem pyrolytisch erzeugten Kohlenstoff gefüllt, und die Ablagerungen wiesen eine ausreichende Leitfähigkeit für die Verwendung als miniaturisierte Elektrode auf.^[25]

Die erfolgreiche Detektion anderer chemischer Botenstoffe als Catecholamine auf der Ebene einzelner Zellen beruht auf der Verwendung chemisch modifizierter UMEs, die katalytische Aktivität hinsichtlich möglicher Redoxreaktionen des interessierenden Analyten aufweisen. Eine kürzlich erschienene Übersicht^[26] liefert Informationen über Strategien zur Modifizierung von Elektrodenoberflächen, um die Detektion physiologisch wichtiger Verbindungen wie NO, Glucose oder Insulin in biologischen Proben zu ermöglichen. Die Modifizierung von Elektrodenoberflächen mit Metallporphyrinen erwies sich als optimal, um UMEs für die Detektion der NO-Ausschüttung an einzelnen Zellen zu erhalten. Miniaturisierte Biosensoren mit integrierter Glucose-oxidase (GOx) oder Glutamatoxidase (GluOx) wurden für die Bestimmung von Glucose an einer Zelle bzw. für die Verfolgung der Glutamatkonzentration zugänglich. Die Sekretion von Insulin aus einer einzelnen Zelle konnte mit einer scheibenförmigen UME nachgewiesen werden, die mit einem gemischtsalvalenten Rutheniumoxid/Cyanoruthenat-Film modifiziert war.

Nackte scheibenförmige Pt-UMEs werden vor allem für die Bestimmung des lokalen O₂-Partialdrucks im extrazellulären Milieu in unmittelbarer Nachbarschaft „atmender“ lebender Zellen benutzt. Typischerweise werden solche Elektroden durch Einschmelzen von Platinmikrodrähten in dünne, ausgezogene Glaskapillaren hergestellt, gefolgt von Schleifen und Polieren, um eine in Glas integrierte Pt-Scheibe freizulegen. Unterschiedliche Modelle miniaturisierter membranüberzogener Clark-O₂-Elektroden für Einzelzellstudien sind von verschiedenen Firmen kommerziell erhältlich. Die Herstellung von Pt-UMEs mit Durchmessern im Nanometerbereich^[27] wurde kürzlich von einigen Arbeitsgruppen beschrieben. Solche UMEs könnten geeignet sein, um die örtliche Auflösung der Detektion des zellulären O₂-Verbrauchs zu verbessern. Allerdings konnte das Potenzial dieses Ansatzes bisher nicht ausgeschöpft werden, da sich die exakte Positionierung an der Membran der zu untersuchenden Zelle als schwierig herausstellte. Eine selbstreferenzirende polarographische Mikroelektrode wurde entwickelt, um selektiv O₂-Flüsse von einzelnen Zellen mit guter Empfindlichkeit und lateraler Auflösung in Echtzeit zu messen.^[28]

Scheibenelektroden mögen zwar für extrazelluläre Messungen genügen, für intrazelluläre voltammetrische Bestimmungen sind naturgemäß aber viel spitzere UMEs notwendig. Die Spitzen müssen sanft durch die Zellmembran in das Zytosplasma eindringen, um eine ernste Schädigung der Zelle zu vermeiden. Schon 1967 wurde über das Konzept einer voltammetrischen Mikroelektrode für die Bestimmung des intrazellulären O₂-Partialdrucks berichtet.^[29] Viel später erst konstruierte Ewings Arbeitsgruppe extrem kleine Kohlenstoffringe-Elektroden,^[30] die für die intrazelluläre voltammetrische Bestimmung von Dopamin^[31] und – nach Modifikation der Oberfläche mit Schichten aus Pt/Nafion oder Pt/GOx/Nafion – von O₂^[32] bzw. Glucose^[33] verwendet wurden.

Meulemans et al. entwickelten Methoden zur Konstruktion glasisolierter nadelförmiger Pt-[³⁴] und C-Mikroelektroden[³⁵] für die intrazelluläre voltammetrische Bestimmung redoxaktiver Spezies. Taha et al. berichteten schon in den frühen 1990er Jahren, dass chemisch modifizierte Spitzen flammengeätzter und polymerisierter Kohlenstofffasern effektiv durch Zellmembranen gestoßen und dann genutzt werden können, um im Zytoplasma Spuren von NO[³⁶] (CF-UME mit dünnen Polymerfilmen aus Nickel(II)-tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)porphyrin (TMHPP-Ni)/Nafion) oder Metallionen (CF-UME mit TMHPP-Ni oder Quecksilber) zu bestimmen.[³⁷]

3. Beispiele für intrazelluläre Voltammetrie

Die metabolischen und katabolischen Pfade bei der biochemischen Prozessierung und Signalweiterleitung im Zytosol beziehen selbstverständlich eine riesige Zahl an (bio)chemischen Substanzen ein, von denen einige redoxaktive Gruppen tragen und daher mit voltammetrischen Methoden bestimmt werden können. Die Entwicklung der intrazellulären Voltammetrie war durch den Wunsch motiviert, die Dynamik der zytosolischen Metabolite und chemischen Transmittermoleküle sowie die zeitlichen Änderungen ihrer Konzentrationen als Folge von Membrantransportprozessen in Echtzeit zu verfolgen. Entsprechende Untersuchungen könnten das Wissen um den Metabolismus, die Funktionen und die Regulation in einzelnen Zellen vertiefen, und dabei helfen, die Mechanismen der Signalübertragung bei der interzellulären Kommunikation in großen Zellnetzwerken zu interpretieren. Darüber hinaus kann die quantitative Bestimmung des Transportes elektroaktiver Wirkstoffe und Gifte durch die Zellmembran hilfreiche Informationen für pharmakologische und toxikologische Entwicklungen liefern.

Entwicklungen in einer Reihe von Arbeitsgruppen führten in den 1980er Jahren zu voltammetrischen Elektroden, die spitz genug waren, um Zellmembranen mit minimaler Schädigung und vernachlässigbarem Verlust an Sensorempfindlichkeit zu durchstechen. Die ersten Berichte, in denen das Potenzial der Voltammetrie an Mikroelektroden im Innern von Zellen erforscht wurde, hatten die Verfolgung intrazellulärer Konzentrationen von O₂, Glucose, NO und einer Reihe biologisch relevanter Spurenmetalle und Wirkstoffe zum Ziel. Meulemans et al. inkubierten beispielsweise individuelle kultivierte Neurone aus präparierten Buccalganglien der Meeresschnecke *Aplysia Californica* mit physiologischen Pufferlösungen, die Antipyrine oder Metronidazole enthielten. Sie beobachteten dann den zeitlichen Verlauf der zellulären Aufnahme und des Ausscheidens dieser redoxaktiven Wirkstoffe mit intrazellulärer Differenzpulsvoltammetrie (DPV).[³⁵] Weiterhin konnten sie erfolgreich die intraneuronale Konzentration von Serotonin (5-HT) in lebenden serotonergen metacerebralen Zellen des gleichen Tiers bestimmen. Änderungen in der intrazellulären 5-HT-Konzentration wurden in Echtzeit mithilfe von DPV an einer glasisolierten nadelförmigen Pt-UME über mehrere Stunden nach der Stimulation der Neuronen verfolgt (entweder nach intrazellulärer Injektion von 5-HT oder extrazellulärer Gabe von L-

Tryptophan, Reserpin oder *p*-Chlorphenylalanin).[³⁴] Kohlenstoffringe-Elektroden wurden im Innern des dopaminergen Riesen-neurons der Schnecke *P. Corneus* platziert und amperometrisch auf ein konstantes Potential polarisiert, um die zytosolische Dopaminkonzentration zu verfolgen und den Membrantransport und metabolischen Abbau von Dopamin zu quantifizieren.[^{31,38}] Diese Untersuchungen belegten, dass das Füllen von neu gebildeten Speichervesikeln mit lokal verfügbaren Transmittermolekülen einen wichtigen Prozess im frühen Stadium der Exozytose darstellt. Allerdings muss dieser Prozess effektiv mit dem Verlust der Transmittermoleküle durch die Zellmembran konkurrieren.

Die Zellatmung ist eine weitere Aktivität, die für die ordnungsgemäße physiologische Funktion einzelner lebender Zellen von großer Bedeutung ist. Die effiziente O₂-Aufnahme ist eng verknüpft mit der Verfügbarkeit von Energie für die unterschiedlichsten biochemischen Prozesse im Zytoplasma. Ewing et al. nutzten die intrazelluläre quantitative Verfolgung der O₂-Konzentration mithilfe Nafion-beschichteter platinierter Kohlenstoffring-UMEs, um die relative zytosolische O₂-Konzentration im dopaminergen Riesen-neuron von *P. Corneus* zu bestimmen. (Auch diese Zelle ist in den Neurowissenschaften ein anerkanntes Modellsystem für Einzelzellexperimente.) Der Vergleich von ruhenden Neuronen und Neuronen, die mit hohen Kaliumkonzentrationen stimuliert waren, zeigte, dass mit der stimulierten vesikulären Dopaminausschüttung offensichtlich ein erhöhter intrazellulärer Sauerstoffverbrauch einhergeht. Dieser Effekt wurde mit einem größeren Energiebedarf der Zellen für den Vesikeltransport und die Exozytose erklärt.[³²]

NO kann in biologischen Systemen sowohl zytotoxisch als auch als schnell diffundierender Botenstoff agieren. NO kann schnell in eine Vielzahl von Signaltransduktionspfaden in der Zielzelle eingreifen und ist folglich an Prozessen wie der neuronalen Signalübertragung, der Immunantwort, der Modulation von Ionenkanälen, zellulären Abwehrmechanismen oder der Gefäßerweiterung beteiligt. NO wird in bestimmten Zellen von Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen NO-Synthasen (NOS) durch die enzymkatalysierte Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin synthetisiert. Um die komplexen Mechanismen NO-regulierter zellulärer Funktionen zu verstehen, muss daher die Dynamik der intrazellulären NO-Produktion aufgeklärt werden. Malinski und Taha gingen diese Aufgabe als Erste mit elektrochemischen Methoden an, indem sie die Spitzen NO-empfindlicher CF-UMEs im Innern individueller kultivierter Endothelzellen platzierten. Die voltammetrischen Sensoren wurden angewendet, um die Erhöhung zytosolischer NO-Konzentrationen nach einem Bradykinin-stimulierten Einsetzen der NOS-Aktivität in Echtzeit zu verfolgen.[³⁶] Nachdem Poly-TMHPP-Ni-Filme auf CF-UMEs in saurer Lösung demetalliert wurden, konnten diese Sensoren sehr selektiv durch einen Ionenaustauschprozess gegen Protonen des Porphyrinrings erneut Ni²⁺-Ionen aufnehmen. Der Strom, der infolge der Oxidation von Ni²⁺ zu Ni³⁺ im Polymerfilm fließt, erzeugt das analytische Signal für die Quantifizierung der Ni²⁺-Ionen. Solche Sensoren wurden im Zytosol individueller Myozyten oder Hepatomzellen eingesetzt, und es konnte gezeigt werden, dass sie ausreichend empfindlich für die Detektion kleinsten Ni²⁺-Konzentratio-

nen in Zellen und für die zeitliche Verfolgung der Aufnahme von Ni^{2+} -Ionen in das Zytoplasma waren, wenn die untersuchten Zellen in Pufferlösungen mit höheren Konzentrationen dieses Ions inkubiert wurden.^[37]

Die genannten Beispiele beweisen, dass die intrazelluläre Voltammetrie Einsichten in relevante physiologische Aktivitäten von Zellen liefern konnte. Im Unterschied zu Untersuchungen, die sich der extrazellulären Voltammetrie an scheibenförmigen UME in der Nähe von Zellen bedienten, flauten die Aktivitäten auf diesem Forschungsgebiet nach einer enthusiastischen Anfangsphase etwas ab. Dies verdeutlicht zu einem gewissen Grad, wie schwierig es ist, gut funktionierende UMEs für intrazelluläre elektrochemische Messungen herzustellen, zu platzieren und am Einsatzort zu betreiben, ohne das lebende Studienobjekt zu verletzen.

4. Beispiele „konventioneller“ extrazellulärer Voltammetrie

„Konventionelle“ extrazelluläre Voltammetrie soll hier definiert werden als voltammetrische Detektion nahe der äußeren Zellmembran mit scheibenförmigen UMEs, die mithilfe eines inversen Mikroskops und piezoelektrischer oder hydraulischer Mikropositionierterste gesteuert werden können. Die exakte Topographie der untersuchten Zelle ist beim Positionieren der UME allerdings nicht bekannt.

Das prominenteste Beispiel für dieses biologische Voltammetrieverfahren ist die hoch empfindliche elektrochemische Detektion der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose, einer synchronisierten Kaskade von intrazellulären Ereignissen (Abbildung 4 A), die in sekretorischen und neuronalen Zellen zur Ausschüttung von Hormonen und Neurotransmittern aus membrangebundenen zytosolischen Speichervesikeln in den extrazellulären Raum oder den synaptischen Spalt führt. Vor der Exozytose werden die sekretorischen Vesikel in einer Sequenz von Schritten gebildet und mit einem bestimmten chemischen Botenstoff gefüllt. Die gefüllten Vesikel werden zuerst als Reserve zurückbehalten und, sobald sie für die Zellkommunikation benötigt werden, zur Plasmamembran transportiert, wo sie durch komplexe Wechselwirkungen mit Membranproteinen andocken. Um für die instantane Ausschüttung bereit zu sein, muss ein frisch angedocktes Vesikel zunächst eine Reihe von Proteinbindungen auf molekularer Ebene umordnen. Ein externer Stimulus, der das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen auslöst, wird in diesem Zustand infolge des plötzlichen Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration nahezu augenblicklich die Exozytose auslösen. Die Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran führt zur Bildung einer kleinen offenen Fusionspore und schließlich zu einer vollständigen Ausschüttung der Botenstoffmoleküle aus dem kollabierenden Vesikel.

Einer geordneten dynamischen Wechselwirkung der vielen Vesikel- und Plasmamembranproteine wird eine große Bedeutung zugemessen – nicht nur für das Andocken der Vesikel, sondern auch für die spätere zeitliche Steuerung der Membranfusion und die Ausschüttung der Sekretionsprodukte.^[39] Die exakte Funktion der identifizierten Proteine und ihr Einfluss auf die Dynamik der Vesikelexozytose

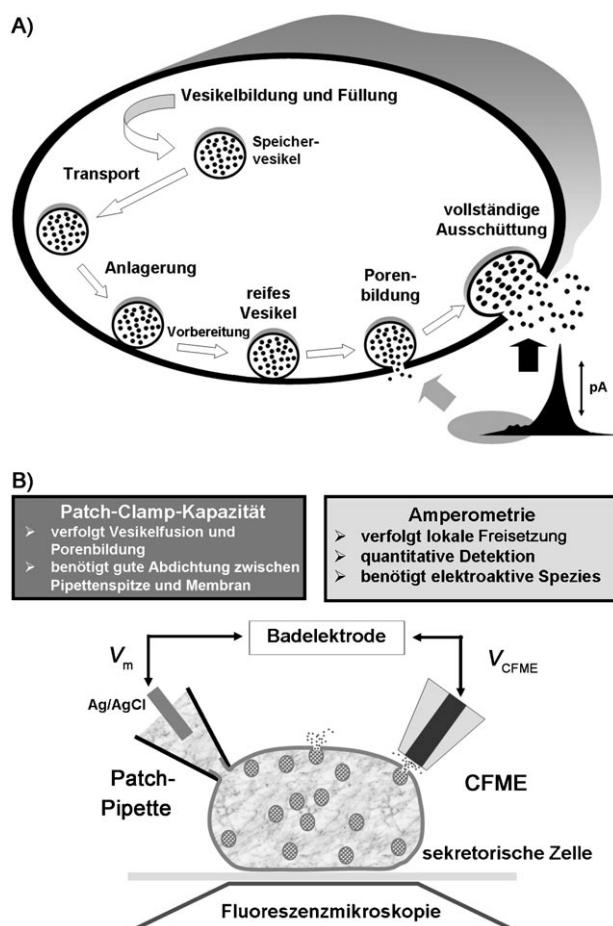


Abbildung 4. A) Schritte bei der durch Ca^{2+} -Einstrom ausgelösten Vesikelexozytose, die letztlich zur quantitativen Ausschüttung sekretorischer Produkte führt. Amperometrische Stromspikes als Folge der Oxidation von entladenen Transmittermolekülen an einer in der Nähe positionierten CF-UME belegen die Schritte beim Öffnen der Fusionspore: Nach einem kleinen „Fußsignal“ zeigt ein deutlicher Stromanstieg die vollständige Ausschüttung an. B) Die drei wichtigsten Analyseschemata, um die intrazelluläre Bewegung sekretorischer Granula und die exozytische Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen bei der Fusion eines einzelnen sekretorischen Vesikels in Echtzeit zu verfolgen: Fluoreszenzmikroskopie in verschiedenen Konfigurationen kann den vollständigen Lebenszyklus eines sekretorischen Vesikels visualisieren, falls dessen Inhalt und/oder die Membran mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Patch-Clamp-Kapazitätsmessungen sind geeignet, um Änderungen in der Gesamtkapazität der Zellmembran zu verfolgen und so die Prozesse der Vesikelfusion und das Öffnen der Fusionspore zu detektieren. Amperometrie an einer geeignet platzierten und polarisierten CF-UME kann mit hervorragender Empfindlichkeit die Oxidation von chemischen Botenstoffen an der Sensoroberfläche detektieren und liefert Information über den zeitlichen Verlauf eines Ausschüttungereignisses.

wurden daher aktiv erforscht, mit dem Ziel, die molekularen Mechanismen hinter dem gemeinsamen Modus der chemischen Zell-Zell-Kommunikation im menschlichen Gehirn und dem Nervensystem von Säugetieren aufzuklären.

In Abbildung 4B sind drei moderne bioanalytische Detektionsverfahren gezeigt, die häufig für das Studium der unterschiedlichen Phasen der vesikulären Botenstoffausschüttung auf der Ebene einzelner Zellen angewendet werden. Technisch ausgefeilte Varianten der hochauflösen-

den Fluoreszenzmikroskopie wurden zu optischen Routine-techniken entwickelt, um einen detaillierten Einblick in prinzipiell alle Schritte im Lebenszyklus eines sekretorischen Vesikels zu erhalten. Der Erfolg dieser Methode beruht zum einen auf der Auswahl geeigneter Fluoreszenzmarkierungen für die Reaktionspartner und zum anderen auf der Qualität der optischen Abbildungsverfahren, beispielsweise der konfokalen oder der Totalreflexionsmikroskopie.^[40] Der Fortgang der Membranfusion und das Öffnen der Fusionspore zu Beginn der Einzelvesikelexozytose wurden mithilfe von hochauflösenden Patch-Clamp-Membrankapazitätsmessungen zugänglich gemacht.^[41] Tatsächlich ist diese Technik ausreichend empfindlich, um das winzige Anwachsen der Zelloberfläche durch das Inkorporieren der Membran eines verschmelzenden Vesikels in Form einer merklichen Signaldifferenz bei der Aufnahme der Gesamtmembrankapazität in Echtzeit zu erfassen. Schließlich hat sich die örtlich begrenzte Voltammetrie an CF-UMEs in unmittelbarer Nähe der Zellmembran zu einer komplementären Technik entwickelt. Mit diesem Verfahren lassen sich Fusionsereignisse darstellen, da es eine hoch empfindliche, direkte und quantitative Messung sowohl des frühzeitigen Verlustes von Botenstoffmolekülen aus unreifen Fusionsporen als auch der gesamten Ausschüttung aus schließlich vollständig kollabierenden sekretorischen Vesikeln ermöglicht. Die Vorteile und Einschränkungen der Amperometrie und schnellen Cyclovoltammetrie an Kohlenstofffaserelektroden sowie Anwendungen dieser Methoden für die Detektion der Exozytose von einzelnen Zellen und eine Beschreibung der Datenanalyse solcher Messungen wurden bereits in Übersichten behandelt.^[42]

Die Nebennieren von Rindern und Ratten lieferten die ersten Modellzellen, an denen die direkte elektrochemische Detektion einzelner Exozytoseereignisse gelang.^[43] In der bahnbrechenden Arbeit hierzu wurde die Spitze einer anodisch polarisierten scheibenförmigen CF-UME so nah wie möglich an der Zellmembran einer einzelnen Adrenalin ausschüttenden Chromaffinzelne positioniert, und die rauscharme amperometrische Stromantwort an der Mikroelektrode wurde über der Zeit aufgezeichnet. Unter diesen Bedingungen führte die chemische Stimulation von Zellen reproduzierbar zum gehäuften Auftreten von Stromspikes, die mit der Ausschüttung diskreter Pakete („Quanten“) an Neurotransmittermolekülen aus einzelnen fusionierenden und kollabierenden Vesikeln in Zusammenhang gebracht werden konnten. Die ausgeschütteten Neurotransmittermoleküle wurden durch ihre elektrochemische Oxidation an der UME-Oberfläche detektiert. Nach dem ersten erfolgreichen Experiment wurde die amperometrische Detektion der Ausschüttung weiter verbessert, sodass mithilfe der Technik bald sogar kleine Sockel- oder Fußsignale, wie sie manchmal zu Beginn eines singulären exozytotischen Stromspikes auftreten, erfasst werden konnten. Diese Sockelsignale sind in Einklang mit dem langsamen Auswaschen der Catecholamin-Moleküle durch die sich gerade öffnende Fusionspore vor dem vollständigen Kollaps des Vesikels und der daraus resultierenden Exozytose.^[44]

Man entdeckte schnell, dass die quantitative Analyse der charakteristischen Merkmale der Stromtransienten in den amperometrischen Aufzeichnungen von Exozytoseereignis-

sen wertvolle Informationen für die Aufklärung des Mechanismus und der Kinetik der exozytotischen Reizleitung enthielten. Die obligatorische Spikeanalyse und Interpretation muss daher mit einer tiefgehenden statistischen Bewertung von Schlüsselparametern wie der Spikefrequenz, der Geschwindigkeit des Stromanstiegs, der Stromamplitude, der übertragenen Ladung, der Halbwertsbreite sowie der Zahl und Kontur der Fußsignale einhergehen. Da die amperometrische Aufzeichnung von Einzelvesikelexozytose-Ereignissen zu riesigen Datenmengen führt, wurden Datenerfassungs- und Datenanalysesoftwaremodule in verschiedenen Programmiersprachen entwickelt, um die manuelle oder automatische Spikeanalyse zu erleichtern.^[44,45] Pro Vesikel wird durchschnittlich eine bestimmte Zahl an Neurotransmittermolekülen ausgeschüttet. Folglich kann das Vorhandensein einer Population von Vesikeln, die sich in der Größe oder der Konzentration ihres Inhalts unterscheiden, aus Histogrammen der übertragenen Ladung während einzelner Stromspikes abgeleitet werden. Der zeitliche Verlauf des Öffnens der Fusionsporen und der späte Zeitraum der Ausschüttung auf der anderen Seite ergibt sich aus der Verteilung der Anstiegszeit der Stromspikes und ihrer Halbwertbreite. Falls die chemische Identität des ausgeschütteten Botenstoffes unbekannt sein sollte, kann sie durch schnelle Cyclovoltammetrie („fast-scan cyclic voltammetry“) an der positionierten CF-UME^[46] aufgeklärt werden, wobei Voltammogramme nach Subtraktion des Hintergrundstromes einen „Fingerabdruck“ liefern, mit dessen Hilfe die ausgeschütteten Moleküle identifiziert werden können. Die voltammetrische Detektion von Exozytoseereignissen kann selbstverständlich nur mit solchen Zellen gelingen, die leicht oxidierbare Neurotransmitter oder Hormone ausschütten. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden Zellkulturprotokolle entwickelt, bei denen es möglich ist, sekretorische Zellen mit exogenen Neurotransmittern zu beladen, die leicht an geeignet polarisierten CF-UMEs oxidiert werden können.^[47]

Allein oder in Verbindung mit Patch-Clamp- oder Fluoreszenzmessungen ist die Kohlenstofffaser-Amperometrie an einzelnen Zellen heute eine verbreitete mikroelektrochemische Standardmethode, um die molekularen Ereignisse zu untersuchen, welche die exozytotische Ausschüttung von chemischen Botenstoffen vermitteln. Isolierte Chromaffinzelnen aus Rindern, Ratten oder Mäusen wurden systematisch untersucht und als native oder genetisch modifizierte Präparationen eingesetzt.^[48] Weitere Zellen, die in der Untersuchung von Exozytoseereignissen Verwendung finden, sind Phäochromozytom(PC12)-Zellen,^[49] Mastzellen,^[49a,50] Beta-zellen aus der Bauchspeicheldrüse,^[49d,51] humane BON-Zellen,^[52] basophile Leukämiezellen aus Ratten (RBL-2H3),^[53] Astrozyten aus dem Rattenhippocampus,^[54] verschiedene Neuronenkulturen,^[55] Chromaffinzellen in Schnitten der Nebenniere von beispielsweise Mäusen,^[56] Angiomyoneurozellen in Schnitten des Karotidkörpers aus Ratten^[57] und nicht zuletzt Neurone aus akuten Hirnschnitten.^[58]

Das Ergebnis aus einer großen Zahl von Publikationen, von denen nur wenige repräsentative Beispiele in Lit. [48–58] genannt sind, hat zu einem verbesserten Verständnis darüber geführt, wie sekretorische Zellen des endokrinen Systems und

Neuronen aus dem Gehirn ihre chemischen Botenstoffe ausschütten. Wie kürzlich in einer Zahl von Veröffentlichungen zusammengefasst wurde, wurden zumindest drei unterschiedliche Arten der vesikulären Exozytose identifiziert.^[39] Gemäß dem „Alles-oder-Nichts“-Mechanismus fusionieren sekretorische Vesikel mit der Zellmembran, bilden eine Fusionspore, kollabieren und verteilen ihren Inhalt vollständig in das extrazelluläre Milieu. Allerdings werden nach der Bildung der engen Fusionspore manchmal Fluktuationen um einen kleinen mittleren Porendurchmesser („Fusionsporenflimmern“) oder sogar ein transientes Schließen beobachtet, bevor sich die Fusionspore irreversibel ausdehnt und das Vesikel seinen Inhalt ausschüttet. Dieser Flimmermechanismus ist typisch für die kleinen Vesikel neuronaler Zellen und ist möglicherweise eine Option, um das Ausmaß der Ausschüttung zu kontrollieren. Ein Mechanismus mit kurzer Membranberührung wurde als ein dritter Typ der Exozytose beobachtet („kiss and run mechanism“); dabei fusionieren die Vesikel kurz mit der Plasmamembran, schütten einen kleinen Anteil des gespeicherten Botenstoffes aus und kehren dann ins Zellinnere zurück, wo sie entweder warten, bis sich der Prozess wiederholt, oder zuerst mit dem Botenstoff beladen werden.

Die genauen Abläufe bei der Bildung und Weiterverarbeitung der Fusionspore sind auf molekularer Ebene bislang noch wenig verstanden. Zusätzlich ist noch unbekannt, aus welchem Grund neuronale Zellen und Vesikel bei bestimmten Bedingungen einen Modus der Exozytose auswählen. Um diese Punkte aufzuklären, sind systematische Studien an genetisch modifizierten sekretorischen Zellen erforderlich, denen das eine oder andere der vielen hoch spezialisierten Membranproteine in der Plasma- oder Vesikelmembran fehlt. Ideale Experimente folgen einem multidimensionalen Ansatz: Die exozytische Antwort der Zielzelle wird gleichzeitig mit Kohlenstofffaser-Amperometrie und mit komplementären Detektionsschemata wie den erwähnten optischen und elektrophysiologischen Analyseverfahren gemessen. Wenn man in dieser Art detailliert die Einzelvesikellexozytose betrachtet, sollte es nach umsichtiger Auswertung der zugänglichen Daten gelingen, den Einfluss einzelner Proteine auf den Porenbildungs- und Porenerweiterungsprozess sowie auf den zeitlichen Verlauf der Transmitterausschüttung zu ermitteln.

Einige neuere elektrochemische Strategien auf der Ebene einzelner sekretorischer Zellen sind es wert, hier kurz genannt zu werden, auch wenn sie über unsere Definition der konventionellen extrazellulären Voltammetrie hinausgehen. Beispielsweise wurden Glasobjektträger mit optisch transparentem und elektrisch leitfähigem Indiumzinnoxid (ITO) strukturiert, sodass gut definierte ITO-Mikroelektroden entstanden, auf die sekretorische Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät werden können.^[59] Die Anwendbarkeit der miniaturisierten ITO-Strukturen für kombinierte optische und elektrochemische Studien auf der Ebene einzelnen Zellen wurde von Amatore et al. nachgewiesen, die gleichzeitig farbstoffbeladene Chromaffinzellen durch Fluoreszenzmikroskopie abbilden und die Botenstoffausschüttung mithilfe von ITO-Mikroelektroden, die sie als amperometrische Sensoren betrieben, detektieren konnten.^[59a] Nach einer

weiteren Miniaturisierung und Optimierung könnten ITO-basierte Mikrochips früher oder später für ein optoelektronisches Hochdurchsatz-Screening der Exozytose eingesetzt werden. Ein Mikrofluidiksystem, das den Transport und die Fixierung sekretorischer Zellen mit amperometrischer Detektion der Einzelzellsekretion^[60] auf einem Chip kombiniert sowie ein Array aus Pikoliter-Reaktionsgefäß für einzelne Chromaffinzellen mit Pt-UMEs am Gefäßboden^[61] wurden bereits als Alternativen für eine schnelle und automatisierte Analyse der Einzelzelllexozytose vorgeschlagen. Hafez et al. stellten durch Mikrofabrikation eine Anordnung von vier Platinmikroelektroden in geringem Abstand auf einem Glasobjektträger her. Sie konnten diese Messanordnung für eine örtlich definierte Detektion der Öffnung von Fusionsporen an unterschiedlichen Stellen einer individuellen sekretorischen Zelle nutzen, die auf dem Mikroelektrodenarray lokalisiert und für die Transmitterausschüttung stimuliert worden war.^[12] Schließlich wurde die Patch-Amperometrie als eine Technik eingeführt, die Patch-Clamp-Messungen zur Änderung der Zellmembrankapazität, und somit Aussagen über die Vesikelgröße, mit Amperometrie an einer CF-UME kombiniert, die im Innern der Patch-Pipette platziert ist und die Quantifizierung von Transmitterausschüttung ermöglicht. Mit einer solchen Strategie wurde die Exozytose an den kleinsten sekretorischen Organellen, den kleinen synaptischen Vesikeln mit Durchmessern von einigen 10 nm, studiert.^[62] Diese Vesikel sind viel kleiner als die Vesikel mit dichtem Kern aus Chromaffin- oder Mastzellen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Patch-Amperometrie ausreichend empfindlich ist, um die geringen Kapazitätssprünge, die durch die Fusion synaptischer Vesikel induziert werden, in Echtzeit aufzulösen und sie zusammen mit den amperometrischen Spikes infolge der Ausschüttung der geringen Transmittermengen aus einem Vesikel darzustellen.

Die meisten aktuellen Arbeiten zur Voltammetrie an Mikroelektroden, deren Mess-Spitzen an der äußeren Oberfläche von Zellen positioniert sind, befassen sich mit der Detektion der Ausschüttung von Neurotransmittern oder Hormonen durch Exozytose von sekretorischen Zellen. Daher wurden auch hier vornehmlich diese Messungen zusammengefasst, allerdings können auch andere wichtige physiologische Prozesse in ähnlicher Weise adressiert werden. Beispiele sind: 1) die Bestimmung des Transmembranfluxes von Sauerstoff mithilfe selbstreferenzierender Platinmikroelektroden,^[28] 2) die elektrochemische Visualisierung der Sauerstoffproduktion in einzelnen Algenprotoplasten nach Bestrahlung,^[63] 3) die Bestimmung der zellulären Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies, z.B. des Superoxidions O_2^- , H_2O_2 oder NO, in Echtzeit an Mikroelektroden, die in unmittelbarer Nähe bestimmter Zellen positioniert sind,^[64] 4) die elektrochemische Detektion der Abgabe von Wirkstoffen aus einzelnen beladenen Zellen mithilfe scheibenförmiger CF-UMEs^[65] und 5) die Bestimmung des Cholesteringehaltes in der Plasmamembran einer einzelnen Zelle mit Pt-UMEs, die mit Cholesterin-Oxidase-haltigen Lipidmembranen modifiziert waren.^[66]

5. Elektrochemische Rastermikroskopie (SECM) an einzelnen Zellen

Die Erfindung der elektrochemischen Rastermikroskopie (SECM) in den späten 1980er Jahren war ein bedeutender Fortschritt für die Grenzflächenwissenschaften. SECM beruht auf der experimentellen Beobachtung eines bemerkenswerten Phänomens: der Abhängigkeit des kleinen Faraday-Stroms durch eine scheibenförmige UME, der durch die Umwandlung einer gelösten redoxaktiven Spezies bei einem konstantem Spitzenzpotential erzeugt wird, vom Abstand L zwischen der Spitze und der Probe sowie den chemischen Eigenschaften der Fest-flüssig-Grenzfläche.^[15] Die Methodik der SECM und der Entwicklungsstand der SECM-Geräte sowie ein breites Spektrum biologischer (und nichtbiologischer) Anwendungen wurden bereits in einer Monographie^[67] und zahlreichen Übersichten^[68] zusammengefasst. Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Beschreibung der grundlegenden Prinzipien dieser Technik und fasst SECM-Anwendungen auf der Ebene von einzelnen Zellen zusammen.

5.1. Prinzipien der Visualisierung mithilfe von SECM

Wenn eine scheibenförmige UME in eine Lösung eintaucht, die eine reversibel oxidierbare/reduzierbare Spezies enthält, zeigt sie ein typisches sigmoides Cyclovoltammogramm und einen diffusionskontrollierten stationären Grenzstrom I_{∞} , zumindest bei Potentialen, die das Redoxpotential des Mediators deutlich übersteigen (Abbildung 5A). Aus dem Durchmesser d der Mikroelektrode, dem Diffusionskoeffizienten D und der Konzentration c des Redoxmediators, sowie der Zahl n der bei der Redoxreaktion an der Elektroden spitze übertragenen Elektronen, kann $I_{\infty} = 2nFDcd$ berechnet werden. Wird eine UME an einer präzisen Mikropositioniereinheit befestigt und als Spitz in einem elektrochemischen Rastermikroskop in unmittelbare Nachbarschaft einer isolierenden Probe gebracht, so wird die hemisphärische Diffusion der Mediatormoleküle in Richtung der aktiven Mikroelektrodenoberfläche physikalisch behindert, was zu einem Absinken des Stroms durch die SECM-Spitze führt (negative Rückkopplung; Abbildung 5B). Dagegen können Redoxmediatormoleküle, die zuerst an der SECM-Spitze reduziert (oder oxidiert) werden, in ihren Ausgangszustand zurückreagieren, falls die SECM-Spitze vor einer elektrochemisch aktiven Oberfläche positioniert ist. Als Folge dieses Redoxzyklus ist der Spitzenzstrom hier höher als im Volumen der Lösung (positive Rückkopplung, Abbildung 5C).

Die SECM-Abbildung im amperometrischen Rückkopplungsmodus nutzt vorteilhaft die oberflächenabhängige Modulation des Stromsignals und umfasst 1) das Aufprägen eines konstanten Potentials an der SECM-Spitze, um einen stationären Strom im Volumen der Lösung zu erhalten, 2) die Annäherung der SECM-Spitze in Richtung der Probenober-

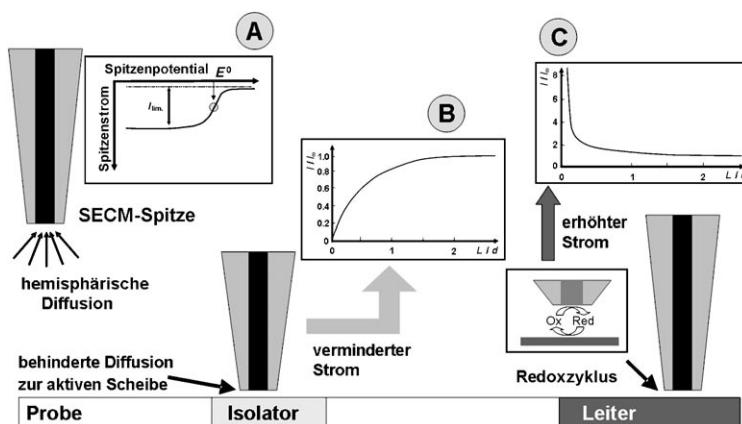


Abbildung 5. Grundlagen der elektrochemischen Rastermikroskopie (SECM). A) In Lösungen, die einen Hilfselektrolyten und beispielsweise eine reduzierbare redoxaktive Komponente enthalten, führt die Cyclovoltammetrie an einer scheibenförmigen Ultramikroelektrode (UME, SECM-Spitze) zu sigmoiden Strom-Spannungs-Kurven mit einem stationären diffusionslimitierten Grenzstrom I_{∞} , der dann gemessen wird, wenn das Potential an der Elektrode ausreichend kathodisch gegenüber dem Formalpotential des gelösten Redoxmediators unter den experimentellen Bedingungen ist. B,C) In z-Annäherungskurven wird der amperometrische Sondenstrom I , normalisiert mit I_{∞} , als Funktion des Spitz-Probe-Abstands L , normalisiert mit dem aktiven Durchmesser d der UME, aufgetragen. Die Kurven zeigen die Entwicklung des Spitzenzstroms bei abnehmendem Abstand der SECM-Sonde zu einer elektrochemisch passiven, isolierenden oder einer elektrochemisch aktiven, leitfähigen Oberfläche. B) In unmittelbarer Nähe zu einem Isolator ist der diffusionskontrollierte Massentransport der redoxaktiven Spezies in Richtung der Elektroden spitze offensichtlich physikalisch gehindert, sodass der Sondenstrom I signifikant abfällt (negative Rückkopplung). C) In der Nähe einer leitfähigen Oberfläche können an der Spitze umgesetzte Redoxspezies wieder in ihren Ausgangsoxidationszustand überführt werden. Mit abnehmendem Spitz-Probe-Abstand L wird dieser Prozess effizienter, und der Sondenstrom steigt (positive Rückkopplung).

fläche und die Positionierung der Spitz im Bereich der negativen und positiven Rückkopplung und 3) eine Rasterbewegung der SECM-Spitze in konstanter Höhe z („Arbeitsabstand“) über die Oberfläche und die Messung des Sondenstroms als Funktion der lateralen (x,y -) Position. Der geeignete Arbeitsabstand für eine bestimmte SECM-Spitze wird aus z-Annäherungskurven ermittelt, die Auftragungen des normalisierten Sondenstroms (I/I_{∞}) gegen den normalisierten Abstand zwischen Spitz und Probe (L/d) darstellen. Beim x,y -Rastern in konstanter Höhe über homogene isolierende oder leitfähige Oberflächen zeigen Änderungen des Stroms durch die SECM-Spitze die Oberflächentopographie an (siehe Abbildung 6). Stromschwankungen in SECM-Bildern, die im Rückkopplungsmodus über weitgehend flachen Proben mit benachbarten leitfähigen und isolierenden Regionen erhalten wurden, zeigen die lokalen Änderungen der Grenzflächenleitfähigkeit. Allerdings wird für rauere Oberflächen, die gleichzeitig Variationen in der Oberflächenleitfähigkeit aufweisen, keine eindeutige Korrelation zwischen Sondenstrom und Oberflächenaktivität erhalten. Der Strom durch die SECM-Spitze ist dann eine Überlagerung der Beiträge des Abstandes und der lokalen elektrochemischen Aktivität der Oberfläche. Folglich sind weitere Informationen zur Probenmorphologie notwendig, um eine aussagekräftige Interpretation der lokalen elektrochemischen Aktivität zu erhalten.

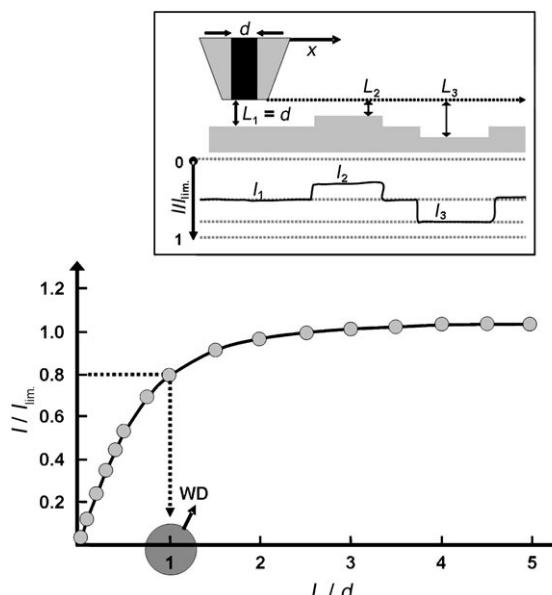


Abbildung 6. Abbildung der Topographie einer homogenen isolierenden Probe durch SECM mit negativer Rückkopplung. Zuerst wird eine z-Annäherungskurve aufgenommen (normalisierter Sondenstrom gegen den normalisierten Spitze-Probe-Abstand), die genutzt wird, um den geeigneten Arbeitsabstand (WD) für die SECM-Spitze festzulegen. Im Allgemeinen werden Abstände gewählt, bei denen der Sondenstrom auf ungefähr 60–80% des Wertes im Volumen der Lösung abgefallen ist. Die SECM-Spitze wird dann bei dem vorher definierten WD (konstante Höhe z) in der x,y -Ebene über die Probenoberfläche gerastert, während der Sondenstrom als Funktion der Spitzenposition aufgezeichnet wird. Bei homogenen isolierenden Grenzflächen zeigen Schwankungen des Sondenstromes direkte Variationen der Probentopographie an (siehe Einschub).

SECM im Rückkopplungsmodus beruht auf der Gegenwart eines aktiven Redoxmediators im Elektrolyt (z.B. $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, gelöstes O_2) und der Modulation des amperometrischen Sondenstroms durch die Eigenschaften der Probenoberfläche. Bei der SECM im SG-TC-Modus (substrate generator/tip collector) dagegen wird die Zugabe eines Redoxmediators bewusst vermieden – statt dessen wird eine auf ein geeignetes Potential polarisierte SECM-Sonde genutzt, um aktiv die Freisetzung oder den Verbrauch von reduzierbaren oder oxidierbaren Spezies an mikroskopischen Stellen der Probenoberfläche zu detektieren (Abbildung 7). Die Freisetzung von Metallionen aus lokalen Korrosionsherden, die Diffusion elektroaktiver Spezies durch die engen Poren semipermeabler Membranen, der O_2 -Verbrauch und die Ausschüttung von chemischen Botenstoffen durch einzelne Zellen sind nur einige der vielen Prozesse, die mit SECM im SG-TC-Modus untersucht werden können.

5.2. SECM-Untersuchungen mit konstanter Höhe an einzelnen lebenden Zellen

Der allgemeine apparative Aufbau für SECM-Einzelzelluntersuchungen ähnelt der Darstellung in

Abbildung 2. Die Mikropositioniereinrichtung, die benötigt wird, um die SECM-Spitze exakt in x -, y - und z -Richtung zu bewegen, wird auf ein inverses Mikroskop aufgebaut, um die optische Beobachtung der Zellen und der SECM-Spitze zu gewährleisten. Lebende Zellen sind typischerweise nichtleitend, und für Untersuchungen in physiologischen Puffern werden die Zellen meistens auf isolierenden Glasdeckgläschchen kultiviert. Unter diesen Bedingungen kann SECM mit negativer Rückkopplung angewendet werden, um durch Rastern in konstanter Höhe individuelle Zellen zu finden und ihre dreidimensionale Struktur zu visualisieren. Geeignete ungiftige Redoxmediatoren oder gelöster Sauerstoff können verwendet werden, um den amperometrischen Sondenstrom zu erzeugen, der die Zelltopographie und Redoxaktivität widerspiegelt.

Abbildung 8 zeigt schematisch, wie adhäsente wachsende Zellen topographisch abgebildet werden können. Nach optischer Lokalisierung der Zielzelle und der SECM-Spitze werden beide in unmittelbarer Nähe, jedoch nicht übereinander, positioniert. Dann wird eine z -Annäherungskurve aufgenommen, während die SECM-Spitze langsam an die Oberfläche des Deckgläschens angenähert wird. Wenn der Gesamtdurchmesser der SECM-Spitze einschließlich des isolierenden Mantels bekannt ist, liefern z -Annäherungskurven ein gutes Maß für den absoluten Spitze-Probe-Abstand. Die SECM-Spitze kann direkt über der Glasoberfläche platziert ($I \ll I_\infty$) und dann um eine Strecke zurückgezogen werden, die dem angenommenen Durchmesser der Zelle entspricht ($I \cong I_\infty$, in Abhängigkeit von der Größe der UME). Auf diese Höhenjustierung der SECM-Spitze (feste z -Position) folgt das laterale Rastern. Dabei werden oberhalb der Zelle aufgrund der verstärkten negativen Rückkopplung geringere amperometrische Spitzenströme detektiert. Wird der Strom durch die SECM-Sonde über ihrer jeweiligen x,y -Position aufgetragen, so ergeben sich Graustufen- oder Farbscans.

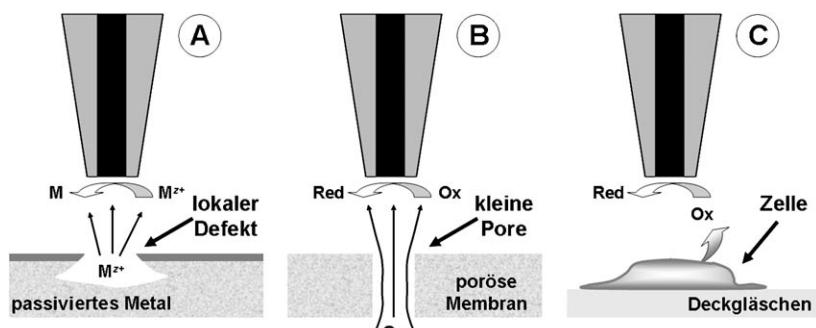


Abbildung 7. SECM im SG-TC-Modus: Eine elektroaktive Spezies kann produziert werden oder bereits an mikroskopischen aktiven Stellen der Probenoberfläche vorhanden sein. Wenn nun eine geeignet polarisierte SECM-Spitze über einen solchen Ort der lokalen Ausschüttung einer Redoxspezies gerastert wird, steigt der Sondenstrom infolge der elektrochemischen Reaktion der redoxaktiven Spezies, die lokal zu der rasternden amperometrischen Sonde angeliefert wird. Beispiele von Prozessen, die mit SECM im SG-TC-Modus detektiert werden können, sind A) die Freisetzung von Metallionen aus lokal korrodierenden Metallen oder Legierungen, B) die Diffusion von redoxaktiven Spezies durch winzige Poren semipermeabler Membranen und ihr Auftauchen in der Nähe der Porenöffnungen und C) die Ausschüttung von direkt oxidierbaren oder reduzierbaren chemischen Botenstoffen wie Hormonen oder Neurotransmittern aus einzelnen sekretorischen Zellen nach einer Stimulation.

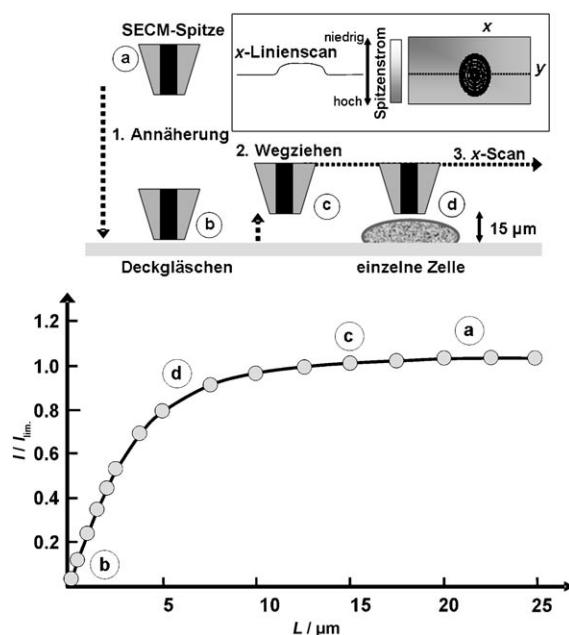


Abbildung 8. Abbilden der Zelltopographie durch SECM mit konstanter z-Höhe im Modus mit negativer Rückkopplung. In der Nähe der Zellen wird eine z-Annäherungskurve aufgenommen, wobei die SECM-Spitze vorsichtig aus der Lösung (Position a) an die Oberfläche des Deckgläschens angenähert wird (Position b). Wenn der Durchmesser der aktiven Elektrode und das Verhältnis zwischen dem Durchmesser der Elektrode und dem der isolierenden Glashülle bekannt sind, ist die z-Annäherungskurve ein Maß für den absoluten Spitze-Probe-Abstand. Das Abbilden der Zellmorphologie ist dann ein zweistufiger Vorgang: Zuerst wird die SECM-Spitze auf einen Abstand zurückgezogen, der etwas größer ist als die erwartete Höhe der abzubildenden Zellen. Dieses Zurückziehen kann fast zu dem ursprünglichen Spitzstrom im Volumen der Lösung führen (Position c). Dann wird die SECM-Spitze in Richtung einer Zelle bewegt und über diese gerastert. Dabei wird der Strom über dem lebenden Objekt vermindert sein, weil es die Diffusion des Redoxmediators zu der aktiven Scheibenelektrode blockiert (Position d). Der Abfall des Stroms (ΔI), der in Auftragungen von I gegen die x,y-Position der Spitze zu beobachten ist, repräsentiert die Zelltopographie.

skalenbilder, die primär die Topographie der untersuchten Zellen zeigen. Weiterführende Informationen hinsichtlich der zellulären Redoxaktivität, der sekretorischen Aktivität oder der Transmembranflüsse von Redoxspezies, die in intrazellulären Prozessen involviert sind, sind bestenfalls durch die Kombination mit nachfolgenden SG-TC-Messungen erhältlich.

SECM-Studien, die auf dieser Strategie beruhen, dienten der Untersuchung unterschiedlicher zellulärer Prozesse. Die Abbildung der Topographie einer einzelnen lebenden Zelle zusammen mit O₂-Konzentrationsprofilen in ihrer Umgebung ist dabei ein frühes Beispiel.^[69] Eine weitere frühe Arbeit betraf die Morphologie und den photosynthetischen Elektronentransport in einzelnen Wächterzellen, die die Stomaöffnung in der Epidermis von Blättern kontrollieren.^[70] Neuere Publikationen umfassen die Untersuchung der Wirkung von Ag⁺-Ionen auf die Atmungskette von verschiedenen bakteriellen Zellen und die Bewertung des antimikrobiellen Effekts mikromolarer Ag⁺-Konzentrationen,^[71] die

Messung der Zytotoxizität von Menadion auf Hepatoblastomzellen,^[72] die Detektion der Menadion-Aufnahme durch Hefezellen und der Ausscheidung des Wirkstoffs aus den Zellen als Glutathionkomplex^[73] sowie die Charakterisierung der lokalen Atmungsaktivität von PC12-Zellen.^[74] Liebetrau et al. testeten eine Vielzahl von Redoxmediatoren hinsichtlich ihrer Eignung für „biologische“ SECM-Experimente, und sie nutzten die besten für SECM-Abbildungen in konstanter Höhe z, um die neuronale Entwicklung von PC12-Zellen, die mit Nervenwachstumsfaktoren behandelt waren, zu visualisieren und Änderungen der Zellhöhe in hypo- oder hypertonischen Pufferlösungen in Echtzeit zu detektieren.^[75]

Die Arbeiten aus der Gruppe von Mirkin über die Visualisierung von normalen und metastatisierenden menschlichen Brustzellen stellen weitere Beispiele für das Potenzial von SECM-Messungen an einzelnen Zellen als modernes biomedizinisches Analyseverfahren und zur Verfolgung relevanter physiologischer und/oder pathologischer zellulärer Funktion dar.^[76] Einzelne Brustzellen wurden in physiologischer Kochsalzlösung einem chemischen Mediator (z.B. einem Chinon) ausgesetzt, der die Zellmembran schnell passiert und im Zytoplasma an intrazellulären Redoxreaktionen teilnehmen kann. Änderungen der extrazellulären Konzentration des Mediators als Folge des zytosolischen Umsatzes wurden auf der Mikrosekundenskala mit einer nahe an der Zellmembran positionierten SECM-Spitze aufgenommen. Für Zellen in unterschiedlichem Gesundheitszustand wurden abweichende Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, und es konnte gezeigt werden, dass diese Messungen den Beginn einer Metastasierung anzeigen und einzelne Krebszellen in einer Ansammlung nichttransformierter Nachbarzellen identifizieren können.

Duale SECM-Spitzen mit einer nackten Pt-UME (\varnothing 10 μm) und einem porphyrinmodifiziertem NO-Mikrosensor (\varnothing 50 μm), die unmittelbar nebeneinander am Ende einer ausgezogenen und dann abgefasten Theta-Glaspipette eingeschmolzen wurden, wurden kürzlich entwickelt, um die Position des NO-Sensors über einer Schicht NO-ausschüttender Endothelzellen präzise zu kontrollieren.^[77] Mit gelöstem O₂ als Redoxmediator wird die nichtmodifizierte Pt-UME mit negativer Rückkopplung betrieben, um den Abstand der bifunktionellen SECM-Spitze von der Oberfläche des Deckgläschens und der Zelle zu ermitteln. Somit kann der NO-Mikrosensor vorsichtig in Richtung der Zielzellen geführt und vor der Stimulation und der Detektion der lokalen NO-Ausschüttung in einem exakt bekannten Abstand positioniert werden. Mit dieser Strategie konnte gezeigt werden, dass die gemessenen NO-Signale stark von der Position des NO-Sensors relativ zu den Zellen abhängt (Abbildung 9). Aufgrund ihrer Gesamtgröße konnten solche dualen NO-empfindlichen SECM-Spitzen bisher nicht für die Visualisierung einzelner Zellen in der x,y-Ebene verwendet werden. Allerdings wird die weitere Verkleinerung und Optimierung der porphyrinbasierten Sensoren^[78] letztlich dazu führen, das Ziel der hochauflösenden räumlichen Kartierung der NO-Ausschüttung aus spezifischen Zellen zu erreichen.

Die Auflösung von SECM-Abbildungen im amperometrischen Rückkopplungsmodus und im Generator-Kollektor-Modus hängt wesentlich vom Durchmesser der elektroakti-

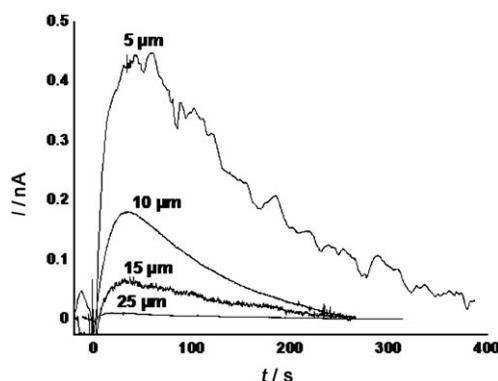
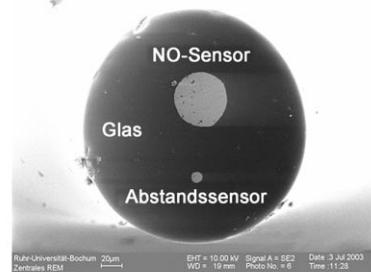


Abbildung 9. Verwendung einer bifunktionellen SECM-Sonde mit zwei Scheibenelektroden für die reproduzierbare und genaue Positionierung eines NO-Sensors in definierter Abstand von NO ausschüttenden Zellen. Oben: Eine der beiden Elektroden, eine nackte Platin-Scheiben-elektrode ($\varnothing 10 \mu\text{m}$), wird als konventionelle amperometrische SECM-Spitze verwendet und kann über im Rückkopplungsmodus aufgenommene z-Annäherungskurven als Führungselektrode für die wenig größere zweite Elektrode, eine mit einem Metallporphyrin oder Metall-phthalocyanin beschichtete Platin-Scheiben-elektrode ($\varnothing 50 \mu\text{m}$), dienen. Unten: Eine Reihe von Messungen zur stimulierten NO-Ausschüttung, bei denen die scheibenförmige Oberfläche des NO-Mikrosensors in unterschiedlichen Abständen zu den Endothelzellen positioniert war. Es wird deutlich, dass das Stromsignal stark von der Position des NO-Sensors relativ zum Ort der NO-Ausschüttung abhängt. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [77a].

von Scheibe der SECM-Spitze ab. Die meisten aktuellen Arbeiten nutzen SECM-Spitzen, die einen charakteristischen Durchmesser und damit typische Arbeitsabstände von 5–10 μm haben. Wegen des relativ großen Arbeitsbereichs im Vergleich zur Höhe von Zellen bei Rückkopplungsmessungen ist die Spitzenpositionierung nach der in Abbildung 8 dargestellten Methode für „große“ SECM-Spitzen relativ zuverlässig, selbst wenn die exakte Höhe der zu untersuchenden Zelle nicht genau bekannt ist. Mit abnehmendem Durchmesser der SECM-Spitze wird die Spitzenpositionierung auf der Grundlage von Annäherungskurven allerdings schwieriger. Eine ungenaue Spitzenpositionierung kann dann zu einer Kollision mit der weichen Zielzelle führen, oder zu der Situation, dass die negative Rückkopplung über der Zelle nicht mehr erreicht wird und so das SECM-Bild nicht aussagekräftig ist. Im nächsten Abschnitt wird daher diskutiert, wie dieses Problem vermieden werden kann, und es werden Strategien für eine vom Sondenstrom unabhängige Spitzenpositionierung beschrieben.

5.3. SECM-Messungen mit konstantem Abstand an einzelnen lebenden Zellen

Die SECM kann die Topographie von einzelnen Zellen zusammen mit ihrer chemischen Aktivität abbilden. Wenn der derzeitige Fortschritt der technischen Entwicklungen anhält, wird SECM in Zukunft das beste Verfahren sein, um die Beziehung zwischen lokalen strukturellen und chemischen Eigenschaften sowie funktionellen Prozessen wie Zellwachstum und Degeneration aufzuklären. Beispielsweise differenzieren PC12-Zellen nach Stimulation mit Nervenwachstumsfaktoren, und sie fangen an, Neurite, Varikositäten und komplexe Verbindungen zu Nachbarzellen auszubilden. In diesem Fall könnte man mit SECM den Prozess der Zellentwicklung zeitlich verfolgen und die morphologischen Stadien der Differenzierung zusammen mit lokalen chemischen Profilen von Spezies in der unmittelbaren Umgebung der entstehenden zellulären Substrukturen erfassen. Allerdings ist eine wesentliche Voraussetzung für eine optimale laterale Auflösung die erfolgreiche Verwendung von kleinstmöglichen UMEs als Rastersonden. Idealerweise sollte die miniaturisierte SECM-Spitze in nahem und konstantem Abstand über die im Allgemeinen topographisch unregelmäßige Zelloberfläche geführt werden (Abbildung 10). Diese Vor-

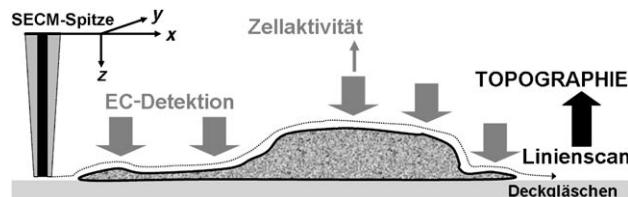


Abbildung 10. Untersuchung von lebenden Zellen durch SECM mit konstantem Abstand. Während der Linienscans wird die Spitze in konstantem Abstand über eine einzelne Zelle geführt. Die Werte des z-Positionierungselementes, das auf lokale Variationen der Oberfläche durch Zurückziehen oder Annähern reagiert, liefern ein genaues Bild der Probentopographie (gestrichelte Linie). Die topographischen Informationen, die in den Linienscans bei konstantem Abstand enthalten sind, kann genutzt werden, um die SECM-Spitze an bestimmten Orten über (Substrukturen) der Zelle zu platzieren und dort zelluläre Prozesse elektrochemisch zu detektieren.

gehensweise wurde nicht nur für die zerstörungsfreie Spitzenpositionierung an weichen mikroskopischen Objekten vorgeschlagen, sondern auch, um die topographische Information über die Einstellwerte der z-Mikropositionierungsvorrichtung auszulesen. In dem vorgeschlagenen SECM-Modus mit konstantem Abstand zwischen Spitz und Probe spiegeln die an einer bestimmten x,y-Position bei einem x- oder y-Linienscan erhaltenen Werte für die z-Position die Topographie der Probe wider. Die elektrochemischen Werte können entweder kontinuierlich während des Rasters oder mit einer stationären Spitz, die durch Wiederholung eines zuvor aufgenommenen Linienscans genau über einem interessierenden Ort der Zelloberfläche positioniert wurde, aufgenommen werden.

Für SECM-Messungen mit konstantem Abstand wird ein computergesteuerter rückgekoppelter Regelkreis benötigt,

der kontinuierlich das aktuelle abstandsabhängige Signal der SECM-Spitze mit einem vom Nutzer definierten Sollwert abgleicht und die Spitze bei Abweichungen neu positioniert. Unterschiedliche Ansätze wurden vorgeschlagen, wie ein abstandsabhängiges Eingangssignal für den rückgekoppelten Regelkreis zur Abstandskontrolle im SECM-Instrument erzeugt werden kann. Einer dieser Ansätze beruht auf der scherkraftabhängigen Rückkopplung mit einer optischen,[79] piezoelektrischen[80] oder auf einer Stimmgabe[81] beruhenden Detektion der kurzreichweiten hydrodynamischen Scherkräfte, die zwischen einer in Resonanz schwingenden SECM-Spitze und der Probenoberfläche in einem Abstand unter 100–300 nm auftreten. Andere Ansätze für das Aufrechterhalten eines konstanten Abstands beruhen auf der Einstellung eines konstanten amperometrischen Spitzstroms während des Rasters[81d,82] oder nutzen die Impedanz der Spitze^[82a,83] als Rückkopplungssignal.

Ein technisch vollständig anderer Ansatz für das simultane elektrochemische und topographische Abbilden mit konstantem Abstand beruht auf der Implementierung von SECM in ein Rasterkraftmikroskop mit eigens konstruierten AFM-Federarmen („cantilever“), die partiell isolierte Metallspitzen als Mikroelektroden tragen.^[84] Die bifunktionellen AFM-Spitzen fungieren sowohl als Kraftsensor für die topographische Information als auch als UME für die mikroelektrochemischen Messungen.

Die unterschiedlichen Abstandskontrolleinheiten für SECM haben ihre eigenen Vor- und Nachteile. Mit Ausnahme von Systemen, die auf der piezoelektrischen Detektion von Scherkräften und kombinierten AFM/SECM beruhen, konnten alle für die topographische Abbildung von einzelnen lebenden Zellen eingesetzt werden. Scherkraftwechselwirkungen oder die Impedanz der Spitze als Rückkopplungssignal haben gegenüber dem amperometrischen Sondenstrom den Vorteil, dass der Zusatz möglicherweise toxischer exogener Redoxmediatoren zu der physiologischen Pufferlösung vermieden wird. Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau eines typischen SECM mit integrierter Abstandsmessung und -regelung für Messungen an biologischen Proben („Bio-SECM“). Die bisher vorgeschlagenen experimentellen Aufbauten sind grundsätzlich ähnlich: Sie bestehen aus der Abstandskontrolleinheit, den Mikropositionierungseinheiten, dem Mikroelektrodenhalter und der elektrochemischen Zelle und sind so zusammengebaut, dass sie die Anforderungen physiologischer elektrochemischer Experimente auf dem Objekttisch eines leistungsstarken inversen Mikroskops genügen.

In den ersten Veröffentlichungen zur Bio-SECM mit Abstandsregelung wurde das Gerät für kombinierte Topographie- und Sekretionsmessungen an einzelnen PC12- und Chromaffinzellen verwendet. Konventionelle CF-UMEs mit einem Spitzendurchmesser um 5 µm^[82a,85] sowie elektrochemisch geätzte und mit Elektrotauchlack isolierte CF-UMEs mit deutlich kleineren Spitzendurchmessern (1–2 µm)^[85] wurden erfolgreich eingesetzt, um zuerst die Topographie einer individuellen sekretorischen Zelle durch Rastern in konstantem Abstand im Detail aufzuklären und diese Information für die exakte Positionierung der SECM-Spitze genau über der Zellmitte zu nutzen. Abbildung 12 zeigt eine typi-

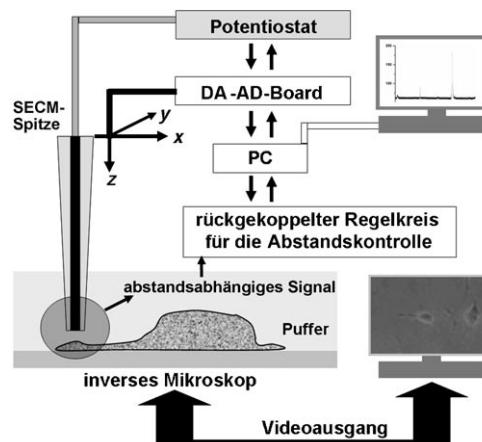


Abbildung 11. Aufbau eines biologischen elektrochemischen Rastermikroskopes für die hochauflösende topographische und chemische Abbildung von einzelnen lebenden Zellen durch SECM mit konstantem Abstand. Das Gerät besteht aus der SECM-Spitze, einer Mikropositionierungsvorrichtung für deren präzise Bewegung, einem inversen Mikroskop mit optionalem Videoausgang, um die SECM-Spitze und die Zellen visuell zu beobachten, einer Abstandskontrolleinheit mit computergesteuertem rückgekoppeltem Regelkreis, einem rauscharmen Potentiostat und einem PC, der mit einem DA-AD-Board verbunden ist. Eine Mikropipette, die zur lokalen Applikation von stimulierenden Agentien durch Injektion benötigt wird, ist nicht abgebildet.

sche Messung. Das präzise Positionieren der SECM-Spitze in 100–300 nm Abstand zu der Zellmembran erlaubte die lokale Detektion der Ausschüttung aus Vesikeln, die durch die Zugabe einer stimulierenden Substanz ausgelöst wurde, wie bereits aus Experimenten mit konventioneller Kohlenstofffaser-Amperometrie bekannt war.

Kürzlich wurden konische Elektroden aus optischen Fasern und Glaskapillaren beschrieben, die durch Beschichtung der Außenseite einer ausgezogenen Glasspitze mit einem Metall gefolgt von der Isolierung der nun leitfähigen Oberfläche durch Abscheidung eines Polymerfilms aus der Gasphase erhalten wurden. Diese Elektroden wurden in der SECM mit konstantem Abstand betrieben, um simultan eine topographische, optische und elektrochemische Abbildung angefärbter PC12-Zellen zu erhalten und die Atmungsaktivität in den elektrochemischen Bildern zu visualisieren.^[81a] Kürzlich wurden hoch empfindliche Nickel-Phthalocyaninbeschichtete CF-UMEs für die lokale Bestimmung von NO konzipiert und in ein SECM für Messungen mit konstantem Abstand implementiert.^[87] Wieder wurde die Positionierung der SECM-Spitze in konstantem Abstand genutzt, um den NO-Mikrosensor gerade über das Zentrum einer adhärent wachsenden Endothelzelle aus der menschlichen Nabelschnur (HUVEC-Zelle) zu platzieren. Die NO-Ausschüttung wurde durch die Zugabe von Bradykinin stimuliert, was zu einem Stromanstieg an dem Mikrosensor führte, der auf ein konstantes Potential von 750 mV gegen Ag/AgCl polarisiert war (Abbildung 13).

Die Entwicklung der SECM mit konstantem Abstand und die Ergebnisse der oben genannten Experimente an Zellen, die Catecholamin oder NO ausschütten, sollten als erste Schritte in Richtung eines ambitionierten Ziels, der örtlichen

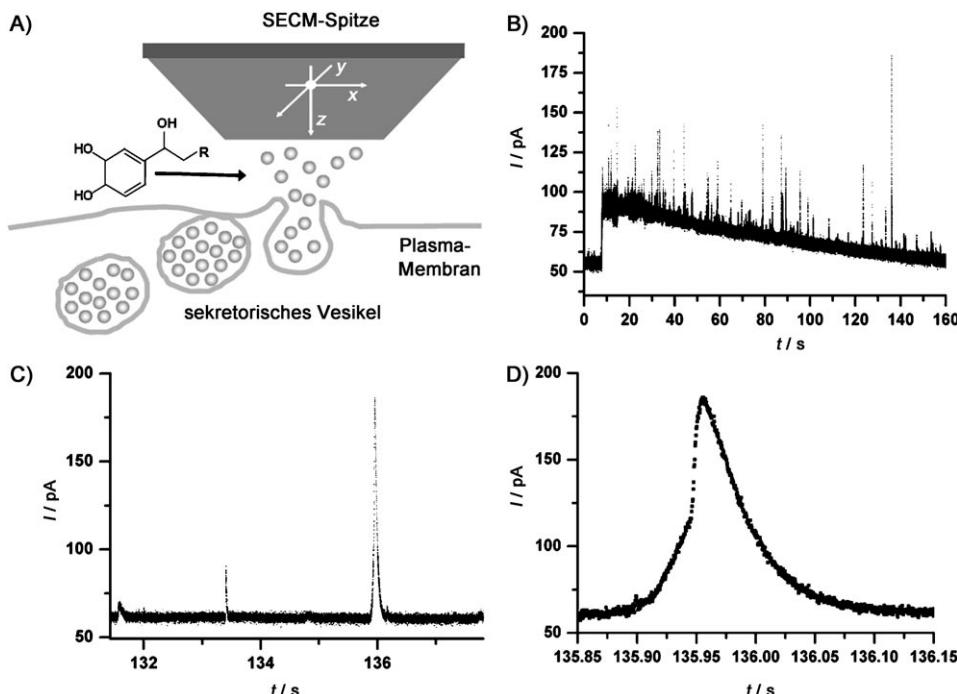


Abbildung 12. A) Anwendung eines biologischen elektrochemischen Rastermikroskops (Bio-SECM) mit konstantem Abstand für die lokale amperometrische Detektion der Adrenalin-Ausschüttung aus einzelnen Rinderchromaffinzellen. Mit der aus einem Linienscan im scherkraftabhängigen konstanten Distanzmodus bekannten Topographie kann die SECM-Spitze ($\varnothing 5 \mu\text{m}$, +800 mV gegen Ag/AgCl) in einem Abstand von weniger als 1 μm genau über dem Zentrum der einzelnen Chromaffinzelle platziert werden. B) Nach Stimulation der selektierten Zelle mit 100 mM KCl-Lösung wird die Exozytose ausgelöst und durch das Auftreten einer großen Zahl von pA-Spikes des amperometrischen Sondenstroms mit hoher Empfindlichkeit detektiert, wobei jeder Spike die Exozytose aus einer einzelnen Granula repräsentiert; C) und D) zeigen Ausschnitte der Stromspur in (B) mit höherer Zeitauflösung. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [86].

und chemischen SECM-Abbildung von (Netzwerken aus) lebenden Zellen, aufgefasst werden. Die zunehmende Verkleinerung der elektrochemischen Rastersonden und die Optimierung der Abstandskontrolle müssen die nächsten Schritte in der Weiterentwicklung der Bio-SECM sein, um eine Bewertung von Struktur-Funktions-Beziehungen in der zellulären Mikroumgebung mit verbesserter lateraler Auflösung zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Individuelle Zellen sind die mikroskopisch kleinen funktionsfähigen Untereinheiten von Lebewesen. Durch den gesamten Körper von Säugetieren bilden diese Objekte gigantische Netzwerke mit komplexen Architekturen und Funktionen. Viele Zelltypen sind stark in die harmonisch zusammenwirkende molekulare Maschinerie des Lebens involviert, etwa die riesige Zahl an unterschiedlichen Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem, im Gehirn und die vielen sekretorischen Zellen des endokrinen Systems. Wir haben in diesem Aufsatz gezeigt, dass kleine, leistungsfähige und akkurat bewegbare voltammetrische UMEs zu ausgeklügelten Hilfsmitteln für die Analyse der facettenreichen

Chemie in der unmittelbaren Umgebung einzelner Zellen weiterentwickelt werden konnten. Dieser Fortschritt der Einzelzellvoltammetrie in wenig mehr als zwei Jahrzehnten wurde durch das Zusammenwirken von Forschern auf den Gebieten der Elektrochemie, Medizin und Biologie möglich. Die Evaluierung der Neurotransmitter-Ausschüttung aus isolierten Neuronen und endokrinen Zellen mit einer zeitlichen und örtlichen Auflösung, die ausreichend ist, um die sekretorische Aktivität einzelner intrazellulärer nanometergroßer Speichervesikel zu visualisieren, sowie der Erfolg der biologischen elektrochemischen Rastermikroskopie bei der simultanen Abbildung der Topographie und der (redox)chemischen Aktivität adhärenter Zellen bilden

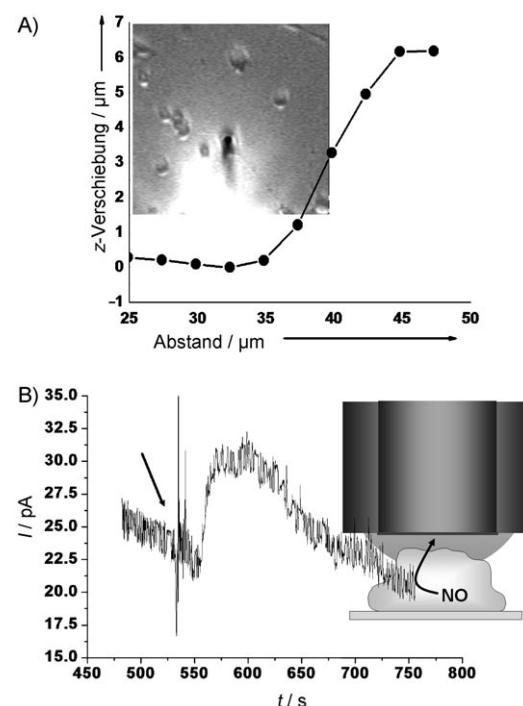


Abbildung 13. A) Linienscans im scherkraftabhängigen konstanten Distanzmodus wurden benutzt, um einen NO-Mikrosensor exakt über einer einzelnen menschlichen Endothelzelle aus der Nabelschnurvene (HUVEC) zu positionieren. Der Einschub zeigt den Schatten des Mikrosensors über der selektierten Zelle in einem simultan aufgenommenen Videobild. B) Amperometrische Detektion von NO, das aus einer einzelnen HUVEC-Zelle nach Stimulation mit Bradykinin ausgeschüttet wurde. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [87].

Meilensteine im Bereich der zellulären Mikroelektroanalytik. Selbst wenn wir alles bis heute Erreichte betrachten, hat die Einzelzellmikroelektrochemie den Zenit ihres Potenzials für die Erforschung der Mechanismen noch nicht erreicht, die hinter der Entwicklung und Degeneration von Zellen stehen oder bei der Zell-Zell-Kommunikation und Synaptogenese von Bedeutung sind. Bisher wurden die meisten Arbeiten an kultivierten Zellen und Zellen in Gewebeschnitten mit mikrometergroßen voltammetrischen Sensoren ausgeführt. Das nächste Ziel könnte es sein, empfindliche nanometergroße elektrochemische Sondenspitzen routinemäßig herzustellen und mit höchster Präzision nicht nur an einzelnen Zellen zu platzieren, sondern auch entlang komplexer Netzwerke von Zellen zu bewegen. Das setzt eine Optimierung der Soft- und Hardware voraus, welche die Spitzenbewegung und die elektrochemische Datenaufnahme kontrollieren und synchronisieren, sowie die Entwicklung selektiver Nanoelektroden für weitere relevante Analyte, die nicht durch eine direkte Oxidation oder Reduktion leicht detektiert werden können. Es wird spannend sein zu sehen, welche Ergebnisse in zwei Jahrzehnten nach der (teilweisen) Umsetzung dieser technischen und methodischen Verbesserungen unter dem Titel „Einzelzellnanoelektronik“ zusammengefasst werden können, und mit welchen Techniken die chemische Kommunikation von und zwischen Zellen als Antwort auf eine (patho)physiologische oder pharmakologische Stimulation in lebenswissenschaftlichen Laboren routinemäßig verfolgt werden.

Eingegangen am 30. November 2006
Online veröffentlicht am 19. Oktober 2007

- [1] K. Stulik, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1483–1492.
- [2] *Microelectrodes: Theory and Application*, NATO ASI Series E197 (Hrsg.: M. I. Montenegro, M. A. Queiros, J. L. Daschbach), Kluver, Dordrecht, **1991**.
- [3] a) C. Amatore, E. Maisonneuve, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 303A–311A; b) C. G. Zoski, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1041–1051; c) M. Ciszowska, Z. Stojek, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 754A–760A; d) R. J. Foster, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 289–297; e) J. Heinze, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1327–1349; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1268–1288; f) K. Aoki, *Electroanalysis* **1993**, *5*, 627–639; g) H.-P. Nirmaier, G. Henze, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 619–624; h) R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **1981**, *53*, A1125–A1134.
- [4] a) R. N. Adams, *Prog. Neurobiol.* **1990**, *35*, 297–311; b) J. O. Schenk, E. Miller, M. E. Rice, R. N. Adams, *Brain Res.* **1983**, *277*, 1–8; c) H.-Y. Cheng, J. Schenk, R. Huff, R. N. Adams, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, *100*, 23–31; d) R. L. McCreery, R. Dreiling, R. N. Adams, *Brain Res.* **1974**, *73*, 15–21; e) P. T. Kissinger, J. B. Hart, R. N. Adams, *Brain Res.* **1973**, *55*, 209–213.
- [5] a) M. Fillenz, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2005**, *29*, 949–962; b) D. L. Robinson, B. J. Venton, M. L. A. V. Heien, R. M. Wightman, *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1763–1773; c) P. E. M. Phillips, R. M. Wightman, *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 509–514; d) K. P. Troyer, M. L. A. V. Heien, B. J. Venton, R. M. Wightman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 696–703; e) J. A. Stamford, J. B. Justice, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 359A–363A; f) R. D. O'Neill, *Analyst* **1994**, *119*, 767–779; g) J. A. Stamford, *J. Neurosci. Methods* **1986**, *17*, 1–29; J. A. Stamford, *Brain Res.* **1985**, *357*, 119–135.
- [6] a) F. Crespi, D. Dalessandro, V. Annovazzi-Lodi, C. Heidbreder, M. Norgia, *J. Neurosci. Methods* **2004**, *140*, 153–161; b) P. A. Garris, R. Ensmann, J. Poehlman, A. Alexander, P. E. Langley, S. G. Sandberg, P. G. Greco, R. M. Wightman, G. V. Rebec, *J. Neurosci. Methods* **2004**, *140*, 103–115; c) M. G. De Simoni, A. De Luigi, L. Imeri, S. Algeri, *J. Neurosci. Methods* **1990**, *33*, 233–240; d) V. Annovazzi-Lodi, S. Donati, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1988**, *35*, 595–606.
- [7] B. J. Venton, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **2003**, *414A*–421A.
- [8] a) G. D. Stuber, R. M. Wightman, R. M. Carelli, *Neuron* **2005**, *46*, 661–669; b) M. F. Roitman, G. D. Stuber, P. E. M. Phillips, R. M. Wightman, R. M. Carelli, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 1265–1271; c) P. G. Greco, P. A. Garris, *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *479*, 117–125; d) P. E. M. Phillips, G. D. Stuber, M. L. Helen, R. M. Wightman, R. M. Carelli, *Nature* **2003**, *422*, 614–618; e) R. M. Wightman, D. L. Robinson, *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 721–735; f) D. L. Robinson, P. E. M. Phillips, E. A. Budygin, B. J. Trafton, P. A. Garris, R. M. Wightman, *Neuroreport* **2001**, *12*, 2549–2552; g) M. R. Kilpatrick, M. B. Rooney, D. J. Michael, R. M. Wightman, *Neuroscience* **2000**, *96*, 697–706; h) G. V. Rebec, J. R. Christensen, C. Guerra, M. T. Bardo, *Brain Res.* **1997**, *776*, 61–67.
- [9] a) D. J. Stephens, V. J. Allan, *Science* **2003**, *300*, 82–86; b) W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377; c) E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, A522–A529; d) M. Dailey, G. Marrs, J. Satz, M. Waite, *Biol. Bull.* **1999**, *197*, 115–122.
- [10] a) *Single-Channel Recording*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. Sakmann, E. Neher), Kluwer, Dordrecht, **1995**; b) *Microelectrode techniques. The Plymouth workshop handbook*, 2. Aufl. (Hrsg.: D. C. Ogden), Company of Biologists, Cambridge, **1994**;
- [11] R. Feeney, S. P. Kounaves, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 677–684.
- [12] I. Hafez, K. Kisler, K. Berberian, G. Demick, V. Valero, M. G. Yong, H. G. Craighead, M. Lindau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13879–13884.
- [13] a) H.-F. Cui, J.-S. Shan, Y. Chen, S.-C. Chong, X. Liu, T.-M. Lim, F.-S. Sheu, *Sens. Actuators B* **2006**, *115*, 634–641; b) T. S. Strong, H. C. Cantor, R. B. Brown, *Sens. Actuators A* **2001**, *91*, 357–362.
- [14] S. Isik, L. Berdondini, J. Oni, A. Bloechl, M. Koudelka-Hep, W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1566–1572.
- [15] a) A. J. Bard, F. R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 132–138; b) R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winquist, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 844–848.
- [16] a) M. A. Edwards, S. Martin, A. L. Whitworth, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *Physiol. Meas.* **2006**, *27*, R63–R108; b) A. J. Bard, X. Li, W. Zhan, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 461–472; c) S. Amemiya, J. D. Guo, H. Xiong, D. A. Gross, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 458–471; d) M. Navratil, G. A. Mabbott, E. A. Arriaga, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4005–4019; e) B. F. Brehm-Schäfer, E. A. Johnson, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 538–559; f) T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 653–659.
- [17] R. S. Kelly, R. M. Wightman, *Anal. Chim. Acta* **1986**, *187*, 79–87.
- [18] R. H. Chow, L. Von Rueden, E. Neher, *Nature* **1992**, *356*, 60–63.
- [19] A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3054–3058.
- [20] a) S. Chen, A. Kucernak, *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 80–85; b) M. S. Mousa, *Appl. Surf. Sci.* **1996**, *94/95*, 129–135; c) A. Schulte, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **1994**; d) J. O. Besenhard, A. Schulte, K. Schur, P. D. Jannakoudakis in *Microelectrodes: Theory and Application*, NATO ASI Series E197 (Hrsg.: M. I. Montenegro, M. A. Queiros, J. L. Daschbach), Kluver, Dordrecht, **1991**, S. 189–204.
- [21] J. Millar, C. W. A. Pelling, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *110*, 1–8.

- [22] a) W.-Z. Wu, W.-H. Huang, W. Wang, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng, T. Xu, R.-Y. Zhang, Y. Chen, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014–8915; b) W.-H. Huang, D.-W. Pang, H. Tong, Z.-L. Wang, J.-K. Chen, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1048–1052; c) T. G. Strein, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1368–1373.
- [23] X. Zhang, W. Zhang, X. Zhou, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3338–3343.
- [24] A. Schulte, R. H. Chow, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 985–990.
- [25] D. K. Y. Wong, L. Y. F. Xu, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4086–4090.
- [26] a) D. D. Yao, A. G. Vlessidis, N. P. Evmiridis, *Microchim. Acta* **2004**, *147*, 1–20; b) Z. H. Taha, *Talanta* **2003**, *61*, 3–10; c) F. Bediou, N. Villeneuve, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 5–18; d) L. Huang, R. T. Kennedy, *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 158–164.
- [27] a) C. Wang, X. Hu, *Talanta* **2006**, *68*, 1322–1328; b) C. J. Slevin, N. J. Gray, J. V. Macpherson, M. A. Webb, P. R. Unwin, *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 282–288; c) B. Ballesteros-Katemann, W. Schuhmann, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 22–28; d) B. D. Pendley, H. D. Abruna, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 782–784.
- [28] S. C. Land, D. M. Porterfield, R. H. Sanger, P. J. S. Smith, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 211–218.
- [29] W. J. Whalen, J. Riley, P. Nair, *J. Appl. Physiol.* **1967**, *23*, 798–801.
- [30] a) Y. Y. Lau, J. B. Chien, D. K. Y. Wong, A. G. Ewing, *Electroanalysis* **1991**, *3*, 87–95; b) Y. T. Kim, D. M. Scarnulis, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1782–1786.
- [31] J. B. Chien, R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 633–638.
- [32] Y. Y. Lau, T. Abe, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1702–1705.
- [33] a) T. Abe, Y. Y. Lau, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2160–2163; b) T. Abe, Y. Y. Lau, A. G. Ewing, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7421–7423.
- [34] A. Meulemans, B. Poulain, G. Baux, L. Tauc, *Brain Res.* **1987**, *414*, 158–162.
- [35] A. Meulemans, B. Poulain, G. Baux, L. Tauc, D. Henzel, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2088–2091.
- [36] T. Malinski, Z. Taha, *Nature* **1992**, *358*, 676–678.
- [37] T. Malinski, S. Grunfeld, Z. Taha, P. Tomboulian, *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102*, 147–151.
- [38] J. B. Chien, R. A. Saraceno, A. G. Ewing, *Redox Chem. Interfacial Behav. Biol. Mol. [Proc. Int. Symp. Redox Mech. Interfacial Prop. Mol. Biol. Importance]* 3rd (1988), Meeting Date 1987, Plenum, New York, **1988**, 417–424.
- [39] a) E. Neher, *Pflügers Arch.* **2006**, *453*, 261–268; b) M. B. Jackson, E. R. Chapman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 135–160; c) R. Schneggenburger, E. Neher, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2005**, *15*, 266–274; d) J. W. Barclay, A. Morgan, R. D. Burgoyne, *Cell Calcium* **2005**, *38*, 343–353; e) J. B. Sorensen, *Trends Neurosci.* **2005**, *28*, 453–455; f) T. C. Suedhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 509–547; g) T. F. J. Martin, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *2–3*, 157–165; h) W. C. Tucker, E. R. Chapman, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 1–13; i) R. Jahn, T. C. Suedhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 219–246; j) R. D. Burgoyne, A. Morgan, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 581–632; k) W. J. Betz, J. K. Angleson, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 347–363; l) P.-M. Lledo, *Eur. J. Endocrinol.* **1997**, *137*, 1–9; m) R. S. Zucker, *Neuron* **1996**, *17*, 1049–1055; n) T. C. Suedhof, *Nature* **1995**, *375*, 645–653.
- [40] a) J. F. Presley, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2005**, *1744*, 259–272; b) H. B. Pollard, D. K. Apps, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *971*, 617–619; c) M. Oheim, D. Loerke, R. H. Chow, W. Stuehmer, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1999**, *354*, 307–318; d) J. A. Steyer, A. Horstmann, W. Almers, *Nature* **1997**, *388*, 474–478; e) M. Oheim, D. Loerke, W. Stuehmer, R. H. Chow, *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 83–98.
- [41] a) R. Heidelberger, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2001**, *143*, 1–80; b) „Techniques for membrane capacitance measurements“: K. D. Gillis in *Single-Channel Recording*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. Sakmann, E. Neher), Plenum, New York, **1995**, S. 155–188; c) G. Matthews, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 358–364; d) M. Lindau, E. Neher, *Pflügers Arch.* **1988**, *411*, 137–146.
- [42] a) E. V. Mosharov, D. Sulzer, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 651–658; b) R. H. S. Westerink, *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 461–470; c) D. Bruns, *Methods* **2004**, *33*, 312–321; d) D. M. Cannon, Jr., N. Winograd, A. G. Ewing, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 239–263; e) J. P. Henry, F. Darchen, S. Cribier, *Biochimie* **1998**, *80*, 371–377; f) E. R. Travis, R. M. Wightman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 77–103; g) J. K. Angleson, W. J. Betz, *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 281–287; h) G. Y. Chen, A. G. Ewing, *Crit. Rev. Neurobiol.* **1997**, *11*, 59–90; i) R. M. Wightman, J. M. Finnegan, K. Pihel, *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 154–158; j) E. Neher, R. H. Chow, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *2*, 251–253; k) A. G. Ewing, T. G. Strein, Y. Y. Lau, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 440–447.
- [43] a) D. J. Leszczyszyn, J. A. Jankowski, O. H. Viveros, E. J. Diliberto, Jr., J. A. Near, R. M. Wightman, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14736–14737; b) M. R. Duchen, J. Millar, T. J. Biscoe, *J. Physiol.* **1990**, *426*, 5P.
- [44] R. H. Chow, L. von Rueden, E. Neher, *Nature* **1992**, *356*, 60–63.
- [45] a) J. F. Gómez, M. A. Brioso, J. D. Machado, J. L. Sanchez, R. Borges, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *971*, 647–654; b) F. Segura, M. A. Brioso, J. F. Gómez, J. D. Machado, R. Borges, *J. Neurosci. Methods* **2000**, *103*, 151–156; c) A. Elhamdani, Z. Zhou, C. R. Artalejo, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 6230–6240; d) A. Elhamdani, T. F. J. Martin, J. A. Kowalchyk, C. R. Artalejo, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7375–7383.
- [46] a) M. L. A. V. Heien, M. A. Johnson, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5697–5704; b) D. J. Michael, J. D. Joseph, M. R. Kilpatrick, E. R. Travis, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3941–3947; c) B. P. Jackson, S. M. Dietz, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1115–1120; d) J. A. Stamford, *J. Neurosci. Methods* **1990**, *34*, 67–72.
- [47] a) D. S. Koh, *Methods Mol. Biol.* **2006**, *337*, 139–153; b) K. T. Kim, D. S. Koh, B. Hille, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 1–5.
- [48] a) G. Nagy, J. H. Kim, Z. P. Pang, U. Matti, J. Rettig, T. C. Suedhof, J. B. Sorensen, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 632–643; b) C. L. Haynes, L. A. Buhler, R. M. Wightman, *Biophys. Chem.* **2006**, *123*, 20–24; c) J. R. Constable, M. E. Graham, A. Morgan, R. D. Burgoyne, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31615–31623; d) C. Amatore, S. Arbault, I. Bonifas, Y. Bouret, M. Erard, A. G. Ewing, L. A. Sombers, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4411–4420; e) D. Speidel, C. E. Bruederle, C. Enk, T. Voets, F. Varoqueaux, K. Reim, U. Becherer, F. Fornai, S. Ruggieri, Y. Hollighaus, E. Weihe, D. Bruns, N. Brose, J. Rettig, *Neuron* **2005**, *46*, 75–88; f) X.-K. Chen, L.-C. Wang, Y. Zhou, Q. Cai, M. Prakriya, K.-L. Duan, Z.-H. Sheng, C. Lingle, Z. Zhou, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 1160–1168; g) G. Nagy, K. Reim, U. Matti, N. Brose, T. Binz, J. Rettig, E. Neher, J. B. Sorensen, *Neuron* **2004**, *41*, 351–365; h) C. Amatore, S. Arbault, I. Bonifas, Y. Bouret, M. Erard, M. Guille, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 147–154; i) J. B. Sorensen, R. Fernandez-Chacon, T. C. Suedhof, E. Neher, *J. Gen. Physiol.* **2003**, *122*, 265–276; j) C. Amatore, Y. Bouret, E. R. Travis, R. M. Wightman, *Biochimie* **2000**, *82*, 481–496; k) M. E. Graham, P. Washbourne, M. C. Wilson, R. D. Burgoyne, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *971*, 210–221; l) T. L. Colliver, E. J. Hess, A. G. Ewing, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *105*, 95–103; m) T. Voets, T. Moser, P.-E. Lund, R. H. Chow, M. Geppert, T. C. Suedhof, E. Neher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11680–11685; n) M. Haller, C. Heinemann, R. H. Chow, R. Heidelberger, E. Neher, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2100–2113; o) A. F. Oberhauser, I. M. Robinson, J. M. Fernandez, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1131–1139; p) R. H. Chow, J. Klingauf, E. Neher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12765–12769.

- [49] a) J. M. Moore, J. B. Papke, A. L. Cahill, A. B. Harkins, *Am. J. Physiol.* **2006**, *291*, C270–C281; b) L. A. Sombers, H. J. Hanchar, T. L. Collier, N. Wittenberg, A. Cans, S. Arbault, C. Amatore, A. G. Ewing, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 303–309; c) J. Bai, C.-T. Wang, D. A. Richards, M. B. Jackson, E. R. Chapman, *Neuron* **2004**, *41*, 929–941; d) J. M. Finnegan, K. Pihel, P. S. Cahill, L. Huang, S. E. Zerby, A. G. Ewing, R. T. Kennedy, R. M. Wightman, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1914–1923; e) T. K. Chen, G. Luo, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3031–3035.
- [50] a) E. H. Jaffe, P. Bulanos, C. Caputo, *Cell Calcium* **2001**, *29*, 199–209; b) K. Pihel, S. Hsieh, J. W. Jorgensen, R. M. Wightman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1046–1052; c) A. F. Oberhauser, I. M. Robinson, J. M. Fernandez, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 1131–1139; d) P. E. Tatham, M. R. Duchen, J. Millar, *Pflugers Arch.* **1991**, *419*, 409–414.
- [51] a) D. J. Michael, R. A. Ritzel, L. Haataja, R. H. Chow, *Diabetes* **2006**, *55*, 600–607; b) K. Bokvist, M. Holmqvist, J. Gromada, P. Rorsman, *Pflugers Arch.* **2000**, *439*, 634–645; c) C. A. Aspinwall, L. Huang, J. R. Lakey, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5551–5556; d) L. Huang, H. Shen, M. A. Atkinson, R. T. Kennedy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9608–9612; e) R. T. Kennedy, L. Huang, M. A. Atkinson, P. Dush, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1882–1887.
- [52] V. S. Tran, A. M. Marion-Audibert, E. Karatekin, S. Huet, S. Cribier, K. Guillaumie, C. Chapuis, C. Desnos, F. Darchen, J. P. Henry, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 179–188.
- [53] S. Iwaki, M. Ogasawara, R. Kurita, O. Niwa, K. Tanizawa, Y. Ohashi, K. Maeyama, *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 236–243.
- [54] X. Chen, L. Wang, Y. Zhou, L.-H. Zheng, Z. Zhou, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 9236–9243.
- [55] a) R. G. Staal, E. V. Mosharov, D. Sulzer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 341–346; b) E. N. Pothos, V. Davila, D. Sulzer, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 4106–4118; c) B. B. Anderson, A. G. Ewing, *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1999**, *15*–32; d) D.-S. Koh, B. Hille, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1506–1511; e) Z. Zhou, S. Misler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6938–6942; f) D. Bruns, R. Jahn, *Nature* **1995**, *377*, 62–65.
- [56] G. Arroyo, J. Fuentealba, N. Sevane-Fernandez, M. Aldea, A. G. Garcia, A. Albilllos, *J. Neurophysiol.* **2006**, *96*, 1196–1202.
- [57] R. Pardal, U. Ludewig, J. Garcia-Hirschfeld, J. Lopez-Barneo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2361–2366.
- [58] E. H. Jaffe, A. Marty, A. Schulte, R. H. Chow, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 3548–3553.
- [59] a) C. Amatore, S. Arbault, Y. Chen, C. Crozatier, F. Lemaitre, Y. Verchier, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4104–4107; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4000–4003; b) X. Sun, K. D. Gillis, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2521–2525.
- [60] W.-H. Huang, W. Cheng, Z. Zhang, D.-W. Pang, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng, D.-F. Cui, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 483–488.
- [61] P. Chen, B. Xu, N. Tokranova, X. Feng, J. Castracane, K. D. Gillis, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 518–524.
- [62] a) G. Dernick, L.-W. Gong, L. Tabares, G. Alvarez de Toledo, M. Lindau, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 699–6708; b) L. Tabares, M. Lindau, G. Alvarez de Toledo, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 837–841; c) G. Dernick, G. Alvarez de Toledo, M. Lindau, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 358–362; d) E. V. Mosharov, L. W. Gong, B. Khanna, D. Sulzer, M. Lindau, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 5835–5845; e) A. Albilllos, G. Dernick, H. Horstmann, W. Almers, G. Alvarez de Toledo, M. Lindau, *Nature* **1997**, *389*, 509–512.
- [63] T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1129–1135.
- [64] a) C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J. C. Drapier, H. Ghadour, Y. Tong, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 653–661; b) B. A. Patel, M. Arundell, K. H. Parker, M. S. Yeoman, D. O'Hare, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7643–7648; c) S. Kasai, H. Shiku, Y.-S. Torisawa, H. Noda, J. Yoshitake, T. Shiraishi, T. Yasukawa, T. Watanabe, T. Matsue, T. Yoshimura, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *549*, 14–19; d) L. A. Blatter, Z. Taha, S. Mesaros, P. S. Shaklock, W. G. Gier, T. Malinski, *Circ. Res.* **1995**, *76*, 922–924.
- [65] H. Lu, M. Gratzl, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2821–2830.
- [66] A. Devadoss, J. D. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10214–10215.
- [67] *Scanning Electrochemical Microscopy* (Hrsg.: A. J. Bard, M. V. Mirkin), Dekker, New York, **2001**.
- [68] a) G. Wittstock, M. Burchardt, S. E. Pust, Y. Shen, C. Zhao, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1604–1640; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1584–1617; b) G. Wittstock, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 303–315; c) M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 119–146; d) G. Nagy, L. Nagy, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *36*, 735–744; e) A. L. Barker, M. Gonsalves, J. V. MacPherson, C. J. Slevin, P. R. Unwin, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 223–240; f) M. V. Mirkin, *Mikrochim. Acta* **1999**, *130*, 127–153.
- [69] T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4637–4641.
- [70] M. Tsionky, Z. G. Cardon, A. J. Bard, R. B. Jackson, *Plant Physiol.* **1997**, *113*, 895–901.
- [71] K. B. Holt, A. J. Bard, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13214–13223.
- [72] J. Mauzeroll, A. J. Bard, O. Owhadian, T. J. Monks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17582–17587.
- [73] J. Mauzeroll, A. J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7862–7867.
- [74] Y. Takii, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 3381–3385.
- [75] J. M. Liebetrau, H. M. Miller, J. E. Baur, S. A. Takacs, V. Anupumpisit, P. A. Garris, D. O. Wipf, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 563–571.
- [76] a) S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2004**, *9*, 375–382; b) W. J. Feng, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4148–4154; c) B. Liu, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9855–9860.
- [77] a) S. Isik, M. Etienne, J. Oni, A. Bloechl, S. Reiter, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6389–6394; b) A. Pailleret, J. Oni, S. Reiter, S. Isik, M. Etienne, F. Bediou, W. Schuhmann, *Electrochim. Commun.* **2003**, *5*, 847–852.
- [78] a) V. Ryabova, A. Schulte, T. Erichsen, W. Schuhmann, *Analyst* **2005**, *130*, 1245–1252; b) N. Diab, J. Oni, W. Schuhmann, *Bioelectrochemistry* **2005**, *66*, 105–110; c) B. Ngounou, S. Neugebauer, A. Frodl, S. Reiter, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* **2004**, *49*, 3855–3863; d) S. Isik, J. Oni, V. Rjabova, S. Neugebauer, W. Schuhmann, *Microchim. Acta* **2004**, *148*, 59–64; e) S. Neugebauer, S. Isik, A. Schulte, W. Schuhmann, *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 2005–2020.
- [79] a) A. Hengstenberg, C. Kranz, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1547–1554; b) M. Ludwig, C. Kranz, W. Schuhmann, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 2857–2860.
- [80] B. Ballesteros Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2025–2033.
- [81] a) Y. Takahashi, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, H. Yamada, T. Matsue, *Langmuir* **2006**, *22*, 10299–10306; b) H. Yamada, H. Fukumoto, T. Yokoyama, T. Koike, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1785–1790; c) D. Oyamatsu, Y. Hirano, N. Kanaya, Y. Mase, M. Nishizawa, T. Matsue, *Bioelectrochemistry* **2003**, *60*, 115–121; d) Y. Lee, Z. E. Ding, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3634–3643; e) P. J. James, L. F. Garfias-Mesias, P. J. Moyer, W. H. Smyrl, *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, L64–L66.
- [82] a) R. T. Kurulugama, D. O. Wipf, S. A. Takacs, S. Pongmayteegul, P. A. Garris, J. E. Baur, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1111–1117; b) D. O. Wipf, A. J. Bard, D. E. Tallman, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1373–1377.
- [83] a) E. N. Ervin, H. S. White, L. A. Baker, C. R. Martin, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6535–6541; b) M. A. Aviles, D. O. Wipf, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4873–4881.

- [84] a) R. J. Fasching, S. J. Bai, T. Fabian, F. B. Prinz, *Microelectron. Eng.* **2006**, 83, 1638–1641; b) C. Kranz, G. Friedbacher, B. Mizaikoff, A. Lugstein, J. Smoliner, E. Bertagnolli, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2491–2500; c) J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 550–557.
- [85] L. Pitta Bauermann, W. Schuhmann, A. Schulte, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 4003–4008.
- [86] A. Schulte, W. Schuhmann in „*Electrochemical Methods for Neuroscience, Frontiers in Neuroengineering Series*“, Bd. 1 (Hrsg.: A. Michael, L. M. Borland), Taylor & Francis, Boca Raton, **2006**, Kap. 17
- [87] S. Isik, W. Schuhmann, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7611–7614; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7451–7454.

Since 1807...

Wiley



BICENTENNIAL
1807
WILEY
2007
BICENTENNIAL
wiley.com

Knowledge for Generations