

Aus dem Bereich der Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Bestimmung physiologischer Parameter auf
Einzelzellebene mit elektrochemischen
Messmethoden

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2020

vorgelegt von: Phillip Knapp

geb. am: 15.08.1989 in Saarbrücken-Dudweiler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies	5
1.2 Messmethoden für reaktive Sauerstoffspezies	8
1.2.1 Optische Messmethoden zur Bestimmung von H_2O_2	8
1.2.2 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie zur Bestimmung von H_2O_2	10
1.3 Theoretischer Hintergrund zur Elektrochemie	11
1.3.1 Die elektrochemische Zelle	12
1.3.2 Voltammetrie	14
1.3.3 Kapazitive Ströme und die elektrochemische Doppelschicht	15
1.3.4 Faradaysche Ströme	16
1.3.5 Amperometrie	17
1.3.6 Wahl der Messmethode	18
1.3.7 Elektrochemische Scan-Mikroskopie	19
1.4 Elektrochemische Messungen in den Biowissenschaften	22
1.4.1 pH-Messungen	22
1.4.2 Topografie-Messungen	23
1.4.3 Sauerstoffmessungen	23
1.4.4 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies	24
1.5 Einzelzellmessungen vs. Zellpopulationmessungen	25
1.6 Zielsetzung	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Reagenzien, Antikörper und Konstrukte	28
2.1.2 Lösungen	29
2.1.3 Verbrauchsmaterial	30
2.1.4 Kits	30
2.1.5 Laborgeräte	31

Inhaltsverzeichnis

2.1.6	Zellen und Mauslinien	32
2.1.7	Software	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	34
2.2.2	Isolation humaner Monozyten	35
2.2.3	Isolation muriner Monozyten.....	36
2.2.4	Zellkultur und Transfektion.....	37
2.2.5	Elektrochemische Messungen mit dem ElProScan	37
2.2.6	Messung von intrazellulärem H ₂ O ₂ mit Sensoren für die Fluoreszenzmikroskopie .	41
2.2.7	Durchflusszytometrie	44
2.2.8	Messung von H ₂ O ₂ mit Amplex UltraRed.....	45
2.2.9	Messung von H ₂ O ₂ mit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	46
2.2.10	Kontrollierte intrazelluläre Produktion von H ₂ O ₂ durch D-Aminosäureoxidase ...	47
2.2.11	Statistik.....	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden.....	50
3.1.1	Qualitätskontrolle der Elektrode.....	55
3.1.2	Temperatursensitivität von Pt-Ultramikroelektroden	57
3.2	Elektrochemische Messung von H ₂ O ₂ an Einzelzellen	59
3.2.1	Kalibrierung chronoamperometrischer H ₂ O ₂ -Messungen	60
3.2.2	Quantifizierung der H ₂ O ₂ -Produktion und Eliminierung durch Monozyten.....	65
3.2.3	H ₂ O ₂ -Produktion und –Eliminierung von Maus-Monozyten in Abhängigkeit vom Lebensalter	76
3.3	Kombinierte elektrochemische und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen an Einzelzellen	80
3.3.1	SECM-FM mit HyPer als intrazellulärem H ₂ O ₂ -Sensor.....	81
3.3.2	SECM-FM mit roGFP als intrazellulärem Sensor.....	89
3.4	Elektrochemische Messung des Sauerstoffverbrauchs von Einzelzellen	96
3.4.1	Chronoamperometrische O ₂ -Messungen	96
3.4.2	Einfluss von Coenzym Q10 auf die Respiration von HEK-293-Zellen	98
4.	Diskussion	101

Inhaltsverzeichnis

4.1	Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden.....	101
4.2	Chronoamperometrische H ₂ O ₂ -Messungen	103
4.3	Kombinierte elektrochemische und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen.....	108
4.4	Chronoamperometrische O ₂ -Messungen	114
4.5	Schlussfolgerung	117
5.	Appendix.....	119
5.1	Abkürzungsverzeichnis	119
5.2	Abbildungsverzeichnis	121
5.3	Tabellenverzeichnis.....	122
5.4	Python-Programm zur Wiener-Dekonvolution von amperometrischen SECM-Messungen.....	123
5.5	Literaturverzeichnis.....	125
5.6	Publikationen	139
5.7	Danksagung.....	141
5.8	Curriculum Vitae.....	142

Zusammenfassung

Genauere Kenntnisse über (patho-)physiologischer Vorgänge auf Einzelzellebene sind eine Grundvoraussetzung, um ein vertieftes Verständnis über die Grundlagen intra- und interzellulärer metabolischer Prozesse zu erlangen. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) spielt dabei eine wichtige Rolle. In niedrigen Konzentrationen ist es ein Botenstoff, der viele verschiedene zelluläre Prozesse über eine gezielte Oxidation wichtiger Schaltstellen beeinflussen kann. Solche Redox-regulierte Prozesse sind unter anderem Transkription, Biosynthese, Modifikation und der Transport von Proteinen, Apoptose und die Zellalterung. Auch für interzelluläre Kommunikation ist H_2O_2 relevant, z. B. bei der Migration von Immunzellen zu den Zielorten. In hohen Konzentrationen spielt H_2O_2 unter anderem als bakterizide Substanz bei der primären Immunantwort eine Rolle. Da H_2O_2 in vielen metabolischen Prozessen und z. B. auch bei der Zellatmung in den Mitochondrien entstehen kann, ist eine effiziente Regulation der H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung („ H_2O_2 -Homöostase“) durch einzelne Zellen essentiell. Verschiedene Methoden zur Messung von H_2O_2 werden bereits genutzt, z. B. fluoreszenzbasierte Methoden. Jedoch bietet keine dieser Methoden die Möglichkeit, H_2O_2 auf Einzelzellebene zu quantifizieren sowie die Dynamik der H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung darzustellen. Elektrochemische H_2O_2 -Messungen mit Platin-Ultramikroelektroden ermöglichen dies; sie zeichnen sich durch Spezifität, hohe Sensitivität, sowie exzellente zeitliche und räumliche Auflösung aus.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, elektrochemische H_2O_2 -Messungen sowie deren Quantifizierung an lebenden Einzelzellen zu etablieren, charakterisieren und mögliche Anwendungen zu demonstrieren. Dazu wurde ein Herstellungsverfahren für Platin-Ultramikroelektroden etabliert, welche für diese Messungen eine grundlegende Voraussetzung sind. Mit elektrochemischen Methoden konnte die Menge an H_2O_2 quantifiziert werden, die ein einzelner, primärer humaner Monozyt produziert, sowie ein vom Monozyten ausgehender H_2O_2 -Gradient.

Da H_2O_2 sowohl intra-, als auch extrazellulär produziert werden und über die Zellmembran transportiert werden kann, wurde ein Verfahren entwickelt, um extrazelluläre, elektrochemische Messungen mit intrazellulären, Fluoreszenzmikroskopie-Messungen für H_2O_2 zu kombinieren. Mit diesem Verfahren konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres H_2O_2 von der Zelle aufgenommen wird, intrazellulär produziertes H_2O_2 die Zelle aber nicht verlässt. Kombinierten Messungen zeigten außerdem, dass eine genetische Veränderung von Mäusen

Zusammenfassung

durch dauerhafte Expression des H_2O_2 -Sensors roGFP2-orp1 die H_2O_2 -Homöostase ihrer Monozyten beeinflusst.

Ein weiteres Ziel war es, mit elektrochemischen Methoden den relativen Sauerstoffverbrauch von lebenden Einzelzellen zu bestimmen. Der O_2 -Verbrauch einer Zelle ermöglicht Rückschlüsse auf Zell-Viabilität, den metabolischen Zustand sowie Reaktionen der Zelle auf Behandlungen mit unterschiedlichen Substanzen. An HEK-293-Zellen konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Gabe von Coenzym Q10 (einem in der Elektronentransportkette relevanten Coenzym), bzw. hydroxyliertem OH-Coenzym Q10 den O_2 -Verbrauch verringert, also die Atmung hemmt.

Zusammengefasst wurden im Rahmen dieser Arbeit elektrochemischen Methoden vorgestellt, die geeignet sind physiologische Parameter, wie die Atmung und die H_2O_2 -Homöostase an lebenden Einzelzellen nicht-invasiv, spezifisch und in Echtzeit zu messen.

Summary

Precise knowledge of (patho-)physiological events on a single-cell level is a prerequisite to obtain deeper insights into the fundamentals of intra- and intercellular metabolism. Hydrogen peroxide (H_2O_2) plays a key role in many metabolic processes. In low concentrations it is a signaling molecule and influences various cellular processes via precise oxidation of target molecules. Redox-regulated processes are, amongst many others, transcription, biosynthesis, modification and transport of proteins, apoptosis and cell-ageing. H_2O_2 is also involved in inter-cellular communication, e.g. in regulating migration of immune cells to their target locations. At the same time, H_2O_2 in high concentrations plays a role for example as a bactericidal substance during the primary immune response. As H_2O_2 is produced during many metabolic processes, as well as for example during cellular respiration in mitochondria, a well-balanced regulation of its production and elimination (“ H_2O_2 -homeostasis”) is essential for cells. Several methods to detect H_2O_2 are regularly used, such as fluorescence based methods. None of those are suitable to quantify H_2O_2 on a single-cell level nor can they measure the dynamics of H_2O_2 -production and –elimination. Electrochemical measurements with platinum-ultramicroelectrodes facilitate that, they are characterized by specificity, high sensitivity, as well as outstanding temporal and spatial resolution.

One main aim of this work was to establish, characterize and demonstrate electrochemical H_2O_2 -measurements on a single-cell level as well as their quantification. For this purpose a fabrication protocol for platinum-ultramicroelectrodes was established, which are a prerequisite for those electrochemical measurements. Using electrochemical methods, the amount of H_2O_2 produced by a single primary human monocyte could be quantified, as well as a H_2O_2 -gradient originating from it.

As H_2O_2 can be produced intra- as well as extracellularly and can cross the cell membrane, a procedure was established to combine extracellular, electrochemical measurements of H_2O_2 with intracellular, fluorescence microscopy determination of H_2O_2 . Using this method, it could be shown that although extracellular H_2O_2 gets absorbed by the cell, intracellularly produced H_2O_2 does not leave the cell. Combined measurements also showed that genetic modification of a mouse with the H_2O_2 -sensor roGFP2-orp1 has an influence on the H_2O_2 -homeostasis of its monocytes.

Another aim was to electrochemically measure the relative oxygen consumption of single living cells. O_2 -consumption allows drawing conclusions about cell viability and metabolic

Summary

state as well as its responses to specific treatments with different substances. Treating HEK-293 cells extracellularly with coenzyme Q10 (a component of the electron transport chain), or with hydroxylated OH-coenzyme Q10 reduced their O₂-consumption, thus inhibiting their respiration.

Summarized, within the scope of this work electrochemical methods to measure physiological parameters, such as respiration and H₂O₂-homeostasis, of single living cells non-invasively, specific and in real time were presented.

1. Einleitung

Um Fortschritte in der modernen Wissenschaft zu machen und neue Erkenntnisse zu gewinnen, ist eine Neu- bzw. Weiterentwicklung von Messverfahren von großer Bedeutung. Elektrochemische Messmethoden haben sich dabei in den letzten Jahren ein Anwendungsgebiet in den Biowissenschaften erschlossen. Sie können ein wertvolles Werkzeug sein, um physiologische Parameter biologischer Systeme sensitiv, spezifisch und nicht-invasiv zu bestimmen. Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, elektrochemische Methoden zur Messung von Wasserstoffperoxid-Konzentrationen, sowie des Sauerstoff-Verbrauchs auf Einzelzellebene zu etablieren und zu charakterisieren. Dieses Kapitel bietet eine Übersicht über die gemessenen Parameter und deren Bedeutung für den Zell-Metabolismus, sowie über den theoretischen Hintergrund und aktuelle Anwendungen der Elektrochemie.

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sind teilweise reduzierte oder angeregte Formen des molekularen (also atmosphärischen) Sauerstoffs (O_2). Molekularer O_2 hat zwei ungepaarte Elektronen in unterschiedlichen Orbitalen der äußeren Elektronenhülle, was ihn anfällig für eine Radikalbildung durch Reduktion macht. Es gibt verschiedene Formen von ROS, radikalische (z. B. Superoxid $O_2^{\cdot-}$, Hydroxyl-Radikal OH^{\cdot}) und nicht-radikalische (z. B. Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Peroxid-Anion O_2^{2-} (Halliwell & Gutteridge, 2007)). Ein Großteil der zellulär produzierten ROS stammt aus der mitochondrialen Atmungskette und von NADPH-Oxidasen (NOX). Andere Oxidasen (z. B. Xanthin-Oxidasen) sind in geringerem Umfang an der Bildung von ROS beteiligt (Sies, 2014). Entlang der Atmungskette werden Elektronen von den aus dem Stoffwechsel stammenden Reduktionsäquivalenten $NADH + H^+$ und $FADH_2$ über mehrere Proteinkomplexe und Elektronen-Carrier (Coenzym Q10, Cytochrom c) auf O_2 übertragen, wobei H_2O und ATP entstehen. Verlässt ein Elektron die Transportkette vorzeitig und geht auf O_2 über, entsteht $O_2^{\cdot-}$ (Murphy, 2009). Eine andere, gezielte Produktion von ROS geschieht über NOX-Enzyme, welche $O_2^{\cdot-}$ entstehen lassen, indem sie einen $1 e^-$ -Transfer von NADPH auf O_2 katalysieren (Ushio-Fukai, 2006). NADPH ist ein weiteres Reduktionsäquivalent und entstammt hauptsächlich aus dem Pentose-Phosphat-Weg (Minard et al., 1998). $O_2^{\cdot-}$ ist hochreaktiv und bildet zusammen mit H^+ die chemisch deutlich stabileren Produkte H_2O_2 und O_2 . Diese

Einleitung

Dismutation kann spontan ablaufen. O_2^- hat eine Halbwertszeit von etwa 10^{-4} s. Intra-, sowie extrazelluläre Superoxid-Dismutasen (SOD) beschleunigen diese Reaktion bis zu 10.000-fach (Che et al., 2016). ROS können sowohl intra- als auch extrazellulär produziert werden (Buvelot et al., 2019; Lambeth, 2004). Extrazelluläre, radikalische ROS können die Zellmembran nicht passieren. Nicht-radikalische ROS (z. B. H_2O_2) gelangen über Aquaporine (sog. Peroxiporine, Sies, 2014) oder in geringen Mengen über Diffusion in das Zellinnere (Antunes & Cadenas, 2000; Henzler & Steudle, 2000).

ROS sind für viele Zellfunktionen von großer Bedeutung: H_2O_2 in hohen Konzentrationen (mikro- bis millimolar) verursacht oxidativen Stress, was z. B. in DNA- oder Proteinschäden resultiert (Cadet & Richard Wagner, 2013). Ebenfalls verwenden phagozytierende Zellen (z. B. Makrophagen) H_2O_2 als cytotoxische Substanz zur Abwehr von pathogenen Eindringlingen (Shi & Pamer, 2011). In niedrigen Konzentrationen (nano- bis niedrig mikromolar) spielt H_2O_2 eine entscheidende Rolle als Signalmolekül (Schieber & Chandel, 2014). H_2O_2 kann mit schwefelhaltigen Aminosäuren (Cystein und Methionin) und mit metallhaltigen Zentren von Proteinen interagieren (Forman et al., 2004, 2014; Winterbourn & Hampton, 2008). Durch Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen zweier Cysteinreste wird eine Disulfidbrücke gebildet, so kann H_2O_2 z. B. Auswirkungen auf die Proteinfaltung haben (Tu & Weissman, 2004). Viele metabolische Prozesse sind durch H_2O_2 Redox-reguliert, unter anderem die Transkription, Biosynthese, Modifikation und der Transport von Proteinen. In der angeborenen und erworbenen Immunabwehr dient H_2O_2 in niedrigen Konzentrationen als Signalmolekül, als auch in höheren Konzentrationen als bakterizide Substanz (z. B. bei der Phagozytose; Burhans & Heintz, 2009; Oliveira-Marques et al., 2009; Sies, 2014; Tamma et al., 2014; Zhou et al., 2017). H_2O_2 in nanomolaren Konzentrationen beeinflusst die Proliferation (Burch & Heintz, 2005), während es in höheren Konzentrationen Apoptose, Zellalterung (Davalli et al., 2016) und diverse pathophysiologische Zustände beeinflusst (Übersichten z. B. in Agarwal et al., 2003; Brieger et al., 2012; Erdamar et al., 2008; Touyz et al., 2020; Volpe et al., 2018). ROS können also über einen großen Konzentrationsbereich auf intra- und extrazelluläre Prozesse einwirken. Aus diesem Grund ist zum einen eine feine Balance zwischen Produktion und Eliminierung essentiell für die Zelle, zum anderen eine streng kontrollierte zeitliche und räumliche Verteilung. Da H_2O_2 „wahllos“ alle geeigneten Substrate in seiner direkten Umgebung oxidieren würde, besitzt die Zelle Mechanismen, um die Wirkung von H_2O_2 zielgerichtet vermitteln zu können. Sie bildet Metaboliten, welche am

Einleitung

passenden Ort zur richtigen Zeit in sehr hoher Affinität durch H_2O_2 oxidiert werden und das Signal über eine Signalkaskade zielgerichtet weitergeben. D. h., dass die H_2O_2 -Konzentration an der jeweiligen Stelle schnell abnimmt (H_2O_2 also eliminiert wird) und eine Redox-Signalkette angestoßen wird, welche über mehrere Zwischenschritte die Signal-Transduktion steuert. Die Redox-Signalkette läuft über verschiedene Redox-Mediatoren ab, welche reversibel oxidiert und reduziert werden. Ein immer wiederkehrendes Motiv in den Proteinen sind dabei Schwefelgruppen, welche zu Disulfidbrücken oxidiert werden, daher werden viele dieser Redox-Mediatoren auch als Thiol-Schalter (*Thiol-Switches*) betitelt (Herrmann et al., 2015). Die Zelle verfügt über verschiedene Systeme, welche diese Kaskaden bilden können. Eine wichtige Komponente ist das Glutathion/Glutathion-Disulfid (GSH/GSSG)-System. Das Tripeptid GSH (gebildet aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin) wird durch H_2O_2 zu dem Dimer GSSG oxidiert und H_2O_2 wird dabei zu H_2O reduziert. GSSG wird über die Glutathion-Reduktase unter Benutzung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Reduktionsäquivalent wieder zu GSH reduziert. Ähnlich verhält es sich beim Peroxiredoxin (Prx), welches von H_2O_2 oxidiert und über Thioredoxin (Trx) wieder reduziert wird. Dabei kann Prx nicht nur als Intermediat in der ROS-Signaltransduktion, sondern auch als ROS-„Abfänger“ fungieren (Aon et al., 2010; Morrell, 2008; Rhee et al., 2018; Winterbourn & Hampton, 2008). Ein weiterer enzymatischer Weg, um H_2O_2 -Konzentrationen niedrig zu halten sind intra- und extrazelluläre Katalasen, welche H_2O_2 zu H_2O reduzieren (Antunes & Cadenas, 2000; Walton & Pizzitelli, 2012).

Eine besonders wichtige Rolle spielen ROS im Immunsystem. Eine der zuerst entdeckten Funktionen von H_2O_2 findet sich im sogenannten *oxidativen burst*. Nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen kommt es zur Freisetzung großer Mengen ROS in den Extrazellulärraum. Diese hohe Produktion von ROS geht mit einem großen Sauerstoffverbrauch einher, woher auch der Name (*oxidativer burst*) stammt (Baldridge & Gerard, 1932; Rada & Leto, 2008). Diese Eigenschaft der genannten Immunzellen machen sie zu interessanten Zellmodellen, um die Mechanismen der extrazellulären H_2O_2 -Produktion und -Veränderung über die Zeit zu studieren. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich hauptsächlich auf die Untersuchung von Monozyten und Makrophagen. Diese Zelltypen übernehmen wichtige Funktionen in der Immunantwort. Über Phagozytose können sie Pathogene aufnehmen und unschädlich machen, sie bilden inflammatorische Zytokine und präsentieren Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Sie sind somit

wichtige Mitspieler in dem komplexen, multi-zellulären Gesamtsystem der Immunantwort (Auffray et al., 2009; Dale et al., 2008; Geissmann et al., 2010). Viele immunologische Prozesse sind Redox-reguliert. Als Signalmolekül übernimmt H_2O_2 sowohl intra- als auch interzellulär wesentliche Aufgaben (Gostner et al., 2013; Lambeth, 2004; Mu et al., 2019). So erstreckt sich z. B. von verletzten Zebrafisch-Epithelzellen ein H_2O_2 -Gradient über das Gewebe, welcher Leukozyten gezielt zur Verletzungsstelle wandern lässt (Niethammer et al., 2009). Auch die Migration von Natürlichen Killerzellen (Zhou et al., 2017), Fibroblasten (Venkova et al., 2014) und glatten Muskelzellen (San Martín & Griendling, 2010) ist durch H_2O_2 beeinflusst. Die geregelte Funktion von Immunzellen setzt eine effiziente Kontrolle intra- und extrazellulärer ROS-Konzentrationen voraus; Abweichungen verursachen gestörte und evtl. irreversible physiologische Veränderungen. So führen z. B. zu niedrige ROS-Konzentrationen in T-Lymphozyten zu erniedrigter Proliferation und T-Zell-Rezeptor-Bildung, während sehr hohe ROS-Konzentrationen oxidativen Stress, DNA-Schäden und Apoptose verursachen (Kesarwani et al., 2013).

1.2 Messmethoden für reaktive Sauerstoffspezies

Zur Messung von ROS werden hauptsächlich folgende Methoden angewendet: Fluoreszenzbasierte Verfahren, welche sowohl genetisch kodierte intrazelluläre Sensoren als auch fluoreszierende Farbstoffe einsetzen; Chemilumineszenz (z. B. Luminol (Bedouhène et al., 2017)); Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie und elektrochemische Techniken. Übersichten über die Methoden sind z. B. in Griendling et al., 2016; Gulaboski et al., 2019; Prasad et al., 2019; Y. Zhang et al., 2018 zu finden.

1.2.1 Optische Messmethoden zur Bestimmung von H_2O_2

Die Anwendung von Chemilumineszenz zur Bestimmung von ROS ist seit den 1960er Jahren bekannt (Totter et al., 1960) und basiert auf der Oxidation eines Redox-sensitiven Stoffes (z. B. Luminol), der nach Oxidation Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Allerdings sind diese Substanzen nicht ROS-spezifisch (können also von unterschiedlichen Oxidantien oxidiert werden). Da sie in die Zelle diffundieren können geben sie Aufschluss über das globale (intra- plus extrazelluläre ROS). Im Fall von Luminol wird hauptsächlich globales $\text{O}_2^{\cdot -}$ detektiert (Yamazaki et al., 2011).

In den Biowissenschaften sind Fluoreszenz-optische Messmethoden weit verbreitet. Zur Bestimmung von H_2O_2 stehen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. So dient

z. B. der *Amplex[®] UltraRed Assay* der Bestimmung von H_2O_2 in einem Puffer oder in der Umgebungsflüssigkeit von Zellen. Bei diesem Assay ist das farblose Amplex UltraRed der Wasserstoffdonor für die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP), welche H_2O_2 reduziert. Amplex UltraRed wird dabei irreversibel zum farbigen Resorufin oxidiert, welches fotometrisch detektiert werden kann. Da diese Reaktion irreversibel ist, sind dynamische Verläufe von H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung über die Zeit nicht messbar. Außerdem sind nur extrazelluläre Messungen an Zellpopulationen möglich, keine Einzelzell-Bestimmungen (Bogeski et al., 2011; Winterbourn, 2014). Für intrazelluläre ROS-Messungen gibt es ähnliche Farbstoffe, welche die Zellmembran passieren können, z. B. Dichlorofluorescein-diazetat (DCFDA). In der Zelle spalten Esterasen einen Ester vom Farbstoff ab und der Farbstoff verbleibt in der Zelle. Vorteile dieser Messmethode sind der günstige Preis und die relativ einfache Handhabung; eine Apparatur zur Messung fluoreszierender Stoffe (z. B. ein Plate-Reader oder ein Fluoreszenzmikroskop) sind in den meisten biowissenschaftlichen Laboren vorhanden. Nachteile sind unter anderem das Ausströmen (auch durch aktiven Transport) des Farbstoffs aus der Zelle, Fototoxizität und -bleaching während der Messung, sowie die Irreversibilität der Reaktion, auf der die Fluoreszenz basiert. DCFDA ist außerdem nicht ROS-selektiv, d. h. es kann gleichfalls durch andere Substanzen oxidiert werden und somit nicht zur genauen Messung für einen einzelnen ROS-Typ (z. B. H_2O_2) eingesetzt werden (Winterbourn, 2014).

Im Jahr 2006 entwickelten Belousov und Kollegen HyPer, einen genetisch kodierten Fluoreszenz-Marker zur intrazellulären Bestimmung von H_2O_2 . Dieser kodiert für ein Fusionsprotein aus cpYFP (Farbstoff) und OxyR (H_2O_2 -sensitives Protein aus Bakterien). Die Oxidation von OxyR ist H_2O_2 -selektiv und führt zu einer Spektralverschiebung der Absorption des Farbstoffs (Belousov et al., 2006). Somit ist mit HyPer eine ratiometrische Bestimmung von H_2O_2 innerhalb der Zelle möglich, was dazu führt, dass z. B. Expressionseffizienz sowie Ausbleichen des Sensors, Änderungen im Fokus oder Variationen der Belichtungsstärke nur geringe Einflüsse auf die Messung haben. Weitere fluoreszierende Proteine für ratiometrische Messungen sind roGFP und rxYFP (Morgan et al., 2016). Diese Sensoren sind auch für Bestimmungen in subzellulären Kompartimenten erhältlich. Solche Sensoren ermöglichen es, H_2O_2 -Profile und komplexe Dynamiken innerhalb der Zelle darzustellen. Nachteile sind unter anderem, dass keine Kalibrierung zur quantitativen H_2O_2 -Bestimmung möglich ist und dass die Farbstoffe pH-sensitiv reagieren (was pH-Kontrollen

nötig macht). Bei Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen kommt es, abhängig vom Wellenlängen-Bereich der Anregung, zu fototoxischen Effekten, welche in Zellen zur Bildung von ROS führen können (Belousov et al., 2006; Lavi et al., 2010). Außerdem kann die Transfektion der Zellen mit den Sensoren durch den damit einhergehenden Zellstress zu einer Auslösung oder Erhöhung der ROS-Produktion führen (Fischer-Kierzkowska et al., 2011). Zudem hat sich gezeigt, dass die Transfektion, vor allem von primären Zellen (z. B. Monozyten) sehr kompliziert oder gar unmöglich ist (Gresch & Altrogge, 2012).

1.2.2 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie zur Bestimmung von H_2O_2

Ein weiteres Verfahren zur (indirekten) Messung von H_2O_2 ist die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie. Da H_2O_2 nicht radikalisch und somit auch nicht per ESR-Spektroskopie direkt gemessen werden kann, muss ein Hilfsmittel, ein sogenannter Spin-Sensor (*spin probe*), verwendet werden. Spin-Sensoren sind Stoffe, welche über eine Reaktion mit dem Molekül von Interesse als freies Radikal messbar werden und das Molekül von Interesse so indirekt nachweisen. Sie können auch direkt an das Molekül von Interesse binden und es somit messbar machen. Zum Nachweis von H_2O_2 dient cyclisches Hydroxylamin-1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) als Spin-Sensor in Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP). Dabei wird die HRP-vermittelte Reduktion von H_2O_2 mit CMH als Elektronendonator für intermediäre Redox-Zustände der HRP, indirekt nachgewiesen. Es entstehen zwei CM-Nitroxyl-Radikale ($\text{CM}\bullet$), welche mit der ESR gemessen werden können (Thierbach et al., 2014). Vorteile dieser Technik sind die Sensitivität (100 nM bis ca. 50 μM) und Spezifität für H_2O_2 (Gulaboski et al., 2019). Nachteile sind, dass lediglich Zellpopulationen in Suspension gemessen werden können und dass teure Ausrüstung sowie umfangreiche Kenntnisse und Erfahrung für Messungen dieser Art notwendig sind.

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung von ROS bieten elektrochemische Methoden. (z. B. Amatore et al., 2000; Bogeski et al., 2011; Severinghaus, 2002; Wang et al., 2012). Diese zeichnen sich durch hohe Sensitivität und Spezifität, sowie gute räumliche und zeitliche Auflösung aus (Amatore et al., 2010; Bozem et al., 2018; Liu & Zweier, 2001). Da in dieser Arbeit vorrangig mit elektrochemischen Methoden gearbeitet wurde, soll im Folgenden eine Einführung in die Prinzipien dieser Methodik gegeben werden.

1.3 Theoretischer Hintergrund zur Elektrochemie

Wenn eine chemische Reaktion mit einem elektrischen Strom verknüpft ist, spricht man von einem elektrochemischen Vorgang. Elektrochemie basiert auf Redoxreaktionen, also Reaktionen, bei denen ein Partner oxidiert wird, d.h. Elektronen abgibt und der andere Partner reduziert wird, d.h. Elektronen aufnimmt. Typisch für die Elektrochemie ist die räumliche Trennung von Oxidation und Reduktion. Das bedeutet, die in den jeweiligen Redoxreaktionen übertragenen Elektronen werden nicht direkt vom Elektronen-Donor auf den finalen Elektronen-Akzeptor übertragen, sondern vom –Donor auf eine Elektrode. Diese ist über einen Stromkreis mit einer weiteren Elektrode verbunden, welche die Elektronen dann auf den endgültigen Elektronen-Akzeptor überträgt. So werden die Redoxreaktionen mess- und steuerbar. Dabei wird entweder die Redoxreaktion durch eine von außen angelegte elektrische Spannung erzwungen (z. B. bei der Elektrolyse) und der resultierende Strom gemessen oder es wird durch die chemische Reaktion geeigneter Substanzen eine messbare Spannung hervorgerufen (z. B. bei einer Batterie). Diese Spannungen sind charakteristisch für die jeweiligen Reaktionen und abhängig vom Redoxpotential des dazugehörigen Stoffes. Das Redoxpotential gibt die Affinität einer Substanz zu Elektronen an. Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Stoffen zu ermöglichen, wurden Standardbedingungen zur Bestimmung des Standard-Redoxpotentials (E^0) eines Stoffes festgelegt: für biologische Systeme gilt: Konzentration 1 mM; pH 7,0; Druck 101,325 kPa; Temperatur 25 °C; gemessen wird das Standard-Redoxpotential gegen eine Standard-Wasserstoff-Elektrode, Wasserstoff-Partialdruck = 1 bar. (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Nič et al., 2009). Das Standard-Redoxpotential kann dabei positiv sein, d. h. die Substanz nimmt von der Wasserstoff-Elektrode Elektronen auf oder negativ, d. h. die Substanz gibt unter Standardbedingungen Elektronen an die Wasserstoff-Elektrode ab. Die Höhe des Potentials gibt dabei an, wie stark die Reaktion abläuft. Die Standard-Redoxpotentiale sind auf der elektrochemischen Spannungsreihe dokumentiert. Mittels der Standard-Redoxpotentiale lässt sich berechnen, welche Spannung ein Zusammenschluss zweier Redoxpaare liefert. Je größer die Differenz zwischen den Redoxpotentialen der Substanzen (ΔE), desto heftiger fließen die Elektronen vom Partner mit dem negativeren Redoxpotential zum Partner mit höherem Potential (= desto höher ist die Spannung). Außerdem lässt sich berechnen, welche Spannung angelegt werden muss, um eine Elektrolyse des jeweiligen Redoxpaares hervorzurufen.

Einleitung

Eine zentrale Bedeutung in der Redox- und Elektrochemie hat die *Nernst*-Gleichung. Sie beschreibt das Elektrodenpotential, welches bei der Reaktion eines Redoxpaares entsteht. Sie verbindet die elektrische Größe Spannung (das Elektrodenpotential) mit der chemischen Größe Konzentration, denn die Spannung ist abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner.

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}$$

Hierbei ist E das Elektrodenpotential, E^0 das Standardelektrodenpotential, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, z_e die Anzahl der übertragenen Elektronen, F die Faraday-Konstante und a die Aktivität (welche analog zur Konzentration gesehen werden kann) des betreffenden Redoxpartners.

Bei 25° C ergibt sich daraus:

$$E = E^0 + \frac{0,059V}{z_e} \log \frac{a_{Ox}}{a_{Red}}$$

Hier zeigt sich, dass die Spannung E unter anderem auch abhängig von der jeweiligen Konzentration des Redoxpartners ist.

1.3.1 Die elektrochemische Zelle

Das Herzstück jeder elektrochemischen Messung ist eine elektrochemische Zelle, welche in einer 3-Elektroden-Konfiguration betrieben wird. Eine Arbeits-, eine Referenz- und eine Gegenelektrode sind dabei mit dem zu untersuchenden Stoff (dem Analyten) über einen Elektrolyten (der Messlösung) verbunden. Man kann die Funktion der Elektroden vereinfacht wie folgt darstellen: Für amperometrische und voltammetrische Messungen wird ein definiertes Potential zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode angelegt. Dadurch läuft an der Arbeitselektrode eine elektrochemische Reaktion ab, z.B. ein Elektronentransfer vom Analyten auf die Arbeitselektrode, was als positiver Strom messbar ist. Eine Reduktion des Analyten ist ebenfalls möglich, also ein Übergang von Elektronen von der Arbeitselektrode auf den Analyten, was als negativer Strom messbar ist. An der Gegenelektrode läuft eine entgegengesetzte Reaktion ab, d. h. bei einer Oxidation an der Arbeitselektrode findet an der Gegenelektrode eine Reduktion statt und umgekehrt. Die Referenzelektrode stellt dabei den Referenzpunkt für das System dar und sorgt für eine stabile Spannung, welche über mehrere Experimente hinweg reproduzierbar ist (Bard & Mirkin, 2012). Bei Messungen, bei denen erwartet wird, dass das Potential der Gegenelektrode nicht stark schwankt, können die Referenz- und die Gegenelektrode zu einer Elektrode zusammengefasst werden

Einleitung

(= 2-Elektrodenmodus). Dies ist der Fall bei Messungen mit sehr geringen Messströmen und bei Systemen, bei welchen die Gegenelektrode eine deutlich größere Oberfläche als die Arbeitselektrode hat (Inzelt, 2013). Im für diese Arbeit verwendeten System haben Kontrollversuche ergeben, dass der 2-Elektrodenmodus für H_2O_2 -Messungen von Vorteil ist, da so ein Überschießen des Messstromes bei H_2O_2 -Zugabe zur Messlösung verringert werden konnte (Bozem et al., 2018). In Abbildung 1 ist ein Messsystem für elektrochemische Messungen dargestellt.

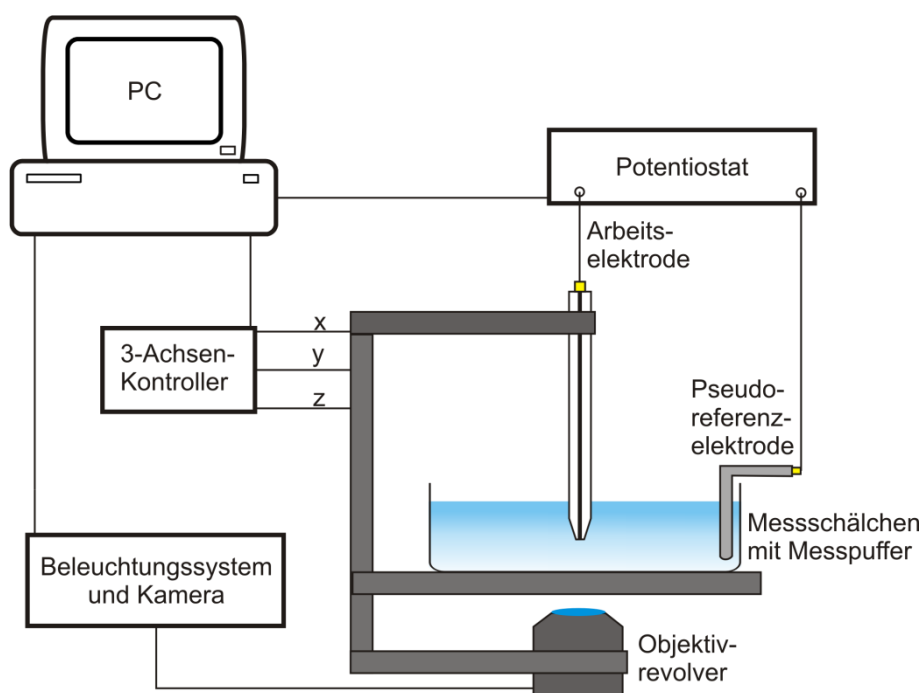


Abbildung 1 - Schematischer Aufbau des Messsystems.

Das System besteht aus der Arbeitselektrode und einer Pseudo-Referenzelektrode, eingetaucht in Messpuffer. Positionierungen der Arbeitselektrode und des inversen Mikroskops werden über den Kontrolller gesteuert. Die Datenerfassung sowie das Regulieren der Spannung erfolgen über den Potentiostaten. Die Daten werden über einen PC aufgezeichnet, über welchen auch das System angesteuert wird. Das in dieser Arbeit verwendete System verfügt zusätzlich über ein Beleuchtungssystem zur Fluoreszenzmikroskopie und eine Kamera.

Mit diesem Grundaufbau des Systems sind verschiedene elektroanalytische Methoden anwendbar, welche die Änderung des Stroms bei entweder gleichzeitiger Änderung des Potentials (Voltammetrie) oder bei gleichbleibendem Potential (Amperometrie) messen. Außerdem kann eine Änderung des Potentials gemessen werden, wobei der Strom bei null gehalten wird (Potentiometrie).

1.3.2 Voltammetrie

In der Voltammetrie werden elektrochemische Eigenschaften eines Analyten untersucht, indem man den erzeugten Strom in Abhängigkeit des Potentials misst (Zoski, 2007). Das angelegte Potential kann dabei auf verschiedene Arten geändert werden, z.B. zyklisch, linear oder auf komplexere Art (z. B. *Squarewave Voltammetry*). In dieser Arbeit wurde nur die zyklische Variante angewendet.

Zyklische Voltammetrie (*Cyclic Voltammetry*, CV)

Bei der CV wird, ausgehend vom gewünschten Startpotential, das angelegte Potential über die Zeit mit einem gewissen Faktor, der sogenannten Vorschubgeschwindigkeit (engl. *scan rate*, angegeben in Spannung pro Zeit), linear geändert. Bei Erreichen des gewünschten Endpotentials wird die Spannung in die entgegengesetzte Richtung verändert, bis das gewählte Startpotential wieder erreicht ist. Einen dieser Durchläufe nennt man einen *sweep*. Bei Erreichen des charakteristischen Potentials für entweder die Oxidation oder die Reduktion des Analyten, erhöht sich der Betrag des Stromes aufgrund der Übertragung der Elektronen auf oder von der Elektrode. Der entstehende Höchststrom (= *peak*) für die ablaufenden Redoxprozesse wird über die *Randles-Sevcik*-Gleichung beschrieben (Heinze, 1984):

$$i_p = 0,4463nFAC\left(\frac{nFvD}{RT}\right)^{\frac{1}{2}}$$

dabei ist i_p der Peakstrom, n die Anzahl der übertragenen Elektronen, F die Faraday-Konstante, A die Elektrodenoberfläche, C die Konzentration des Analyten, v die Scan-Rate, D der Diffusionskoeffizient, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur.

Der Strom i an der Arbeitselektrode, in Abhängigkeit von der angelegten Spannung ist also der Faktor, welcher Informationen über den Analyt liefert. Ein genaues Verständnis, wie dieser Strom entsteht, ist also unabdingbar um elektrochemische Vorgänge verstehen und interpretieren zu können.

Der an der Elektrode gemessene Strom kann in zwei Kategorien unterteilt werden:

1. Faradaysche Ströme, welche aus den an der Elektrode ablaufenden Redoxreaktionen entstehen. Dadurch wird ein Konzentrationsgradient erzeugt, welcher dazu führt, dass elektroaktive Spezies zu der Arbeitselektrode diffundieren.
2. Kapazitive Ströme, welche unabhängig von chemischen Reaktionen oder Ladungsübertragung sind. Kapazitive Ströme stammen von der Bildung einer Doppelschicht an der Elektrode.

1.3.3 Kapazitive Ströme und die elektrochemische Doppelschicht

Sobald man eine Elektrode einer Elektrolytlösung aussetzt, entsteht an ihrer elektrochemisch aktiven Oberfläche eine Grenzschicht aus zwei parallelen Schichten elektrisch geladener Teilchen, die sogenannte elektrochemische Doppelschicht (Stern, 1924). Dies geschieht, da an der Elektroden-Elektrolyt-Grenzschicht eine Ladung entsteht, welche durch Ionen des Elektrolyten ausbalanciert wird. Da Ionen nicht so dicht gepackt werden können wie Elektronen, welche die Ladung in der Elektrode bilden, kommt es zu einer Ausbildung mehrerer Schichten von Ionen an der Elektrodenoberfläche (siehe Abb. 2). Diese Schichten sind abhängig von der Ladung der Elektrode, welche wiederum abhängig vom angelegten Potential und der Zusammensetzung der Lösung ist. Durch diesen Aufbau verhält sich die Doppelschicht wie ein elektrischer Kondensator, d. h. sie kann sich laden und entladen. Dabei entsteht ein kapazitiver Strom. Dies geschieht vor allem bei Potentialänderungen an der Elektrode. Ebenso führt eine Kapazitätsänderung der Elektrode zu einer Änderung der Ladung der Doppelschicht und somit zu einem kapazitiven Strom. Die Kapazität der Elektrode kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z. B. durch eine Veränderung der Temperatur oder der Elektrodenoberfläche. Durch Verschmutzung oder elektrochemischer Maskierung kann die elektrochemische aktive Oberfläche verkleinert werden. In dem von uns verwendeten System, bei dem ein Phosphat-Puffer eingesetzt wird, ist die Bildung von Pt-Oxiden an der Elektrodenoberfläche hauptsächlich verantwortlich für eine Abnahme der Elektrodensensitivität (Burke & Morrissey, 1996; Hall et al., 1997).

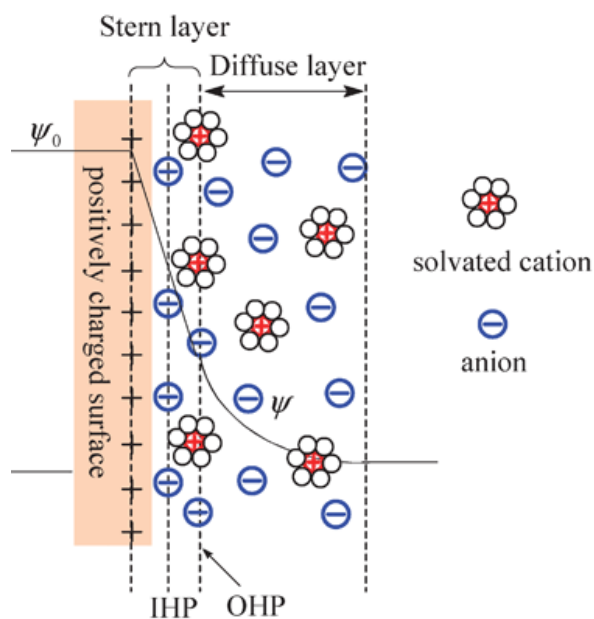


Abbildung 2 - Elektrochemische Doppelschicht (Stern-Modell).

Sie entsteht an der Grenzfläche von Elektrode (hier positiv geladen) zur Elektrolytlösung und besteht aus zwei parallelen Schichten elektrisch geladener Teilchen: Die innere (*inner Helmholtz plane*, IHP) und die äußere Helmholtz-Schicht (*outer Helmholtz plane*, OHP). *Diffuse layer* = Diffusionsschicht; Ψ_0 und Ψ = Potentiale an der Elektrodenoberfläche bzw. der Elektroden/Elektrolytlösungs-Grenzfläche. Modifiziert aus Zhang & Zhao, 2009.

1.3.4 Faradaysche Ströme

Faradaysche Ströme entstehen bei Redoxreaktionen, die bei dem angelegten Potential ablaufen. Sie geben Auskunft über den (bzw. die) Analyten in der Lösung. Allerdings ist zu beachten, dass in einer komplexen Messlösung nicht nur die Redoxreaktionen des zu untersuchenden Analyten ablaufen, sondern möglicherweise auch solche von anderen elektrochemisch aktiven Substanzen in der Messlösung. Der faradaysche Strom ist direkt abhängig von der Verfügbarkeit der elektrochemisch aktiven Spezies an der Elektrodenoberfläche. Die Schicht um die Elektrodenspitze wird als Diffusionsschicht bezeichnet und definiert als „Region in der Nähe der Elektrode, in der die Konzentration [elektrochemisch aktiver Substanzen] unterschiedlich von der Konzentration in der restlichen Lösung“ (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Nič et al., 2009). Die Diffusionsschicht hängt vom Diffusionskoeffizienten des Analyten und der Scan-Rate ab. Eine konstante Potentialänderung führt zu einem elektrochemischen Gradienten, dabei gilt: je höher die Scan-Rate, desto geringer die Diffusionsschicht (Crouch et al., 2017; Kissinger, Peter; Heineman, 1996; Kissinger, 2002). Allerdings wird durch eine hohe Scan-Rate der

kapazitive Strom erhöht (siehe 1.3.2), was zu einem geringeren Verhältnis von faradayschem Strom (also des Stroms, der Auskunft über den Analyten gibt) zu kapazitivem Strom führt. Je geringer die Scan-Rate, desto größer wird die Diffusionsschicht, allerdings wird auch der kapazitive Strom geringer und damit das Verhältnis von faradayschem zu kapazitivem Strom größer.

Zusammengefasst gilt, dass sich der gemessene Strom aus mehreren Subströmen summiert: (1) Aus faradayschen Strömen des Analyten; (2) aus Hintergrundsignalen, bestehend aus faradayschen Strömen des Elektrolyten und weiterer, in der Messlösung vorhandener elektrochemisch aktiver Substanzen; (3) aus kapazitiven Strömen.

1.3.5 Amperometrie

Bei amperometrischen Messungen ist die angelegte Spannung konstant, man untersucht also die Veränderung des Stromes über die Zeit (= Chronoamperometrie, CA). Ruft man sich in Erinnerung, dass eine Potentialänderung zu einem hohen kapazitiven Strom führt (siehe 1.3.3), ist bei gleichbleibendem Potential das Verhältnis von faradayschem zu kapazitivem Strom sehr hoch. Allerdings entsteht auch eine größere Diffusionsschicht an der Elektrode (siehe 1.3.4), welche den Massentransfer von elektrochemisch aktiven Substanzen zur Elektrodenoberfläche behindern kann. Der Strom hängt bei dieser Art der elektrochemischen Messung maßgeblich von der Anzahl der Elektronenübergänge der Reaktion sowie des Massentransfers des Reaktionspartners an der Elektrodenspitze ab. Der Punkt, an dem der gemessene Strom konstant ist, wird als Fließgleichgewicht bezeichnet. Für Scheiben-Elektroden mit einem gegebenen Durchmesser wird der Strom im Fließgleichgewicht bei Diffusionslimitierung mit Hilfe der *Cottrell*-Gleichung beschrieben:

$$i = \frac{nFAc_j^0\sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}}$$

wobei i der Strom, n die Anzahl der übertragenen Elektronen, F die Faraday-Konstante, A die Oberfläche der Elektrode, c_j^0 die Konzentration des Analyten, D die Diffusionskonstante des Analyten und t die Zeit ist. Der Strom i ist also, bei gleichbleibenden restlichen Parametern, proportional zur Konzentration c_j^0 des Analyten.

Die Geometrie der Arbeitselektrode, vor allem die Größe der elektrochemisch aktiven Oberfläche (A), ist ein entscheidender Faktor für die Eigenschaften des Systems. Um Messungen an Einzelzellen durchführen zu können, benötigt man Elektroden mit einem kleinen Durchmesser, idealerweise im Bereich des Zell-Durchmessers. Elektroden mit einem

Durchmesser $< 25 \mu\text{m}$ nennt man Ultramikroelektroden (UME). Durch ihre geringe Größe verlaufen elektrochemische Messungen anders als bei Elektroden größeren Durchmessers, diese Besonderheiten müssen beachtet werden (Heinze, 1993; Stojek, 2005): Im Gegensatz zur planaren Diffusion bei größeren Elektroden herrscht an der UME eine hemisphärische Diffusion zu der Elektrodenoberfläche vor, was dazu führt, dass ein höherer Massentransfer an der Elektrode stattfindet. Dieser wiederum führt zu einem hohen faradayschen Strom und somit zu einem guten Signal-Rausch-Verhältnis. Aufgrund der geringen Größe und des geringen Stromes kommt es auch zu einem niedrigen ohmschen Spannungsabfall (dem Abfall der Spannung zwischen Arbeits- und Gegenelektrode, hervorgerufen durch den inneren Widerstand des Elektrolyten), was Messungen in schlecht leitenden (z. B. elektrolytarmen) Lösungsmitteln möglich macht. Die geringe Größe der an der Elektrode anliegenden Doppelschicht (vgl. 1.3.3) führt zu einer geringen Kapazität der Elektrode, was es ermöglicht, Konzentrationsänderung des Analyten im Nanosekundenbereich zu erfassen (Amatore & Maisonhaute, 2005; Heinze, 1993; Schulte & Schuhmann, 2007).

1.3.6 Wahl der Messmethode

Voltammetrische oder amperometrische Methoden werden je nach experimenteller Fragestellung gewählt. Sind die Redox-Eigenschaften des Analyten in der Messlösung unbekannt, sind voltammetrische Methoden von Vorteil. Durch das Scannen verschiedener Potentialbereiche können Erkenntnisse über den Analyten gewonnen werden. So kann der Analyt bei der CV innerhalb des gewählten Potentialbereichs oxidiert und/oder reduziert werden, was sich in charakteristischen Höhepunkten (*peaks*) des Stromes im Voltammogramm zeigt. Man unterteilt dabei in unterschiedliche Reaktionsformen: Reversible Reaktionen zeigen sowohl beim Vorwärts- als auch Rückwärtsscan einen charakteristischen, gleich hohen Peak (anodischer Peakstrom (i_{pa}) = kathodischer Peakstrom (i_{pc}); $i_{pa}/i_{pc} = 1$). Das bedeutet, dass der Analyt, der beim Vorwärtsscan oxidiert wird, beim Rückwärtsscan wieder in die Ursprungsform reduziert wird. Das Potential, bei welchem Oxidations- (E_{pa}) und Reduktionspeak (E_{pc}) liegen, hängt von der Anzahl der übertragenen Elektronen ab, pro e^- -Transfer beträgt die Differenz 56,5 mV. Neben den vollständig reversiblen Redox-Prozessen gibt es quasi-reversible und nicht-reversible Reaktionen. Dabei ist $i_{pa}/i_{pc} \neq 1$, das bedeutet, dass der Analyt nach Reduktion/Oxidation nicht mehr vollständig in seinen Ausgangszustand oxidiert/reduziert wird. Mögliche Gründe sind, dass der Analyt nach der ersten Reaktion isomerisiert, dissoziiert oder anderweitig reagiert (z. B. mit Luft-Sauerstoff in einer offenen

Messkammer) und somit für keine weiteren (oder andere) elektrochemischen Reaktionen im jeweiligen Potentialbereich zur Verfügung steht. Zusammengefasst kann man sagen, dass die CV Auskunft über Eigenschaften wie die Kinetik der ablaufenden Redoxreaktionen der Analyten in einer Messlösung geben kann. Allerdings ist zu beachten, dass je nach Sweep-Länge, die vom Potentialbereich und der Scan-Rate abhängt, nur eine geringe zeitliche Auflösung möglich ist. CV kann ebenso dazu eingesetzt werden, die Eigenschaften einer Mess-Elektrode zu testen. Dabei benutzt man einen Analyten, dessen elektrochemische Eigenschaften und somit die Form des Voltammogramms unter Idealbedingungen bekannt sind (z. B. Ferrocenmethanol). Abweichungen in der Form des Voltammogramms lassen Rückschlüsse auf die Qualität einer Elektrode zu (Hu et al., 2005).

Ist die zeitliche Auflösung einer Reaktion oder eines längeren Versuchs von besonderem Interesse, ist die Amperometrie besser geeignet als die Voltammetrie. Bei der Amperometrie kann die Reaktion eines bekannten Analyten in Echtzeit mit hoher zeitlicher Auflösung untersucht werden. Dazu ist es wichtig, das angelegte Potential dem Redoxpotential des zu untersuchenden Analyten anzupassen und alle elektrochemisch aktiven Substanzen der Messlösung zu kennen. Das gute Verhältnis von faradayschem zu kapazitivem Strom erlaubt sensitive Messungen des Analyten. Bei konstantem Potential ist die zeitliche Mess-Rate (*sampling rate*) um ein Vielfaches höher als bei der CV; Datenerfassung bis in den kHz-Bereich ist möglich.

1.3.7 Elektrochemische Scan-Mikroskopie

Verbindet man elektrochemische Techniken mit der Rastersonden-Mikroskopie (die Arbeitselektrode ist hierbei die Sonde), erhält man die Elektrochemische Scan-Mikroskopie (*scanning electrochemical microscopy*, SECM). Der Begriff wurde 1989 von Allen J. Bard geprägt, welcher einer der Pioniere auf diesem Gebiet ist (Bard et al., 1989). Das Grundprinzip der SECM ist, dass eine Elektrode die zu untersuchende Oberfläche einer Probe ab rastert (scannt) und dabei für verschiedene x-, y- und z-Positionen elektrische Parameter beschreibt. So liefert ein Scannen des Analyten ein 1-3-dimensionales Bild der elektrischen Aktivität im Messbereich. SECM kann sowohl im amperometrischen als auch potentiometrischen Modus benutzt werden, wobei der amperometrische häufiger verwendet wird (Bard & Mirkin, 2012; Schulte & Schuhmann, 2007; Wittstock et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde der amperometrische Modus in zwei Unterarten verwendet, dem „*Feedback*“ sowie dem „*Substrate Generation/Tip Collection*“-Modus.

1.3.7.1 *Feedback*-Modus

Im *Feedback*-Modus wird die Rückkopplung des elektrochemischen Signals bei Annäherung der Elektrode an eine Oberfläche gemessen. Dabei unterscheidet man zwischen dem negativen und dem positiven *Feedback*-Modus der Annäherung.

Negatives *Feedback*:

Beim negativen *Feedback* wird die Mess-Elektrode in eine Lösung getaucht, in der ein Analyt gleichmäßig verteilt ist. Dabei wird das angelegte Potential so gewählt, dass der Analyt entweder reduziert oder oxidiert wird. Der Strom an der Elektrodenoberfläche ist im Fließgleichgewicht, solange der Analyt frei zur Elektrodenoberfläche diffundieren kann. Wenn die Elektrode einer nichtleitenden Oberfläche angenähert wird, wird die Diffusion des Analyten behindert, was zu einer Verringerung des absoluten Stroms führt. Diese Verringerung des Stroms zeigt einen logarithmischen Verlauf und wird als negatives *Feedback* bezeichnet (Abb. 3, Zoski, 2007).

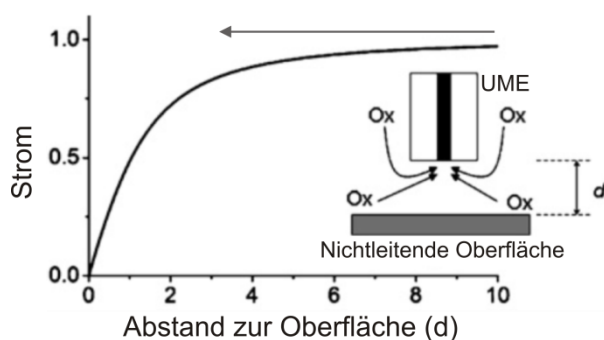


Abbildung 3 - Negativer *Feedback*-Modus der Annäherung.

Beim negativen *Feedback* wird die Elektrode (UME) einer nichtleitenden Oberfläche angenähert (der Pfeil zeigt die Richtung der Annäherung). Dadurch wird die Diffusion der elektroaktiven Spezies (hier *Ox*) zur Elektrode behindert, was zu einer Abnahme des Stroms führt. Modifiziert aus Zoski, 2007.

Positives *Feedback*:

Beim positiven *Feedback* nähert man die Elektrode einer leitenden anstatt einer nichtleitenden Oberfläche an. Obwohl es immer noch zu einer Behinderung der Diffusion kommt, führt das sogenannte *Redox-Cycling* zu einer Erhöhung des Stroms. Dabei wird der Analyt, wenn er an der Elektrode reduziert wird, an der leitenden Oberfläche oxidiert (und umgekehrt). Das führt dazu, dass der Analyt wieder an die Elektrodenoberfläche diffundieren und dort reduziert (respektive oxidiert) werden kann, was zu einer Erhöhung des Stroms

führt. Dieser Kreislauf wird als *Redox-Cycling* bezeichnet und die daraus resultierende Erhöhung des Stroms als positives *Feedback* (Abb. 4, Zoski, 2007).

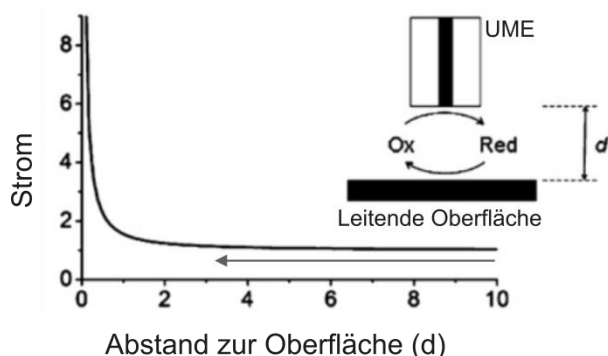


Abbildung 4 - Positiver *Feedback*-Modus der Annäherung.

Beim positiven *Feedback* wird die Elektrode (UME) einer leitenden Oberfläche angenähert (der Pfeil zeigt die Richtung der Annäherung). Dadurch kommt es zum *Redox-Cycling* (*Ox* & *Red*) des Analyten und somit zu einer Erhöhung des Stroms. Modifiziert aus Zoski, 2007.

Mit Hilfe der *Feedback*-Modi ist es also möglich, die Oberfläche eines Substrates zu charakterisieren. Im *Constant-Height*-Modus verbleibt die Elektrode in konstanter z-Position, nahe an der Oberfläche des Substrates. Scannt man nun über die Oberfläche des Substrates in x- bzw. y-Richtung, kann aufgrund der Stromantwort auf die Topografie des Substrates geschlossen werden. Das ist sowohl im negativen *Feedback*-Modus (z. B. Topografie von Wasserpest-Blättern (C. Lee et al., 1990)) als auch im positiven *Feedback*-Modus möglich (z. B. bei Korrosionsstudien von Metallen (Souto et al., 2010)).

1.3.7.2 Substrate Generation / Tip Collection (SGTC)-Modus

Im Gegensatz zum *Feedback*-Modus wird die Elektrode im SGTC-Modus in eine Lösung eingetaucht, in der der Analyt nicht von Anfang an vorhanden ist, bzw. eine Änderung der Konzentration des Analyten über die Zeit stattfindet. Dabei produziert das Substrat (z. B. eine Zelle) den Analyten (z. B. H_2O_2). Durch Positionierung der Elektrode in direkter Nähe des Substrates ist es möglich, die Produktion/Freisetzung des Analyten in Echtzeit zu messen, sowie, im Scanning-Modus, Konzentrationsprofile des Analyten zu bestimmen (Abb. 5, Wittstock et al., 2007).

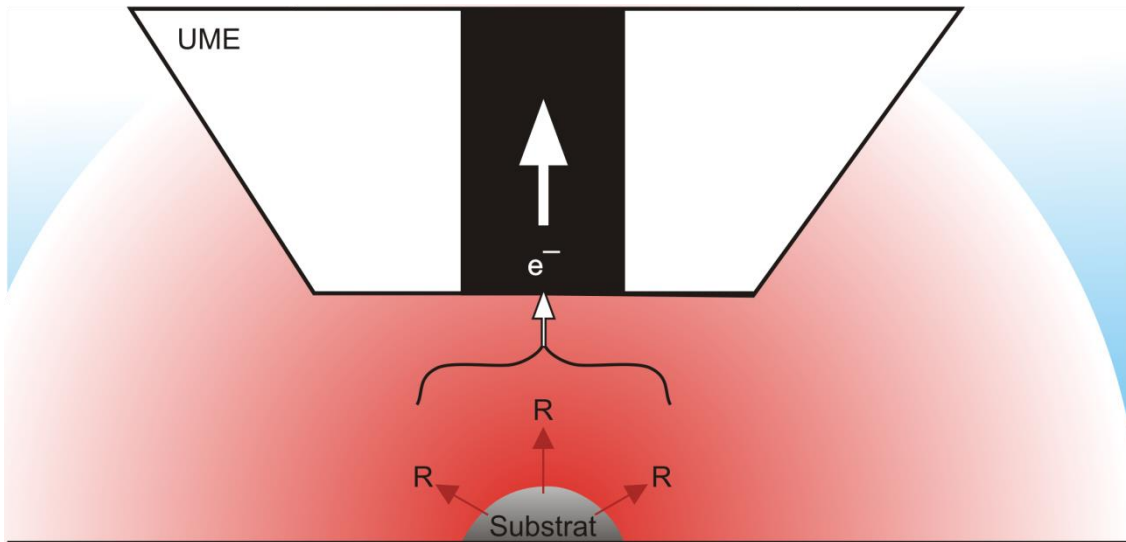


Abbildung 5 - *Substrate Generation / Tip Collection*-Modus.

In diesem Modus ist der Analyt (R) zu Beginn der Messung in der Messlösung nicht vorhanden, sondern wird vom Substrat gebildet. Eine Annäherung der Elektrode (UME) an das Substrat ermöglicht es, die Freisetzung des Analyten zu messen.

1.4 Elektrochemische Messungen in den Biowissenschaften

Im folgenden Teil sollen einige Beispiele für die Anwendung elektrochemischer Messungen in Biowissenschaften gezeigt werden. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden gelegt.

1.4.1 pH-Messungen

Potentiometrische Messungen können für pH-Messungen benutzt werden. Bei der Potentiometrie wird die Potenzialdifferenz zwischen einer Messelektrode und einer Referenzelektrode gemessen, während der Strom bei null gehalten wird. Da kein faradayscher Strom fließt, ist das Potenzial von den thermodynamischen Eigenschaften der in der Messlösung vorhandenen Stoffe, also allein von der Leerlaufspannung (= elektromotorische Kraft, EMK) abhängig. pH-Messungen funktionieren über eine Bestimmung der EMK der in der Messlösung befindlichen H^+ -Ionen. Die EMK ist direkt abhängig von der H^+ -Konzentration und somit vom pH. pH-Messungen sind Laboralltag, z. B. bei der Messung und zum Einstellen des pH-Wertes von Messpuffern. Ebenso sind potentiometrische Messungen im SECM-Modus machbar, so konnten 1993 von Horrocks und Kollegen pH-Profile um verschiedene Oberflächen, wie Platin oder Silberiodid gescannt und dargestellt werden.

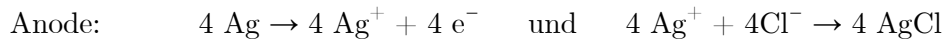
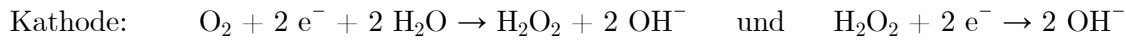
1.4.2 Topografie-Messungen

Der *Feedback*-Modus amperometrischer Messungen kann verwendet werden, um die 3D-Struktur einer Oberfläche, also auch einer Zelle darzustellen. Dazu kann z. B. das negative *Feedback* bei Annäherung der Elektrode an eine Zelle verwendet werden. Hierbei benötigt man einen Redox-Mediator, dessen Reduktion oder Oxidation gemessen wird. Der verwendete Mediator sollte keinen substantiellen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen haben und sein Redoxpotential sollte sich von dem anderer in der Messlösung vorkommender elektrochemisch aktiven Substanzen unterscheiden. Die Eigenschaften geeigneter Redox-Mediatoren für topografische Bestimmungen von Zellen wurden von Liebetrau und Kollegen zusammengefasst (Liebetrau et al., 2003). Zuerst wurde diese Art der Messungen von Lee und Kollegen durchgeführt, um die Topografie eines Wasserpest-Blattes zu bestimmen (Lee et al., 1990). Ein weiteres Beispiel sind die Messungen von Bondarenko und Kollegen. Sie konnten nachweisen, dass eine Fixierung von Zellen durch Formaldehyd ihre Form verändert und zu einer Vergrößerung in ihrer Höhe führt (Bondarenko et al., 2016).

1.4.3 Sauerstoffmessungen

Eine maßgebliche Anwendung elektrochemischer Messmethoden für lebende biologische Systeme ist die Messung von Sauerstoff (O_2). O_2 wird bei der Fotosynthese von pflanzlichen Zellen gebildet und freigesetzt und bei der Atmung verbraucht. Er ist ein grundlegender Bestandteil des Metabolismus von aeroben Zellen, der finale Elektronen-Akzeptor in der mitochondrialen Elektronentransportkette und somit entscheidend für die Produktion von ATP, dem primären Energieträger in Zellen. Aus diesem Grund kann eine Messung des Sauerstoffverbrauchs Informationen über den Zellmetabolismus und die Zell-Viabilität liefern. Sauerstoff ist elektrochemisch aktiv und kann über Reduktion an der Arbeitselektrode direkt detektiert werden. Dieses Prinzip kam schon in den späten 1950er Jahren zur Anwendung, als Leland Clark die erste „Sauerstoff-Elektrode“ entwickelte, um bei chirurgischen Eingriffen die Sauerstoffkonzentration im Blut von Patienten zu messen (Clark et al., 1958). Die seitdem sogenannte Clark-Elektrode wird im klinischen Alltag benutzt, z. B. bei der Blutgasanalyse oder bei Sauerstoffverbrauchs-Analysen von Zellsuspensionen. Der Aufbau ist relativ einfach: eine elektrochemische Zelle, bestehend aus einer Pt-Arbeitselektrode die über eine Elektrolytlösung mit einer Silberelektrode verbunden ist, steht über eine für Sauerstoff semipermeable Membran in Kontakt mit der Messlösung. Sauerstoff diffundiert durch die Membran an die Pt-Elektrode, welche auf ein Potential von -800 mV polarisiert ist und wird

dort reduziert. An der Ag-Elektrode wird Silber zu Silberionen oxidiert, die sich als AgCl auf der Elektrode ablagern:



Der dadurch entstehende Strom i ist proportional zur Sauerstoffkonzentration (siehe 1.3.5, *Cottrell*-Gleichung), also auch des Sauerstoffpartialdrucks.

O₂-Messungen an unterschiedlichen Zellsystemen sind beschrieben, so wurde z. B. die Fotosyntheserate von Pflanzenzellen in Abhängigkeit des Umgebungslichtes bestimmt (Tsionsky et al., 1997). Im pharmazeutischen Bereich dienen O₂-Messungen als Viabilitäts-Assays, so wurden z. B. elektrochemische O₂-Messungen verwendet, um die bakteriziden Eigenschaften verschiedener Antibiotika auf *E. coli* zu testen (Kaya et al., 2001). Ein ähnliches System wurde benutzt, um verschiedene Wirkstoffe auf ihre Eigenschaften zu testen, die Zellatmung von Krebszellen zu unterdrücken. O₂-Messungen können gleichermaßen in 3D-Zellkulturen durchgeführt werden, was Einblicke in Zell-Viabilität und die Einflüsse verschiedener Wirkstoffe auf solche komplexen Zellsysteme zulässt (Torisawa et al., 2007). Mit dieser Methode wurde auch die Wachstumskinetik von Sphäroiden analysiert (Torisawa et al., 2005).

1.4.4 Messungen reaktiver Sauerstoffspezies

Elektrochemische Messungen von H₂O₂ sind weit verbreitet, im Allgemeinen sind sie sehr sensitiv und spezifisch (Hill, 1987). Bei der Bestimmung von H₂O₂ wird hauptsächlich die Oxidation gemessen, die Elektronen gehen auf die Arbeitselektrode über und verursachen einen positiven Strom:



Ein Anwendungsbeispiel sind Glucose-Sensoren, z. B. zum Monitoring von Glucose-Spiegeln im Blut von Diabetespatienten (Yoo & Lee, 2010). Diese Messungen basieren auf der Oxidation von Glucose zu Gluconsäure durch das (im Sensor enthaltene) Enzym Glucose-Oxidase, wobei H₂O₂ entsteht. H₂O₂ wird an einer Elektrode oxidiert und der entstehende Strom amperometrisch gemessen. Der Strom ist linear proportional zur H₂O₂-Konzentration, welche wiederum linear proportional zur Glucose-Konzentration ist.

H₂O₂-Messungen an Zellpopulationen (X. Liu & Zweier, 2001) sowie an Einzelzellen (Amatore, Arbault, & Koh, 2010; Bozem et al., 2018; Y. Wang et al., 2012) sind interessante Ansätze, um Redox-regulierte Stoffwechselwege genauer zu untersuchen und besser verstehen

zu können. So wurde beispielsweise die Katalase-Aktivität eines Bakterien-Biofilms durch amperometrische Messung der Abnahme der H_2O_2 -Konzentration über einem *V. fischeri*-Rasen bestimmt (Abucayon et al., 2014). Durch amperometrische Messungen wurde die Freisetzung von H_2O_2 sowie reaktiver Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) an Makrophagen gemessen (Amatore, Arbault, & Koh, 2010). Intrazelluläre amperometrische Messungen von ROS sind auch möglich. Z. B. wurde von Wang und Kollegen ein muriner Makrophage mit einer Nanoelektrode punktiert und ROS sowie RNS gemessen (Wang et al., 2012). Auch die Detektion im *scanning*-Modus ist machbar, z. B. wurde durch amperometrische SECM die Entstehung von ROS bei einer Entzündungsantwort von humanen Blaszellen charakterisiert (Zhao et al., 2010). Eine Übersicht über elektrochemische Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung von H_2O_2 wurde 2019 von Gulaboski und Kollegen veröffentlicht.

1.5 Einzelzellmessungen vs. Zellpopulationmessungen

Dass nicht alle Zellen desselben Typs mit gleicher Morphologie und physiologischer Funktion (metabolisch) gleich sind, wurde schon früh entdeckt und als wichtiger Faktor für die Eigenschaften von Zellsystemen postuliert (Elsasser, 1984; Rubin, 1990). Viele Messmethoden basieren auf der Untersuchung von Zellpopulationen und ermöglichen die Charakterisierung einer „Durchschnittszelle“. Während diese Art der Messungen einen guten Überblick über die Eigenschaften der Zellgesamtheit liefert und so schnell und effizient z. B. der Einfluss verschiedener Substanzen auf Zellen oder einzelne Stoffwechsel- oder Signalwege erforscht werden kann, können einzelne Zellen desselben Typs in ihren Eigenschaften stark vom Durchschnitt abweichen. So können Reaktionen kleinerer Subpopulationen desselben Zelltyps unentdeckt bleiben, wenn viele Tausende Zellen gemeinsam gemessen werden. Bei Krebszellen können Subpopulationen für einen schweren Verlauf der Krankheit verantwortlich sein, u. a. weil sie anders auf Medikamente reagieren als der größere Teil der Krebszellen (Cohen et al., 2008; Dhawan, 2019; Sharma et al., 2010). Auch um direkte Zell-Zell-Interaktionen, sowie komplexe Signalkaskaden und -Netzwerke zu untersuchen, sind Einzelzellmessungen von Vorteil (Kumar et al., 2018; Sachs et al., 2005). Alschuler und Wu haben 2010 zusammengefasst, welche Informationen bei Messungen an Zellpopulationen im Vergleich zu Einzelzellmessungen verloren gehen können und wo die Vor- und Nachteile der jeweiligen Experimente zu sehen sind.

Messungen einzelner Zellen stellen uns vor besondere Herausforderungen: Um möglichst physiologische Bedingungen für die Zellen zu schaffen, sind verschiedene Faktoren von Bedeutung, unter anderem die Temperatur und das Milieu der Zelle (z. B. der verwendete Messpuffer, die Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration oder die Lichtbelastung). Auch die Handhabung der Zellen, z. B. die Isolationsmethode von primären Zellen oder eine Manipulation durch genetische Veränderung, die Kultur im Brutschrank über längere Zeit, das Waschen und Zentrifugieren, sowie Puffer- bzw. Medienwechsel wirkt sich auf die Zelle aus. Elektrochemische Messmethoden mit Ultramikroelektroden bieten einen vielversprechenden Ansatz, um nicht-invasiv Metaboliten wie H_2O_2 oder die Atmung über den O_2 -Verbrauch zu untersuchen. Dazu müssen die Zellen weder genetisch verändert noch mit nicht-physiologischen Substanzen wie Farbstoffen oder anderen Reportersubstanzen behandelt werden.

1.6 Zielsetzung

Eine konstante Weiter- und Neuentwicklung naturwissenschaftlicher Mess- und Analysemethoden ist unabdingbar, um die immer komplexer werdenden Fragestellungen der Wissenschaft beantworten zu können. Erkenntnisse über intra- und interzellulärer Prozesse, sowie das Zusammenspiel einzelner Zellen setzen voraus, dass man metabolische und Signal-Prozesse auf Einzelzellebene analysieren kann. Elektrochemische Messmethoden können durch ihre hohe Spezifität, Sensitivität, sowie räumliche und zeitliche Auflösung derartige Anforderungen erfüllen. Dabei müssen die Zellen weder genetisch verändert noch mit Sensor-Farbstoffen beladen werden, die Messungen sind also nicht-invasiv. Um physiologisch relevante elektrochemische Messungen zu ermöglichen, werden passende Arbeitselektroden benötigt. Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt daher die Herstellung und Charakterisierung von Platin-Ultramikroelektroden. Diese wurden für elektrochemische Messungen von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff an lebenden Einzelzellen verwendet. H_2O_2 ist sowohl in niedrigen Konzentrationen als intra- und interzelluläres Signalmolekül als auch in hohen Konzentrationen in der Immunantwort relevant. Daher ist eine präzise Messung der Dynamik der Produktion und Eliminierung von H_2O_2 von Interesse. Ein weiterer Teil dieser Arbeit zeigt eine Kombination extrazellulärer elektrochemischer Messungen mit intrazellulären Fluoreszenzmessungen von H_2O_2 , das auf diese Weise von der ein- und selben Zelle simultan bestimmt werden konnte. Zu jedem methodischen Teil konnte (exemplarisch) eine

Einleitung

physiologische Fragestellung beantwortet werden, die im entsprechenden Ergebnisteil aufgeführt ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Antikörper und Konstrukte

Tabelle 1 - Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer/ Anmerkungen
Angiotensin-II (AT-II)	Sigma Aldrich	A9525
Azeton	Sigma Aldrich	680501
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech	P06-1391500
Coenzym Q10	Sigma Aldrich	C9538
Cyclisches Hydroxylamin 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH)	Noxygen	NOX-02.2
D-Alanin	Sigma Aldrich	A7377
Diamid	Sigma Aldrich	D3648
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich	43815
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	D4540
Ethanol	Sigma Aldrich	702543
FACSClean Solution	BD Biosciences	340345
Ferrocenmethanol	Sigma Aldrich	335061
Fetales Kälberserum (FCS)	Fisher Scientific	10270
Fibronectin (aus Rinderplasma)	Sigma Aldrich	F4759
Glucose	Sigma Aldrich	G8270
H ₂ O ₂ (30 % (w/w) in H ₂ O)	Sigma Aldrich	H1009
Hydroxy-Coenzym Q10	Eigenproduktion	Siehe Slowik, 2019
Katalase (aus Rinderleber)	Sigma Aldrich	C9322
Kaliumchlorid (KCl)	VWR	26764. 298
L-Alanin	Sigma Aldrich	A7627
LSM 1077	PAA	J15-004
Macrophage Colony-Stimulating Factor (MCSF)	Sigma Aldrich	M9170
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma Aldrich	P8375
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma Aldrich	P4333
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich	P8139
4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL)	Sigma Aldrich	176141
VAS2870	Sigma Aldrich	SML0273

Material und Methoden

Tabelle 2 - Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorophor	Klon	Hersteller	Bestellnummer
anti-CD14	Pe-Cy7	MφP-9	BD Biosciences	562698
anti-CD45	BV510	HI30	BD Biosciences	563204

Tabelle 3 - Liste der zur Transfektion verwendeten Konstrukte

Konstrukt	Bereitgestellt durch
pC1-HyPer-3	Vsevolod Belousov (Addgene plasmid # 42131)
pAAV-HyPer-DAAO-NES	Thomas Michel (Addgene plasmid # 119164)
pAAV-SypHer2-DAAO-NES	Thomas Michel (Addgene plasmid # 119184)

2.1.2 Lösungen

Tabelle 4 – Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer

Medium	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's PBS (D-PBS)	Fisher Scientific	14190-094
RPMI-1640-Medium	Fisher Scientific	21875-034
MEM-Medium	Fisher Scientific	31095029
HBSS	Sigma Aldrich	H6648
Gibco™ D-PBS, ohne Calcium, ohne Magnesium	Fisher Scientific	14190094

Dulbecco's PBS:	NaCl	136,9 mM
	KCl	2,68 mM
	CaCl ₂	0,905 mM
	MgCl ₂	0,49 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	pH	7,4

D-PBS, ohne Calcium, ohne Magnesium:	NaCl	136,9 mM
	KCl	2,68 mM
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	pH	7,4

Erythrozytenlysepuffer:	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	EDTA	1,3 mM
	pH	7,3

Material und Methoden

Ca ²⁺ -Ringer:	NaCl	155 mM
	KCl	4.5 mM
	Glucose	10 mM
	HEPES	5 mM
	MgCl ₂	2.5 mM
	CaCl ₂	0.5 mM
	pH	7,4

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5 – Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
24-Well Zellkulturplatte <i>Ultra-Low Attachment</i>	Corning	3473
96-Well Imaging Platte (Black/Clear)	VWR	353219
Borosilikat-Kapillare (OD 2 mm, ID 1,16 mm, Länge 100 mm)	Sutter	B200-116-10
Einmalkanüle BD Microlance (30 G x ½")	Fisher Scientific	304000
ESR-Kapillare (<i>ringcaps</i>)	Hirschmann	9600150
FluoroDish Cell Culture Dish - 35mm	WPI	FD35-100
Kalknatronglas-Kapillare (OD 1 mm, ID 0,8 mm)	Goodfellow	437-807-87
Leitfähiger Epoxid-Klebstoff	CircuitWorks	CW2400
Leucosep-Röhrchen	Greiner Bio-One	227289
Miniatur-Steckverbinder (∅ 1 mm)	Stäubli	22.1007
Platindraht (∅ 10 µm)	Goodfellow	293-392-86
Silberdraht (∅ 0,1 mm)	Goodfellow	481-480-50
Silberdraht (∅ 1 mm)	Goodfellow	831-560-81
Teflonring	Eigenproduktion	
Zellsieb (Porengröße 40 µm)	VWR	734-2760

Verbrauchsmaterialien, wie u.a. serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden, soweit nicht anders angegeben, von VWR, BD, PEQLAB oder Sarstedt bezogen.

2.1.4 Kits

Tabelle 6 – Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Amplex UltraRed	Thermo Fisher	A36006
Dynabeads Untouched Human Monocyte System	Thermo Fisher	11350D
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega	E2312
Monocyte Isolation Kit (BM), mouse	Miltenyi Biotec	130-100-629

2.1.5 Laborgeräte

Tabelle 7 – Liste der verwendeten Geräte

Laborgeräte	Hersteller
Axio Observer A1	Zeiss
Cell Observer	Zeiss
CO ₂ Inkubator Heraeus	Thermo Scientific
ElProScan (ELP3)	HEKA Elektronik
ESP 300	Bruker
FACSVerse	BD Biosciences
Horizontalpuller P-1000	Sutter
Infinite M200 Pro	Tecan
Magnetrührer IKA RCT basic	Sigma Aldrich
MHK-1	HEKA
pH Elektrode accumet Basic	Fisher Scientific
Pipetboy acy	Integra Biosciences
Sterilwerkbank	HERAsafe
Ultraschallreiniger SUR 42	Sanitas
Universal-Trockenschrank	Memmert
Vertikalpuller Narishige	Bachofer
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

Tabelle 8 – Liste der wesentlichen Komponenten des Cell Observers

(Ex = Exzitation, Em = Emission, BP = Bandpass, TBP = Triple-Bandpass, FT = Farbteiler, TFT = Triple-Farbteiler)

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Lichtquelle: Colibri	Zeiss	LEDs: 420 nm, 470 nm, 505 nm, N-Weiß
Filtersatz 54 HE	Zeiss	Ex BP 427/14 Ex BP 504/17 Ex BP 589/21 Strahlteiler TFT 440 + 520 + 607 Em TBP 464 + 542 + 639
Evolve 512 CCD-Kamera	Photometrics	

Tabelle 9 – Liste der wesentlichen Komponenten des Axio Observers
(BP = Bandpass, Em = Emission, Ex = Exzitation, FT = Farbteiler)

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Lichtquelle: HXP 120V	Leistungselektronik JENA	
Filtersatz 38 HE	Zeiss	Ex BP 470/40 Strahlteiler FT 495 Em BP 525/50
Filtersatz 46 HE	Zeiss	Ex BP 500/25 Strahlteiler FT 515 Em BP 535/30
Filtersatz 21 HE	Zeiss	Ex BP 340/30 Ex BP 387/15 Strahlteiler FT 409 Em BP 510/90
Prime 95B sCMOS-Kamera	Photometrics	

Tabelle 10 – Liste der wesentlichen Komponenten des ElProScan (ELP3)
(BP = Bandpass, Em = Emission, Ex = Exzitation, N.A. = Numerische Apertur, FT = Farbteiler, TBP = Triple-Bandpass, TFT = Triple-Farbteiler)

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Lichtquelle: Lambda DG4-Plus	Sutter	
CFP/YFP/HcRed Filtersatz	Semrock	Ex BP 427/10 Ex BP 504/12 Ex BP 589/15 Strahlteiler TFT 444+521+608 Em TBP 465+542+639
395/11 BrightLine HC	Semrock	Ex BP 395/11
Filtersatz 38 HE	Zeiss	Ex BP 470/40 Strahlteiler FT 495 Em BP 525/50
ProgRes MFCool CCD-Kamera	Jenoptik	
TC-344C Temperaturkontroller	Warner Instruments	
LUCPLFLN 40x (0,6 N.A.) PLCN 4x (0,1 N.A.)	Olympus	

2.1.6 Zellen und Mauslinien

2.1.6.1 Primäre humane Monozyten

Primäre humane Monozyten (hMZ) können nach Stimulierung große Mengen an extrazellulärem H_2O_2 produzieren. Daher eignen sie sich besonders gut um die Bildung und Eliminierung von H_2O_2 auf Einzelzellebene zu untersuchen. Sie wurden aus dem Blut von gesunden, humanen Blutspendern gewonnen (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Nach Isolation und Aufreinigung wurden hMZ in RPMI-1640-Medium + 10 % FCS und 0,1 % Penicillin-

Streptomycin (P/S) in einem Inkubator bei 37° C, 5 % atmosphärischem CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für bis zu 4 Wochen gehalten. Diese Zellkulturbedingungen werden fortan als Standard-Zellkulturbedingungen bezeichnet.

2.1.6.2 Primäre murine Monozyten

Auch Monozyten aus der Maus (murine Monozyten, mMZ) produzieren nach Stimulation viel H₂O₂. Der Vorteil gegenüber hMZ liegt darin, dass mMZ aus transgenen Mäusen isoliert werden können und durch vorhergehende genetische Veränderung der Maus optimal an die jeweilige Fragestellung des Forschungsprojektes anpassbar sind. Sie wurden aus der Milz und aus dem Knochenmark der Tiere isoliert (siehe 2.2.3). Die dazu verwendeten Tiere sind in Tabelle 11 aufgelistet. Nach der Präparation wurden mMZ in RPMI-1640-Medium + 10 % FCS, 0,1 % P/S und 20 ng/ml MCSF unter Standard-Zellkulturbedingungen für bis zu 3 Wochen kultiviert.

Tabelle 11 – Liste der verwendeten Mäuse

Stamm	Genotyp	Bereitgestellt durch
C57BL/6J	Wildtyp (wt)	The Jackson Laboratory
C57BL/6N	Wildtyp (wt)	Charles River Laboratories
C57BL/6N	mito-roGFP2-orp1	Tobias Dick, Heidelberg (Fujikawa et al., 2016)
C57BL/6N	cyto-roGFP2-orp1	Tobias Dick, Heidelberg

2.1.6.3 HEK-293-Zellen

Die Zelllinie HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) stammt aus menschlichen, embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney*) die über eine Transfektion mit Adenovirus-5-DNA immortalisiert wurde. Sie bietet sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung und guten Transfizierbarkeit als Modellsystem an. Adhärente HEK-293-Zellen wurden in MEM-Medium + 10 % FCS und 0,1 % P/S unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert.

2.1.7 Software

Tabelle 12 - Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
Axio Vision	Zeiss
CorelDraw X4	Corel Corporation
Excel	Microsoft
FACSSuite	BD Biosciences
FIJI	Schindelin et al., 2012

FlowJo	BD Biosciences
Mendeley	Elsevier
OriginPro 2019	OriginLab
Patchmaster mit <i>Imaging</i> Erweiterung	HEKA
PowerPoint	Microsoft
Python 3.8	Python Software Foundation
Word	Microsoft
ZEN	Zeiss

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Zur *ex-vivo*-Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheric blood mononuclear cells*, PBMC) von gesunden humanen Blutspendern (anonymisiert; unbekanntes Alter und Geschlecht) wurden Leukozytenreduktionskammern (LRS-Kammern aus *TrimaAccelSystem* bzw. *Amicus System*) verwendet, welche bei der Thrombozyten-Apherese als Abfallprodukt anfallen. Diese LRS-Kammern erhielten wir von der lokalen Blutbank (Universitätskliniken des Saarlandes, Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Prof. Dr. Eichler, autorisiert durch das lokale Ethik-Komitee vom 16.04.2015; Nr. 84/15; Prof. Dr. Rettig-Stürmer).

Die Aufreinigung der Leukozyten erfolgte über eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurden pro Spender ein *Leucosep*-Röhrchen mit 17 ml LSM 1077 Lymphozyt Separationsmedium beladen und dieses für 30 s bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Die LRS Kammern wurden mit ungefähr 30 ml HBSS durchgespült, wobei das (nun die Zellen enthaltende) HBSS in den vorbereiteten *Leucosep*-Röhrchen aufgefangen wurde. Die Zentrifugation zur Trennung der Zellen erfolgte bei 450 x g und RT für 30 min ohne Bremse und bei geringer Beschleunigung (Acc.: 1). Es bilden sich mehrere Schichten: oben eine gelbliche Schicht aus Blutplasma, darunter ein weißlicher Ring aus angereicherten PBMC und unten das farblose Separationsmedium. Das Blutplasma wurde abgesaugt und verworfen, bevor die PBMC-Schicht in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (250 x g, RT, 15 min) und in 2 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen, um die Erythrozyten zu zerstören. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde das Röhrchen mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt, um die Lyse zu stoppen. Nach anschließender Zentrifugation (200 x g, RT, 10 min) verbleiben die

Thrombozyten im Überstand und können mit diesem abgesaugt werden. Die PBMC wurden in 20 ml PBS/0,5 % BSA aufgenommen, zur Vereinzelung der Zellen durch ein Zellsieb mit der Porengröße 40 µm filtriert und die Zellzahl bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PBMC bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Isolation humaner Monozyten

Zur Isolation humaner Monozyten (hMZ) wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die Adhärenz-Isolation und die Negativ-Isolation.

2.2.2.1 Adhärenz-Isolation humaner Monozyten

1,5 – 2,5 x 10⁸ PBMC wurden in Zellkulturflaschen (T75) überführt und mit 30 ml RPMI-Medium (10 % FCS) aufgefüllt. Nach 2 h Inkubation unter Standard-Zellkulturbedingungen war ein Teil der Zellen, vor allem hMZ, an der positiv geladenen Oberfläche der Zellkulturflasche adhäriert. Die restlichen Zellen wurden mit dem Medium abgesaugt und frisches RPMI-Medium (10 % FCS, 1% P/S) wurde auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und mit PBS/0,5 % BSA überschichtet. Die hMZ wurden mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche der Flasche gelöst und bei 200 x g, RT für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % P/S) aufgenommen. Anschließend wurden die hMZ mit einer Dichte von 1-4 x 10⁶ Zellen pro ml in 24-Well-Platten (*Ultra-Low Attachment*) ausgesät. An diesen Platten können die hMZ nicht adhären und so konnten sie in Suspension unter Standard-Zellkulturbedingungen für bis zu 4 Wochen kultiviert werden.

2.2.2.2 Negativ-Isolation humaner Monozyten

Die Negativ-Isolation von hMZ wurde mit dem *Dynabeads® Untouched™ Human Monocyte System* nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Um eine Kreuzreaktion oder eine Aktivierung der hMZ zu verhindern, wurden PBMC mit einem Blockreagenz gegen *Fc*-Rezeptoren gemischt. Diese Rezeptoren sind an der Bindung verschiedener Immunglobuline und somit der Aktivierung von hMZ beteiligt. Danach wurde eine Mischung primärer Antikörper hinzugegeben, die alle PBMC bis auf hMZ (z. B. NK- oder T-Zellen) erkennen und binden. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher an magnetische Kügelchen gebunden ist und die *Fc*-Region der primären Antikörper bindet. Mit einem Magneten wurden so alle Zellen, die keine MZ waren, aus der Zellsuspension entfernt. Die hMZ wurden in einer Dichte von 1-4 x 10⁶ Zellen pro ml in 24-Well-Platten (*Ultra-Low Attachment*) ausgesät und wie die Adhärenz-isolierten MZ kultiviert.

2.2.3 Isolation muriner Monozyten

Murine Monozyten (mMZ) wurden auf zwei verschiedene Arten isoliert: Aus der Milz der Maus über Adhärenz-Isolation oder aus dem Knochenmark über eine Negativ-Isolation mit einem kommerziellen Kit.

2.2.3.1 Adhärenz-Isolation muriner Monozyten

Die Maus (siehe Tab. 11) wurde über eine zervikale Dislokation und Dekapitation getötet und größtenteils ausgeblutet. Die Milz wurde entnommen und sofort in eine Petrischale mit 15 ml eiskaltem PBS/0,5 % BSA überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis mit gekühlten Puffern durchgeführt. Die Milz wurde zerkleinert und die Gewebestückchen vorsichtig durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) in die Petrischale mit PBS gedrückt. Dabei verändern die Milzstücke ihre Farbe von tiefrot nach weiß. Sobald die Milzstücke weißlich-durchsichtig waren, wurde das Zellsieb mit 2 ml PBS durchgespült, das gesamte PBS aus der Petrischale in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (200 x g, 4 °C, 10 min). Danach wurden die Zellen in 30 ml RPMI-Medium (10 % FCS, 20 ng/ml MCSF) aufgenommen, in eine Zellkulturflasche überführt und 2 h bei Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das RPMI-Medium durch frisches ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS/0,5 % BSA gewaschen und mit PBS/0,5 % BSA überschichtet. Die mMZ wurden mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche gelöst und bei 200 x g, RT für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium (10 % FCS, 20 ng/ml MCSF, 1 % P/S) aufgenommen. Anschließend wurden die mMZ in einer Dichte von $1-4 \times 10^6$ Zellen pro ml in 24-Well-Platten (*Ultra-Low Attachment*) ausgesät und unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert.

2.2.3.2 Negativ-Isolation muriner Monozyten

Die Negativ-Isolation von mMZ wurde mit dem *Monocyte Isolation Kit (BM)* der Firma *Miltenyi* nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Zuerst mussten Knochenmarkszellen der Maus isoliert werden. Dazu wurde die Maus (siehe Tab. 11) über eine zervikale Dislokation und Dekapitation getötet, größtenteils ausgeblutet und beide Oberschenkel entnommen. Alle folgenden Schritte wurden mit gekühlten Puffern auf Eis durchgeführt. Die Oberschenkelknochen wurden von Fell und Muskel befreit und mit Ethanol-getränkten Tüchern abgewischt, um letzte Muskelreste zu entfernen und die Knochen zu desinfizieren. Die Gelenkköpfe wurden mit einer Schere beidseitig vor der Epiphyse abgeschnitten. Anschließend wurde eine 5-ml-Spritze mit einer 30-Gauge Kanüle mit PBS gefüllt und an

einer Seite in den Knochen eingeführt. Das Knochenmark wurde so in eine Petrischale mit 15 ml eiskaltem PBS gespült. Es wurde so oft gespült, bis alle Knochenmarkszellen aus dem Femur entfernt waren, zu erkennen an einer Farbveränderung des Knochens von rötlich zu weißlich. Die Pufferlösung mit den Knochenmarkszellen wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (200 x g, 4 °C, 10 min). Die Aufreinigung der mMZ erfolgte nach dem Herstellerprotokoll, analog zu der Negativ-Isolation von hMZ (siehe 2.2.2.2).

2.2.4 Zellkultur und Transfektion

2.2.4.1 Monozyten

Sowohl humane als auch murine Monozyten wurden in Suspension unter Standard-Zellkulturbedingungen gehalten. Dazu wurden sie in speziellen Zellkulturplatten mit einer Beschichtung aus einem kovalent-gebundenem hydrophilen, nicht-ionischen, neutral-geladenem Hydrogel (24-Well-Platten, *Ultra-Low Attachment, Corning*) kultiviert. 2-3-mal pro Woche wurde das Medium erneuert, indem die Zellen vorsichtig resuspendiert und dann für 8 min bei 200 x g, RT zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in einer Dichte von 1-4 x 10⁶ Zellen pro ml ausgesät.

2.2.4.2 HEK-293-Zellen

Adhärente HEK-293-Zellen wurden in 75 cm² Flaschen (T75) unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert und zwei Mal pro Woche passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA (0.05%) vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und ein Teil der Zellen wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen

Transfektion bezeichnet das Einbringen zellfremder DNA oder RNA in die zu transfizierende Zelle. In dieser Arbeit wurden HEK-293-Zellen mittels des *FuGENE® HD Transfection Reagent* transfiziert. Dabei formen DNA-Konstrukte mit den *FuGENE*-Polymeren einen Komplex, der die Zellmembran passieren kann und eine Expression in der Zelle möglich macht. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Pro Transfektion wurde 1 µg des Konstruktes benutzt. Die verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 3 (2.1.1) aufgelistet.

2.2.5 Elektrochemische Messungen mit dem ElProScan

Die Messeinrichtung *ElProScan* (*Electrochemical Probe Scanner*, HEKA Elektronik, *ELP3*) wurde für die in dieser Arbeit gezeigten elektrochemischen Messungen verwendet. Sie ist aus

drei Hauptbestandteilen zusammengesetzt: dem Regler *ESC 3*, dem Verstärker *EPC 10 USB* und dem Positionierungssystem, inklusive Mikroskop und digitaler Kamera. Datenaufzeichnung und -Analyse wurden mit der *Patchmaster*-Software mit *Imaging*-Erweiterung durchgeführt. Die wichtigsten Funktionen des Systems sind Messungen des elektrischen Stromes im fA- bis μ A-Bereich bei einem sehr geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Dabei sind genaue Positionierungen der Probe, der Messelektrode sowie des Objektivs in 0,1 μ m-Schritten in x-, y- und z-Richtung möglich (HEKA Elektronik). Das gesamte System steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC) und ist über einen faradayschen Käfig vor unerwünschten elektrischen Interferenzen abgeschirmt (Abb. 6).

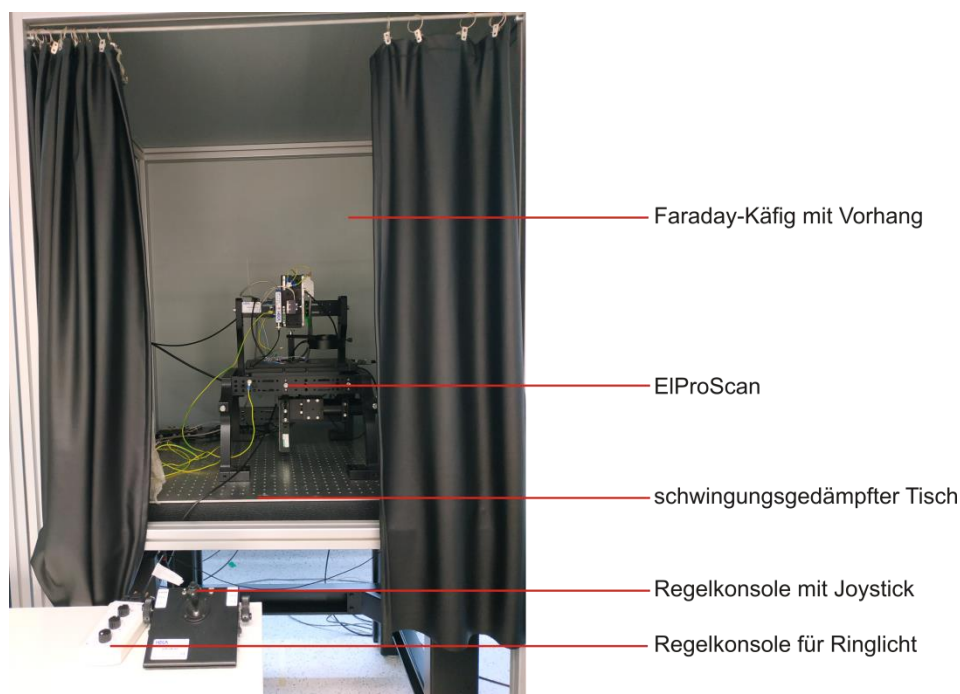


Abbildung 6 - Aufbau des EIProScan-Systems für elektrochemische Messungen. Das *ELP3* ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut und steht zur Abschirmung vor elektrischen Interferenzen innerhalb eines Faraday-Käfigs. Der schwarze Vorhang dient der Abdunkelung des Systems, er besteht außerdem aus einer Schicht aus metallischem Stoff zur elektrischen Abschirmung. Während der Messung ist der Vorhang geschlossen. Die Regelkonsole mit Joystick zur manuellen Positionierung von Probe, Arbeitselektrode und Objektiv, sowie die Regelkonsole zur Steuerung des Ring-Durchlichts befinden sich außerhalb des Faraday-Käfigs.

Zwei verschiedene Elektroden wurden für die Experimente benutzt: Die Arbeitselektrode war eine Platin-Ultramikroelektrode (UME) mit einem Durchmesser des Platinkerns von 10 μ m. Die Herstellung ist in Kapitel 3.1 beschrieben. Die Spitze der UME wurde vor und nach jeder

Messung in einem Ultraschallbad zuerst in EtOH (70 %), anschließend in destilliertem Wasser für je 10 s gesäubert. Bei zunehmendem Sensitivitätsverlust wurde sie mit einer speziellen Schleifmaschine (*MHK1*, HEKA Elektronik) poliert. Diese benutzt eine steuerbare, rotierende Schleifscheibe, welche mit Schleifpapier in verschiedenen Körnungen bestückt werden kann. Unter einem Mikroskop wurde die Oberfläche der UME poliert, um Unebenheiten und Verschmutzungen zu entfernen. Als Pseudo-Referenzelektrode (RE) wurde ein reiner Silberdraht (\varnothing 1 mm) verwendet, welcher durch Elektrolyse in einer 0,1 molaren HCl-Lösung bei 3 V für 30 s mit AgCl beschichtet wurde. Die Ag/AgCl RE wurde regelmäßig durch Abschleifen der Chlorid-Schicht mit Schleifpapier und erneuter Chlorierung aufgefrischt (East & Del Valle, 2000). Der Verstärker EPC10 wurde einmal im Monat über ein systeminternes Kalibrierungsprogramm mit einer dazugehörigen externen Kalibrierungseinheit kalibriert. Alle Messungen wurden (sofern nicht anders angegeben) bei Raumtemperatur (23 ± 1 °C) und -luft durchgeführt. Einstellungen des *ELP3* für alle elektrochemischen Messungen (sofern nicht anders angegeben): Filter 1: 15 Hz Bessel; Filter 2: 100 Hz Bessel; *sample frequency* 1 kHz.

2.2.5.1 Elektrochemische Messungen (*in vitro*)

Für Messungen mit dem *ELP3* in zellfreiem Puffer wurde ein Glasboden-Messschälchen (*FluoroDish*) mit 2 ml Messpuffer befüllt (D-PBS, außer ein anderer Puffer wird angegeben). Ein sauberer Teflon-Ring wurde in das Schälchen gelegt. Dieser Ring sorgt unter anderem dafür, dass die Flüssigkeitssäule im Schälchen höher steht, was sowohl die Positionierung der UME, als auch das Zugeben von Substanzen zur Messlösung erleichtert. Das Schälchen wurde in eine Vertiefung des Probenstischs der Messapparatur gesetzt und die Referenzelektrode (RE), sowie ein Temperatursensor in den Messpuffer getaucht. Um Verschiebungen der RE oder des Sensors während der Messung zu verhindern, wurden sie zwischen dem Rand des Schälchens und dem Teflon-Ring positioniert (Abb. 7). Anschließend wurde die UME in einem Elektrodenhalter senkrecht über dem Messschälchen fixiert und an den Stromkreis angeschlossen. Über die Regelkonsole wurde die UME manuell in den Messpuffer eingetaucht und anschließend auf das gewünschte Potential polarisiert.

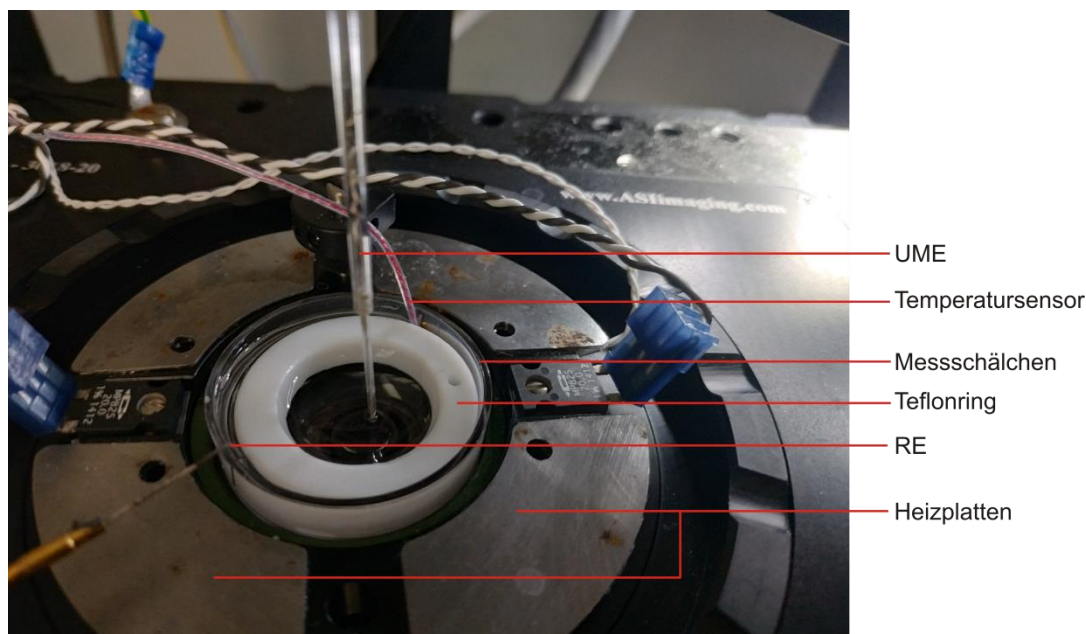


Abbildung 7 –Messaufbau für elektrochemische Messungen am ELP3.

Das Messschälchen (befüllt mit Messpuffer), bestückt mit einem Teflon-Ring zur Fixierung der Referenzelektrode (RE) und des Temperatursensors. Die Ultramikroelektrode (UME) ist bereits in den Messpuffer eingetaucht. Über die Heizplatten lässt sich die Temperatur des Messpuffers verändern.

2.2.5.2 Elektrochemische Messungen an Zellen

Elektrochemische Messungen an lebenden Kultur- oder primären Zellen wurden ebenfalls in den Glasboden-Messschälchen durchgeführt. Einen Tag vor der Messung wurden die zu untersuchenden Zellen (inkl. Zellkulturmedium) in der gewünschten Zellzahl in das Schälchen überführt. Bei Messungen mit Monozyten wurde der Glasboden des Messschälchens zuerst mit 50 μ l Fibronectin (0,1 mg/ml PBS) beschichtet, für 30 min bei RT inkubiert und dann die überstehende Lösung abgesaugt. Obwohl MZ am Glasboden haften, sorgt die Fibronectin-Beschichtung für ein festeres Anheften der MZ, was z. B. bei Mischen des Puffers während der Messung von Nutzen ist. In das so vorbereitete Schälchen wurden 1×10^4 - 1×10^5 MZ in RPMI-Medium + 10 % FCS überführt und bis zur Messung unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Für Messungen mit adhärenenten HEK-293-Zellen wurden ca. 10^5 Zellen in MEM-Medium + 10 % FCS in ein Messschälchen überführt und bis zur Messung bei Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Vor dem Experiment wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 2 ml D-PBS + 5 mM Glucose überschichtet. Anschließend wurde das Schälchen analog zu den *in-vitro*-Messungen mit Teflon-Ring, RE und Temperatursonde im System positioniert. Die

UME wurde in den Messpuffer eingetaucht, auf das gewünschte Potential polarisiert und unter ständiger optischer Kontrolle der z-Position schrittweise auf 10-12 μm über der Zellebene (auf dem Glasboden des Schälchens) positioniert. Die optische Kontrolle erfolgte folgendermaßen: Zuerst wurde manuell auf die Zellebene auf dem Glasboden des Schälchens fokussiert. Diese Ebene diente als Ausgangsebene, Höhe 0 μm . Durch Verschieben des Probestisches in x- und y-Richtung wurde ein Ausschnitt mit geeigneten Zellen in das Blickfeld gefahren. Anschließend wurde mit dem 40x-Objektiv auf die Oberfläche der UME-Spitze fokussiert, was bei 2 ml Puffer und knapp eingetauchter UME eine Höhe von ca. 2100 μm bedeutete. Um die Elektrode im Bildausschnitt zu zentrieren, wurde ein Objektiv mit geringerer Vergrößerung (4x) benutzt, mit dem die Elektrode auf dem größeren Bildausschnitt leicht zu finden war. Über Justierräder am *ELP3* wurde die UME manuell in x- bzw. y-Richtung in den Bereich des Bildausschnittes gebracht, der bei 40-facher Vergrößerung ungefähr in der Mitte lag. Für die Versuche wurde auf das Objektiv mit 40x-Vergrößerung gewechselt. Die endgültige Positionierung der UME direkt über einer ausgewählten Zelle erforderte ein vorsichtiges Absenken der Elektrode in kleinen Schritten, um ein Aufsetzen der fragilen Elektrodenspitze auf dem Glasboden (oder den Zellen) zu vermeiden. Dazu wurde zuerst die auf die UME-Spitze ausgerichtete Fokusebene um 10 bis 100 μm nach unten verschoben und dann die z-Position der UME, bis sie erneut im Fokus war. Dieses schrittweise Absenken der Elektrode wurde ab 300 μm über dem Boden in kleineren 10 bis 20 μm Intervallen fortgesetzt. Die finale Positionierung der UME erfolgte über eine scharfe Fokussierung der UME-Spitze im gewünschten Abstand zur Zellebene (10-12 μm).

2.2.6 Messung von intrazellulärem H_2O_2 mit Sensoren für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden drei unterschiedliche Systeme für *Live Cell Imaging*-Messungen von intrazellulärem H_2O_2 benutzt: (1) der *Cell Observer* (Zeiss), (2) der *Axio Observer* (Zeiss), (3) der *ELP3* (HEKA Elektronik). Beim *Cell Observer* und beim *Axio Observer* handelt es sich um Weitfeld-Fluoreszenzmikroskope, welche es erlauben, Zellen auf Einzelzellebene hochauflösend zu beobachten. Der *ELP3* ist ein Gerät zur elektrochemischen Scan-Mikroskopie (*scanning electrochemical microscopy*, SECM, siehe 2.2.5), kombiniert mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Veränderung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration von verschiedenen Zellen untersucht. Dazu wurden mMZ transgener Mäuse verwendet, welche einen intrazellulären H_2O_2 -Sensor stabil exprimieren, sowie HEK-293-Zellen, welche über eine transiente Transfektion einen H_2O_2 -Sensor bildeten. Transgene Mäuse exprimierten den Sensor roGFP2-orp1, entweder cytosolisch oder mitochondrial. HEK-293-Zellen wurden mit cytosolisch exprimierendem *HyPer-3* transfiziert. Sowohl roGFP2-orp1 als auch HyPer-3 sind ratiometrische Farbstoffe, welche selektiv durch H_2O_2 oxidiert werden, was zu einer Spektralverschiebung ihrer Absorption führt, während das Emissionsspektrum gleich bleibt. Dadurch ist eine Bestimmung von H_2O_2 innerhalb der Zelle möglich, welche unabhängig von der Effizienz der Sensor-Expression ist. HyPer-3 besitzt Exzitationsmaxima bei 420 nm und 500 nm, wobei bei Oxidation der 420 nm-Peak sinkt und der 500 nm-Peak steigt. Die Emission besitzt ein Maximum bei 516 nm. Die Exzitationsmaxima von roGFP2-orp1 liegen bei 405 nm und 488 nm, wobei bei Oxidation der 488 nm-Peak sinkt und der 405 nm-Peak steigt. Das Emissions-Maximum liegt bei 515 nm (Abb. 8).

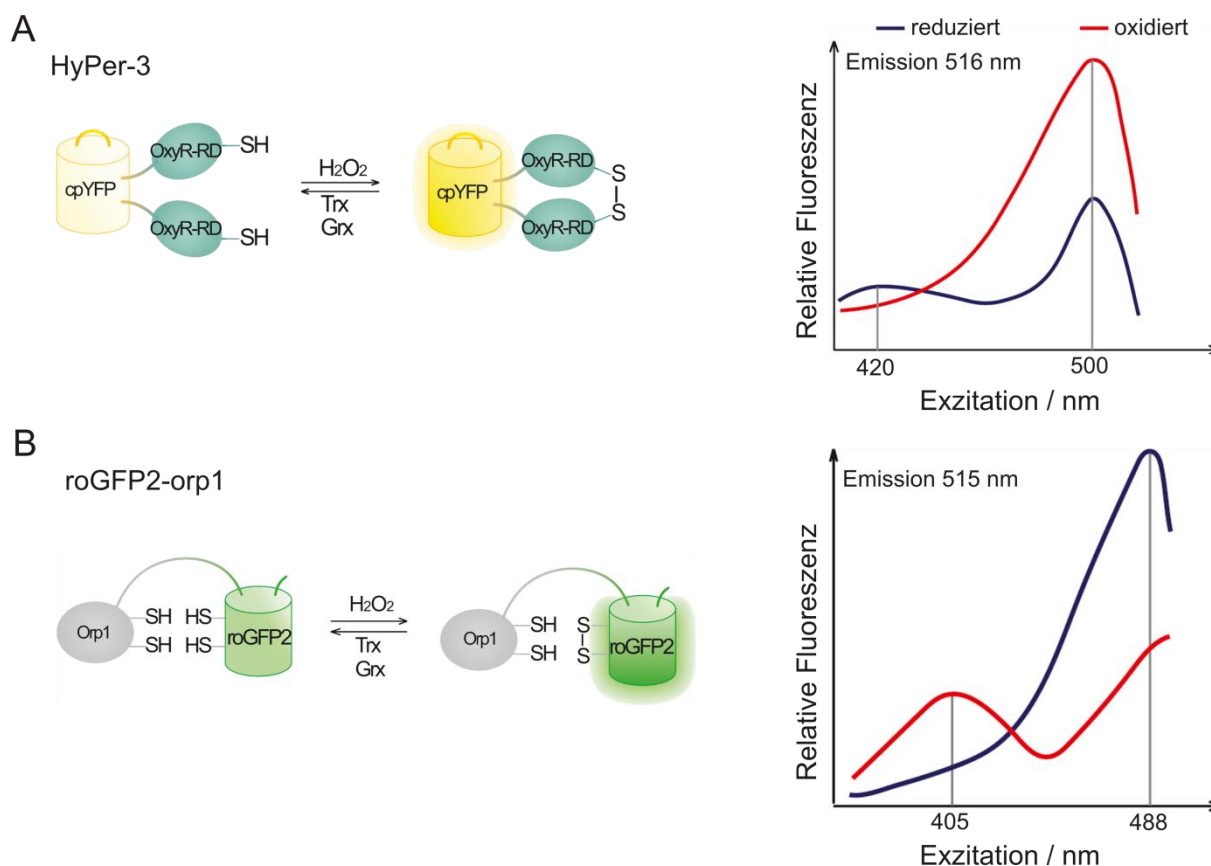


Abbildung 8 –Intrazelluläre H_2O_2 -Sensoren.

A) Durch Oxidation zweier Thiolgruppen der OxyR-Domänen von HyPer-3 durch H_2O_2 bildet sich eine Disulfidbrücke, was zu einer Änderung des Absorptionsspektrums führt. B) roGFP2 wird (über einen Zwischenschritt, bei dem zuerst Orp1 oxidiert wird) durch H_2O_2 oxidiert, wobei eine Disulfidbrücke entsteht. Diese führt zu einer Veränderung der Exzitationsmaxima. Beide Sensoren können durch Thioredoxine (Trx) und Glutaredoxine (Grx) wieder reduziert werden. Abbildung modifiziert aus Bilan & Belousov, 2017.

Für Messungen am *Axio Observer* sowie am *Cell Observer* wurden runde Glas-Objektträger (\varnothing 25 mm) benutzt. Für Messungen am *ELP3* wurden die gleichen Messschälchen wie für die elektrochemischen Messungen benutzt (*FluoroDish*). Die Schälchen und Objektträger wurden auf die gleiche Art vorbereitet wie für elektrochemische Messungen (siehe 2.2.5.2). Vor dem Experiment wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal vorsichtig mit D-PBS gewaschen und mit 2 ml D-PBS + 5 mM Glucose überschichtet. In der jeweiligen Messapparatur wurde die Fokusebene auf die Zellebene eingestellt. Ein Bildausschnitt mit repräsentativen Zellen wurde ausgewählt und die Messung gestartet. Stimulationen, Pufferwechsel oder sonstige Applikationen von Substanzen wurden durch Zugabe mit anschließendem vorsichtigem Mischen des Puffers durchgeführt. Alternativ konnte durch vorsichtiges Abziehen von 1 ml Messpuffer und Zugabe von 1 ml neuem Puffer der gesamte

Puffer schrittweise ausgetauscht werden. Dabei war besonders auf veränderte Substanzkonzentrationen durch Abziehen und Zugabe der Puffer zu achten. Bilder wurden mit der jeweiligen Software des Messsystems aufgenommen:

Axio Observer: ZEN Blue

Cell Observer: Axio Vision

ELP3: Patchmaster mit Imaging-Erweiterung

Die Datenanalysen wurden mit den Programmen *FIJI* (Schindelin et al., 2012) und *Origin* durchgeführt.

2.2.7 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell scanning*, FACS) können gleichzeitig mehrere optische Eigenschaften von Zellen oder Partikeln in einer Suspension bestimmt werden. Dazu werden Zellen einer Zellsuspension vereinzelt und durchlaufen einen oder mehrere Laserstrahlen. Dabei entstehen charakteristische Streulicht- und Fluoreszenz-Signale, von welchen Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle gezogen werden können. Fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen es, extra- und/oder intrazelluläre Epitope der Zellen zu quantifizieren, da die Intensität der Emission des Fluoreszenzlichtes proportional zur Anzahl gebundener Fluorochrome (und damit Antikörper) ist. Die Beugung des Streulichts im flachen Winkel wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) detektiert und lässt Rückschlüsse auf die Größe bzw. das Volumen der Zelle zu. Zusätzlich wird das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) detektiert, welches die Brechung des Lichts im rechten Winkel wiedergibt, die direkt abhängig von der Granularität der Zelle ist.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am *FACSVerse* Durchflusszytometer (Laser: 488 nm, Filter: 527/32, 586/42, 700/54, 783/56; Laser: 640 nm, Filter: 660/20, 780/60; Laser: 405 nm, Filter: 450/40, 525/50) der Firma Becton Dickinson mit der Software BD *FACSuite*[™] durchgeführt. Die Vorbereitung und Markierung der Zellen mit Antikörpern erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zellen wurden zuerst vorsichtig resuspendiert, $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen entnommen und zweimal mit je 1 ml PBS + 0,5 % BSA gewaschen (5 min, 250 x g, RT zentrifugiert). Währenddessen wurde eine Antikörpermischung in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe vorbereitet. Diese bestand aus 2 µl anti-CD14 (Fluorochrom Pe-Cy7), 2 µl anti-CD45 (Fluorochrom BV510) und 46 µl PBS + 0,5 % BSA pro Probe. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS + 0,5 % BSA resuspendiert und zu jeder Probe wurde 50 µl der Antikörpermischung

gegeben, vorsichtig gemischt und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS + 0,5 % BSA gewaschen (5 min, 250 x g, RT zentrifugiert), in 150 µl PBS + 0,5 % BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

Zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten diente die Software *FlowJo 10.0.7*. Die Färbungen wurden mit Hilfe einer Software-gestützten Kompensation (*FACSSuite*) kompensiert (d.h. die Streuung der einzelnen Fluorochrome in andere, nicht erwünschte Detektions-Kanäle rechnerisch korrigiert).

2.2.8 Messung von H₂O₂ mit Amplex UltraRed

Zur Messung von extrazellulären H₂O₂ mit fluoreszenzbasierten Methoden wurde der *Amplex™ UltraRed Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay* der Firma Thermo Fisher verwendet. Bei diesem Assay wird das nicht-fluoreszierende *Amplex UltraRed* (AUR) mit Hilfe von Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) zum fluoreszierenden Resorufin umgewandelt, wobei AUR als Elektronendonator für die von der HRP katalysierte Reduktion von H₂O₂ dient (Abb. 9).

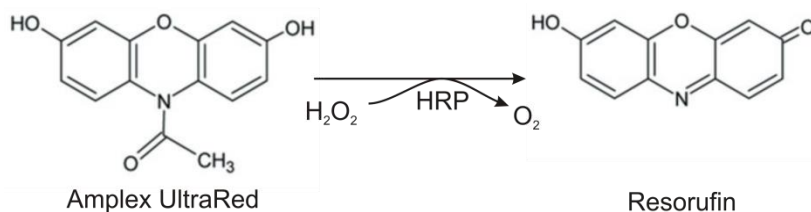


Abbildung 9 - Bestimmung von H₂O₂ mit Amplex UltraRed.

Amplex UltraRed dient als Wasserstoffdonor für die enzymatische Umwandlung von H₂O₂ durch die Meerrettichperoxidase (HRP). Dadurch wird das farblose Amplex UltraRed zum fluoreszenten Resorufin umgewandelt, welches fotometrisch detektiert werden kann.

Da die Oxidation von AUR zu Resorufin irreversibel ist, ist nach dem Standardprotokoll des Herstellers nur eine Endpunkt-Bestimmung möglich. Um die Kinetik der Bildung und Eliminierung von H₂O₂ zu verfolgen, musste das Protokoll leicht abgewandelt werden. Dazu wurden 1,5 x 10⁶ MZ entnommen und zweimal mit PBS gewaschen (250 x g, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in PBS + 5 mM Glucose in einer Dichte von 0,5 x 10⁶ pro ml in 24-Well-Platten (*ultra-low-attachment*) ausgesät. Um eine Oxidation des AUR durch Licht zu verringern, wurden alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Messung bei RT in Suspension gehalten. Um eine dynamische Messung des H₂O₂ zu

ermöglichen, wurde zu festgelegten Zeitpunkten nur ein Teil der Zellsuspension mit AUR und HRP gemischt. Dabei ist zu beachten, dass die Zeit zwischen zwei Messpunkten durch die Zeit limitiert ist, die für alle Pipettierschritte und den Messvorgang im Plattenleser benötigt wird. Messungen mit 10-minütigen Intervallen waren durchführbar. Für jeden Zeitpunkt der Messung wurden die Zellen jeder Bedingung vorsichtig resuspendiert und je 50 μ l der Zellsuspension (\sim 25000 Zellen, in Duplikaten) jeder Bedingung in ein Well der 96-Well-Messplatte (schwarz, mit flachem Boden und runden Wells) pipettiert. In jedem Well war eine Mischung mit AUR und HRP nach Herstellerangaben vorgelegt (Endkonzentrationen 30 μ M AUR, 0,1 U/ml HRP). Für jeden geplanten Zeitpunkt wurde die Platte direkt nach der Bestückung mit den Zellen im Plattenleser gemessen. Als Kontrollen dienten zellfreie Proben, um die lichtinduzierte (Hintergrund)-Oxidation des AUR zu messen. Einstellungen des Plattenlesers: *bottom reading*; *gain* 50; *9 reads* pro Well; Exzitation: 535 nm, Emission: 590 nm; RT.

2.2.9 Messung von H_2O_2 mit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Zur extrazellulären Bestimmung von H_2O_2 bei MZ mit Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie wurde cyclisches Hydroxylamin-1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) als Spin-Sensor in Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, da H_2O_2 kein Radikal ist und nicht direkt mit CMH interagiert. Dabei wird die HRP-vermittelte Reduktion von H_2O_2 mit CMH als Elektronendonator für intermediäre Redox-Zustände der HRP indirekt nachgewiesen. Es entstehen zwei CM-Nitroxyl-Radikale ($CM\bullet$), welche mit der ESR gemessen werden können (Abb. 10; Thierbach et al., 2014).

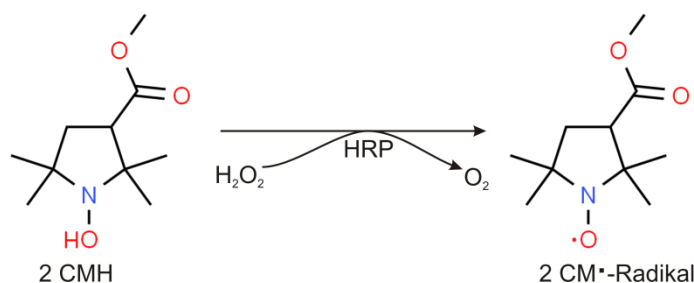


Abbildung 10 - Bestimmung von H_2O_2 mit CMH und HRP in der ESR-Spektroskopie.

CMH dient als Wasserstoffdonor für die enzymatische Umwandlung von H_2O_2 durch die Meerrettichperoxidase (HRP). Dadurch entstehen zwei $CM\bullet$ -Radikale, welche mit der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie gemessen werden können.

Die Vorbereitung der MZ erfolgte analog zur Vorbereitung für die AUR-Messungen (2.2.8). Für jeden gewünschten Mess-Zeitpunkt wurden 50 μl einer Zellsuspension zu 50 μl der ESR-Messlösung gegeben (Endkonzentrationen 100 U/ml HRP, 1 mM CMH). 50 μl dieser Mischung wurden in eine Glaskapillare (Hirschmann, 50 μl *Ringcaps*) überführt und direkt in einem *Bruker ESP300e* Spektrometer bei 37° C gemessen. Die Änderung der [CM•] für die gewählten Zeitpunkte wurde über die Veränderung des für Nitroxyl-Radikale charakteristischen ESR-Spektrum mit drei Linien gemessen. Die Intensität der ersten Linie wurde als Spitzenwert (*peak-to-peak*) erfasst und daraus die [CM•] über eine Kalibriermessung einer Probe mit bekannter Nitroxyl-Radikal-Konzentration (TEMPOL, 100 μM , identische Bedingungen) berechnet. Die [CM•] verändert sich unter diesen Bedingungen linear mit steigender $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Einstellungen des Spektrometers: Modulationsamplitude 0.1 mT, Mikrowellenleistung 20 mW, Frequenz 9,8 GHz, Zeitkonstante 20 ms, Dauer pro Scan 1 min. Alle EPR-Experimente wurden unter Anleitung von Dr. Reinhard Kappl (Biophysik, Universität Homburg) durchgeführt.

2.2.10 Kontrollierte intrazelluläre Produktion von H_2O_2 durch D-Aminosäureoxidase

Um innerhalb einer Zelle gezielt und steuerbar H_2O_2 produzieren zu können, bedient man sich des Enzyms D-Aminosäureoxidase (*D-amino acid oxidase*, DAAO). DAAO ist ein von Hefen bis Säugern konserviertes Enzym, das eine oxidative Desaminierung von D-Aminosäuren katalysiert, wobei H_2O_2 entsteht (Pollegioni et al., 2007). DAAO ist Enantiomer-spezifisch für D-Aminosäuren, welche in humanen Zellen so gut wie nicht vorkommen (Sasabe & Suzuki, 2019). Bietet man Zellen, welche DAAO überexprimieren, D-Aminosäuren an, kann so eine kontrollierte, intrazelluläre H_2O_2 -Produktion hervorgerufen werden. Um diese Produktion direkt mit fluoreszenzbasierten Methoden messen zu können, wurde von Matlashov und Kollegen ein Fusionsprotein aus DAAO und dem H_2O_2 -sensitiven Fluoreszenzsensor HyPer hergestellt (Matlashov et al., 2014). Dabei entsteht bei Gabe von D-Aminosäuren H_2O_2 , welches das direkt benachbarte HyPer oxidiert und somit zu einer Verschiebung der Exzitationsmaxima von HyPer führt, welche via Fluoreszenzmikroskopie gemessen werden kann (siehe 2.2.6). Die Konstrukte besitzen ein nukleäres-Export-Signal (NES) und sind daher in der kompletten Zelle, außer dem Nukleus, lokalisiert. Da sich die größte Menge jedoch im Cytosol befindet, überdeckt die Fluoreszenz aus dem Cytosol die restliche Fluoreszenz. Als Kontrollen dienen ein Fusionsprotein aus DAAO und dem H_2O_2 -insensitiven

Fluoreszenzsensor SyPher, sowie die Gabe von L-Aminosäuren, da DAAO Enantiomer-spezifisch wirkt. Das Mess-Prinzip ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

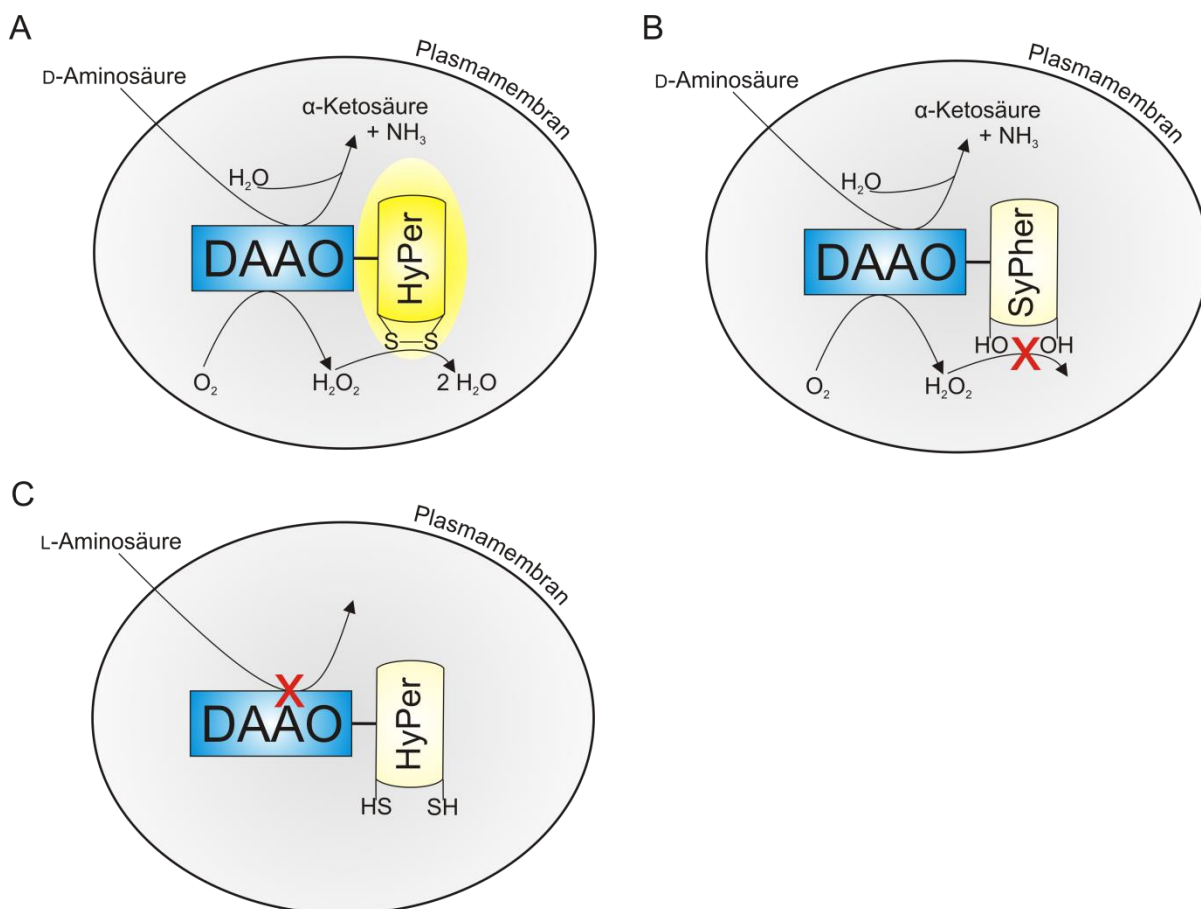


Abbildung 11 – Kontrollierte intrazelluläre Produktion und Messung von H_2O_2 . A,B) Eine beliebige D-Aminosäure wird durch D-Aminosäureoxidase (DAAO) desaminiert. Bei dieser Reaktion entsteht H_2O_2 . A) An DAAO ist das H_2O_2 -Sensorprotein HyPer fusioniert. H_2O_2 oxidiert dessen Cysteinreste und verschiebt so das Exzitationsmaximum. B) In diesem Fall ist das H_2O_2 -insensitive Protein SyPher mit DAAO fusioniert. Es kommt zu keiner Interaktion von H_2O_2 und SyPher, somit auch nicht zur Fluoreszenzänderung. C) Da DAAO Enantiomer-spezifisch wirkt, können L-Aminosäuren nicht desaminiert werden. Es kommt nicht zu einer H_2O_2 -Produktion und somit zu keiner Reaktion mit HyPer.

HEK-293-Zellen wurden mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert (siehe 2.2.4) und im Fluoreszenzmikroskop gemessen (siehe 2.2.6). Die Produktion von intrazellulärem H_2O_2 wurde über eine Gabe von 4 mM D-Alanin, gelöst in H_2O , angeregt. L-Alanin (4 mM) diente als Kontrollsubstanz. Zum Abschluss der Messung wurde der Fluoreszenzsensor überprüft, indem H_2O_2 zugegeben wurde, um HyPer vollständig zu oxidieren (bzw. um die H_2O_2 -Insensitivität von SyPher zu testen).

2.2.11 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm *OriginPro 2019* durchgeführt. Dafür wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung (*D'Agostino & Pearson normality test*) getestet und entsprechende statistische Testverfahren (gepaarter T-Test, *Wilcoxon Test*, *Mann-Whitney-Test*, *one-way* oder *two-way Anova*) ausgewählt. Dargestellte p-Werte stehen für: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Anzahl der Replikate wird angegeben als N = Anzahl der Spendertiere, n = Anzahl der unabhängigen Versuche.

3. Ergebnisse

Messungen auf Einzelzellebene sind unabdingbar, um komplexe intra- und interzelluläre Prozesse erkennen und erklären zu können. Elektrochemische Messmethoden bieten sich aufgrund ihrer hohen Spezifität, Sensitivität, sowie räumlicher als auch zeitlicher Genauigkeit an, um Messungen auf Einzelzellebene durchzuführen. Dabei müssen die Zellen weder genetisch verändert noch mit Sensor-Farbstoffen beladen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit elektrochemischen Messungen von H_2O_2 sowie des O_2 -Verbrauchs lebender Zellen Werkzeuge etabliert, welche die Untersuchung dieser physiologisch relevanten Parameter auf Einzelzellebene ermöglichen. Des Weiteren wurde eine Möglichkeit geschaffen, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in einem lokalen Bereich um eine einzelne Zelle zu quantifizieren. Zusätzlich wurde eine Kombination elektrochemischer Messungen mit Fluoreszenzmikroskopie etabliert, um so von ein und derselben Zell simultan intra- und extrazelluläres H_2O_2 zu bestimmen. Diese Messungen tragen so zu einem besseren Verständnis der Funktion und des metabolischen Status von Einzelzellen bei.

3.1 Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden

Um mit elektrochemischen Methoden Metaboliten von Einzelzellen zu messen, wird eine Elektrode mit einem sehr kleinen Durchmesser benötigt, die man sehr nah an der zu messenden Zelle positionieren kann. Idealerweise sollte der Durchmesser des leitenden Kerns der Elektrode geringer sein als der Durchmesser der Zelle. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Pt-Elektroden mit einem Durchmesser des Pt-Kerns von $10\ \mu\text{m}$ verwendet.

Die Ultramikroelektrode (UME), als Ort der elektrochemischen Reaktion von Interesse, ist das Herzstück jeder elektrochemischen Messung. Sie sollte über folgende, wichtige Eigenschaften verfügen, um für Messungen auf Einzelzellebene geeignet zu sein:

UME benötigen einen geringen Rg-Wert. Dieser ist definiert als das Verhältnis des Radius der Isolierung zu dem Radius des leitenden Kerns. Je kleiner der Rg-Wert ist, desto weniger Interferenz in der Diffusion zum elektrochemisch aktiven, leitenden Kern gibt es und somit eine größere Sensitivität. Idealerweise sollte der Rg-Wert kleiner als 10 sein, wobei gilt: je kleiner der Rg-Wert, desto besser das Signal-Rausch-Verhältnis (Bard & Mirkin, 2012; Shen et al., 2011). Mit der hier beschriebenen Herstellungsmethode konnte verlässlich ein Rg-Wert < 3 erreicht werden. Des Weiteren sollte die Spitze der UME sehr kurz sein, also stark konisch zulaufen. Dies hilft dabei, Vibrationen der Elektrode, welche zu Artefakten in der

Ergebnisse

Messung führen, zu verringern. Eine kurze Spitze sorgt auch für eine erhöhte Verwindungssteifigkeit und somit zu einer höheren Robustheit der Elektrode. Elektroden, die all diese Voraussetzungen erfüllen, waren zum Zeitpunkt der Arbeit allerdings nicht (mehr) kommerziell erhältlich, da HEKA Elektronik die Produktion einstellte. Tests mit gekauften Elektroden aus dem Labor von J. Mauzeroll (McGill University, Montréal, Kanada) zeigten, dass diese Elektroden prinzipiell für unsere Messung geeignet, aber nicht optimal waren. Aufgrund ihrer langen Spitze neigen sie zum Vibrieren und somit kam es zu einem verstärkten Rauschen der Messung und zu einem Sensitivitätsverlust.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die Optimierung der Herstellung von Pt-UME und orientiert sich dabei im Wesentlichen am Protokoll der Mauzeroll-Gruppe (*Fabrication of Carbon, Gold, Platinum, Silver, and Mercury Ultramicroelectrodes with Controlled Geometry*, (Danis et al., 2015)). Die UME besteht aus mehreren Bauteilen, welche separat gefertigt und am Ende zusammengesetzt werden (Abb. 12).

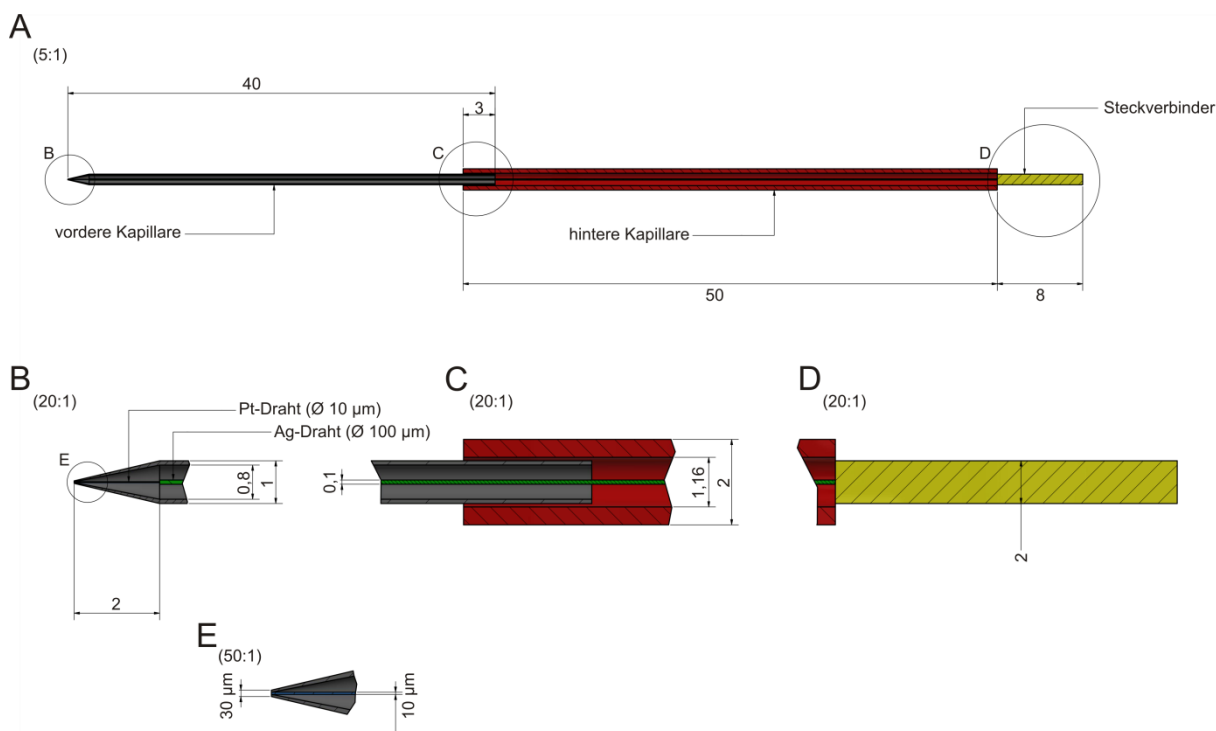


Abbildung 12 - Aufbau einer Platin-Ultramikroelektrode.

A) Gesamtansicht (5:1) der Elektrode B-D) Vergrößerte Ansicht der in A umrahmten Bereiche. E) Detailansicht der Spitze (in B umrahmter Bereich). Die einzelnen Bauteile sind in unterschiedlichen Farben dargestellt: vordere Kapillare (grau), hintere Kapillare (rot), Platindraht (blau), Silberdraht (grün), Steckverbinder (gelb). Maßstab von 5:1 bis 50:1. Alle Angaben in mm (sofern nicht anders angegeben). Zeichnung erstellt von Jens Bregen (technischer Zeichner).

Ergebnisse

Zunächst musste die vordere Kapillare, in welche der Platindraht eingeschmolzen wird, mit Hilfe eines Horizontalpullers geformt werden. Es wurden 100 mm Kalknatronglas-Kapillaren mit einem äußeren Durchmesser von 1 mm und einem inneren Durchmesser von 0,8 mm genutzt. Die Sauberkeit der Kapillaren wurde durch ein mehrstündiges Bad in Azeton mit anschließendem Abspülen unter destilliertem Wasser und Trocknung über Nacht im Ofen bei 60 °C gewährleistet. Anschließend wurden die Kapillaren mit Hilfe eines Horizontalpullers (*Sutter P-1000*) in ihre charakteristische, konisch zulaufende Form gezogen. Die Parameter, welche den Schmelzvorgang charakterisieren und am Gerät eingestellt werden können, sind folgende:

1. HEAT – beschreibt, wie stark das Filament, welches die Glaskapillare umspannt, erhitzt wird.
2. PULL – beschreibt, wie stark an den Enden der Kapillare gezogen wird, wenn der unter VELOCITY eingestellte Grenzwert erreicht wird.
3. VELOCITY – beschreibt, mit welcher Geschwindigkeit sich die Glaskapillare separieren muss, bevor die Erhitzung des Filaments gestoppt und ggf. an den Enden der Kapillare gezogen wird.
4. TIME – beschreibt, wie lange die Kapillare und das Filament nach Erreichen des VELOCITY-Grenzwertes durch einströmende Luft gekühlt wird.
5. PRESSURE – beschreibt den Luftdruck, der benutzt wird um Kapillare und Filament zu kühlen.

Die Rolle dieser Parameter ist im Sutter P-1000 Handbuch sowie in mehreren Reviews detaillierter erklärt (Oesterle & Sutter, 2018; Valaskovic et al., 1995; Williamson & Miles, 1996), eine Übersicht über die Rolle ist in Tabelle 13 gegeben:

Tabelle 13 – Rolle der Parameter-Einstellungen des Horizontalpullers
Adaptiert aus dem *Pipette Cookbook* von *Sutter Instruments* (Oesterle & Sutter, 2018).

PARAMETER	STEIGERUNG	REDUZIERUNG
HEAT	Kleinere Spitze; längerer Konus	Größere Spitze; kürzerer Konus
VELOCITY	Kleinere Spitze	Größere Spitze
PULL	Kleinere Spitze; längerer Konus	Größere Spitze; kürzerer Konus

Um einen Konus mit möglichst geringer Höhe zu erreichen, wurden folgende Einstellungen des Horizontalpullers benutzt:

HEAT 420, PULL 0, VELOCITY 10, TIME 255, PRESSURE 999

Hierbei ist zu beachten, dass diese Werte von der Hersteller-Charge der Glaskapillaren und dem Alter des Filaments des Pullers abhängen. Grundsätzlich sind für die Parameter HEAT, VELOCITY und PULL die niedrigsten Werte zu wählen, bei denen noch eine Separierung des Glases erreicht wird. Mit diesen Parametern konnte ein Durchmesser der Spitze von 20-30 μm erreicht werden, welcher sich innerhalb von 2 mm wieder auf den Anfangsdurchmesser der Kapillare von 1 mm verbreitert (Abb. 13 A).

Als nächstes wurde der Pt-Draht mit Hilfe eines Skalpells in 3-4 mm große Stücke zugeschnitten und mit einer Präzisionspinzette in das Ende der Kapillare eingefädelt, was über eine Binokularlupe kontrolliert wurde (Abb. 13 B). Der Drahtabschnitt wurde über leichtes Klopfen der Kapillare bis in die Spitze gebracht. Hier wurde gegebenenfalls zusätzlich eine Nylonschnur benutzt, um den Drahtabschnitt nach vorne zu schieben. Dabei muss allerdings darauf geachtet werden, den Draht nicht zu verbiegen oder um die Schnur zu wickeln. Die Positionierung des Drahtes wurde fortwährend mit einer Binokularlupe und einem Durchlichtmikroskop kontrolliert (Abb. 13 C).

Danach muss der Pt-Draht mit der Kapillare verschmolzen werden. Dazu wurde die Kapillare mit dem Draht in einen Vertikalpuller mit einer Kanthal-Spule eingespannt. Die Spule wurde bis zur Weißglut vorgeheizt und die Kapillare mit der Spitze voran in die Spule geschoben. Dort wurde sie 5-10 s gehalten und dann wieder entfernt. Hierbei ist zu beachten, dass die Kapillare zentral in die Spule eingeführt wird, um durch ungleichmäßige Erhitzung verursachtes Verbiegen der Spitze zu vermeiden. Dieser Vorgang wurde vier- bis fünfmal wiederholt, wobei vor jedem Durchlauf die Kapillare im Schlitten des Gerätes leicht gedreht wurde, um eine gleichmäßige Hitzeverteilung zu erreichen, selbst wenn sich die Kapillare nicht komplett zentriert in der Spule befand. Dabei schmilzt das Glas und bildet eine Isolierung um den Pt-Draht (Abb. 13 D). Um den eingeschmolzenen Draht zu kontrollieren, wurde das inverse Mikroskop des *ELP3* verwendet. Für eine optimale Elektrode war sicherzustellen, dass der Draht vollständig von Glas ummantelt war, ohne eingeschlossene Luftblasen oder Staubpartikel. Zusätzlich wurden die Form der Spitze und die Positionierung des Drahtes kontrolliert; die Spitze sollte gerade und der Draht zentriert in der Spitze sein (Abb. 13 G).

Ergebnisse

Um den Elektrodenbau abzuschließen, mussten zusätzlich eine äußere Schutzkapillare und ein elektrischer Steckverbinder angebracht werden. Hierzu wurde eine 10 cm lange Borosilikat-Kapillare mit einem inneren Durchmesser von 1,16 mm und einem äußeren Durchmesser von 2 mm in zwei Hälften geschnitten und ein Teilstück ca. 1 cm über die Kapillare mit dem eingeschmolzenen Draht geschoben. Anschließend wurde ein 6-7 cm langer Silberdraht (\varnothing 0,1 mm) mit einem leitfähigen Epoxid-Klebstoff an den Platindraht geklebt. Mit dem gleichen Kleber wurde ein 1 mm Miniatur-Steckverbinder (vergoldet) an den Silberdraht geklebt und so eine elektrische Verbindung zwischen Elektrode und Messeinheit ermöglicht (wobei es auch möglich ist, den Steckverbinder anzulöten). Der Kleber wurde über Nacht im Ofen bei 60 °C gehärtet. Um die Stabilität der Elektrode zu verbessern, wurden die Lücken zwischen der Borosilikat- und der Kalknatronglas-Kapillare sowie der Borosilikat-Kapillare und dem elektrischen Steckverbinder mit Cyanoacrylatkleber („Sekundenkleber“) versiegelt (Abb. 13 F). Die fertige Elektrode wurde in eine Poliereinrichtung gespannt (MHK-1, HEKA Elektronik) und die Spitze soweit geschliffen, bis der im Glas eingeschmolzene Pt-Draht eine plane Oberfläche aufwies. Dabei wurden Schleifpapiere mit verschiedenen groben Körnungen verwendet, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten. Die Körnungen der Schleifpapiere reichten von einer groben (9 μm) über eine mittlere (0,5 μm) bis hin zu einer feinen Körnung (0,1 μm). Hierbei war darauf zu achten, dass nicht zu weit geschliffen wurde, um einen möglichst kleinen Rg-Wert zu gewährleisten (Abb. 13 E).

Ergebnisse

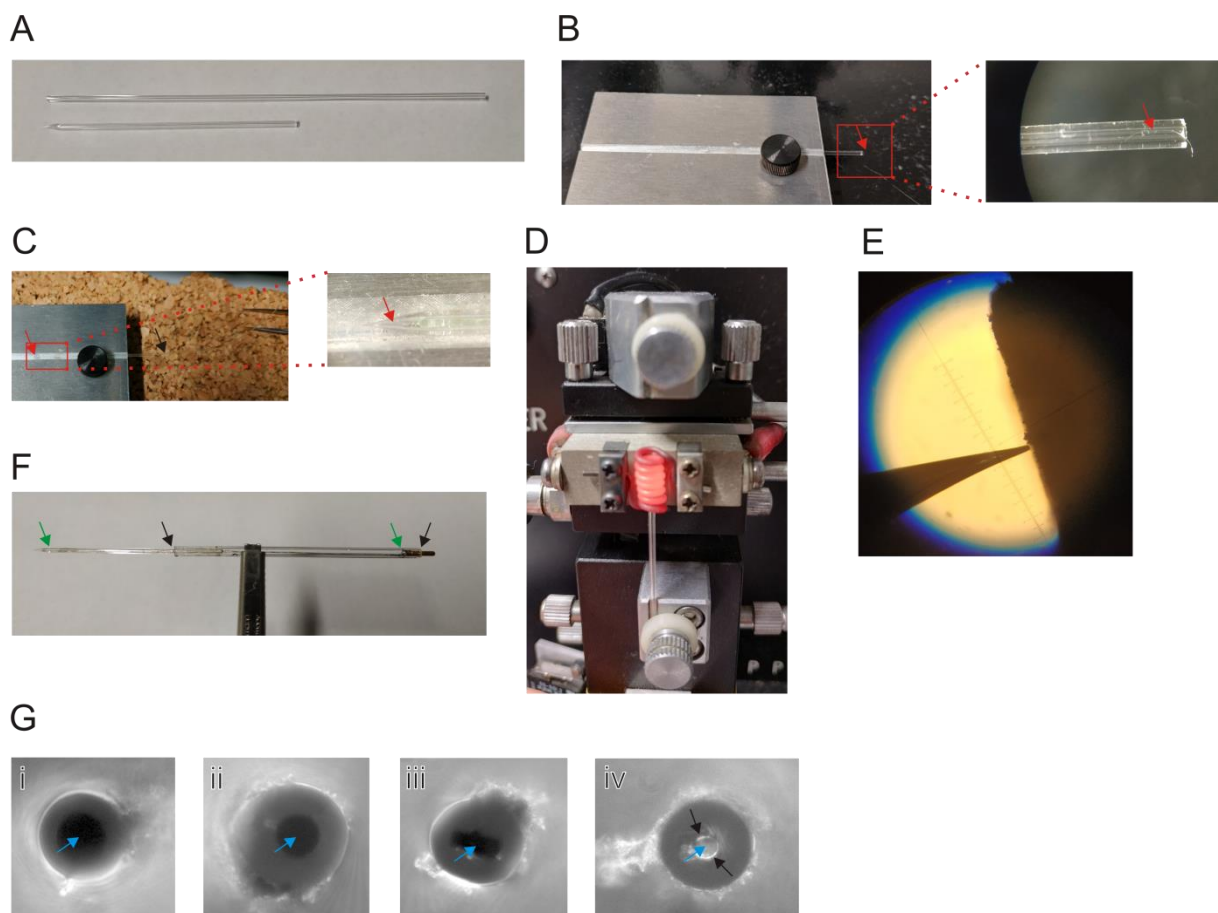


Abbildung 13 - Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden.

A) Kalknatronglas-Kapillaren mit äußerem Durchmesser von 1 mm und innerem Durchmesser von 0,8 mm, vor und nach horizontalem Pull. B) Einführen des Pt-Drahts (Ø 10 μm , roter Pfeil) in die Kapillare. C) Pt-Draht (roter Pfeil) in der Spitze der Kapillare, vorgeschoben mit Hilfe einer Nylonschnur (schwarzer Pfeil). D) Einschmelzen des Drahts in die Spitze der Kapillare in der glühenden Kanthal-Spule eines Vertikalpullers. E) Polieren der Elektrode mit dem *MHK-1*-Schleifgerät. F) Durch Anbringen einer Schutzkapillare und Herstellung der elektrischen Verbindung über einen Silberdraht mit einem Steckverbinder fertiggestellte Elektrode. Verkleben des Silber- mit dem Pt-Draht und Silberdraht mit dem Steckverbinder über einen leitfähigen Epoxid-Klebstoff (grüne Pfeile). Stabilisierung und Verkleben der Schutzkapillare mit Sekundenkleber (schwarze Pfeile). G) Eingeschmolzener Pt-Draht (blauer Pfeil) in der Spitze der Kapillare (i) Perfekte Zentrierung, sehr kleiner Rg-Wert. (ii) Etwas dezentral eingeschmolzener Draht, trotzdem gut verwendbar. (iii) Quer eingeschmolzener Pt-Draht, Veränderung der elektrochemisch aktiven Oberfläche. (iv) Schlecht eingeschmolzener Draht (Luftblasen, schwarze Pfeile), so nicht verwendbar. An allen Elektroden ist außen Schleifstaub zu erkennen, welcher durch finales Polieren und Ultraschallbad entfernt wurde.

3.1.1 Qualitätskontrolle der Elektrode

Um die Funktionalität der fertigen Elektrode für die hochsensiblen elektrochemischen Messungen zu bestimmen, musste jede UME einzeln überprüft werden. Zyklische

Voltammetrie (CV) mit niedriger Scan-Rate (< 150 mV/s) mit einem Redox-Mediator mit bekannten elektrochemischen Eigenschaften kann benutzt werden, um das elektrochemische Verhalten von Elektroden zu charakterisieren (Hu et al., 2005). Ein Hauptaugenmerk wird dabei auf die Form des Voltammogramms gelegt. Eine für sensitive Messungen geeignete Elektrode weist bei geringen Scan-Raten eine geringe Hysterese zwischen Vor- und Rückwärtsscan, sowie einen rauscharmen Stromverlauf auf (Howell & Wightman, 1984; Zoski, 2007). Um zu testen, ob eine UME den Ansprüchen genügt, wurden zyklische Voltammogramme in Ferrocenmethanol (1 mM in 100 mM KCl) von -100 mV bis 400 mV mit einer Scan-Rate von 10 mV/s durchgeführt. Die Form des Voltammogramms lässt Rückschlüsse auf die Elektrodenqualität zu, in Abbildung 14 sind Voltammogramme einer geeigneten („guten“) Elektrode mit geringem Rauschen und geringer Hysterese (Abb. 14 A), in Abb. 14 B einer ungeeigneten („schlechten“) Elektrode mit starkem Rauschen und großer Hysterese dargestellt.

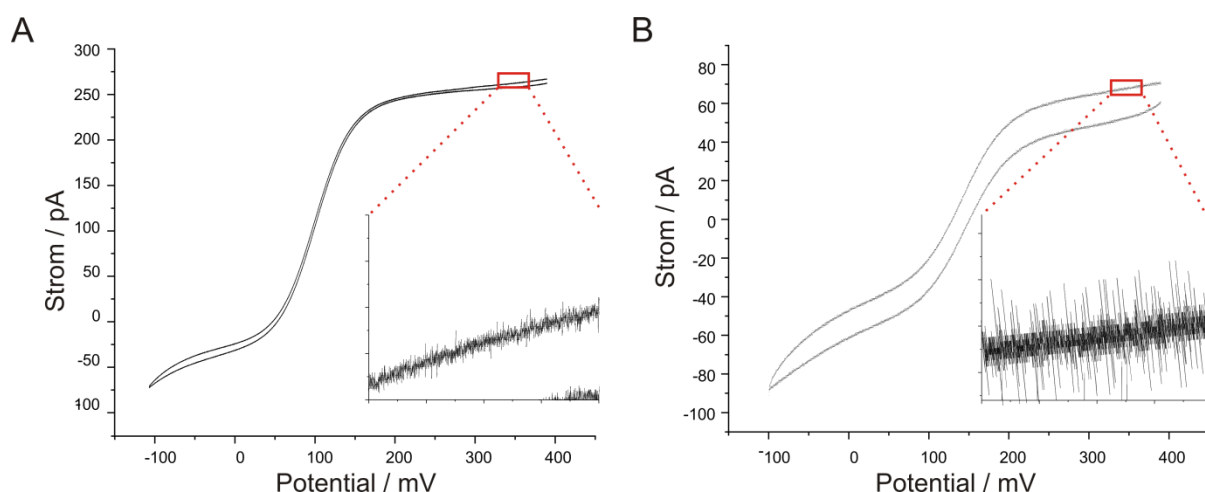


Abbildung 14 - Zyklische Voltammetrie zur Qualitätskontrolle von Pt-Ultramikroelektroden.

Ferrocenmethanol unterläuft eine reversible Oxidation zwischen -100 und $+400$ mV. Die Form des Voltammogramms lässt Rückschlüsse auf die Qualität der Elektrode zu.

A) Voltammogramm einer geeigneten Elektrode, zu erkennen an der geringen Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtsscan. Das Inlay zeigt vergrößert dargestellt das geringe Rauschen. B) Voltammogramm einer für sensitive Messungen ungeeigneten Elektrode, zu erkennen an der breiten Hysterese zwischen Vor- und Rückwärtsscan. Das Inlay zeigt vergrößert dargestellt das im Vergleich zu A) stärkere Rauschen. Potentialbereich -100 mV bis 400 mV, Scan-Rate 10 mV/s, Pt-UME vs. Ag/AgCl, 1 mM Ferrocenmethanol in 100 mM KCl.

Eine qualitativ gute UME kann für unbestimmte Zeit benutzt werden. Allerdings verschlechtern sich die elektrochemischen Eigenschaften der Elektrode mit der Zeit, was sich in einer reduzierten Sensitivität sowie einem größeren Rauschen widerspiegelt. Mögliche Gründe dafür können Kontaminierung der elektrochemisch aktiven Oberfläche sein, z. B. durch Anhaften organischen Materials oder physische Schäden an der Spitze, z. B. durch Berühren eines Gegenstandes mit der Elektrodenoberfläche. Je nach Art der Schädigung kann ein Säubern der Elektrode durch ein Ultraschallbad in 70 % Ethanol für 10 s, gefolgt von einem Ultraschallbad in H₂O *dest.* für 10 s die Sensitivität wiederherstellen. Diese Art der Säuberung wurde vor und nach jedem Messtag, sowie nach Verschmutzung zwischen einzelnen Messungen durchgeführt. Als *ultima ratio* ist ein mechanisches Polieren der Oberfläche mit Schleifpapier verschiedener Körnungen möglich (analog zur Fertigstellung beim Elektrodenbau), um festsitzende Unreinheiten zu entfernen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass dadurch der Rg-Wert vergrößert wird und sich die elektrochemischen Eigenschaften der Elektrode verändern.

3.1.2 Temperatursensitivität von Pt-Ultramikroelektroden

Um Messungen unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen, ist, neben vielen anderen Parametern, die Temperatur während einer Messung ein wichtiger Faktor (z. B. J. Wang et al., 2017). Idealerweise sollten Experimente mit menschlichen Zellen bei einer Messpuffer-Temperatur von 37° C durchgeführt werden. Messungen mit Pt-UME, bei denen die Temperatur des Puffers über RT erhöht wurde, führten allerdings zu einem deutlich erhöhten Rauschen des elektrochemischen Signals. Eine exemplarische chronoamperometrische Messung bei gleichzeitiger langsamer Erwärmung des Messpuffers von 22° C auf 37° C (gefolgt von Abkühlung und erneuter Erwärmung) ist in Abbildung 15 dargestellt. Das erhöhte Rauschen bei höheren Temperaturen ist ein bekanntes Phänomen, so ist z.B. bei Korrosions-Studien von Metallen eine ähnliche Abhängigkeit des Signalrauschens von der Temperatur vorhanden (Kearns et al., 1997). Das dabei gemessene Rauschen ist dabei reversibel, nach Abkühlung des Puffers auf Raumtemperatur sank die Amplitude des Rauschens wieder auf ein niedriges Niveau ab. Im Rauschen war keine Regelmäßigkeit in Frequenz und Amplitude erkennbar, deshalb gab es keine Möglichkeit, diese Signale aus den Messungen herauszufiltern. Da chronoamperometrische Messungen an Zellen die Metaboliten in oft niedrigen Konzentrationen bestimmen und die gemessene Stromstärke direkt abhängig von der Konzentration ist (vgl. *Cottrell*-Gleichung, 1.3.5), sind die (Signal-)Ströme sehr klein.

Ein starkes Rauschen verschlechtert also das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung deutlich und relevante (Signal-)Ströme werden durch das Rauschen maskiert. Da das Messschälchen über einen beheizten Metallrahmen im Proben Tisch erwärmt wird (siehe Abb. 7), kommt es zu einem Temperaturgradienten vom Rand zur Mitte des Schälchens (wo die UME positioniert ist). Um zu testen, ob durch den Temperaturunterschied innerhalb des Puffers die Elektrode zum Schwingen gebracht und das Rauschen dadurch hervorgerufen wird, wurde durch ein Vorwärmen des Messpuffers in einem Wasserbad ein Temperaturgradient vermieden. Es konnte jedoch keine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses festgestellt werden. Ein Vergleich von UME mit längerer und kürzerer Spitze, welche durch ihre unterschiedlichen Geometrien mit verschiedenen Frequenzen schwingen, zeigte dieselbe Abhängigkeit des Rauschens von der Temperatur. Da Hintergrundströme auch durch kapazitive Ströme entstehen (siehe 1.3.3), sollte getestet werden, ob das erhöhte Rauschen durch eine Veränderung der Kapazität der Elektrode bei erhöhter Temperatur hervorgerufen wurde. Dazu wurde die Elektrodenspitze durch kurzes Eintauchen in *Sigmacote*, einem chlorierten Organopolysiloxan beschichtet. *Sigmacote* bildet eine kovalente, mikroskopisch dünne Schicht auf Glas aus und verringert die Kapazität der Elektrode (Tseng & Santra, 2018). Durch diese Behandlung konnte jedoch auch keine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei erhöhter Temperatur erreicht werden. Elektrische Interferenzen durch Komponenten des Beheizungs-Systems konnten ausgeschlossen werden, da weder ein Abschirmen des Systems, noch selektiver, schrittweiser Abbau der einzelnen Komponenten zur Verbesserung des Rauschens führte. Wie die Kontrollen zeigten, scheint die Ursache des Rauschens nicht technisch bedingt zu sein. Diverse Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit ähnlichen Phänomenen und versuchen, mathematische Modelle oder technische Ansätze zu erarbeiten, um das Problem anzugehen, allerdings gibt es noch keine allgemeingültige Lösung (Novev & Compton, 2016, 2017, 2018; Ribeiro et al., 2009). Aufgrund der zurzeit für uns nicht lösbaren Problematik wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

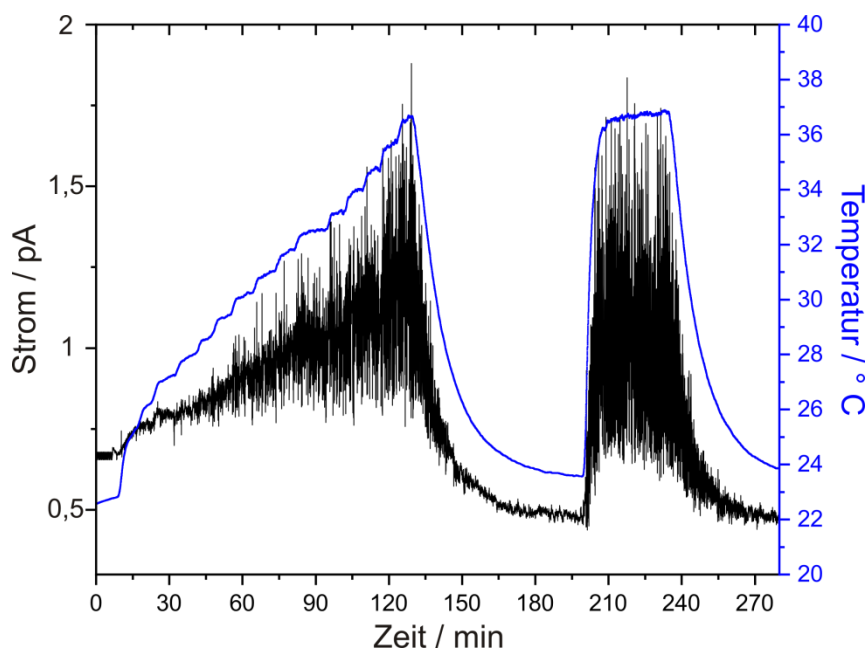


Abbildung 15 – Temperatur-Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses von Pt-Ultramikroelektroden (UME)

Eine Pt-UME wurde in zellfreien D-PBS getaucht und auf 650 mV (vs. Ag/AgCl) polarisiert. Die Temperatur des Messpuffers (blaue Kurve) wurde schrittweise bis 37° C erhöht und das Stromsignal (schwarze Kurve) aufgezeichnet. Bei ca. 130 min wurde das Heizsystem ausgeschaltet und der Puffer auf RT abkühlen gelassen. Bei 200 min wurde der Messpuffer erneut auf 37° C beheizt.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein Protokoll zur reproduzierbaren Herstellung von Pt-UME mit kurzen Spitzen und kleinem Rg-Wert etabliert werden. Die UME können auf ihre Tauglichkeit überprüft und gewartet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur des Messpuffers das Signal-Rausch-Verhältnis der Messungen verschlechtert. Elektrochemische Messungen mussten deshalb bei Raumtemperatur durchgeführt werden. In den folgenden Teilen dieser Arbeit soll die Anwendung dieser UME für elektrochemische Messungen demonstriert werden.

3.2 Elektrochemische Messung von H₂O₂ an Einzelzellen

H₂O₂ kann auf unterschiedliche Arten auf multiple Zellprozesse Einfluss nehmen. Ein Aspekt, dem immer mehr Beachtung geschenkt wird, ist dabei die Funktion von H₂O₂ als *second messenger*, also wie H₂O₂ intra- und interzelluläre Signalkaskaden beeinflusst. Mit Hilfe elektrochemischer Methoden ist es möglich, [H₂O₂] in der direkten Umgebung einer Zelle zu

messen und zu quantifizieren. Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Etablierung der elektrochemischen Messung von H_2O_2 und dessen Quantifizierung.

3.2.1 Kalibrierung chronoamperometrischer H_2O_2 -Messungen

Chronoamperometrische (CA) Messungen bieten sowohl hohe Sensitivität und Spezifität, als auch räumliche und zeitliche Auflösung. Daher ist diese Methode das Mittel der Wahl zur Messung von $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Verläufen (Bozem et al., 2018). Um CA-Messungen zu kalibrieren, wurde die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ der zellfreien Messlösung (D-PBS + 5 mM Glucose) durch Gabe von H_2O_2 in 5 μM -Schritten erhöht. Das Potential war bei 650 mV fixiert, bei dem H_2O_2 oxidiert wird. Wie in Abbildung 16 A dargestellt, stieg die Stromstärke linear mit der Zugabe von H_2O_2 , wobei ein Kalibrierungsfaktor von 233 ± 20 fA pro μM H_2O_2 in zellfreiem Puffer ($n = 25$) berechnet werden konnte. Um den Kalibrierungsfaktor in Anwesenheit von Zellen, in diesem Fall primären humanen Monozyten, zu bestimmen, wurde die UME mindestens 1 mm über den am Boden des Messschälchens haftenden Zellen positioniert. So kann eine Interferenz mit lokalen Zellprozessen vermieden werden. Dann wurde, analog zu den zellfreien Experimenten, durch Gabe von H_2O_2 zur Messlösung die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in 5 μM -Schritten erhöht. Bei diesen Experimenten konnte ebenso eine lineare Abhängigkeit der Stromstärke von der H_2O_2 -Konzentration beobachtet werden, mit einem Kalibrierungsfaktor von 224 ± 10 fA pro μM H_2O_2 ($n = 25$).

Physiologische $[\text{H}_2\text{O}_2]$ reichen von wenigen nM bis in den niedrigen millimolaren Bereich (Sies, 2017). Um zu überprüfen, ob chronoamperometrische H_2O_2 -Messungen in diesem Bereich eine lineares Strom/ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Verhältnis aufweisen, wurde in zellfreiem D-PBS (+ 5 mM Glucose) durch Gabe von H_2O_2 zum Messpuffer die H_2O_2 -Konzentration schrittweise von 500 nM bis 1 mM erhöht. Dabei wurde der resultierende Strom bei einem Potential von 650 mV gemessen. Es konnte eine Linearität bei physiologisch relevanten $[\text{H}_2\text{O}_2]$ von 500 nM bis 1 mM festgestellt werden (Abb. 16 B).

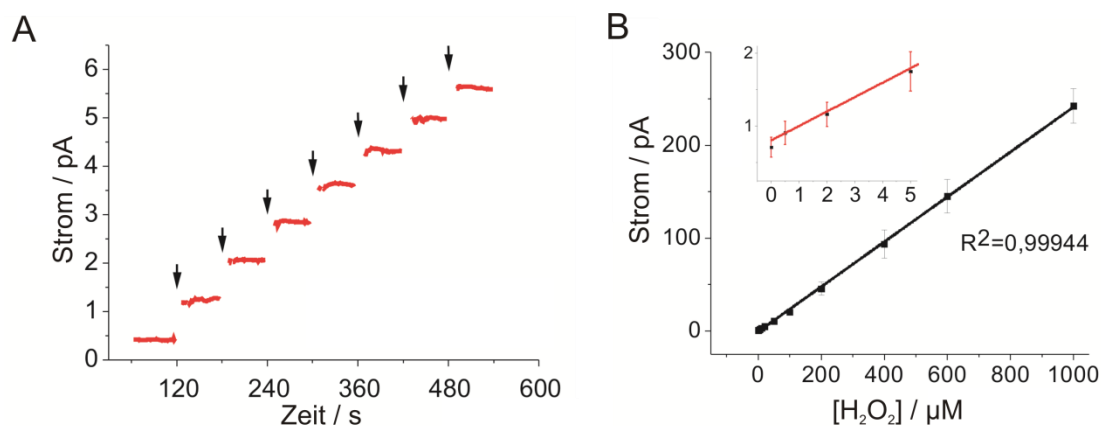


Abbildung 16 - Kalibrierung chronoamperometrischer H₂O₂-Messungen.

A) Beispielhafte chronoamperometrische H₂O₂-Messung. Die Pfeile repräsentieren die Zugabe von H₂O₂ zur Messlösung in 5 µM-Schritten. B) Änderung des Stromes nach schrittweiser Zugabe von H₂O₂ zum Messpuffer. [H₂O₂]-Endkonzentrationen von 500 nM bis 1 mM. Für die Berechnung der linearen Regression wurden die Stromwerte im Gleichgewichtszustand nach jeder H₂O₂-Addition gemittelt, sie betrug 233 ± 20 fA pro µM [H₂O₂]. Das Inlay (rot) zeigt vergrößert den Bereich von 0 bis 5 µM H₂O₂. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS (+ 5 mM Glucose), n = 10. Abbildung modifiziert aus Bozem et al., 2018.

Bei den Messungen fiel auf, dass die Sensitivität einer UME von Elektrode zu Elektrode, aber auch bei derselben Elektrode von Messtag zu Messtag schwanken kann. Um eine genaue Bestimmung der [H₂O₂] für jeden Messpunkt eines Versuches zu ermöglichen, ist eine für jedes Experiment spezifische Kalibrierung vorzunehmen.

In Abbildung 17 sind eine beispielhafte chronoamperometrische H₂O₂-Messung an einer Einzelzelle sowie die Quantifizierung der [H₂O₂] dargestellt. In diesem Versuch wurde die H₂O₂-Produktion eines einzelnen primären humanen Monozyten (hMZ) gemessen. In diesen Zellen sind NADPH-Oxidasen (NOX2)-Enzymkomplexe die Hauptquellen für extrazelluläres O₂⁻, welches sowohl spontan als auch durch die Superoxid-Dismutase 3 katalysiert zu H₂O₂ dismutiert (Brandes et al., 2014). Man kann NOX-Enzyme mit Hilfe des Phorbolesters Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktivieren und so eine H₂O₂-Produktion stimulieren (Rastogi et al., 2017). Nach Zugabe von 1 µM PMA kam es zu einem kleinen elektrochemischen Artefakt, welches auf das Lösemittel DMSO (für PMA, finale Konzentration in der Messlösung 0,2 % (v/v)) zurück zu führen war. Danach stieg der Strom über 15 Minuten, bis ein Plateau erreicht war (Abb. 17 A). Am Ende der Messung wurde die UME nach oben und somit in einen deutlichen Abstand (> 1 mm) zur Zellebene gebracht. Sobald die UME die nähere Umgebung der Zelle verließ, sank die Stromstärke wieder auf

Ergebnisse

900 fA, was dem Ausgangswert vor der Zugabe von PMA entsprach. Um die Messung zu kalibrieren wurden, analog zu dem in Abbildung 16 A dargestellten Experiment, mehrfach H_2O_2 zugegeben (in 5 μM -Schritten) um Endkonzentrationen von 5 bis 20 μM zu erreichen (Abb. 17 C). Die gemittelten Stromwerte jeder H_2O_2 -Konzentrationsstufe wurden benutzt, um eine Bestgerade zu erstellen und den Kalibrierungsfaktor zu berechnen, welcher für diese Messung bei 43,4 fA pro μM $[\text{H}_2\text{O}_2]$ lag (Abb. 17 D). Mit dem Kalibrierungsfaktor ließ sich die Stromkurve in eine $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Kurve umrechnen. Nach Abzug des Hintergrund-Stromes zeigt die Kurve den Verlauf der lokalen $[\text{H}_2\text{O}_2]$ vor und nach Stimulation mit PMA (Abb. 17 E).

Ergebnisse

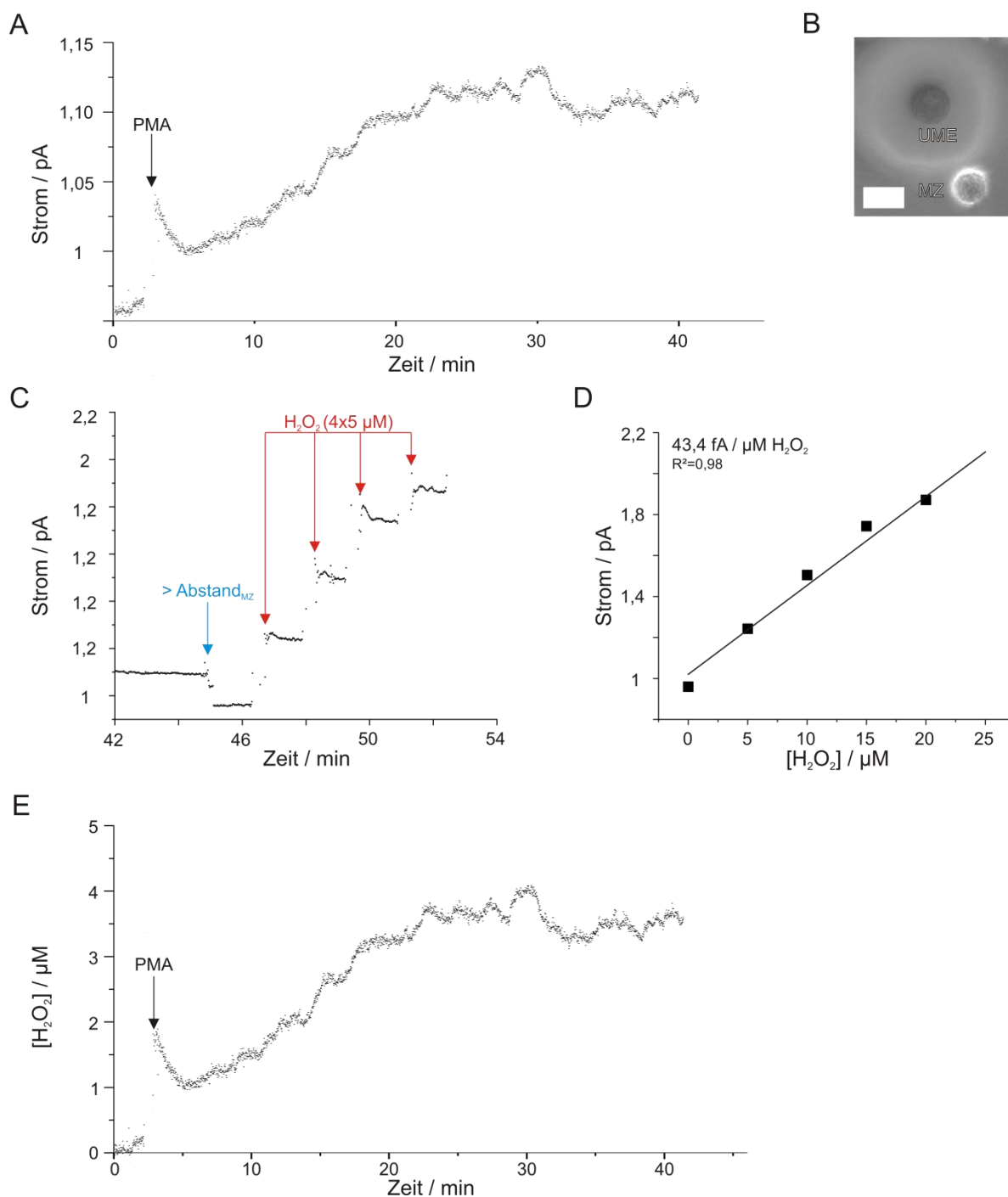


Abbildung 17 - Chronoamperometrische H_2O_2 -Messung und -Quantifizierung. Repräsentative Messung der H_2O_2 -Produktion eines einzelnen primären humanen Monozyten (hMZ) nach Stimulierung mit PMA. Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einem hMZ positioniert. A) Verlauf des Stroms nach Stimulierung des hMZ mit 1 μM PMA (schwarzer Pfeil). B) Durchlichtmikroskopie-Bild des gemessenen hMZ sowie der UME. Balken = 10 μm . C) Kalibrierung der Messung durch Positionierung der Elektrode > 1 mm über der Zellebene (blauer Pfeil) und subsequenter H_2O_2 -Gabe zum Puffer, 4 x 5 μM (rote Pfeile) D) Für die Berechnung der linearen Regression wurden die Stromwerte im Gleichgewichtszustand nach jeder H_2O_2 -Addition gemittelt. E) Umrechnung der Messung aus A) in lokale $[H_2O_2]$ um die Elektrodenspitze. Dazu wurde die Stromkurve durch den Kalibrierungsfaktor geteilt und das Hintergrundsignal subtrahiert. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose

Der Anstieg des Stromes reflektiert den Anstieg der $[H_2O_2]$ in einem kleinen Puffer-Volumen um die Elektrodenspitze. Dieses Volumen kann als Halbkugel um den Pt-Kern abstrahiert werden, da bei UME aufgrund ihrer geringen Größe eine hemisphärische Diffusion herrscht (Bard & Faulkner, 2001; Heinze, 1993). Alle Angaben zu Konzentrationsänderungen gemessener Metaboliten beziehen sich immer auf dieses Messvolumen. In Abbildung 18 sind das Messvolumen, sowie Diffusion des von MZ produzierten H_2O_2 und die hemisphärische Diffusion an der Elektrodenspitze schematisch dargestellt.

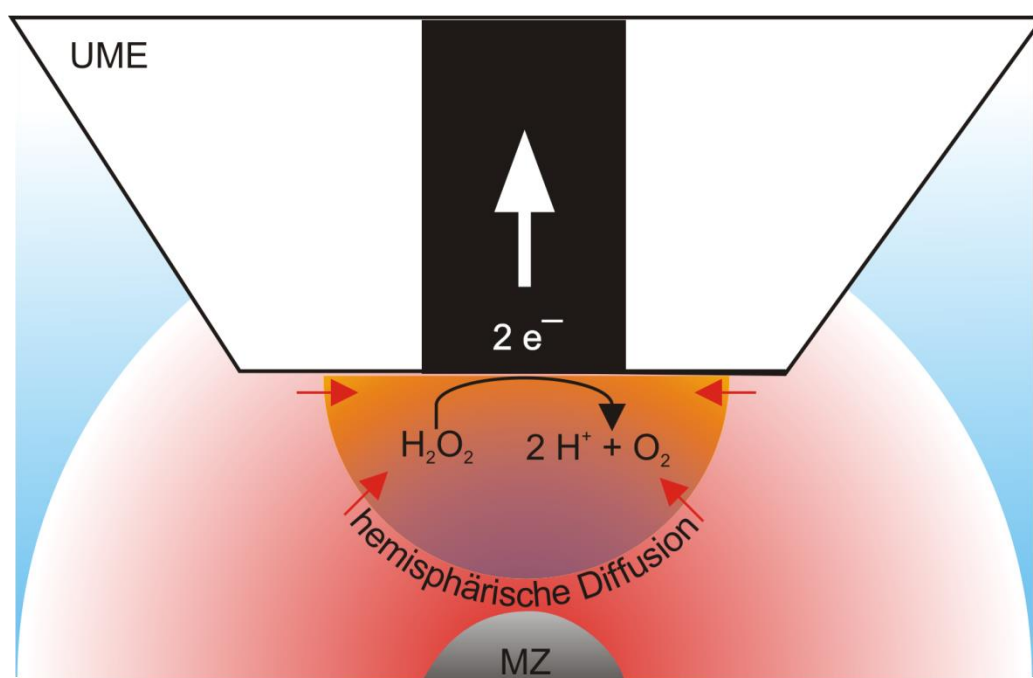


Abbildung 18 – Schematische Darstellung des Messvolumens um eine Ultramikroelektroden (UME)-Spitze.

Diffusion des von einem Monozyten (MZ) produzierten H_2O_2 um den MZ (roter Gradient) und hemisphärische Diffusion zur UME-Spitze (rote Pfeile, lila-orangener Gradient), welches hier als das Messvolumen um die UME-Spitze bezeichnet wird. Alle Angaben von Konzentrationsänderungen in dieser Arbeit beziehen sich auf Änderungen der $[H_2O_2]$ in dieser Hemisphäre.

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass der Strom linear abhängig von der $[H_2O_2]$ in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich (500 nM bis 1 mM) ist. Außerdem wurde ein Kalibrierungs-Verfahren vorgestellt, mit dem die lokale $[H_2O_2]$ in einem Messbereich um einen einzelnen Monozyten für jeden Messpunkt einer chronoamperometrischen H_2O_2 -Bestimmung ermittelt werden kann.

3.2.2 Quantifizierung der H₂O₂-Produktion und Eliminierung durch Monozyten

Eine der Hauptaufgaben von Monozyten (MZ) ist es, über Phagozytose körperfremde, pathogene Mikroorganismen zu zerstören. Dabei produzieren MZ große Mengen ROS, welche nicht nur antipathogen wirken, sondern auch als sekundärer Botenstoff in Signaltransduktion und interzellulärer Kommunikation involviert sind. Eine Messung der H₂O₂-Dynamik auf Einzelzellebene kann genauere Erkenntnisse über die Produktion und Eliminierung von H₂O₂ liefern, was sowohl für die gemessene Zelle, als auch für Zell-Zell-Interaktionen in einem Zellverband von Bedeutung ist.

Um dynamische Veränderungen der [H₂O₂] zu messen wurde die UME 10 - 12 µm über einen einzelnen primären hMZ positioniert und auf 650 mV polarisiert. Die Produktion von H₂O₂ wurde durch Stimulierung der Zelle mit PMA hervorgerufen (Abb. 19 A). Direkt nach der Zugabe von 1 µM PMA kam es zu einem kleinen elektrochemischen Artefakt, welches auf das Lösemittel DMSO zurück zu führen ist. Danach stieg der Strom über 15 min bis ein Plateau erreicht war. Eine Quantifizierung dieses Plateaus (Mittelwert des Plateau-Stroms für jede Messung über 10 min, 15-25 min nach Stimulierung) ergab eine durchschnittliche, maximale [H₂O₂] im Messbereich der Elektrode von $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (n = 23). Die Zugabe des Lösemittels DMSO (0,2 % (v/v)) als Kontrolle führte zu einem elektrochemischen Artefakt, das einer „[H₂O₂]“ von $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ entsprechen würde (Abb. 19 B).

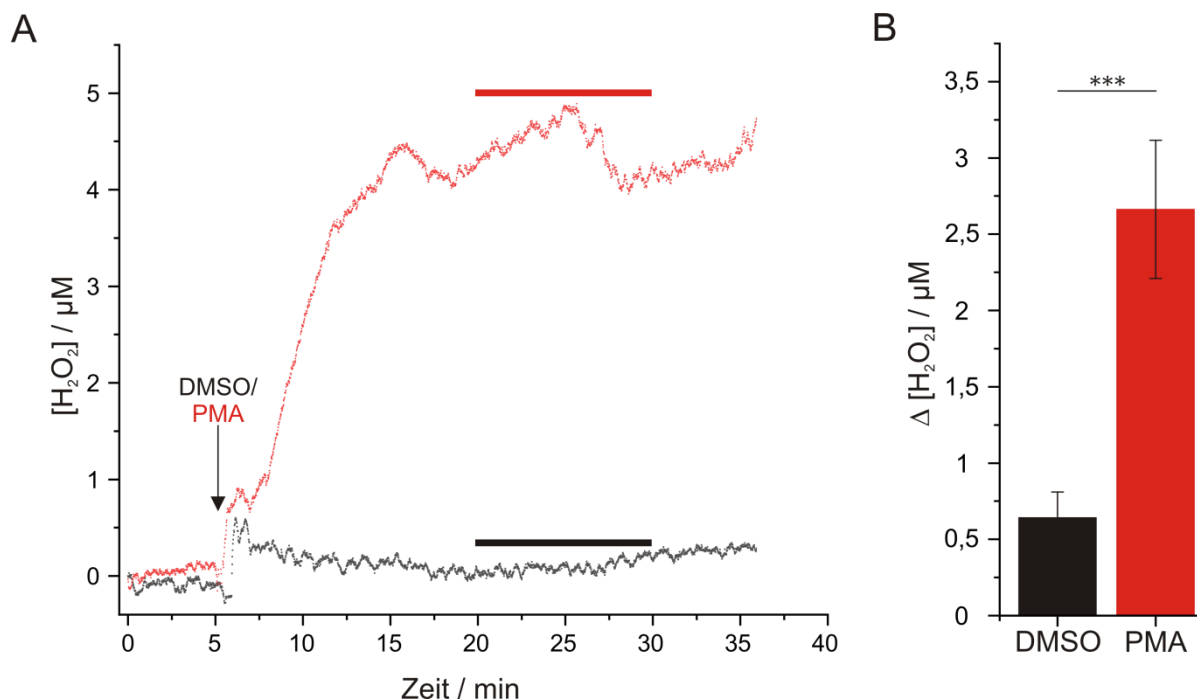


Abbildung 19 - Quantifizierung der H_2O_2 -Produktion einzelner humaner Monozyten (hMZ) nach Stimulierung mit PMA.

Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einen einzelnen hMZ positioniert. A) Verlauf der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ über einem einzelnen hMZ nach Stimulation (Pfeil) mit 1 μM PMA (rote Kurve) oder als Kontrolle das Lösemittel DMSO (0,2% (v/v), schwarze Kurve). Roter bzw. schwarzer Balken zeigen das Zeitfenster, aus dem die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Plateau-Werte jeder Messung gemittelt wurden. B) Mittlere Änderung der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ im Messbereich der Elektrode. $\Delta [\text{H}_2\text{O}_2]$ als Differenz zwischen Basiswert (vor PMA/DMSO Applikation) und Plateau (gemittelte Werte 15-25 min nach Applikation). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose. Jeweils $n = 23$, Mittelwerte \pm SD.

Um zu überprüfen, ob NOX-Enzyme hauptverantwortlich für die H_2O_2 -Produktion von hMZ sind, wurden alle NOX-Enzyme mit dem pan-NOX-Blocker VAS2870 gehemmt. Hierzu wurden primäre hMZ für 30 min bei 37° C mit 20 μM VAS2870 prä-inkubiert, gründlich gewaschen und dann mit 1 μM PMA stimuliert. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt, die ähnliche Ergebnisse erbrachten. Ein typisches Experiment ist in Abbildung 20 A dargestellt (rote Kurve). Unter dieser Behandlung konnte nach PMA-Stimulation kein signifikanter Anstieg des Stromes beobachtet werden, lediglich das DMSO-induzierte elektrochemische Artefakt. Dass VAS2870 nicht mit der chronoamperometrischen Messung interferiert, konnte durch Zugabe eines H_2O_2 -Bolus (5 μM) gezeigt werden, welcher wie zu erwarten eine Erhöhung des Stromes hervorrief. Als Kontrolle wurden hMZ in DMSO (dem Lösemittel von VAS2870, Endkonzentration 0,2 % (v/v)) prä-inkubiert, gewaschen, mit 1 μM PMA stimuliert und gemessen. Ein typisches Experiment ($n = 5$) ist in Abbildung 20 A

dargestellt (schwarze Kurve). Hier zeigte sich der charakteristische Anstieg des Stromsignals nach PMA-Stimulation, wie er von hMZ zu erwarten war (vgl. Abb. 19).

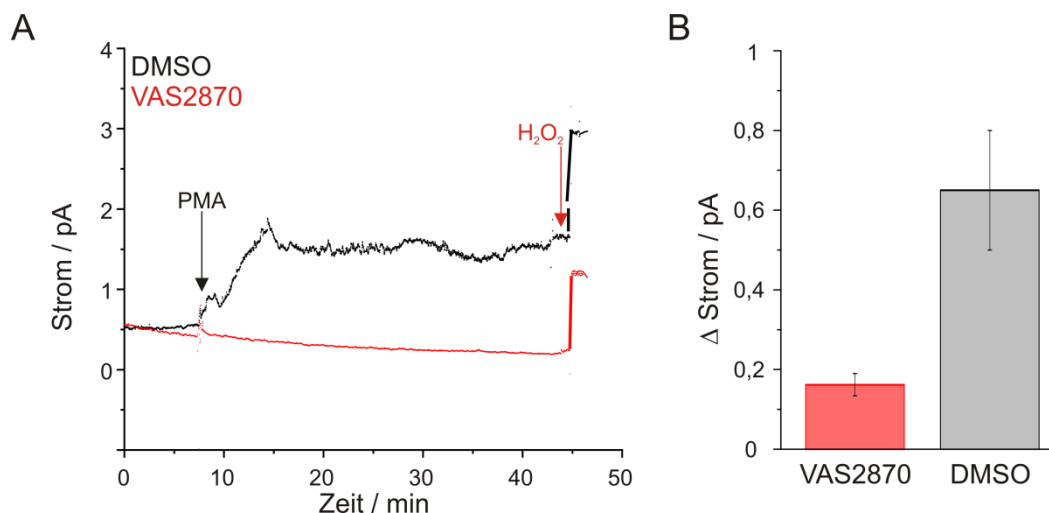


Abbildung 20 - H_2O_2 -Produktion humaner Monozyten (hMZ) nach Hemmen aller NOX-Enzyme mit VAS2870.

Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einen einzelnen hMZ positioniert. A) Stimulation eines hMZ mit 1 μM PMA (schwarzer Pfeil), welcher mit dem pan-NOX-Blocker VAS2870 (20 μM , rote Kurve) oder ein anderer hMZ, der mit DMSO als Kontrolle (0,2 % (v/v), schwarze Kurve) für 30 min vorbehandelt wurde. Am Ende der Messung wurde ein Bolus von 5 μM H_2O_2 appliziert (roter Pfeil). B) Mittlere Änderung des Stromes. Δ Strom als Differenz zwischen Basiswert (vor PMA-Applikation) und Plateau (20 min nach Applikation). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS +5 mM Glucose, jeweils $n = 5$, Mittelwerte \pm SD, Abbildung modifiziert aus Bozem et al., 2018.

In diesem Teil der Arbeit konnte am Beispiel einzelner humaner Monozyten gezeigt werden, wie sich die extrazelluläre $[\text{H}_2\text{O}_2]$ über die Zeit ändert, wenn sie mit PMA stimuliert werden. Mit einem pan-NOX-Blocker ließ sich die Produktion von extrazellulärem H_2O_2 vollständig hemmen.

3.2.2.1 Einfluss der MZ-Präparation auf die H_2O_2 Produktion

Monozyten können mit verschiedenen Methoden aus der Gesamtheit der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) isoliert werden: Zum einen durch eine Isolation über magnetische Kügelchen (*beads*), welche mittels gekoppelter Antikörper alle Zellen, die keine Monozyten sind, binden. So können alle Nicht-Monozyten aus den PBMC entfernt werden. Dadurch erhält man eine Zellpopulation, welche nur aus Monozyten besteht, die während des Isolationsprozesses nicht aktiviert werden

(= negative Isolation, siehe 2.2.2.2). Zum anderen gibt es die Möglichkeit der Adhärenz-Isolation. Bei der Adhärenz-Isolation bedient man sich der Eigenschaft von Monozyten, dass sie, obwohl sie eigentlich als Einzelzellen in Suspension vorliegen und keine Zellverbände bilden, an positiv-geladenen Plastikoberflächen anhaften (= Adhärenz-Isolation, siehe 2.2.2.1). Um zu überprüfen, ob sich die Isolationstechniken auf die H₂O₂-Produktion von Monozyten auswirken, wurden Monozyten aus PBMC desselben Spenders mit beiden Isolationstechniken aufgereinigt. Um einen Einblick zu erhalten, aus welchen Zelltypen sich die isolierten Zellen zusammensetzen, also wie gut die Isolation funktioniert, wurde einen Tag nach der Isolation eine durchflusszytometrische (FACS)-Analyse durchgeführt (Abb. 21).

Bei Bead-Isolationen zeigte die Zellpopulation einen typischen MZ-Phänotyp: ein hohes Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC)-Signal (= große Zellen), hohes Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC)-Signal (= sehr granulare Zellen) und starke Oberflächenexpression von CD45 und CD14 (Marimuthu et al., 2018). Die Bead-Isolation führte zu einer Monozyten-Reinheit von 97,9 %. Adhärenz-isolierte hMZ zeigten ein differenzierteres Bild. Neben einer Subpopulation mit hohem FSC und SSC bei gleichzeitig starker CD14- und CD45-Ausprägung konnten Subpopulationen detektiert werden, welche kleiner (= geringerer FSC), weniger granular (= geringerer SSC), sowie CD45-positiv und CD14-negativ waren. Diese Zellen entsprechen den Charakteristika restlicher PBMC (Iverson et al., 2018). Durch Adhärenz-Isolation konnte eine MZ-Reinheit von 84,8 % erhalten werden, die restlichen Zellen waren weitere, nicht näher charakterisierte PBMC-Subtypen, z. B. T- oder B-Zellen.

Ergebnisse

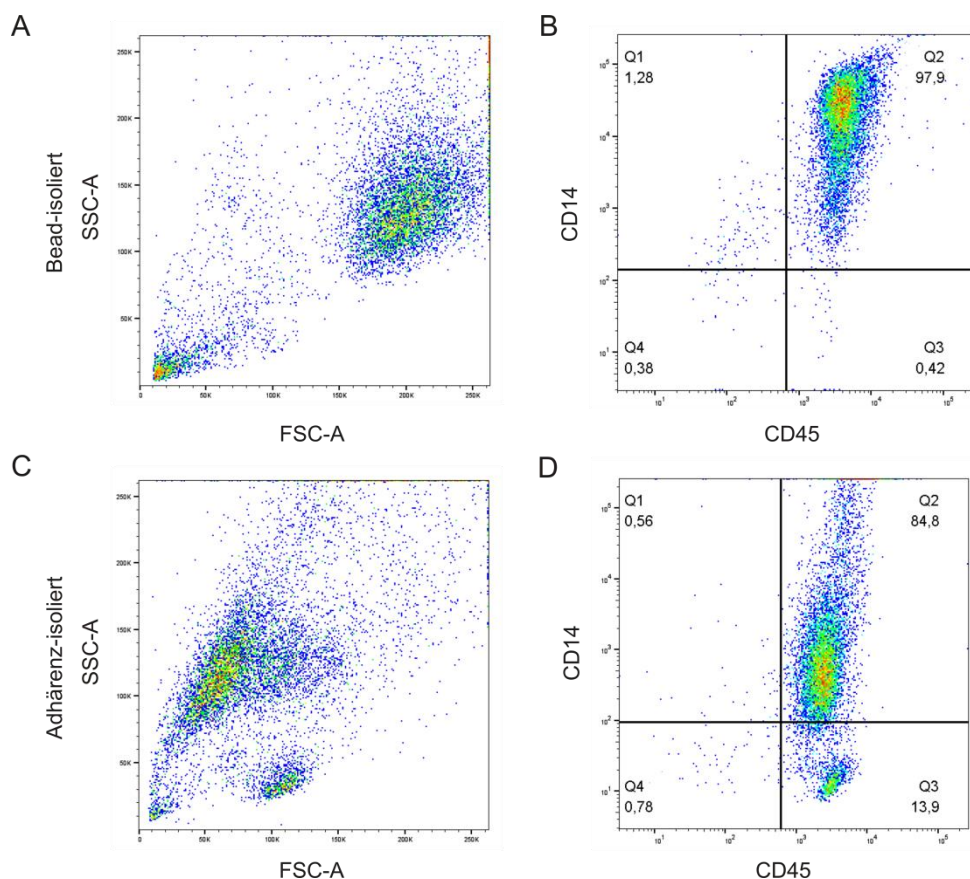


Abbildung 21 - FACS-Analyse von Bead- und Adhärenz-isolierten humanen Monozyten (hMZ).

Darstellung der Größe (FSC) und Granularität (SSC) der A) Bead-isolierten Zellpopulation und der C) Adhärenz-isolierten Zellpopulation. Unterteilung in hMZ ($CD45^+/CD14^+$) und restliche Leukozyten ($CD45^+/CD14^-$) der B) Bead-isolierten Zellpopulation sowie der D) Adhärenz-isolierten Zellpopulation. Die Bead-Isolation führte zu einer hMZ-Reinheit von 97,9 %, die Adhärenz-Isolation zu einer hMZ-Reinheit von 84,8 %.

Von Monozyten beider Isolationsmethoden wurden CA-Experimente zur Bestimmung der PMA-induzierten H_2O_2 -Produktion durchgeführt, analog zu den bereits gezeigten hMZ-Experimenten (wie Abb. 18, 19). Dazu wurden die hMZ mit $1 \mu M$ PMA stimuliert und die Stromantwort bei einem Potential von 650 mV gemessen. Zellen beider Präparationsmethoden zeigten gleiche Messergebnisse, sowohl für die Stromsignale vor Stimulation (Abb. 22 A), als auch in ihrer H_2O_2 -Produktion nach Stimulation mit PMA. Die Zellen verursachten einen Anstieg der $[H_2O_2]$ im Messbereich der UME von $2,4 \pm 0,3 \mu M$ (Abb. 22 B, jeweils $n = 11$). Allerdings ist zu beachten, dass bei CA Experimenten immer nur eine einzelne, subjektiv ausgewählte Zelle gemessen wird. Da die Auswahl der Zelle auf optischen Merkmalen basiert, ist es möglich, auch bei heterogenen Mischpopulationen (wie z. B. Adhärenz-isolierte hMZ) genau die Zellen zu messen, welche optisch dem Zelltyp von

Ergebnisse

Interesse (in diesem Falle einem Monozyten) entsprechen. Das kann von Vorteil sein, wenn man z. B. eine Minderheitspopulation eines heterogenen Zellgemischs messen möchte und sich eine relevante Zelle für die Messung aussuchen kann. Allerdings muss man sich der Subjektivität dieser Auswahlmethode bewusst sein.

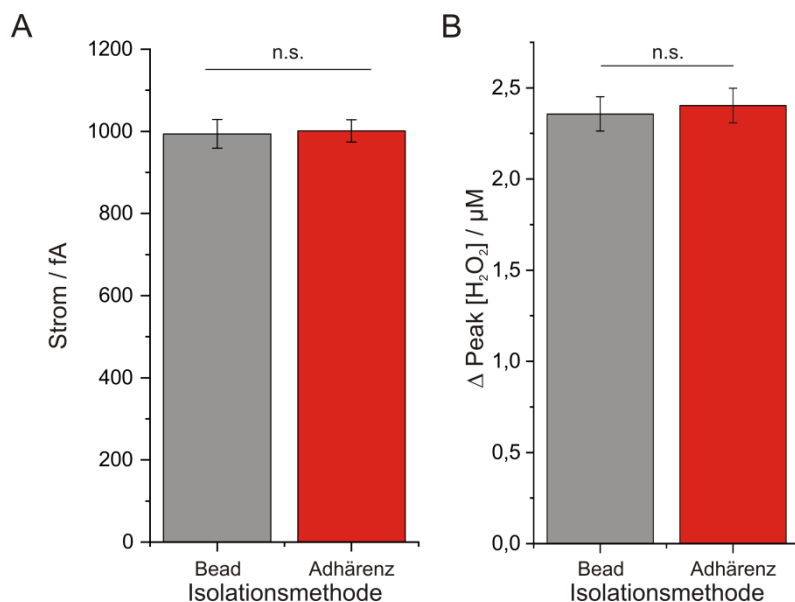


Abbildung 22 - Einfluss der Isolationsmethode von humanen Monozyten (hMZ) auf chronoamperometrische Messungen von H₂O₂.

H₂O₂-Produktion eines hMZ nach Stimulierung mit 1 μM PMA, nach Bead- oder Adhärenz-Isolation A) Mittleres Stromsignal über dem MZ vor Stimulation B) Mittlere Veränderung der [H₂O₂] im Messbereich der Elektrode. Δ [H₂O₂] als Differenz zwischen Signal vor PMA-Applikation und Plateau (20 min nach Applikation). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in PBS, jeweils n = 11, Mittelwerte ±SD.

3.2.2.2 Einflüsse von Erythrozytenlyse und Fibronektin auf die H₂O₂-Produktion eines humanen Monozyten

hMZ sind während der Aufreinigung und Messung Substanzen ausgesetzt, welche ihre Handhabung während der Experimente vereinfachen, aber nicht unbedingt relevant für diese sind. Bei der Aufreinigung der PBMC benutzt man Erythrozytenlysepuffer (siehe 2.2.1), um Erythrozyten zu zerstören und die PBMC-Präparation zu verbessern. Außerdem wurden die Messschälchen für elektrochemische Messungen mit MZ mit Fibronektin beschichtet, um die Haftung der MZ an die Glasoberfläche der Schälchen zu verbessern. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Einsatz dieser Verfahren Einflüsse auf die H₂O₂-Produktion von hMZ haben. Dazu wurde die Produktion von H₂O₂ von primären hMZ nach Stimulation mit 1 μM PMA untersucht. hMZ wurden gemessen, die in Messschälchen mit und ohne

Ergebnisse

Fibronektin ausgesät waren. Außerdem wurden hMZ gemessen, welche aus PBMC desselben Spenders isoliert wurden, wobei die PBMC-Aufreinigung entweder mit oder ohne Erythrozytenlyse durchgeführt wurde. Weder das Beschichten der Schälchen mit Fibronektin (Abb. 23 A) noch die Erythrozytenlyse (Abb. 23 C) führte zu einem Unterschied im Stromsignal vor Stimulation der hMZ. Die H_2O_2 -Produktion nach PMA-Stimulierung wies ebenso keinen Unterschied auf, ohne Fibronektin-Beschichtung betrug sie $2,31 \pm 0,33 \mu\text{M}$, bei Fibronektin-beschichteten Schälchen $2,3 \pm 0,34 \mu\text{M}$ (Abb. 23 B, jeweils $n = 6$). Auch die Erythrozytenlyse während der Präparation hatte keinen Einfluss auf die H_2O_2 -Bildung von hMZ nach PMA-Stimulierung, sie betrug $2,69 \pm 0,19 \mu\text{M}$ (ohne Lyse) bzw. $2,72 \pm 0,18 \mu\text{M}$ (mit Lyse; Abb. 23 D, jeweils $n = 6$).

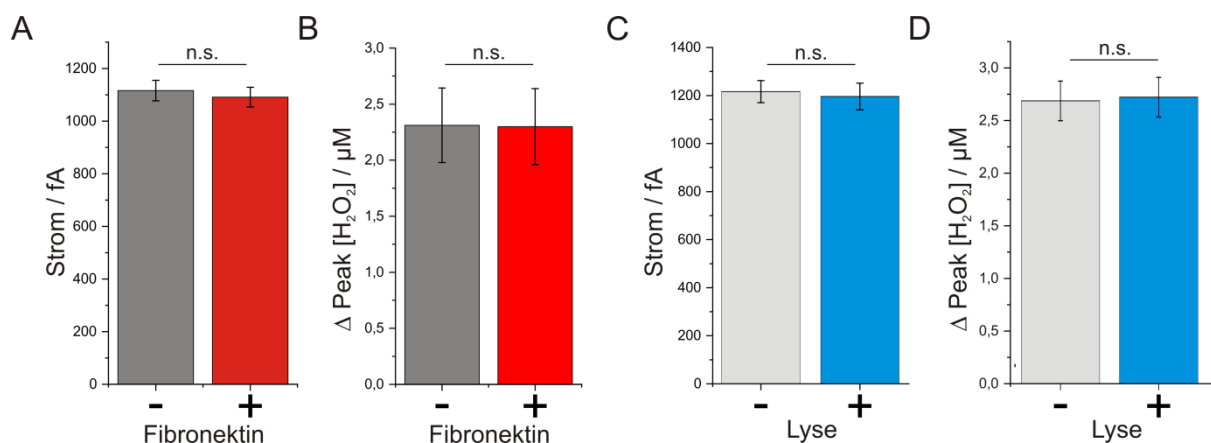


Abbildung 23 - Einflüsse von Fibronektin und Erythrozytenlyse auf chronoamperometrische Messungen der H_2O_2 -Produktion von humanen Monozyten (hMZ)

H_2O_2 -Produktion eines hMZ nach Stimulierung mit $1 \mu\text{M}$ PMA, A+B) in Messschälchen mit (+) und ohne (-) Fibronektin oder C+D) mit (+) oder ohne (-) Erythrozytenlyse während der PBMC-Aufreinigung A+C) Mittleres Stromsignal über dem hMZ vor Stimulation B+D) Mittlere Veränderung der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ im Messbereich der Elektrode nach Stimulation. $\Delta [\text{H}_2\text{O}_2]$ als Differenz zwischen Signal vor PMA-Applikation und Plateau (20 min nach Applikation). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose, jeweils $n = 6$, Mittelwerte \pm SD.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PMA-stimulierte H_2O_2 -Produktion von hMZ weder durch die Erythrozytenlyse während der PBMC-Isolation, noch durch die Isolationsmethode beeinflusst wird. Eine Vorbehandlung der Messschälchen mit Fibronektin sorgt zwar für ein besseres Anhaften der Zellen auf den Boden des Messschälchens, wirkt sich aber

ebenfalls nicht auf die H_2O_2 -Produktion von hMZ aus. Allerdings ist zu beachten, dass mit den beiden gezeigten Isolationsmethoden für hMZ unterschiedliche MZ-Reinheiten erreicht werden, was bei Methoden, welche nicht an Einzelzellen messen, berücksichtigt werden muss.

3.2.2.3 Räumliche Verteilung von extrazellulär gebildetem H_2O_2

Da H_2O_2 auch in der interzellulären Kommunikation eine Rolle spielt, ist die räumliche Verteilung von H_2O_2 um eine Zelle herum von Interesse. Durch Produktion und Eliminierung von H_2O_2 kann eine einzelne Zelle so einen Einfluss auf benachbarte Zellen haben. Durch ein Abrastern (= Scannen) einer Zelle (= *scanning electrochemical microscopy*, SECM-Messung) kann ein 3D-Profil der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ um einen einzelnen primären humanen MZ erstellt werden. Dazu wurde die UME auf eine konstante Höhe (10-12 μm) über einem einzelnen, primärem hMZ fixiert und der Probenstisch mit dem Messschälchen nach einem eingestellten Protokoll in x- und y-Richtung bewegt. In Abbildung 24 sind mehrere Scans eines solchen Experimentes dargestellt. Die Scans wurden nacheinander erstellt und zeigen die räumliche Verteilung von H_2O_2 um einen einzelnen hMZ nach Stimulation mit 1 μM PMA. Das vom hMZ produzierte H_2O_2 war kreisförmig um die Zelle verteilt, was auf eine gleichmäßige Produktion über die gesamte Zellmembran schließen lässt. Die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ um den Monozyten stieg von $< 0,5 \mu\text{M}$ vor PMA-Applikation (direkt über dem hMZ, Abb. 24 B) auf 2 μM , 5 min nach Stimulierung mit PMA (Abb. 24 C). 20 min nach PMA-Zugabe konnten Konzentrationen von $> 3 \mu\text{M}$ gemessen werden. Ausgehend von der Zelle war ein deutlicher H_2O_2 -Konzentrationsgradient zu erkennen, wobei noch in 20 μm Abstand zur Zelle eine messbare $[\text{H}_2\text{O}_2]$ nachgewiesen werden konnte (Abb. 24 D). Somit ist denkbar, dass von einem einzelnen MZ produziertes H_2O_2 benachbarte, weiter entfernte Zellen beeinflussen kann.

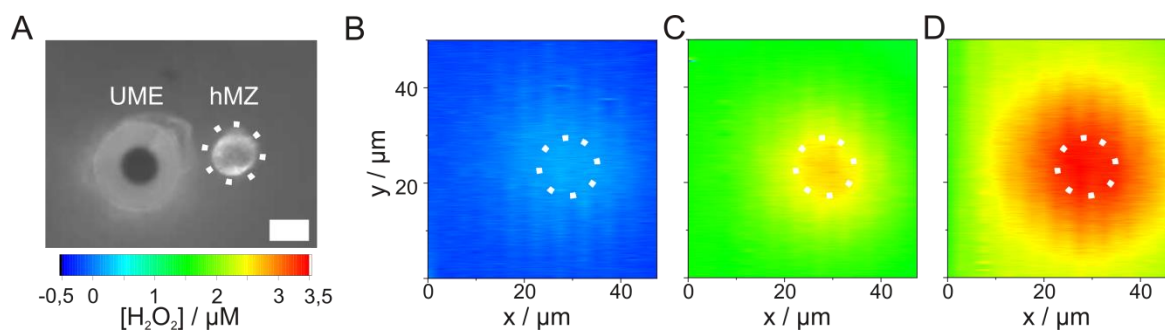


Abbildung 24 - 2D-Scan der $[H_2O_2]$ um einen humanen Monozyten (hMZ) vor und nach PMA-Stimulation.

A) Durchlichtmikroskopie-Bild der Pt-Ultramikroelektrode (UME) sowie des gemessenen hMZ (die gepunktete Linie zeigt dessen Umriss). Referenzbalken = 10 μm . B, C, D) Drei aufeinanderfolgende Scans des in A) dargestellten hMZ vor, bzw. nach PMA-Stimulation (1 μM) B) direkt vor PMA-Applikation, C) 5 min nach Stimulierung und D) 20 min nach Stimulierung. Messung im *Constant-Height*-Modus, Scan-Geschwindigkeit $x = 2 \mu m/s$, x-Abstand 50 nm pro Datenpunkt; y-Abstand = 2 μm pro Datenpunkt. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose.

3.2.2.4 Dekonvolution amperometrischer SECM-Messungen

Ein Problem der SECM ist, dass durch die Bewegung der Elektrode mehrere Vorgänge an ihrer Oberfläche stattfinden, welche die Messung beeinflussen. So führt eine Bewegung der Elektrode zu einer Kapazitätsänderung und damit zu einer Änderung der elektrochemischen Doppelschicht. Dadurch kommt es zu einem kapazitiven Strom, der den faradayschen Strom des Analyten maskiert und so zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt, da sich das Rauschen (kapazitiver Strom) erhöht, das Signal (faradayscher Strom) jedoch gleichbleibt. Außerdem muss die Elektrode nach jeder Bewegung an eine neue Position für kurze Zeit ruhig stehen, um die Diffusion des Analyten zur Elektrodenoberfläche und die Herstellung des Fließgleichgewichts zu gewährleisten. Dieses Fließgleichgewicht kann über die *Cottrell*-Gleichung dargestellt werden (siehe 1.3.5). Ein zu kurzes Verweilen an einem Punkt (also ein schnelles Scannen) führt dazu, dass die Messung verzerrt dargestellt wird, da das Rauschen erhöht wird und kein Fließgleichgewicht des Analyten an der Elektrodenoberfläche eintritt. An jedem Messpunkt wird das Signal also leicht verzögert dargestellt und wird vom Signal des jeweils vorherigen Messpunktes beeinflusst. Dieses „Hinterher-Schleifen“ des Signals ist in Abbildung 25 A schematisch dargestellt und im Experiment (Abb. 25 D) gut erkennbar. Langsames Scannen verringert zwar das Rauschen an jedem Punkt, führt allerdings dazu, dass die Datenpunkte der jeweiligen x-y-Koordinaten zeitlich weit auseinanderliegen. Dadurch entsteht ein zeitlich asynchrones Gesamtbild, was bei

dynamischen Messungen von Nachteil ist, bei denen sich die Konzentration des Analyten mit der Zeit ändert (z. B. bei H_2O_2 -Messungen um eine Zelle). Für potentiometrische SECM-Messungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Dekonvolution, also eine mathematische Transformation des verzerrten Bildes in seinen eigentlichen „Ist-Zustand“ und somit eine verbesserte Auflösung bei höheren Scan-Geschwindigkeiten möglich ist (Kiss & Nagy, 2015). Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob eine Dekonvolution auch für amperometrische SECM-Messungen angewendet werden kann und eine Verbesserung der Darstellung liefert.

Dazu wurde die Topografie eines Pt-Drahtes (\varnothing 10 μm) mittels 2D-Scan im positiven *Feedback*-Modus bestimmt, wobei die UME auf einer konstanten Höhe gehalten wurde. Scannt man über eine leitende Oberfläche (in diesem Fall den Pt-Draht), kommt es zum *Redox-Cycling* und dadurch zu einer Erhöhung des Stromes. Je näher die UME der leitenden Oberfläche ist, desto höher der Strom. So kann vom Stromprofil auf die Geometrie der gescannten Oberfläche geschlossen werden. Die UME wurde 15 μm über dem Boden des Messschälchens positioniert, auf dem der Pt-Draht (\varnothing 10 μm) lag. Als Redox-Mediator diente 1 mM Ferrocenmethanol in 100 mM KCl. In Abbildung 25 B ist das Prinzip der Messung dargestellt. Es wurde im alternierenden Modus gescannt, d. h. es wurde die erste y-Reihe von links nach rechts, die zweite y-Reihe von rechts nach links, die nächste wieder von links nach rechts und immer weiter abwechselnd gescannt (schematisch in Abb. 25 D eingezeichnet). Bei einer Scangeschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ konnte ein verzerrtes Topografieprofil des gescannten Pt-Drahtes dargestellt werden (Abb. 25 D). Über eine Wiener-Dekonvolution, welche das Rauschen über die mittlere quadratische Abweichung der Datenpunkte korrigiert, d. h. das beobachtete „Schleifen“ durch das Signal der vorherigen Datenpunkte herausrechnet (Wiener, 1949), konnte das Bildrauschen verringert werden. Das mit der mathematischen Dekonvolution errechnete Topografieprofil entspricht der dem Durchlichtbild nach zu erwartenden Form des Drahtes (Abb. 25 C+E). Das verwendete Dekonvolutions-Programm befindet sich im Anhang (5.4).

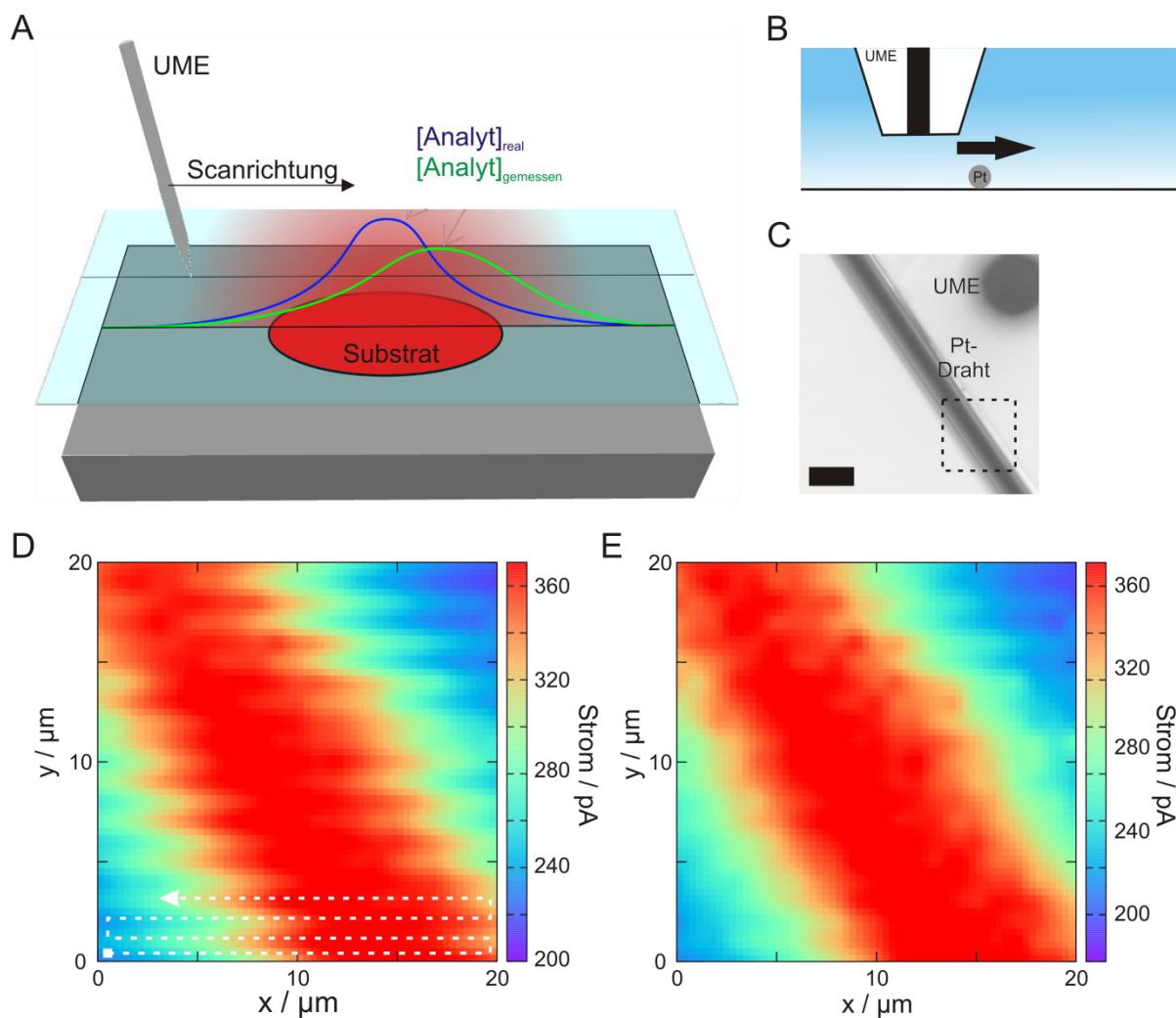


Abbildung 25 - Dekonvolution amperometrischer SECM-Messungen.

A) Schematische Darstellung des „Hinterher-Schleifen“ des Signals bei zu schnellen Scangeschwindigkeiten. Durch zu schnelles Scannen wird an der neuen Position der Ultramikroelektrode (UME) kein Fließgleichgewicht des Analyten erreicht und das „reale“ Signal (blaue Kurve) wird leicht verzögert gemessen (grüne Kurve). B) Veranschaulichung des Experimentdesigns. Eine Pt-UME scannt im *Constant-Height*-Modus über einen Pt-Draht (\varnothing 10 μm), der am Boden des Messschälchens liegt. Als Redox-Mediator wurde 1 mM Ferrocenmethanol in 100 mM KCl verwendet. C) Durchlichtmikroskopie-Bild des gescannten Pt-Drahts und der UME. Gestrichelter Kasten zeigt den Scan-Bereich in D. Balken = 10 μm . D) SECM-Messung des in C) abgebildeten Pt-Drahts im *Constant-Height*-Modus., Scan-Geschwindigkeit $x = 10 \mu\text{m/s}$, x -Abstand = 50 nm pro Datenpunkt; y -Abstand = 2 μm pro Datenpunkt; alternierender Modus (Scan-Verlauf als gestrichelte Linie eingezeichnet); unkomprimierte Rohdaten. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 400 mV. E) SECM-Bild nach Wiener-Dekonvolution, welche das Rauschen über die mittlere quadratische Abweichung der Datenpunkte korrigiert. Daten, Grafiken und Dekonvolutions-Programm erstellt in Zusammenarbeit mit Dr. András Kiss, University of Pécs, Ungarn.

In diesem Teil der Arbeit wurden SECM-Experimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass von hMZ produziertes H_2O_2 in einem kreisförmigen Konzentrationsgradienten um die Zelle messbar ist. Potentiell können hMZ so einen Einfluss auf benachbarte Zellen haben. Des Weiteren konnte über eine mathematische Dekonvolution die Verzerrung in der Bilddarstellung von amperometrischen SECM-Scans verringert werden.

3.2.3 H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung von Maus-Monozyten in Abhängigkeit vom Lebensalter

Das Lebensalter hat einen gravierenden Einfluss auf die Funktion des Immunsystems, so ist z. B. die Funktion reifer Lymphozyten in sekundären Lymphorganen vermindert (z. B. Weyand & Goronzy, 2016). Auch MZ verändern sich in Abhängigkeit des Lebensalters, sie zeigen z. B. eine unterschiedliche Verteilung der Subtypen (Metcalf et al., 2016; Seidler et al., 2010) und veränderte Oberflächenprotein- und Rezeptor-Expressionen (Seidler et al., 2010). Aus diesem Grund ist eine Charakterisierung der Fähigkeit von Maus-Monozyten (mMZ) verschiedener Altersstufen, H_2O_2 zu bilden und zu eliminieren von Interesse.

Monozyten wurden aus adulten (= 16-22 Wochen alten, fortan als Altersstufe I, AS-I bezeichnet) und aus gealterten (= 80-102 Wochen alten, fortan als AS-II bezeichnet) Mäusen (C57BL/6J) isoliert. Dies entspricht in etwa einem Menschenalter von 20-30 (AS-I) bzw. 60-70 (AS-II) Jahren (Fox et al., 2007). Um die H_2O_2 -Produktion eines einzelnen mMZ chronoamperometrisch zu untersuchen, wurde die Zelle mit 1 μM PMA stimuliert. Das Plateau der $[\text{H}_2\text{O}_2]$, gemittelt über 15-20 min (300 Datenpunkte) nach PMA-Stimulierung wurde analysiert (Abb. 26 B). AS-I mMZ zeigten eine durchschnittliche maximale $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Änderung von $1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$, AS-II mMZ eine durchschnittliche $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Änderung von $3,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (Abb. 26 C, N = 3, n = 9). Im weiteren Versuchs-Verlauf wurden diese mMZ dann mit 10 μM H_2O_2 behandelt, um die Eliminierung von extrazellulärem H_2O_2 durch z. B. externe Katalasen sowie die Aufnahme von H_2O_2 in die Zelle zu untersuchen. Dazu wurde die Differenz zwischen der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ direkt nach der Zugabe des 10 μM H_2O_2 -Bolus (gemittelt über 2 min, 120 Datenpunkte) und 30 min später (gemittelt über 2 min, 120 Datenpunkte) berechnet. Die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ verringerte sich bei AS-I mMZ um $8 \pm 2 \mu\text{M}$, bei AS-II mMZ um $8 \pm 1,5 \mu\text{M}$ (Abb. 26 D). Dass H_2O_2 in diesen Konzentrationen in dem von uns verwendeten Messpuffer chemisch stabil ist und die Abnahme der Konzentration auf die Zellen

Ergebnisse

zurückzuführen ist, konnte durch unsere Arbeitsgruppe im Vorfeld bereits gezeigt werden (Bozem et al., 2018). mMZ aus AS-II tendieren also dazu, mehr H_2O_2 zu produzieren als mMZ aus AS-I, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Bei der Eliminierung konnte kein Unterschied festgestellt werden.

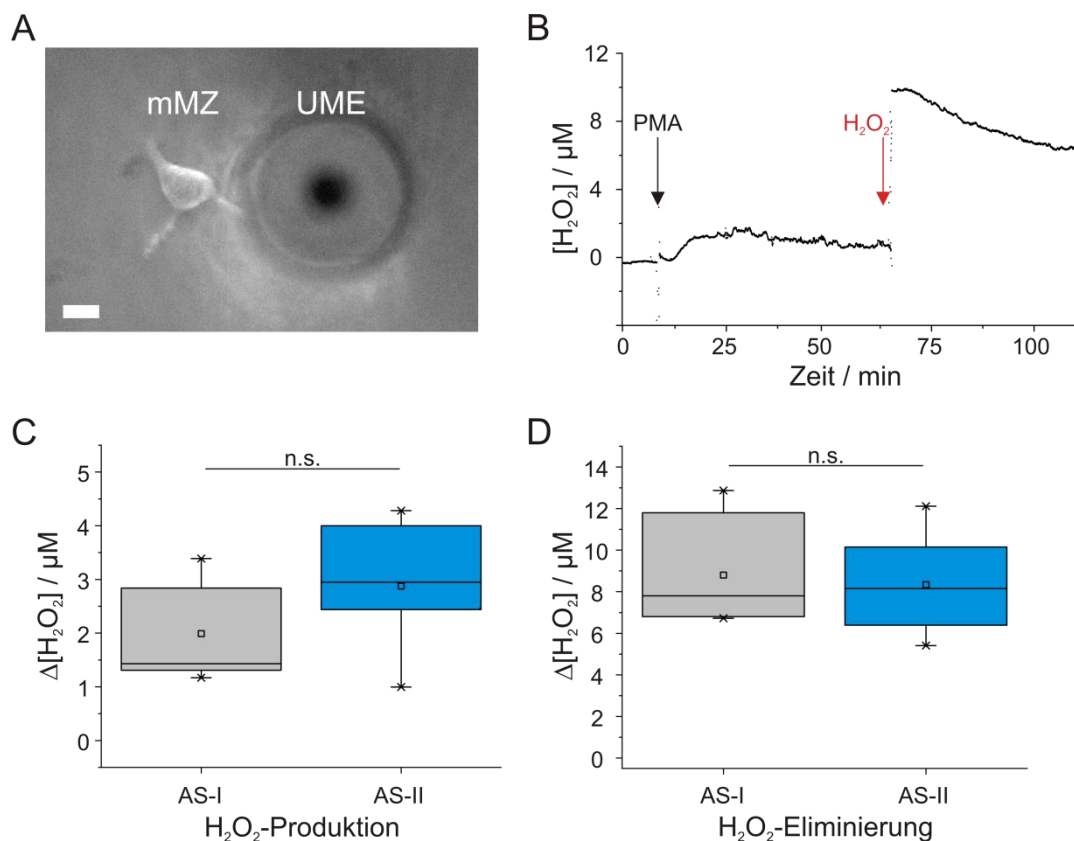


Abbildung 26 - Einfluss des Lebensalters der Maus auf die H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung muriner Monozyten (mMZ) – elektrochemische Messungen.

Eine Pt-Ultramikroelektrode (UME) wurde 10-12 μm über einem einzelnen mMZ positioniert. A) Durchlichtmikroskopie-Bild eines repräsentativen mMZ sowie der UME. Balken = 10 μm . B) Repräsentativer Verlauf der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ über einem einzelnen mMZ nach Stimulation mit 1 μM PMA (schwarzer Pfeil) und anschließender Gabe von 10 μM H_2O_2 (roter Pfeil). C) Mittlere Zunahme der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ nach Stimulation eines mMZ mit PMA. Vergleich zwischen mMZ aus 16-22 Wochen alten (AS-I) und 80-102 Wochen alten (AS-II) Mäusen. $\Delta [\text{H}_2\text{O}_2]$ = Differenz zwischen Wert vor PMA-Applikation und Plateau (30 min nach Applikation, gemittelt über jeweils 300 Datenpunkte (5 min)). D) Mittlere Abnahme der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ im Messbereich der Elektrode nach Applikation von H_2O_2 . Vergleich zwischen mMZ aus 16-22 Wochen alten (AS-I) und 80-102 Wochen alten (AS-II) Mäusen. $\Delta [\text{H}_2\text{O}_2]$ = Differenz zwischen der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ direkt nach der Zugabe des 10 μM H_2O_2 -Bolus und 30 min später, gemittelt über jeweils 120 Datenpunkte (2 min). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose. Jeweils N = 3 und n = 9. Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, 25-Median-75% Interquartilen dar.

Ergebnisse

Zusätzlich zu den elektrochemischen Messungen wurde ein modifizierter Amplex UltraRed-Assay verwendet, um die Änderung der relativen extrazellulären H_2O_2 -Konzentration von mMZ-Populationen zu messen. Dieser Assay basiert auf einer Umwandlung des nichtfluoreszierenden Amplex Ultra Red zu fluoreszierendem Resorufin durch Meerrettichperoxidase und H_2O_2 in einer 1:1 Stöchiometrie, wobei die Änderung der Fluoreszenz detektiert wird. Zu beachten ist hierbei, dass pro Datenpunkt eine Zellsuspension mit 25000 Zellen gemessen wurde, im Gegensatz zu den elektrochemischen Messungen auf Einzelzellebene. Außerdem ist keine Quantifizierung der H_2O_2 -Menge möglich. Eine exemplarische Messung ist in Abbildung 27 A dargestellt. mMZ wurden mit 1 μM PMA stimuliert (schwarzer Pfeil) und im weiteren Verlauf mit 10 μM H_2O_2 behandelt (roter Pfeil). Um den Assay auf H_2O_2 -Selektivität zu testen, wurde vor dem letzten Messpunkt 100 U/ml Katalase zur Messlösung zugegeben (grüner Pfeil). Das führte dazu, dass das Amplex-Signal auf den Wert des Hintergrundsignals absank, bestätigte also die Selektivität des Assays. Die H_2O_2 -Produktion wurde aus der Differenz des Amplex-Fluoreszenzsignals nach Erreichen des Plateaus (bei 40 min, d. h. 30 min nach PMA-Stimulierung) und des Hintergrundsignals berechnet. Die relative H_2O_2 Produktion nach PMA-Stimulierung war bei mMZ aus AS-II im Vergleich zu mMZ aus AS-I leicht, allerdings nicht signifikant erhöht (Abb. 27 B). Die H_2O_2 -Eliminierung wurde als Differenz zwischen dem Signal direkt nach H_2O_2 -Gabe ($t = 70$ min) und 30 min später ($t = 100$ min) errechnet. Bei der Eliminierung konnte kein Unterschied zwischen den mMZ beider Altersstufen der Mäuse festgestellt werden (Abb. 27 C). Diese Ergebnisse validieren somit qualitativ die chronoamperometrischen Messungen.

Ergebnisse

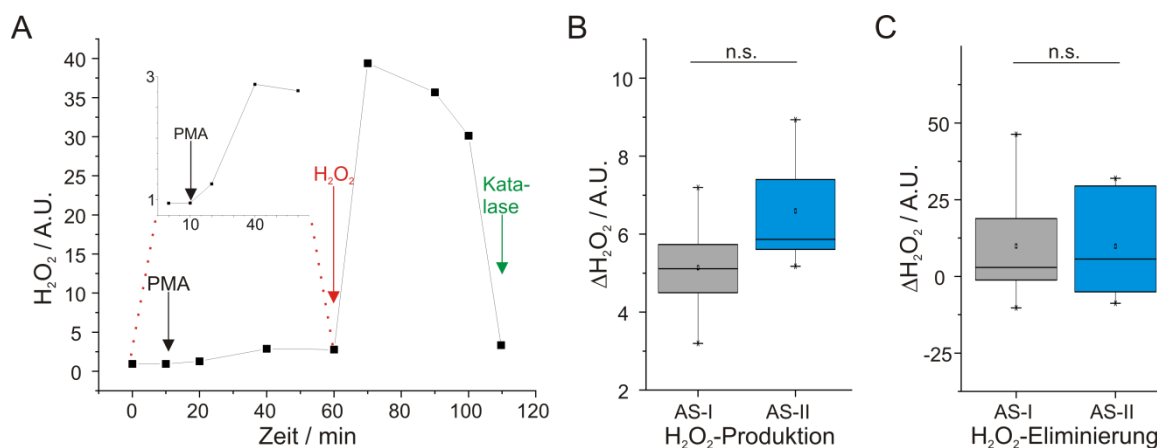


Abbildung 27 - Einfluss des Lebensalters auf die H_2O_2 -Produktion und -Eliminierung muriner Monozyten (mMZ) – Amplex UltraRed-Messungen.

A) Repräsentativer Verlauf des H_2O_2 -Signals einer mMZ-Population (25000 Zellen pro Messpunkt) nach Stimulation mit $1 \mu M$ PMA (schwarzer Pfeil) und anschließender Gabe von $10 \mu M$ H_2O_2 (roter Pfeil). Amplex UltraRed-Experimente wurden durch Zugabe von Katalase (100 U/ml; grüner Pfeil) beendet um den Assay auf H_2O_2 -Selektivität zu testen. Inlay zeigt die Zeitpunkte von 0 - 60 Minuten in höherer Auflösung. B) Mittlere, relative Zunahme an H_2O_2 nach Stimulation mit PMA. Vergleich zwischen mMZ aus 16-22 Wochen alten (AS-I) und 80-102 Wochen alten (AS-II) Mäusen. $\Delta [H_2O_2]$ = Differenz zwischen Wert vor PMA-Applikation und Plateau (30 min nach Applikation). C) Mittlere Abnahme des H_2O_2 -Signals nach Applikation von H_2O_2 . Vergleich zwischen mMZ aus 16-22 Wochen alten (AS-I) und 80-102 Wochen alten (AS-II) Mäusen. $\Delta [H_2O_2]$ = Differenz zwischen Wert direkt nach H_2O_2 -Gabe und 30 min später. Jeweils $N = 3$ und $n = 9$. Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, 25-Median-75% Interquartilen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Lebensalters von Mäusen auf die Fähigkeit ihrer Monozyten, H_2O_2 zu produzieren und zu eliminieren, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PMA-stimulierte Monozyten älterer Mäuse dazu tendieren, mehr H_2O_2 zu produzieren als MZ aus jüngeren Mäusen. Bei der Eliminierung konnte kein Unterschied festgestellt werden. Zusammenfassend zeigt das komplette Kapitel 3.2 die Etablierung und Anwendung elektrochemischer Messungen von H_2O_2 auf Einzelzellebene sowie deren Quantifizierung. Selektive, sensitive Messungen in Echtzeit liefern reproduzierbare H_2O_2 -Messungen an einzelnen Zellen verschiedener Spezies, welche über alternative Messmethoden validiert werden konnten.

3.3 Kombinierte elektrochemische und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen an Einzelzellen

Bis dato angewendete Methoden zur Messung von H_2O_2 ließen eine Bestimmung entweder extrazellulär (z. B. ESR-Spektroskopie, Amplex UltraRed-Assays, Elektrochemie) oder intrazellulär (z. B. Fluoreszenzsensoren, Elektrochemie) zu, jedoch nicht simultan intra- und extrazellulär. Durch Kombination von elektrochemischen Messungen (SECM) außerhalb der Zelle mit Fluoreszenzmikroskopie (FM), um innerhalb der Zelle zu messen, ist eine kombinierte Messung intra- und extrazellulärer Parameter möglich, hier als SECM-FM bezeichnet. Zur Kombination von SECM mit FM sind nur wenige Studien verfügbar (z. B. Guerret-Legras et al., 2019; Kaya et al., 2003; Matsumae et al., 2013; Salamifar & Lai, 2015), daher soll im folgenden Teil die Kombination elektrochemischer mit Fluoreszenzmikroskopie-Messungen von H_2O_2 vorgestellt werden. Ein wichtiger Punkt der Messungen mit Fluoreszenzsensoren, der zu beachten ist, ist, dass die Fluoreszenzwerte nur eine Auskunft über die relativen H_2O_2 -Verhältnisse in einer transfizierten Zelle geben. Zum einen existiert ein H_2O_2 -Gradient über die Plasmamembran, der zwischen 7:1 und 650:1 (extra- : intrazellulär) in der Literatur beschrieben ist (Antunes & Cadenas, 2000; Huang & Sikes, 2014), zum anderen oxidiert intrazelluläres H_2O_2 nicht nur den Sensor, sondern auch viele andere Zellbestandteile, vor allem dedizierte Redox-Mediatoren wie Glutaredoxine oder Peroxiredoxine. Intrazelluläre H_2O_2 -Sensoren „konkurrieren“ sozusagen mit den Zell-eigenen Interaktionsmechanismen. Einen Ansatz, durch mathematische Berechnungen die Fluoreszenzsignale des H_2O_2 -Fluoreszenzsensors HyPer-3 zu H_2O_2 -Konzentrationen umzurechnen, haben Huang & Sikes 2014 veröffentlicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, durch Versuche an permeabilisierten Zellen die Zellmembran durchlässig für H_2O_2 zu machen und somit Messungen mit gleicher $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in- und außerhalb der Zelle zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser Messungen sollten die Sensoren experimentell kalibriert werden. Unglücklicherweise konnte in unseren Experimenten weder eine Permeabilisierung mit den dafür benutzten Chemikalien Amphotericin B, Streptolysin O, Perforin, Paraformaldehyd, Saponin, Triton-X, Tween, Digitonin, DMSO oder eine Änderung des osmotischen Drucks (alle in vielen verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten) eine Aufhebung des H_2O_2 -Gradienten herbeiführen, ohne dass die Zelle nach wenigen Minuten starb. Außerdem interagierten z.B. Streptolysin O oder Amphotericin mit H_2O_2 , da sie zur Gruppe der Thiol-aktivierten Toxine gehören (Palmer, 2001). Daher konnte keine

Kalibrierung der intrazellulären H_2O_2 -Sensoren (z. B. HyOer-3) durchgeführt werden. Alle in dieser Arbeit angegebenen intrazellulären H_2O_2 -Werte sind immer nur relativ zu den Werten von Kontrollen, bzw. Werten vor jeweiliger Stimulation.

3.3.1 SECM-FM mit HyPer als intrazellulärem H_2O_2 -Sensor

Um eine simultane Messung von intrazellulärem und extrazellulärem H_2O_2 durchzuführen, wurde der intrazelluläre H_2O_2 Sensor HyPer-3 benutzt. HyPer-3 ist ein Fusionsprotein aus dem Fluorophor cpYFP und der regulatorischen Domäne des *E. coli*-Proteins oxyR, welches ein H_2O_2 -sensitives Protein ist. Der Sensor basiert auf einer Spektralverschiebung der Absorption nach seiner Oxidation durch H_2O_2 . Im reduzierten Zustand hat HyPer zwei Exzitations-Maxima bei 420 und 500 nm, sowie ein Emissionsmaximum bei 516 nm. Nach Oxidation durch H_2O_2 wird der Exzitationspeak bei 420 nm verringert, während der Exzitationspeak bei 500 nm proportional zunimmt. Diese Oxidation ist H_2O_2 -exklusiv, d.h. HyPer-3 kann nicht von anderen ROS oder Oxidantien oxidiert werden. Außerdem ist die Reaktion reversibel, es können also die dynamischen Veränderungen der intrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ratiometrisch verfolgt werden (Bilan et al., 2013).

Um die Eigenschaften des Fluoreszenzsensors sowie dessen Dynamik zu bestimmen, wurde eine mit *HyPer-3* transfizierte HEK-293-Zelle mit H_2O_2 in aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Die Änderung der intrazellulären Fluoreszenz des Sensors (HyPer-Ratio (F_{500}/F_{420})) wurden verfolgt; gleichzeitig wurde mit einer Pt-UME (\varnothing 10 μm) der Strom bei 650 mV über derselben Zelle chronoamperometrisch gemessen (Abb. 28). H_2O_2 wurde in aufsteigenden Konzentrationen appliziert, die Zeitpunkte, finalen $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in der Messlösung sowie die Strom- als auch Fluoreszenzwerte des Sensors sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tabelle 14 – Charakterisierung von HyPer-3 in HEK-293-Zellen

Zeitpunkte, finale $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in der Messlösung sowie danach resultierende Stromsignale der chronoamperometrischen Messung mit einer Pt-UME und Fluoreszenzsignale (HyPer-Ratio (F_{500}/F_{420})) des Sensors nach Applikation aufsteigender Konzentrationen von H_2O_2 zur Messlösung.

Zeit / min	0	10	20	30	40	60	100
$[\text{H}_2\text{O}_2]$ / μM	0	5	10	20	30	80	180
Strom / pA	2,6	4,2	5,2	6,3	7,3	13,7	27,4
HyPer-Ratio (F_{500}/F_{420})	1,01	1,04	1,23	1,57	2,04	5,36	5,68

Ergebnisse

Auffällig war, dass das extrazelluläre (Strom-)Signal nach Zugabe von H_2O_2 schnell auf ein Plateau anstieg, während das intrazelluläre (Fluoreszenz-)Signal erst nach einiger Zeit ein stabiles Plateau erreichte. Dies entsprach unseren Erwartungen, da H_2O_2 erst die Zellmembran passieren muss um mit dem Sensor innerhalb der Zelle interagieren zu können. Anzumerken ist das „Überschießen“ des extrazellulären H_2O_2 -Signals bei Zugabe von H_2O_2 zu einer Endkonzentration von $180 \mu\text{M}$ ($t = 100 \text{ min}$). Dieses Überschießen und langsame Einpendeln des Stroms auf ein Plateau konnte immer bei Zugaben großer Mengen H_2O_2 beobachtet werden. Außerdem konnte bei der letzten H_2O_2 -Gabe (finale Konzentration $180 \mu\text{M}$ bei 100 min) nur eine geringe Erhöhung des HyPer-Signals festgestellt werden, was darauf deuten kann, dass der Sensor vollständig oxidiert, das Signal also gesättigt war.

Um die Dynamik der extra- sowie der intrazellulären Messungen zu analysieren, wurde die Ratio des Fluoreszenzsensors, bzw. der gemessene Strom in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration aufgetragen und mathematisch angenähert. Während das extrazelluläre Strom-Signal eine lineare Abhängigkeit aufwies, folgte das Verhältnis von Hyper-Ratio zur extrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ einem sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 28). Dies entspricht dem beschriebenen Verhalten des Sensors (Belousov et al., 2006).

Ergebnisse

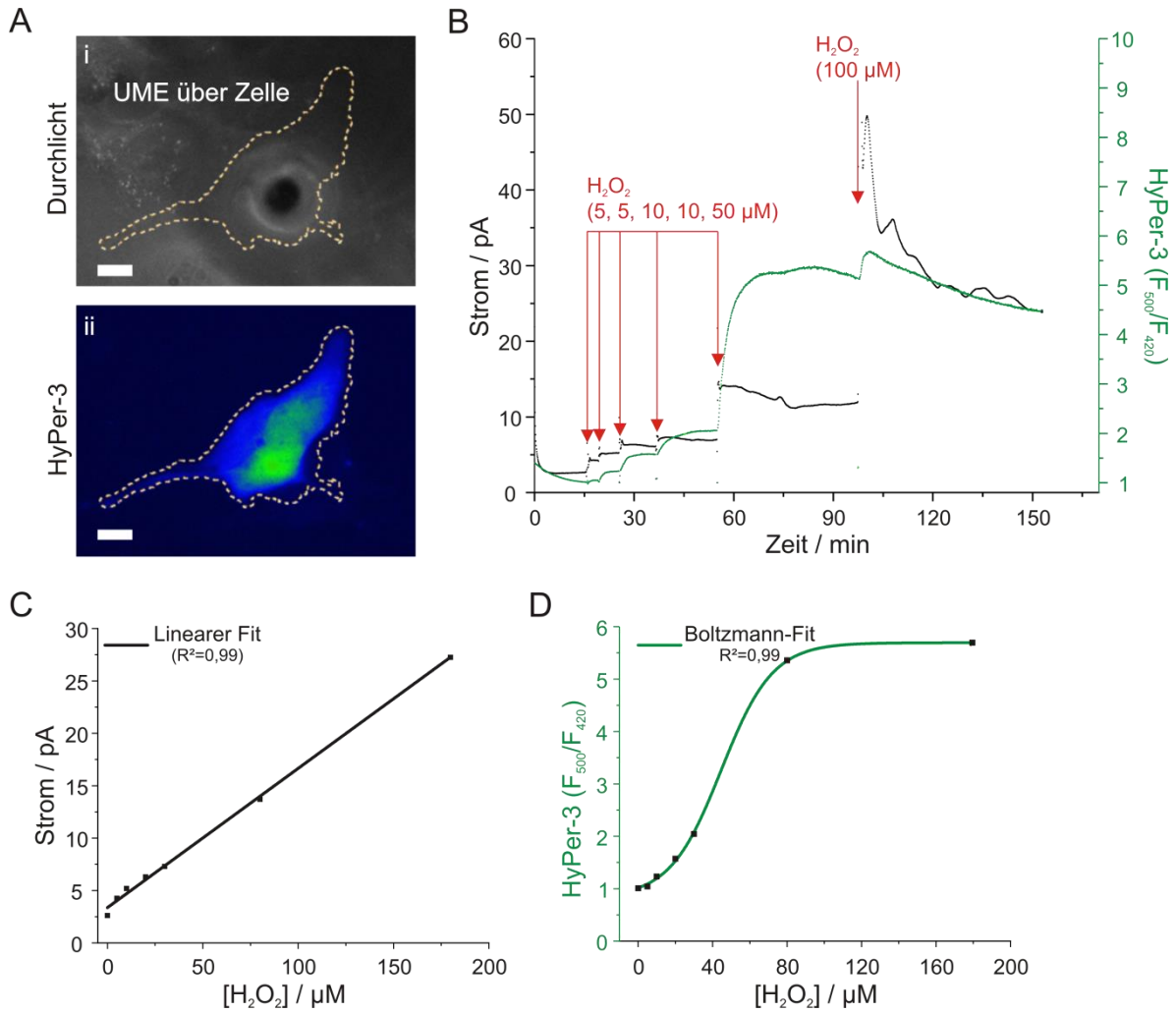


Abbildung 28 - Kombinierte chronoamperometrische und Fluoreszenzmikroskopische Messung von H_2O_2 an derselben, einzelnen HEK-293-Zelle. Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einer einzelnen, mit *HyPer-3* transfizierten HEK-293-Zelle positioniert. A) Durchlicht (i)- und Fluoreszenzmikroskopie (ii)-Bild einer repräsentativen HEK-293-Zelle (Umriss gepunktet) sowie der UME (direkt über der Zelle). Balken = 10 μm . B) Verlauf des extrazellulären H_2O_2 -Signals (Stromsignal, schwarze Kurve) und des intrazellulären H_2O_2 -Signals (HyPer-3-Ratio F_{500}/F_{420} , grüne Kurve), nach Zugabe von H_2O_2 in aufsteigenden Konzentrationen (finale Konzentration 5, 10, 20, 30, 80, 180 μM , rote Pfeile) C) Mathematische Annäherung des intrazellulären H_2O_2 -Signals. Linearer Fit, korrigiertes Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$. D) Mathematische Anpassung des extrazellulären H_2O_2 -Signals. Boltzmann-Fit, korrigiertes Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,99$.

Zur Kontrolle wurden die Messungen von intrazellulärem H_2O_2 mittels HyPer zusätzlich an einem anderen, dedizierten Fluoreszenzmikroskop (*Cell Observer*) wiederholt. Dazu wurde der Hyper-Ratio-Basiswert, sowie die HyPer-Ratio nach Applikation von 50 μM H_2O_2 , von Messungen am *ELP3* mit Messungen am *Cell Observer* verglichen (Abb. 29 A). Beim *ELP3* lag das Basissignal der HyPer-Ratio bei $0,6 \pm 0,1$, beim *Cell Observer* bei $0,6 \pm 0,05$. Nach

Applikation von 50 μM H_2O_2 lag die HyPer-Ratio bei Messungen am *ELP3* bei $2,5 \pm 0,5$, am *Cell Observer* bei $2,4 \pm 0,4$ (jeweils $n = 5$). Es bestand also kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen am *ELP3* und denen am *Cell Observer*.

Zu Beginn mancher Messungen am *Cell Observer* Messung konnte ein Absinken der HyPer-Ratio über einen Zeitraum von 10-15 min bis zu einem stabilen Wert beobachtet werden. Diese Einlaufphase konnte vor allem bei Experimenten festgestellt werden, bei denen die Messung sehr schnell nach dem Umsetzen der Zellen aus dem Zellkulturmedium in den Messpuffer begann. Um zu testen, ob das Umsetzen der Zellen aus dem Zellkulturmedium in den Messpuffer einen Einfluss auf das Hyper-Signal hat, wurden mehrere Fluoreszenzmikroskopie-Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen vor Messstart 15 min im Messpuffer (D-PBS + 5 mM Glucose) vorinkubiert wurden. Bei den Experimenten mit Prä-Inkubation war die HyPer-Ratio von Anfang an stabil. Auch bei Experimenten am *ELP3* konnte keine Einlaufphase des HyPer-Signals festgestellt werden. Vermutlich kann diese Beobachtung darauf zurückgeführt werden, dass die Vorbereitung der Messungen am *ELP3* deutlich länger dauerten (~ 10 min) als am *Cell Observer* (~ 2 min). Es ist also davon auszugehen, dass der Wechsel vom Zellkulturmedium zum Messpuffer Zellstress und somit erhöhte intrazelluläre H_2O_2 -Produktion induziert. Aus diesem Grund wurden die Zellen bei allen weiteren Experimenten, unabhängig der Messmethode, 10 Minuten vor der Messung in den Messpuffer überführt.

Da in der Fluoreszenzmikroskopie in unserer Arbeitsgruppe neben D-PBS weitere Puffer zum Einsatz kommen, z. B. Ca^{2+} -Ringer, sollte getestet werden, ob die Wahl des Puffers einen Einfluss auf HyPer-Messungen hat. Dazu wurden HEK-293-Zellen, welche Hyper-3 transient exprimierten, entweder in D-PBS (+5 mM Glucose) oder in Ca^{2+} -Ringer-Lösung (+5 mM Glucose) gemessen und der Basiswert sowie die Veränderung der HyPer-3-Ratio auf einen H_2O_2 -Bolus (50 μM) analysiert und miteinander verglichen (Abb. 29 B). Die HyPer-Ratio von unbehandelten HEK-293-Zellen lag in D-PBS bei $0,61 \pm 0,04$, in Ca^{2+} -Ringer bei $0,6 \pm 0,05$. Nach Applikation von 50 μM H_2O_2 lag sie in D-PBS bei $2,6 \pm 0,37$; in Ca^{2+} -Ringer bei $2,55 \pm 0,44$ (jeweils $n = 5$). Es bestand also kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Puffern, aus diesem Grund wurde weiterhin PBS für alle Experimente, ob SECM, FM oder SECM-FM, verwendet.

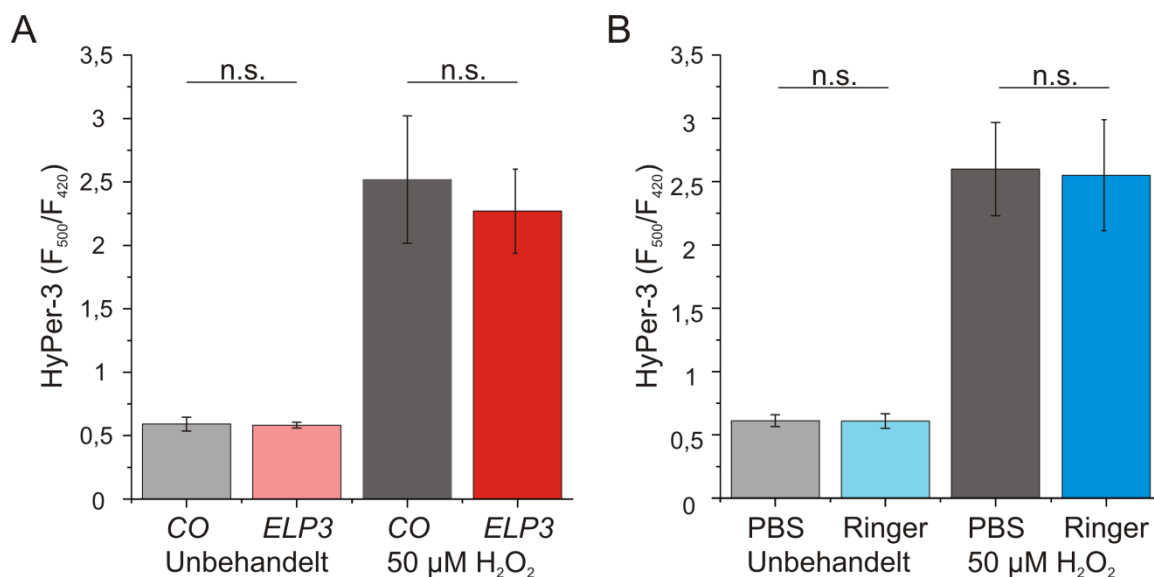


Abbildung 29 – Fluoreszenzmikroskopische Messungen von H₂O₂ mit HyPer-3. Vergleich zwischen Cell Observer (CO) und ELP3; Einfluss verschiedener Messpuffer.

Die Ratio (F₅₀₀/F₄₂₀) HyPer-3-exprimierender HEK-293-Zellen wurde vor und nach Zugabe von 50 µM H₂O₂ gemessen. A) Vergleich der HyPer-3 Ratio zwischen CO und ELP3. B) Vergleich der HyPer-3 Ratio zwischen D-PBS und Ca²⁺-Ringer als Messlösung. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte der HyPer-3-Ratio vor (= unbehandelt) und nach Zugabe von 50 µM H₂O₂ ± SD. Jeweils n = 5.

Zusammengefasst ließ sich in diesem Kapitel zeigen, dass eine kombinierte Messung von intra- und extrazellulärem H₂O₂ möglich ist. Beide Messmethoden zeigen die gleichen Signale nach H₂O₂-Applikation, welche sie auch einzeln angewendet aufweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es für fluoreszenzmikroskopische Messungen von HyPer-3 keinen Unterschied macht, ob D-PBS oder Ca²⁺-Ringer als Messpuffer verwendet wird.

3.3.1.1 Intrazellulär produziertes H₂O₂ verlässt die Zelle nicht

H₂O₂ spielt eine wichtige Rolle in vielen intra- und interzellulären Prozessen. Während in den letzten Jahren bedeutende Erkenntnisse über die zelluläre Herstellung und Eliminierung von H₂O₂ gemacht worden sind, ist noch immer recht wenig darüber bekannt, wie es sich innerhalb der Zelle verteilt. Widersprüchliche Meinungen existieren, ob intrazellulär produziertes H₂O₂ die Zelle verlassen kann oder nicht (z. B. Bienert et al., 2006; Lennicke et al., 2015). Daher wurde ein Experiment entworfen, welches es ermöglicht, über die D-Aminosäureoxidase (*D-amino acid oxidase*, DAAO) innerhalb einer Zelle gezielt H₂O₂ zu

generieren und es zeitgleich mit HyPer zu messen. Simultan kann mit elektrochemischen Methoden H_2O_2 außerhalb der Zelle bestimmt werden. Füttert man diese Zellen mit D-Alanin, katalysiert die DAAO die oxidative Desaminierung des D-Alanins unter Produktion von H_2O_2 . Diese intrazelluläre H_2O_2 -Produktion kann mit Hilfe von HyPer dargestellt werden. Misst man zeitgleich $[\text{H}_2\text{O}_2]$ außerhalb der Zelle kann überprüft werden, ob H_2O_2 aus der Zelle gelangt. Da DAAO Enantiomer-spezifisch wirkt, wird L-Alanin hingegen nicht durch DAAO desaminiert und eignet sich daher als Kontrollsubstanz. In unserem Fall wurden HEK-293-Zellen mit *HyPer-DAAO-NES* transient transfiziert. Dieses Konstrukt kodiert für ein HyPer-DAAO-Fusionsprotein, welches eine gleichzeitige intrazelluläre Produktion und Detektion von H_2O_2 ermöglicht. Die Konstrukte besitzen ein nukleäres-Export-Signal (NES) und sind daher in der kompletten Zelle, außer dem Nukleus, lokalisiert. Da sich die größte Menge jedoch im Cytosol befindet, überdeckt die Fluoreszenz aus dem Cytosol die restliche Fluoreszenz (Matlashov et al., 2014). Die intrazelluläre Produktion von H_2O_2 wurde per Fluoreszenzmikroskopie über die HyPer-Ratio, das extrazelluläre H_2O_2 über Chronoamperometrie gemessen (Abb. 30, in A-D sind repräsentative Messungen dargestellt). Nach der Applikation von 4 mM D-Alanin zu den transfizierten HEK-293-Zellen konnte ein Anstieg des HyPer-Signals innerhalb von 30 min beobachtet werden, bis ein Plateau der Hyper-Ratio von 1,5 erreicht wurde. Extrazellulär war keine Änderung des Stromes messbar (Abb. 30 A+B). Nach der extrazellulären Gabe von 50 μM H_2O_2 kam es zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären H_2O_2 -Signals, die HyPer-Ratio stieg auf 3. Gleichzeitig konnte ein Anstieg des extrazellulären H_2O_2 -Signals beobachtet werden (Abb. 30 B). Behandelte man die HEK-293-Zellen stattdessen mit L-Alanin, kam es nicht zu einem Anstieg der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration (Abb. 30. C+D). Erst nach der extrazellulären Gabe von 50 μM H_2O_2 stieg das intrazelluläre H_2O_2 -Signal, die HyPer-Ratio stieg auf 2,5. Gleichzeitig konnte ein Anstieg des extrazellulären H_2O_2 -Signals beobachtet werden (Abb. 30 C). Quantifiziert man die relative Veränderung der H_2O_2 -Signale über mehrere Messungen (jeweils $n = 3$, Abb. 30 E+F), konnte festgestellt werden, dass das intrazelluläre H_2O_2 -Signal 20 min nach Stimulation mit D-Alanin auf das $1,54 \pm 0,03$ -fache und 45 min nach Stimulierung auf das $1,89 \pm 0,02$ -fache signifikant anstieg. Das extrazelluläre Signal wies keine signifikante Veränderung auf (20 min nach D-Alanin-Stimulation: $0,99 \pm 0,01$ -fach, bzw. $0,93 \pm 0,01$ -fach nach 45 min). Nach Gabe von extrazellulärem H_2O_2 erhöhten sich sowohl das intra- als auch das extrazelluläre H_2O_2 -Signal signifikant. Das intrazelluläre Signal stieg 20 min nach H_2O_2 -

Ergebnisse

Gabe auf das $3,39 \pm 0,18$ -fache an, das extrazelluläre Signal auf das $3,37 \pm 0,4$ -fache an (jeweils $n=3$). Um zu überprüfen, ob das HyPer-DAAO-Konstrukt das von der DAAO produzierte H_2O_2 komplett abfängt (durch Oxidation von HyPer) und deshalb außerhalb der Zelle kein H_2O_2 gemessen werden konnte, wurden HEK-293-Zellen mit *SypHer-DAAO-NES* transfiziert. SypHer ist ein mit HyPer verwandter Sensor, bei dem die zwei Cysteine, die durch H_2O_2 oxidiert werden und essentiell für die HyPer-Funktion sind, durch Serine ersetzt sind. SypHer ist somit H_2O_2 insensitiv. Mit *SypHer-DAAO* transfizierte Zellen zeigten nach Gabe von D-Alanin, wie zu erwarten, keine Veränderung des intrazellulären Signals. Es veränderte sich auf das $0,92 \pm 0,01$ -fache, 20 min nach Gabe von D-Alanin, bzw. auf das $0,81 \pm 0,01$ -fache nach 45 min. Das extrazelluläre Signal veränderte sich auf das $0,92 \pm 0,01$ -fache, 20 min nach Stimulation und das $0,89 \pm 0,01$ -fache, 45 min nach Gabe von D-Alanin. Erst nach zusätzlicher extrazellulärer Gabe von $50 \mu M H_2O_2$ stieg das extrazelluläre Signal auf das $3,27 \pm 0,41$ -fache des Ausgangssignals an. Die leichte Abnahme der Fluoreszenz des Sensors in manchen Experimenten ist vermutlich auf ein Ausbleichen des Sensors zurückzuführen.

Ergebnisse

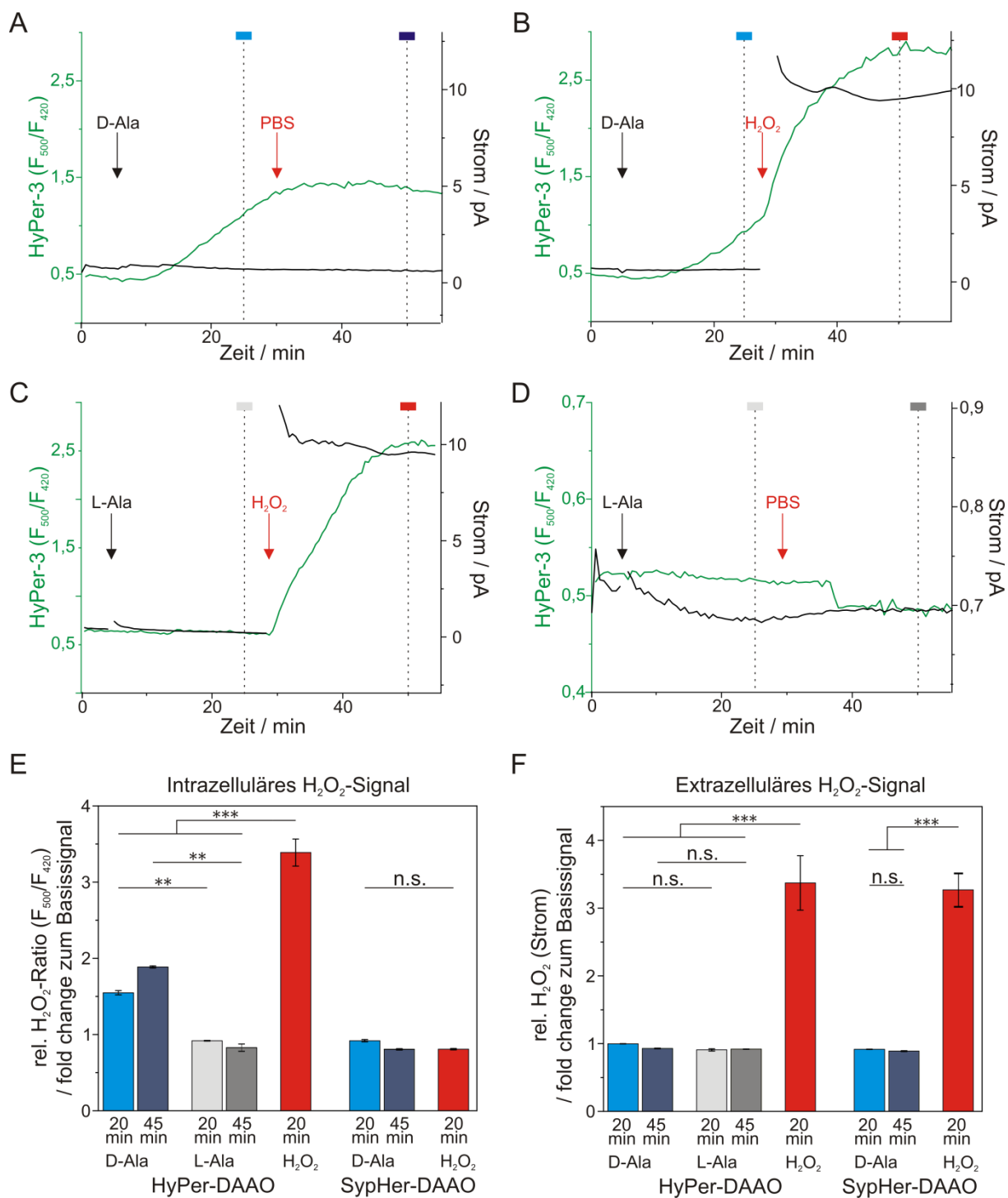


Abbildung 30 - Kombinierte extrazelluläre und intrazelluläre Messung von intrazellulär produziertem H_2O_2 .

A-D) Repräsentative Messungen: Verlauf des intra- (HyPer-3) und extrazellulären (Strom) H_2O_2 -Signals von *HyPer-DAAO* transfizierten HEK-293-Zellen. Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einer einzelnen HEK-293-Zelle positioniert. DAAO katalysiert Enantiomer-spezifisch eine oxidative Desaminierung von D-Alanin unter Bildung von H_2O_2 . Gestrichelte Linien = Zeitpunkte der Wertentnahme zur Analyse (E+F) A + B) Verlauf des Signals nach Gabe von 4 mM D-Alanin (schwarzer Pfeil) und zusätzlich A) D-PBS als Kontrolle bzw. B) 50 μM H_2O_2 (jeweils roter Pfeil). C+D) Kontrolle der Spezifität der DAAO. Verlauf des Signals nach Zugabe von 4 mM L-Alanin (schwarzer Pfeil) und zusätzlich C) 50 μM H_2O_2 bzw. D)

D-PBS (jeweils roter Pfeil). Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS (+5 mM Glucose). E, F) Quantifizierung des intra- und extrazellulären H_2O_2 -Signals, dargestellt als vielfaches des jeweiligen Ausgangssignals vor Zugabe (0-5 min), 20 und 45 min nach Gabe von D- oder L-Alanin und 20 min nach Gabe von H_2O_2 . E) Intrazelluläres H_2O_2 -Signal (HyPer-Ratio F_{500}/F_{420}). F) Extrazelluläres H_2O_2 -Signal (Strom). Jeweils $n = 3$, Mittelwerte \pm SD.

In diesem Teil der Arbeit konnte mit kombinierten SECM-FM-Messungen gezeigt werden, dass innerhalb der Zelle produziertes H_2O_2 die Zellmembran nicht in für uns messbarer Menge passiert. Dass der Sensor nicht maßgeblich an der Eliminierung des produzierten H_2O_2 beteiligt und nur aus diesem Grund außerhalb der Zelle kein H_2O_2 zu messen war, zeigen die Messungen mit der H_2O_2 -insensitiven Variante des Sensors, da dort auch kein extrazelluläres H_2O_2 gemessen werden konnte.

3.3.2 SECM-FM mit roGFP als intrazellulärem Sensor

In 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass von Monozyten extrazellulär produziertes H_2O_2 mit elektrochemischen Methoden nachweisbar ist. Es ist auch bekannt, dass sich intrazelluläre H_2O_2 -Konzentrationen ändern können. Deshalb sollte simultan intra- und extrazelluläres H_2O_2 von MZ gemessen werden. Dazu musste ein H_2O_2 -Sensor in MZ eingebracht werden. Da eine Transfektion von primären hMZ mit HyPer-3 nicht möglich war, wurden mMZ aus transgenen Mäusen isoliert, welche den intrazellulären Redox-Sensor roGFP-2-orp1 stabil exprimierten. Ähnlich wie HyPer basiert dieser Sensor auf einer Spektralverschiebung der Absorption nach Oxidation durch H_2O_2 . Er besteht aus einem Redox-sensitiven GFP (roGFP) welches mit Orp1, einer Thiol-Peroxidase aus *S. cerevisiae* fusioniert ist, um eine reversible, H_2O_2 -abhängige Oxidation von roGFP zu ermöglichen. Dadurch ist eine ratiometrische Bestimmung von intrazellulärem H_2O_2 möglich (Meyer & Dick, 2010). Die Mäuse exprimierten Versionen des Sensors entweder cytosolisch (cyto-roGFP2-orp1, fortan als cyto-roGFP bezeichnet) oder in den Mitochondrien (mito-roGFP2-orp1, fortan als mito-roGFP bezeichnet).

Zuerst sollten beide Sensoren charakterisiert werden. Deshalb wurden die Ratios der Sensoren im maximal oxidierten und im maximal reduzierten Zustand bestimmt. Dazu wurden primäre mMZ transgener Mäuse mit 2 mM Diamid bzw. 10 mM Dithiothreitol (DTT) behandelt, um den jeweiligen Sensor vollständig zu oxidieren (Diamid) oder vollständig zu reduzieren (DTT). Diese Messungen wurden sowohl am *ELP3* als auch an dem Fluoreszenzmikroskop

Ergebnisse

Axio Observer (AO) durchgeführt, um die Messungen gegenseitig zu validieren (Abb. 31). Die erhaltenen Ratios (F_{405}/F_{488}) vor Behandlung (Grundzustand des Sensors, R_0), nach vollständiger Reduktion ($R_{\text{red.}}$), nach vollständiger Oxidation ($R_{\text{ox.}}$) und die Differenzen zwischen unbehandelt und maximal oxidiertes Ratio ($\Delta R_{\text{ox.}}$) sowie unbehandelt und maximal reduzierter Ratio ($\Delta R_{\text{red.}}$) sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tabelle 15 – Charakterisierung von mito-roGFP und cyto-roGFP in murinen Monozyten.

Vergleich zwischen Messungen am *ELP3* und *Axio Observer*. roGFP-Ratios (F_{405}/F_{488}) im unbehandelten Grundzustand (R_0), vollständig reduziert durch 10 mM Dithiothreitol (RED) oder vollständig oxidiert durch 2 mM Diamid ($R_{\text{ox.}}$). Des Weiteren sind die Differenzen der Ratios zwischen R_0 und reduziert ($\Delta R_{\text{red.}}$) und R_0 und oxidiert ($\Delta R_{\text{ox.}}$). Jeweils $n = 3$.

<i>ELP3</i>						<i>Axio Observer</i>					
cyto-roGFP			mito-roGFP			cyto-roGFP			mito-roGFP		
$R_{\text{red.}}$	R_0	$R_{\text{ox.}}$	$R_{\text{red.}}$	R_0	$R_{\text{ox.}}$	$R_{\text{red.}}$	R_0	$R_{\text{ox.}}$	$R_{\text{red.}}$	R_0	$R_{\text{ox.}}$
0,15	0,15	0,29	0,11	0,12	0,14	0,45	0,5 ± 0,17	0,89	0,27	0,27 ± 0,1	0,35
±	±	±	±	±	±	±		±	±		±
0,03	0,05	0,06	0,02	0,02	0,01	0,14		0,15	0,07		0,07
$\Delta R_{\text{red.}}$		$\Delta R_{\text{ox.}}$	$\Delta R_{\text{red.}}$		$\Delta R_{\text{ox.}}$	$\Delta R_{\text{red.}}$		$\Delta R_{\text{ox.}}$	$\Delta R_{\text{red.}}$		$\Delta R_{\text{ox.}}$
< 0,001		0,13	0,01		0,02	-0,08		0,4	-0,13		0,14
		±	±		±	±		±	±		±
		0,01	0,005		0,01	0,04		0,1	0,03		0,04

Normiert man die Differenzen der Ratios im vollständig oxidierten ($\Delta R_{\text{ox.}}$) bzw. reduzierten ($\Delta R_{\text{red.}}$) Zustand auf die Ausgangsratio (R_0) vor Behandlung, erhält man das relative Potential des Sensors, reduziert bzw. oxidiert zu werden ($\Delta R/R_0$). Der mitochondriale Sensor konnte im Grundzustand sowohl recht gut oxidiert werden ($\Delta R_{\text{ox.}}/R_0 = 0,5 \pm 0,16$ (AO) bzw. $0,5 \pm 0,14$ (ELP3)) als auch reduziert werden ($\Delta R_{\text{red.}}/R_0 = -0,48 \pm 0,11$ (AO) bzw. $-0,32 \pm 0,05$ (ELP3)). Der cytosolische Sensor hatte im Grundzustand weniger Potential, reduziert zu werden ($\Delta R_{\text{red.}}/R_0 = -0,16 \pm 0,09$ (AO) bzw. $-0,002 \pm 0,003$ (ELP3)), dafür war das Potential, oxidiert zu werden, deutlich höher ($\Delta R_{\text{ox.}}/R_0 = 0,85 \pm 0,06$ (AO) bzw. $0,86 \pm 0,21$ (ELP3)) (Abb. 31 B, jeweils $n = 3$). Dies bedeutet, dass die H_2O_2 -Konzentration in unbehandelten Zellen in den Mitochondrien höher ist als die cytosolische

[H₂O₂], was in der Literatur belegt ist (Noctor & Foyer, 2016). Der Sensor liegt somit in den Mitochondrien in einem stärker oxidierten Grundzustand vor und kann sowohl reduziert, als auch oxidiert werden. Im Cytosol liegt er in fast vollständig reduzierter Form vor und kann fast nur oxidiert werden. Zu beachten ist, dass sich die absoluten Fluoreszenzwerte und Ratios zwischen den beiden Messsystemen unterschieden, was vermutlich auf die unterschiedlichen Lichtausbeuten durch unterschiedliche Filtersätze sowie Lampeneffizienz zurück zu führen ist. Das Potential des Sensors, reduziert oder oxidiert zu werden, war jedoch bei beiden Messsystemen ähnlich (Abb. 31 B).

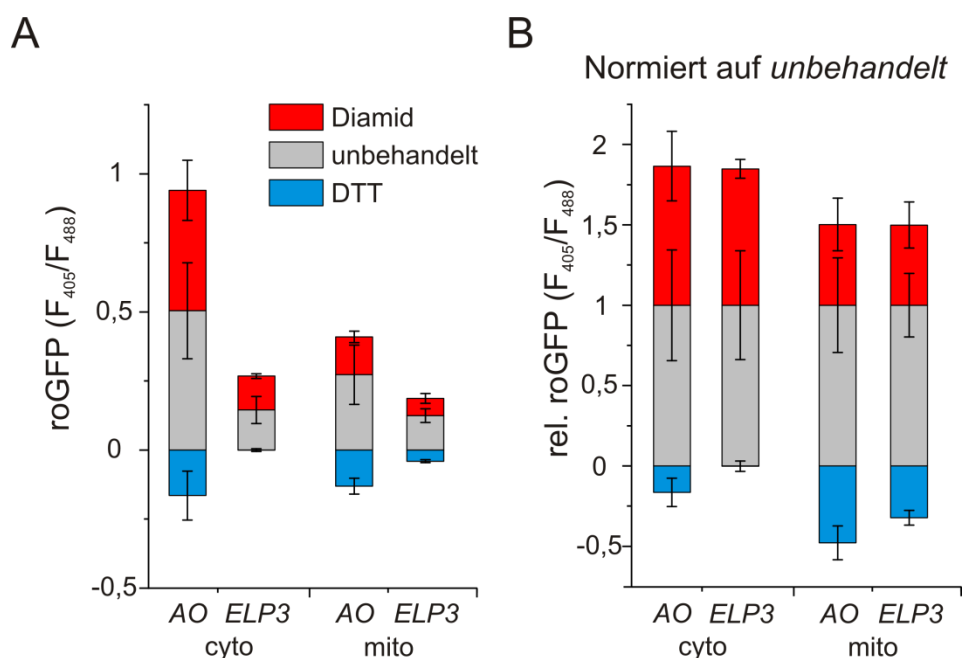


Abbildung 31 - Charakterisierung von mito-roGFP und cyto-roGFP in murinen Monozyten (mMZ).

Vergleich zwischen Messungen am *Axio Observer* (AO) und am *ELP3*. A) Die roGFP-Ratio (F_{405}/F_{488}) transgener mMZ wurde vor und nach Zugabe von 2 mM Diamid oder 10 mM DTT gemessen. Der Sensor war entweder cytosolisch (cyto) oder mitochondrial (mito) lokalisiert. Säulendiagramme zeigen Mittelwerte \pm SD der roGFP-Ratio im unbehandelten Zustand und nach vollständiger Oxidierung des Sensors durch Diamid bzw. vollständiger Reduzierung durch DTT. B) Relative Veränderung der roGFP-Ratio, normiert auf die Werte im unbehandelten Zustand. Werte im oxidierten (Diamid) und reduzierten Zustand (DTT) als relative roGFP-Ratios der Differenzen zwischen roGFP-Ratio im unbehandelten und vollständig oxidierten, sowie unbehandelten und vollständig reduzierten Zustand. Mittelwerte \pm SD. Jeweils $n = 3$.

3.4.2.1 Intra- und extrazelluläre H₂O₂-Produktion von roGFP-exprimierenden Mausmonozyten

Im Folgenden sollten die zuvor gewonnen Erkenntnisse über roGFP verwendet werden um in transgenen Mausmonozyten (mMZ) simultan intra- und extrazelluläres H₂O₂ zu messen. Um eine H₂O₂-Produktion der mMZ hervorzurufen, wurden die Zellen entweder mit 1 μ M PMA oder mit 10 μ M Angiotensin-II (AT-II) behandelt (Abb. 32). AT-II stimuliert die H₂O₂-Produktion von Monozyten nach Bindung an einen Angiotensin-Rezeptor, welcher über eine intrazelluläre Signalkaskade NOX-Enzyme aktiviert (Nguyen Dinh Cat et al., 2013). Direkt nach der Applikation von PMA oder 0,2 % (v/v) DMSO (als Kontrolle) konnte ein kleines elektrochemisches Artefakt festgestellt werden (Abb. 32 A; ähnlich wie bei den Messungen mit PMA an humanen Zellen, 3.2.2). Bei Zugabe von AT-II (in Wasser gelöst) gab es kein Messartefakt. Nach der Zugabe sowohl von AT-II, als auch von PMA kam es zu einem Anstieg der intrazellulären H₂O₂-Signale, sowohl im Cytosol (cyto-roGFP) als auch in den Mitochondrien (mito-roGFP). PMA führte zu einem Anstieg der cyto-roGFP-Ratio (also des cytosolischen H₂O₂-Signals) auf das $1,1 \pm 0,08$ -fache des Ausgangssignals. Die mito-roGFP-Ratio (also das mitochondriale H₂O₂-Signal) stieg auf das $1,12 \pm 0,08$ -fache des Ausgangssignals. AT-II führte zu einem Anstieg der cyto-roGFP-Ratio auf das $1,1 \pm 0,04$ -fache des Ausgangssignals und der mito-roGFP-Ratio auf das $1,22 \pm 0,08$ -fache des Ausgangssignals (Abb. 32 C, jeweils N=3, n = 6-7). Zusätzlich wurde die Zeit betrachtet, bis ein signifikanter Effekt sichtbar wurde. Dabei ist ein signifikanter Effekt definiert als ein Anstieg des Signals über den Wert des Ausgangssignals + 3*SD des Ausgangssignals. Der Effekt von PMA war deutlich schneller sichtbar als der von AT-II. Nach Stimulation des mMZ mit PMA kam es beim cytosolischen Sensor bereits nach $4,6 \pm 2,1$ min zu einem signifikanten Anstieg über das Ausgangssignal, der mitochondriale Sensor sprach bereits nach $3,1 \pm 1,6$ min an. Bei Behandlung der Zellen mit AT-II dauerte es hingegen $26,7 \pm 6,4$ min, bis das Signal des cytosolischen Sensors signifikant über das Ausgangssignal stieg, beim mitochondrialen Sensor dauerte es $11,3 \pm 1,5$ min (Abb. 32 D). Weder nach PMA- noch nach AT-II-Stimulation konnte ein Anstieg des Stromes, also des extrazellulären H₂O₂ beobachtet werden. Am Ende jeder Messung wurde, wie in 3.2.1 beschrieben, durch Zugabe von H₂O₂ zum Messpuffer eine Kalibrierung der elektrochemischen H₂O₂-Messung durchgeführt, was bestätigte, dass die extrazelluläre H₂O₂-Messung prinzipiell funktionierte (Abb. 32 A).

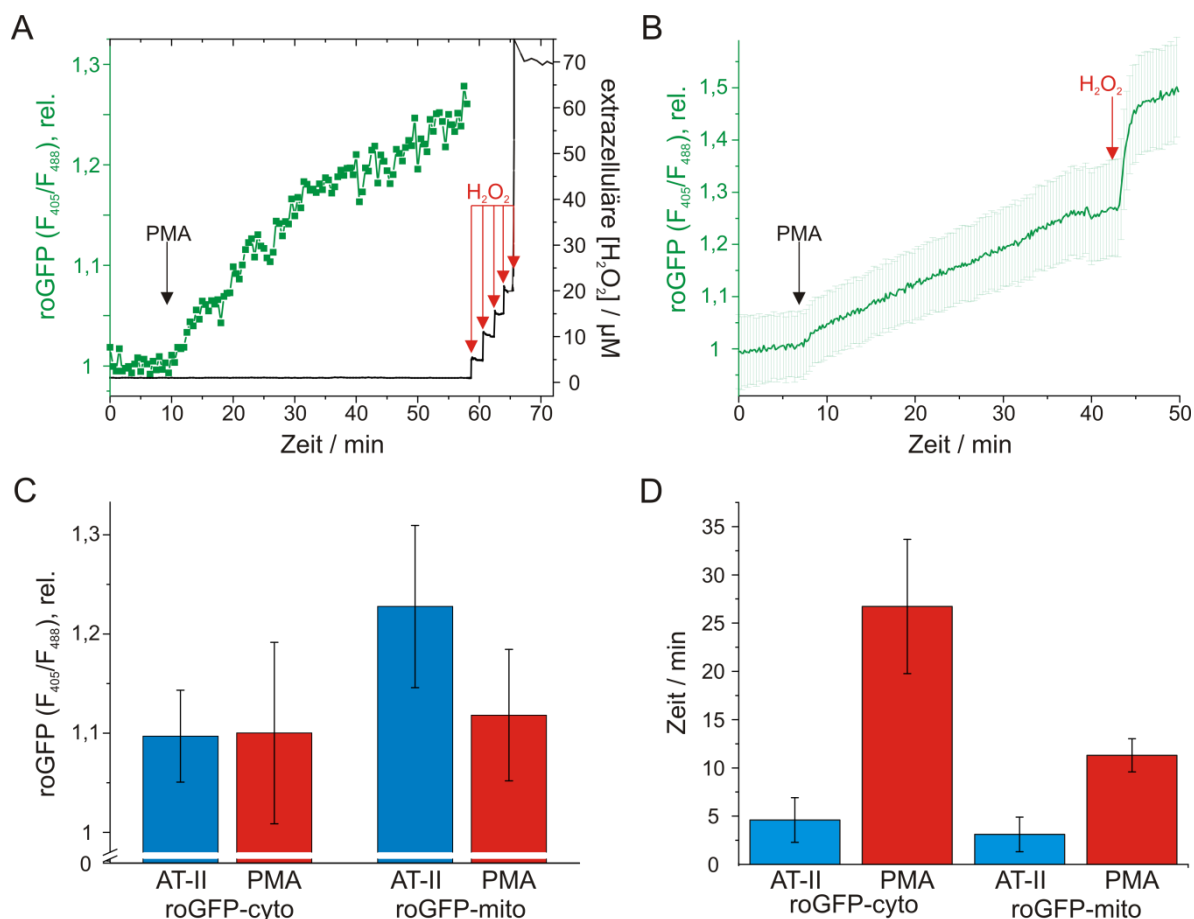


Abbildung 32 - Intra- und extrazelluläre H_2O_2 -Produktion von roGFP-exprimierenden Mausmonozyten (mMZ).

A) Repräsentative kombinierte intra- (Fluoreszenz) und extrazelluläre (chronoamperometrisch) Messung von H_2O_2 . Eine Pt-Ultramikroelektrode (UME) wurde 10-12 μm über einem einzelnen, roGFP-exprimierenden mMZ positioniert. Extrazelluläre $[\text{H}_2\text{O}_2]$ berechnet über chronoamperometrische Messung (schwarze Kurve) und relatives intrazelluläres H_2O_2 -Signal (rel. roGFP-Ratio F_{405}/F_{490} , normiert auf F_{405}/F_{490} -Ratio vor Stimulation, grüne Kurve). Der schwarze Pfeil repräsentiert die Stimulation eines mMZ mit 1 μM PMA (oder bei anderen Experimenten AT-II). Zugabe von H_2O_2 (rote Pfeile ($4 \times 5 \mu\text{M}$, $1 \times 50 \mu\text{M}$)) zur Kalibrierung. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose.

B) Repräsentative Messung der roGFP-Ratio (F_{405}/F_{488}) transgener mMZ. Der schwarze Pfeil repräsentiert die Stimulation der mMZ mit 1 μM PMA (oder bei anderen Experimenten AT-II). Zugabe von 50 μM H_2O_2 (roter Pfeil), in D-PBS + 5 mM Glucose, Mittelwerte mehrerer hMZ (5-10 pro Messung) \pm SD. Rel. roGFP-Ratio F_{405}/F_{490} , normiert auf F_{405}/F_{490} -Ratio vor Stimulation.

C) Intrazelluläre H_2O_2 -Produktion von mMZ nach Stimulation mit PMA oder AT-II, Signal bei Erreichen des Plateaus (rel. roGFP-Ratio F_{405}/F_{490} , normiert auf F_{405}/F_{490} -Ratio vor Stimulation).

D) Durchschnittliche Zeit, bis das intrazelluläre H_2O_2 -Signal signifikant über das Ausgangssignal angestiegen war (Ausgangssignal + $3 \times$ SD des Ausgangssignals). Mittelwerte \pm SD. Jeweils $N = 3$, $n = 6-7$.

Ergebnisse

Bei den MZ transgener Mäuse konnte weder nach PMA- noch AT-II-Stimulation eine Änderung der extrazellulären $[H_2O_2]$ festgestellt werden. Vorangegangene Experimente mit Monozyten aus nicht-transgenen Mäusen zeigten allerdings einen Anstieg der extrazellulären $[H_2O_2]$ nach PMA-Stimulierung (siehe 3.2.3). Daher sollte getestet werden, ob die gentechnische Veränderung der Mäuse mit cyto-roGFP2-orp1 (respektive mito-roGFP2-orp1) Einflüsse auf die Produktion von extrazellulärem H_2O_2 hat. Dazu wurden Monozyten aus Wildtyp-Mäusen des Mausstamms isoliert, auf welchem die transgenen Tiere basieren (C57BL/6N). Diese mMZ wurden mit 1 μM PMA bzw. 10 μM AT-II stimuliert und extrazelluläres H_2O_2 chronoamperometrisch gemessen (Abb. 33 A+B). Die PMA-Applikation führte zum bekannten elektrochemischen Artefakt durch DMSO, sowie in einem Zeitrahmen von 10-15 Minuten nach Stimulierung zu einem Anstieg des Stromwertes bis zu einem Plateau, mit einer Differenz des Plateau-Stromes von 500 fA zum Stromwert vor Stimulierung. Das entspricht einer extrazellulären $[H_2O_2]$ von $2,1 \pm 0,05 \mu M$ (Abb. 33 A, C). Eine Applikation von AT-II führte allerdings auch bei mMZ nicht-transgener Mäuse zu keiner messbaren extrazellulären H_2O_2 -Produktion (Abb. 33 B, C, jeweils $n = 3$). Die Ergebnisse der extrazellulären H_2O_2 -Messungen mit PMA bzw. AT-II an mMZ sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16 – Extrazelluläre Produktion von H_2O_2 durch murine Monozyten verschiedener Mauslinien, nach Stimulation mit PMA oder AT-II.

Unter Angabe des Mausstamms, des Genotyps und der Stimulanz.

Mausstamm	Genotyp	Extrazelluläre H_2O_2 -Produktion nach Stimulierung mit	
		PMA	AT-II
C57BL/6N	mito-roGFP2-orp1	—	—
C57BL/6N	cyto-roGFP2-orp1	—	—
C57BL/6N	Wildtyp (wt)	+	—
C57BL/6J	Wildtyp (wt)	+	n. a.

Um zu testen, ob die transgenen Mäuse zwar extrazelluläres H_2O_2 produzieren und einzig die Sensitivität der elektrochemischen Messung nicht ausreichend war, wurden zusätzlich ESR-spektroskopische Experimente durchgeführt. Dazu wurde CMH als Spin-Sensor in Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Dabei wird die HRP-vermittelte Reduktion von

Ergebnisse

H_2O_2 mit CMH als Elektronendonator für intermediäre Redox-Zustände der HRP indirekt nachgewiesen. Es entstehen 2 CM-Nitroxyl-Radikale ($\text{CM}\bullet$), die mittels ESR-Spektroskopie gemessen werden können. Die Höhe des $\text{CM}\bullet$ -Signals korreliert also mit der $[\text{H}_2\text{O}_2]$. Es wurden mMZ aus cyto-roGFP Mäusen, sowie mMZ aus nicht-transgenen C57BL/6N-Mäusen gemessen, sie wurden jeweils mit 1 μM PMA (bzw. 0,2 % DMSO (v/v) als Kontrolle) behandelt (Abb. 33 D). mMZ nicht-transgener C57BL/6N-Mäuse zeigten nach PMA-Stimulation einen Anstieg des extrazellulären H_2O_2 um 2121 ± 149 A.U. Mit DMSO behandelte MZ, sowie PMA-stimulierte MZ der transgenen Mäuse zeigten keine Änderung im extrazellulären H_2O_2 -Signal (-107 ± 4 A.U.). Dies bestätigt die vorherigen Experimente qualitativ und lässt das Fazit zu, dass die Veränderung der C57BL/6N-Mäuse durch Transgenexpression von roGFP2-orp1 dazu führt, dass deren MZ durch PMA nicht mehr zur extrazellulären H_2O_2 -Produktion stimuliert werden können.

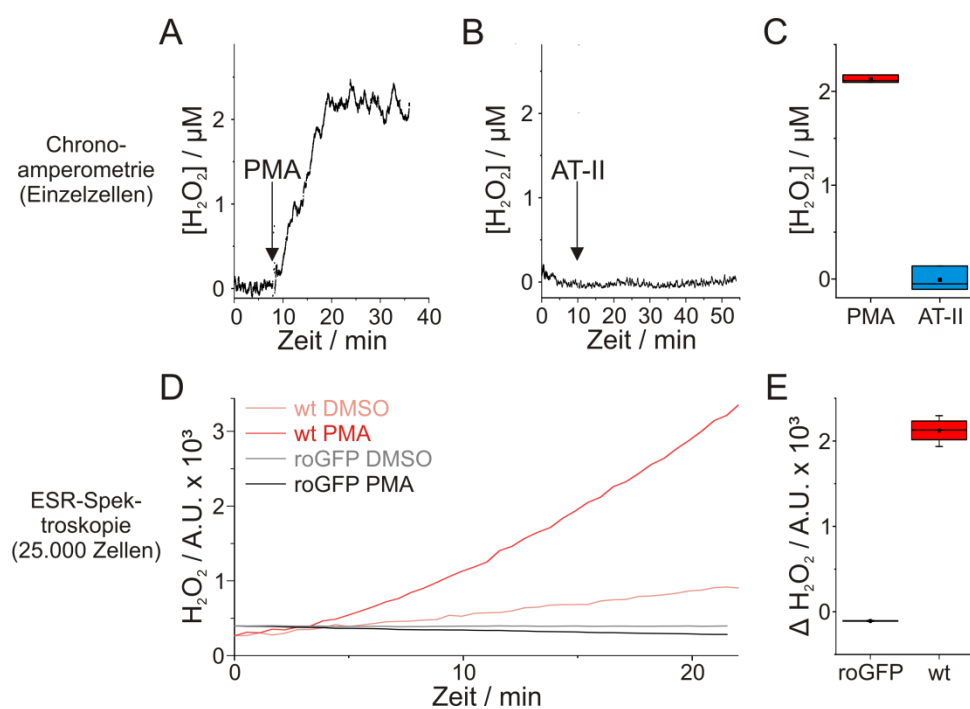


Abbildung 33 - H_2O_2 Produktion durch Maus-Monozyten (mMZ) aus verschiedenen Mauslinien; elektrochemische und ESR-spektroskopische Messungen.

A, B) Exemplarische chronoamperometrische H_2O_2 -Messung einzelner muriner MZ (mMZ) einer wt-C57BL/6N-Maus. Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einem einzelnen mMZ positioniert, Verlauf der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ über die Zeit. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei 650 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose. A) Stimulation mit 1 μM PMA (Pfeil). B) Stimulation mit 10 μM AT-II (Pfeil). C) Analyse der in A+B dargestellten Messungen nach Stimulation mit PMA oder AT-II. D) Messungen des extrazellulären H_2O_2 an mMZ-Populationen (25.000 Zellen je Messpunkt) mittels ESR-Spektroskopie. Transgene mMZ aus cyto-roGFP2-orp1-Mäusen

(roGFP, schwarze und graue Kurve), mMZ aus nicht-transgenen Mäusen (wt, rote Kurven) wurden mit 1 μM PMA oder 0,2 % (v/v) DMSO behandelt. E) Analyse der in D) dargestellten Messungen. $\Delta \text{H}_2\text{O}_2$ als Differenz zwischen PMA- und DMSO-behandelten mMZ nach 20 min. Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, 25-Median-75% Interquartile dar. $n = 3-5$.

In diesem Teil der Arbeit konnten Messungen von intrazellulärem H_2O_2 durch verschiedene Fluoreszenzsensoren mit extrazellulären Messungen von H_2O_2 durch elektrochemische Methoden kombiniert werden. Mit diesem System ließ sich nachweisen, dass intrazellulär produziertes H_2O_2 die Zelle nicht verläßt und dass eine transgene Veränderung von Mäusen, in diesem Fall mit dem Redox-Sensor roGFP2-orp1, einen Einfluss auf deren Fähigkeit haben kann, extrazelluläres H_2O_2 zu produzieren.

3.4 Elektrochemische Messung des Sauerstoffverbrauchs von Einzelzellen

Ein weiterer physiologischer Parameter, welcher über elektrochemische Methoden gemessen werden kann, ist der Sauerstoffverbrauch von Zellen. Er ist ein wichtiges Kriterium der Zellphysiologie und lässt Rückschlüsse auf Zellatmung und -stoffwechsel zu. Durch eine elektrochemische Messung lässt sich der O_2 -Verbrauch von Zellen effizient und nicht-invasiv charakterisieren. Elektrochemische Messungen von Sauerstoff sind mit der Clark-Elektrode wissenschaftliches Standardrepertoire. Verschiedene kommerzielle Systeme sind dazu erhältlich, z.B. das *Oroboros O2K*, womit man O_2 -Verbrauchsdaten an Zellpopulationen messen kann. Die vorliegende Arbeit soll die Anwendung chronoamperometrischer Sauerstoffmessungen auf Einzelzellebene unter physiologischen Bedingungen etablieren.

3.4.1 Chronoamperometrische O_2 -Messungen

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches von lebenden Zellen wurde mit einer Pt-Elektrode ($\varnothing 10 \mu\text{m}$) die O_2 -Reduktionsreaktion bei -700 mV gemessen. Dazu wurden Zellen untersucht, die am Boden des Messschälchens in einzelliger Lage adhärirt waren. Um die Differenz der Sauerstoffkonzentration zwischen dem zellfreien Bereich des Messpuffers (welche sich während des Versuches ändern kann) und der direkten Umgebung der Zelle zu messen, wurde ein dynamisches Messprotokoll verwendet. Hierbei wurde die UME 10-12 μm über der zu messenden Zelle positioniert, auf -700 mV polarisiert und für 30 s dort belassen, während die

Stromstärke mit einer Mess-Rate von 1 Hz überwacht wurde. Die Stromstärke entspricht der lokalen $[O_2]$ im Messbereich der Elektrodenspitze, also in direkter Umgebung der Zelle. Anschließend wurde die UME 50 μm von der Zelle entfernt positioniert (dabei machte es keinen Unterschied, ob in x-, y- oder z-Richtung, solange sich keine andere Zelle in der Umgebung befand) und der Strom erneut für 30 s gemessen. Dies entspricht der lokalen $[O_2]$ im zellfreien Bereich des Messpuffers. Dieses Hin- und Herspringen zwischen Zelle und zellfreiem Bereich wurde während des gesamten Experimentes beibehalten (Abb. 34 A).

In Abbildung 34 sind eine beispielhafte chronoamperometrische O_2 -Messung sowie deren Analyse dargestellt. In diesem Beispiel wurde der ruhende O_2 -Verbrauch einer einzelnen lebenden HEK-293-Zelle gemessen. Der Strom über der Zelle (rote Kurve, I_{Zelle}) ist konstant positiver als der Strom im zellfreien Bereich (schwarze Kurve, I_{Zellfrei}). Dies beruht auf der Tatsache, dass die O_2 -Reduktionsreaktion gemessen wurde. Dabei gehen Elektronen von der Pt-UME auf O_2 über, was sich in einem negativen Strom widerspiegelt. Ein negativerer Strom entspricht in diesem Fall also einer höheren Sauerstoffkonzentration. Die Sauerstoffkonzentration um die Zelle ist demnach niedriger als im zellfreien Bereich. Die Differenz in der Sauerstoffkonzentration zwischen dem zellfreien und dem Bereich über der Zelle wurde als der O_2 -Verbrauch der Zelle betrachtet. Aus diesem Grund wurde die Differenz zwischen I_{Zellfrei} und I_{Zelle} berechnet (Abb. 34 B, grüne Kurve, $I_{\text{Verbrauch}}$). Als Kontrolle wurde die UME am Ende der Messung > 1 mm über der Zellebene positioniert und das Hin- und Herspringen zwischen den beiden Positionen fortgesetzt. Wie erwartet gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Stromstärken, da hier sowohl I_{Zelle} als auch der I_{Zellfrei} in zellfreien Bereichen, deutlich über der Zellebene, gemessen wurden (Abb. 34 C). Es konnte also gezeigt werden, dass eine dynamische Messung des Sauerstoffverbrauchs über die Zeit an Einzelzellen möglich ist.

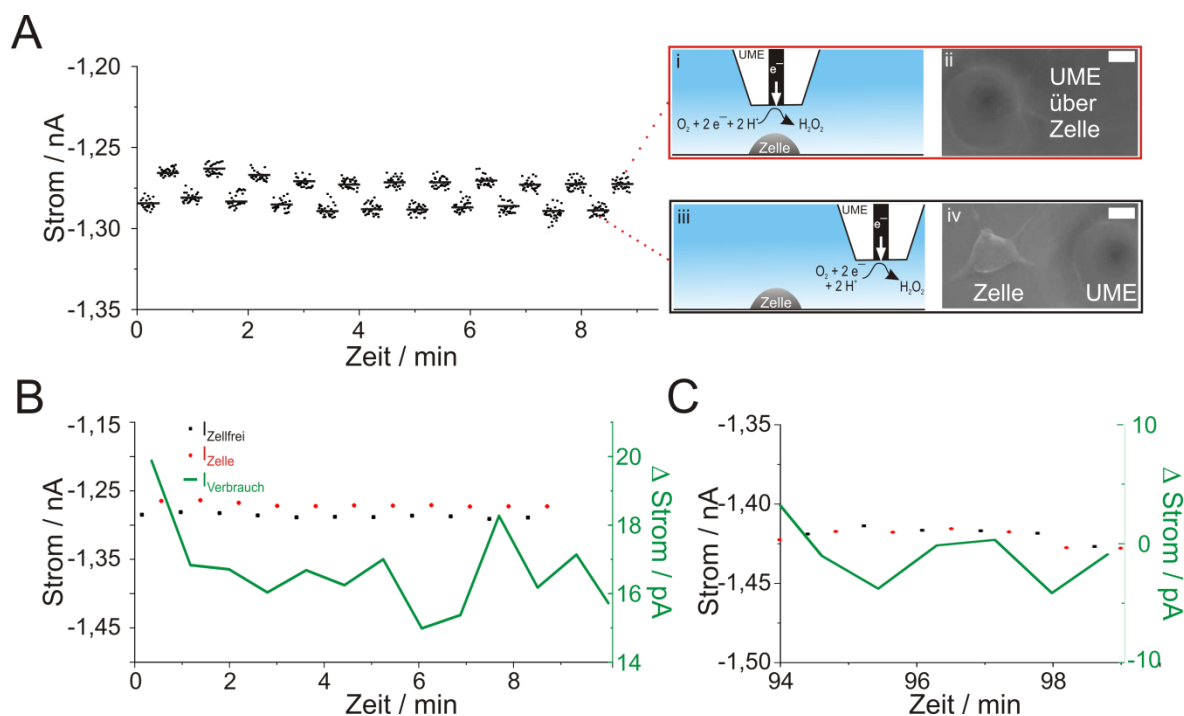


Abbildung 34 - Chronoamperometrische O_2 -Messung an HEK-293-Einzelzellen
 Beispiel einer repräsentativen Messung des O_2 -Verbrauchs einer einzelnen HEK-293-Zelle über die Zeit. A) Eine Pt-Ultramikroelektrode (UME, \varnothing 10 μ m) wurde 10-12 μ m über einer einzelnen HEK-293-Zelle positioniert und der Strom für 30 s aufgezeichnet (obere Messpunkte-Reihe). Anschließend wurde die UME 50 μ m von der Zelle entfernt positioniert und der Strom für 30 s aufgezeichnet (untere Messpunkte-Reihe). i + iii) Schema der UME über (i) bzw. neben (iii) der Zelle; ii + iv) Durchlichtmikroskopie-Bild der UME über (ii) bzw. neben (iv) einer HEK-293-Zelle B) Aus A) abgeleiteter Verlauf des O_2 -Signals über der Zelle (rot, I_{Zelle}) und im zellfreien Bereich (schwarz, $I_{Zellfrei}$). Daraus wurde die Differenz zwischen zellfreiem Messbereich und Messbereich über der Zelle errechnet (grün, $I_{Verbrauch}$). Diese kann als O_2 -Verbrauch der Zelle über die Zeit betrachtet werden. C) Kontrolle der Messung durch Positionierung der Elektrode $>$ 1 mm über der Zellebene und weiterer dynamischer Messung an 2 Positionen. Δ Strom = $|I_{Zellfrei} - I_{Zelle}|$. Pt-UME vs. Ag/AgCl bei -700 mV, in D-PBS + 5 mM Glucose. Messbalken = 10 μ m.

3.4.2 Einfluss von Coenzym Q10 auf die Respiration von HEK-293-Zellen

Coenzym Q10 (CoQ10) ist ein Ubichinon, welches in allen menschlichen Zellen vorkommt und eine essenzielle Rolle im Zellmetabolismus, vor allem in der Redox-Homöostase spielt. CoQ10 ist eine Komponente der Elektronentransportkette in den Mitochondrien. In Experimenten an isolierten Maus- und Rindermitochondrien konnte gezeigt werden, dass CoQ10, sowie die hydroxylierte Variante OH-CoQ10 den Sauerstoffverbrauch verringern, d. h. die Atmung hemmen (Slowik, 2019). Aus diesem Grund wurden mögliche Auswirkungen von CoQ10 und OH-CoQ10 auf die Respiration von lebenden HEK-293-Zellen elektrochemisch untersucht.

Ergebnisse

Dazu wurden HEK-293-Zellen entweder mit 10 μM CoQ10, CoOH-Q10 (jeweils gelöst in EtOH, Endkonzentration im Messpuffer 1 % (v/v)) oder als Kontrolle mit 1 % (v/v) EtOH für 15 min vorinkubiert. Die elektrochemische O_2 -Messung einer einzelnen Zelle wurde dann wie in 3.4.1 beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung des relativen O_2 -Verbrauchs innerhalb von 10 Minuten wurde für jeden Messpunkt folgende Formel verwendet:

$$\text{O}_2 - \text{Verbrauch}_{rel.} = \frac{I_{Zellfrei} - I_{Zelle}}{I_{Zellfrei}}$$

Hierbei ist $I_{Zellfrei}$ der Strom im zellfreien Bereich und I_{Zelle} der Strom über der Zelle, wobei für jeden I_{Zelle} ein eigener, korrespondierender $I_{Zellfrei}$ gemessen wird, da sich die $[\text{O}_2]$ im zellfreien Bereich sich über die Zeit ändern und in jedem Versuch unterschiedlich sein kann. Dabei wird zuerst $I_{\text{Verbrauch}}$ ($= I_{Zellfrei} - I_{Zelle}$), wie in 3.3.1 beschrieben, für jeden Messpunkt ermittelt. Zur Berechnung des relativen, prozentualen O_2 -Verbrauchs wurde jeder $I_{\text{Verbrauch}}$ auf den entsprechenden $I_{Zellfrei}$ normiert. Da die Stromstärke linear mit der $[\text{O}_2]$ korreliert, kann der $I_{Zellfrei}$ als relative $[\text{O}_2]_{Zellfrei}$ betrachtet werden und damit der relative O_2 -Verbrauch als die Verringerung der $[\text{O}_2]$ in der direkten Umgebung der Zelle.

Unbehandelte und mit 1 % EtOH behandelte Zellen zeigten den gleichen O_2 -Verbrauch, er betrug $0,8 \pm 0,2$ % der $[\text{O}_2]_{Zellfrei}$ ($n = 5$). Anders ausgedrückt verringerte die Zelle die $[\text{O}_2]$ des Puffers in ihrer direkten Umgebung um weniger als 1%. CoQ10-behandelte Zellen zeigten einen etwas geringeren relativen O_2 -Verbrauch von $0,75 \pm 0,2$ % von $[\text{O}_2]_{Zellfrei}$ (Abb. 35 B), was einer Reduktion auf 89 % des O_2 -Verbrauchs unbehandelter Zellen entsprach (Abb. 35 C, $n = 5$). Bei OH-CoQ10 behandelten Zellen war der O_2 -Verbrauch noch deutlicher reduziert, er betrug $0,55 \pm 0,1$ % der Konzentration im zellfreien Bereich (Abb. 35 B), was einer Reduktion auf 68 % des Verbrauchs unbehandelter Zellen entsprach (Abb. 35 C, $n = 5$). Die Behandlung von HEK-293-Zellen mit OH-CoQ10, bzw. CoQ10 führte also zu einer signifikanten Hemmung der Respiration.

Ergebnisse

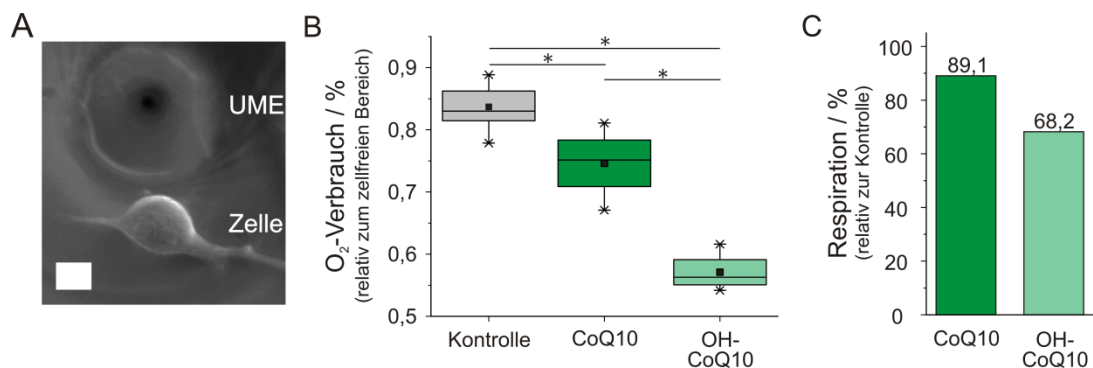


Abbildung 35 - Effekt von CoQ10 und OH-CoQ10 auf den O₂-Verbrauch von HEK-293-Zellen.

Eine Pt-UME wurde 10-12 μm über einer einzelnen HEK-293-Zelle positioniert und der Stromverlauf „dynamisch“ gemessen (siehe Beschreibung im Text und Abb. 34). A) Durchlichtmikroskopie-Bild einer repräsentativen HEK-293-Zelle sowie der UME. Balken = 10 μm . B) Durchschnittlicher O₂-Verbrauch der HEK-293-Zelle, angegeben in % des Sauerstoffsignals des zellfreien Bereichs. Dazu wurde für jede Messung ein Zeitrahmen von 10 Minuten analysiert. C) Respiration der HEK-293-Zelle, angegeben in % des Sauerstoffverbrauchs relativ zu unbehandelten Zellen (= Kontrolle). HEK-293-Zellen für 15 min in 10 μM CoQ10/OH-CoQ10 bei RT vorinkubiert, bei allen Zellen 1% (v/v) EtOH, Pt-UME vs. Ag/AgCl bei -700 mV, in D-PBS (+5 mM Glucose), Whisker-Box-Plots stellen Min-Max, 25-Median-75% Interquartile dar. Jeweils n = 5.

In diesem Teil der Arbeit konnte eine Methode vorgestellt werden, um den Sauerstoffverbrauch von lebenden Einzelzellen elektrochemisch zu messen. Mit diesen Messungen wurde gezeigt, dass CoQ10, sowie OH-CoQ10 die Atmung von lebenden HEK-293-Zellen hemmen, was bisher nur an isolierten Mitochondrien nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

Als Hauptziele dieser Arbeit wurden die Etablierung und Charakterisierung elektrochemischer Messungen für physiologische Parameter auf Einzelzellebene formuliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten elektrochemische Messmethoden zur Messung von H_2O_2 sowie O_2 auf Einzelzellebene etabliert und charakterisiert werden. Zusätzlich wurde eine Kombination von elektrochemischen mit fluoreszenzmikroskopischen Messungen vorgestellt, die es erlaubt, H_2O_2 an ein und derselben Zelle intra- und extrazellulär zu bestimmen.

4.1 Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden

Funktionelle Arbeitselektroden sind eine Voraussetzung für sensitive und reproduzierbare elektrochemische Messungen. Für die Bestimmung von H_2O_2 sowie O_2 sind Pt-Ultramikroelektroden (UME) mit geringem Rg-Wert das Mittel der Wahl. Platin katalysiert spezifisch H_2O_2 -Redoxreaktionen ohne zusätzlichen Redox-Mediator. Reines Platin ist weitgehend inert und hat keinen Einfluss auf lebende Zellen (nicht zu verwechseln mit Platin-Komplexen, die unter Umständen toxisch sein können (Dannen et al., 2020; Rosenberg, 1971)). Da passende UME nicht käuflich erwerbbar waren, war ein Hauptziel dieser Arbeit ein Protokoll zu etablieren, um diese UME schnell, einfach und reproduzierbar herzustellen. Das hier vorgestellte Verfahren erfüllt diese Bedingungen und liefert Elektroden, die eine gut kontrollierbare Elektrodengeometrie aufweisen. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Elektrodenqualität über zyklische Voltammetrie konnte ebenso etabliert werden (Abb. 14). In Herstellungsverfahren anderer Labore wird der aktive, leitfähige Draht-Kern der Elektrode mit einer offenen Flamme (z. B. einem Bunsenbrenner) eingeschmolzen und die Elektrode danach zugeschliffen (z.B. Zoski, 2007), was, um einen ausreichend geringen Rg-Wert zu erhalten, zeitaufwändig ist und langwierige Erfahrung benötigt. Daher adaptierten wir ein Herstellungsverfahren, bei dem der Draht in vorgezogene Kalknatronglas-Kapillaren eingeführt und dann eingeschmolzen wird. Die Anpassung des Protokolls um die für unsere Messungen benötigte veränderte Spitzengeometrie zu erreichen führte zu weniger bruchgefährdeten Elektroden. Durch die breitere Spitze und den stark konischen Zulauf wird außerdem keine Vakuumpumpe mehr benötigt (wie es im Ausgangsprotokoll der Fall war (Danis et al., 2015)), um einen Luftblasen-freien Einschluss des Pt-Drahts zu gewährleisten, was die Herstellung vereinfacht und beschleunigt. Allerdings sind Verfahren, welche auf die Schwingung einer langen Elektrodenspitze angewiesen sind (z. B. *shear force sensing*) mit den hier vorgestellten Elektroden aufgrund der kürzeren Spitze nicht möglich (Bard & Mirkin,

2012). Mit dem hier vorgestellten Verfahren können auch Elektroden mit einer anderen Geometrie konstruiert werden: Ersetzt man die Kalknatronglas-Kapillare durch eine Kapillare, die zwei getrennte Röhren besitzt (sogenannte Theta-Profil- oder *double-barrel* (dt. Doppelrohr)-Kapillaren), sind Elektroden denkbar, bei denen ein Rohr als Arbeitselektrode für SECM-Messungen und das andere Rohr für andere Techniken, z. B. Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (*scanning ion conductance microscopy*, SICM) genutzt werden kann. Solche Elektroden wurden von Takahashi und Kollegen dazu benutzt, um an Neuronen simultan topografische Profile über SICM und eine Neurotransmitter-Freisetzung über SECM zu bestimmen (Takahashi et al., 2011). Ebenso wäre ein Mikrofluidik-System in einem Rohr der Kapillare denkbar, um so gezielt an einer Zelle Reagenzien applizieren zu können. Die Herstellung von UME mit anderen (z. B. Gold oder Carbon) oder kleineren elektrischen Kernen benötigt nur minimale Anpassungen des Protokolls. Erste Versuche mit Antimon-Ultramikroelektroden für potentiometrische pH-Messungen und UME mit kleineren Spitzendurchmessern wurden bereits durchgeführt.

Tests mit den so hergestellten UME ergaben allerdings, dass Messungen bei physiologischen Temperaturen um 37° C nicht möglich waren (siehe Abb. 15), da ein Erhöhen der Temperatur zu einem deutlichen Anstieg der Rausch-Amplitude und somit zu einem stark verringerten Signal-Rausch-Verhältnis führte. Kleine Stromsignale wurden durch das Rauschen maskiert und konnten nicht mehr aufgelöst werden. Verschiedene Hypothesen zur Herkunft des Rauschens können aufgestellt werden: (1) Durch die höhere Temperatur laufen elektrochemische (Hintergrund)-Prozesse schneller ab, was zu einer Erhöhung des Hintergrund-Signals (also des Rauschens) führt (siehe 1.3.2 *Randles-Sevcik*-Gleichung). Allerdings sollte dann auch die Amplitude des Signals ansteigen, was nicht immer der Fall war. (2) Ein Temperaturgradient vom Rand zur Mitte des Schälchens führt zu Änderungen der Konvektion des Messpuffers und zu Schwingungen der Elektrodenspitze, was das Rauschen verstärkt. Tests mit Elektroden unterschiedlicher Spitzengeometrie zeigten dieselben Ergebnisse, ebenso führte das Vorwärmen des Messpuffers (was den Temperaturgradienten aufhebt) zu keiner Verbesserung. (3) Durch Temperatur-Änderung kommt es zur Kapazitäts-Änderung der UME und somit zu kapazitiven Strömen. Eine Verringerung der Kapazität der UME durch Beschichtung mit einem Organopolysiloxan (*Sigmacote*) brachte keine Verringerung des Rauschens bei erhöhten Temperaturen. Elektrische Interferenzen durch die zusätzlichen technischen Komponenten des Heiz-Systems

konnten durch Abschirmen und Abbauen der einzelnen Bauteile ausgeschlossen werden. Die Ursache des erhöhten Rauschens war somit nicht festzustellen und auch nicht zu beheben. Ein Ansatz, um Messungen bei physiologischer Temperatur durchführen zu können, wäre das Erhöhen des Signal-Rausch-Verhältnisses über eine Verstärkung des Signals durch Beschichtung der Elektroden-Oberfläche. Möglich wäre ein Überzug mit Eisenhexacyanidoferrat (= Preußischblau, PB) (Karyakin et al., 1999) oder einer Kombination aus PB mit Nickel-Hexacyanoferrat (Komkova et al., 2013). Dass PB keinen Einfluss auf die Zell-Viabilität hat, wurde an mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen (Wen et al., 2018). 2016 zeigten Marquitan und Kollegen intrazelluläre Messungen von H_2O_2 an murinen Makrophagen mit PB-modifizierten Kohlenstoff-Nanoröhren (Marquitan et al., 2016). Um zu überprüfen, ob das Rauschen doch an den Temperaturunterschieden der verschiedenen Komponenten des Messsystems liegt, wäre eine weitere Möglichkeit, das komplette System in einer Inkubationskammer aufzubauen, was alle Bestandteile des Systems auf dieselbe Temperatur bringen würde. Damit wäre es gleichfalls möglich, über eine CO_2 -Begasung Standard-Zellkultur- und dadurch noch besser physiologische Bedingungen zu gewährleisten und Langzeit-Versuche über mehrere Tage durchzuführen. Auch eine N_2 -Begasung zur Schaffung verringerter O_2 -Konzentrationen wäre denkbar, um Versuche unter Hypoxie-Bedingungen durchführen zu können, wobei allerdings beachtet werden muss, dass sich die elektrochemischen Eigenschaften des Systems durch den Wegfall von O_2 für elektrochemische Reaktionen ändern.

4.2 Chronoamperometrische H_2O_2 -Messungen

Das zweite Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung und Anwendung chronoamperometrischer H_2O_2 -Messungen sowie deren Quantifizierung. Um die Auswirkungen von H_2O_2 auf intra- und interzelluläre Signalkaskaden besser verstehen zu können, sind lokale, quantifizierbare Messungen von H_2O_2 auf Einzelzellebene notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass chronoamperometrische Bestimmungen von H_2O_2 in einem physiologischen Konzentrationsbereich über mehrere Größenordnungen hinweg linear sind (Abb. 16). Allerdings zeigte sich, dass zwischen einzelnen Messungen Unterschiede in der Stromstärke und somit dem Kalibrierungsfaktor (Stromstärke / $[\text{H}_2\text{O}_2]$) auftraten. Diese Unterschiede in den Messungen können auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden: Eine Änderung der elektrochemisch aktiven Oberfläche (*electrochemically active surface area*, ECA) der Elektrode, also in dem Bereich, in dem die elektrochemischen

Reaktionen an der Elektrode ablaufen (McCrum & Janik, 2017; Zoski, 2007). Dies ist u. A. der Fall, wenn für unterschiedliche Messungen unterschiedliche Elektroden benutzt werden, da diese nie die exakt gleiche Spitzen-Topografie aufweisen. Eine Änderung der ECA kann aber auch an der gleichen Elektrode stattfinden, z. B. wenn die Pt-Oberfläche maskiert wird. Relevant für die von uns verwendeten Elektroden ist dabei wahrscheinlich hauptsächlich die Bildung von Pt-Oxiden (Burke & Morrissey, 1996; Chen et al., 2011; Hall et al., 1997). Eine Adsorption organischer (z. B. von Zellen produzierter) oder sonstiger (z. B. in der Messlösung vorliegender) Substanzen kann ebenfalls die ECA und somit das Strom-Signal verändern (Chen et al., 2011; Doña Rodríguez et al., 2000). Zusätzlich kann die Temperatur (vgl. 1.3.2 *Randles-Sevcik*-Gleichung), sowie das lokale pH-Milieu (Amatore et al., 2010) die Stromstärke beeinflussen. Aus all diesen Gründen ist für jedes Experiment eine spezifische Kalibrierung am Ende jeder Messung notwendig. Eine einfache und schnelle Methode dazu wurde in dieser Arbeit vorgestellt. Mit Hilfe dieser Kalibrierung ist es möglich, die Änderung des Stromes in die Änderung der lokalen $[\text{H}_2\text{O}_2]$ umzurechnen und darzustellen (Abb. 17). Dabei reflektiert die Änderung des Stromes die Änderung der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in einem kleinen Volumen um die Elektrode (= Messbereich der Elektrode). Dieses Volumen kann als Halbkreis um die Elektrodenspitze abstrahiert werden, da an UME eine hemisphärische Diffusion herrscht (Abb. 18; Bard & Faulkner, 2001; Heinze, 1993). Der Analyt diffundiert vom Ort der Produktion weg und wird von der Elektrodenspitze abgefangen. Bei Elektroden, die deutlich größer sind als das Substrat welches den Analyten produziert (z. B. eine Zelle), ist eine Kollektionseffizienz von 100% gegeben. Bei konstanter Produktionsrate des Analyten wird ein Fließgleichgewicht des Stromes erreicht, wobei der Diffusionskoeffizient keinen Einfluss auf die Stromstärke hat. Ein höherer Diffusionskoeffizient sorgt dabei lediglich für ein schnelleres Eintreten des Fließgleichgewichtes, hat aber keinen Einfluss auf die Stromstärke (Martin & Unwin, 1998).

Da sowohl primäre, als auch Zellen aus immortalisierten Zelllinien ungleichmäßige Formen aufweisen können und in unserem Fall die UME oftmals gleich groß oder kleiner als die produzierende Zelle ist, muss davon ausgegangen werden, dass nicht das komplette von der Zelle produzierte H_2O_2 erfasst werden kann. Von der Zelle extrazellulär gebildetes H_2O_2 diffundiert in alle Richtungen von der Zelle weg, ein Teil dieses Diffusionsfeldes wird vom Messbereich der Elektrode abgedeckt und das dortige H_2O_2 wird gemessen. Eine Schwierigkeit bei dieser Abstrahierung ist die genaue Positionierung der Elektrode über einer Zelle, um eine

für alle Messungen vergleichbare Überlappung von Diffusionsfeld um die Zelle und Messbereich der Elektrode zu erhalten. Daher ist vor allem eine exakte z-Position der UME wichtig, um in allen Messungen eine vergleichbare Distanz zwischen Zelle und Elektrode zu gewährleisten. Allerdings darf diese Distanz nicht zu niedrig sein, damit keine Diffusionslimitierung des Stromes auftritt. Die Distanz sollte idealerweise dem Durchmesser des Kerns der Elektrode entsprechen (Bard & Mirkin, 2012), in unserem Fall also 10 μm . Um eine präzise Distanz zwischen Zelle und UME einzustellen, sind mehrere Ansätze denkbar. Im Prinzip können Annäherungskurven im *Feedback*-Modus erstellt werden (siehe 1.3.7.1) da bei geringer Distanz zwischen UME und einer Oberfläche Änderungen in der Diffusion entstehen und man damit die genaue z-Position darstellen kann. Allerdings sind Annäherungen an lebende Zellen schwierig, da Zellen manchmal vor der Elektrode zurückweichen, wenn man ihnen zu nahe kommt (Dunn et al., 2011). Eine Kombination mit Methoden zur Bestimmung von Topografieprofilen von Zellen, wodurch man auch die genaue z-Position der Elektrode ableiten kann, konnte bereits demonstriert werden, z. B. mit SICM (Page et al., 2017; Takahashi et al., 2011) oder mit Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM; (Wiedemair et al., 2009)). Eine Kombination dieser Methoden ist allerdings komplex und zeitaufwändig, daher sind sie für eine reine Positionierung der Elektrode eher nicht geeignet. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz, die z-Positionierung der UME über eine optische Fokus-Kontrolle vorzunehmen, ist schnell, unkompliziert und reproduzierbar.

Ein Anwendungsbeispiel für chronoamperometrische Messungen von H_2O_2 sind die hier durchgeführten Messungen an Monozyten (MZ). Stimulation von einzelnen, primären, humanen MZ (hMZ) mit dem Phorbol ester PMA veranlasste sie, extrazellulär H_2O_2 zu produzieren, was nach 10-15 min zu einem Eintreten eines Fließgleichgewichtes an der UME als Strom-Plateau führte (Abb. 19). Dies lässt darauf schließen, dass MZ eine gewisse, konstante H_2O_2 -Produktion aufweisen, welche zu einer Erhöhung der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in unmittelbarer Nähe eines einzelnen hMZ von $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ führte (Abb. 19). Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund der Diffusion nicht das komplette extrazellulär von der Zelle produzierte H_2O_2 erfasst wird (s. o.) und MZ selbst ebenfalls H_2O_2 eliminieren können (Bozem et al., 2018). Daher ist dieser Wert als „netto-Produktion“, also einer Kombination aus Produktion und Eliminierung von H_2O_2 in dem Messbereich der Elektrode zu verstehen. Die absolute Menge ist daher als noch höher anzunehmen. Durch Hemmen der NOX-Enzyme konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre H_2O_2 -Produktion hauptsächlich auf diese Enzyme

zurückzuführen ist (Abb. 20). In Monozyten sind vor allem NOX2-Enzyme ausgeprägt (Saul et al., 2016). Es kann natürlich nicht komplett ausgeschlossen werden, dass extrazelluläres H_2O_2 auch aus anderen Quellen stammt. Sollte das der Fall sein, sind die Mengen so gering, dass sie außerhalb des Sensitivitätsbereichs der elektrochemischen Messung liegen.

Die räumliche Verteilung des von einem einzelnen hMZ produzierten H_2O_2 konnte über Abrastern der Zelle (= *scanning electrochemical microscopy*, SECM-Messung) dargestellt werden (Abb. 24). Dabei sah man, dass H_2O_2 in einem Abstand von 20 μm zum hMZ messbar war. Denkbar ist, dass einzelne hMZ andere Zellen in der Umgebung über H_2O_2 -Produktion oder -Eliminierung beeinflussen können. Ein Beispiel für eine Beeinflussung durch H_2O_2 sind natürliche Killerzellen, welche ihre Zielzellen schneller finden und eliminieren, wenn „Beobachter (*bystander*)“-Zellen um sie herum H_2O_2 produzieren (Zhou et al., 2017). SECM-Messungen könnten auch benutzt werden, um H_2O_2 -Profile von Zell-Bereichen, z. B. von immunologischen Synapsen zwischen T- und Zielzellen zu untersuchen. Es wurde bereits gezeigt, dass H_2O_2 die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion und damit die Toxizität von T-Zellen erhöht (Gill & Levine, 2013).

Ein inhärentes Problem von SECM-Experimenten ist, dass jeder Messpunkt der x-y-Koordinaten nacheinander von der UME angefahren und abgebildet wird. Dadurch wird jeder Messpunkt zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt leicht versetzt aufgenommen. Bei schnell ablaufenden Reaktionen können so Informationen verloren gehen. Um den zeitlichen Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Punkt zu minimieren, muss möglichst schnell über die Probe gescannt werden. Ein zu schnelles Scannen kann allerdings zu einer Verzerrung des Bildes führen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine mathematische Korrektur dieser Verzerrung über eine Wiener-Dekonvolution möglich ist (Abb. 25). Voraussetzung für das Anwenden der Wiener-Dekonvolution ist, dass sich das Rauschen gleichmäßig über die Datenpunkte verteilt (Brown & Hwang, 2012; Wiener, 1949). Die Verzerrung des Bildes durch das „Schleifen“ des Signals verteilt sich gleichmäßig über alle Datenpunkte einer Reihe, da sich die Elektrode mit konstanter Geschwindigkeit bewegt. Ein Nachteil der Wiener-Dekonvolution ist allerdings, dass es sich um eine sogenannte blinde Dekonvolution handelt, also eine Dekonvolution, die nicht die exakte Umkehrfunktion der „Verzerrungs-Funktion“ anwendet. Für eine optimale Dekonvolution müssen alle Prozesse, die zur Verzerrung des Bildes führen, bekannt und mathematisch berechenbar sein, um die Umkehrfunktion dazu erstellen zu können. Da viele Faktoren zur Verzerrung des Signals

führen, unter anderem eine Verzögerung des Eintretens des Fließgleichgewichts, Kapazitätsänderungen der Elektrode durch Bewegung und Veränderungen der elektrochemischen Doppelschicht, ist eine Bestimmung der mathematischen Funktion komplex und zeitaufwändig. In dieser Arbeit wurde nur ein konzeptioneller Entwurf des Prinzips der blinden Dekonvolution für SECM-Bilder erarbeitet. Dieser Entwurf ist durch weitere SECM-Experimente von Objekten mit bekannter Form, im negativen und positiven *Feedback*-Modus mit unterschiedlichen Scan-Geschwindigkeiten zu überprüfen. Um eine Aussage über die Anwendung an lebenden Zellen, z. B. an Aktivitätsprofilen treffen zu können, müssen ähnliche Experimente im *Substrate Generation/Tip Collection* Modus durchgeführt werden.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für chronoamperometrische Messungen von Produktion und Eliminierung von H_2O_2 sind die hier durchgeführten Untersuchungen an murinen MZ (mMZ). Es ist bekannt, dass sich MZ eines Organismus mit dessen Lebensalter verändern, sie zeigen z. B. eine unterschiedliche Verteilung der Subtypen (Metcalf et al., 2016; Seidler et al., 2010) und veränderte Oberflächenprotein- und Rezeptor-Expressionen (Seidler et al., 2010). Daher wurde der Einfluss des Lebensalters der Maus auf die Produktion und Eliminierung von H_2O_2 durch ihre MZ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mMZ älterer (80-102 Wochen) Mäuse dazu tendieren etwas mehr H_2O_2 zu produzieren als MZ aus jüngeren, ausgewachsenen (16-22 Wochen) Mäusen, der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Die Eliminierung beider Altersstufen war ähnlich hoch und unterschied sich nicht signifikant voneinander (Abb. 26). Eine qualitative Validierung der Experimente an Einzelzellen wurde über einen modifizierten Amplex UltraRed-Assay an mMZ-Zellpopulationen durchgeführt, welcher die Resultate der elektrochemischen Messungen bestätigte (Abb. 27). Die Tendenz von mMZ älterer Mäuse mehr H_2O_2 zu produzieren als die von jüngeren Mäusen ist im Einklang mit der Literatur; Granulozyten älterer Menschen (50-59 Jahre) produzieren mehr ROS als Granulozyten jüngerer Menschen (20-29 Jahre; Martins Chaves et al., 2007). Allerdings muss beachtet werden, dass die Mäuse, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, in einem spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierstall gehalten wurden und dadurch nicht in Kontakt mit Keimen von der Außenwelt kamen. Das kann dazu führen, dass das Immunsystem dieser Tiere sich vom „normalen“ Immunsystem unterscheidet, welches im Laufe des Lebens von vielen verschiedenen Pathogenen herausgefordert wird (Beura et al., 2016; Reese et al., 2016).

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit chronoamperometrische Messungen von H_2O_2 an Einzelzellen sowie deren Quantifizierung etabliert, charakterisiert und ihre Anwendung demonstriert werden. Die Vorteile dieser Messmethode im hier dargestellten Ansatz mit nicht-modifizierter Pt-UME sind die hohe Sensitivität für H_2O_2 (500 nM), die Linearität in einem physiologischen H_2O_2 -Bereich bis 1 mM, sowie die zeitliche Auflösung der Messung (>1 Hz bis mehrere kHz). Mit den gleichen Pt-UME ist eine Sensitivität bis 5 nM bei *Squarewave Voltammetry*-Messungen zu erreichen. Allerdings sind solche Experimente an Zellen über längere Zeit nicht durchführbar (Bozem et al., 2018). Das hier dargestellte Messverfahren ermöglicht die Quantifizierung der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ an jedem Messpunkt. Zusätzlich können dynamische Veränderungen, wie H_2O_2 -Produktion als auch -Eliminierung einer einzelnen Zelle, in Echtzeit über die Zeit verfolgt werden, was mit anderen Verfahren (wie z. B. mit Amplex UltraRed) bisher nicht möglich war. Nachteile der Messungen sind der relativ komplexe Versuchsaufbau, und ein für Rauschen anfälliges System, dass eine genaue Kalibrierung und Abschirmung benötigt. Auch dass (momentan) keine Messungen bei physiologischer Temperatur möglich sind, ist anzumerken. Mit 10 μm -Pt-UME ist eine Bestimmung von H_2O_2 nur extrazellulär möglich. Zur intrazellulären elektrochemischen Messung muss der Durchmesser der Elektrode deutlich kleiner sein. Solche sogenannten Nano-Elektroden wurden z. B. zur Bestimmung von intrazellulärem H_2O_2 (Marquitan et al., 2016) oder kombinierter Messung intrazellulärer ROS und RNS (Y. Wang et al., 2012) verwendet. Dabei sollte allerdings bedacht werden, dass eine Punktierung der Zellmembran Stress für die Zelle bedeutet (Cooper & McNeil, 2015; Tang & Marshall, 2017), was sich möglicherweise in einer erhöhten ROS-Produktion widerspiegelt.

4.3 Kombinierte elektrochemische und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen

Da nicht nur die H_2O_2 -Veränderungen außerhalb der Zelle von Interesse sind, sondern auch intrazelluläre Veränderungen, können simultane Messungen von intra- und extrazellulärem H_2O_2 an derselben Einzelzelle Einblicke in das Zusammenspiel intra- und extrazellulärer H_2O_2 -Effekte und zugrunde liegender Prozesse ermöglichen. Das dritte Hauptziel dieser Arbeit war daher die Etablierung und Anwendung kombinierter chronoamperometrischer (SECM), extrazellulärer H_2O_2 -Messungen mit fluoreszenzmikroskopischen (FM), intrazellulären H_2O_2 -Messungen, hier als SECM-FM bezeichnet.

Dazu wurden Zellen verwendet, die intrazelluläre, genetisch kodierte H_2O_2 -Sensoren bildeten, nämlich roGFP2-orp1, bzw. HyPer-3. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass kombinierte chronoamperometrische und fluoreszenzmikroskopische Bestimmungen von H_2O_2 an Einzelzellen möglich sind und die beiden Messmethoden sich nicht gegenseitig beeinflussen. Sowohl das elektrochemische (Strom-)Signal, als auch das (Fluoreszenz-)Signal des intrazellulären Sensors änderte sich bei kombinierten SECM-FM Messungen auf die gleiche Weise, so, wie wenn die jeweilige Methode einzeln angewendet wurde. Bei Experimenten an HEK-293-Zellen veränderte sich das (extrazelluläre) Stromsignal linear zur $[\text{H}_2\text{O}_2]$, während das (intrazelluläre) HyPer-3-Signal einen sigmoidalen Verlauf relativ zur extrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ aufwies (Abb. 28). Der sigmoidale Verlauf des Fluoreszenzsignals, ausgehend von der minimalen extrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{ez}$), die ein Signal erzeugt ($5 \mu\text{M} [\text{H}_2\text{O}_2]_{ez}$) bis zu Sättigung des Sensors ($< 100 \mu\text{M} [\text{H}_2\text{O}_2]_{ez}$), ist ebenso in der Literatur beschrieben (Belousov et al., 2006). Zu beachten ist allerdings, dass in der Arbeit von Belousov und Kollegen eine Sättigung des Sensors in COS-Zellen (einer Fibroblasten-Zelllinie aus Affen) etwas früher (bei $\sim 50 \mu\text{M} [\text{H}_2\text{O}_2]_{ez}$) erreicht wurde, als bei uns an HEK-293-Zellen (einer menschlichen Nieren-Zelllinie). Da der Sensor mit intrazellulären Zellbestandteilen, vor allem Redox-Mediatoren wie Glutaredoxinen oder Peroxiredoxinen um H_2O_2 konkurriert, ist das Signal des Sensors auch von den Konzentrationen dieser Bestandteile abhängig. In unterschiedlichen Zelltypen können diese unterschiedlich stark ausgeprägt sein (Hanschmann et al., 2013).

Für roGFP2-orp1 konnte gezeigt werden, dass der Sensor sowohl am *ELP3* als auch am *Axio Observer* gleich gut oxidiert bzw. reduziert werden konnte (Abb. 31). Da an den beiden Systemen unterschiedliche Fluoreszenz-Filter und -Lichtquellen benutzt wurden, gab es technisch bedingt leichte Differenzen in den Fluoreszenzwerten.

Licht kann bei verschiedenen Wellenlängen einen fotoelektrischen Strom hervorrufen (Hertz, 1887). Daher ist für jeden Fluoreszenzfarbstoff oder -sensor, welcher in kombinierten SECM-FM-Messungen benutzt werden soll, zu überprüfen, ob das Lichtsignal den gemessenen Strom beim gewählten Potential beeinflusst. Bei kombinierten SECM-FM-Messungen mit den beiden Sensoren (roGFP2-orp1 und HyPer-3) in den entsprechenden Wellenlängenbereichen kam es zu keinen lichtinduzierten Artefakten in der elektrochemischen Messung.

Ob unter physiologischen Bedingungen intrazellulär produziertes H_2O_2 die Zelle verlässt oder nicht, ist nicht geklärt und kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit wurde ein System zur kontrollierten, intrazellulären H_2O_2 -Produktion benutzt, welches eine simultane Messung von

intrazellulärem H_2O_2 ermöglicht. Dabei handelt es sich um eine D-Aminosäure-Oxidase (DAAO), welche D-Aminosäuren unter Bildung von H_2O_2 oxidativ desaminiert. Das Enzym ist an HyPer gekoppelt (HyPer-DAAO), was die Messung des intrazellulären H_2O_2 durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Durch kombinierte SECM-FM-Messungen konnte gezeigt werden, dass nach intrazellulärer H_2O_2 -Produktion durch die D-Aminosäure-Oxidase extrazellulär kein H_2O_2 messbar war (Abb. 30). Es ist also anzunehmen, dass H_2O_2 innerhalb der Zelle effizient eliminiert wird, vor allem durch Redox-Mediatoren wie Thioredoxine (Trx). Dies konnte von Mishina und Kollegen gezeigt werden, die einen Trx-abhängigen H_2O_2 -Gradienten im Cytosol von HeLa-Zellen darstellen konnten (Mishina et al., 2019). Zukünftige, kombinierte SECM-FM-Experimente, bei denen verschiedene intrazelluläre Redox-Mediatoren und Abbau-Mechanismen gehemmt werden, können weitere Hinweise darauf geben, wie sich H_2O_2 in der Zelle verteilt und welche Mechanismen verhindern, dass es die Zelle verlässt. Möglich ist auch, dass H_2O_2 mit der Zellmembran interagiert (Siddique et al., 2012) und deshalb außerhalb der Zelle nicht messbar ist. Dies könnte z. B. über eine Messung der Lipidperoxidation überprüft werden. Allerdings könnte die Konzentration von H_2O_2 , welche die Zelle verlässt, so niedrig sein, dass sie chronoamperometrisch nicht detektiert werden kann. Mishina und Kollegen schätzten die durch DAAO produzierte Menge auf sub-mikromolare Mengen, ca. 200 nM. Allerdings ist zu beachten, dass sie in den Zellen eine DAAO-Variante überexprimierten, die im Nukleus lokalisiert war (Mishina et al., 2019), im Gegensatz zum von uns verwendeten, global (außer im Nukleus) exprimierten Fusionskonstrukt. Um kleinste Mengen extrazellulären H_2O_2 zu bestimmen, können andere Verfahren, die sensitiver sind, angewendet werden (z. B. *Squarewave Voltammetry* oder Amperometrie mit modifizierten Elektroden („dritte Generation“; Gulaboski et al., 2019). Akkumuliertes H_2O_2 von Zell-Suspensionen könnte z. B. mit ESR-Spektroskopie oder einem Amplex UltraRed-Assay bestimmt werden.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für SECM-FM-Messungen von H_2O_2 sind die hier durchgeführten Untersuchungen an transgenen, *roGFP2-orp1*-exprimierenden mMZ. Die Zellen exprimierten den Sensor entweder cytosolisch (*cyto-roGFP2-orp1*) oder mitochondrial (*mito-roGFP2-orp1*). mMZ wurden entweder mit PMA (zur NOX-Aktivierung über die Proteinkinase C) oder mit Angiotensin II (AT-II; zur NOX-Aktivierung über membranständige Angiotensin-Rezeptoren) stimuliert. Beide Behandlungen führten zu einem Anstieg sowohl des cytosolischen, als auch des mitochondrialen H_2O_2 -Signals (Abb. 32). Der

Anstieg des intrazellulären H_2O_2 ist für beide Stimulanzen zu erwarten und mit anderen Messmethoden in der Literatur hinreichend belegt (El Bekay et al., 2003; Escobales et al., 2019; Kuwabara et al., 2015; H. B. Lee et al., 2004; Nguyen Dinh Cat et al., 2013; C. Wang et al., 2018). Interessanterweise konnte bei transgenen mMZ weder mit PMA, noch mit AT-II, weder in *cyto-roGFP2-orp1*- noch in *mito-roGFP2-orp1*-exprimierenden Zellen eine Veränderung der extrazellulären H_2O_2 -Konzentration hervorgerufen werden. In verschiedenen Studien wurde jedoch für beide Stimulanzen ein Anstieg des extrazellulären H_2O_2 berichtet (El Bekay et al., 2003; Liang et al., 2018). Allerdings ist zu beachten, dass in der Arbeit von El Bekay und Kollegen Messungen an humanen neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurden. Außerdem benutzten sie zur Bestimmung von ROS die Chemilumineszenz von Luminol, welche unspezifisch globales (intra- sowie extrazelluläres) ROS, hauptsächlich $\text{O}_2^{\cdot-}$ misst. Zur Bestimmung der extrazellulären ROS benutzten sie eine Methode zur Messung der Oxidation von Phenolrot (El Bekay et al., 2003). Dabei ist nicht auszuschließen, dass andere Oxidantien mit Phenolrot reagieren und Messergebnisse durch die pH-Abhängigkeit von Phenolrot beeinflusst wurden. Die Ergebnisse von Liang und Kollegen beruhen auf einer anderen Zell-Art (Endothelzellen), sowie einem Lucigenin-Assay zur Bestimmung der NOX-Aktivität, bestimmen also auch nicht selektiv extrazelluläres H_2O_2 (Liang et al., 2018). Eine weitere Erklärung unserer abweichenden Ergebnisse mit mMZ könnte sein, dass sie auf AT-II nur schwach reagieren und extrazellulär so wenig H_2O_2 gebildet wird, dass es unter der Nachweisgrenze chronoamperometrischer Methoden liegt.

Vorangegangene Experimente an mMZ nicht-transgener Mäuse zeigten eine extrazelluläre H_2O_2 -Produktion nach PMA-Stimulation (siehe 4.2; Abb. 26). Für mMZ transgener Mäuse konnte wider Erwarten keine extrazelluläre H_2O_2 -Produktion nach PMA-Stimulation nachgewiesen werden. Deshalb sollte geklärt werden, ob die gentechnische Veränderung der Mäuse der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse war. In parallelen Experimenten an mMZ aus transgenen roGFP2-orp1- und nicht-transgenen Wildtyp-Mäusen desselben genetischen Hintergrunds (CS57BL/6N) konnte reproduziert werden, dass nur mMZ aus nicht-transgenen Mäusen nach PMA-Stimulation extrazelluläres H_2O_2 produzierten. Die Ergebnisse wurden zusätzlich mittels ESR-Spektroskopie qualitativ validiert (Abb. 33). Somit ist anzunehmen, dass die genetische Veränderung der Mäuse mit dem roGFP2-orp1 Sensor (cytosolisch oder mitochondrial) die PMA-induzierte, extrazelluläre H_2O_2 -Produktion verändert. Eine Erklärung könnte sein, dass intrazellulär produziertes H_2O_2 durch den

dauerhaft exprimierten Sensor „abgefangen“ wird und die Zelle die intrazelluläre H_2O_2 -Produktion hochreguliert, um weiterhin physiologische H_2O_2 -Konzentrationen zu erhalten. Da dafür mehr Reduktionsäquivalente benötigt werden, ist es möglich, dass diese für membranständige NOX2-Enzyme nicht mehr (ausreichend) zur Verfügung stehen und es somit zu weniger PMA-induzierter extrazellulärer H_2O_2 -Produktion kommt. Ebenso ist ein Herunterregulieren der NOX2-Expression in der Zellmembran aus den gleichen Gründen denkbar. Eine vergleichende Quantifizierung der Expression der Enzyme, die an der H_2O_2 -Produktion- und -Eliminierung beteiligt sind könnte hierüber Aufschluss geben. Einige Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass die Redox-Homöostase transgener Tiere, die Katalase überexprimieren, im Vergleich zu ihren nicht-transgenen, Wildtyp-Äquivalenten unterschiedlich ist (Godin et al., 2010; Schriener & Linford, 2006). Intrazellulär exprimierte H_2O_2 -Sensoren könnten sich ebenso auf die H_2O_2 -Homöostase auswirken.

Ein großer Nachteil der Messungen mit fluoreszierenden H_2O_2 -Sensoren ist, dass eine quantitative Bestimmung der intrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ momentan nicht möglich ist. An aufgereinigtem HyPer-3-Protein konnte zwar *in vitro* gezeigt werden, dass eine Veränderung der Fluoreszenz des Sensors bereits bei $[\text{H}_2\text{O}_2]$ von 25 nM zu sehen und der Sensor bei 250 nM vollständig gesättigt war (Belousov et al., 2006), allerdings lässt diese *in vitro*-Kalibrierung keine Rückschlüsse auf die $[\text{H}_2\text{O}_2]$ innerhalb einer Zelle zu. Zum einen konkurriert ein intrazellulärer H_2O_2 -Sensor (z. B. HyPer) mit allen Zellbestandteilen, welche mit H_2O_2 interagieren, allen voran Redox-Mediatoren wie Glutaredoxine, Peroxiredoxine und Thioredoxine. Zum anderen findet ein ständiges Recycling (also eine Reduktion) der Sensoren durch Redox-Mediatoren statt. Einen Ansatz, durch mathematische Berechnungen die Fluoreszenzsignale des H_2O_2 -Sensors HyPer-3 in H_2O_2 -Konzentrationen umzurechnen, haben Huang und Sikes veröffentlicht. Sie benutzten dabei die Affinitäten der verschiedenen Substanzen, die mit H_2O_2 interagieren, um eine Annahme zu treffen, wie viel H_2O_2 über die Plasmamembran in die Zelle diffundiert und wie viel davon mit HyPer-3 reagiert (Huang & Sikes, 2014). Dieser Ansatz bietet eine interessante mathematische Annäherung an die extra- und intrazellulären $[\text{H}_2\text{O}_2]$ und zeigt den potentiell großen Gradienten zwischen extra- und intrazellulärem H_2O_2 , welcher zwischen 7:1 und 650:1 (extra- : intrazellulär) liegen kann (Antunes & Cadenas, 2000). Allerdings wurden zur Vereinfachung der Mathematik und Modellierung einige physiologische Gegebenheiten nicht berücksichtigt. Intrazelluläre Reaktionen von Enzymen, Peptiden, Lipiden und weiteren Metaboliten mit H_2O_2 können

zwischen Zellen verschiedenen Typs, zwischen einzelnen Zellen desselben Typs und sogar innerhalb derselben Zelle zwischen Zell-Kompartimenten variieren. Außerdem wirkt sich der metabolischen Status und technisch bedingte Stress-Zustände auf den Redox-Zustand der Zelle aus (Cecarini et al., 2007; Ray et al., 2012).

In dieser Arbeit sollte eine experimentelle Kalibrierung des Sensors vorgenommen werden. Dazu sollte die intra- und extrazelluläre $[H_2O_2]$ durch Permeabilisierung der Zellmembran äquilibriert werden. Unglücklicherweise konnte keins der benutzten Verfahren zur Permeabilisierung eine Aufhebung des H_2O_2 -Gradienten herbeiführen, ohne dass die Zelle nach wenigen Minuten apoptotisch oder nekrotisch wurde. Ein alternativer Ansatz für eine experimentelle Kalibrierung könnte die Punktierung einer einzelnen Zelle mit einer Mikropipette sein, um H_2O_2 in definierten Konzentrationen gezielt in die Zelle zu bringen und das Fluoreszenzsignal des Sensors zu messen. Würde man dieses Vorgehen mit chronoamperometrischen Messungen der extrazellulären $[H_2O_2]$ verbinden, wäre eine Kalibrierung des Sensors für jeden gewünschten Zelltyp möglich. Zu bedenken bleibt allerdings auch hier, dass eine Punktierung der Zellmembran Stress für die Zelle bedeutet (Cooper & McNeil, 2015; Tang & Marshall, 2017), was sich möglicherweise in einer erhöhten ROS-Produktion widerspiegelt.

Die Kombination von SECM-Messungen mit weiteren Methoden, um parallel mehrere Parameter bestimmen zu können, gilt als ein vielversprechender Ansatz, komplexe Fragestellungen zu bearbeiten (Kanoufi, 2017). In diesem Teil der Arbeit konnte eine Kombination von elektrochemischen mit fluoreszenzmikroskopischen Messungen am Beispiel von kombinierten intra- und extrazellulären H_2O_2 -Messungen etabliert und charakterisiert werden. Bisherige Ansätze bestimmten unspezifisch verschiedene ROS an Prostatakrebszellen mit elektrochemischen Methoden und dem nicht-selektiven ROS-Farbstoff Dichlorofluorescein-diazetat (DCFDA), mit dem die Zellen beladen wurden (Salamifar & Lai, 2015). Die hier vorgestellte Methodik verbessert die SECM-FM, indem sowohl intra- als auch extrazellulär H_2O_2 selektiv gemessen wird und die Quantifizierung des extrazellulären H_2O_2 für jeden Messpunkt möglich macht. Außerdem ist mit DCFDA (wie von Salamifar & Lai verwendet) keine dynamische Bestimmung der H_2O_2 -Veränderung möglich, da es irreversibel und nicht-selektiv mit vielen ROS reagiert. Mit den von uns verwendeten Sensoren sind sowohl die Zu- als auch die Abnahme von intrazellulärem H_2O_2 messbar. Mit dem hier dargestellten Verfahren sind Messungen mit anderen Fluoreszenz-Farbstoffen zur

Bestimmung weiterer Parameter denkbar. Da bekannt ist, dass ROS und Ca^{2+} im Zell-Metabolismus interagieren können (Bogeski & Niemeyer, 2014; Frisch et al., 2019), wäre die ratiometrische Messung von Ca^{2+} mit Fura-2 denkbar, während gleichzeitig an derselben Zelle extrazelluläres H_2O_2 bestimmt wird. Da Fura-2 im UV(A)-Bereich angeregt wird (Paredes et al., 2008) muss ein besonderes Augenmerk auf eine potentielle Interaktion des Fluoreszenzlichtes auf die elektrochemische Messung gelegt werden. Licht mit kürzeren Wellenlängen transportiert mehr Energie als langwelligeres Licht und kann somit den gemessenen Strom beeinflussen. Bei kombinierten SECM-FM-Messungen können negative Aspekte von elektrochemischen Messungen mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden ausgeglichen werden und umgekehrt, allerdings können sich die Nachteile beider Methoden auch summieren. Wie weiter oben beschrieben, sind quantitative intrazelluläre $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Messungen mit Fluoreszenzsensoren schwierig bzw. momentan nicht möglich. Abhängig vom Wellenlängen-Bereich des Fluoreszenzlichtes kommt es zu fototoxischen Effekten, welche in den Zellen zur Bildung von ROS führen können (Belousov et al., 2006; Lavi et al., 2010). Auch die Transfektion der Zellen mit genetisch kodierten Sensoren verursacht Zellstress und kann zu einer Erhöhung der ROS-Produktion führen (Fischer-Kierzkowska et al., 2011; Jacobsen et al., 2009). Hier sind transgene Zellen von Vorteil, da diese nicht transfiziert werden müssen. Allerdings kann es durch den genetischen Eingriff zu einer veränderten Proteinexpression der Zellen kommen, vergleichende Kontroll-Experimente sind also unerlässlich.

4.4 Chronoamperometrische O_2 -Messungen

Messungen des zellulären Sauerstoffverbrauchs geben Aufschluss über viele metabolische Prozesse und den Vital-Zustand von Zellen. Mit elektrochemischen Methoden lässt sich der O_2 -Verbrauch (also die Atmung) von lebenden Zellen effizient und nicht-invasiv charakterisieren. Kommerzielle Systeme, ausgestattet mit Clark-Elektroden, können den O_2 -Verbrauch an Zellpopulationen messen. Einige Studien liefern Hinweise darauf, dass eine deutliche Heterogenität im Sauerstoffverbrauch sowohl zwischen einzelnen Zellen einer Zellpopulation als auch zwischen einzelnen Mitochondrien derselben Zelle besteht (Boumelhem et al., 2017; Wikstrom et al., 2009). Das vierte Hauptziel dieser Arbeit war, elektrochemische Messungen des Sauerstoffverbrauchs von Einzelzellen zu etablieren und anzuwenden.

Mit der „dynamischen“ O₂-Messung kann eine Methode vorgestellt werden, welche O₂ über die an der Pt-UME ablaufenden Sauerstoff-Reduktions-Reaktion (*oxygen reduction reaction*, ORR) bestimmt. Dabei gehen Elektronen von der Pt-UME auf O₂ über, was sich in einem negativen Strom widerspiegelt. Ein negativerer Strom entspricht in diesem Fall also einer höheren Sauerstoffkonzentration. In unserem Versuchsansatz wird durch das Hin- und Herspringen der UME zwischen Bereichen über einer einzelnen Zelle und zellfreien Bereichen des Messpuffers der relative Sauerstoffverbrauch der Zelle über die Zeit verfolgt (Abb. 34). Bisherige elektrochemische Messungen des Sauerstoffverbrauchs von Einzelzellen anderer Arbeitsgruppen nutzten die Veränderung des Stromes (der ORR) als direktes Maß für Sauerstoffverbrauch der Zelle. Dabei wurde die Veränderung des Stromes als die relative Veränderung der [O₂] über einer Zelle betrachtet. Über die erste Ableitung (also die Steigung) der Strom-Kurve wurde so der relative [O₂]-Verbrauch der Zelle berechnet (Santos et al., 2017). Allerdings ist dies kritisch zu betrachten, da der Stromverlauf während der ORR grundsätzlich instabil ist und sich auch ohne Veränderung der O₂-Konzentration während der Messung verändert (B. Liu & Bard, 2002). Außerdem wurden die Experimente von Santos und Kollegen (wie auch unsere) Messungen in einem offenen System durchgeführt. In offenen Systemen wird verbrauchter Sauerstoff durch ständigen Gasaustausch mit der Raumluft wieder ersetzt. Es entsteht ein O₂-Gradient von Messpuffer-Oberfläche zur Zellebene (auf dem Boden des Messschälchens), was z. B. Place und Kollegen 2017 in einer Übersichtsarbeit zu O₂-Bedingungen in der Zellkultur zusammengefasst haben. Man kann also nicht davon ausgehen, dass eine Änderung des Stroms der ORR ausschließlich von der Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Messlösung über die Zeit bedingt wird. In unseren Experimenten konnte ebenfalls eine derartige Veränderung des Stromes über die Zeit festgestellt werden, sowohl mit, als auch ohne Zellen. Daher ist die hier präsentierte dynamische Methode vorzuziehen, welche den Sauerstoffverbrauch einer einzelnen Zelle als relative Differenz der [O₂] über einer einzelnen Zelle im Vergleich zur [O₂] im zellfreien Bereich darstellt. Da für jede Mess-Sequenz über der Zelle eine eigene Referenz-Sequenz im zellfreien Bereich aufgenommen wird, muss die Zell-unabhängige Veränderung des Stroms über die Zeit nicht mehr berücksichtigt werden. Einen ähnlichen Ansatz haben Sugimura und Kollegen (2012) verwendet, um den Sauerstoffverbrauch von Oozyten zu messen.

Als Anwendungsbeispiel wurden die Einflüsse von Coenzym Q10 (CoQ10), bzw. der hydroxylierten Variante OH-CoQ10 auf die Respiration von HEK-293-Zellen untersucht. An

isolierten Mitochondrien aus murinen Herzzellen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden, dass sowohl CoQ10 als auch OH-CoQ10 den Sauerstoffverbrauch verringern, d. h. die Atmung hemmen (Slowik, 2019). Mit der dynamischen, elektrochemischen Messung des O₂-Verbrauchs konnte an lebenden HEK-293-Zellen gezeigt werden, dass die Atmung durch CoQ10 bzw. OH-CoQ10 gehemmt wird (Abb. 35). Diese Ergebnisse belegen, dass (OH-)CoQ10 wenn es von außen appliziert wird, entweder in die Zelle aufgenommen wird oder über die Zellmembran intrazelluläre Effekte ausübt. Erste HPLC-Experimente (durchgeführt von Nikolina Mitreska, Biophysik, Universität des Saarlandes) zeigen, dass (OH-)CoQ10 innerhalb einer 30-minütigen Inkubation in lebende HEK-293-Zellen gelangt. Theorien zu den Wirkmechanismen der Coenzyme in der Zelle sind in der Dissertation von Ewa Slowik (Biophysik, Universität des Saarlandes, 2019) zusammengefasst: In isolierten Mitochondrien reduziert (OH-)CoQ-10 die Komplex I-, II- und III-gekoppelte Atmung und beeinflusst möglicherweise Membraneigenschaften, Ca²⁺-Homöostase sowie ROS-Produktion. Unbekannt ist, ob sich die Coenzyme in der Zellmembran (oder in anderen Membranen) anreichern, ob und wo sie in der Zelle akkumulieren und ob sie auf Kanäle oder Rezeptoren wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur dynamischen, non-invasiven Messung des relativen Sauerstoffverbrauchs von Einzelzellen vorgestellt. Ein Vorteil der hier beschriebenen Methode ist die Unabhängigkeit der Messung von technisch bedingten, O₂-unabhängigen Veränderung des ORR-Stromes. Allerdings sind diese Messungen momentan nur qualitativer Art; eine genaue Bestimmung der tatsächlichen [O₂] muss über Kalibrierungs-Experimente unter Berücksichtigung der jeweiligen lokalen Temperatur, des Luftdrucks und des O₂-Gradienten im Messpuffer vorgenommen werden. Ein Nachteil der Messungen ist, dass bei der ORR H₂O₂ entsteht, welches einen Einfluss auf die gemessenen Zellen haben kann. Es ist vorstellbar, extrazelluläre O₂-Messungen in Zukunft mit weiteren Techniken, wie der Fluoreszenzmikroskopie, zu kombinieren. Interessant wäre z. B. das gleichzeitige Verfolgen von intrazellulärem Ca²⁺ und O₂-Verbrauch einer Zelle nach Behandlung mit (OH-)CoQ10, da bekannt ist, dass CoQ10 mit Ca²⁺ interagieren kann (Bogeski et al., 2011). Auch das Profil des O₂-Verbrauchs über einer Zelle könnte mit SECM gemessen werden. So haben beispielsweise Santos und Kollegen gezeigt, dass unterschiedliche Bereiche einer einzelnen humanen Brustkrebs-Zelle einen unterschiedlichen O₂-Verbrauch aufwiesen (Santos et al.,

2017). Außerdem sind extrazelluläre Messungen des O₂-Verbrauchs von größeren Zellverbänden und potentiell ganzen Organen denkbar.

4.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten elektrochemische Messungen für die Bestimmung verschiedener physiologischer Parameter etabliert, charakterisiert, mit weiteren Methoden kombiniert und an lebenden Einzelzellen angewendet werden. Ungeachtet der in dieser Arbeit gezeigten Fortschritte zur Messung physiologischer Parameter an Einzelzellen, können elektrochemische Methoden für weitere biologische Fragestellungen angepasst, bzw. verbessert werden. In diesem Abschnitt diskutiere ich verschiedene Aspekte, basierend auf meiner persönlichen Erfahrung. Zuerst möchte ich die Komplexität des Messsystems hervorheben, welche eine intensive Einführung und Erfahrung benötigt, um reproduzierbare Messungen zu erhalten. Die Software bietet umfassende Einstellungs- und Personalisierungsmöglichkeiten, sie erschließt sich deshalb aber nur langsam. Das Programmieren eigener Mess-Protokolle ist nicht immer benutzerfreundlich. Allerdings ist anzumerken, dass in den letzten Jahren, dank eines regelmäßigen Dialogs mit dem Hersteller HEKA sowohl Soft- als auch Hardware ständig weiterentwickelt, mit neuen Funktionen ausgestattet und dadurch deutlich verbessert wurden. SECM-Systeme sind immer noch Nischensysteme, daher herrschen für eine kommerzielle Weiterentwicklung nur geringe finanzielle Anreize. Allerdings finden SECM-Systeme in immer mehr Laboren Anwendung und Messsysteme werden häufig mit individuell zugeschnittenen Funktionen für die jeweiligen Anforderungen der Forschergruppen ausgestattet.

Elektrochemische Messungen an biologischen Systemen stellen im Feld der Elektrochemie eine weitere, noch viel kleinere Nische dar (wobei sich auch das in den letzten Jahren immer mehr verändert). Die meisten Anwendungen elektrochemischer Verfahren sind auf nicht-biologische Systeme zugeschnitten und benötigen oft extreme, nicht-physiologische Konditionen wie saure pH-Bedingungen, toxische Metalle, Redox-Mediatoren oder Elektrodenbeschichtungen, sowie Puffer, in denen Zellen nicht überleben könnten. Daher sind viele bereits etablierte Messmethoden nicht direkt auf die Anwendung in biologischen Systemen übertragbar. Eine verbesserte Kommunikation zwischen Biologen und Elektrochemikern kann dabei Abhilfe schaffen, die Anforderungen beider zu berücksichtigen. Dieser Dialog rückt immer stärker in den Vordergrund, z. B. bei interdisziplinären Konferenzen wie der alle zwei Jahre stattfindende, internationale SECM-Workshop.

Diskussion

Abschließend möchte ich anmerken, dass elektrochemische Anwendungen zwar eine recht hohe Einstiegshürde haben, aber aufgrund ihrer exzellenten Spezifität und Sensitivität, sowie der Möglichkeit, nicht-invasive Messungen an lebenden Einzelzellen durchzuführen, eine lohnende Investition darstellen. Ich hoffe darauf, dass in Zukunft weitere Anwendungen der Elektrochemie für biologische Fragestellungen gezeigt und genutzt werden, bei der Beantwortung dieser Fragen zu helfen.

5. Appendix

5.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englisch	deutsch
AFM	atomic force microscopy	Rasterkraftmikroskopie
AS-I	age category I	Altersstufe I
AS-II	age category II	Altersstufe II
AT-II	angiotensin II	Angiotensin II
AUR	Amplex UltraRed	Amplex UltraRed
BP	bandpass	Bandpass
BSA	bovine serum albumin	Bovines Serumalbumin
CA	chronoamperometry	Chronoamperometrie
CM•	CM-nitroxide-radical	CM-Nitroxyl-Radikale
CMH	cyclic hydroxylamine 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine	Cyclisches Hydroxylamin-1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CoQ-10	coenzyme Q10	Coenzym Q10
CV	cyclic voltammetry	Zyklische Voltammetrie
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DAAO	D-amino acid oxidase	D-Aminosäureoxidase
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
Em	emission	Emission
EMK	electromotive force	Elektromotorische Kraft
ESR	electron spin resonance	Elektronenspinresonanz
Ex	excitation	Exzitation
FACS	fluorescence activated cell scanning	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter	Vorwärtsstreulicht
FT	dichroic mirror	Farbteiler
GSH	glutathione	Glutathion
GSSG	glutathione disulfide	Glutathion-Disulfid
HEK-Zellen	human embryonic kidney cells	Menschliche embryonale Nierenzellen
hMZ	human monocyte	Humaner Monozyt
HRP	horse radish peroxidase	Meerrettichperoxidase
ID	inner diameter	Innendurchmesser
IHP	inner Helmholtz plane	Innere Helmholtz-Schicht

Appendix

LRS-Kammern	leukocyte reduction chamber	Leukozytenreduktionskammern
MCSF	macrophage colony-stimulating factor	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mMZ	murine monocyte	Muriner Monozyt
MZ	monocyte	Monozyt
N. A.	numerical aperture	Numerische Apertur
NES	nuclear exclusion signal	Nukleäres Export-Signal
NOX	NADPH oxidase	NADPH-Oxidase
OD	outer diameter	Außendurchmesser
OH-CoQ-10	hydroxy coenzyme Q10	Hydroxy-Coenzym Q10
OHP	outer Helmholtz plane	Äußere Helmholtz-Schicht
P/S	penicillin-streptomycine	Penicillin-Streptomycin
PBMC	peripheric blood mononuclear cells	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Prx	peroxiredoxin	Peroxiredoxin
RE	reference electrode	Referenzelektrode
ROS	reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	room temperature	Raumtemperatur
SD	standard deviation	Standardabweichung
SECM	scanning electrochemical microscopy	Elektrochemische Scan-Mikroskopie
SGTC-Modus	substrate generation/tip collection mode	Substrat-Herstellung/Spitzen-Kollektions-Modus
SICM	scanning ion conductance microscopy	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie
SOD	superoxide dismutase	Superoxid-Dismutase
SSC	sideward scatter	Seitwärtsstreulicht
TBP	triple bandpass	Dreifach-Bandpass
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFT	triple <i>farbteiler</i>	Dreifach-Farbteiler
Trx	thioredoxin	Thioredoxin
UME	ultramicroelectrode	Ultramikroelektrode

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schematischer Aufbau des Messsystems.	13
Abbildung 2 - Elektrochemische Doppelschicht (Stern-Modell).	16
Abbildung 3 - Negativer <i>Feedback</i> -Modus der Annäherung.	20
Abbildung 4 - Positiver <i>Feedback</i> -Modus der Annäherung.	21
Abbildung 5 - <i>Substrate Generation / Tip Collection</i> -Modus.	22
Abbildung 6 - Aufbau des EIProScan-Systems für elektrochemische Messungen.	38
Abbildung 7 – Messaufbau für elektrochemische Messungen am ELP3.	40
Abbildung 8 – Intrazelluläre H ₂ O ₂ -Sensoren.	43
Abbildung 9 - Bestimmung von H ₂ O ₂ mit Amplex UltraRed.	45
Abbildung 10 - Bestimmung von H ₂ O ₂ mit CMH und HRP in der ESR-Spektroskopie.	46
Abbildung 11 – Kontrollierte intrazelluläre Produktion und Messung von H ₂ O ₂	48
Abbildung 12 - Aufbau einer Platin-Ultramikroelektrode.	51
Abbildung 13 - Herstellung von Platin-Ultramikroelektroden.	55
Abbildung 14 - Zyklische Voltammetrie zur Qualitätskontrolle von Pt-Ultramikroelektroden.	56
Abbildung 15 – Temperatur-Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses von Pt- Ultramikroelektroden (UME).	59
Abbildung 16 - Kalibrierung chronoamperometrischer H ₂ O ₂ -Messungen.	61
Abbildung 17 - Chronoamperometrische H ₂ O ₂ -Messung und –Quantifizierung.	63
Abbildung 18 – Schematische Darstellung des Messvolumens um eine Ultramikroelektroden (UME)-Spitze.	64
Abbildung 19 - Quantifizierung der H ₂ O ₂ -Produktion einzelner humaner Monozyten (hMZ) nach Stimulierung mit PMA.	66
Abbildung 20 - H ₂ O ₂ -Produktion humaner Monozyten (hMZ) nach Hemmen aller NOX- Enzyme mit VAS2870.	67
Abbildung 21 - FACS-Analyse von Bead- und Adhärenz-isolierten humanen Monozyten (hMZ).	69
Abbildung 22 - Einfluss der Isolationsmethode von humanen Monozyten (hMZ) auf chronoamperometrische Messungen von H ₂ O ₂	70
Abbildung 23 - Einflüsse von Fibronektin und Erythrozytenlyse auf chronoamperometrische Messungen der H ₂ O ₂ -Produktion von humanen Monozyten (hMZ)	71
Abbildung 24 - 2D-Scan der [H ₂ O ₂] um einen humanen Monozyten (hMZ) vor und nach PMA-Stimulation.	73
Abbildung 25 - Dekonvolution amperometrischer SECM-Messungen.	75
Abbildung 26 - Einfluss des Lebensalters der Maus auf die H ₂ O ₂ -Produktion und – Eliminierung muriner Monozyten (mMZ) – elektrochemische Messungen.	77

Appendix

Abbildung 27 - Einfluss des Lebensalters auf die H ₂ O ₂ -Produktion und –Eliminierung muriner Monozyten (mMZ) – Amplex UltraRed-Messungen.	79
Abbildung 28 - Kombinierte chronoamperometrische und Fluoreszenz-mikroskopische Messung von H ₂ O ₂ an derselben, einzelnen HEK-293-Zelle.....	83
Abbildung 29 – Fluoreszenzmikroskopische Messungen von H ₂ O ₂ mit HyPer-3. Vergleich zwischen Cell Observer (CO) und ELP3; Einfluss verschiedener Messpuffer.	85
Abbildung 30 - Kombinierte extrazelluläre und intrazelluläre Messung von intrazellulär produziertem H ₂ O ₂	88
Abbildung 31 - Charakterisierung von mito-roGFP und cyto-roGFP in murinen Monozyten (mMZ).....	91
Abbildung 32 - Intra- und extrazelluläre H ₂ O ₂ -Produktion von roGFP-exprimierenden Mausmonozyten (mMZ).....	93
Abbildung 33 - H ₂ O ₂ Produktion durch Maus-Monozyten (mMZ) aus verschiedenen Mauslinien; elektrochemische und ESR-spektroskopische Messungen.	95
Abbildung 34 - Chronoamperometrische O ₂ -Messung an HEK-293-Einzelnzellen	98
Abbildung 35 - Effekt von CoQ10 und OH-CoQ10 auf den O ₂ -Verbrauch von HEK-293-Zellen.....	100

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Liste der verwendeten Reagenzien.....	28
Tabelle 2 - Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
Tabelle 3 - Liste der zur Transfektion verwendeten Konstrukte.....	29
Tabelle 4 – Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer	29
Tabelle 5 – Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 6 – Liste der verwendeten Kits.....	30
Tabelle 7 – Liste der verwendeten Geräte.....	31
Tabelle 8 – Liste der wesentlichen Komponenten des Cell Observers.....	31
Tabelle 9 – Liste der wesentlichen Komponenten des Axio Observers.....	32
Tabelle 10 – Liste der wesentlichen Komponenten des ElProScan (ELP3).....	32
Tabelle 11 – Liste der verwendeten Mäuse.....	33
Tabelle 12 - Liste der verwendeten Software.....	33
Tabelle 13 – Rolle der Parameter-Einstellungen des Horizontalpullers.....	52
Tabelle 14 – Charakterisierung von HyPer-3 in HEK-293-Zellen.....	81
Tabelle 15 – Charakterisierung von mito-roGFP und cyto-roGFP in murinen Monozyten....	90
Tabelle 16 – Extrazelluläre Produktion von H ₂ O ₂ durch murine Monozyten verschiedener Mauslinien, nach Stimulation mit PMA oder AT-II.....	94

5.4 Python-Programm zur Wiener-Dekonvolution von amperometrischen SECM-Messungen

```
#!/usr/bin/env python

'''
Wiener deconvolution.

Sample shows how DFT can be used to perform Wiener deconvolution [1]
of an image with user-defined point spread function (PSF)

Usage:
  deconvolution.py
    [--d <diameter>]
    [--snr <signal/noise ratio in db>]
    [<input image>]

Use sliders to adjust PSF paramitiers.
Keys:
  SPACE - switch btw linear/circular PSF
  ESC   - exit

  deconvolution.py --d 19 ../data/text_defocus.jpg

[1] http://en.wikipedia.org/wiki/Wiener\_deconvolution
'''

# Python 2/3 compatibility
from __future__ import print_function
from scipy.ndimage.filters import gaussian_filter
from skimage import color, data, restoration
import numpy as np
import cv2 as cv
# local module
# from common import nothing
def blur_edge(img, d=110):
    h, w = img.shape[:2]
    img_pad = cv.copyMakeBorder(img, d, d, d, d, cv.BORDER_WRAP)
    img_blur = cv.GaussianBlur(img_pad, (2*d+1, 2*d+1), -1)[d:-d,d:-d]
    y, x = np.indices((h, w))
    dist = np.dstack([x, w-x-1, y, h-y-1]).min(-1)
    w = np.minimum(np.float32(dist)/d, 1.0)
    return img*w + img_blur*(1-w)
def defocus_kernel(d, sz=110):
    kern = np.zeros((sz, sz), np.uint8)
    cv.circle(kern, (sz, sz), d, 255, -1, cv.CV_AA, shift=1)
    kern = np.float32(kern) / 255.0
    return kern
if __name__ == '__main__':
    print(__doc__)
    import sys, getopt
    opts, args = getopt.getopt(sys.argv[1:], '', ['d=', 'snr='])
    opts = dict(opts)
    fn = args[0]
    win = 'deconvolution'
    #img = cv.imread(fn, 0)
    #if img is None:
    #    print('Failed to load file:', fn)
```

Appendix

```
# sys.exit(1)
img = np.loadtxt("180704/1_matrix.txt")
#img = np.float32(img)/255.0
#img = np.float32(img)/5.5
img = np.float32(img)/np.float32(img.max())
imglr = np.fliplr(img)
imgup = np.flipud(img)
imgcr = np.flipud(np.fliplr(img))
first = np.hstack((imgcr,imgup,imgcr))
second = np.hstack((imglr,img,imglr))
third = np.hstack((imgcr,imgup,imgcr))
complete = np.vstack((first,second,third))
#img = gaussian_filter(img, sigma=3)
#cv.imshow('input', img)
newimage_input = cv.resize(img, (450,500))
cv.imshow('original', newimage_input)
img_blurred = blur_edge(img)
IMG = cv.dft(img_blurred, flags=cv.DFT_COMPLEX_OUTPUT)
def update(_):
    d = cv.getTrackbarPos('d', win)
    noise = 10**(-0.1*cv.getTrackbarPos('SNR (db)', win))
    psf = defocus_kernel(d)
    cv.imshow('psf', psf)
    psf /= psf.sum()
    psf_pad = np.zeros_like(img)
    kh, kw = psf.shape
    psf_pad[:kh, :kw] = psf
    PSF = cv.dft(psf_pad, flags=cv.DFT_COMPLEX_OUTPUT, nonzeroRows =
kh)
    PSF2 = (PSF**2).sum(-1)
    iPSF = PSF / (PSF2 + noise)[...,np.newaxis]
    RES = cv.mulSpectrums(IMG, iPSF, 0)
    res = cv.idft(RES, flags=cv.DFT_SCALE | cv.DFT_REAL_OUTPUT )
    res = np.roll(res, -kh//2, 0)
    res = np.roll(res, -kw//2, 1)
#lucy = restoration.richardson_lucy(complete, psf, iterations=3)
#cv.imshow('deconvoluted', res)
newimage = cv.resize(res, (460,500))
cv.imshow('deconvoluted', newimage)
#newimage_rl = cv.resize(lucy, (460,500))
#cv.imshow('lucy', newimage_rl)
np.savetxt("180704/1_matrix_deconvoluted.txt", res, delimiter=" ")
cv.namedWindow(win)
cv.namedWindow('psf', 0)
cv.createTrackbar('d', win, int(opts.get('--d', 22)), 100, update)
cv.createTrackbar('SNR (db)', win, int(opts.get('--snr', 25)), 50,
update)
update(None)
while True:
    ch = cv.waitKey()
    if ch == 27:
        break
```


5.5 Literaturverzeichnis

- Abucayon, E., Ke, N., Cornut, R., Patelunas, A., Miller, D., Nishiguchi, M. K., & Zoski, C. G. (2014). Investigating Catalase Activity Through Hydrogen Peroxide Decomposition by Bacteria Biofilms in Real Time Using Scanning Electrochemical Microscopy. *Analytical Chemistry*, *86*(1), 498–505. <https://doi.org/10.1021/ac402475m>
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. In *Fertility and Sterility* (Vol. 79, Issue 4, pp. 829–843). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- Altschuler, S. J., & Wu, L. F. (2010). Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? In *Cell* (Vol. 141, Issue 4, pp. 559–563). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.033>
- Amatore, C., Arbault, S., Bouret, Y., Guille, M., & Lemaître, F. (2010). Prediction of Local pH Variations during amperometric monitoring of vesicular exocytotic events at chromaffin cells. *ChemPhysChem*, *11*(13), 2931–2941. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000102>
- Amatore, C., Arbault, S., & Koh, A. C. W. (2010). Simultaneous Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by a Single Macrophage by Triple Potential-Step Chronoamperometry. *Analytical Chemistry*, *82*(4), 1411–1419. <https://doi.org/10.1021/ac902486x>
- Amatore, C., Bruce, D., de Oliveira, P., Erard Ste, M., & Vuillaume, M. (2000). Analysis of individual biochemical events based on artificial synapses using ultramicroelectrodes: cellular oxidative burst. *This Journal Is The Royal Society of Chemistry*, *116*, 319–333. <https://doi.org/10.1039/b001448f>
- Amatore, C., & Maisonhaute, E. (2005). When Voltammetry Reaches Nanoseconds. *Analytical Chemistry*, *77*(15), 303 A-311 A. <https://doi.org/10.1021/ac053430m>
- Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Letters*, *475*(2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01638-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01638-0)
- Aon, M. A., Cortassa, S., & O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(6–7), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.016>
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Baldrige, C. W., & Gerard, R. W. (1932). THE EXTRA RESPIRATION OF PHAGOCYTOSIS. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *103*(1), 235–236. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1932.103.1.235>
- Bard, A. J., Fan, F. R. F., Kwak, J., & Lev, O. (1989). Scanning Electrochemical Microscopy. Introduction and Principles. *Analytical Chemistry*, *61*(2), 132–138. <https://doi.org/10.1021/ac00177a011>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2nd ed.). Wiley.
- Bard, A. J., & Mirkin, M. V. (2012). *Scanning electrochemical microscopy*. CRC Press.
- Bedouhène, S., Moulti-Mati, F., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P. M.-C., & El-Benna, J. (2017). Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *American Journal of Blood Research*, *7*(4), 41–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28804681>

Appendix

- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods*, *3*(4), 281–286. <https://doi.org/10.1038/nmeth866>
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Nicholas Haining, W., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, *532*(7600), 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1758, Issue 8, pp. 994–1003). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bilan, D. S., & Belousov, V. V. (2017). New tools for redox biology: From imaging to manipulation. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 109, pp. 167–188). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004>
- Bilan, D. S., Pase, L., Joosen, L., Gorokhovatsky, A. Y., Ermakova, Y. G., Gadella, T. W. J., Grabher, C., Schultz, C., Lukyanov, S., & Belousov, V. V. (2013). HyPer-3: A genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chemical Biology*, *8*(3), 535–542. <https://doi.org/10.1021/cb300625g>
- Bogeski, I., Gulaboski, R., Kappl, R., Mirceski, V., Stefova, M., Petreska, J., & Hoth, M. (2011). Calcium binding and transport by coenzyme Q. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(24), 9293–9303. <https://doi.org/10.1021/ja110190t>
- Bogeski, I., & Niemeyer, B. A. (2014). Redox regulation of ion channels. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 21, Issue 6, pp. 859–862). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6019>
- Bondarenko, A., Lin, T. E., Stupar, P., Lesch, A., Cortés-Salazar, F., Girault, H. H., & Pick, H. (2016). Fixation and permeabilization approaches for scanning electrochemical microscopy of living cells. *Analytical Chemistry*, *88*(23), 11436–11443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02379>
- Boumelhem, B. B., Assinder, S. J., Bell-Anderson, K. S., & Fraser, S. T. (2017). Flow cytometric single cell analysis reveals heterogeneity between adipose depots. *Adipocyte*, *6*(2), 112–123. <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1319536>
- Bozem, M., Knapp, P., Mirčeski, V., Slowik, E. J., Bogeski, I., Kappl, R., Heinemann, C., & Hoth, M. (2018). Electrochemical quantification of extracellular local H₂O₂ kinetics originating from single cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, *29*(6). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6840>
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 76, pp. 208–226). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. In *Swiss Medical Weekly* (Vol. 142, p. w13659). <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Brown, R. G., & Hwang, P. Y. C. (2012). *Introduction to Random Signals and Applied Kalman Filtering* (4th ed.). Wiley.
- Burch, P. M., & Heintz, N. H. (2005). Redox regulation of cell-cycle re-entry: Cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 7, Issues 5–6, pp. 741–751). <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.741>

Appendix

- Burhans, W. C., & Heintz, N. H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 47, Issue 9, pp. 1282–1293). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026>
- Burke, L. D., & Morrissey, J. A. (1996). A survey of platinum hydrous oxide electrochemistry at elevated temperature: Evidence for a new component in the β -deposit. In *Journal of Applied Electrochemistry* (Vol. 26, Issue 6, pp. 593–601). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/BF00253457>
- Buvelot, H., Jaquet, V., & Krause, K. H. (2019). Mammalian NADPH oxidases. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1982, pp. 17–36). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_2
- Cadet, J., & Richard Wagner, J. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559>
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., & Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1773, Issue 2, pp. 93–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H. Y., & Zheng, X. F. S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. In *Drug Discovery Today* (Vol. 21, Issue 1, pp. 143–149). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.10.001>
- Chen, D., Tao, Q., Liao, L. W., Liu, S. X., Chen, Y. X., & Ye, S. (2011). Determining the Active Surface Area for Various Platinum Electrodes. *Electrocatalysis*, 2(3), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s12678-011-0054-1>
- CLARK, L. C., KAPLAN, S., MATTHEWS, E. C., EDWARDS, F. K., & HELMSWORTH, J. A. (1958). Monitor and control of blood oxygen tension and pH during total body perfusion. *The Journal of Thoracic Surgery*, 36(4), 488–496.
- Cohen, A. A., Geva-Zatorsky, N., Eden, E., Frenkel-Morgenstern, M., Issaeva, I., Sigal, A., Milo, R., Cohen-Saidon, C., Liron, Y., Kam, Z., Cohen, L., Danon, T., Perzov, N., & Alon, U. (2008). Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. *Science*, 322(5907), 1511–1516. <https://doi.org/10.1126/science.1160165>
- Cooper, S. T., & McNeil, P. L. (2015). Membrane repair: Mechanisms and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 95(4), 1205–1240. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2014>
- Crouch, S., Skoog, D., & Holler, F. (2017). *Principles of Instrumental Analysis* (7th ed.).
- Dale, D. C., Boxer, L., & Conrad Liles, W. (2008). The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*, 112(4), 935–945. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077917>
- Danis, L., Polcari, D., Kwan, A., Gateman, S. M., & Mauzeroll, J. (2015). Fabrication of carbon, gold, platinum, silver, and mercury ultramicroelectrodes with controlled geometry. *Analytical Chemistry*, 87(5), 2565–2569. <https://doi.org/10.1021/ac503767n>
- Dannen, S. D., Cornelison, L., Durham, P., Morley, J. E., Shahverdi, K., Du, J., Zhou, H., Sudlow, L. C., Hunter, D., Wood, M. D., Berezin, M. Y., & Gerasimchuk, N. (2020). New in vitro highly cytotoxic platinum and palladium cyanoximates with minimal side effects in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111082>
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>

Appendix

- Dhawan, D. (2019). Single-Cell Diagnostics, Prognosis, and Therapy. In *Single-Cell Omics* (pp. 3–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817532-3.00001-3>
- Doña Rodríguez, J. M., Melián, J. A. H., & Peña, J. P. (2000). Determination of the Real Surface Area of Pt Electrodes by Hydrogen Adsorption Using Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, *77*(9), 1195–1197. <https://doi.org/10.1021/ed077p1195>
- Dunn, A. C., Gregory Sawyer, W., Sarntinoranont, M., & Tran-Son-Tay, R. (2011). Mechanical Response of Living Cells to Contacting Shear Forces. In *Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials* (Vol. 4, pp. 125–141). Springer. https://doi.org/10.1007/8415_2010_23
- East, G. A., & Del Valle, M. A. (2000). Easy-to-Make Ag/AgCl Reference Electrode. In *Journal of Chemical Education* (Vol. 77, Issue 1, p. 97). Division of Chemical Education . <https://doi.org/10.1021/ed077p97>
- El Bekay, R., Alvarez, M., Monteseirín, J., Alba, G., Chacón, P., Vega, A., Martín-Nieto, J., Jiménez, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., & Sobrino, F. (2003). Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood*, *102*(2), 662–671. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2785>
- Elsasser, W. M. (1984). Outline of a theory of cellular heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(16 I), 5126–5129. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.16.5126>
- Erdamar, H., Demirci, H., Yaman, H., Erbil, M. K., Yakar, T., Sancak, B., Elbeg, S., Biberoglu, G., & Yetkin, I. (2008). The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *46*(7), 1004–1010. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.183>
- Escobales, N., Nuñez, R. E., & Javadov, S. (2019). Mitochondrial angiotensin receptors and cardioprotective pathways. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *316*(6), H1426–H1438. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00772.2018>
- Fischer-Kierzkowska, A., Vydra, N., Wysocka-Wycisk, A., Kronekova, Z., Jarzab, M., Lisowska, K. M., & Krawczyk, Z. (2011). Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Molecular Biology*, *12*, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-27>
- Forman, H. J., Fukuto, J. M., & Torres, M. (2004). Redox signaling: Thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 287, Issues 2 56-2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00516.2003>
- Forman, H. J., Ursini, F., & Maorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 73, pp. 2–9). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.018>
- Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., & Smith, A. L. (2007). The mouse in biomedical research. Normative Biology, Husbandry, and Models. In *American College of Laboratory Animal Medicine Series* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50054-6>
- Frisch, J., Angenendt, A., Hoth, M., Roma, L. P., & Lis, A. (2019). STIM-Orai channels and reactive oxygen species in the tumor microenvironment. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11040457>
- Fujikawa, Y., Roma, L. P., Sobotta, M. C., Rose, A. J., Diaz, M. B., Locatelli, G., Breckwoldt, M. O.,

Appendix

- Misgeld, T., Kerschensteiner, M., Herzig, S., Müller-Decker, K., & Dick, T. P. (2016). Mouse redox histology using genetically encoded probes. *Science Signaling*, *9*(419), rs1–rs1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3895>
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. In *Science* (Vol. 327, Issue 5966, pp. 656–661). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Gill, T., & Levine, A. D. (2013). Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(36), 26246–26255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476895>
- Godin, N., Liu, F., Lau, G. J., Brezniceanu, M. L., Chénier, I., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R., Zhang, S. L., & Chan, J. S. D. (2010). Catalase overexpression prevents hypertension and tubular apoptosis in angiotensinogen transgenic mice. *Kidney International*, *77*(12), 1086–1097. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.63>
- Gostner, J. M., Becker, K., Fuchs, D., & Sucher, R. (2013). Redox regulation of the immune response. In *Redox Report* (Vol. 18, Issue 3, pp. 88–94). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000044>
- Gresch, O., & Altrogge, L. (2012). Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, *801*, 65–74. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-352-3_5
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R., Harrison, D. G., & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement from the American Heart Association. In *Circulation Research* (Vol. 119, Issue 5, pp. e39–e75). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000110>
- Guerret-Legras, L., Audibert, J. F., Ojeda, I. M. G., Dubacheva, G. V., & Miomandre, F. (2019). Combined SECM-fluorescence microscopy using a water-soluble electrofluorochromic dye as the redox mediator. *Electrochimica Acta*, *305*, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.03.069>
- Gulaboski, R., Mirčeski, V., Kappl, R., Hoth, M., & Bozem, M. (2019). Review—Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Journal of The Electrochemical Society*, *166*(8), G82–G101. <https://doi.org/10.1149/2.1061908jes>
- Hall, S. B., Khudaish, E. A., & Hart, A. L. (1997). Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism. *Electrochimica Acta*, *43*(5–6), 579–588. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(97\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(97)00125-4)
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press.
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., & Lillig, C. H. (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 19, Issue 13, pp. 1539–1605). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4599>
- Heinze, J. (1984). Cyclovoltammetrie — die „Spektroskopie“ des Elektrochemikers. *Angewandte Chemie*, *96*(11), 823–840. <https://doi.org/10.1002/ange.19840961104>
- Heinze, J. (1993). Elektrochemie mit Ultramikroelektroden. *Angewandte Chemie*, *105*(9), 1327–1349. <https://doi.org/10.1002/ange.19931050906>
- Henzler, T., & Steudle, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in chara corallina: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of

Appendix

- h202 across water channels. *Journal of Experimental Botany*, 51(353), 2053–2066.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/51.353.2053>
- Herrmann, J. M., Becker, K., & Dick, T. P. (2015). Highlight: Dynamics of Thiol-Based Redox Switches. In *Biological Chemistry* (Vol. 396, Issue 5, pp. 385–387). Walter de Gruyter GmbH.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0135>
- Hertz, H. (1887). Ueber einen Einfluss des ultravioletten Lichtes auf die electrische Entladung. *Annalen Der Physik Und Chemie*, 267(8), 983–1000. <https://doi.org/10.1002/andp.18872670827>
- Horrocks, B. R., Mirkin, M. V., Pierce, D. T., Bard, A. J., Nagy, G., & Toth, K. (1993). Scanning electrochemical microscopy. 19. Ion-selective potentiometric microscopy. *Analytical Chemistry*, 65(9), 1213–1224. <https://doi.org/10.1021/ac00057a019>
- Howell, J. O., & Wightman, R. M. (1984). Ultrafast voltammetry and voltammetry in highly resistive solutions with microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry*, 56(3), 524–529.
<https://doi.org/10.1021/ac00267a050>
- Hu, Z., Troyk, P. R., & Cogan, S. F. (2005). Comprehensive cyclic voltammetry characterization of AIROF microelectrodes. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings*, 7 VOLS, 5246–5249. <https://doi.org/10.1109/iembs.2005.1615662>
- Huang, B. K., & Sikes, H. D. (2014). Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biology*, 2, 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.001>
- Inzelt, G. (2013). Pseudo-reference electrodes. In *Handbook of Reference Electrodes* (pp. 331–332). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36188-3_14
- IUPAC Compendium of Chemical Terminology. (2009). In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. IUPAC. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- Iverson, S., Malek, M., Garcia, R. V., Broady, R., Halpin, A., Richaud, M., Brant, R. F., Wang, S. I., Goupil, M., Guan, Q., Ashton, P., Warren, J., Rajab, A., Urschel, S., Kumar, D., Streitz, M., Sawitzki, B., Schlickeiser, S., Bijl, J. J., ... Levings, M. K. (2018). A standardized immune phenotyping and automated data analysis platform for multicenter biomarker studies. *JCI Insight*, 3(23). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121867>
- Jacobsen, L. B., Calvin, S. A., & Lobenhofer, E. K. (2009). Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. *BioTechniques*, 47(1), 617–624. <https://doi.org/10.2144/000113132>
- Kanoufi, F. (2017). Editorial: Innovative Methods in Electrochemistry. Seeing electrochemistry with new eyes. In *Current Opinion in Electrochemistry* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–3). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.11.014>
- Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., & Gorton, L. (1999). On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 1(2), 78–82.
[https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00010-7)
- Kaya, T., Nishizawa, M., Yasukawa, T., Nishiguchi, M., Onouchi, T., & Matsue, T. (2001). A microbial chip combined with scanning electrochemical microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(4), 391–394. <https://doi.org/10.1002/bit.10085>
- Kaya, T., Torisawa, Y., Oyamatsu, D., Nishizawa, M., & Matsue, T. (2003). Monitoring the cellular activity of a cultured single cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). A comparison with fluorescence viability monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(11), 1379–1383.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00083-6)
- Kearns, J. R., Scully, J. R., Roberge, P. R., Reichert, D. L., & Dawson, J. L. (1997). *Electrochemical*

Appendix

Noise Measurement for Corrosion Applications (1st ed.). American Society for Testing & Materials.

- Kesarwani, P., Murali, A. K., Al-Khami, A. A., & Mehrotra, S. (2013). Redox regulation of T-cell function: From molecular mechanisms to significance in human health and disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 18, Issue 12, pp. 1497–1534). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4073>
- Kiss, A., & Nagy, G. (2015). Deconvolution of potentiometric SECM images recorded with high scan rate. *Electrochimica Acta*, *163*, 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.02.096>
- Kissinger, Peter; Heineman, W. R. (1996). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, Revised and Expanded - CRC Press Book. In *CRC Press* (p. 1008). CRC Press. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80266-9_14
- Kissinger, P. T. (2002). Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Current Separations*, *20*(2), 51–53. www.currentseparations.com
- Komkova, M. A., Holzinger, A., Hartmann, A., Khokhlov, A. R., Kranz, C., Karyakin, A. A., & Voronin, O. G. (2013). Ultramicrosensors based on transition metal hexacyanoferrates for scanning electrochemical microscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *4*(1), 649–654. <https://doi.org/10.3762/bjnano.4.72>
- Kumar, M. P., Du, J., Lagoudas, G., Jiao, Y., Sawyer, A., Drummond, D. C., Lauffenburger, D. A., & Raue, A. (2018). Analysis of Single-Cell RNA-Seq Identifies Cell-Cell Communication Associated with Tumor Characteristics. *Cell Reports*, *25*(6), 1458–1468.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.047>
- Kuwabara, W. M. T., Zhang, L., Schuiki, I., Curi, R., Volchuk, A., & Alba-Loureiro, T. C. (2015). NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmic reticulum stress in neutrophil-like HL60 cells. *PLoS ONE*, *10*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116410>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 181–189). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lavi, R., Shainberg, A., Shneyvays, V., Hochauser, E., Isaac, A., Zinman, T., Friedmann, H., & Lubart, R. (2010). Detailed analysis of reactive oxygen species induced by visible light in various cell types. *Lasers in Surgery and Medicine*, *42*(6), 473–480. <https://doi.org/10.1002/lsm.20919>
- Lee, C., Kwak, J., & Bard, A. J. (1990). Application of scanning electrochemical microscopy to biological samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(5).
- Lee, H. B., Yu, M. R., Song, J. S., & Ha, H. (2004). Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*, *65*(4), 1170–1179. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00491.x>
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., & Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide - Production, fate and role in redox signaling of tumor cells. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0118-6>
- Liang, G. zheng, Cheng, L. min, Chen, X. feng, Li, Y. jiao, Li, X. long, Guan, Y. yuan, & Du, Y. hua. (2018). CIC-3 promotes angiotensin II-induced reactive oxygen species production in endothelial cells by facilitating Nox2 NADPH oxidase complex formation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *39*(11), 1725–1734. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0072-0>
- Liebetrau, J. M., Miller, H. M., Baur, J. E., Takacs, S. A., Anupunpisit, V., Garris, P. A., & Wipf, D. O. (2003). Scanning electrochemical microscopy of model neurons: Imaging and real-time

Appendix

- detection of morphological changes. *Analytical Chemistry*, *75*(3), 563–571.
<https://doi.org/10.1021/ac026166v>
- Liu, B., & Bard, A. J. (2002). Scanning electrochemical microscopy. 45. Study of the kinetics of oxygen reduction on platinum with potential programming of the tip. *Journal of Physical Chemistry B*, *106*(49), 12801–12806. <https://doi.org/10.1021/jp026824f>
- Liu, X., & Zweier, J. L. (2001). A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: Evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(7), 894–901. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00665-7)
- Marimuthu, R., Francis, H., Dervish, S., Li, S. C. H., Medbury, H., & Williams, H. (2018). Characterization of human monocyte subsets by whole blood flow cytometry analysis. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(140). <https://doi.org/10.3791/57941>
- Marquitan, M., Clausmeyer, J., Actis, P., Córdoba, A. L., Korchev, Y., Mark, M. D., Herlitz, S., & Schuhmann, W. (2016). Intracellular Hydrogen Peroxide Detection with Functionalised Nanoelectrodes. *ChemElectroChem*, *3*(12), 2125–2129. <https://doi.org/10.1002/celec.201600390>
- Martin, R. D., & Unwin, P. R. (1998). Theory and Experiment for the Substrate Generation/Tip Collection Mode of the Scanning Electrochemical Microscope: Application as an Approach for Measuring the Diffusion Coefficient Ratio of a Redox Couple. *Analytical Chemistry*, *70*(2), 276–284. <https://doi.org/10.1021/ac970681p>
- Martins Chaves, M., Caldeira Costa, D., Costa Telhado Pereira, C., Andrade, T. R., Horta, B. C., & Nogueira-Machado, J. A. (2007). Role of inositol 1,4,5-triphosphate and p38 mitogen-activated protein kinase in reactive oxygen species generation by granulocytes in a cyclic AMP-dependent manner: An age-related phenomenon. *Gerontology*, *53*(4), 228–233.
<https://doi.org/10.1159/000100960>
- Matlashov, M. E., Belousov, V. V., & Enikolopov, G. (2014). How much H₂O₂ is produced by recombinant D-Amino acid oxidase in mammalian cells? In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 7, pp. 1039–1044). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5618>
- Matsumae, Y., Arai, T., Takahashi, Y., Ino, K., Shiku, H., & Matsue, T. (2013). Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells using scanning electrochemical microscopy. *Chemical Communications*, *49*(58), 6498. <https://doi.org/10.1039/c3cc43126f>
- McCrum, I. T., & Janik, M. J. (2017). Deconvoluting Cyclic Voltammograms To Accurately Calculate Pt Electrochemically Active Surface Area. *The Journal of Physical Chemistry C*, *121*(11), 6237–6245. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01617>
- Metcalf, T., Wilkinson, P., Wertheimer, A., Nikolich-Zugich, J., & Haddad, E. (2016). Global analyses of monocyte subsets revealed age-related alternations after stimulation of pathogen recognition receptors. *The Journal of Immunology*, *196*(1 Supplement).
- Meyer, A. J., & Dick, T. P. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 13, Issue 5, pp. 621–650). <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2948>
- Minard, K. I., Jennings, G. T., Loftus, T. M., Xuan, D., & McAlister-Henn, L. (1998). Sources of NADPH and expression of mammalian NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(47), 31486–31493.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31486>
- Mishina, N. M., Bogdanova, Y. A., Ermakova, Y. G., Panova, A. S., Kotova, D. A., Bilan, D. S., Steinhorn, B., Arnér, E. S. J., Michel, T., & Belousov, V. V. (2019). Which Antioxidant System Shapes Intracellular H₂O₂ Gradients? *Antioxidants and Redox Signaling*, *31*(9), 664–670.

Appendix

<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7697>

- Morgan, B., Van Laer, K., Owusu, T. N. E., Ezeriņa, D., Pastor-Flores, D., Amponsah, P. S., Tursch, A., & Dick, T. P. (2016). Real-time monitoring of basal H₂O₂ levels with peroxiredoxin-based probes. *Nature Chemical Biology*, *12*(6), 437–443. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2067>
- Morrell, C. N. (2008). Reactive oxygen species: Finding the right balance. In *Circulation Research* (Vol. 103, Issue 6, pp. 571–572). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184325>
- Mu, K., Wang, D., & Kitts, D. D. (2019). Molecular mechanisms that define redox balance function in pathogen-host interactions—Is there a role for dietary bioactive polyphenols? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20246222>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. In *Biochemical Journal* (Vol. 417, Issue 1, pp. 1–13). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A. C., Burger, D., & Touyz, R. M. (2013). Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 19, Issue 10, pp. 1110–1120). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4641>
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., & Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, *459*(7249), 996–999. <https://doi.org/10.1038/nature08119>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*, *171*(3), 1581–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00346>
- Novev, J. K., & Compton, R. G. (2016). Convective heat transfer in a measurement cell for scanning electrochemical microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *18*(43), 29836–29846. <https://doi.org/10.1039/c6cp06121d>
- Novev, J. K., & Compton, R. G. (2017). Thermal convection in electrochemical cells. Boundaries with heterogeneous thermal conductivity and implications for scanning electrochemical microscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19*(20), 12759–12775. <https://doi.org/10.1039/c7cp01797a>
- Novev, J. K., & Compton, R. G. (2018). Natural convection effects in electrochemical systems. In *Current Opinion in Electrochemistry* (Vol. 7, pp. 118–129). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.010>
- Oesterle, A., & Sutter. (2018). *Pipette Cookbook*. http://www.sutter.com/contact/faqs/pipette_cookbook.pdf
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2009). Modulation of NF- κ B-dependent gene expression by H₂O₂: A major role for a simple chemical process in a complex biological response. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(9), 2043–2053. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2279>
- Page, A., Perry, D., & Unwin, P. R. (2017). Multifunctional scanning ion conductance microscopy. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *473*(2200). <https://doi.org/10.1098/rspa.2016.0889>
- Palmer, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon*, *39*(11), 1681–1689. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00155-6)
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, *46*(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.025>
- Place, T. L., Domann, F. E., & Case, A. J. (2017). Limitations of oxygen delivery to cells in culture:

Appendix

- An underappreciated problem in basic and translational research. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 113, pp. 311–322). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003>
- Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M. S., & Molla, G. (2007). Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 64, Issue 11, pp. 1373–1394). Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6558-4>
- Prasad, A., Pospíšil, P., & Tada, M. (2019). Editorial: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Methods in Biological System. *Frontiers in Physiology*, 10(OCT), 1316.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01316>
- Rada, B., & Leto, T. (2008). Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox Family NADPH oxidases. In *Contributions to Microbiology* (Vol. 15, pp. 164–187).
<https://doi.org/10.1159/000136357>
- Rastogi, R., Geng, X., Li, F., & Ding, Y. (2017). NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00301>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular Signalling* (Vol. 24, Issue 5, pp. 981–990). Pergamon.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reese, T. A., Bi, K., Kambal, A., Filali-Mouhim, A., Beura, L. K., Bürger, M. C., Pulendran, B., Sekaly, R. P., Jameson, S. C., Masopust, D., Haining, W. N., & Virgin, H. W. (2016). Sequential Infection with Common Pathogens Promotes Human-like Immune Gene Expression and Altered Vaccine Response. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 713–719.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.003>
- Rhee, S. G., Woo, H. A., & Kang, D. (2018). The Role of Peroxiredoxins in the Transduction of H₂O₂ Signals. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 28, Issue 7, pp. 537–557). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7167>
- Ribeiro, M. C., Rego, L. G. C., & D'Ajello, P. C. T. (2009). Diffusion, reaction and forced convection in electrochemical cells. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 628(1–2), 21–26.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.12.018>
- Rosenberg, B. (1971). Some Biological Effects of Platinum Compounds. *Johnson Matthey Technology Review*, 15(2), 42.
- Rubin, H. (1990). The significance of biological heterogeneity. *CANCER AND METASTASIS REVIEW*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00047585>
- Sachs, K., Perez, O., Pe'er, D., Lauffenburger, D. A., & Nolan, G. P. (2005). Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science*, 308(5721), 523–529.
<https://doi.org/10.1126/science.1105809>
- Salamifar, S. E., & Lai, R. Y. (2015). *Scanning Electrochemical and Fluorescence Microscopy for Detection of Reactive Oxygen Species in Living Cells* (pp. 415–430). <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1200.ch017>
- San Martín, A., & Griendling, K. K. (2010). Redox control of vascular smooth muscle migration. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 12, Issue 5, pp. 625–640).
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2852>
- Santos, C. S., Kowaltowski, A. J., & Bertotti, M. (2017). Single Cell Oxygen Mapping (SCOM) by Scanning Electrochemical Microscopy Uncovers Heterogeneous Intracellular Oxygen Consumption. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11956-w>

Appendix

- Sasabe, J., & Suzuki, M. (2019). Distinctive roles of d-Amino acids in the homochiral world: Chirality of amino acids modulates mammalian physiology and pathology. In *Keio Journal of Medicine* (Vol. 68, Issue 1, pp. 1–16). Keio University School of Medicine. <https://doi.org/10.2302/kjm.2018-0001-IR>
- Saul, S., Gibhardt, C. S., Schmidt, B., Lis, A., Pasička, B., Conrad, D., Jung, P., Gaupp, R., Wonnenberg, B., Diler, E., Stanis, H., Vogt, T., Schwarz, E. C., Bischoff, M., Herrmann, M., Tschernig, T., Kappl, R., Rieger, H., Niemeyer, B. A., & Bogeski, I. (2016). A calcium-redox feedback loop controls human monocyte immune responses: The role of ORAI Ca²⁺ channels. *Science Signaling*, *9*(418). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf1639>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. In *Current Biology* (Vol. 24, Issue 10, p. R453). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schriner, S. E., & Linford, N. J. (2006). Extension of mouse lifespan by overexpression of catalase. *Age*, *28*(2), 209–218. <https://doi.org/10.1007/s11357-006-9010-z>
- Schulte, A., & Schuhmann, W. (2007). Single-Cell Microelectrochemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(46), 8760–8777. <https://doi.org/10.1002/anie.200604851>
- Seidler, S., Zimmermann, H. W., Bartneck, M., Trautwein, C., & Tacke, F. (2010). Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunology*, *11*, 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-30>
- Severinghaus, J. W. (2002). The invention and development of blood gas analysis apparatus. *Anesthesiology*, *97*(1), 253–256. <https://doi.org/10.1097/0000542-200207000-00031>
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., Wong, K. K., Brandstetter, K., Wittner, B., Ramaswamy, S., Classon, M., & Settleman, J. (2010). A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*, *141*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>
- Shen, M., Arroyo-Currás, N., & Bard, A. J. (2011). Achieving nanometer scale tip-to-substrate gaps with micrometer-size ultramicroelectrodes in scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry*, *83*(23), 9082–9085. <https://doi.org/10.1021/ac2021294>
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 762–774). <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Siddique, Y. H., Ara, G., & Afzal, M. (2012). Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose-Response*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.2203/dose-response.10-002.Siddique>
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 289, Issue 13, pp. 8735–8741). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. In *Redox Biology* (Vol. 11, pp. 613–619). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>

Appendix

- Slowik, E. J. (2019). *Synthesis, endogenous detection, and mitochondrial function of the hydroxy-substituted Coenzyme Q10 derivative HO-CoQ10*. Saarland University.
- Souto, R. M., Lamaka, S. V., & González, S. (2010). Uses of Scanning Electrochemical Microscopy in Corrosion Research. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* (Vol. 3).
- Stern, O. (1924). Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. *Zeitschrift Fur Elektrochemie*, 30(21-22), 508–516. <https://doi.org/10.1002/bbpc.192400182>
- Stojek, Z. (2005). Experimental Setup. In *Electroanalytical Methods* (pp. 301–305). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04757-6_16
- Sugimura, S., Matoba, S., Hashiyada, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Matsuda, H., Kobayashi, S., Konishi, K., & Imai, K. (2012). Oxidative phosphorylation-linked respiration in individual bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 58(6), 636–641. <https://doi.org/10.1262/jrd.2012-082>
- Takahashi, Y., Shevchuk, A. I., Novak, P., Zhang, Y., Ebejer, N., MacPherson, J. V., Unwin, P. R., Pollard, A. J., Roy, D., Clifford, C. A., Shiku, H., Matsue, T., Klenerman, D., & Korchev, Y. E. (2011). Multifunctional nanoprobe for nanoscale chemical imaging and localized chemical delivery at surfaces and interfaces. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(41), 9638–9642. <https://doi.org/10.1002/anie.201102796>
- Tamma, G., Ranieri, M., Di Mise, A., Centrone, M., Sveito, M., & Valenti, G. (2014). Glutathionylation of the aquaporin-2 water channel a NOVEL POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION MODULATED by the OXIDATIVE STRESS. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40), 27807–27813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586024>
- Tang, S. K. Y., & Marshall, W. F. (2017). Self-repairing cells: How single cells heal membrane ruptures and restore lost structures. In *Science* (Vol. 356, Issue 6342, pp. 1022–1025). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aam6496>
- Thierbach, S., Bui, N., Zapp, J., Chhabra, S. R., Kappl, R., & Fetzner, S. (2014). Substrate-assisted O₂ activation in a cofactor-independent dioxygenase. *Chemistry and Biology*, 21(2), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.013>
- Torisawa, Y. S., Shiku, H., Yasukawa, T., Nishizawa, M., & Matsue, T. (2005). Three-dimensional micro-culture system with a silicon-based cell array device for multi-channel drug sensitivity test. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 108(1-2 SPEC. ISS.), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.045>
- Torisawa, Y. S., Takagi, A., Nashimoto, Y., Yasukawa, T., Shiku, H., & Matsue, T. (2007). A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials*, 28(3), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.054>
- Totter, J. R., Medina, V. J., & Scoseria, J. L. (1960). Luminescence during the Oxidation of Hypoxanthine by Xanthine Oxidase in the Presence of Dimethylbiacridylum Nitrate*. In *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 235, Issue 1). <http://www.jbc.org/>
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative stress – A unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>
- Tseng, F.-G., & Santra, T. S. (2018). Single Cell Analysis in Biotechnology and Systems Biology. In *Single Cell Analysis in Biotechnology and Systems Biology*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/books978-3-03842-194-8>
- Tsionsky, M., Cardon, Z. G., Bard, A. J., & Jackson, R. B. (1997). Photosynthetic electron transport in single guard cells as measured by scanning electrochemical microscopy. *Plant Physiology*,

Appendix

113(3), 895–901. <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.895>

- Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 164, Issue 3, pp. 341–346). <https://doi.org/10.1083/jcb.200311055>
- Ushio-Fukai, M. (2006). Localizing NADPH oxidase-derived ROS. In *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* (Vol. 2006, Issue 349, pp. re8–re8). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/stke.3492006re8>
- Valaskovic, G. A., Holton, M., & Morrison, G. H. (1995). Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes. *Applied Optics*, 34(7), 1215. <https://doi.org/10.1364/ao.34.001215>
- Venkova, L. S., Chernouvanenko, I. S., & Minin, A. A. (2014). Hydrogen peroxide stimulating migration of fibroblasts is formed in mitochondria. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 8(4), 309–313. <https://doi.org/10.1134/S1990747814050080>
- Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Walton, P. A., & Pizzitelli, M. (2012). Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Frontiers in Physiology*, 3 APR. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00108>
- Wang, C., Zhang, C., Zhou, F., Gao, L., Wang, Y., Wang, C., & Zhang, Y. (2018). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by increasing reactive oxygen species-mediated activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway in osteoblasts. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 1166–1172. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7971>
- Wang, J., Wei, Y., Zhao, S., Zhou, Y., He, W., Zhang, Y., & Deng, W. (2017). The analysis of viability for mammalian cells treated at different temperatures and its application in cell shipment. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176120>
- Wang, Y., Noël, J. M., Velmurugan, J., Nogala, W., Mirkin, M. V., Lu, C., Collignon, M. G., Lemaître, F., & Amatore, C. (2012). Nanoelectrodes for determination of reactive oxygen and nitrogen species inside murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11534–11539. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201552109>
- Wen, J., Zhao, Z., Tong, R., Huang, L., Miao, Y., & Wu, J. (2018). Prussian Blue Nanoparticle-Labeled Mesenchymal Stem Cells: Evaluation of Cell Viability, Proliferation, Migration, Differentiation, Cytoskeleton, and Protein Expression In Vitro. *Nanoscale Research Letters*, 13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2730-z>
- Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2016). Aging of the immune system: Mechanisms and therapeutic targets. *Annals of the American Thoracic Society*, 13(Supplement_5), S422–S428. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-095AW>
- Wiedemair, J., Moon, J.-S., Eaton, D. E., Mizaikoff, B., & Kranz, C. (2009). *Combined AFM-SECM: Towards a novel platform for imaging microbiosensors* (pp. 372–375). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03887-7_107
- Wiener, N. (1949). *Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series*. Wiley.
- Wikstrom, J. D., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2009). What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 41, Issue 10, pp. 1914–1927). Int J Biochem Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.06.006>

Appendix

- Williamson, R. L., & Miles, M. J. (1996). Melt-drawn scanning near-field optical microscopy probe profiles. *Journal of Applied Physics*, *80*(9), 4804–4812. <https://doi.org/10.1063/1.363521>
- Winterbourn, C. C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1840, Issue 2, pp. 730–738). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.004>
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 45, Issue 5, pp. 549–561). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>
- Wittstock, G., Burchardt, M., Pust, S. E., Shen, Y., & Zhao, C. (2007). Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 46, Issue 10, pp. 1584–1617). <https://doi.org/10.1002/anie.200602750>
- Yamazaki, T., Kawai, C., Yamauchi, A., & Kuribayashi, F. (2011). A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Tropical Medicine and Health*, *39*(2), 41–45. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-08>
- Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. In *Sensors* (Vol. 10, Issue 5, pp. 4558–4576). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/s100504558>
- Zhang, L. L., & Zhao, X. S. (2009). Carbon-based materials as supercapacitor electrodes. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 38, Issue 9, pp. 2520–2531). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/b813846j>
- Zhang, Y., Dai, M., & Yuan, Z. (2018). Methods for the detection of reactive oxygen species. In *Analytical Methods* (Vol. 10, Issue 38, pp. 4625–4638). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8ay01339j>
- Zhao, X., Lam, S., Jass, J., & Ding, Z. (2010). Scanning electrochemical microscopy of single human urinary bladder cells using reactive oxygen species as probe of inflammatory response. *Electrochemistry Communications*, *12*(6), 773–776. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.03.030>
- Zhou, X., Zhao, R., Schwarz, K., Mangeat, M., Schwarz, E. C., Hamed, M., Bogeski, I., Helms, V., Rieger, H., & Qu, B. (2017). Bystander cells enhance NK cytotoxic efficiency by reducing search time. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep44357>
- Zoski, C. G. (2007). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.

5.6 Publikationen

Publikationen

Bozem, M., Knapp, P., Mirčeski, V., Slowik, E. J., Bogeski, I., Kappl, R., Heinemann, C., & Hoth, M. (2018). Electrochemical quantification of extracellular local H₂O₂ kinetics originating from single cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(6). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6840>

Konferenzen und Vorträge

2019

Cell Physics 2019, Saarbrücken, Germany, 9.-11.10.2019

Knapp, P., Bozem, M & Hoth, M.: Usage of electrochemistry to study physiological parameters on a single cell level (Poster)

10th Workshop on Scanning Electrochemical Microscopy and Related Techniques, Fontainebleau, France, 29.9.-3.10.2019

Knapp, P.: Usage of electrochemistry to study physiological parameters on a single cell level (Vortrag)

2018

1st Symposium of the SPP1710, Rauischholzhausen Castle, Germany, 12.-14.03.2018

Knapp, P.: Electrochemical H₂O₂ measurements from single living cells (Vortrag)

IRTG-Seminar, Saarbrücken, Germany, 30.01.2018

Knapp, P. & Bozem, M.: Electrochemical real-time H₂O₂ determinations from single living human monocytes (Vortrag)

2017

Seminaire Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Université de Lorraine, France, 29.11.2017

Knapp, P. & Bozem, M.: Electrochemical real-time H₂O₂ determinations from single living human monocytes (Vortrag)

9th Workshop on Scanning Electrochemical Microscopy and Related Techniques, Serock, Poland, 13.-17.8.2017

Knapp, P.: Electrochemical Quantification of Extracellular Local H₂O₂ Kinetics Originating from Single Cells (Vortrag)

SPP1710 Summer School, Homburg, Germany, 26.-30.6.2017

Knapp, P.: H₂O₂ Determination in Cells Using Fluorescence-Based Methods (Vortrag und Workshop)

Appendix

96th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Greifswald, Germany, 16.-18.3.2017

Knapp, P., Bozem, M., Mirčeski, V., Slowik, E. J., Bogeski, I., Kappl, R., Heinemann, C., & Hoth, M.: Redox Microscopy: A sensitive method to quantify production and degradation of H₂O₂ from single human monocytes (Poster)

2016

Annual meeting of the German biophysical society, Erlangen, Germany, 25.–28.9.2016

Knapp, P., Bozem, M., Mirčeski, V., Slowik, E. J., Bogeski, I., Kappl, R., Heinemann, C., & Hoth, M.: Redox Microscopy: A sensitive method to quantify production and degradation of H₂O₂ from single human monocytes (Poster)

Cell Physics 2016, Saarbrücken, Germany, 22.-24.6.2016

Knapp, P., Bozem, M., Mirčeski, V., Slowik, E. J., Bogeski, I., Kappl, R., Heinemann, C., & Hoth, M.: Redox Microscopy: A sensitive method to quantify production and degradation of H₂O₂ from single human monocytes (Poster)

5.7 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Markus Hoth bedanken. Dein fortwährendes Interesse, nicht nur an der Arbeit, sondern auch am Wohlergehen aller deiner Mitarbeiter, die lebhaften Diskussionen und allen voran deine Positivität sorgen für ein Arbeitsklima, dass nicht zu knapp zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Du hast immer ein offenes Ohr, egal wann und wie stressig es gerade auch sein mag. Dein Input hat mir geholfen, meine Stärken und Schwächen zu erkennen und mich sowohl beruflich, als auch persönlich weiter zu entwickeln.

Ein besonderer Dank gilt natürlich Monika Bozem. Deine fortwährende Geduld, sei es beim Erklären des ElProScan oder beim Diskutieren von Ergebnissen, Vorträgen oder sonstigen Plänen hat diese Arbeit erst ermöglicht. Für dich war keine Idee zu absurd, um sie nicht zumindest mal auszuprobieren. Dein umfassendes Wissen in vielen Disziplinen lehrte mich, immer auf der Hut zu sein und kreative Herangehensweisen in Betracht zu ziehen.

Dankeschön an Carmen Hässig, Cora Hoxha, Gertrud Schwär, Kathrin Förderer, Sandra Janku und Susanne Renno für die großartige technische Unterstützung. Dass ich die Mol-Bio-Krone gewonnen habe, ging nur dank eurer Hilfe!

Vielen Dank an Christian Heinemann und Mareike Hänsch von HEKA Elektronik, die ich stets bei kniffligen technischen Fragen erreichen konnte. Ohne euer Interesse und die fruchtbaren Diskussionen wären viele Messungen meiner Arbeit nicht möglich gewesen. Im gleichen Atemzug möchte ich András Kiss danken. Danke für die Gespräche und die Ideen, die wir auch mal abends an der Hotelbar ausgearbeitet haben.

Ein großer Dank gilt der „E-Chem-Q“-Gruppe; Reinhard, Christopher, Ewa, Hannah, Katerina und Nikolina, die mit großem Interesse und aufmerksamen Fragen meine Arbeit bereichert haben.

Dank an alle Kollegen der Biophysik und molekularen Biophysik in Homburg. Ihr schafft eine motivierende, freundliche Arbeitsatmosphäre, die den Wecker morgens deutlich erträglicher macht. Die regen Diskussionen und fortwährende Unterstützung hilft immens beim Umsetzen von Ideen.

Hier geht ein ganz besonderer Dank an Adrian, Arne und die restliche Mensagruppe. Aus Arbeitskollegen wurden Freunde, ihr helft auch nach einem stressigen Tag das Lächeln nicht zu Verlieren. Hunderte an „Million-Dollar“-Ideen sind bei hochkomplexen Mensa-Diskussionen entstanden. Danke dafür!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meinem Vater und meiner wundervollen Frau Mona. Ohne eure Unterstützung und euren Rückhalt wäre all das nicht möglich gewesen. Ihr unterstützt mich und holt mich aus den tiefsten Löchern hinaus, aber helft mir auch dabei, am Boden zu bleiben, wenn ich mal wieder über's Ziel hinaus schieße. Ihr habt nie den Glauben an mich verloren, auch in den schwierigsten Situationen. Ihr macht mich zu dem Menschen, der ich bin, dafür bin ich unendlich dankbar. Ihr bedeutet mir alles.

5.8 Curriculum Vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 25.08.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. M. Hoth
Prof. P. Lipp