Technische Universität München
Physik Department
Lehrstuhl für Biophysik, E22

Viskoelastische Mikroskopie der Zellhülle von humanen Endothelzellen

Wolfgang Feneberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		Univ.-Prof. Dr. M. Kleber
Prüfer der Dissertation:	1.	Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann
	2.	Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz

Die Dissertation wurde am 29.04.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 06.06.2003 angenommen.

Vielen Dank ...

Ganz herzlich möchte ich mich zu Beginn dieser Arbeit bei den Personen bedanken, ohne deren Mitwirkung sie überhaupt nicht zustande gekommen wäre.

An erster Stelle steht hier natürlich mein Doktorvater **Prof. Erich Sackmann**, der es wieder geschafft hat, mich auch bei völliger Verzweiflung über mein ach so biologisches Thema zu motivieren und mir mit zahlreichen Einfällen zur Seite stand.

Bedanken will ich mich auch bei Herrn **Prof. Martin Aepfelbacher** und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die unser Labor bereits seit längerem mit frischen Endothelzellen höchster Qualität ausstatten. Speziell erwähnen will ich dabei Agnès Wiedemann, die mir zusätzlich noch bei der Mikroinjektion der Zellen geholfen hat.

Im Zusammenhang mit den Zellen darf ein dickes „Danke schön“ an **Gabi Chmel** nicht fehlen. Sie hat zusammen mit **Monika Rusp** meine Endos fürsorglich gepflegt, gefüttert und bei guter Laune gehalten: Grundvoraussetzung für gute Experimente!

Vielen Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe *Magnetic Tweezers* für allseits aufschlussreiche Diskussionen fachlicher und privater Natur: **Jörg Uhde**, der auch für gute Stimmung am Schreibtisch verantwortlich war (und Schöpfer des *Resist-o-mats* ist), **Manfred Keller** und **Jörg Schilling**, meine Ansprechpartner bei Computer- und Setupfragen, **Steffi Gönnenwein**, mit der ich die Geheimnisse von inhomogenen Magnetfeldern ergründen durfte. Mit viel Hilfe, Rat und guter Stimmung stand mir auch die ehemaligen Magnetisierer **Marius Dichtl** und **Laurent Vonna** zur Seite.

Ohne zahlreiche Helfer auf unphysikalischen Gebieten wäre es auch nicht gegangen: **Claudine Voelcker** und **Sonja Kraus** in bürokratischen, **Hulda Kirpal, Stefan (Dr.) Kaufmann** und **Michael Bärmann** in biochemischen und **Rudi Lehrhuber** und **Erwin Plötz** in werkstattlichen Dingen.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle anderen Mitglieder von E22: durch so gute Stimmung und Kollegialität haben die vergangenen Jahre mit Sicherheit gewonnen.

Außerhalb der Wissenschaft haben einige Menschen große Verdienste, mich vor der Fachidiotie bewahrt zu haben: die Bläser und Ehrenbläser des **Abaco-**

Orchesters und das **WindbergQuintett**.

Ganz besonders bedanken will ich mich für die Unterstützung, die ich durch meine **Eltern** und meine **Geschwister** erfahren habe (auch wenn sie nicht so genau wussten, was ich da tat). Meine Mutter hat auch entscheidend bei der Suche nach der korrekten Schreibweise mitgeholfen.

Zuletzt, aber bei weitem nicht am geringsten, gebührt der Dank meiner Gefährtin **Barbara**, die mir auch außerhalb des Labors mit Rat und Tat zur Seite stand und steht, meine Musikeskapaden erträgt und mir das Leben soviel lebenswerter macht.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 8

Grundlagen, Materialien und Methoden

1 Einleitung und biologische Grundlagen 13
Lebenswichtige Bewegung – 13
Das Zytoskelett – 14
Die Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix – 16
Gegenstand der Untersuchung – 18

2 Verwendete Materialien und Präparationen 19
Endothelzellen und ihre Zellkultur – 19
Verwendete Substanzen zur biochemischen Stimulation und Manipulation der Zellen – 21
Präparation der Kugeln mit unterschiedlichen Beschichtungen – 25

3 Der experimentelle Aufbau der Magnetischen Pinzette 28
Der experimentelle Aufbau – 28
Krafterzeugung durch einen magnetischen Feldgradienten – 33
Magnetkugeln – 35
Kalibration des Aufbaus – 36
Genauigkeit der Kalibration – 42

4 Bildverarbeitung 43
Die Software `Open Box` – 43
Digitale Kugelnachverfolgung – 44

5 Rheologie — die Lehre der Viskoelastizität 48
Lineare Viskoelastizität – 48
Mechanische Elemente zur Beschreibung von Viskoelastizität – 53
Numerische Berechnungen von viskoelastischen Größen aus experimentellen Daten – 56

Experimenteller Teil

6 Die Viskoelastizität von Endothelzellen 63
Beschreibung eines typischen Experiments – 63

Messung der Kriechkomplianz J durch eine konstante Kraft – 65
Bestimmung des Relaxationsmodul – 71
Kartierung der Zelloberfläche nach unterschiedlichem viskoelastischem Verhalten – 72
Modellierung der Kugelauslenkung – 74
Diskussion – 78

7 Anwendung der linearen Viskoelastizität – die Auslenkung durch beliebige Pulsformen 82
Dreieckpulse – 82
Kriecherholung nach einer Auslenkung – 90
Viskoelastische Antwort auf Treppenpulse – 92
Diskussion – 97

8 Die Eigenschaften des Deformationsfeldes des Aktinkortex 101
Messung des Deformationsfeldes – 102
Vergleich von Invasin- und Fibronektin-beschichteten Magnetkugeln – 106
Diskussion – 107

9 Experimente mit zytoskelettstimulierenden Substanzen 111
Durchführung der Experimente – 111
Auflösung von Zytoskelettkomponenten durch Latrunculin A und Nocodazol – 112
Stimulation des Zytoskeletts durch Thrombin, Histamin und LPA – 114
Versteifung des Kortex durch DMSO – 116
Diskussion – 117

10 Ausblick auf weiterführende Fragen 123
Mikroskopischer Ansatz zur Modellierung der Kugelauslenkung – 123
Weitere Untersuchungen am Zytoskelett von Endothelzellen – 125
Mechanische Stimulation durch die Magnetische Pinzette – 128

Anhang

A Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 133
B Tetramethylrhodamin-Konjugat von Aktin 134
C Skizzen zur Magnetischen Pinzette 136

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis 141
Tabellenverzeichnis 143
Literaturverzeichnis 144

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die viskoelastischen Eigenschaften der Zellhülle von menschlichen Endothelzellen der Vene von Nabelschnüren durch die Anwendung einer externen Scherkraft untersucht. Die Zellhülle ist eine verbundartig aufgebaute Schale aus einer hyperelastischen Lipid/Protein-Doppelschicht und einem assoziierten Aktinnetzwerk, dem Aktinkortex, der die Doppelschicht unterstützt. Zur lokalen Messung der viskoelastischen Antwort der Zelloberfläche wird die experimentelle Methode der „Magnetischen Pinzette“ verwendet. Bei dieser Technik werden superparamagnetische kolloidale Partikel über Fibronektin (ein Protein der extrazellulären Matrix) oder Invasin (ein Protein des Bakteriums *Yersinia pseudotuberculosis*) durch Integrine an die Zelloberfläche gebunden und die durch Kraftpulse induzierte viskoelastische Auslenkung der Kugeln analysiert. Die so bestimmte zweidimensionale Oberflächenkriechkomplianz ist ein Maß für das viskoelastische Verhalten der Zellhülle.

Die Deformation der Zellhülle durch die Kugeln skaliert bis zu einer Auslenkung von 1 μm und einer Dauer von einigen Sekunden mit der Stärke der angelegten Kraft, die Zellhülle verhält sich in diesem Bereich erstaunlich gut wie ein linearer viskoelastischer Körper. Dauert die Auslenkung der Kugel länger als 30 sec an, kann das zu aktiven Reaktionen der Zelle führen und nicht-lineares Verhalten der Kugelauslenkung zur Folge haben. Im linearen Regime der Kugelauslenkung stimmen die durch eine Pulsfolge an einer Kugel gemessenen Kriechkomplianzen sehr gut überein und haben eine statistische Streuung von 10%. Durch die numerische Lösung der impliziten Beziehung der Kriechkomplianz J mit dem Relaxationsmodul G kann aus den Auslenkungen der Kugeln dieser Relaxationsmodul als Funktion der Zeit berechnet werden. Diese Rechnung wird hier erstmals durchgeführt und zeigt, dass der Aktinkortex zwischen 0,05 sec und 0,15 sec ein Gummiplateau besitzt, dessen Wert einem effektiven Young-Modul von $E = 6$ kPa entspricht (wobei die Dicke des Aktinkortex mit 0,3 μm angenommen wurde). Dieser Wert stimmt gut mit Ergebnissen aus Messungen mit anderen Techniken (z.B. AFM) überein. Es kann gezeigt werden, dass sich die Kriechkomplianz durch einen mechanischen Ersatzschaltkreis, der im Gegensatz zu älteren Arbeiten mehr als eine charakteristische Zeit besitzt, modellieren lässt. Die genaue Analyse der Kriechkomplianzen zeigt, dass sich die Antwort durch nur drei Retardationszeiten erstaunlich genau quantitativ beschreiben lässt. Die so

bestimmten Retardationszeiten sind $\tau_1 = 0{,}05 \pm 0{,}02$ sec, $\tau_2 = 0{,}5 \pm 0{,}3$ sec und $\tau_3 = 15 \pm 12{,}5$ sec. Das qualitative Verhalten der viskosen und elastischen Anteile der Kriechkomplianz in diesen unterschiedlichen Zeitregimen stimmt mit dem Ergebnissen aus frequenzabhängigen Messungen durch das AFM überein.

Durch Beobachtung von viskoelastischen Antworten der Kugelauslenkungen auf unterschiedliche Kraftprofile (dreiecks-, rechtecks- und treppenförmige Kraftpulse), werden weitere Tests der Linearität des Systems ermöglicht. Es zeigt sich, dass die Auslenkungen, die durch dreiecksförmige Kraftpulse ausgelöst werden, auf die zuvor gemessene Kriechkomplianz J zurückgeführt werden können. Ebenso ist es möglich, die Auslenkung durch einen rechtecksförmigen Kraftpuls, und dabei vor allem die Kriecherholung nach Ende des Pulses, durch die Kriechkomplianz zu beschreiben. Auslenkungen durch treppenförmige Kraftpulse können nicht immer auf die Kriechkomplianz reduziert werden: Da solche Treppenpulse grundsätzlich über einen sehr langen Zeitraum gemessen werden, ist es hier nicht immer möglich, nicht-lineare Effekte durch aktive Reaktionen der Zelle zu vernachlässigen.

Durch die Verwendung unmagnetischer, mit Integrin-Antikörpern, Fibronektin oder Invasin beschichteter Sondenpartikel ist es erstmals gelungen, das durch die Magnetkugeln induzierte Deformationsfeld der Zellhülle zu bestimmen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Entwicklung einer Elastizitätstheorie der zellulären Schale. Erstaunlicherweise kann ein Deformationsfeld nur beobachtet werden, wenn die Bindung der unmagnetischen Kugeln an die Zelloberfläche über Invasin erfolgt. Das induzierte Deformationsfeld, das direkt proportional mit der Entfernung zur Magnetkugel abfällt und einen Abschirmradius von $r_c = 11 \pm 1\,\mu$m besitzt, kann nicht durch das Modell der elastischen, an das Substrat gekoppelten, homogenen Platte erklärt werden.

Durch die Zugabe von Zytoskelett-stimulierenden Substanzen können verschiede zellbiologische Fragen geklärt werden. Schon früher war gezeigt worden, dass die dominierende Größe für die viskoelastischen Eigenschaften der Zellen der Aktinkortex ist. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch die Zugabe von Latrunculin A (ein Gift des Meeresschwamms *Latrunculia magnificans*, das die Polymerisation von Aktinmonomeren verhindert) bestätigt. Darüber hinaus wird durch die Zugabe des Stoffes Nocodazol, der die Mikrotubuli in der Zelle zerstört, gezeigt, dass die Mikrotubuli kaum Einfluss auf die gemessenen viskoelastischen Eigenschaften besitzen. Nach der Zugabe von Histamin (ein Auslöser allergischer Entzündungen) wird ein ähnlicher Versteifungseffekt beobachtet, wie der bereits bekannte, durch Thrombin ausgelöste Effekt. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch die Zugabe von DMSO, einem Stoff, der die Zellmembran für im Puffer gelöstes Ca^{2+} durchlässig macht, eine Versteifung des Aktinkortex bewirkt, lässt dies den Schluss zu, dass die Versteifung durch Ca^{2+} hervorgerufen wird.

Grundlagen, Methoden und Materialien

Kapitel 1

Einleitung und biologische Grundlagen

1.1 Lebenswichtige Bewegung

Menschliches und tierisches Gewebe muss in der Lage sein, seine Form zu verändern, um seine vielfältigen Aufgaben zu bewältigen. Viele Zellen befinden sich in ständiger oder zeitweiliger Bewegung und wandern durch den Körper (Stossel 1994, Alberts et al. 2002). In vielen Bereichen ist diese Fähigkeit zur Bewegung und Anhaftung an Substrate lebenswichtig für den Organismus: so beruht der Aufbau der Plazenta im Uterus oder die Wundheilung auf Zellen, die sich zu diesem Zweck umsiedeln und an einen neuen Ort begeben (Stossel 1993). Weiße Blutkörperchen migrieren ständig durch das Gewebe, um fremde Mikroorganismen aufzuspüren und unschädlich zu machen. Auch für das Überleben der Zelle selbst ist die Fähigkeit zur Bewegung und Adhäsion wichtig. Können z.B. Endothelzellen der Rinderaorta nicht mehr adhärieren, so beginnt die Apoptose, der programmierte Zelltod (Chen et al. 1997).

Entscheidende Grundlage für die Zellbewegung und Adhäsion ist ein dynamisches Gerüst, das je nach Bedarf flexibel oder fest reagieren kann und das in der Lage ist, beliebige Formen anzunehmen, damit sich die Zelle an ihre Umgebungsform anpassen kann (Sackmann et al. 2002). Dieses Gerüst wird durch das sogenannte Zytoskelett gebildet, das über einzigartige mechanische Eigenschaften verfügt, um seine vielseitigen Aufgaben erfüllen zu können. Für die Zellbewegung ist hierbei vor allem das Aktinzytoskelett wichtig (Janmey 1998). Das Aktinzytoskelett ist über verschiedene Proteine an das Transmembranprotein Integrin gebunden, dessen Bindungsstelle außerhalb der Zelle zur Haftung an die Unterlage dient. Zusammen mit Motorproteinen können Zellen so Kräfte zur Fortbewegung ausüben (Heidemann und Buxbaum 1998).

Im folgenden sollen kurz die biologischen Grundlagen des Zytoskeletts und der Integrine beschrieben werden, da sie das weitere Verständnis der Arbeit erleichtern. Für ausführlichere Informationen sei auf die angegebene Literatur verwiesen.

Protein	Molekulare Masse der Untereinheiten (kDa)	Anzahl der Protofilamente	Durchmesser (nm)
Aktin	45	2	6
Tubulin	50	1–3	25
Intermediärfilamente	40–180	8	~ 2

Tabelle 1.1: Einige quantitative Daten über Zytoskelettproteine und -filamente. Die Tabelle ist entnommen aus Howard (2001).

1.2 Das Zytoskelett

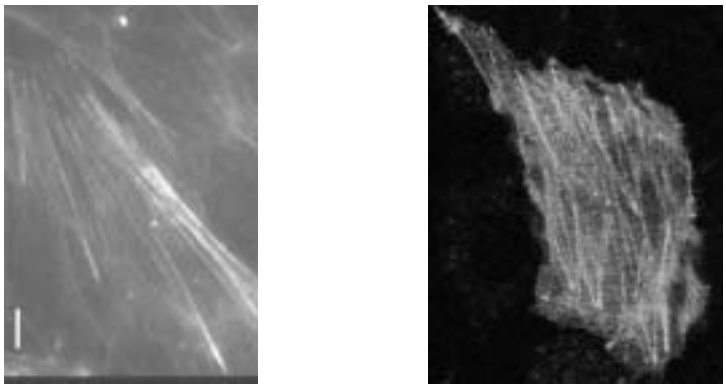
Das Zytoskelett, das in Zellen für Form und Festigkeit verantwortlich ist, wird üblicherweise in drei Komponenten unterteilt: Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Eine ausführliche Beschreibung dieser drei Klassen findet sich z.B. bei Howard (2001) und Alberts et al. (2002). Ein quantitativer Überblick und Vergleich der verschiedenen Komponenten ist in Tabelle 1.1 aufgelistet. Im folgenden werden kurz das Aktinzytoskelett und die Mikrotubuli näher vorgestellt, da sie für die Experimente dieser Arbeit von Interesse sind.

Gemeinsam ist allen Bestandteilen des Zytoskeletts eine starke Dynamik; die Filamente des Zytoskeletts werden ständig neu gebildet und wieder abgebaut. Viele der Zytoskelettfilamente sind polar. D.h. sie haben ein vorderes Ende (Plus-Ende), an dem leicht neue Monomere angebunden werden, und ein hinteres Ende (Minus-Ende), an dem vor allem Monomere abgelöst werden. Monomere durchlaufen die Filamente von vorn nach hinten, wenn sie einmal an ein Filament angebunden wurden. Diesen Prozess bezeichnet man als Tretmühlenprozess (engl. *treadmilling process*).

Das Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett wird aus dem Protein Aktin gebildet. Das monomere Aktin, auch globuläres Aktin genannt (G-Aktin), polymerisiert zu polaren Filamenten, dem filamentösen Aktin (F-Aktin). Ungefähr 35–50% des Aktins in Endothelzellen ist in Filamente eingebunden, das restliche Aktin liegt als G-Aktin vor (McGrath et al. 1998).

Man unterscheidet bei F-Aktin in der Zelle zwei Bereiche: Direkt unter der Zellmembran befindet sich eine dünne Schicht von 0,1 bis 0,5 μm Dicke, der sogenannte Zellkortex (Abraham et al. 1999, Sackmann et al. 2002). Er ist vor allem verantwortlich für die Form der Zelle. Er unterstützt die Zellmembran, die aus einer Lipiddoppelschicht gebildet wird, und ist über verschiedene Proteine (z.B. Integrin) mit der Zellmembran verbunden. Im Inneren der Zelle befindet sich wei-



A Färbung durch Fixierung

B Färbung durch Mikroinjektion

Abbildung 1.1: Anfärbung von Aktinfilamenten. Rechts ist eine Färbung durch markiertes Phalloidin, links durch Mikroinjektion von gefärbtem Aktin. Der Maßstab ist 10 μm lang.

teres F-Aktin, das vor allem als Bündel, den sog. Stressfasern (engl. *stress fibre*, die Punkte verbindet, an denen die Zelle adhäriert ist (Fokaladhäsionspunkte, engl. *focal adhesion points*). Bilder von F-Aktin, die über ein Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht wurden, sind in Abbildung 1.1 gezeigt.

Aktin besitzt viele assoziierte Proteine, die u.a. dazu dienen, Aktinfilamente zu vernetzen. Darunter befindet sich eine Familie von Proteinen, die besonders ausgezeichnet ist: Die Familie der Myosine kann nicht nur an Aktinfilamente binden, sondern unter Anwesenheit von ATP die Filamente auch gegeneinander bewegen. Dieser Mechanismus dient in der Natur als ein universaler Krafterzeuger: Muskelkontraktion erfolgt genauso durch das Aktomyosin-System wie die Kontraktion von Zellen, die durch die Wirkung von Myosin aktivierenden Stoffen ausgelöst wird (vgl. Abschnitt 2.2).

Die Mikrotubuli

Mikrotubuli sind lange röhrenförmige Filamente, die vom Zentrosom, das sich in der Mitte der Zelle direkt neben dem Zellkern befindet, sternförmig nach außen führen. Sie werden aus dem Protein Tubulin gebildet, das in den verschiedenen Varianten α-Tubulin, β-Tubulin und γ-Tubulin in der Zelle vorhanden ist. Die beiden Proteinvarianten α–Tubulin und β–Tubulin bilden zusammen Dimere, die sich zu Protofilamenten zusammenlagern. Jeweils 9 bis 13 solcher Protofilamente bilden dann einen Mikrotubulus.

Mikrotubuli sind nicht unabhängig vom Aktinkortex. Bei Zellen der Art *Dictyostelium discoideum* konnte nachgewiesen werden, dass sie mit dem Aktinkortex verbunden sind (Neujahr et al. 1998). Auch bei Endothelzellen ist

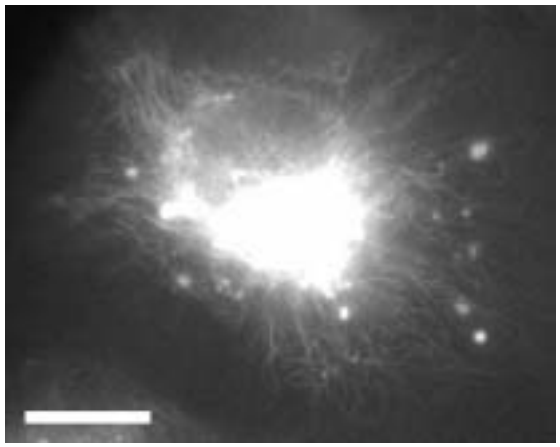


Abbildung 1.2: Anfärbung der Mikrotubuli durch fluoreszenzmarkiertes Paclitaxel. Der Maßstab ist 5 μm lang.

eine Kopplung der beiden Zytoskelettkomponenten schon beobachtet worden (Maniotis et al. 1997).

Ähnlich dem Aktomyosin-System gibt es auch Motorproteine, die an Mikrotubuli Bewegungen ausführen können. Das sind die Familien der Kinesine und der Dyneine. Sie dienen vor allem zum intrazellulärem Transport entlang der Mikrotubuli.

1.3 Die Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix

Das Zytoskelett allein eröffnet einer Zelle noch nicht die Möglichkeit, an ein Substrat zu adhärieren und sich zu bewegen. Um in der Lage zu sein, Kräfte auf eine Unterlage auszuüben, muss eine Kopplung zwischen Zytoskelett und der Umgebung der Zelle vorhanden sein. Diese Kopplung kommt durch die Bindung von Integrinen an ihre Bindungspartner der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix, ECM*) zustande.

Das Transmembranprotein Integrin

Bei der spezifischen Adhäsion von Zellen an ein Substrat spielt die große Familie der Integrine eine wichtige Rolle. Eine schematische Darstellung des Proteins ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Integrine sind homologe Heterodimere, die aus jeweils einer α und β Untereinheit bestehen. Beide Einheiten besitzen große extrazelluläre Domänen, kleine α-helikale Membrandomänen und ein intrazelluläres, zytoplasmatisches Ende, das bei der β-Kette über verschiedene Proteine wie z.B. Talin, Vinculin und α-Actinin an den Aktinkortex binden kann

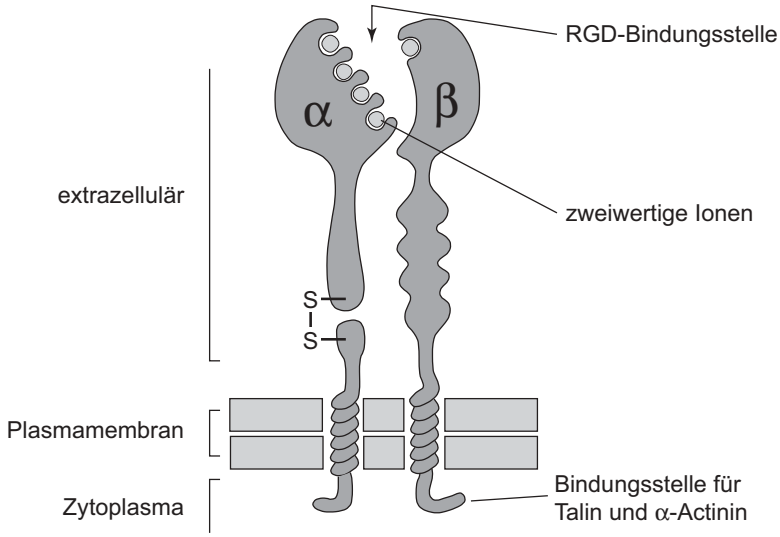


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau von Integrin. Das Protein besteht aus zwei Untereinheiten, der α-Kette und der β-Kette. An die großen extrazellulären Teile können Elemente der ECM binden (z.B. die Peptidsequenz RGD). Die Skizze ist Alberts et al. (2002) entnommen.

(Miyamoto et al. 1995a, Yamada und Geiger 1997). Integrine nehmen bei der Bewegung von Zellen und bei der mechanischen Signalübermittlung eine zentrale Rolle ein (Juliano und Haskill 1993), da sie Bindungen mit Proteinen der EMC wie z.B. Fibronektin oder Laminin eingehen können (Alberts et al. 2002). Diese Bindungen ermöglichen die Adhäsion der Zellen an das darunterliegende Gewebe.

Ein notwendiger Auslöser für die Kopplung von Integrinen an den Aktinkortex ist die Aggregation von mehreren Integrinproteinen (Clusterbildung), die im Zytoplasma zur Phosphorylierung von Tyrosin führt (Kornberg et al. 1991, Miyamoto et al. 1995b, Schmidt et al. 1998). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung an Integrine eine Signalkaskade auslöst, die zu einer Umorganisation des Aktinzytoskeletts führt und so die Kopplung an das Aktin verstärkt (Yamada und Miyamoto 1995).

Fibronektin und Invasin

Zwei Proteine, die eine Bindung mit Integrinen eingehen können, sind Fibronektin und Invasin. Fibronektin ist ein Glykoprotein der ECM und kann über die Peptid-Sequenz *Arginin-Glycin-Aspartidsäure (RGD)* an verschiedene Integrine binden. Mindestens 8 Integrine sind bekannt, die eine Bindung mit Fibronektin eingehen (Alberts et al. 2002). Die Kopplung der Magnetkugeln in der vorliegenden Arbeit erfolgte hauptsächlich über die Fibronektin-Integrin-Bindung.

Das Protein Invasin ist ein Membranprotein der Bakterien *Yersinia pseudotu-*

Integrin	Bindungspartner
$\alpha_5\beta_1$	Fibronektin, Invasin
$\alpha_6\beta_1$	Laminin, Invasin
$\alpha_2\beta_3$	Fibrinogen
$\alpha_6\beta_4$	Laminin

Tabelle 1.2: Eine kleine Übersicht von Integrinen und ihren Bindungspartnern. Es gibt insgesamt mindestens 22 verschiedene Integrine, die z.T. mehrere Bindungspartner besitzen. Es sind jeweils nur die wichtigsten Partner dargestellt. Invasin kann an alle $\alpha_x\beta_1$-Integrine binden. Die Tabelle ist Alberts et al. (2002) entnommen.

berculosis, das an β_1-Integrin-Ketten binden kann. Durch die Bindung an Integrin iniziiert Invasin eine Reorganisation des Zytoskeletts, was letztlich zur Phagozytose des Bakteriums führt, das so in die Wirtszelle eindringt (Nguyen-Duong 2002).

1.4 Gegenstand der Untersuchung

Die folgenden Arbeit behandelt die mechanischen Eigenschaften der Zellhülle, die aus der Lipiddoppelschicht und dem darunterliegenden Aktinkortex besteht. Wie oben beschrieben, ist dieser Teil der Zelle wichtig für das Überleben der Zelle in ihrer Umgebung. Aus diesem Grund besitzt die Zellhülle physikalisch interessante, mechanische Eigenschaften, die allgemein mit dem Stichwort der Viskoelastizität beschrieben werden: In der Zellhülle kombinieren sich Charakteristika eines elastischen Festkörpers und einer viskosen Flüssigkeit. Inwieweit die Zellhülle durch die Theorie der linearen Viskoelastizität beschrieben werden kann und welche Informationen man daraus über mechanische und zellbiologische Vorgänge gewinnen kann, ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

Kapitel 2

Verwendete Materialien und Präparationen

2.1 Endothelzellen und ihre Zellkultur

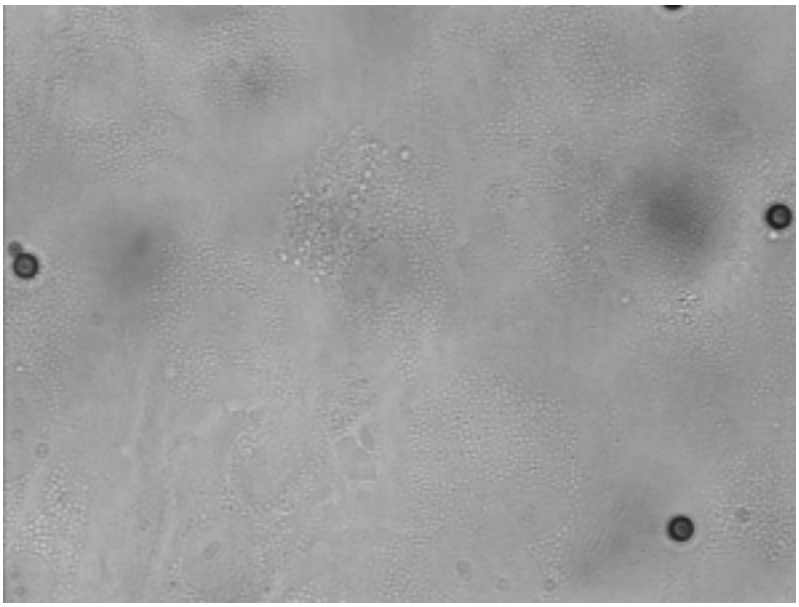
Die Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind Endothelzellen, die aus Venen von menschlichen Nabelschnüren stammen, sogenannte HUVECs (engl. *human umbial vein endothelial cells*). Als Endothelzellen oder Endothelium[1] werden die Zellen bezeichnet, die die Innenwände von Blut- und Lymphgefäßen auskleiden. Diese Zellen bilden eine zusammenhängende, zweidimensionale Schicht (d.h. Endothelzellen bilden kein dreidimensionales Gewebe), bei kleinen Blutgefäßen kann sogar eine einzige Endothelzelle die Fläche eines Querschnitts auskleiden. Endothelzellen weisen eine ungewöhnlich lange Lebenszeit auf, die bis zu einigen Jahren reichen kann. Ihre Teilbarkeit unterliegt *in vivo* keiner Einschränkung, eine Eigenschaft, die sie in die Lage versetzt, problemlos Verletzungen der Blutgefäße wieder zu schließen. Sie kontrollieren die Stoffwechselvorgänge aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe und umgekehrt. Endothelzellen sind am Rand der Blutgefäße starken mechanischen bzw. hydrodynamischen Kräften ausgesetzt.

In ihrer Funktion als permeable Wand zwischen Blutgefäß und Gewebe müssen Endothelzellen in der Lage sein, Makromoleküle aus dem Blut in das Gewebe zu lassen. Im Fall von Krankheiten und Entzündungen müssen sogar weiße Blutkörperchen durch das Endothelium gelangen können. Endothelzellen reagieren deshalb auf bestimmte Enzyme und Botenstoffe wie Histamin, Thrombin u.a.

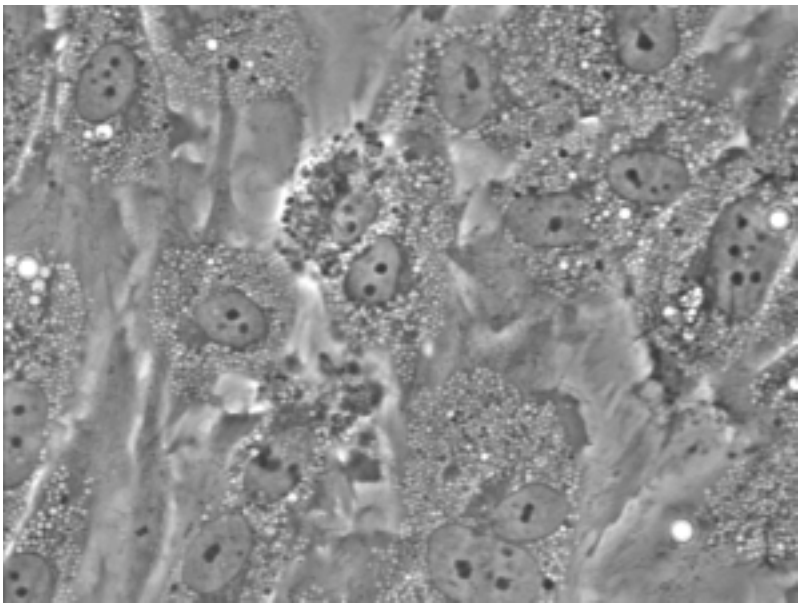
Zellpräparation und -kultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden am Lehrstuhl von Prof. Aepfelbacher (Max von Pettenkofer-Institut für Medizinische Mikrobiologie) aus den

[1] *éndothen*, (*griech.*), im Inneren



A Hellfeld



B Phasenkontrast

Abbildung 2.1: Aufnahmen eines typischen Bildes von Endothelzellen im Mikroskop. Die beiden Bilder zeigen die gleiche Probe bei unterschiedlichen Mikroskopietechniken. (a) wurde mit normaler Hellfeldmikroskopie gemacht, d.h. Ort mit unterschiedlichen Absorptionseigenschaften erscheinen in verschiedenen Grautönen. Die Magnetkugeln sind als schwarze Kreise zu erkennen (bei den Schatten handelt es sich um Hintergrund). (b) zeigt ein Bild mit Phasenkontrasttechnik. Hier werden unterschiedliche Brechungsindizes sichtbar gemacht. Diese Technik eignet sich besonders für Zellen und wurde in den Experimenten dieser Arbeit ausschließlich verwendet. Die Magnetkugeln sind als weiße Kreise zu sehen.

Nabelschüren Neugeborener präpariert und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Das Protokoll der Präparation findet sich z.B. bei Hellerer (1999) oder Bausch et al. (2001). Die frisch präparierten Zellen wurden bis zu Passage 8 (P8) verwendet, anschließend wurde eine neue Zellreihe begonnen. Zellen aus den frühen Passagen (P2 oder P3) wurden auch in flüssigem Stickstoff eingefroren, und für spätere Passagen gelagert. Es konnten in den Experimenten keine Unterschiede zwischen Zellen aus einer zuvor eingefrorenen Linie und direkt aus der Präparation stammenden Linie beobachtet werden.

Die Zellen wurden bei 37° C und 7,5% CO_2 in Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) in einem Zellinkubator kultiviert. Als Nährmedium wurde Endothelzellmedium (Promo Cell, Heidelberg) mit 10% fetalem Kälberserum verwendet. Das Medium wurde jeweils nach 2-3 Tagen gewechselt, die Zellen alle 7 Tage trypsiniert und geteilt.

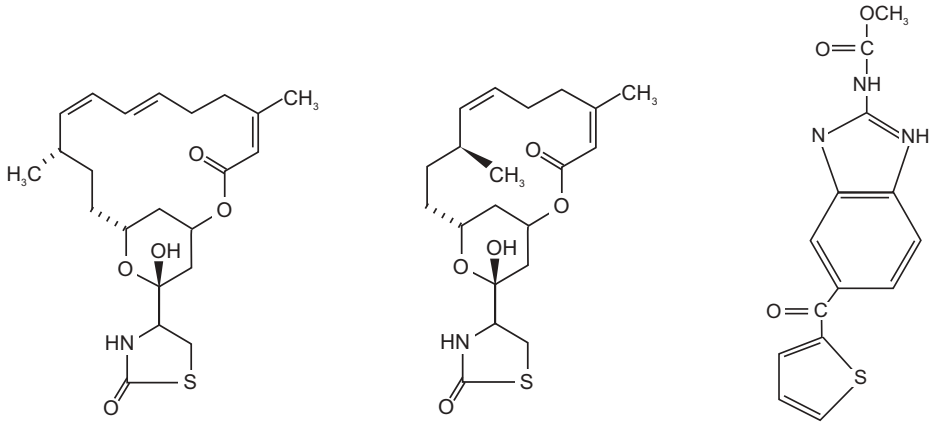
Für Experimente war es notwendig, die Zellen auf Deckgläser zu kultivieren, die vorher mit Collagen oder Nitrozellulose beschichtet worden sind, um den Zellen die Adhäsion auf dem Glas zu ermöglichen. So mit Zellen bewachsene Deckgläser können nach ca. 5 Tagen für Experimente verwendet werden. Nach diesem Zeitraum sind die Zellen konfluent, d.h. sie bilden auf dem Deckglas eine zusammenhängende Schicht und befinden sich nicht als Einzelzellen auf dem Präparat. Während der Experimente befinden sich die Zellen in der Probenkammer weiterhin in Nährmedium. Das Bild eines so bewachsenen Deckglases in Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

2.2 Verwendete Substanzen zur biochemischen Stimulation und Manipulation der Zellen

In einem Teil der Experimente dieser Arbeit soll die Wirkungsweise von körpereigenen Signalstoffen und der Einfluss des Zytoskeletts auf die viskoelastischen Eigenschaften der Zellen getestet werden. Die in diesen Epxerimenten verwendeten Stoffe und ihre Wirkungsweise werden im folgenden kurz beschrieben.

Latrunculin A

Latrunculin A wird aus einer giftigen, roten Flüssigkeit gewonnen, die von Schwämmen der Art *Latrunculia magnificans* im Roten Meer ausgesondert wird und Fische innerhalb von Sekunden tötet (Nèeman et al. 1975, Morton et al. 2000). Latrunculin A bindet monomeres Aktin (Spector et al. 1983, Spector et al. 1989, Yarmola et al. 2000) und verhindert so dessen Polymerisation zu filamentösem Aktin. Da in Zellen das Aktinzytoskelett einer fortwährenden Dynamik unterliegt (McGrath et al. 1998), also ständig neue Filamente gebildet werden und F-Aktin depolymerisiert wird, bedeutet ein Eindringen von Latrunculin A in eine Zelle den graduellen Abbau des Aktin-Zytoskeletts, da keine neue



A Latrunculin A **B** Latrunculin B **C** Nocodazol

Abbildung 2.2: Die chemische Formeln von Latrunculin A, Latrunculin B und Nocodazol. Die Formeln von Latrunculin A und B sind dem online-Handbuch der Fa. Molecular Probes entnommen (`www.probes.com`), die chemische Formel von Nocodazol entstammt dem online-Handbuch der Fa. Sigma (`www.sigmaaldrich.com`).

Polymerisation mehr stattfinden kann.

Einige Quellen verwenden anstelle von Latrunculin A den Stoff *Cytochalasin D* (Rotsch und Radmacher 2000, Bausch et al. 2001). Cytochalasin D hat einen sehr ähnlichen Effekt wie Latrunculin A, wenn auch die Wirkungsweise etwas unterschiedlich ist (Morton et al. 2000). Latrunculin A wirkt spezifischer auf F-Aktin als Cytochalasin D (Bärmann 2002, Aepfelbacher 2002).

Nocodazol

Nocodazol (Methyl N-(5-thenoyl-2-benzimidazolyl)carbamate) Methyl N-(5-thenoyl-2-benzimidazolyl)carbamat ist ein Wirkstoff, der die Mikrotubuli einer Zelle depolarisiert. Die Mikrotubuli werden dabei nicht aktiv angegriffen, sondern Nocodazol bindet an monomeres β–Tubulin, das so nicht mehr für die Bildung von Dimeren zur Verfügung steht und sich nicht mehr zur Filamentbildung eignet. Da die Mikrotubuli einem konstanten dynamischen Prozess unterliegen, depolymerisiert Nocodazol die Mikrotubuli, indem frisch depolymerisiertes β–Tubulin blockiert und so eine Neubildung von Mikrotubuli verhindert wird.

Nocodazol stört so die Zellteilung (Mitose), da der zur Mitose notwendige Spindelapparat, der die DNA einer Zelle auf zwei Tochterzellen verteilt, aus Mikrotubuli besteht. In Anwesenheit von Nocodazol kann sich der Spindelapparat deshalb nicht ausbilden. Nocodazol wird aus diesem Grund in der Krebstherapie eingesetzt.

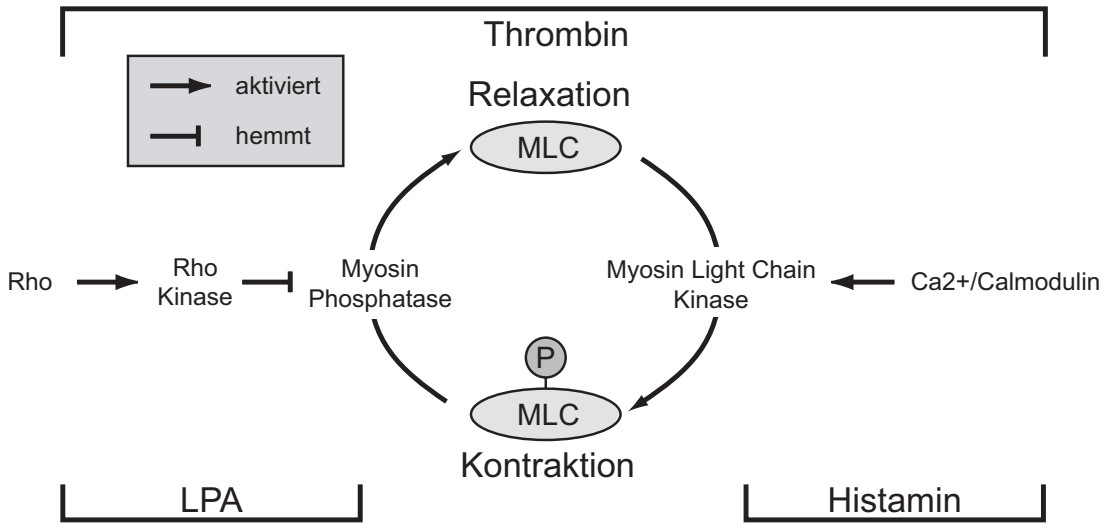


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Myosin II Aktivierung. Durch Ca^{2+}/Calmodulin wird die Aktivität der MLC-Kinase gesteigert, was zu einer verstärkten MLC-Phosphorylierung führt. Rho dagegen hemmt über die Rho-kinase die MLC-Phosphatase und so den Abbau des phosphorylierten MLC. Beides aktiviert die Aktomyosin-Kontraktion in der Zelle. Thrombin wirkt auf beide Signalwege, Histamin nur über Ca^{2+} und LPA nur über Rho auf das Aktinzytoskelett.

Thrombin

Thrombin ist eine Protease des Blutplasmas und wird bei der Aktivierung der Blutgerinnung erzeugt. Es induziert in Endothelzellen eine Kontraktion der Zelle. Es wird vermutet, dass Thrombin die geschlossene Schicht aus Endothelzellen an den Gefäßwänden permeabel macht und so bei Entzündungen ein schneller Transport von Stoffen ins darunterliegende Gewebe stattfinden kann. Im Fall einer Überreaktion bei Entzündung kann Thrombin zu großen Blutverlusten in das umliegende Gewebe führen (Garcia et al. 1996, Aepfelbacher und Essler 2001).

Die Kontraktion, die Thrombin bei Endothelzellen hervorruft, wird durch die Phosphorylierung der leichten Kette des Motorproteins Myosin II (engl. *myosin II light chain, MLC*) gesteuert (Adelstein et al. 1982, Aepfelbacher und Essler 2001). Myosin bildet zusammen mit Aktin eine molekulare Kraftmaschine. Die Phosphorylierung der MLC kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Der eine Signalweg läuft über das GTP-bindende Protein Rho, das einen molekularen Schalter darstellt: Rho ist aktiv, wenn es GTP, und inaktiv, wenn es GDP gebunden hat. Rho kann die Rho-Kinasen ROKα und $p160^{ROCK}$ aktivieren, was letztlich zu einer Phosphorylierung der MLC führt.[2] Der zwei-

[2]Die Aktivierung der Rho-Kinasen hat zunächst einen Abbau der MLC-Phosphatase zur Folge, was indirekt wieder zur Phosphorylierung der MLC führt, da die MLC-Phosphatase dem entgegenwirkt.

te Weg führt über einen Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration. Diese aktiviert eine Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige MLC-Kinase, die dann ebenfalls MLC phosphoryliert (Wysolmerski und Lagunoff 1990). Schematisch ist die Aktivierung durch Rho und Ca^{2+} in Abbildung 2.3 dargestellt.

Bindet Thrombin an einen Rezeptor der Endothelzellen, so führt das zu einem sprunghaften intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} (Mayerhofer 1996, Grand et al. 1996). Auch der Einfluss von Rho über den oben beschriebenen Signalweg bei der Kontraktion der Endothelzellen konnte nachgewiesen werden (Essler et al. 1998).

Histamin

Histamin ist einer der bekanntesten Mediatoren von allergischen Entzündungen. Es findet sich beim Menschen in allen Körpergeweben, insbesondere in Mastzellen und hat unterschiedliche Funktionen wie Kontraktion der Lungenmuskulatur oder Erhöhung der Herzfrequenz. In Blutgefäßen führt es zu Kapillardilatation und so zu Blutdruckabfall. Darüber hinaus erhöht es die Kapillarpermeabilität.

Histamin ruft in Endothelzellen eine ähnliche Wirkung wie Thrombin hervor. Auch Histamin erzeugt einen starken Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration vom nanomolaren Bereich (111 nM) in den Bereich von Mikromolarität. Dieser Anstieg wird aus intrazellulären Kalziumspeichern gespeist (Rotrosen und Gallin 1986). Der Einfluss von Histamin senkt den Anteil an F-Aktin um 25% (Rotrosen und Gallin 1986). Durch die Stimulation von Histamin ziehen sich die Endothelzellen zusammen und lösen die Zell-Zell-Kontakte ähnlich wie unter dem Einfluss von Thrombin, allerdings erzeugt Histamin kleinere Kontraktionskräfte in den Zellen und diese relaxieren nach einer Histaminstimulation schneller (Moy et al. 1996). In Abbildung 2.3 wirkt Histamin nur über die auf der rechten Seite skizzierte Signalkaskade auf das Aktinzytoskelett.

Lysophosphatidsäure

Lysophosphatidsäure (1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphat; *lysophosphatidic acid*, LPA) wird von aktivierten roten Blutkörperchen erzeugt und beeinflusst Zellen durch Stimulation von spezifischen Rezeptoren, die mit G-Proteinen verbunden sind. LPA ist ein Lyso-Phospholipid, das vor allem albumingebunden im Blutserum vorkommt und starke Wirkung als Wachstumsfaktor zeigt. Als solches dient es vermutlich vor allem zur Stimulation von Gewebewachstum bei Verletzungen und Entzündungen (Moolenar et al. 1997).

LPA wirkt über die G-Protein-Rezeptoren auf die Ras- und Rho-Proteinfamilien. Durch den bei Thrombin beschriebenen Signalweg der Rho-Proteine wirkt LPA also auch auf das Aktinzytoskelett, indem es die MLC-Phosphatase hemmt (linker Weg in Abbildung 2.3). Entsprechend bildet auch LPA in Endothelzellen Aktinstressfasern und fördert die Kontraktion (Siess et al. 1999), allerdings ohne den Kalziumspiegel zu erhöhen (Essler et al. 1999).

Anfärbungen von Teilen des Zytoskeletts

Eine bewährte Form der Visualisierung von Zytoskelettbestandteilen ist die spezifische Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und anschließende Beobachtung im Mikroskop. Auch in dieser Arbeit wurden Färbungen des Zytoskeletts vorgenommen:

Die Anfärbung des Aktin wurde auf zwei unterschiedliche Weisen durchgeführt. Die genaue Rezeptur der Anfärbung fixierter Zellen ist bei Hellerer (1999) beschrieben. Sie erfolgt über die Bindung des Gifts des Knollenblätterpilzes Phalloidin, das zu diesem Zweck mit Farbstoff markiert wird, an filamentöses Aktin. Da Phalloidin toxisch ist, kann diese Färbung nur an fixierten (also toten) Zellen erfolgen.

In der lebenden Zelle erfolgte die Anfärbung durch Injektion von fluoreszenzmarkierten Aktinmonomeren in Einzelzellen. Die Präparation des gefärbten Aktins ist im Anhang B erläutert. Die kovalent mit Farbstoff markierten Aktinmonomere werden von der Zelle als G-Aktin in bestehende Filamente eingebaut und diese so markiert. Die Abbildung 1.1 zeigt je ein Beispiel einer Färbung des F-Aktins in Endothelzellen.

Die Anfärbung der Mikrotubuli erfolgte über die spezifische Bindung von Paclitaxel[3] an Mikrotubuli. Verwendet wurde zu diesem Zweck mit *Oregon Green* markiertes Paclitaxel (Molecular Probes, Leiden, Holland). Die Färbung der lebenden Zellen erfolgte durch die Anleitung des Herstellers: der in DMSO gelöste Farbstoff wurde in einer Konzentration von 10-20 μM in die Zellkultur gegeben und dort für eine Stunde inkubiert. Nach dem Spülen der Probe mit PBS erfolgte die Beobachtung. Ein Beispiel einer solchen Färbung ist in Abbildung 1.2 zu sehen.

2.3 Präparation der Kugeln mit unterschiedlichen Beschichtungen

Um die Eigenschaften des Aktins in den Zellen testen zu können, ist es nötig, die verwendeten Kraftüberträger spezifisch an die Zelloberfläche zu binden. Dies gelingt durch die Funkionalisierung der Kugeln mit entsprechenden Proteinen.

Beschichtung der Magnetkugeln mit Fibronektin und Invasin

Die Beschichtung der Magnetkugeln mit dem Protein der extrazellulären Matrix Fibronektin (FN) folgt den Angaben des Herstellers der Magnetkugeln (Dynal, Hamburg).

[3] die ältere Bezeichnung lautet Taxol

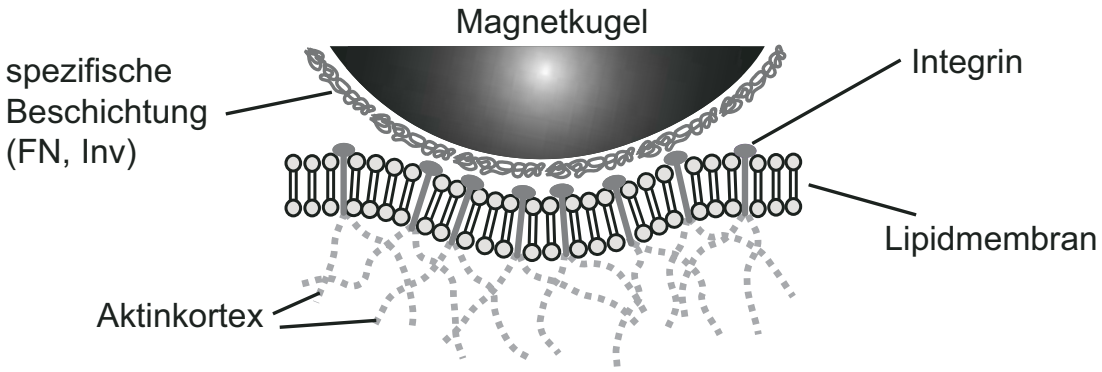


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Kopplung der Magnetkugeln über die Integrine der Zellmembran an den darunterliegenden Zellkortex.

Die Bindung an die Magnetkugeln erfolgt über die chemisch aktive Gruppe der Kugeloberfläche, einer Tosylgruppe. Für die Beschichtung wird der Vorratslösung der Kugeln eine geeignete Menge entnommen (typischerweise 100 μl, das entspricht 10^8 Kugeln), dreimal mit einem Boratpuffer (0.1M Borat in Wasser, pH 9,5 mit NaOH eingestellt) gewaschen und mit 20 μg Fibronektin (aus dem menschlichen Blutplasma, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die nun beschichteten Kugeln mit einem Phosphatpuffer (0,02M $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 0,008M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 0,1% BSA, pH 7,4) gewaschen und für 4 h mit einem Tris-Puffer (0.2M Tris, 0.1%BSA, pH 8.5 mit HCl eingestellt) inkubiert, um die ungebundenen Tosylgruppen zu passivieren. Die Verifizierung der erfolgreichen Fibronektin-Beschichtung erfolgt direkt durch die Bindung der Kugeln an die Zellen: Die beschichteten Kugeln binden über Integrin-Proteine an den Aktinkortex der Zellen, unbehandelte Kugeln (und einige andere Kugelbeschichtungen) binden dagegen nicht an Endothelzellen, was im Mikroskop eindeutig durch die diffusive Bewegung der Kugeln detektiert werden kann.

Über die gleiche Präparation können die Kugeln mit Invasin (Arbeitsgruppe M. Aepfelbacher, Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München) beschichtet werden. Die Beschichtung mit Invasin wurde mittels einer Antikörperreaktion getestet, bei der ein Fluoreszenzfarbstoff eine erfolgreiche Invasinbindung signalisierte (Vonna et al. 2003).

Beschichtung nicht-magnetischer Kugeln

Unmagnetische Kugeln aus Melamin und Polystyrol werden auf unterschiedliche Art mit Integrin-bindenden Proteinen beschichtet.

Beschichtung mit Fibronektin: Die Beschichtung von Melaminkugeln (Durchmesser 2 μm) erfolgt mittels Physisorption des Fibronektins an

der Kugeloberfläche, indem die Kugeln über mehrere Stunden mit dem Fibronektin in einem Überkopfrotierer gemischt werden. Dass diese sehr einfache Methode erfolgreich ist, zeigt die Bindung der Kugeln an die Zelloberfläche, die bei unbehandelten Kugeln nicht beobachtet werden kann.

Beschichtung mit Invasin: Die kovalente Bindung von Invasin 497 (Arbeitsgruppe Eble, Institut für Physiologische Chemie und Pathochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster) an mit Dextran beschichtete Melaminkugeln wurde von Michael Reicheicher durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der chemischen Rezeptur ist zu finden z.B. bei Strigl et al. (1999), Reicheicher (1999) oder Nguyen-Duong (2002).

Beschichtung mit Integrin-Antikörpern: Die Integrin-Antikörper binden durch die Imunoglubolin-Protein A-Wechselwirkung an die Oberfläche von fluoreszierenden Latexkugeln (Durchmesser 1μm), die vom Hersteller (Polysciences, Eppelheim) entsprechend funkionalisiert bezogen werden können. Auch diese Bindung kann verifiziert werden, indem die Bindung der Kugeln an die Zellen beobachtet wird, die bei unbehandelten Zellen ausbleibt. Ungebundene Kugeln zeichneten sich durch diffusive, Brownsche Bewegung aus, die im Mikroskop leicht beobachtet werden kann.

Die Fluoreszenz der kleineren Polystyrolkugeln, die nur den halben Durchmesser der Melaminkugeln besitzen, erleichtert die Nachverfolgung in den Mikroskopbildern mit dem im Abschnitt 4.2 beschriebenen *particle-tracking*-Algorithmus. Durch ihre geringe Größe ist die Beobachtung durch Phasenkontrastmikroskopie, durch die sowohl Magnetkugeln (∅ 4,5 μm) als auch Melaminkugeln (∅ 2 μm) beobachtet werden können, nur ungenau möglich. Da bei dem verwendeten Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen) eine simultane Beobachtung von Phasenkontrastbildern mit Fluoreszenzbeleuchtung möglich ist, können Polystyrolkugeln deutlich sichtbar gemacht werden.

Kapitel 3

Der experimentelle Aufbau der Magnetischen Pinzette

Im folgenden Kapitel soll der verwendete Experimentalaufbau der Magnetischen Pinzette (engl. *Magnetic Tweezers*) und das physikalische Prinzip der Krafterzeugung im magnetischen Feld beschrieben werden. Da die Krafteichung des Aufbaus entscheidende Bedeutung für die Anwendungen besitzt, wird die Kalibration anschließend erläutert.

3.1 Der experimentelle Aufbau

Der gesamte Aufbau des *Magnetic-Tweezers* ist zur Übersicht in Abbildung 3.1 schematisch skizziert. Die experimentelle Anordnung setzt sich zusammen aus Probenkammer, Magnetspule, Stromquelle, Kamera und Rechner. Diese Komponenten werden nun im Detail beschrieben.

3.1.1 Probenhalter und Spule

Entscheidend für die Stärke der Kraft, die mit dem *Magnetic-Tweezers*-Aufbau auf eine kleine, magnetische Kugel ausgeübt werden kann, sind die Eigenschaften der Spule und deren Eisenkern. Die verwendete Spule hat die geometrischen Dimensionen von 5 cm Länge und 5 cm Durchmesser und besteht aus 1500 Windungen eines Kupferdrahtes von 0,7 mm Dicke. Im Inneren der Spule befindet sich ein Weicheisenkern des Durchmessers von 1 cm, der das Magnetfeld verstärkt und aus der Spule herausleitet. Dieser Kern, der sich am Ende zu einer Kante mit einem 60°-Winkel verjüngt (vgl. Abbildung 3.2), ragt von der Spule bis in die Probenkammer hinein. Weicheisen wurde für den Aufbau gewählt, da dieses Material mit 2,15 T eine sehr große Sättigungsmagnetisierung, gleichzeitig jedoch ein schwaches remanentes Feld besitzt. Durch die hohe Sättigungsmagnetisierung können große Feldstärken und dadurch auch große Gradienten erzeugt werden,

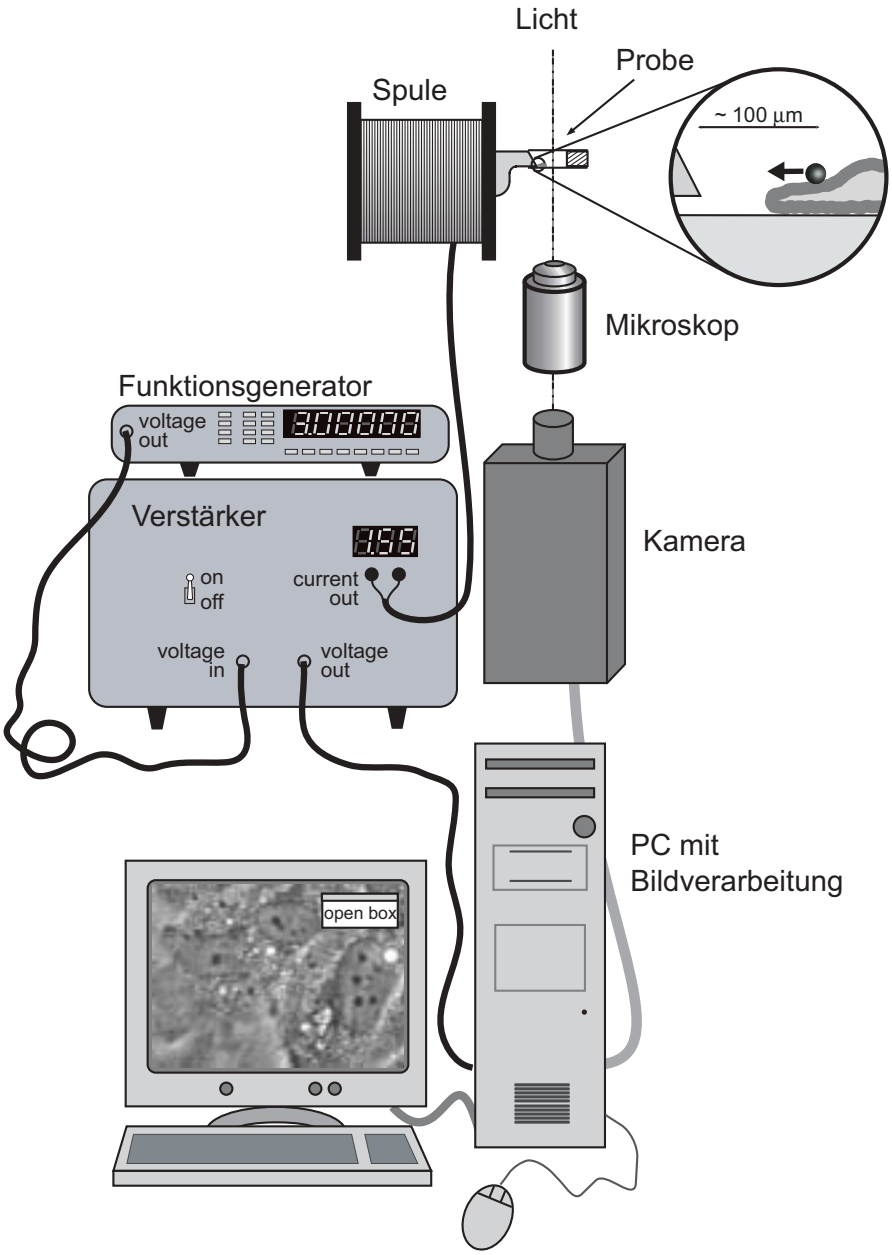


Abbildung 3.1: Der skizzierte Teil des Experimentalaufbaus zeigt die Spule, die das Magnetfeld erzeugt, und die Probenkammer, in der sich das Messvolumen befindet. Der Weicheisenkern der Spule ragt aus derselben heraus bis in die Probe hinein. Die Probenkammer ist auf einem invertierten Mikroskop montiert, dessen Phasenkontrastbild durch eine Rechner-unterstützte Kamera beobachtet wird. Die Spule wird durch einen Verstärker mit Strom versorgt, dessen Stärke proportional zur anliegenden Spannung eines Funktionsgenerators ist. Die Information über die aktuelle Stärke des Magnetfeldes wird vom Rechner durch eine AD-Karte am Verstärker abgelesen und als zusätzliche Information der Videodatei beigefügt.

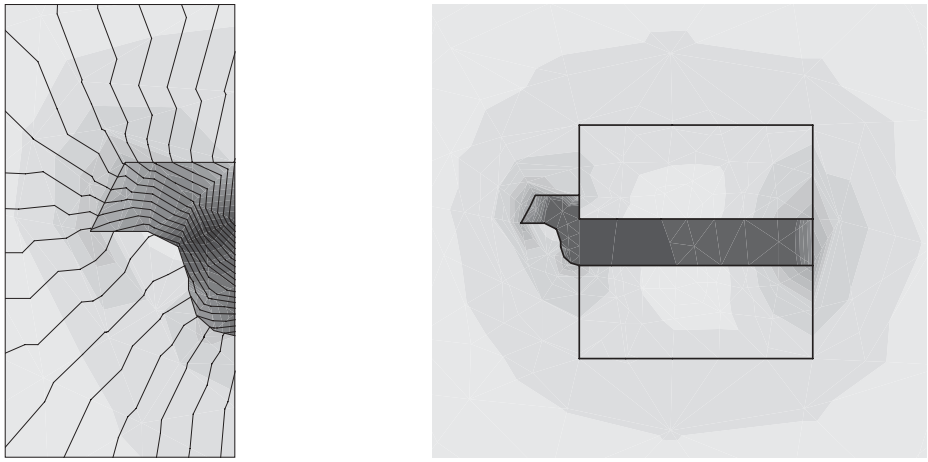


Abbildung 3.2: Numerische Simulation des erzeugten Magnetfeldes. Die Simulation soll die qualitativen Eigenschaften des Magnetfeldes darstellen. Die Spule ist in der Seitenansicht zu sehen, deutlich zu erkennen sind zum einen der fast horizontale Verlauf der Feldlinien vor der Kante des Eisenkerns (Bild links) und der schnelle Abfall des Feldes außerhalb des Magnetkerns, also der starke Gradient des Feldes (Bild rechts). Der Simulation liegen die realen Spulengeometrien zugrunde. Sie wurde berechnet mit Hilfe des Programmes *Quickfield* der Fa. Tera Analysis, Svendborg, Dänemark. Die kostenlose Studentenversion der Software ist erhältlich unter `www.quickfield.com`.

während die geringe Remanenz das Verschwinden der Kraft gewährleistet, wenn der Spulenstrom abgeschaltet wird. Die genauen Abmessungen und Skizzen des Spulenkerns, des Spulenrahmens und des Probenhalters sind im Anhang C auf Seite 136 dargestellt.

Durch die Positionierung der Kante des Magnetkerns in der Probenkammer können die Magnetkugeln bis auf einige 10 Mikrometer an die Spitze des Magnetkerns herangeführt werden. Dort ist die Dichte der magnetischen Feldlinien besonders groß (d.h. starke Magnetisierung der paramagnetischen Mikropartikel) und die Kugeln spüren einen großen Gradienten (d.h. starke Kraft auf den magnetischen Dipol), da die Feldlinien von der Spitze des Kerns weg zum rückwärtigen Pol der Spule auseinander laufen. Eine qualitative, numerische Berechnung des Magnetfeldes in und um die Spule ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Hier ist sowohl der Verlauf der magnetischen Feldlinien an der Spitze des Magnetkerns als auch die Stärke des Magnetfeldes der gesamten Anordnung dargestellt. Man erkennt deutlich, dass das Feld am Kern sehr schnell abfällt, und der Gradient der Feldstärke entsprechend groß ist. Die Position des Magneten ist durch eine Millimeterschraube verstellbar, so dass eine gewünschte Entfernung (und somit eine gewünschte Kraft) zwischen Magnet und Kugel praktisch beliebig gewählt werden kann.

Die Probenkammer, in die der Magnetkern eingeführt wird, besteht aus einem äußeren Rahmen aus Aluminium, der über ein Wasserbad gekühlt oder geheizt

werden kann. In diesen Rahmen werden das Deckglas, das mit den zu untersuchenden Zellen bewachsen ist, und ein Teflonrahmen eingesetzt, in den Puffer oder Zellmedium eingefüllt wird. Das Volumen der Kammer beträgt 200 μl, die Positionsänderung des Magneten in der Kammer wird durch ein Reservoir ausgeglichen, so dass das Probenvolumen konstant bleibt. Durch den Teflonrahmen wird verhindert, dass die Flüssigkeit, in der sich die Zellen befinden, mit Metallflächen in Kontakt kommt und so schädliche Metallionen zu den Zellen gelangen können. Probenkammer und Magnetspule sind auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 10, Axiovert 135 oder Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen) montiert und werden durch eine CCD-Kamera (C 4880-80, Hamamatsu, Herrsching) mit Phasenkontrastmikroskopie beobachtet.

Veränderungen der Spule gegenüber älteren Aufbauten

Um die optische Qualität der Abbildung zu optimieren, wurde für die vorliegende Arbeit der Spulenkern gegenüber dem ursprünglichen Aufbau von F. Ziemann leicht verändert (Ziemann 1997). Da sich die Spule sehr nahe bei der Probenkammer befindet (damit die Magnetkante bis in die Probenkammer reicht), war bei dem älteren Spulenaufbau eine optimalen Beleuchtung der Probe wegen der Kollision von Mikroskopkondensor und Spule nicht möglich. Dieser Konflikt konnte gelöst werden, indem der Magnetkern zunächst vertikal nach oben geführt wird, nachdem er die Spule verlässt. Die Spule kann auf diese Weise tiefer auf dem Mikroskoptisch montiert werden und kollidiert nicht mehr mit dem Kondensor. Eine Seitenansicht des Spulenkerns ist im Anhang in Abbildung C.2A dargestellt.

3.1.2 Stromquelle und Funktionsgenerator

Die Stromquelle der Magnetspule ist ein Verstärker, der für den Experimentalaufbau der Magnetischen Pinzette als Spezialanfertigung hergestellt worden ist. Er liefert einen Strom, der proportional zu einem Spannungssignal ist, das am Eingang des Verstärkers angelegt wird. Dabei kann zwischen einer Verstärkung von 250 mA/V und 500 mA/V gewählt werden. Dieser Strom fließt unabhängig vom Lastwiderstand, der am Verstärker angeschlossen ist, er hängt ausschließlich von der Eingangsspannung ab. So ist gewährleistet, dass sich der Strom in der Spule nicht ändert, falls sich diese erwärmt und sich deshalb ihr ohmscher Widerstand erhöht. An einem zweiten Ausgang des Verstärkers ist es möglich, ein Spannungssignal abzugreifen, das proportional zum ausgehenden Strom ist. Dieses Signal kann über einen Analog-Digital-Wandler-Eingang (AD-Karte) direkt in den Messrechner eingelesen und so zusammen mit den Bildern des Experiments gespeichert werden.

Das Spannungssignal, das am Eingang des Verstärkers den gewünschten Strom vorgibt, wird von geeigneten Funktionsgeneratoren erzeugt. In der vorliegenden Arbeit sind die Funktionsgeneratoren FG 9000 (ELV Elektronik AG, Leer) und

DS345 (SRS Stanford Research Systems, Sunnyvale (CA), USA) verwendet worden. Sie generieren sowohl Rechteckpulse unterschiedlicher Länge und Stärke als auch Dreieckpulse. Der Funktionsgenerator DS345 kann zusätzlich mit einer vom Benutzer gewählten Spannungsform programmiert werden.

Das Antwortsignal des Verstärkers auf ein rechtecksförmiges Spannungssignal des Funktionsgenerators ist nicht beliebig schnell, da der Strom wegen der Selbstinduktion der Spule nicht unendlich schnell der äußeren Spannung folgen kann (Lenzsche Regel). Durch die Darstellung an einem Oszilloskop wurde gemessen, dass es 8 ms dauert, bis der Strom 90% des konstanten Wertes eines solchen Spannungspulses erreicht hat. Diese Verzögerung des Spulenstroms aufgrund der Selbstinduktion muss bei der Wahl der Bildrate beachtet werden, um systematische Fehlerquellen im Experiment zu vermeiden.

3.1.3 Kamera und Rechner

Das vom Mikroskop erzeugte Bild wird von einer CCD-Kamera aufgenommen und von der Kamera direkt in einen Rechner eingespeist, wo die Bilder sofort als `avi`-Datei gespeichert werden. Die verwendete Kamera C 4880-80 (Hamamatsu, Herrsching) ist optimiert für schnelle Bildraten: durch entsprechende Wahl des Bildausschnitts und gemitteltes Auslesen von 2×2 Kamerapixeln (sog. *binning*) in einen Bildwert können Bildraten von unter 10 msec erreicht werden. Wegen des oben beschriebenen Effekts des verzögerten Stromflusses aufgrund der Induktion der Spule sollte jedoch darauf geachtet werden, die Bildrate immer oberhalb von 10 msec zu belassen. Da der Beginn der Belichtungszeit eines Bildes mit dem Beginn des Kraftpulses statistisch korreliert ist, ergibt sich bei einer Rate von 16 msec/Bild durch den verzögerten Stromfluss im Mittel eine Messunsicherheit von 25% für den ersten Datenpunkt. Diese Unsicherheit gilt aber nur für den ersten Punkt und wurde darum in der Auswertung vernachlässigt.

Ein typisches Bild kann eine Größe von 200×200 Pixel erreichen, was bei 10 bit Farbtiefe ca. 50 KB Speichervolumen ergibt. Bei einer Beobachtungsdauer von 20 min und einer Bildrate von 18 ms führt das zu einem Speichervolumen von 3,3 GB und einem Datenfluss von 2,8 MB/sec. Zu diesem Zweck steht für die Experimente der Magnetischen Pinzette ein PC mit 20 GB Festspeicherplatte und 700 MHz zur Verfügung. Die Größe der erstellten Videodateien wird zur Archivierung nach der Auswertung der Daten durch eine Wavelet-Komprimierung auf 10% der Originalgröße reduziert. Der Verlust an Genauigkeit durch die Komprimierung liegt dabei unter der Genauigkeit der Ortsauflösung durch die Bildverarbeitung. Ein Datenverlust durch die Komprimierung findet also nicht statt. Die genauen technischen Daten der Hardware zur Speicherung der anfallenden Bilddaten können bei Keller et al. (2001) gefunden werden, die Anforderungen an die Software und deren Lösung sind bei Schilling (1999) beschrieben.

3.2 Krafterzeugung durch einen magnetischen Feldgradienten

Die Erzeugung einer Kraft auf einen magnetischen Dipol in einem inhomogenen Magnetfeld beruht auf der Minimierung der potentiellen Energie U des magnetischen Dipols $\boldsymbol{m}$ in einem magnetischen Feld $\boldsymbol{B}$. In den folgenden Überlegungen wird dabei von einem Dipol ausgegangen, der aus paramagnetischem Material besteht. Das heißt, dieser Dipol wird durch ein äußeres Magnetfeld induziert, er ist nicht permanent vorhanden.

$$\boldsymbol{m} = \chi \boldsymbol{B} \tag{3.1}$$

Dabei ist χ die magnetische Suszeptibilität, eine spezifische Materialkonstante.

Ein magnetischer Dipol besitzt in einem Feld die potentielle Energie $U = \boldsymbol{m} \cdot \boldsymbol{B}$. Die Kraft, die auf den Dipol im magnetischen Feld wirkt, lautet dann

$$\boldsymbol{F} = -\nabla(\boldsymbol{m} \cdot \boldsymbol{B}) \tag{3.2}$$

Diese Beziehung ist allgemein gültig, unabhängig davon, ob das Magnetfeld homogen oder inhomogen ist. In einem homogenen (d.h. konstanten) Magnetfeld ist jedoch auch ein induziertes Dipolmoment konstant, d.h. die Anwendung des Nablaoperators auf das Skalarprodukt verschwindet. Im homogenen Magnetfeld wirkt keine Kraft auf einen paramagnetischen Partikel.

Wie aus Gleichung (3.1) ersichtlich, ist $\boldsymbol{m}$ parallel zu $\boldsymbol{B}$, das Skalarprodukt aus $\boldsymbol{m}$ und $\boldsymbol{B}$ also maximal, die Vektoren können jeweils durch den Betrag ersetzt werden. Wichtig in Gleichung (3.2) ist nun, dass der Nablaoperator auf den Skalar $m \cdot B$ wirkt, die Richtung des magnetischen Feldes also keinen Einfluss in der Gleichung besitzt. Physikalisch bedeutet dies, dass die Orientierung der Kraft nicht vom Verlauf der magnetischen Feldlinien abhängt, sondern nur vom Verlauf des Dichtegradienten der Feldlinien (d.h. dem Gradienten der Feldstärke). Im vorliegenden Fall der Magnetischen Pinzette sind Kraft und Feldlinien parallel. Beispiele, in denen die erzeugte Kraft gerade senkrecht auf den Feldlinien steht, sind jedoch auch bekannt. Zu nennen sind der Aufbau, den B. Maier verwendet hat (Maier 2001) und ein Aufbau, der am Lehrstuhl E22 neu entwickelt worden ist (Gönnenwein 2003).

Setzt man Gleichung (3.1) in Gleichung (3.2) ein, so erhält man einen Ausdruck für die Kraft, der quadratisch von der magnetischen Feldstärke abhängt. Wird das magnetische Feld durch einen Elektromagneten erzeugt, hängt die Kraft also quadratisch vom fließenden Strom ab.

$$\boldsymbol{F} = -\nabla(\chi B^2) \tag{3.3}$$

Diese quadratische Abhängigkeit wurde bei Experimenten mit schwachen magnetischen Feldern beobachtet (Ziemann et al. 1994, Schmidt 1999).

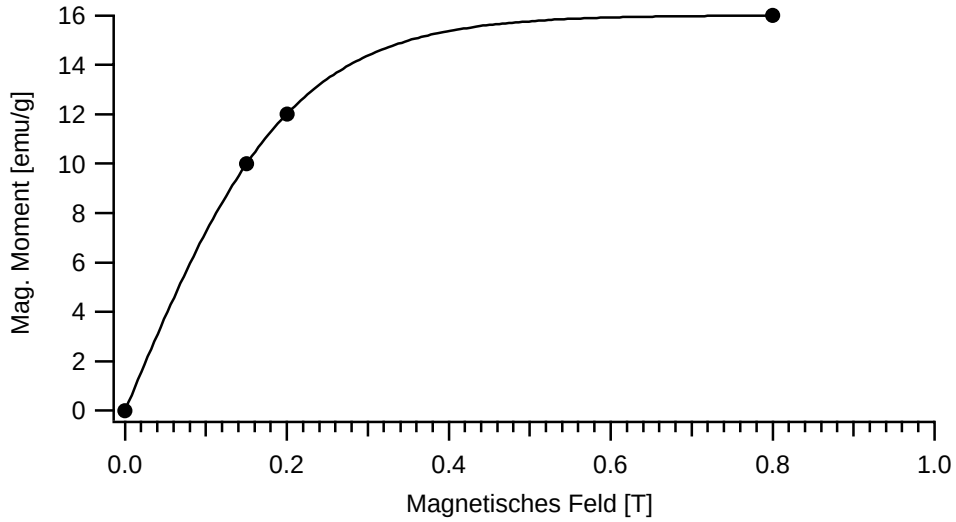


Abbildung 3.3: Das magnetische Moment der paramagnetischen Kugeln in Abhängigkeit des äußeren Feldes. Die Werte (•) sind vom Hersteller angegeben und wurden durch eine tanh-Funktion angenähert.

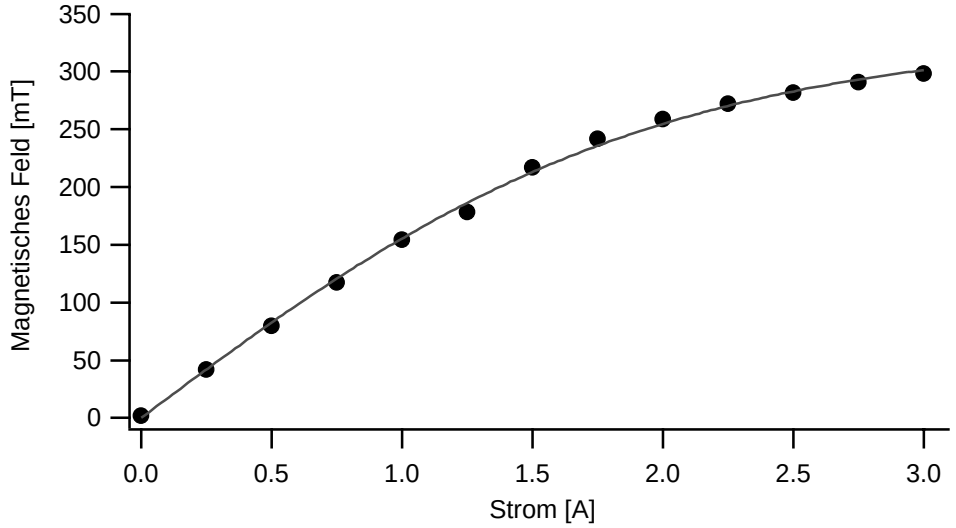


Abbildung 3.4: Messung des Magnetfeldes in Abhängigkeit des fließenden Stroms. Die Werte wurden mit Hilfe einer Hallsonde aufgenommen. Die Messdaten (•) sind mit einer tanh-Funktion genähert (durchgezogene Linie), die bei ungefähr 0,3 T sättigt. Es muss bemerkt werden, dass das so gemessene Feld einen Mittelwert über die Fläche der Hallsonde von $2\,\mathrm{mm}^2$ darstellt, lokale Werte des Magnetfeldes können also deutlich größer sein.

Allerdings besitzen paramagnetische Kugeln eine maximale Magnetisierung, die erreicht wird, wenn alle mikroskopischen Dipole parallel zum äußeren Feld ausgerichtet sind. Dieses maximale Dipolmoment wird bei starken äußeren Magnetfeldern durchaus erreicht (Furst 2000). Das Dipolmoment bleibt ab dieser Feldstärke konstant $\boldsymbol{m}_{\max}$, die Kraft durch das inhomogene Magnetfeld ist dann nur noch linear vom Strom abhängig.

$$\boldsymbol{F} = -\nabla(m_{\max} \cdot B) \tag{3.4}$$

Die Kalibration des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus zeigt diese lineare Abhängigkeit ab einem Strom von ca. 0,25 A, die Magnetkugeln sind im Experiment also maximal magnetisiert. In Abbildung 3.3 ist das magnetische Moment der verwendeten Magnetkugeln gezeigt und mit einem Tangens hyperbolicus angenähert. Nach dieser Annäherung beginnt das magnetische Moment ab einer äußeren Feldstärke von ca. 0,3 T zu sättigen. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, wird ein solches Feld mit diesem beschriebenen Aufbau auch tatsächlich erreicht.

3.3 Magnetkugeln

Einen weiteren wichtigen Bestandteil der Experimente mit der Magnetischen Pinzette stellen die verwendeten Kraftüberträger, die Magnetkugeln, dar. Die Kugeln sollten über eine möglichst homogene (monodisperse) Größe verfügen , da bereits kleinste Schwankungen im Radius zu merklichen Ungenauigkeiten im Volumen und damit im Magnetgehalt der Kugeln führen. Diese Vorgabe schränkt die Wahl der Kugeln aus der Vielzahl der Anbieter stark ein, da eine sinnvolle Kalibration des Aufbaus nur möglich ist, wenn die Standardabweichung des Kugeldurchmessers weniger als 10% beträgt.

In der vorliegenden Arbeit fanden ausschließlich die Kugeln M-450 der Fa. Dynal (Deutsche Dynal, Hamburg) Verwendung, die einen Durchmesser von 4,5 μm besitzen. Laut Hersteller beträgt die Standardabweichung des Radius maximal 3%. Der Magnetgehalt der Kugeln wurde von Door et al. (1991) zu $19{,}6 \pm 2\,\%$ des Gewichts bestimmt. Das magnetische Material im Inneren der Kugeln besteht aus kleinen Kolloiden aus Maghemit (Fe_2O_3) und Magnetit (Fe_3O_4), deren Volumen kleiner ist als die typische Größe eines Weißschen Bezirks. Die Kolloide stellen also jeweils ein Ein-Domänen-Teilchen mit einem Dipolmoment dar. Diese kolloidalen Dipolmomente sind in den Kugeln statistisch verteilt, die Kugeln besitzen kein makroskopisches Dipolmoment. Jedoch zeigen sie aufgrund der ferromagnetischen Natur ihrer Magnetisierung eine sehr starke Suszeptibilität $\chi = 0{,}2$–$0{,}3$ (Angaben des Herstellers). Das entspricht ungefähr dem Wert von Eisen bei der Curie-Temperatur. Wegen ihrer starken Magnetisierbarkeit werden die Partikel auch als *superparamagnetisch* bezeichnet. Die Kugeln besitzen auf der Oberfläche eine aktive Tosylgruppe, an die gewünschte Beschichtungen chemisch gekoppelt werden können (vgl. Abschnitt 2.3).

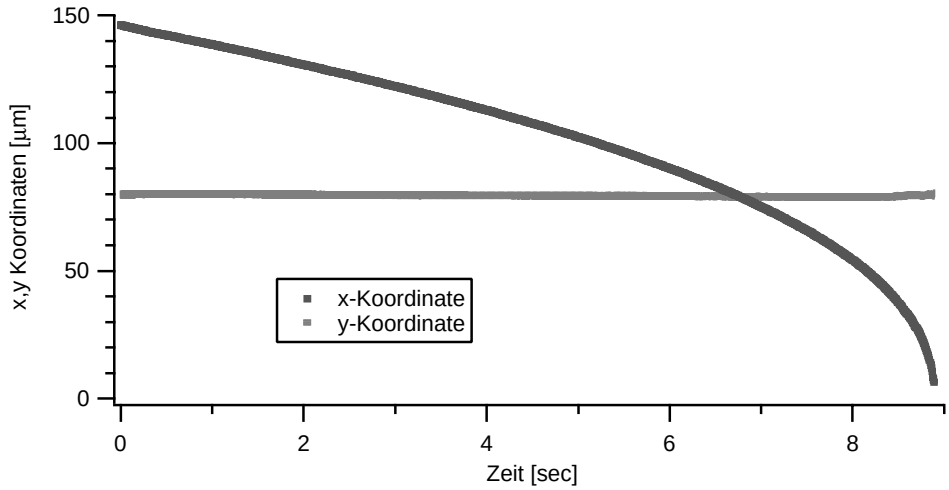


Abbildung 3.5: Die Koordinaten einer Eichkurve aufgetragen gegen die Zeit. Die y-Koordinate bleibt konstant, während sich die x-Koordinate ändert, da die Kugel zum Magneten gezogen wird, der bei $x = 0$ positioniert ist. Die Kugel (Durchmessers 4,5μm) befindet sich in wasserfreiem Glyzerol.

3.4 Kalibration des Aufbaus

Um aus Experimenten mit magnetischen Kugeln als Kraftüberträgern numerische Werte erhalten zu können, muss bekannt sein, welche Kraft auf die Kugeln wirkt. Es ist also nötig, den Aufbau zu kalibrieren. Dabei muss die Magnetische Pinzette für jede verwendete Kugelsorte separat geeicht werden, da zwar das Feld des Magneten bei gleichen Bedingungen immer identisch ist, die induzierten magnetischen Dipolmomente aber je nach Kugelsorte variieren. Die Kalibration erfolgt mit Hilfe des Gesetzes der Stokesschen Reibung einer laminar umströmten Kugel in einem viskosen Medium.

Zur Kalibration werden die Kugeln in ein Medium bekannter Viskosität gegeben und bei konstantem Strom durch dieses Medium gezogen. Aus den Trajektorien der Kugeln ist es möglich, anhand der Stokesschen Formel

$$F(x, I) = 6\pi\eta\, R \cdot v(x, I) \tag{3.5}$$

die wirkende Kraft für verschiedene Stromstärken I an unterschiedlichen Positionen x zum Magneten zu bestimmen. Dabei ist η die Viskosität des umgebenden Mediums, R der Radius der umströmten Kugel und v die Geschwindigkeit der Kugel, die aus der gemessenen Trajektorie berechnet werden muss.

Abbildung 3.5 zeigt das Beispiel einer superparamagnetischen Kugel mit Radius $R = 2{,}25\,\mu$m in Glyzerol. Deutlich kann man an der Änderung der Steigung der Trajektorie erkennen, dass die Kraft im Verlauf der Messung zunimmt, da der Gradient in der Nähe des Magneten stärker wird. Um die Viskosität des Glyzerols

zu erhöhen und so die Geschwindigkeiten der Kugeln gering zu halten, wird die Probe durch ein Wasserbad, das an den Probenhalter angeschlossen ist, gekühlt. Bei einer Temperatur von 15° C hat Glycerol eine Viskosität von 2,33 Pa s, also die 1000fache Viskosität von Wasser. Die Experimente fanden bei Temperaturen zwischen 10° C und 15° C statt. Die Viskositäten wurden anhand von Tabellenwerten und der gemessenen Temperatur der Probe bestimmt.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeiten der Kugeln müssen die gemessenen Trajektorien analysiert werden. Es werden zu diesem Zweck die x-Werte der Trajektorien nicht numerisch differenziert, was zunächst nahe liegend wäre. Es zeigt sich aber, dass die numerisch erzeugten Geschwindigkeitskurven sehr stark verrauscht sind, wie auch Ziemann (1997) bereits beschreibt. Ziemann umgeht das Problem, indem er ein Polynom achten Grades zur Interpolation der bereits differenzierten Werte verwendet, weil sich ein solches als geeignet erwies. Allerdings stellt sich mit der Interpolation durch ein Polynom die Schwierigkeit, dass es die zu interpolierenden Werte immer genauer beschreibt, je höheren Grades das Polynom ist. Es lassen sich bei genügend vielen Freiheitsgraden alle statistischen Abweichungen der Trajektorien wiedergeben, die resultierende Geschwindigkeit wird wieder verrauscht. Aus diesem Grund wurde versucht, einen neuen Ansatz zur Interpolation zu wählen.

Bei genauer Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der x-Koordinate in Abbildung 3.5 besitzt diese Funktion in der Nähe des Magneten eine Singularität: die x-Koordinate endet bei $x = 0$ senkrecht auf der Ordinaten-Achse. Dieser Verlauf kann durch ein Polynom nicht wiedergegeben, sondern bestenfalls angenähert werden. Deshalb wird heuristisch eine Interpolationskurve gewählt, die sowohl die Messwerte wiedergibt als auch über eine Singularität verfügt und so die Charakteristik der Eichtrajektorien wiederspiegelt. Als solche Interpolationskurve erweist sich

$$x(t) = a_0 + a_1 t + a\sqrt{t_0 - t} + [\, a_2\, t^2], \tag{3.6}$$

wobei der letzte Term in eckigen Klammern nicht für alle Kurven verwendet werden muss, um die Messdaten wiederzugeben. Er wird darum, wann immer möglich, unterdrückt, um die Anzahl der Freiheitsgrade der Interpolation zu minimieren. Die Koeffizienten der Kurve a_0, a_1, a_2, a und t_0 müssen dabei durch Anpassung an die Messdaten bestimmt werden. Es ist so möglich, alle Eichkurven mit einer analytischen Funktion zu interpolieren, die maximal 5 freien Parameter enthält, also weniger als bei Ziemann zur Beschreibung der Daten nötig waren. Streng genommen existieren dabei auch noch experimentell bestimmte Einschränkungen für einen der Parameter: die Variable t_0 kann nicht frei gewählt werden, sondern ist die Position der Singularität auf der Ordinate, bei der die Kugel den Magneten erreicht. Abbildung 3.6 zeigt das Beispiel der mit Gleichung (3.6) gewonnenen Interpolationskurve zur Eichtrajektorie aus Abbildung 3.5. Die hervorragende Übereinstimmung ist evident.

Die Interpolationskurve kann nun analytisch differenziert werden, um die Ge-

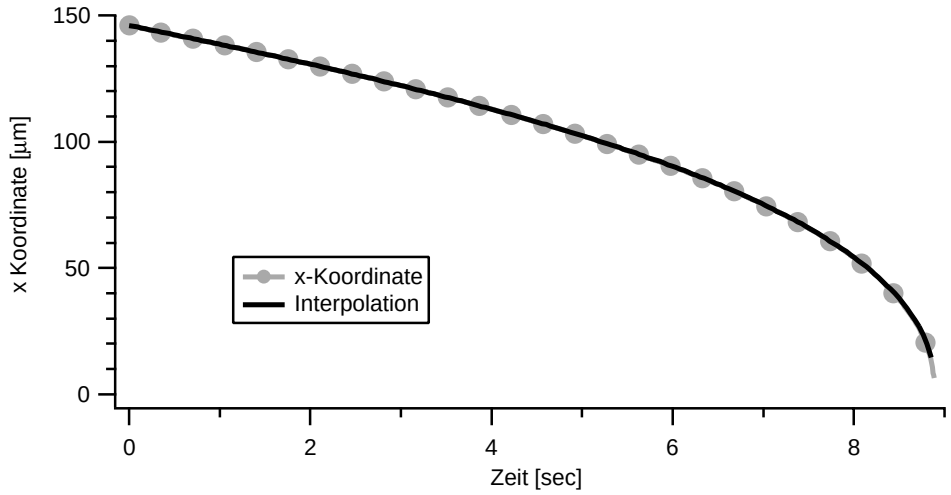


Abbildung 3.6: Die Eichkurve aus Abbildung 3.5 mit der Interpolationskurve. Die Interpolation wurde mit 5 freien Parametern erzeugt und zeigt eine hervorragende Übereinstimmung mit den Messdaten.

schwindigkeit der Kugel zu bestimmen. Die analytische Ableitung von Gleichung (3.6) lautet

$$\dot{x}(t) = a_1 - \frac{a}{2\sqrt{t_0 - t}} + [\,2a_2\,t]. \tag{3.7}$$

Auch sie besitzt eine Singularität bei $t = t_0$. In diese analytische Ableitung wurden die aus der Interpolation gewonnenen Koeffizienten t_0, a_1, a_2 und a eingesetzt und so die Ableitung berechnet. Auf diese Art kann eine glatte Geschwindigkeitskurve aus den Kugeltrajektorien bestimmt werden, die nicht durch numerische Artefakte verrauscht ist. Abbildung 3.7 zeigt die Geschwindigkeitskurve zu den Daten aus Abbildung 3.5 und vergleicht sie zusätzlich zur Verdeutlichung mit einer Geschwindigkeitskurve aus der numerischen Differentiation. Die glatte Kurve stellt also keine Anpassung an die numerischen Daten dar, sondern wurde analytisch berechnet aus der Interpolation der experimentellen Daten.

Nach der Stokesschen Gleichung (3.5) wird aus der Geschwindigkeit $\dot{x}$ der Kugel im Abstand x vom Magneten in Abhängigkeit vom angelegten Strom I die jeweils wirkende Kraft $F(x, I)$ bestimmt. Diese Kraftkalibration kann als Kraft-Abstand-Kurve und als Kraft-Strom-Kurve für die Kugelsorte verwendet werden. Die verwendeten Kalibrationskurven sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Abbildung 3.8A zeigt die Relation zwischen Kraft und Abstand zum Magneten. Die erzeugten Kräfte nehmen in der Nähe des Magneten stark zu, was nicht überrascht, wenn man sich die Simulation der Feldstärke in Abbildung 3.2 vergegenwärtigt. Im Gegensatz dazu erkennt man in Abbildung 3.8B eine lineare Abhängigkeit zwischen Kraft und Strom bei konstantem Ort. Dieser lineare Zusammenhang lässt sich durch ein konstantes, gesättigtes magnetisches Dipolmoment der Ku-

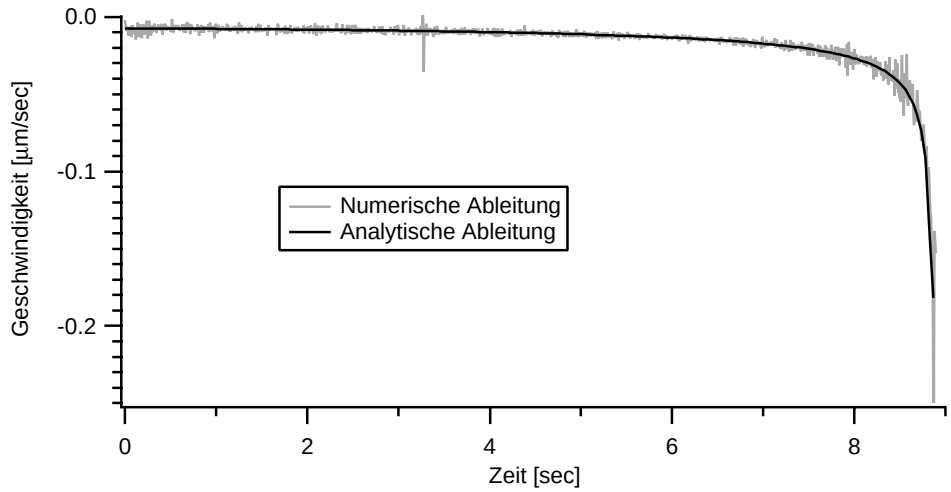


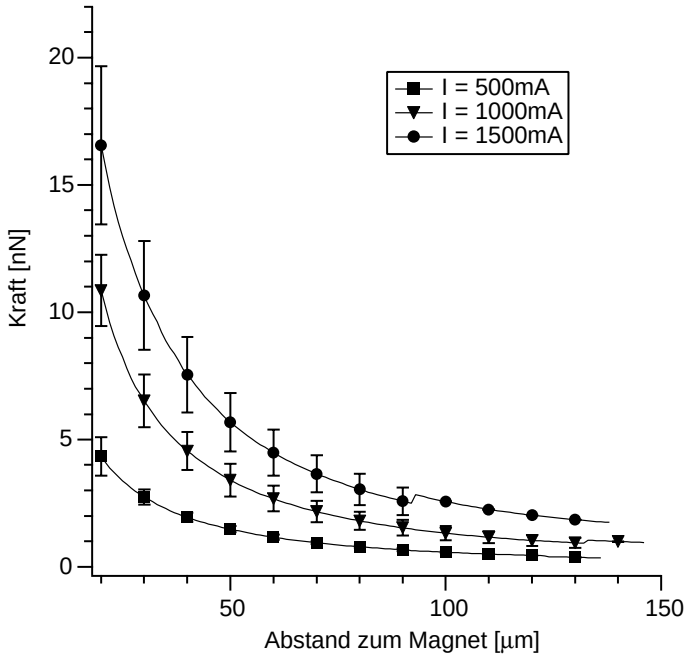
Abbildung 3.7: Die Ergebnisse der Differentiation aus der Eichkurve in Abbildung 3.5 sowohl aus der numerischen Berechnung als auch aus der analytischen Formel von Gleichung (3.7).

gel erklären, das sich im Gradienten eines inhomogenen Magnetfeldes befindet (vgl. Abschnitt 3.2). Überraschend ist jedoch, dass dieser lineare Zusammenhang bereits ab Stromstärken von 250 mA zu erkennen ist. Nach den Messwerten in Abbildung 3.4 ist bei diesem Strom das Magnetfeld noch nicht stark genug, um die Sättigung der Kugeln hervorrufen zu können (vgl. Sättigungsmagnetisierung der Kugeln in Abbildung 3.3). Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Messung der Feldstärke nur einen mittleren Wert wiedergibt, da die Probenfläche der verwendeten Hallsonde eine Größe von 2 mm^2 hatte. Die lokalen Feldstärken können also durchaus zur maximalen Magnetisierung ausreichen.

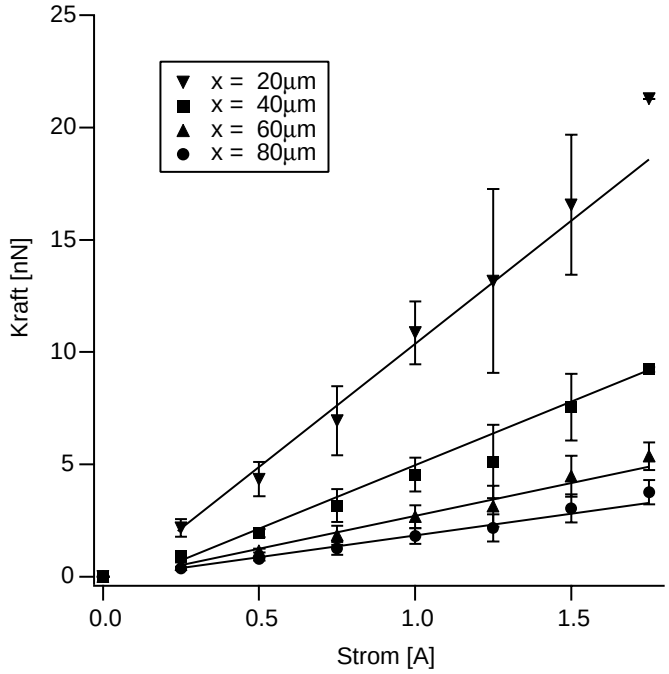
Die für kleine Stromstärken erwartete quadratische Abhängigkeit wurde durch eine weitere Kalibration bei Stromstärken kleiner als 250 mA bestätigt (Uhde 2003). Zusammen mit den Daten der oben präsentierten Kalibration ergibt sich der Übergang vom quadratischen in den linearen Bereich der Kraftabhängigkeit bei einer Stromstärke von etwas mehr als 250 mA.

Der lineare Zusammenhang zwischen Kraft und Strom, der bei 250 mA beginnt, ist nicht unbegrenzt gültig für alle Ströme $I > 250$ mA. Er gilt nur bis zu einer Stromstärke I_S =1,75 A. Ab dieser Stromstärke nimmt die Kraft nicht mehr weiter zu, sondern bleibt konstant für alle weiteren Ströme $I > I_S$. Wie bei der Darstellung des Magnetfeldes in Abhängigkeit des Stroms in Abbildung 3.4 zu erkennen, beginnt ab dieser Stromstärke die Sättigung des Magnetkerns. Jede weitere Verstärkung des Stroms kann also das Magnetfeld des Eisenkerns nicht mehr erhöhen, da dieser bereits maximal magnetisiert ist.

Es liegen der Kalibration pro Stromstärke jeweils Messungen von 3 bis 5



A Eichkurve Kraft gegen Abstand



B Eichkurve Kraft gegen Strom

Abbildung 3.8: Die Kalibrationskurven zeigen deutlich die starke Abhängigkeit der erzeugten Kraft vom Abstand zum Magneten. Im Gegensatz dazu ist die Relation zwischen Kraft und Strom an allen Positionen zum Magneten linear.

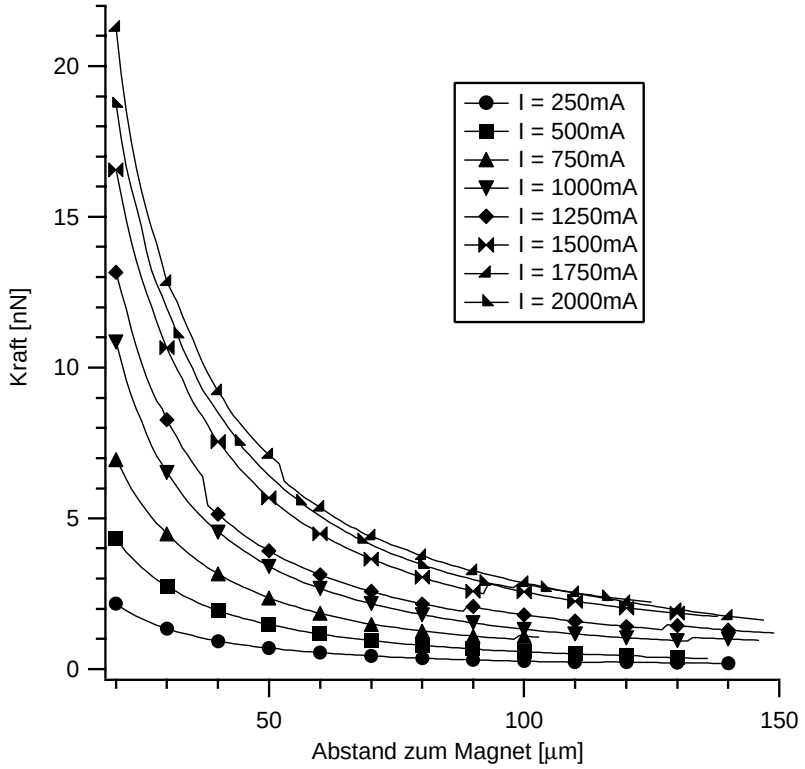


Abbildung 3.9: Die Kalibrationskurven zeigen für große Ströme ein Sättigungsverhalten. Ab 1,75 A ändern sich die erzeugten Kräfte nicht mehr, da der Eisenkern des Magneten dann maximal magnetisiert ist.

Kugeln in einem Bereich bis 150 μm Abstand zum Magneten[1] zugrunde, aus denen für jeden Strom ein Mittelwert gebildet wurde. Die Standardabweichung, die sich aus der Streuung um die Mittelwerte ergibt, ist in Abbildung 3.8 als Fehler aufgetragen. Da nicht alle Kugeln über die komplette Distanz beobachtet wurden, ergeben sich z.T. Sprünge im Mittelwert der Kraftkurven, die jedoch innerhalb der Standardabweichung liegen. Der Übersichtlichkeit halber sind in Abbildung 3.8 nur einige Kurven mit Standardabweichung dargestellt. Abbildung 3.9 zeigt alle Kraftkurven ohne Standardabweichung.

Wie aus der Kalibration ersichtlich, können mit diesem Aufbau in der Nähe des Magneten Kräfte bis zu 20 nN erzeugt werden. Diese Kräfte sind im Vergleich zum ursprünglichen Aufbau von Ziemann (1997) sogar noch um einen Faktor 2 größer, was an der leicht veränderten Form des Magnetkerns liegen muss.

[1]Dieser Abstand entspricht dem Sichtfeld am Axiovert 10 mit einem 40×0,75 Luft-Objektiv

3.5 Genauigkeit der Kalibration

Ziemann (1997) erläutert und begründet ausführlich die limitierenden Faktoren für die Genauigkeit der Messmethode. Es zeigt sich, wie auch aus der Kalibration ersichtlich, dass die homogene Dispersion des Kugelradius die deutlich größte Ungenauigkeit in der Eichung erzeugt, wenn quantitative Mittelwerte aus Experimenten mit mehreren Magnetkugeln der gleichen Charge ermittelt werden sollen. Wie an den Standardabweichungen in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, erfahren die Kugeln leicht voneinander abweichende Kräfte an gleichen Orten und bei gleichen Strömen. Bedenkt man, dass kleine Änderungen des Kugelradius aber in der dritten Potenz ins Volumen und damit auch in die Masse magnetischen Materials eingehen, dann sind diese Abweichungen verständlich. Dynal gibt die relative Streuung des Kugelradius mit $\Delta R/R = 3\%$ an. Das bedeutet für das Volumen eine Genauigkeit von ca. 10%, was mit den gemessenen Standardabweichungen übereinstimmt. Schon kleine Schwankungen im Kugelradius haben so deutlichen Einfluss auf die erzeugte, magnetische Kraft.

Präziser messen lassen sich relative Änderungen in der viskoelastischen Antwort ein und derselben Kugel. Da hier der Kraftüberträger nicht wechselt, gibt es auch keine Schwankungen in der Menge des magnetischen Materials. Die Genauigkeit ist nur noch von der exakten Bestimmung der Kugelposition abhängig. Genau betrachtet ist dabei die absolute Kugelposition, die von den bekannten optischen Kriterien der Auflösung bestimmt wird, nicht von Bedeutung, sondern die relative Verschiebung von einem Bild zum nächsten. Diese kann durch die Bildverarbeitung auf mindestens 0,050 μm genau gemessen werden. Die typischen Verschiebungen durch die äußere Kraft betragen 0,5-1 μm. Es ergibt sich also ein maximaler Messfehler von $\Delta x/x \leq 10\,\%$.

Kapitel 4

Bildverarbeitung

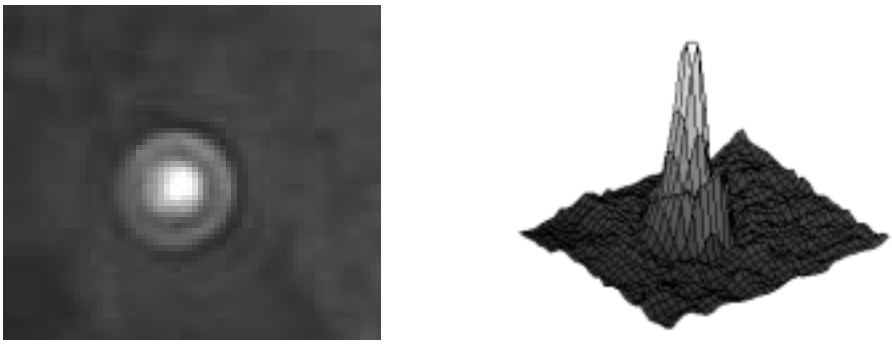
Um Bilder, die vom Mikroskop aufgenommen wurden, quantitativ mit einem Rechner zu analysieren, gibt es verschiedene Programme und Routinen. Obwohl die der Bildverarbeitung zugrunde liegenden Prinzipien und Algorithmen bereits in früheren Arbeiten mehrfach erläutert und beschrieben wurden (Ziemann 1997, Schmidt 1999, Bausch 2000, Dichtl 2001), sollen sie auch hier kurz erwähnt und skizziert werden, da sie grundlegend die quantitative Auswertung der Experimente ermöglichen.

4.1 Die Software `Open Box`

Um die Bilder eines Mikroskops auf einem Computer zu verwerten, entwickelte J. Schilling das Bildverarbeitungsprogramm `Open Box` (Schilling 1999, Keller et al. 2001). Diese Software unterstützt direkt eine am Mikroskop montierte CCD-Kamera C 4880-80 (Hamamatsu, Herrsching), deren Bildinformation als 10bit-Signal an den Rechner weitergeleitet und dort gespeichert wird. Ein Bild dieser Kamera besitzt maximal $2^{10} = 1024$ Grauwerte, was eine Steigerung der Bildinformation gegenüber älteren Systemen darstellt (8bit-Kamera, entspricht 256 Graustufen). Durch direktes Speichern der Bilder auf dem Rechner ist die Bildfrequenz nicht mehr vom Speichermedium abhängig, wie das bei einem Videorekorder der Fall ist. Statt dessen hängt die Bildrate nur noch von der Geschwindigkeit des Rechners und der Größe der Bilder (Größe der Datenmenge) ab.

Um die Bildgröße zu reduzieren (und so die Bildrate zu steigern), ist es bei der verwendeten Kamera möglich, nur einen Teil des Kamera-Chips auszulesen. Beschränkt sich der interessante Bereich des Experiments auf einen Ausschnitt des gesamten Bildes, kann die Bildgröße so ohne Informationsverlust verringert werden. Außerdem kann sogenanntes *binning*[1] eingesetzt werden, ein Aufnahmemodus, der die Werte von 2×2 (oder 4×4) Bildpunkten (Pixel) zu einem

[1] engl. *bin* – der Behälter, offene Kasten



A Bildausschnitt **B** 3D-Darstellung des Bildes

Abbildung 4.1: Intensitätsprofil einer Kugel. In Abbildung 4.1A kann man deutlich einen dunklen Ring erkennen, der das Profil der Kugel nicht wie eine Gaußkurve erscheinen lässt. Trägt man die Intensitätswerte jedoch dreidimensional auf, ist gut zu erkennen, dass diese Abweichung vernachlässigbar ist und das Profil doch gut durch eine Glockenkurve beschrieben werden kann.

Bildpunkt zusammenfasst. Durch diese Mittelung nimmt zwar die laterale Auflösung des Bildes ab, die Lichtausbeute verbessert sich jedoch, was speziell für Fluoreszenzmikroskopie von Interesse ist. Zusätzlich sinkt die Datengröße pro Bild auf ein Viertel (ein Sechzehntel) des ursprünglichen Wertes. Durch die Verkleinerung des Bildes durch *binning* oder durch die Auswahl eines Bildausschnitts kann die Bildrate gesteigert werden, da die Datenmenge pro Bild kleiner geworden ist. Es können so problemlos Bildraten von bis zu 8 msec pro Bild bzw. 125 Hz erreicht werden (zum Vergleich: bei einer Videokamera ist die Bildrate 40 msec bzw. 25 Hz).

Für den *Magnetic-Tweezers-Aufbau* ist die exakte Kenntnis des gerade in der Spule fließenden Stromes eine entscheidende Größe. Darum wird ein dem Strom proportionales Spannungssignal vom Verstärker über einen analog-digital-Wandler (AD-Karte) in den Rechner eingelesen. Jedem Bild, das der Rechner auf der Festplatte abspeichert, wird der aktuelle Spannungswert des Verstärkers zusätzlich als numerische Bildinformation beigefügt und kann als solche bei der Kugelnachverfolgung wieder ausgelesen werden.

4.2 Digitale Kugelnachverfolgung

Um aus den Bildern des Mikroskops numerische Werte zu erhalten, wurden in die Software `Open Box` zwei Algorithmen implementiert, die die Koordinaten von Kugeln bestimmen. Die Kugeln sind dabei als charakteristische Grauwerte im Bild sichtbar. Die eine der beiden Routinen passt eine Gaußkurve an diese Grauwerte des Bildes an, die andere bestimmt die Änderung des Ortes einer Intensitätsverteilung über die Korrelation der beiden Bilder.

Nachverfolgung durch Gaußkurve

Bei der Nachverfolgung von Objekten in digitalen Bildern wird versucht, charakteristische Helligkeitsverteilungen mit einer numerischen Kurve zu beschreiben und die Objekte so in aufeinander folgenden Bildern zu identifizieren. Im Fall von kleinen Partikeln eines Durchmessers von mehr als 1 μm, können die Grauwerte der Kugel durch eine Gaußsche Glockenkurve genähert werden. Das Beispiel einer Magnetkugel in einem Mikroskopbild ist in Abbildung 4.1A gezeigt. Die dreidimensionale Darstellung, in der die Grauwerte an die z-Achse aufgetragen sind (Abbildung 4.1B) verdeutlicht, dass eine Anpassung durch eine Gaußkurve sinnvoll ist und dem Profil der Kugel entspricht.

An die Grauwerte wird zur Nachverfolgung numerisch eine Gaußkurve angepasst und die Position der Kugelkoordinaten mit der Lage des Maximums der Gaußkurve identifiziert. Dabei startet der Anpassungsalgorithmus an einer vom Benutzer durch Mausklick vorgegebenen Stelle mit der Suche nach dem Maximum. Ist das Maximum im Bild gefunden, wird der Wert in einer Datei abgespeichert. Im folgenden Bild startet der Algorithmus in der gerade gefundenen Position und führt erneut eine Anpassung an die im neuen Bild veränderte Grauwerteverteilung aus. Die Nachverfolgung durch diese Prozedur kann also nur erfolgreich sein, wenn sich die Kugel von einem Bild zum nächsten um weniger als die Fläche bewegt wird, an die der Algorithmus die Glockenkurve anpasst.

Nachverfolgung durch Korrelation

Eine Alternative zum oben beschriebenen Verfahren zur Objektverfolgung durch ein Gaußprofil ist vor allem dann nötig, wenn sich das fragliche Objekt vor einem sehr heterogenen Hintergrund befindet, in dem der Algorithmus eventuell andere Maxima finden könnte, die dann als falsche Kugelposition wiedergegeben werden.

Zu diesem Zweck wurde von J. Schilling ein weiterer Nachverfolgungsalgorithmus entwickelt, der versucht, eine vorgegebene, aber beliebige Grauwerteverteilung im Bild zu identifizieren. Zu diesem Zweck werden die Grauwerte des Helligkeitsprofils mit den Werten eines Bildbereichs gleicher Größe korreliert. Der Korrelationsbereich des Bildes wird nun um einen Bildpunkt verschoben und die Korrelation erneut berechnet und dieser Vorgang solange wiederholt, bis das ganze Bild abgerastert wurde. An der Stelle der größten Übereinstimmung des Bildes mit dem gesuchten Helligkeitsprofil besitzen die Korrelationswerte ein Maximum. Dieses Maximum wird nun als neue Position des Profils identifiziert. Das Verfahren ist in Abbildung 4.2 skizziert.

Die Partikelnachverfolgung durch den Korrelationsalgorithmus hat gegenüber der oben beschriebenen Nachverfolgung durch eine Gaußkurve den Vorteil, dass sie, unabhängig von der speziellen Form des Grauwerteprofils eines Objektes, dieses nachverfolgen kann. Wichtig ist jedoch, dass das Profil charakteristisch ist und sich im Laufe des Experiments nicht oder nur unwesentlich verändert.

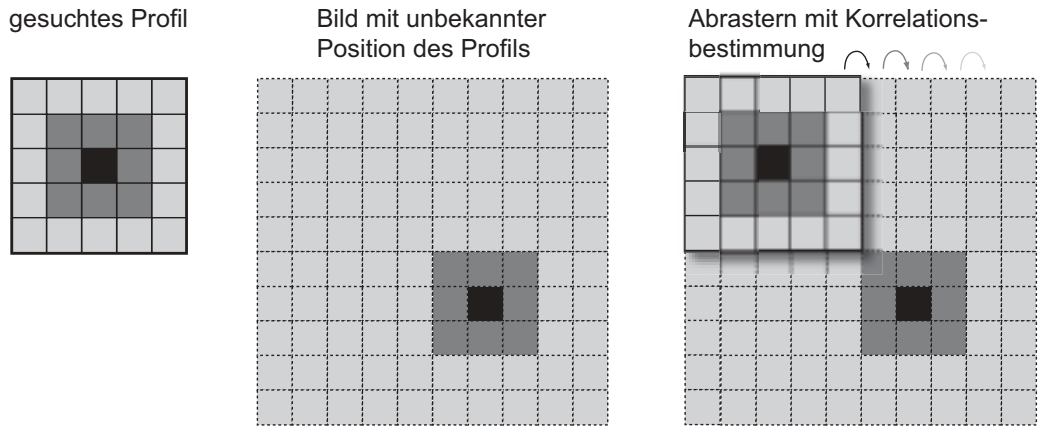


Abbildung 4.2: Skizze des Vorgehens zur Nachverfolgung durch Korrelation. Das Profil links soll im Bild in der Mitte gefunden werden. Dazu wird nun der Reihe nach das Profil mit Ausschnitten des Bildes korreliert. An der Stelle, an der im Bild das Profil wieder auftritt, bekommt der Wert der Korrelation ein Maximum. Dieses Maximum wird als Position des Profils im Bild identifiziert.

Das Verfahren hat den Nachteil, das die Nachverfolgung mehr Rechenzeit beansprucht im Vergleich zu einer Nachverfolgung mit Hilfe des Gaußalgorithmus, also a priori langsamer ist. Ein weiteres Manko der Korrelationsmethode ist, dass Software-bedingt in einem Arbeitsgang nur eine Kugel nachverfolgt werden kann. Da häufig mehrere Kugeln in einem Bild beobachtet werden, wenn z.B. neben magnetischen auch unmagnetische Kugeln als Sonden eingesetzt werden, erhöht die Verwendung der Korrelationsmethode den Zeitaufwand erheblich, da der Algorithmus für jede einzelne Kugel wiederholt werden muss. Die Nachverfolgung durch den Korrelationsalgorithmus wurde deshalb nur verwendet, wenn eine Verfolgung mit Hilfe des Gaußalgorithmus fehlschlug.

Ergebnis der Nachverfolgung

Die durch die Nachverfolgung gewonnenen numerischen Werte der x- und y-Koordinate werden zusammen mit weiteren Informationen der Bilder als Text-Datei auf dem Rechner abgespeichert. Als weitere Informationen können dabei verwendet werden: die Information über einen durch die Probenspule fließenden Strom (entspricht dem anliegenden Magnetfeld); der Index (d.h. Bildnummer) des Bildes im laufenden Film und die Uhrzeit, zu der das jeweilige Bild abgespeichert wurde (in Millisekunden ab 0.00 Uhr). Weitere mögliche Daten, die durch `Open Box` ausgelesen und abgespeichert werden können, sind z.B. die mittlere Helligkeit in einem ausgewählten Gebiet.

In Abbildung 4.3 ist das Beispiel der Trajektorie einer unmagnetischen Kugel dargestellt. Die Kugel, die einen Durchmesser von 2 μm besitzt, wurde über

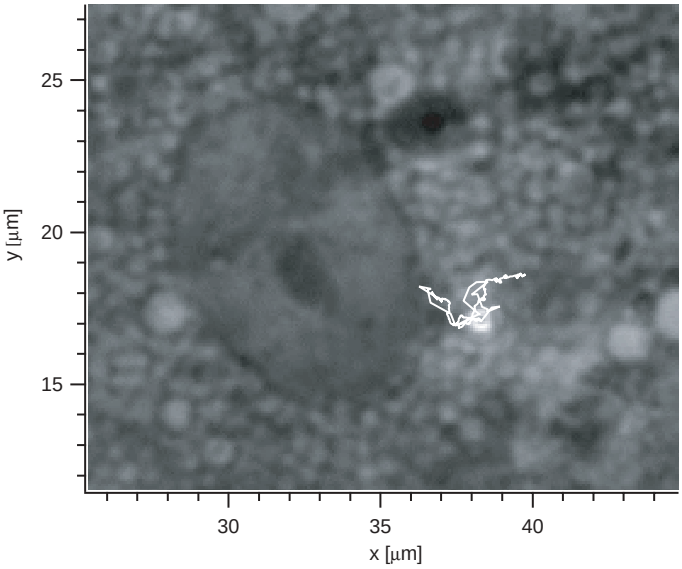


Abbildung 4.3: Beispiel der Trajektorie einer 2 μm Kugel, die durch digitale Nachverfolgung bestimmt wurde. In diesem Beispiel wurde die Kugel durch den Gaußalgorithmus nachverfolgt.

7 Minuten 37 Sekunden mittels des Gaußalgorithmus nachverfolgt. Das Mikroskopbild der Zelle in der Abbildung ist die erste Aufnahme der Bildsequenz. Die Trajektorie der Kugel, die durch Fibronektin an die Zelloberfläche gebunden ist, verdeutlicht die dynamische Natur einer lebenden Zelle: auch ohne äußeren Einfluss wird die unmagnetische Kugel auf der Zelle bewegt und verbleibt nicht am selben Ort.

Genauigkeit der Ortsbestimmung

Interessant ist die Genauigkeit, mit der die oben beschriebenen Algorithmen die Kugelposition bestimmen. Diese ist nicht durch das optische Auflösungvermögen des Mikroskops bestimmt, sondern durch die Anzahl der im Bild vorhandenen Grauwerte. Theoretisch ist bei 1024 Grauwerten eine Verschiebung eines Profils um 1/1024 Pixel detektierbar (Subpixelauflösung, siehe Ziemann 1997). Dies gilt aber nur, wenn sich die Helligkeit im Bild sonst nicht verändert, was bei der Beobachtung lebender Zellen nicht vorausgesetzt werden kann.

Experimentell wurde die Präzision der Ortsauflösung durch den Gaußalgorithmus an Kugeln bestimmt, die in Epoxyharz immobilisiert wurden (Ziemann 1997). Die Position einer so mit Video aufgenommenen Kugel wurde in x bzw. y auf 4 nm bzw. 1 nm genau bestimmt. Werden bewegte Objekte beobachtet, deren Helligkeitsverteilung durch die Bewegung leicht schwankt, ist die Ortsauflösung natürlich geringer. Die Streuung der Daten in den Experimenten dieser Arbeit zeigt eine Genauigkeit, die je nach verwendetem Objektiv zwischen 10 nm und 50 nm liegt.

Kapitel 5

Rheologie — die Lehre der Viskoelastizität

In der klassischen Physik unterscheidet man perfekte Festkörper, die sich unter Krafteinfluss reversibel deformieren und die geleistete Arbeit speichern (Hooksches Gesetz), und newtonsche Flüssigkeiten, die unter Krafteinfluss die geleistete Arbeit zu 100% dissipieren. Viele Biomaterialien und Polymere zeigen, wenn sie aufgrund äußerer Einflüsse wie Scherung und Druck deformiert werden, sowohl elastische Eigenschaften (wie ein Festkörper) als auch viskose Beiträge (wie eine newtonsche Flüssigkeit). Dieses Verhalten nennt man viskoelastisch. Üblich ist dabei die Unterscheidung des viskoelastischen Festkörpers, dessen Deformation unter konstanter Spannung für lange Zeiten einen konstanten Wert annimmt, und der viskoelastischen Flüssigkeit, deren Deformation auch für lange Zeiten weiter zunimmt.

Im folgenden sollen die wichtigsten Gesetze aus der Elastizitätslehre und der Rheologie, die das Verhalten von viskoelastischen Körpern beschreiben, kurz zusammengefasst und erläutert werden. Sie sind den Büchern von Landau und Lifschitz (1970), Ferry (1980) und Tschoegl (1989) entnommen.

5.1 Lineare Viskoelastizität

Ein deformierter Körper besitzt linear viskoelastische Eigenschaften, wenn die die Verzerrung des Körpers beschreibende Größen Deformation γ, Scherspannung σ, Kriechkomplianz J und Relaxationsmodul G das Superpositionsprinzip erfüllen. Formal kann das durch die Gleichungen der linearen Viskoelastizität ausgedrückt werden:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^{t} G(t-t')\,\dot{\gamma}(t')\,dt' \tag{5.1a}$$

$$\gamma(t) \quad = \quad \int_{-\infty}^{t} J(t-t')\,\dot{\sigma}(t')\,dt' \tag{5.1b}$$

Der Relaxationsmodul $G(t)$ und die Kriechkomplianz $J(t)$ sind zwei korrespondierende Größen eines Körpers. Den Gleichungen (5.1a) und (5.1b) liegt die Idee zugrunde, dass sich Effekte, die durch nacheinander auftretende Änderungen im Körper erzeugt werden, addieren. Der Relaxationsmodul und die Kriechkomplianz stellen somit eine Art Erinnerungsvermögen dar, das wiedergibt, was bis zu einem Zeitpunkt t in einer Probe passiert ist. Die beiden Größen sind nicht unabhängig voneinander, sondern bedingen sich: kennt man Relaxationsmodul oder Kriechkomplianz kann die jeweils andere Größe berechnet werden durch die Identität

$$\int_{0}^{t} G(t-t')J(t')\,dt' = t. \tag{5.2}$$

Das Verhalten unter bekannter, jedoch beliebiger äußerer Deformation bzw. Scherspannung kann, falls der Relaxationsmodul $G(t)$ bzw. die Kriechkomplianz $J(t)$ bekannt sind, durch die Lösung der Gleichungen (5.1a) bzw. (5.1b) vorhergesagt werden, was in Kapitel 7 zur Anwendung kommt. Die Kriechkomplianz muss dabei, um physikalisch sinnvoll zu sein, eine stetig wachsende Funktion sein. Würde zu irgendeinem Zeitpunkt gelten $J(t_1) < J(t_0)$ mit $t_1 > t_0$, bedeutete das eine negative Deformation als Reaktion auf eine positive Kraft, was physikalisch nicht möglich ist. Entsprechendes gilt für den Relaxationsmodul $G(t)$, dieser muss eine stetig fallende Funktion sein.

In Gleichung (5.1a) sind die Grenzfälle rein viskosen und rein elastischen Verhaltens enthalten: für einen perfekt elastischen Körper gilt $G(t) = \text{const.}$, da induzierte Spannungen nicht relaxieren können. Es ergibt sich dann

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= G \int_{-\infty}^{t} \dot{\gamma}(t')\,dt' \\ \sigma(t) &= G \cdot \gamma(t). \end{aligned} \tag{5.3}$$

Das ist das Hookesche Gesetz der Elastizität: die Dehnung γ eines Körper ist proportional zur anliegenden Spannung σ.

Durch $G(t) = \eta\,\delta(t)$ wird ein Körper beschrieben, der instantan relaxiert und keine inneren Spannungen aufbaut, also perfekt viskos ist. Die Gleichung (5.1a) beschreibt dann das Newtonsche Gesetz viskoser Flüssigkeiten:

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= \eta \int_{-\infty}^{t} \dot{\gamma}(t')\delta(t-t')\,dt' \\ \sigma(t) &= \eta\,\dot{\gamma}(t). \end{aligned} \tag{5.4}$$

Die Gleichungen (5.1a) und (5.1b) sind der Spezialfall für die eindimensionale Scherung eines Körpers. Die allgemeine Form, eine Relation zwischen Spannungs- und Verzerrungstensor, kann in den oben angegebenen Quellen gefunden werden.

5.1.1 Deformation durch eine konstante Scherspannung

Wird eine Probe innerhalb eines Zeitintervalls $[t_0 - \tau, t_0]$ einer konstanten Scherspannung ausgesetzt, die den Wert $\sigma(t) = \sigma_0$ für $t > t_0$ erreicht, dann können die Integrationsgrenzen in der Gleichung (5.1b) ersetzt werden durch $t_0 - \tau$ und t_0, da für alle Zeiten vorher und nachher $\dot{\sigma} = 0$ erfüllt ist. Innerhalb der Integrationsgrenzen kann $\dot{\sigma} = \sigma_0/\tau$ für kleine τ ersetzt werden.

$$\begin{aligned} \gamma(t) &= \int_{-\infty}^{t} J(t-t')\,\dot{\sigma}(t')dt' \\ \gamma(t) &= \int_{t_0-\tau}^{t_0} J(t-t')\frac{\sigma_0}{\tau}\,dt' \end{aligned} \tag{5.5}$$

Nach dem Mittelwertsatz der Integralrechnung gibt es nun ein ϵ zwischen 0 und 1, so dass gilt

$$\begin{aligned} \gamma(t) &= J(t-(t_0-\epsilon\cdot\tau))(t_0-(t_0-\tau))\,\frac{\sigma_0}{\tau} \\ \gamma(t) &= \sigma_0 \cdot J(t-t_0+\epsilon\cdot\tau) \\ \gamma(t) &\overset{\tau\ll t}{=} \sigma_0 \cdot J(t-t_0) \qquad \text{für } t > t_0. \end{aligned} \tag{5.6}$$

Die Deformation, die durch eine konstante Spannung hervorgerufen wird, ist also direkt proportional zur Kriechkomplianz $J(t)$, die somit eine direkt messbare Größe ist. Den Zeitpunkt t_0, an dem die konstante Spannung beginnt, kann dabei ohne Einschränkung zur Vereinfachung als Nullpunkt $t_0 = 0$ definiert werden:

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\sigma_0} \tag{5.7}$$

Analog könnte aus Gleichung (5.1b) der Relaxationsmodul bestimmt werden, indem die Relaxation der Spannung nach konstanter Deformation gemessen würde. Dieser zweite Fall wurde in der vorliegenden Arbeit aber nicht verwendet.

5.1.2 Deformation durch einen Rechteckpuls

Eine einfache Erweiterung der Deformation durch eine konstante Kraft ist die Scherdeformation durch einen Rechteckpuls. In diesem Fall wird zu einer Zeit t_0 innerhalb einer sehr kurzen Zeit τ eine konstante Scherspannung an das Medium

angelegt, die zu einer späteren Zeit t_1 wiederum innerhalb des kurzen Intervalls τ erneut auf null abfällt. Die Deformation im Zeitintervall $t_0 < t < t_1$ wird durch Gleichung (5.6) beschrieben. Für Zeiten $t > t_1$ kommt jedoch ein weiterer Beitrag zur Deformation hinzu: Im Zeitintervall $[(t_1-\tau), t_1]$ wirkt die Spannungsänderung $\dot{\sigma} = -\sigma_0/\tau$, es ergibt sich analog zu Gleichung (5.6) für $t > t_1$

$$\begin{aligned}
\gamma(t) &= \int_{-\infty}^{t} J(t-t')\,\dot{\sigma}(t')dt' \\
\gamma(t) &= \int_{t_0-\tau}^{t_0} J(t-t')\frac{\sigma_0}{\tau}\,dt' + \int_{t_1-\tau}^{t_1} J(t-t')\frac{-\sigma_0}{\tau}\,dt' \\
\gamma(t) &= \sigma_0 \cdot J(t-t_0) - \sigma_0 \cdot J(t-t_1) \qquad (5.8)
\end{aligned}$$

Am Ende eines Reckteckpulses wiederholt sich also nicht einfach die Auslenkung in negative Richtung, sondern es findet eine Überlagerung statt zwischen einer Deformation durch eine Spannung σ_0 und einer zweiten Deformation durch die Spannung $-\sigma_0$, die zu einem späteren Zeitpunkt begann.

5.1.3 Deformation durch eine Treppenfunktion

Wird anstelle eines Rechteckpulses eine treppenförmige Scherspannung an ein viskoelastisches Medium gelegt, kann die Gleichung (5.1b) analog zum oben beschriebenen Fall des Rechteckpulses gelöst werden, sofern die Voraussetzung von linearer Viskoelastizität erfüllt ist. Das Integral in (5.1b) kann dann zerlegt werden in die einzelnen Anteile kurz vor und nach einer Spannungsänderung. Wenn zur Zeit t_i die Spannungsänderung innerhalb des Zeitintervalls τ erfolgt, so lässt sich schreiben:

$$\begin{aligned}
\gamma(t) &= \int_{-\infty}^{t} J(t-t')\,\dot{\sigma}(t')dt' \\
\gamma(t) &= \sum_{i}^{n} \int_{t_i-\tau}^{t_i} J(t-t')\frac{\sigma(t_i)-\sigma(t_i-\tau)}{\tau}\,dt' \\
\gamma(t) &= \sum_{i}^{n} \Delta\sigma_i \cdot J(t-t_i)\,\Theta(t-t_i). \qquad (5.9)
\end{aligned}$$

Dabei steht $\Theta(t-t_i)$ für die Stufenfunktion (engl. *heavy-side function*), deren Wert 0 ist für $t < t_i$ und 1 für $t > t_i$. $\Delta\sigma_i$ ist die Differenz, um die sich die Spannung σ am Zeitpunkt t_i ändert. Ist diese Spannungsänderung jeweils identisch

und bezeichnet man diesen Wert mit $\Delta\sigma$, vereinfacht sich Gleichung (5.9) zu

$$\gamma(t) = \Delta\sigma \cdot \sum_{i}^{n} J(t - t_i)\,\Theta(t - t_i). \tag{5.10}$$

Dabei kann $\Delta\sigma$ auch negative Werte annehmen, wie im Beispiel des Rechteckpulses gezeigt wurde. Die Deformation eines viskoelastischen Körpers auf eine treppenförmige Spannung entspricht also einer Summe gebildet aus der Kriechkomplianz des Körpers mit sich selbst, die jeweils zeitlich um die Länge einer Stufe verschoben ist.

Besteht eine solche Treppenfunktion aus n Stufen der Länge T, so ist es entsprechend möglich, aus der beobachteten Deformation iterativ die Werte der zugrunde liegenden Kriechkomplianz für die Länge $n \cdot T$ zu bestimmen, die der Antwort des Körpers auf eine konstante Spannung der Stärke $\Delta\sigma$ und der Dauer $n \cdot T$ entspricht. Wird die Länge einer Stufe als t_0 bezeichnet und beginnt der Treppenpuls bei $t = 0$, so gilt nach Gleichung (5.10) die rekursive Beziehung

$$\begin{aligned}
0 < t < t_0 : \quad & J_0 := J(t) = \frac{x(t)}{F_0} \\
t_0 < t < 2t_0 : \quad & J_1 := J(t) = \frac{x(t)}{F_0} - J_1 \\
2t_0 < t < 3t_0 : \quad & J_2 := J(t) = \frac{x(t)}{F_0} - J_1 - J_2 \\
\vdots \quad & \vdots \\
n \cdot t_0 < t < (n+1) \cdot t_0 : \quad & J_n := J(t) = \frac{x(t)}{F_0} - \sum_{i=1}^{n-1} J_i
\end{aligned} \tag{5.11}$$

Durch diese Rekursion kann die Kriechkomplianz eines Körpers aus der Deformation eines Treppenpulses berechnet werden.

5.1.4 Deformation durch eine linear ansteigende Kraft

Ist die Kriechkomplianz einer Probe bekannt, kann die zeitabhängige Deformation aufgrund einer linear ansteigenden Spannung relativ einfach durch Gleichung (5.1b) berechnet werden. Denn die zeitliche Änderung der Spannung $\dot{\sigma}_1$ ist in diesem Fall konstant und Gleichung (5.1b) wird zu

$$\begin{aligned}
\gamma(t) &= \int_{-\infty}^{t} J(t - t')\,\dot{\sigma}(t')\,dt' \\
\gamma(t) &= \dot{\sigma}_1 \int_{0}^{t} J(t - t')\,dt',
\end{aligned} \tag{5.12}$$

wenn der lineare Anstieg bei $t_0 = 0$ beginnt. Liegt die Kriechkomplianz analytisch vor, kann nach Gleichung (5.12) die Deformation berechnet werden, sofern das Integral lösbar ist. Ist die Kriechkomplianz aus einem Experiment durch Anlegen eines konstanten Spannungspulses bekannt (vgl. Abschn. 5.1.2), kann die Beziehung (5.6) in Gleichung (5.12) eingesetzt werden:

$$\gamma_l(t) = \dot{\sigma}_1 \int_0^t \frac{\gamma_k(t-t')}{\sigma_0}\, dt' \tag{5.13}$$

Durch diese Gleichung kann aus der Deformation γ_k der konstanten Spannung die veränderte Deformation γ_l durch die linear ansteigende Spannung numerisch berechnet werden.

5.1.5 Deformation durch eine Dreieckfunktion

Als letztes Beispiel soll die Deformation durch eine Dreieckfunktion besprochen werden. In diesem Fall steigt die Spannung σ linear bei $t = 0$ mit der Steigung $+\dot{\sigma}_d$ an bis zu einem Zeitpunkt t_0, ab da fällt die Spannung wieder linear ab mit der Steigung $-\dot{\sigma}_d$. Es gilt also

$$\dot{\sigma}_d(t) = \begin{cases} +\dot{\sigma}_d & 0 < t < t_0 \\ -\dot{\sigma}_d \quad \text{für} & t_0 < t < 2t_0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \tag{5.14}$$

Das Faltungsintegral in Gleichung (5.1b) lässt sich nun für Zeiten $t > t_0$ nicht mehr einfach analytisch lösen, auch wenn $J(t)$ analytisch bekannt wäre. Jedoch ist es möglich, die Integration numerisch auszuführen.

Ist die Deformation γ_k durch eine konstante Spannung aus einem anderen Experiment bekannt, so kann diese dazu genutzt werden, um durch Gleichung (5.6) die Deformation γ_d des Körpers durch eine dreicksförmige Kraft zu berechnen.

$$\gamma_d(t) = \int_0^t \gamma_k(t-t')\, \frac{\dot{\sigma}_1(t')}{\sigma_0}\, dt' \tag{5.15}$$

In diesem Fall geht die Kriechkomplianz selbst gar nicht mehr explizit in die Rechnung ein.

5.2 Mechanische Elemente zur Beschreibung von Viskoelastizität

Viskoelastizität kann durch mechanische Schaltkreise modelliert werden. Eine Feder (engl. *spring*) übernimmt dabei die Rolle einer Elastizität k, die der Gleichung

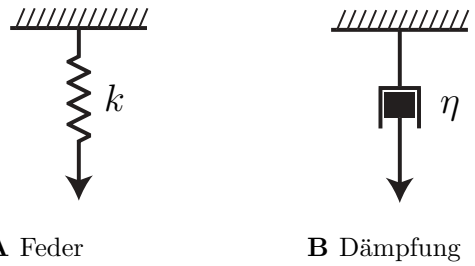


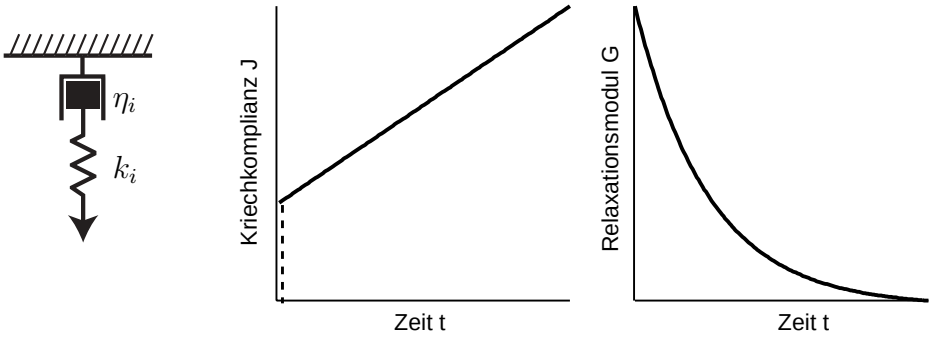
Abbildung 5.1: Die mechanischen Elemente zur Beschreibung viskoelastischer Systeme. Die Feder beschreibt die elastischen Anteile eines viskoelastischen Körpers, indem jede Feder dem Hookeschen Gesetz (Gleichung (5.3)) gehorcht. Die Dämpfung beschreibt die viskosen Anteile eines Körpers durch Newtonsche Reibung (Gleichung (5.4)).

(5.3), dem Hookeschen Gesetz, genügt. Eine Dämpfung (engl. *dashpot*) der Viskosität η gehorcht der Gleichung (5.4), dem Newtonschen Gesetz für Flüssigkeiten. In Abbildung 5.1 sind die beiden Elemente graphisch dargestellt. Mit Hilfe dieser mechanischen Elemente lässt sich das viskoelastische Verhalten eines Körpers phänomenologisch beschreiben, allerdings ohne genaue Kenntnis der mikroskopischen Ursachen für dieses Verhalten zu erlangen.

Die beiden mechanischen Elemente Feder und Dämpfung können beliebig kombiniert werden, um die viskoelastischen Eigenschaften eines Mediums zu beschreiben. Ähnlich den Kirchhoffschen Regeln im elektrischen Kreis gelten bestimmte Bedingungen für Deformation und Scherspannung in einem mechanischen Schaltkreis, der aus den Elementen gebildet wird. Sind die mechanischen Elemente parallel angeordnet, müssen ihre Deformationen γ_i identisch sein, die anliegende Spannung σ ist die Summe der Einzelspannungen σ_i der jeweiligen Elemente. Umgekehrt addieren sich bei einer Serien- bzw. Reihenschaltung die Deformationen γ_i der einzelnen Elemente, während die anliegende Spannung σ an allen Elementen gleich ist. Formal drücken sich diese Regeln in folgenden Gleichungen aus:

$$\begin{aligned} &\text{Parallelschaltung:} && \gamma = \gamma_1 = \gamma_2 = \ldots = \gamma_n \\ & && \sigma = \sum_i^n \sigma_i \\ &\text{Reihenschaltung:} && \sigma = \sigma_1 = \sigma_2 = \ldots = \sigma_n \\ & && \gamma = \sum_i^n \gamma_i \end{aligned} \tag{5.16}$$

Die beiden einfachsten Schaltkreise, die sich so aus den beiden mechanischen Elementen bilden lassen, sind das sogenannte Maxwell-Element, bei dem Feder



A Maxwell-Element **B** Kriechkomplianz und Relaxationsmodul des Maxwell-Elements

Abbildung 5.2: Schematische Darstellung eines Maxwell-Elements. Das Maxwell-Element besteht aus der Reihenschaltung einer Feder und einer Dämpfung. Rechts sind die Kriechkomplianz J^M und der Relaxationsmodul G^M des Elements dargestellt.

und Dämpfung in Reihe sind, und das Voigt-Element (auch Kelvin-Voigt-Element genannt), bei dem die beiden Elemente parallel geschaltet sind.

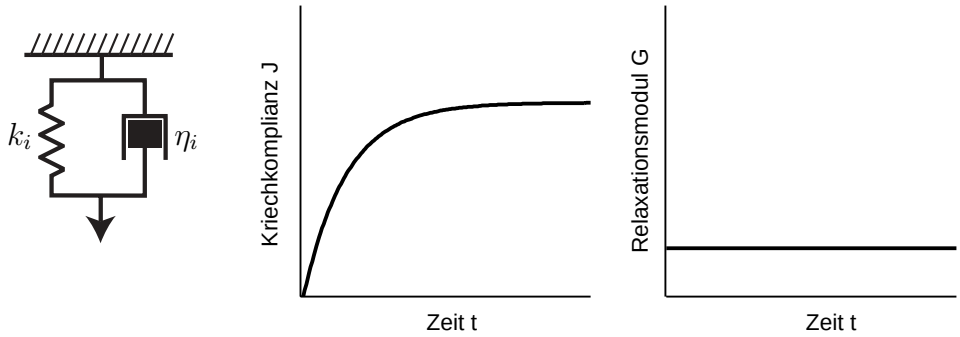
Das Maxwell-Element, dargestellt in Abbildung 5.2A, dient vor allem zur Beschreibung einer Spannungsrelaxation nach konstanter Deformation eines Körpers. Besitzt die Feder die Elastizität k_i und der Dämpfer die Viskosität η_i, so ergeben sich aus den Regeln (5.16) für Kriechkomplianz $J^M(t)$ und Relaxationsmodul $G^M(t)$

$$J^M(t) = k_i^{-1} + t/\eta_i \tag{5.17}$$

$$G^M(t) = k_i \exp[-t/\tau_i], \tag{5.18}$$

wobei $\tau_i = \eta_i/k_i$ die charakteristische Relaxationszeit des Schaltkreises ist. Nach dieser Zeit ist die Spannung auf den e-ten Teil des Ausgangswertes abgefallen. Abbildung 5.2B zeigt die Kriechkomplianz und den Relaxationsmodul des Maxwell-Elements graphisch. Sowohl $J^M(t)$ als auch $G^M(t)$ lassen sich anschaulich interpretieren, wenn man bedenkt, dass $J^M(t)$ der Deformation unter konstanter Spannung und $G^M(t)$ der Spannung unter konstanter Deformation entspricht. $J^M(t)$ zeigt einen instantanen Sprung durch die deformierte Feder (infinitesimal schnelle Auslenkung) und dann lineares Fließen durch die Deformation der Viskosität. Dieses Fließen ist charakteristisch für eine einzelne Dämpfung, die in Reihe ist mit allen weiteren Elementen eines Schaltkreises. Unter konstanter Auslenkung wiederum relaxiert die Spannung in der Feder durch die Deformation der Dämpfung.

Das Voigt-Element ist in Abbildung 5.3A gezeigt. Es dient zur Beschreibung der Deformation eines Körpers unter äußerer Spannung. Die Kriechkomplianz



A Voigt-Element **B** Kriechkomplianz und Relaxationsmodul des Voigt-Elements

Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines Voigt-Elements. Das Voigt-Element besteht aus der Parallelschaltung einer Feder und einer Dämpfung. Rechts sind die Kriechkomplianz J^V und der Relaxationsmodul G^V des Elements dargestellt.

$J^V(t)$ und der Relaxationsmodul $G^V(t)$ nehmen folgende Ausdrücke an:

$$J^V(t) = k_i^{-1}(1 - \exp^{-t/\tau_i}) \tag{5.19}$$

$$G^V(t) = k_i \tag{5.20}$$

Wieder ist $\tau_i = \eta_i/k_i$ die charakteristische Zeit im System. Sie wird als Retardationszeit bezeichnet, d.h. als Zeit, in der die Auslenkung abgebremst bzw. verzögert wird.

Auch hier können $J^V(t)$ und $G^V(t)$ wieder anschaulich gedeutet werden. Bei konstanter Spannung dehnt sich die Feder um $\gamma = \sigma/k_i$, jedoch kann sie das im Voigt-Element nicht unendlich schnell, sondern die Dehnung wird durch die Dämpfung verzögert. Unter konstanter Dehnung wird im Voigt-Element keine Spannung abgebaut, da in diesem Element nichts relaxieren kann, ohne dass die Auslenkung sich ändern würde.

5.3 Numerische Berechnungen von viskoelastischen Größen aus experimentellen Daten

5.3.1 Bestimmung der Kriechkomplianz aus einer gemessenen Auslenkung

Wie im Abschnitt 5.1 erläutert, ist die viskoelastische Antwort auf einen rechtecksförmigen Kraftpuls direkt proportional zur Kriechkomplianz J, die als charakteristische Größe das Verhalten des untersuchten Materials darstellt. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit ist die Auslenkung Δx einer mikroskopischen Kugel durch digitale Bildverarbeitung direkt messbar. Um die Werte der

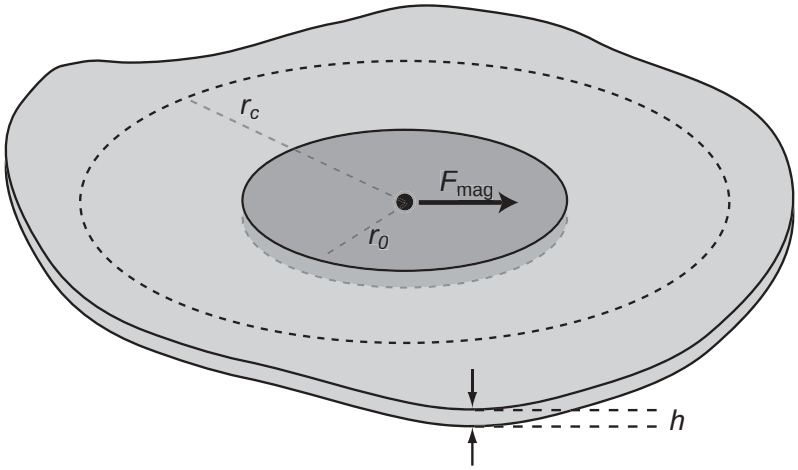


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Deformation einer dünnen, viskoelastischen Schicht der Dicke h. Die Kraft F greift in der Mitte der Adhäsionsscheibe der Kugel an. Die Deformation fällt bis zum Abschirmradius r_c auf Null ab.

Auslenkung Δx in J exakt umrechnen zu können und nicht nur qualitativ zu diskutieren, müssen zunächst die Proportionalitätskonstanten bestimmt werden, die in diese Beziehung eingehen. Dies geschieht ausgehend von der Bewegungsgleichung einer Kugel, die an einer zwei-dimensionalen viskoelastischen Schicht der Dicke h gebunden ist. Diese Gleichung lautet:

$$m \cdot \ddot{x}(t) + g_v \eta(t) \cdot \dot{x}(t) + g_e \mu(t) \cdot x(t) = F(t) \tag{5.21}$$

In dieser Gleichung steht zunächst der Trägheitsterm $m \cdot \ddot{x}$, der wegen der geringen Masse der Kugel jedoch vernachlässigt werden kann und im weiteren nicht mehr diskutiert wird. Der zweite Term stellt den Reibungsterm dar, der durch die Viskosität der Probe bestimmt ist. g_v ist der geometrische Vorfaktor dieses Beitrags, $\eta(t)$ ist die Viskosität. Diese ist zeitabhängig, da es sich bei der untersuchten Probe nicht um eine newtonsche Flüssigkeit handelt, sondern um ein viskoelastisches Material, das auf verschiedenen Zeitskalen durch unterschiedliche Viskositäten zu beschreiben ist. Aufgrund der viskoelastischen Natur muss auch der Schermodul $\mu(t)$, der die Elastizität beschreibt, zeitabhängig betrachtet werden. g_e ist wieder ein geometrischer Vorfaktor, der ebenfalls noch zu bestimmen ist.

Als Grundlage zur Bestimmung der geometrischen Vorfaktoren g_v und g_e dienen die Überlegungen von Ziemann (1997). Sie beruhen auf folgenden Annahmen (vg. Abb. 5.4):

- Die Kugel ist mit einer kreisförmigen Adhäsionsscheibe des Radius r_0, die in der homogenen, dünnen, viskoelastischen Schicht der Dicke h liegt, fest verbunden.

- Die Kraft F wirkt im Zentrum der Adhäsionsscheibe, also in der Ebene der viskoelastischen Schicht. Eine Torsion der Kugel wird vernachlässigt. Ohne Einschränkung wird die Richtung der Kraft entlang der x-Koordinate gewählt.
- Das Gesamtsystem ist groß gegen den Radius der Adhäsionsscheibe r_0.
- Einflüsse durch das die Kugel umgebende Medium (Puffer, extrazelluläre Matrix) werden vernachlässigt.
- Das Deformationsfeld soll in einer endlichen Entfernung vom Rand der Adhäsionsfläche verschwinden. Diese Entfernung wird als Abschirmradius r_c bezeichnet.

Eine Skizze der Adhäsionsscheibe in der dünnen, viskoelastischen Schicht ist in Abbildung 5.4 gezeigt. Mit Hilfe dieser Annahmen (für die genaue Rechnung vgl. Ziemann 1997) lässt sich der Spannungszustand einer zweidimensionalen elastischen Platte unter Einwirkung einer Punktkraft berechnen (Ziemann 1997, Boulbitch 1999) und so der Faktor g_e bestimmen. Man erhält

$$g_e = g \cdot h = -\frac{16/5\pi}{\ln(r_0/r_c)} \cdot h. \tag{5.22}$$

Der Faktor g_v lässt sich aus der Hydrodynamik eines umströmten Zylinders abschätzen (vgl. Ziemann 1997). Gilt die Bedingung

$$\left|\frac{5}{4}\ln r\right| \gg \left|\ln\left(\frac{\dot{x}\, e^{(C-1/2)}}{4\nu r_0^{1/4}}\right)\right| \tag{5.23}$$

mit ν der kinematischen Zähigkeit und C der Eulerschen Konstante, die bei den im folgenden gezeigten Experimenten erfüllt ist, so erhält man als geometrischen Faktor für die Längeneinheit eines Zylinders, dessen Achse senkrecht zur Strömungsrichtung liegt (=Adhäsionsscheibe in einer zweidimensionalen Ebene), einen Vorfaktor g_v, der gleich dem elastischen Faktor g_e ist:

$$g_v = g \cdot h = -\frac{16/5\pi}{\ln(r_0/r_c)} \cdot h \tag{5.24}$$

Die Beziehung zwischen Kugelauslenkung $x(t)$ und $J(t)$ lautet somit:

$$J(t) = \frac{-16/5\pi h}{F_0\ \ln(r_0/r_c)} x(t) \qquad \text{mit } r_0 < r_c \tag{5.25}$$

Teilt man die Kriechkomplianz $J(t)$ durch die Schichtdicke h, so erhält man eine Oberflächenkomplianz. Im folgenden werden die Daten als Oberflächenkomplianz dargestellt, da dies im Fall der Zellhülle die tatsächlich gemessene Größe

ist. Nur zum Vergleich mit den Ergebnissen anderen Messmethoden wird die Schichtdicke berücksichtigt, um die Volumenkomplianz zu bestimmen. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden deshalb zur Vereinfachung die Ausdrücke Oberflächenkomplianz und Komplianz synonym verwendet.

Wie im Kapitel 8 gezeigt wird, besitzt der Abschirmradius bei Endothelzellen eine Größe von 10 bis 11μm. Nimmt man für den Radius der Adhäsionsscheibe den Wert $r_0 = 1\ \mu$m an, was sicherlich eine obere Grenze darstellt, so bestimmt sich der geometrische Vorfaktor damit zu $g < 4 = \mathcal{O}(1)$. Es ist also g nur geringfügig von 1 verschieden und wird im weiteren Verlauf der Arbeit deshalb zu 1 gesetzt.

5.3.2 Numerische Berechnungen des Relaxationsmoduls aus der Kriechkomplianz

Erhält man aus einem Experiment die Kriechkomplianz $J(t)$, ist durch Gleichung (5.2) damit auch der Relaxationsmodul $G(t)$ bestimmt. Allerdings kann $G(t)$ nicht analytisch aus Gleichung (5.2) berechnet, der Relaxationsmodul lässt sich aber numerisch bestimmen. Tempel (1996) beschreibt solch ein numerisches Verfahren, das von Hopkins und Hamming entwickelt wurde. Dabei wird das Integrationsintervall in Gleichung (5.2) in n Einzelintervalle aufgeteilt, so dass auf jedem Subintervall i der Wert von $G(t_i)$ als konstant angenommen und vor das Integral gezogen werden kann.

$$\begin{aligned} t &= \int_0^t G(t')J(t-t')dt' \\ &= \sum_{i=0}^{n-1} \int_{t_i}^{t_{i+1}} G(t')J(t-t')dt' \\ &= \sum_{i=0}^{n-1} G(t_{i+1/2}) \int_{t_i}^{t_{i+1}} J(t-t')dt' \end{aligned} \tag{5.26}$$

wobei $t_0 = 0$, $t_n = t$ und $t_{i+1/2} = (t_{i+1} + t_i)/2$ gilt. Bei den experimentellen Daten werden als Intervalle die Stützstellen der Kriechkomplianz J gewählt, die ebenfalls diskret und zusätzlich auf der Zeitskala äquidistant sind. So wird aus Gleichung (5.26)

$$t = \sum_{i=0}^{n-1} G(t_{i+1/2}) \left\{ \left(J(t-t_{i+1}) + J(t-t_i) \right) (t_{i+1} - t_i) \right\} \tag{5.27}$$

So kann eine Rekursionsbeziehung aufgestellt werden, aus der $G(t)$ als Reihe diskreter Werte bestimmt werden kann. Zur Vereinfachung der Formel wurde

folgende Notation gewählt: $G_i = G(t_i), J_{j-i} = J(t_j - t_i)$

$$G_{1/2} = \frac{2}{J_0 + J_1} \tag{5.28a}$$

$$\begin{aligned} G_{n-1/2} &= \frac{2t_n - \sum_{i=1}^{n-1} G_{i-1/2}(J_{n-i} + J_{n-(i-1)})(t_i - t_{i-1})}{(J_0 + J_{n-(n-1)})(t_n - t_{n-1})} \\ &= \frac{2t_n - \sum_{i=1}^{n-1} G_{i-1/2}(J_{n-i} + J_{n-(i-1)})\Delta t}{(J_0 + J_1)\Delta t} \end{aligned} \tag{5.28b}$$

wobei bei der letzten Umformung verwendet wurde, dass alle Messpunkte auf der Zeitachse äquidistant im Abstand Δt liegen. J_0 ist die Nullkomplianz, also der Wert von $J(t)$ zur Zeit $t = 0$. Um diese Rekursion sinnvoll durchzuführen, müssen zwei Bedingungen durch $J(t)$ erfüllt sein. $J(t)$ muss eine stetig steigende Funktion sein; ist dies nicht der Fall, konvergiert $G(t)$ nicht zu physikalisch sinnvollen Werten. Weiter ist es nötig, dass für die Nullkomplianz $J_0 \geq 0$ gegeben ist. Vor allem die erste Einschränkung ist durch experimentelle Messwerte nicht gegeben, sie streuen, wenn auch gering, um einen Mittelwert, so dass auch negative Steigungen in $J(t)$ auftreten. Aus diesem Grund wurden zur Berechnung von $G(t)$ interpolierte Messwerte verwendet.

Experimenteller Teil

Kapitel 6

Die Viskoelastizität von Endothelzellen

Im folgenden Kapitel werden Experimente vorgestellt, mit deren Hilfe die Materialeigenschaften der Zellhülle von Endothelzellen untersucht wurden. Zunächst sollen die Durchführung und Analyse eines typischen Experiments ausführlich beschrieben werden, da sie auch grundlegend für die Untersuchungen der folgenden Kapitel sind. Daran anschließend wird die experimentelle Bestimmung der Kriechkomplianz des Zellkortex gezeigt und deren Abhängigkeit von Kraftstärke und -dauer ermittelt. Zuletzt wird das Verhalten der Kriechkomplianz durch einen makroskopischen Ansatz modelliert.

6.1 Beschreibung eines typischen Experiments

Die experimentelle Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften des Zellkortex beruht auf der Beobachtung der Auslenkung einer superparamagnetischen Kugel (∅ 4,5 μm) durch eine Kraft bekannter Stärke. In allen Experimenten, die im folgenden beschrieben werden, sind, wenn nicht anders erwähnt, Fibronektin-beschichtete Kugeln über Integrine an den Aktinkortex von Endothelzellen gebunden worden (vgl. Kapitel 2). Die beobachtete Auslenkung ist also eine Deformation der Verbundschicht aus Zellmembran und dem damit verbundenen Aktinkortex. Dabei zeigen sich die Eigenschaften des Aktinkortex als dominant, die evaluierten numerischen Werte können dieser dünnen Schicht aus Aktinfilamenten an der Zellschale zugeordnet werden. Der experimentelle Aufbau und die Erzeugung der Kraft durch ein inhomogenes, magnetisches Feld sowie die Kalibration der Kraft sind im Kapitel 3 beschrieben. Die Beobachtung der Kugeln erfolgt im Mikroskop durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Eine Phasenkontrastaufnahme von Endothelzellen mit adhärierten Magnetkugeln, wie sie für die Experimente verwendet wurden, ist in Abbildung 2.1B auf Seite 20 gezeigt. Die Auslenkung der Kugel wird durch das Bildverarbeitungsprogramm

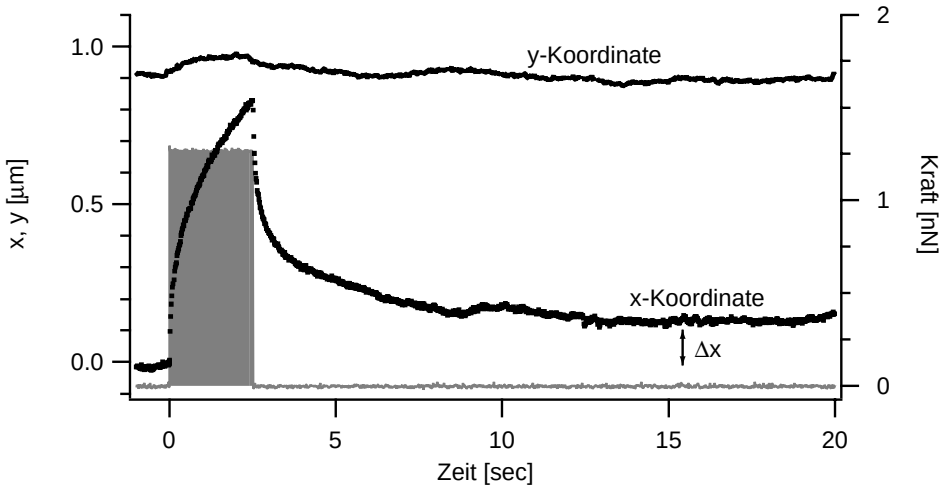


Abbildung 6.1: Beispiel für die Kugelauslenkung durch einen Rechteckpuls. Dargestellt sind die x-Koordinate der Kugel, die durch die externe Kraft (graue Fläche) eine Änderung erfährt, und die y-Koordinate, die während des Pulses weitgehend konstant bleibt, da die Kraft nur in x-Richtung wirkt. Nach dem Ende des Kraftpulses relaxiert die Kugel wieder und kehrt fast völlig in die Ausgangsposition zurück.

`Open Box` bestimmt und analysiert (vgl. Kapitel 4).

In Abbildung 6.1 ist die typische Antwort einer Magnetkugel auf einen Kraftpuls gezeigt. Wie in Kapitel 5 erläutert, ist die Auslenkung der Kugel durch eine konstante Kraft proportional zur Kriechkomplianz, in der das Verhalten des deformierten Materials enthalten ist. Die Auslenkung der Kugel durch den Einfluss der externen Kraft kann als Änderung in der x-Koordinate detektiert werden. Entsprechend zeigt die y-Koordinate kaum Änderungen durch die Kraft der Magnetspule, da in dieser Richtung keine Kräfte angreifen. Die Auslenkung der Magnetkugel durch den Rechteckpuls beginnt relativ steil und schnell. Theoretisch sollte direkt zu Beginn des Pulses ein elastischer Sprung zu beobachten sein, die sogenannte Nullkomplianz J_0. Diesen Sprung zu detektieren ist allerdings problematisch, da durch die endliche Belichtungszeit eines Bildes (kürzeste Belichtungszeit 10 msec, vgl. Kap. 3) der zeitlichen Auflösung der Kugelauslenkung nach unten Grenzen gesetzt sind (vgl. auch Ferry 1980). Die Geschwindigkeit der Auslenkung flacht nach kurzer Zeit ab und verlangsamt sich zunehmend. Die maximale Auslenkung der Kugel aus der Ruheposition hängt sowohl von der Länge als auch von der Stärke des Kraftpulses ab, typische Auslenkungen liegen im Bereich von 0,1 μm bis 2 μm, können aber auch bis zu 10 μm erreichen.

Am Ende des Pulses relaxiert die Kugel wieder, da die am System verrichtete Arbeit zum Teil gespeichert wurde und nun wieder abgegeben wird. Diese Relaxation, auch Kriecherholung (engl. *creep recovery*) genannt, wird durch die im Kortex erzeugte Spannung getrieben, die die Kugel wieder in Richtung ih-

rer Ausgangsposition zurückbewegt. Diese Relaxation ist im gezeigten Beispiel nicht vollständig, der Unterschied zwischen Ausgangs- und Endposition beträgt $\Delta x = 0{,}1\ \mu$m, das sind 16% der Maximalauslenkung. Durch Reorganisation des Systems während des Kraftpulses kann die geleistete Arbeit auch dissipiert werden, Δx ist deshalb ein Maß für die dissipierte Energie. Im Fall der Endothelzellen ist Δx sehr klein (meist kleiner als 10% der Maximalauslenkung) und oft gar nicht zu beobachten. In einigen Fällen wird im Gegensatz zum Beispiel in Abbildung 6.1 die Kugel auch über ihre Position vor dem Kraftpuls zurückgezogen, was nur durch ein aktives Verhalten der Zelle zu erklären ist.

Untersucht man eine große Zahl von Zellen mittels rechtecksförmiger Kraftpulse, wie es in Abbildung 6.1 dargestellt ist, so tritt die dort gezeigte und oben beschriebene Kugelauslenkung am häufigsten auf und wird daher im folgenden als das *normale Verhalten* betrachtet und analysiert. Es können bei den Antworten der Kugel auf eine externe Kraft noch zwei weitere Szenarien beobachtet werden:

Beim ersten Sonderfall kann keine Kugelauslenkung beobachtet werden, unabhängig davon, wie groß die angreifenden, externen Kräfte der Magnetischen Pinzette gewählt werden. Die Zellen sind in diesem Fall in einem extrem steifen Zustand, wie er sonst meist erst durch die Wirkung von Enzymstoffen erzeugt wird (vgl. Kapitel 9). Diese Versteifung, die im Allgemeinen immer alle Zellen einer Probe betrifft, nicht Einzelzellen, wird durch das Aktinzytoskelett bestimmt und kann durch die Zerstörung des F-Aktin (durch Latrunculin A) überwunden werden. Experimente sind mit solchen Zellen nur bedingt möglich.

Beim zweiten anomalen Verhalten zeigt die Kugel eine praktisch lineare Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit und keinerlei Relaxation am Ende des Pulses. In diesem Fall ist die Bindung der Kugel an die Zelle ungenügend, durch die externe Kraft wird die Kugel auf der Zelloberfläche entlang durch die extrazelluläre Matrix gezogen und kann sich in Einzelfällen unter dem Einfluss der Magnetkraft sogar von der Zelloberfläche lösen. Da dieser anomale Fall selten auftritt, wird er als nicht-reproduzierbarer Artefakt betrachtet und für die Auswertung nicht beachtet.

6.2 Messung der Kriechkomplianz J durch eine konstante Kraft

Um die Linearität der viskoelastischen Antwortkurven zu prüfen, wurden die Kugeln Kraftpulsen verschiedener Stärke und unterschiedlicher Länge ausgesetzt. Die Dauer der rechteckigen Kraftpulse wurde dabei von 2,5 Sekunden bis 10 Sekunden variiert. Die Stärke der Kraft lag, abhängig vom Abstand zum Magneten, zwischen 0,1nN und 2,5nN. Im Allgemeinen wurden die Kugeln durch diese Kräfte um bis zu 1 μm ausgelenkt, in einigen Fällen war die Auslenkung jedoch auch größer, abhängig von der Länge und Stärke der Kraft. Sowohl Pulslänge als auch

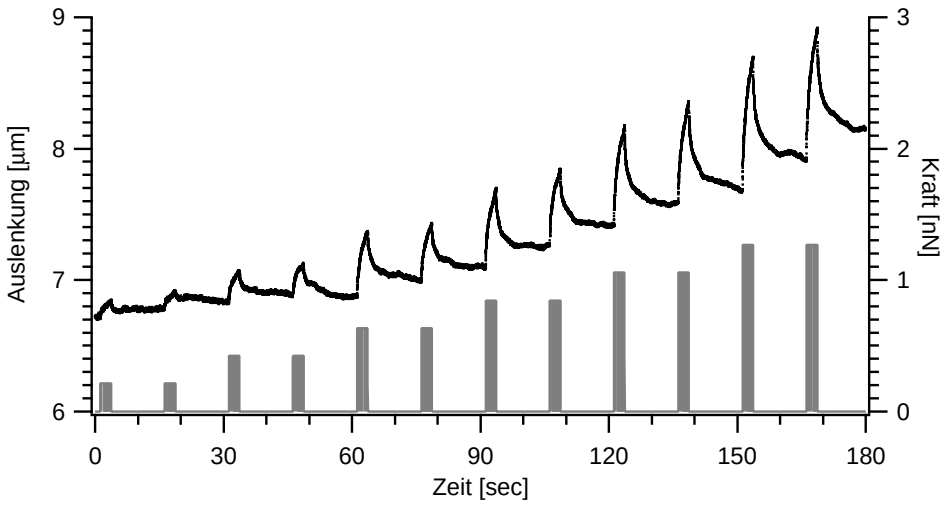
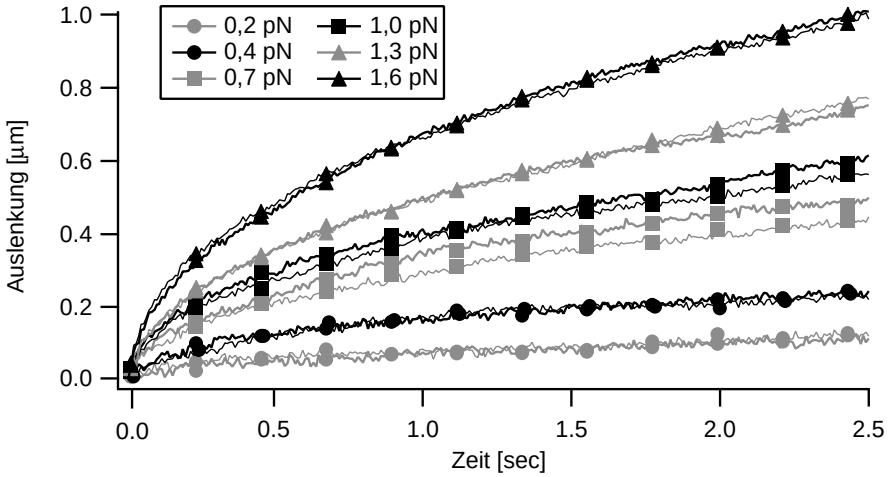


Abbildung 6.2: Auslenkung einer Kugel durch eine Serie von Rechteckpulsen unterschiedlicher Stärke. Der Graph zeigt die x-Koordinate der Magnetkugel (schwarz) und die Kraftpulse (grau).

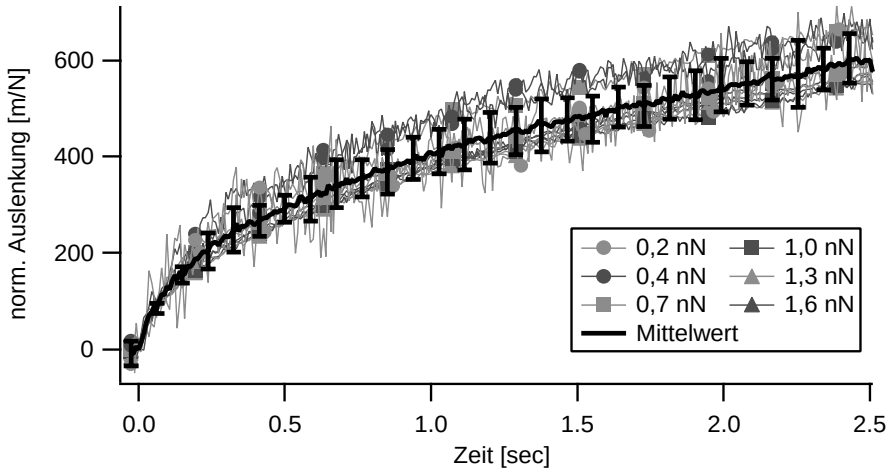
-stärke konnten sukzessive an ein und der selben Kugel geändert und so die Antwort des Materials auf die unterschiedlichen äußeren Störungen getestet werden. Wie im Kapitel 3 beschrieben, können Messwerte, die von einer einzigen Kugel stammen, mit großer Genauigkeit verglichen werden. Treten im Verlauf des Experiments Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften der Zellen auf, können sie relativ präzise beobachtet werden. Die Berechnung der Kriechkomplianz J aus der gemessenen Kugelauslenkung erfolgt anhand der Gleichung (5.25).

Auslenkung mit unterschiedlichen Kräften

In Abbildung 6.2 ist das Beispiel eines Experiments mit Deformationen durch unterschiedliche Kräfte gezeigt. Die x-Koordinate der Magnetkugel, die durch eine Serie von rechteckigen Kraftpulsen zwischen 0,2 nN und 1,3 nN ausgelenkt wird, ist gegen die Zeit aufgetragen. Die y-Koordinate ist nicht dargestellt, da die Kraft, die der Experimentalaufbau erzeugt, nur in x-Richtung wirkt. In Abbildung 6.3A sind die Auslenkungen der Kugel durch die einzelnen Pulse aus Abbildung 6.2 noch einmal zusammen dargestellt, wobei jeweils der Beginn eines Pulses auf $x = 0\ \mu$m und $t = 0$ sec normiert wurde. Zwei Ergebnisse sind sofort zu erkennen: Bei gleicher Kraft erfährt die Kugel die gleiche Auslenkung, die Antwortkurven lassen sich sehr gut reproduzieren. Das ist nicht unbedingt zu erwarten, da Zellen auf äußere Reize wie z.B. mechanische Stimulationen aktiv reagieren können (vgl. Kap. 10). Zusätzlich nimmt die Auslenkung mit stärker werdenden Kräften gleichmäßig zu. Diese lineare Skalierung mit der Kraft wird noch deutlicher sichtbar, wenn die Auslenkung auf die angelegte Kraft normiert



A x-Koordinaten verschiedener Pulse einer einzigen Kugel. Es handelt sich um die Pulse aus Abbildung 6.2.



B Die Einzelpulse normiert auf die auslenkende Kraft.

Abbildung 6.3: Normiert man die einzelnen Auslenkungen einer Kugel durch unterschiedliche Kraftpulse (Abbildung A) auf die Stärke der Kraft, die die Auslenkung bewirkt hat, so erhält man fast deckungsgleiche Kurven, die unterschiedlich stark verrauscht sind (Abbildung B). Bei den hier gezeigten Pulsen handelt es sich um das Experiment, dessen x-Koordinate in Abbildung 6.2 gegen die Zeit aufgetragen ist. Die schwarze Kurve ist der Mittelwert aller normierten Auslenkungen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

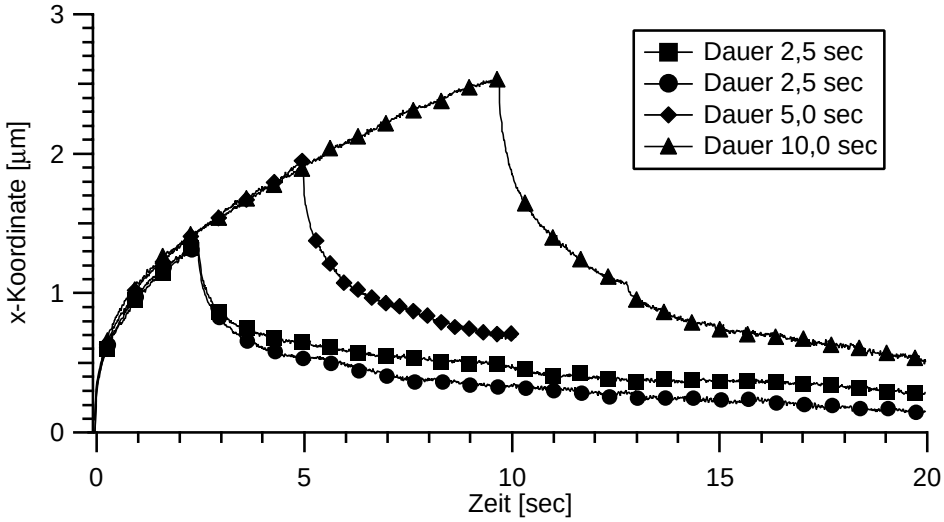


Abbildung 6.4: Die Abbildung zeigt Pulse unterschiedlicher Länge von 2,5 bis 10 sec. Die Deformation zeigt immer den gleichen Verlauf zu Beginn des Pulses, die längeren Pulse verhalten sich am Anfang genauso wie die kurzen. Die Messpunkte werden dabei durch die Linien dargestellt, die Markierungen dienen nur zur Unterscheidung.

wird, wie es in Abbildung 6.3B dargestellt ist. Im Idealfall der linearen Viskoelastizität erhält man dabei deckungsgleiche Kurven. Im vorliegenden Fall stimmen die normierten Auslenkungen gut miteinander überein, nichtlineare Effekte sind im Rahmen der Messgenauigkeit nicht zu erkennen.

Durch die Normierung der Auslenkung wird aus der Kugelauslenkung die Kriechkomplianz berechnet, die unabhängig von der angreifenden Kraft ist (vgl. Gleichung (5.6) in Abschnitt 5.1.1). Die Dimension der Kriechkomplianz ist dabei $[\mathrm{m/N}]=[(\mathrm{Pa\,m})^{-1}]$ und unterscheidet sich von der einer normalen Kriechkomplianz [1/Pa]. Die zusätzliche Dimension [1/m] der Kriechkomplianz folgt aus der Tatsache, dass im vorliegenden Fall Oberflächenkomplianzen betrachtet werden. Diese hängen immer von der Dicke h der untersuchten Schicht ab (siehe auch Ziemann 1997), in diesem Fall bezieht sich die Oberflächenkomplianz also auf die Dicke des Aktinkortex, die bei 0,2 μm bis 0,5 μm liegt.

Die Kurven der normierten Auslenkungen sind unterschiedlich stark verrauscht, da die relative Genauigkeit des *particle-tracking*-Algorithmus natürlich besser wird, je größer die absolute Auslenkung der Kugel ist. Die normierten Auslenkungen werden gemittelt, um eine statistisch geglättete Kurve zu bekommen, an der nun verschiedene Berechnungen und Anpassungen durchgeführt werden können. Der Mittelwert der Pulse ist in Abbildung 6.3B als schwarze Kurve dargestellt, die Standardabweichung vom Mittelwert ist als Fehlerbalken eingetragen. Die relative Standardabweichung beträgt 10% der Messwerte.

Auslenkungen durch Pulse unterschiedlicher Länge

Bei Pulsen unterschiedlicher Länge zeigt sich zwischen den Pulsen kein verändertes Verhalten. In Abbildung 6.4 sind Einzelpulse einer Kugel gezeigt, deren Länge zwischen 2,5 und 10 sec Dauer variieren (im weiteren bezeichnet als $P_{2.5}, P_5$,und P_{10}). In den 2,5 Sekunden zu Beginn eines jeden Kraftpulses zeigen die Pulse dabei im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede. Im weiteren Verlauf bis $t = 5$ sec decken sich auch die Auslenkungen von P_5 und P_{10}, das heißt, die Kugel durchläuft bei jedem Puls von neuem die gleiche Kurve und setzt die vorhergehende fort, wenn der Kraftpuls länger andauert. Die Reproduzierbarkeit der Pulsform unabhängig von der Länge der Pulse zeigt, dass die Auslenkung der Kugel einzig durch das Material bestimmt ist, das durch die angreifende Kraft unter Spannung gesetzt wird. Reaktionen der Zelle sind bei kurzen Pulsen (bis 10 Sekunden Dauer) nicht zu beobachten.

Interessant ist auch das Langzeitverhalten bei Kraftpulsen von mehreren 10 Sekunden Dauer, da hier festgestellt werden kann, ob die Auslenkung der Kugel einen konstanten Wert annimmt (viskoelastischer Festkörper) oder linear fließt (viskoelastische Flüssigkeit). Ein Beispiel eines solchen langen Pulses ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Nach ca. 10 Sekunden beginnt eine lineare Auslenkung der Kugel, es setzt viskoses Fließen mit einer Viskosität von $\eta_0 = 90 \cdot 10^{-3}\,\mathrm{Pa\,s\,m}$ ein[1]. Am Ende des Pulses kehrt die Kugel nicht mehr vollständig in die Ausgangsposition zurück, die Ruhelage der Kugel verändert sich durch diesen Puls um $\Delta x = 0{,}9\,\mu$m. Berechnet man die Distanz, die eine Kugel in einem Medium der Viskosität η_0 durch eine Kraft von $F = 1{,}8\,\mathrm{nN}$ (vgl. Abbildung 6.5) innerhalb von 50 Sekunden zurücklegen würde, so erhält man eine Distanz von 1 μm, was erstaunlich gut mit der Änderung der Ruhelage übereinstimmt.

Dieses lineare Fließen ist aber nicht einheitlich in allen Experimenten, in denen Kräfte über einen langen Zeitraum angelegt wurden, zu beobachten. Allgemein kann man bei Pulsen, deren Länge 30 Sekunden überschreitet, die Bewegung der Zelle nicht immer vernachlässigen. Je nachdem wie stark die Zelle sich im Beobachtungszeitraum bewegt und ihre Form verändert, überlagert sich diese Zellbewegung mit der Kugelauslenkung. Die Analyse dieser überlagerten Kugeltrajektorien gestaltet sich als sehr schwierig, da die Einflüsse der Zelle nicht immer eindeutig von der Kugelantwort auf eine externe Kraft getrennt werden können. In manchen Fällen bewegen sich die Magnetkugeln dadurch sogar entgegen der angelegten Kraft zurück, wenn die Zelle vom Magneten wegkriecht.

Abgesehen von Einflüssen durch die Bewegung der Zellen zeigen sich auch Beispiele (vor allem bei kleineren Kräften), in denen die Kugeln ein sehr variables Verhalten zeigen. So ist in Abbildung 6.6 zunächst ein ähnliches Verhalten zu beobachten wie in Abbildung 6.5[2], bei dem auch die Auslenkungen, normiert

[1] η ist eine Oberflächenviskosität und besitzt darum die Dimension [Pa s m] (vgl. oben und Kapitel 5).

[2] Es handelt sich bei den beiden Beispielen tatsächlich um Aufnahmen der gleichen Zelle und

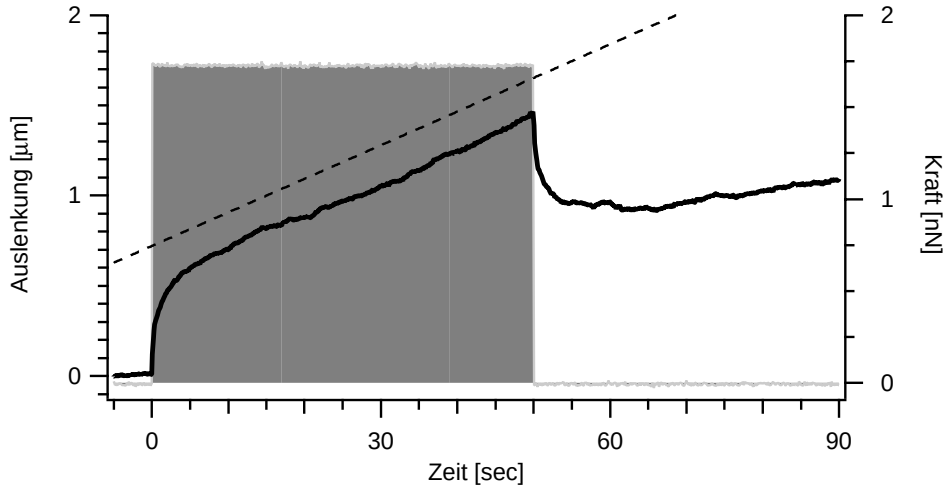


Abbildung 6.5: Die Abbildung zeigt einen langen Puls von 50 sec Dauer. Nach ungefähr 10 sec stellt sich viskoses Fließen mit einer Viskosität von $\eta_0 = 90 \cdot 10^{-3}$ Pa s m ein, die gestrichelte Linie ist eine Gerade mit der Steigung $m = 1/\eta_0$.

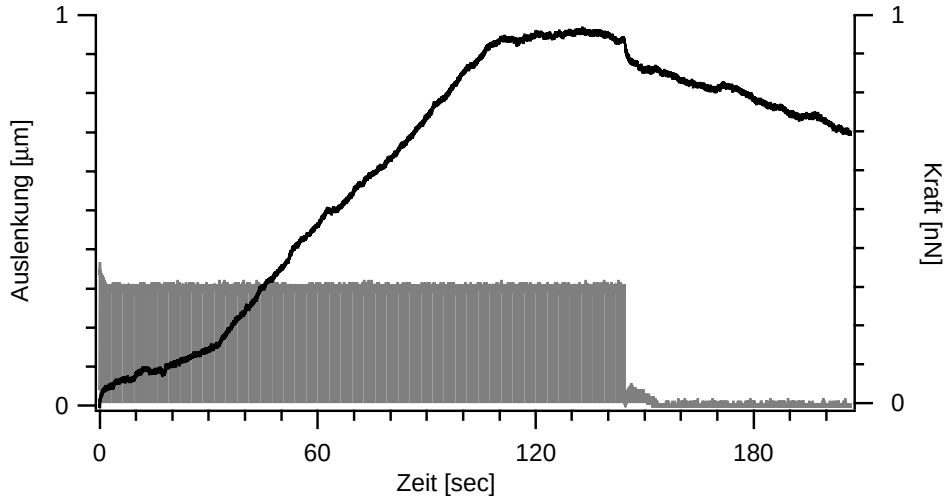


Abbildung 6.6: Die Abbildung zeigt einen langen Puls von 145 sec Dauer. Diese Auslenkung wurde an der gleichen Kugel beobachtet wie Abbildung 6.5 (Beachte unterschiedliche Skalierung der Achsen!) . Bis zu einer Dauer von 30 sec ist das Verhalten mit dem in Abbildung 6.5 vergleichbar, wenn man die unterschiedlichen Kräfte beachtet. Dann setzt jedoch plötzlich ein schnelleres Fließen ein und nach ca. 100 sec stoppt die Auslenkung völlig, obwohl weiterhin eine Kraft anliegt.

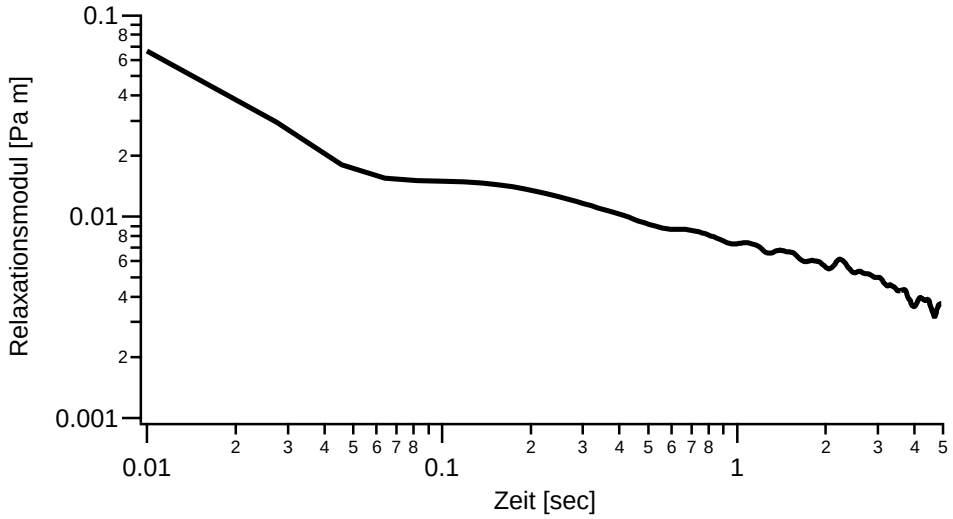


Abbildung 6.7: Die Abbildung zeigt den numerisch berechneten Relaxationsmodul $G(t)$, der mittels Gleichung (5.28) aus der Interpolation von Messdaten bestimmt wurde. Der Relaxationsmodul zeigt ein kurzes, aber deutliches Gummi-Plateau im Bereich von 0,05 bis 0,15 Sekunden.

auf die Kraft, vergleichbar sind (dargestellt ist jedoch die absolute Auslenkung Δx, nicht die Kriechkomplianz $\Delta x/F$). Nach 30 sec ändert sich jedoch plötzlich die Steigung des linearen Fließens (was einer veränderten Viskosität entspräche) und nach insgesamt 100 sec endet die Auslenkung der Kugel komplett, obwohl weiterhin eine Kraft anliegt.

6.3 Bestimmung des Relaxationsmodul

Durch Gleichung (5.2) sind Kriechkomplianz $J(t)$ und Relaxationsmodul $G(t)$ direkt miteinander verknüpft. Der Relaxationsmodul veranschaulicht, wie Spannungen, die durch die Deformation eines viskoelastischen Körpers erzeugt wurden, relaxieren und abgebaut werden. Ein konstanter Wert bedeutet in diesem Zusammenhang elastisches Verhalten, da dann keine Relaxation zu beobachten ist.

Aufgrund der Beziehung (5.2) ist es möglich, aus gemessenen Werten $J(t)$ den Relaxationsmodul zu berechnen. Diese Berechnung geschieht mit Hilfe der numerischen Rekursionsmethode, die durch die Gleichungen (5.28) beschrieben wird. Um diese numerische Rekursionsmethode durchzuführen, werden die Messdaten der Antwortfunktionen der Kugeln auf konstante Scherkräfte durch eine Interpolation mit geglätteten *spline*-Funktionen beschrieben. Diese Interpolati-

Kugel, ein Vergleich ist also gerechtfertigt.

on ist nötig, da eine numerische Berechnung aus den Originaldaten wegen des statistischen Rauschens zu keinem sinnvollen Ergebnis führen würde.

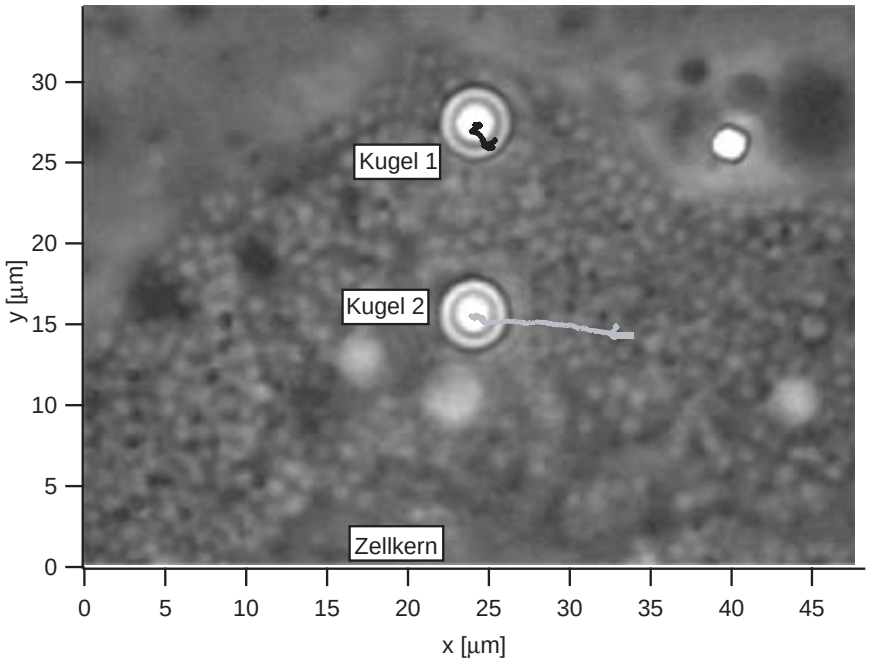
Abbildung 6.7 zeigt das Ergebnis einer solchen Rekursion. Dabei zeigt der Relaxationsmodul ein ausgeprägtes Plateau im Bereich von 0,05 und 0,15 Sekunden. Dieses Plateau wird in der Polymerphysik als Gummiplateau (engl. *rubber plateau*) bezeichnet. Es zeigt den zeitlichen Bereich, in dem die Zellen vornehmlich elastisch reagieren.

6.4 Kartierung der Zelloberfläche nach unterschiedlichem viskoelastischem Verhalten

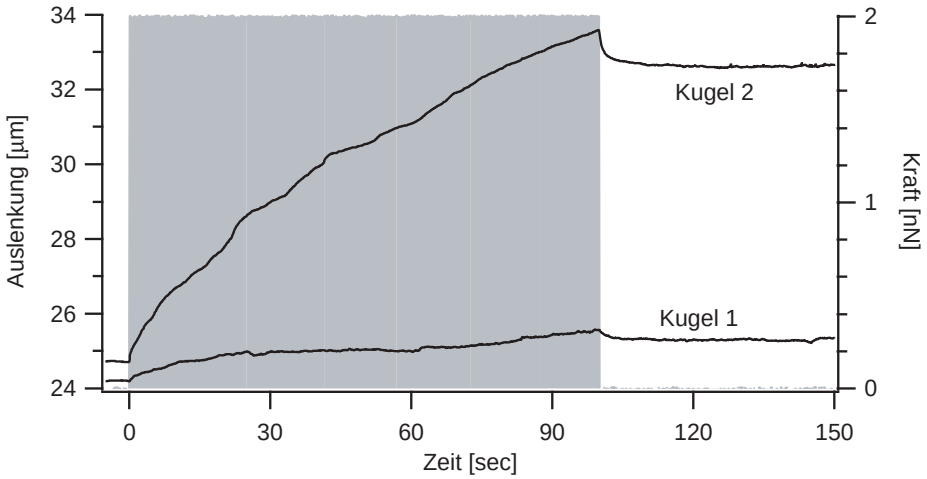
Der Aufbau der Magnetischen Pinzette ermöglicht es relativ einfach, innerhalb eines Experiments verschiedene Stellen einer Zelle auf ihre mechanische Antwort auf eine äußere Kraft zu testen. Auf diese Weise kann eine Karte der viskoelastischen Eigenschaften der verschiedenen Positionen einer Zelle erstellt werden. Erste Versuche in diese Richtung wurden an Endothelzellen durchgeführt, ein Beispiel einer solchen Messung ist in Abbildung 6.8 gezeigt.

Die experimentelle Umsetzung ist dabei nicht völlig unproblematisch, es müssen einige Details beachtet werden. Zum einen lagern sich Fibronektin- und Invasin-beschichtete Magnetkugeln hauptsächlich direkt über oder beim Kern der Zelle (engl. *nucleus*) an die Oberfläche an, eine Kopplung an anderen Stellen der Zelle ist selten. Deshalb können die hier vorgestellten Experimente auch nur eine erste Abschätzung einer Kartierung geben, da Kugeln zu selten an anderen Orten der Zelloberfläche beobachtet wurden. Ein weiteres Problem liegt in der Natur der Magnetischen Pinzette: durch das externe Feld der Spule werden magnetische Dipole in den Magnetkugeln erzeugt, die essentiell für die Kraftübertragung sind. Diese induzierten Dipolmomente können sich jedoch auch gegenseitig beeinflussen und stellen, vor allem in unmittelbarer Nähe einer Kugel, ein stärkeres Kraftpotential als das äußere Feld dar, dessen Eichung unter diesen Umständen nicht mehr gültig ist. Man muss bei der Erstellung einer viskoelastischen Karte der Zelloberfläche also sicherstellen, dass die verwendeten Kugeln nicht zu nah beieinander liegen, sondern wenigstens 2-3 Kugelradien voneinander entfernt sind, da sonst die Information über die wirkende Kraft verloren geht.

Betrachtet man Abbildung 6.8, so erkennt man, dass die Kugel in der Nähe des Zellkerns eine deutlich größere Auslenkung zeigt, als die Kugel am Rand des Zytoplasmas. Die Zelle ist also in der Nähe des Kerns deutlich weicher als am Rand. Diese Tendenz ist einheitlich bei allen Experimenten ($n = 5$) vorhanden, die bisher auf diese Weise analysiert wurden, da unabhängige Kugeln auf einer Zelle beobachtet werden konnten.



A Bild einer Zelle mit zwei Magnetkugeln und Kugeltrajektorien.



B Vergleich der Auslenkungen der beiden Kugeln durch eine Kraft von 2 nN.

Abbildung 6.8: Kartierung der viskoelastischen Eigenschaften einer Zelle. In Abbildung A ist die Position zweier Magnetkugeln auf einer Zelloberfläche zu erkennen. Die eine Kugel ist dabei in unmittelbarer Nähe des Zellkerns, die andere am Rand des Zytoplasmas adhäriert. Die Reaktion der beiden Kugeln auf eine Kraft von 2 nN unterscheidet sich deutlich, wie in Abbildung B dargestellt.

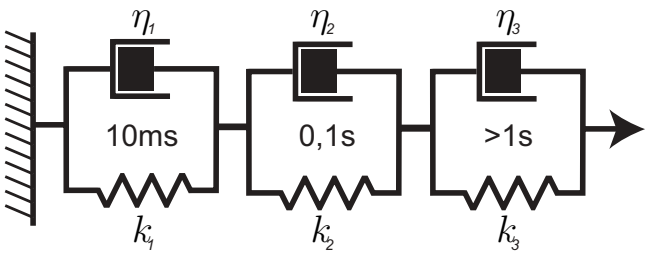


Abbildung 6.9: Mechanischer Äquivalentkreis zur Beschreibung der Auslenkung der Magnetkugeln auf Endothelzellen. Die Auslenkung wird mathematisch durch Gleichung (6.1) beschrieben. Die Größenordnungen der charakteristischen Zeiten, die sich bei der Anpassung der Funktion an die experimentellen Daten ergeben, sind in der Abbildung eingetragen.

6.5 Modellierung der Kugelauslenkung

Zur Modellierung der Auslenkung der Magnetkugeln wird ein phänomenologisches, makroskopisches Modell verwendet, das aus einem System von Federn und Dämpfungen besteht. Ein solches Verfahren zur Beschreibung von viskoelastischen Eigenschaften wird seit langem in der Rheologie eingesetzt (Ter Haar 1950a, Ter Haar 1950b, Ferry 1980) und wurde auch bei biologischen Systemen bereits erfolgreich angewendet, z.B. zur Beschreibung von Zelleigenschaften (Sato et al. 1990, Ziemann 1997, Bausch et al. 1998) und von Aktinnetzwerken (Schmidt 1999, Dichtl und Sackmann 2002).

Ein völlig anderes Modell zur Beschreibung der Daten beruht auf einem neu entwickelten theoretischen Ansatz von A. Boulbitch und N. Ter-Oganessian (Ter-Oganessian et al. 2003). Es beschreibt die Form der Kugelauslenkung als Resultat eines Kräftegleichgewichts der Magnetkraft und einer osmotischen Kraft, die der Verschiebung der Makromoleküle im Aktinkortex entspringt. Da diese Theorie noch nicht abgeschlossen vorliegt, wird sie im Kapitel 10 kurz skizziert.

Modellierung durch mechanische Modelle

Nach Ferry (1980) können rheologische Experimente, bei denen die Deformation unter konstanter Spannung betrachtet wird, durch eine Serie von Voigt-Elementen modelliert werden, die jeweils unterschiedliche Retardationszeiten besitzen. Im vorliegenden Fall wird zur Beschreibung der Kugelauslenkung ein Modell verwendet, das aus einer Reihe von drei Voigt-Elementen besteht, wie es in Abbildung 6.9 dargestellt ist. Jedes der drei Voigt-Elemente besitzt einen viskosen Beitrag η_i und einen elastischen Beitrag $k_i = 1/J_i$, aus denen sich für jedes Element eine charakteristische Retardationszeit $\tau_i = \eta_i/k_i = \eta_i J_i$ berechnet (eine genaue Beschreibung der Modellierung durch Voigt-Elemente findet sich im Abschnitt 5.2). Die Auslenkung eines einzelnen Voigt-Elements durch eine konstante Scherkraft,

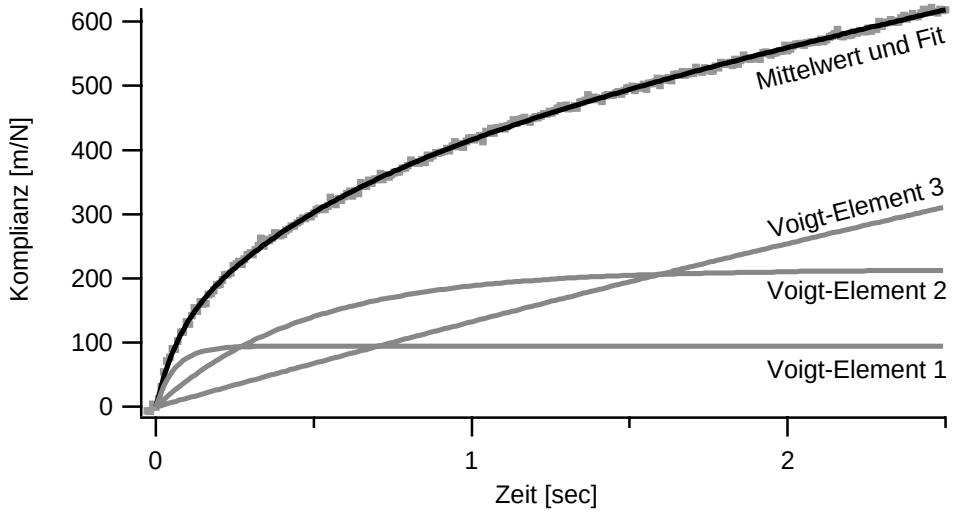


Abbildung 6.10: Die Abbildung zeigt eine numerische Anpassung (schwarz) an den Mittelwert (grau) der Einzelpulse aus Abbildung 6.3B mit Hilfe des mechanischen Schaltkreises aus Abbildung 6.9. Die einzelnen beitragenden Funktionen der Voigt-Elemente sind dargestellt und haben die Retardationszeiten $\tau_1 = 0,060 \pm 0,005$ sec, $t_2 = 0,47 \pm 0,07$ sec und $\tau_3 = 11,6 \pm 13$ sec.

die zum Zeitpunkt $t = 0$ einsetzt, ist gegeben durch $x_i(t) = J_i(1 - \exp[-t/\tau_i])$. In dieser Form erkennt man die Bedeutung der Retardationszeit τ_i, die gleich der Zeit ist, in der die Auslenkung des Voigt-Elements nur noch um den e-ten Teil von der Maximalauslenkung J_i abweicht. Die resultierende Deformation $x(t)$ des mechanischen Schaltkreises aus drei Voigt-Elementen wird durch die Summe der drei Einzeldeformationen wiedergegeben:

$$x(t) = J_1(1 - e^{-t/\tau_1}) + J_2(1 - e^{-t/\tau_2}) + J_3(1 - e^{-t/\tau_3}) \tag{6.1}$$

Durch ein Modell bestehend aus verschiedenen, unabhängigen Voigt-Elementen kann ein viskoelastischer Körper beschrieben werden, der über mehrere, voneinander unabhängige Retardationszeiten verfügt. Auf diese Weise können bei der Anpassung der Modellfunktion an die Messwerte unterschiedliche Zeitregime beachtet werden, was bei einfacheren Modellen nicht möglich ist. So verfügt z.B. das mechanische Modell von Ziemann (1997), Feneberg et al. (2001) und Bausch et al. (2001) nur über eine einzelne charakteristische Retardationszeit.

Eine Eigenschaft des Voigt-Modells besteht darin, dass die Deformation durch eine konstante Scherkraft völlig reversibel ist, wenn diese Scherkraft abgeschaltet wird. Betrachtet man die Auslenkungen an Endothelzellen durch kurze Kraftpulse, beobachtet man meistens eine solche Reversibilität, weshalb das Modell in Abbildung 6.9 als Grundmodell gewählt wurde. Allerdings findet sich in der Auslenkung der Kugel in Abbildung 6.5 für lange Zeiten ein linearer viskoser Fluss, der durch ein vollständiges Voigt-Element nicht beschrieben, sondern nur durch

	Amplitude J_i [m/N]	Retard. Zeit τ_i [sec]
Voigt-Element 1	93 ± 69	$0,05 \pm 0,02$
Voigt-Element 2	143 ± 112	$0,5 \pm 0,27$
Voigt-Element 3	1025 ± 783	$15 \pm 12,5$

Tabelle 6.1: Numerische Werte für die Beschreibung des Modells aus Abbildung 6.9. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte aus 16 Einzelexperimenten. Die Einzelexperimente repräsentieren jeweils die Mittelwerte mehrerer Pulse einer einzelnen Kugel. Die angegebenen Unsicherheiten sind die einfachen Standardabweichungen, die sich beim Anpassen der Modellfunktion ergeben.

eine einzelne Viskosität wiedergegeben werden kann (was einem degenerierten Voigt-Element mit $k_i = 0$ entspricht). Passt man Gleichung (6.1) an experimentelle Daten mit Pulsen relativ kurzer Dauer an ($t < 10\,\text{sec}$), fällt in der Tat auf, dass die charakteristische Zeit τ_3 größer ist, als die Dauer der im Experiment angelegten konstanten Kraft. Insofern können die Daten meistens auch durch ein mechanisches Modell wiedergegeben werden, das aus zwei Voigt-Elementen und einer zusätzlichen Viskosität besteht. Jedoch widersprechen sich diese beiden Modelle nicht unbedingt: Wenn das Produkt $\eta_3 \cdot J_3 = \tau_3$ groß wird gegenüber t, kann die Exponentialfunktion $\exp[-t/(\eta_3 J_3)]$ genähert werden und für den Beitrag des dritten Voigt-Elements ergibt sich:

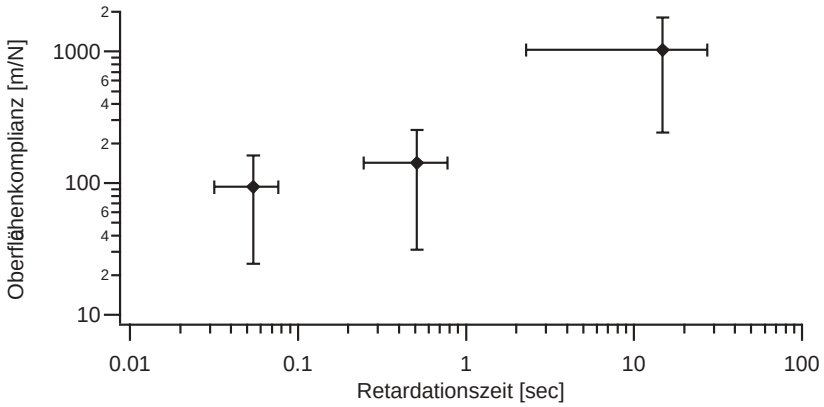
$$J_3\left(1 - e^{-t/(\eta_3 J_3)}\right) = J_3\left(1 - \left[1 - \frac{t}{\eta_3 J_3} + \ldots\right]\right) \approx \frac{t}{\eta_3} \tag{6.2}$$

In diesem Fall wird also das dritte Voigt-Element durch eine Viskosität genähert und die Auslenkung der Kugel wird beschrieben durch

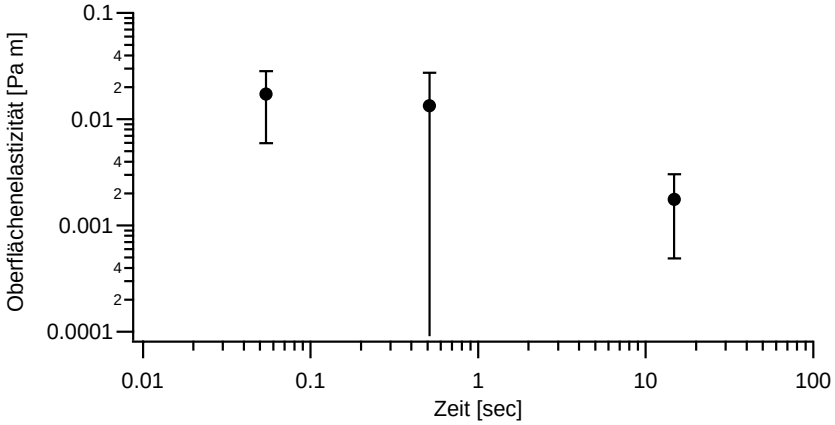
$$\gamma(t) = J_1(1 - e^{-t/\tau_1}) + J_2(1 - e^{-t/\tau_2}) + t/\eta_3. \tag{6.3}$$

Tatsächlich unterscheiden sich die numerischen Werte im Rahmen des Messfehlers, die man durch eine Anpassung mit Gleichung (6.3) erhält, nicht von denen, die sich durch Gleichung (6.1) ergeben, wenn man für $\eta_3 = \tau_3/J_3$ setzt.

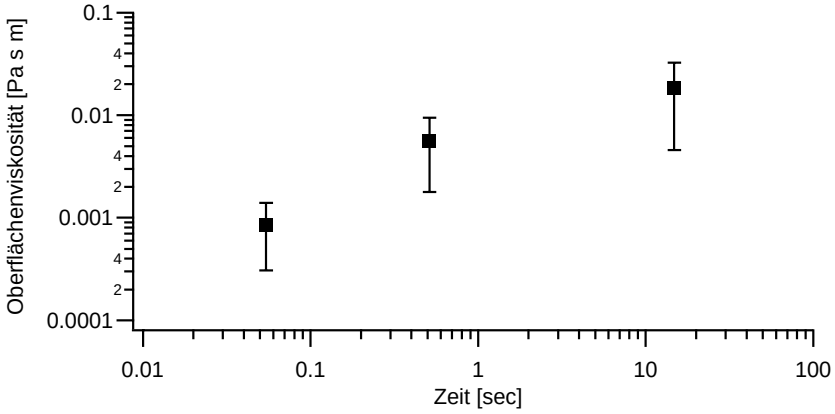
In Abbildung 6.10 ist das Beispiel einer Anpassung von Gleichung (6.1) an experimentellen Daten zu sehen. Zur Verdeutlichung sind in diesem Graphen auch alle einzelnen Beiträge der drei Voigt-Modelle dargestellt. Die unterschiedlichen Zeitregime sind deutlich an der Sättigung der einzelnen Funktionen zu erkennen. In Tabelle 6.1 sind die numerischen Werte für J_i und τ_i der drei Voigt-Elemente zusammengefasst, die durch die Anpassung des Modells an Daten von insgesamt $n = 16$ Kugeln für die Elemente des mechanischen Modells bestimmt werden konnten. Die drei Retardationszeiten besitzen jeweils unterschiedliche Größenordnungen: $\tau_1 \sim \mathcal{O}(0,010\,\text{sec})$, $\tau_2 \sim \mathcal{O}(0,10\,\text{sec})$ und $\tau_3 \sim \mathcal{O}(1 \ldots 100\,\text{sec})$. Interessant ist, dass der Zeitbereich der ersten beiden Retardationszeiten sehr scharf



A Zusammenhang zwischen Amplitude und Retardationszeit



B Werte der Elastizität k_i



C Werte der Viskosität η_i

Abbildung 6.11: Numerische Ergebnisse aus der Anpassung eines Modells aus drei Voigtelementen an die experimentellen Daten.

voneinander abgegrenzt werden kann. Nur die dritte Retardationszeit ist nicht eindeutig auf einen Zeitbereich zu beschränken, die Werte streuen von 2,5 sec bis 50 sec. Bemerkenswert ist, dass die Auslenkungen mit Hilfe der drei charakteristischen Zeiten gut beschrieben werden können, obwohl die Experimente vier Zeitdekaden abdecken. Allerdings muss beachtet werden, dass der Wert der dritten Retardationszeit relativ schlecht bestimmt ist, wie aus der großen Standardabweichung zu erkennen ist.

In Abbildung 6.11 sind die numerischen Ergebnisse der Experimente graphisch dargestellt: in Abbildung 6.11A sind die Mittelwerte der Komplianzen J_i gegen die Mittelwerte der Retardationszeit τ_i mit Standardabweichungen aufgetragen. Die angegebenen Unsicherheiten machen deutlich, wie scharf die Retardationszeiten gegeneinander abgegrenzt sind, während sich die Komplianzen nicht so klar voneinander unterscheiden. Abbildung 6.11B zeigt die Elastizität $k_i = 1/J_i$, die zunächst eine schwache Abhänigkeit von der Retardationszeit besitzt, und Abbildung 6.11C die Werte der Viskosität $\eta_i = \tau_i \cdot J_i$, die kontinuierlich ansteigt, je größer die Retardationszeit ist. Es handelt sich jeweils um die Werte bezogen auf eine 2-dimensionale viskoelastische Schicht der Dicke h.

6.6 Diskussion

Die wesentliche Frage, die durch die Experimente dieses Kapitels beantwortet werden sollte, war, wie weit die lokale Deformation des Aktinkortex bei Endothelzellen linear von der angelegten Kraft abhängt. Durch die hier vorgestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Eigenschaften auf kurzen Zeitskalen bis ca. 10 Sekunden Dauer sehr gut durch lineare Gleichungen beschrieben werden können und dieser lineare Zusammenhang auch bis zu relativ großen Deformationen von 1 bis 2 Mikrometern gegeben ist. Die Beispiele in den Abbildung 6.3B und 6.4 zeigen diese Abhängigkeit deutlich. Für Deformationen, die über einen längeren Zeitraum ausgeübt werden, gilt die Linearität jedoch nicht mehr generell, sie ist in solchen Fällen nur in einigen Beispielen zu beobachten. Auf lange Zeit ($t > 30$ sec) reagieren die Zellen auf die äußere mechanische Stimulation, die Deformationen des Zellkortex werden nicht-linear (vgl. Abb. 6.6).

Erstmals wurde bei Zellen durch die numerische Rekursion (5.28) aus Kriechexperimenten der Relaxationsmodul $G(t)$ bestimmt. Diese Größe, die komplementär zur Kriechkomplianz ist, gibt einen anschaulichen Einblick in das Verhalten des untersuchten Körpers. Der Relaxationsmodul, dargestellt in Abbildung 6.7, zeigt ein kurzes, aber deutlich ausgeprägtes Gummi-Plateau im zeitlichen Bereich von 0,05 bis 0,15 Sekunden. In diesem Bereich, der dem Frequenzintervall von 6 Hz bis 20 Hz entspricht, dominiert also elastisches Verhalten den Aktinkortex. Ein solches Plateau ist aus in vitro-Messungen von Aktin-Netzwerken durchaus bekannt, erstreckt sich bei reinem Aktin jedoch auf einen größeren Fre-

Zellbestandteil	Young-Modul E [kPa]	Technik	Referenz
Nach Scherkraft	18,7 ± 5,7	AFM	Ohashi et al. (2002)
Vor Scherkraft	12,2 ± 4,2		
Zytoskelett	10	Dehnkammer	Caille et al. (1998)
Aktinkortex	**6**	**Mag. Pinzette**	**Kapitel 6**
Oberhalb des Zellkerns	7,22 ± 0,46		
Umgebung des Zellkerns	2,97 ± 0,79	AFM	Mathur et al. (2000)
Rand der Zelle	1,27 ± 0,36		
Endothelzelle der Leber	2	AFM	Braet et al. (1998)
Fibroblasten	40	Mag. Pinzette	Bausch et al. (1998)

Tabelle 6.2: Zusammenstellung einiger experimenteller Werte von Endtothelzellen. Zum Vergleich ist ein Messwert an Fibroblasten beigefügt, der ebenfalls mit der Magnetischen Pinzette gemessen worden ist.

quenzbereich und ist gegenüber den hier vorgestellten Messungen leicht zu tieferen Frequenzen verschoben (Schmidt 1999, Keller 2003).

Um den Relaxationmodul dieses Plateaus mit Experimenten zum elastischen Verhalten von Endothelzellen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen, ist es nötig, den gemessenen Oberflächenrelaxationsmodul in einen Relaxationsmodul für die Scherung eines Volumens umzurechnen. Zu diesem Zweck wird das Plateau in Abbildung 6.7 als elastische Federkonstante $k = F/x$ aufgefasst. Für die Scherung eines elastischen Körpers gilt nach Gleichung (5.3) der Zusammenhang $\sigma = \mu \cdot \gamma$ zwischen Scherspannung $\sigma = F/A_c$ und Scherwinkel $\gamma = x/d$, wobei μ der Schermodul ist. Die Kontaktfläche der Kugel ($\varnothing = 4{,}5\,\mu$m) mit dem Kortex wird dabei zu $A_c \approx 1\ \mu\text{m}^2$ abgeschätzt, als Dicke des Aktinkortex der Wert von $d = 0,3\,\mu$m verwendet (Sackmann et al. 2002). Man erhält aus dieser Rechnung einen Schermodul des Aktinkortex von $\mu = 2\,$kPa, was einem Young-Modul von $E = 6\,$kPa entspricht[3]. In Tabelle 6.2 wird dieser Wert in den Kontext von Ergebnissen anderer Autoren gestellt. Die Werte stimmen erstaunlich gut miteinander überein, obwohl sehr unterschiedliche Techniken verwendet wurden.

Ein genauerer Vergleich mit den Experimenten von Mathur et al. (2000) zeigt jedoch einen interessanten Unterschied. Mathur et al. (2000) finden für den Young-Modul an verschiedenen Stellen der Zelle ein umgekehrtes Verhalten wie es durch die Magnetische Pinzette gemessen wird: am Zellkern ergibt die Messung mit dem AFM den größten Wert (steif), am Rand der Zelle den niedrigsten Wert (weich) des Young-Moduls. Mit der Magnetischen Pinzette ergibt sich ge-

[3]Der Zusammenhang zwischen Young-Modul E und Schermodul μ lautet $E = 3\mu$ (Landau und Lifschitz 1970), wenn das Poissonverhältnis eines inkompressiblen Mediums $\sigma_P = 0,5$ verwendet wird, was für biologische Proben üblich ist.

Zelletyp	Schermodul [kPa]	Oberflächenviskosität [Pa s m]	char. Zeiten [sec]	Referenz
Endothelzellen	**6**	**0,015**	**0,05 & 0,5**	**Kapitel 6**
Fibroblasten	40	0,031	0,09	Bausch et al. (1998)

Tabelle 6.3: Vergleich von Ergebnissen gemessen mit der Magnetischen Pinzette an Endothelzellen und Fibroblasten.

rade die umgekehrte Tendenz: am Zellkern sind die Kugeln leichter und weiter auszulenken als am Zellrand (vgl. Abbildung 6.8). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass es sich bei den Experimenten mit der Magnetischen Pinzette um eine Messung des Langzeitverhaltens handelt, bei der vor allem viskose Beiträge eine wichtige Rolle spielen und die beiden Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

Um aus den gemessenen Kriechkomplianzen numerische Werte für charakteristische Zeiten, Elastizitäten und Viskositäten zu bestimmen, gibt es mehrere Ansatzmöglichkeiten. Eine häufig verwendete Methode besteht in der Modellierung der Kriechkomplianz durch einen mechanischen Ersatzschaltkreis. Schon früher wurden die Scherdeformationen von Zellen durch Schaltkreise simuliert (Hiramoto 1969, Sato et al. 1990), auch für Experimente mit der Magnetischen Pinzette sind sie schon verwendet worden (Ziemann 1997, Bausch et al. 2001). Trotz unterschiedlicher Anzahl von Elementen hatten diese Modelle alle eine Gemeinsamkeit: sie besaßen alle nur eine charakteristische Retardationszeit τ_c.

Tatsächlich ist es nicht möglich, die Experimente der vorliegenden Arbeit mit diesem einfachen Modell befriedigend zu modellieren. Es wird daher als neues phänomenologisches Modell zur Beschreibung der Auslenkung eine Kombination von drei Voigt-Elementen verwendet, von denen bei einem der elastische Beitrag verschwinden kann. Dieses Modell zeichnet sich gegenüber den früheren dadurch aus, dass unterschiedliche Retardationszeiten im System beschrieben werden können. Tatsächlich ist die Übereinstimmung des so modellierten Verlaufs der Auslenkung mit den experimentellen besser, vor allem bei kurzen Zeiten treten keine systematischen Abweichungen mehr auf. Die charakteristischen Retardationszeiten dieser Voigtmodelle liegen dabei immer in unterschiedlichen Größenordungen, $\tau_1 = 0{,}05 \pm 0{,}02$ sec, $\tau_2 = 0{,}5 \pm 0{,}3$ sec und $\tau_3 = 15 \pm 12{,}5$ sec. Generell könnte dieses Modell auch noch leicht vereinfacht werden, da die Retardationszeit des dritten Voigtelements immer außerhalb der Beobachtungszeit liegt und darum dieses Element durch eine einzelne Viskosität mit dem Wert $\eta = \tau_3/J_3$ genähert werden kann, was im Mittel zu einer Viskosität von $15 \cdot 10^{-3}$ Pa s mführt. Vergleicht man die Retardationszeiten mit der charakteristischen Zeit $\tau_c = 0{,}1$sec, die Bausch et al. (1998) mit der Magnetischen Pinzette bei Fibroblasten gemessen haben, so befindet sich diese zwischen den hier bestimmten Zeiten τ_1 und τ_2. Die Daten der Fibroblasten werden in Tabelle 6.3 mit den Ergebnissen dieses

Kapitels verglichen.

Dass die Unterscheidung verschiedener Zeitskalen in den mechanischen Eigenschaften biologischer Proben relevant ist, zeigen die rheologischen Untersuchungen an Aktinnetzwerken (Tempel 1996, Hinner et al. 1998, Schmidt et al. 2000) und wird durch das Auftreten des Gummi-Plateaus im Relaxationsmodul bestätigt. Auch bei Zellen wurde eine solche Zeitabhängigkeit bereits beobachtet. Im Zytoplasma von Fibroblasten wurden die viskoelastischen Moduln durch eine *multiple-particle-tracking*-Methode bestimmt, bei der die ungestörten Trajektorien kleinster Kugeln (d =0,1 μm) verfolgt und ausgewertet wurden (Tseng et al. 2002). Es zeigt sich, dass das Zellzytoplasma bei niedrigen Frequenzen von $\omega = 1\text{Hz}$ ($\widehat{=} t = 1\text{sec}$) viskos, bei höher Frequenzen von $\omega = 63\text{Hz}$ ($\widehat{=}\ t = 0,016\,\text{sec}$) elastisch dominiert ist. Diese relativ allgemeine Feststellung wird durch die hier vorgestellten Experimente an Endothelzellen bestätigt: der elastische Beitrag $\mu_i = 1/J_i$ ($i = 1, 2, 3$) im mechanischen Modell bleibt bei den ersten beiden Voigt-Elementen ungefähr konstant, fällt dann aber auf 1/10 des ursprünglichen Wertes ab. Ebenfalls an Fibroblasten wurden frequenzabhängige Experimente mit dem AFM im Intervall von 50 Hz bis 300 Hz durchgeführt (Mahaffy et al. 2000), die im Bereich bis 100 Hz eine Dominanz des elastischen Anteils beobachten. Bei höheren Frequenzen (die außerhalb des Messbereichs der hier vorgestellten Experimente liegen) wurde für die viskoelastischen Module ein ähnliches Verhalten wie bei *in-vitro*-Messungen von Aktin gefunden, was zeigt, dass unterschiedliche Zeitskalen tatsächlich beachtet werden müssen. Frequenzabhängige Experimente am Zellkortex selbst wurden von Fabry et al. (2001) an glatten Muskelzellen der menschlichen Lunge durchgeführt. Auch diese Gruppe fand unterschiedliche Werte für die viskoelastischen Module je nach Anregungsfrequenz, allerdings zeigte sich in diesen Messungen kein elastisches Plateau wie es bei den Endothelzellen gefunden wurde.

Kapitel 7

Anwendung der linearen Viskoelastizität – die Auslenkung durch beliebige Pulsformen

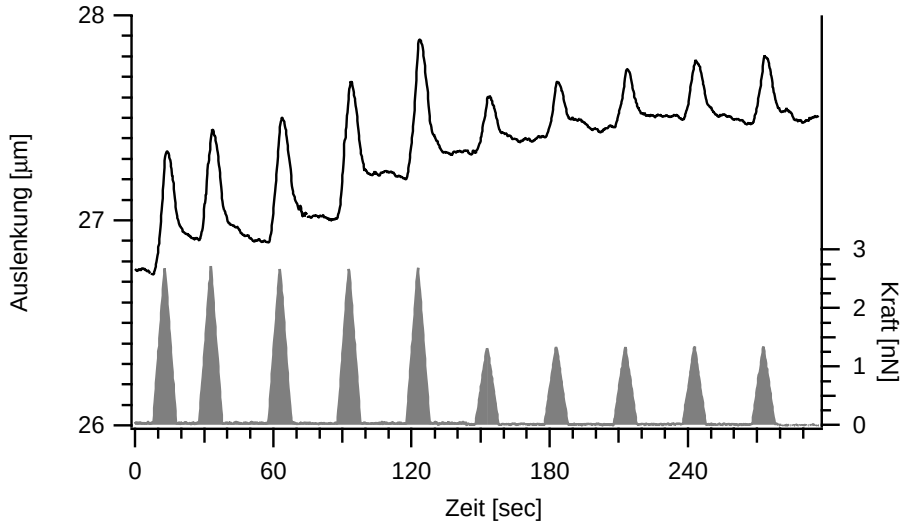
Eine Möglichkeit, die Gültigkeit der Theorie der linearen Viskoelastizität zu testen, bietet die Analyse von Deformationen hervorgerufen durch beliebige, sich zeitlich ändernde Scherspannungen. Zu diesem Zweck werden Auslenkungen von Magnetkugeln durch andere Kraftprofile als die bisher verwendete konstante Scherkraft gemessen und mit den theoretischen Vorhersagen verglichen.

Nachdem im vorigen Kapitel die Kriechkomplianz des Aktinkortex durch Anlegen der konstanten Scherkraft bestimmt worden ist, werden im folgenden mit Hilfe dieser Komplianz die Auslenkungen von Magnetkugeln durch Dreieck-, Rechteck- und Treppenpulse berechnet und mit Experimenten verglichen, die mit diesen Pulsformen durchgeführt wurden.

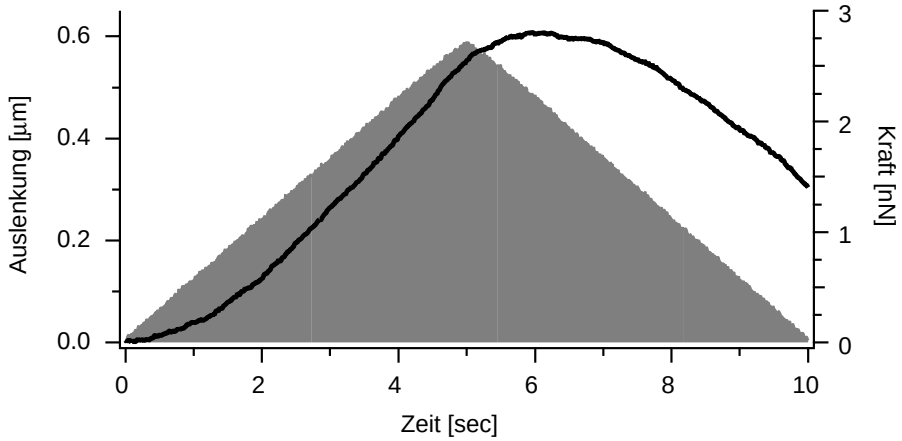
Relevant sind diese Experimente, weil die untersuchten Objekte lebende Zellen sind. Für diese kann es einen gravierenden Unterschied bedeuten, ob eine mechanische Belastung kontinuierlich ansteigt (Dreieckpuls), plötzlich einsetzt (Rechteckpuls) oder über lange Zeiten kleinen Veränderungen unterworfen ist (Treppenpuls). Durch die Anwendung von Gleichung (5.1b) steht eine Technik zur Verfügung, eine Reaktion der Zellen auf die mechanischen Reize zu messen. Sollte dies der Fall sein, dann sollte die Deformation nicht mehr durch die lineare Gleichungen zu beschreiben sein.

7.1 Dreieckpulse

Mit Hilfe eines Funktionsgenerators können Kraftprofile erzeugt werden, die die Form eines Dreiecks besitzen. Dabei bedeutet Dreieckpuls, dass bei einem Puls der Dauer T die Kraft linear mit einer konstanten Stromrate $\dot{I}$ bis zu einer Stromstärke $I(T_{1/2}) = I_{\max}$ ansteigt und dann wieder linear mit $-\dot{I}$ auf $I(T) = 0$



A Messkurve einer Anregung mit Dreieckpulsen



B Ausschnitt aus dieser Messreihe

Abbildung 7.1: Beispiel der Auslenkung einer Kugel durch Dreieckpulse. Die Auslenkung unterscheidet sich deutlich von der einer konstanten Scherspannung, lässt sich aber durch Gleichung 5.1b auf diese zurückführen.

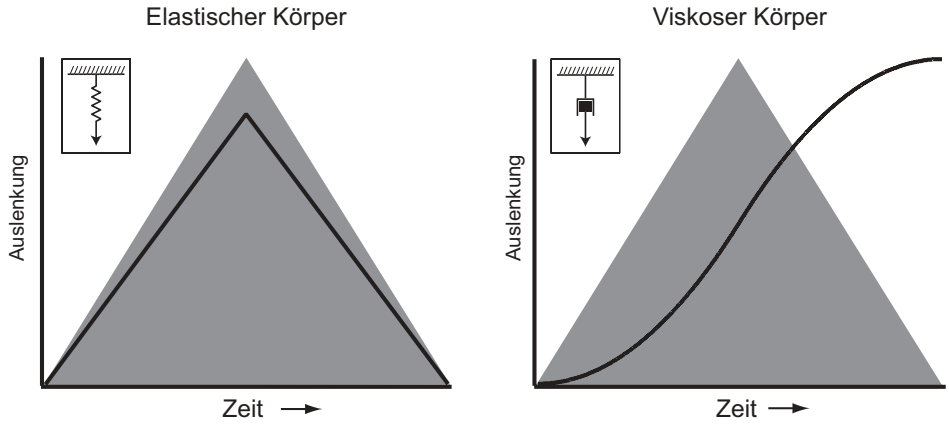


Abbildung 7.2: Theoretische Auslenkungen (schwarze Linie) eines rein elastischen und eines rein viskosen Körpers durch einen dreieckförmigen Kraftpuls (graue Fläche).

abfällt. Dies ist vor allem deshalb möglich, weil die Kraft-Strom-Relation der Magnetischen Pinzette fast vollständig linear verläuft (vgl. Gleichung (3.4) und Abbildung 3.8B). Abbildung 7.1A zeigt die Messkurve einer Sequenz mehrerer Dreieckpulse mit zwei verschieden großen Maximalströmen bzw. -kräften von $I = 0,75\,\mathrm{A}$ ($\widehat{=}\,1,1\,\mathrm{nN}$) und $I = 1,5\,\mathrm{A}$ ($\widehat{=}\,2,2\,\mathrm{nN}$).

Ein Ausschnitt aus dieser Messreihe ist in Abbildung 7.1B vergrößert dargestellt. Der gesamte Puls dauert in diesem Beispiel 10 Sekunden, der Anstieg bis zur Maximalkraft 5 Sekunden. Die Auslenkung der Kugel im Verlauf dieses Pulses beginnt bereits bei geringen Kräften, steigt langsam an und wird im Verlauf der zunehmenden Kraft annähernd linear. In der Mitte des Pulses beginnt die Kraft wieder schwächer zu werden. Dabei beobachtet man, dass die Auslenkung der Kugel bei absteigender, kleiner werdender Kraft immer noch zunimmt. Erst wenn der Betrag der äußeren Kraft einen gewissen Wert unterschritten hat, nimmt auch die Auslenkung der Kugel wieder ab.

Die Antwort eines elastischen und eines viskosen Körpers auf eine dreiecksförmige Scherkraft

Um die Antwort der Kugel auf die Dreieckskraft besser zu verstehen, soll hier zunächst das Verhalten eines rein elastischen und eines rein viskosen Körpers auf einen solchen Kraftpuls verdeutlicht werden. Dabei werden den beiden Körpern die Beziehungen von Gleichung (5.3) (elastisch) und (5.4) (viskos) zugrunde gelegt. Danach gilt für einen elastischen Körper, dass die Auslenkung proportional zur anliegenden Kraft ist. Die Deformation durch einen Dreieckpuls besitzt also ebenfalls die Form eines Dreiecks und nimmt sofort wieder ab, wenn die äußere Kraft kleiner wird. Die Auslenkung ist als schwarze Linie im linken Teil von Abbildung 7.2 skizziert.

Nach Gleichung (5.4) ist bei einem viskosen Körper die Geschwindigkeit der Auslenkung proportional zur angreifenden Kraft, die Auslenkung des Körpers ist also proportional zum Integral über den Kraftpuls. Diese Auslenkung ist im rechten Teil von Abbildung 7.2 dargestellt und zeigt zunächst eine quadratisch ansteigende Auslenkung, solange die äußere Kraft linear zunimmt. Wird die äußere Kraft wieder schwächer, ändert sich nicht das Vorzeichen der Auslenkung, diese nimmt weiterhin zu, da die Kraft immer noch positiv ist. Die Auslenkung wird nur langsamer und stoppt, wenn die äußere Kraft auf null abgefallen ist.

Viskoelastische Auslenkung der Magnetkugel

Betrachtet man die Auslenkung der Magnetkugel durch einen Dreieckpuls, so sind sowohl viskose als auch elastische Eigenschaften sichtbar, wie es nach den Ergebnissen des Kapitels 6 zu erwarten ist. Der langsame Beginn der Auslenkung der Kugel, aber vor allem auch die weitere Zunahme der Kugelauslenkung zu Beginn der zweiten, abnehmenden Pulshälfte lassen sich anschaulich mit dem Verhalten eines viskosen Körpers vergleichen: auch wenn die Kraft ab der Mitte der Dreieckskurve wieder abnimmt, ist sie noch immer positiv und zieht in die positive x-Richtung, was zu einer fortdauernden Auslenkung der Kugel führt. Da die Zelle jedoch kein rein viskoser Körper ist, zeigt sich auch elastisches Verhalten. Die annähernd lineare Auslenkung gegen Ende des ansteigenden Pulses entspricht dem linearen Verhalten eines elastischen Körpers. Vor allem aber die kleiner werdende Auslenkung im Verlauf des abnehmenden Pulsteils zeigt, dass bei der Auslenkung im System Energie gespeichert worden ist, die bei geringerer äußerer Kraft wieder abgegeben wird. Dies entspricht dem Verhalten eines elastischen Körpers.

Kraftskalierung der Kugelauslenkung

Auch im Falle der Dreieckpulse ist die lineare Kraftskalierung gewährleistet: bei doppelter Kraft wird die Kugel doppelt so weit ausgelenkt, wie bereits in Abbildung 7.1A zu erkennen ist. Noch genauer nachvollziehen lässt sich dieser Sachverhalt in Abbildung 7.3, in der die Auslenkungen für Pulse der unterschiedlichen Maximalkräfte $F_1 = 1{,}1\,\mathrm{nN}$ und $F_2 = 2{,}2\,\mathrm{nN}$ miteinander verglichen werden. Die maximale Auslenkung beträgt $x_1 = 0{,}28\,\mu\mathrm{m}$ bei F_1 und $x_2 = 0,6\,\mu\mathrm{m}$ bei F_2, die Maximalauslenkung verdoppelt sich also, wenn die äußere Kraft verdoppelt wird. Auch die Restauslenkung am Ende des Pulses ist annähernd proportional zur Maximalkraft, hier ist $x_1 = 0{,}12\,\mu\mathrm{m}$ und $x_2 = 0{,}30\,\mu\mathrm{m}$.

Berechnung der Auslenkung durch die Gleichung der linearen Viskoelastizität.

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit das Verhalten der Auslenkung x_d durch den Dreieckpuls auf die Messung der Auslenkung x_k durch eine konstante Kraft

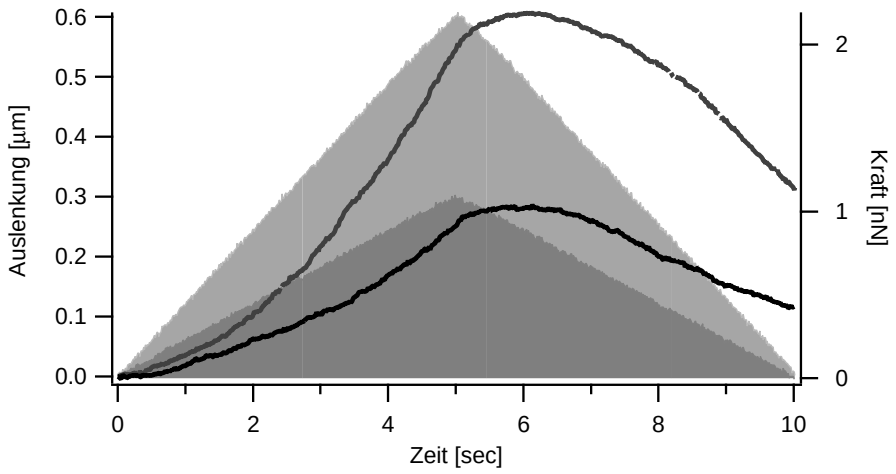
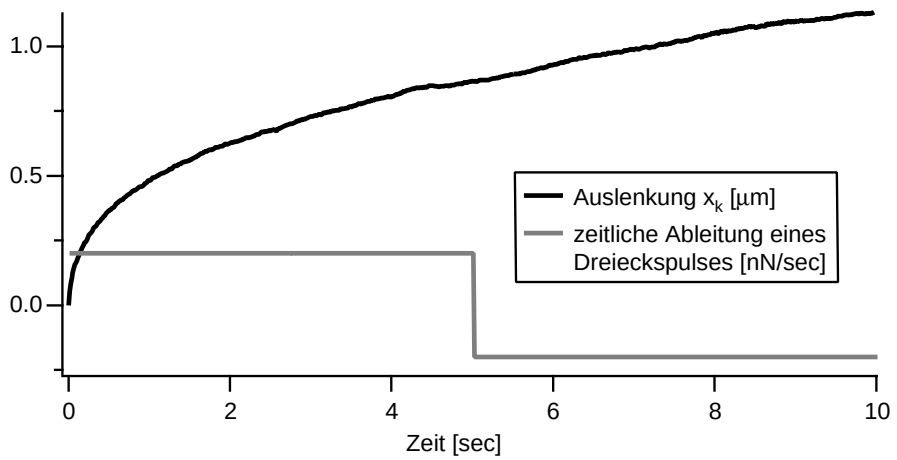


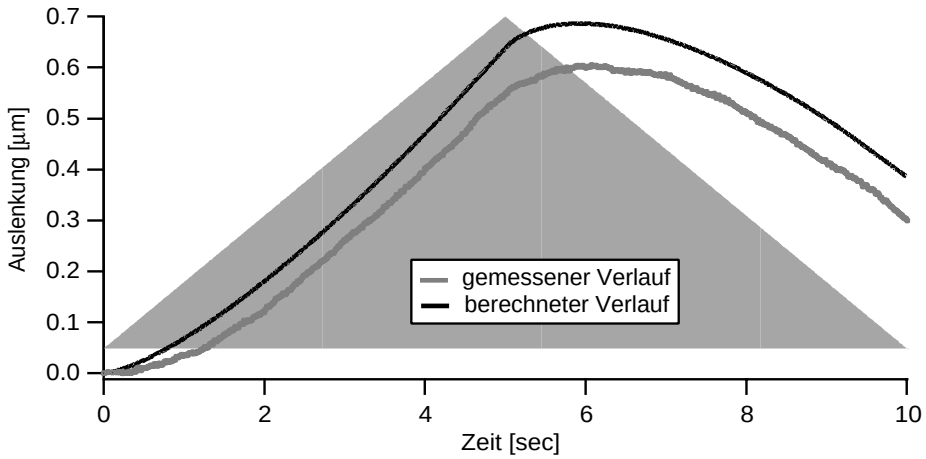
Abbildung 7.3: Skalierung der Kugelauslenkung bei Dreieckpulsen. Aufgetragen sind die Auslenkungen durch zwei Dreieckpulse unterschiedlicher Maximalkräfte $F_1 = 1{,}1\,\mathrm{nN}$ und $F_2 = 2{,}2\,\mathrm{nN}$ gleicher Länge. Auch hier skaliert die Auslenkung mit der angelegten Kraft.

zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck kann mit Hilfe von Gleichung 5.1b die Theorie der linearen Viskoelastizität verwendet werden, um die Auslenkung x_d numerisch zu berechnen. Dabei ist, wie in Abschnitt 5.1 erläutert, die Antwort einer Magnetkugel auf eine konstante Scherkraft proportional zur Kriechkomplianz $J(t)$. Die Experimente mit konstanter Scherkraft im Kapitel 6 stellen also direkte Messungen dieser Materialeigenschaft dar, die nun verwendet werden können, um die Auslenkung x_d durch einen Dreieckpuls zu bestimmen. Die genaue Vorgehensweise soll anhand eines expliziten Beispiels erläutert werden.

Zunächst wird in einem ersten Schritt die Kugelauslenkung x_k durch eine konstante Kraft gemessen. Im hier gezeigten Fall handelt es sich um die Auslenkung während einer Dauer von $T_{\mathrm{Puls}} = 10\,\mathrm{sec}$ bei einem konstanten Strom von $I_k = 1{,}5\,\mathrm{A}$, sie ist als schwarze Kurve in Abbildung 7.4A dargestellt. Die theoretische Kurve der Auslenkung durch einen Dreieckpuls erhält man durch die numerische Lösung von Gleichung (5.15), der Faltung der Kriechkomplianz und der zeitlichen Ableitung der Kraft des Dreieckpulses. Dabei ist die Ableitung der Kraft zunächst positiv konstant bis zur Pulsmitte $T_{1/2} = 5\,\mathrm{sec}$, dann negativ konstant bis zum Ende des Pulses. Diese Ableitung ist als graue Linie in Abbildung 7.4A dargestellt. Zur numerischen Berechnung des Integrals ist dabei die exakte Kenntnis der Kriechkomplianz J nicht notwendig. Denn wie in Gleichung (5.15) dargestellt, spielen die Proportionalitätsfaktoren, die die Auslenkung x_k und J verknüpfen, in diesem Fall keine Rolle, da sie bei der Änderung der Pulsform von konstanter Scherkraft auf Dreieckpuls erhalten bleiben und sich darum in Gleichung (5.15) gegenseitig wegkürzen. Auch die absolute Kraft, die im Experiment angelegt wird, trägt nicht zu dieser Rechnung bei, einzig das



A Graphische Darstellung der zu faltenden Funktionen. In Schwarz ist die Auslenkung bei einer konstanten Spannung gezeigt, in Grau die zeitliche Ableitung einer dreiecksförmigen Kraft.



B Vergleich der berechneten Auslenkung und des Experiments. In Schwarz ist die gemessene Auslenkung einer Kugel durch eine Dreieckskraft gezeigt, in Grau die aus der Faltung errechnete, theoretisch erwartete Auslenkung. Hinterlegt ist der Verlauf der anliegenden Kraft (willkürliche Einheiten).

Abbildung 7.4: Vergleich der berechneten Auslenkung durch einen Dreieckpuls mit dem Experiment. Im ersten Teil sind die einzelnen Funktionen dargestellt, die nach Gleichung (5.15) miteinander gefaltet werden. Im unteren Teil der Abbildung ist das Resultat dieser Faltung verglichen mit dem Ergebnis aus einer Messung.

Verhältnis der Maximalkräfte, das identisch ist mit dem Verhältnis der Ströme in der Spule, und die Rate, mit der die Kraft des Dreieckpulses ansteigt, sind für die Durchführung dieser Rechnung entscheidend.

Die experimentelle Bestimmung der Auslenkung x_d durch einen Dreieckpuls wird mit derselben Kugel durchgeführt, mit der die Auslenkung x_k gemessen wurde, um wirkliche Vergleichbarkeit zwischen Experiment und Rechnung zu gewährleisten. Der Dreieckpuls besitzt ebenfalls eine Länge von T_d =10 sec, die Kraft steigt also bis zur Zeit $T_{1/2} = 5$sec linear an und fällt dann wieder linear ab. Es bietet sich an, den selben Wert wie bei der konstanten Kraft als Maximalstrom des Dreieckpulses zu verwenden. Der Maximalwert ist also $I_k = I_{\max}$ =1,5 A und die Scherrate ergibt sich somit zu

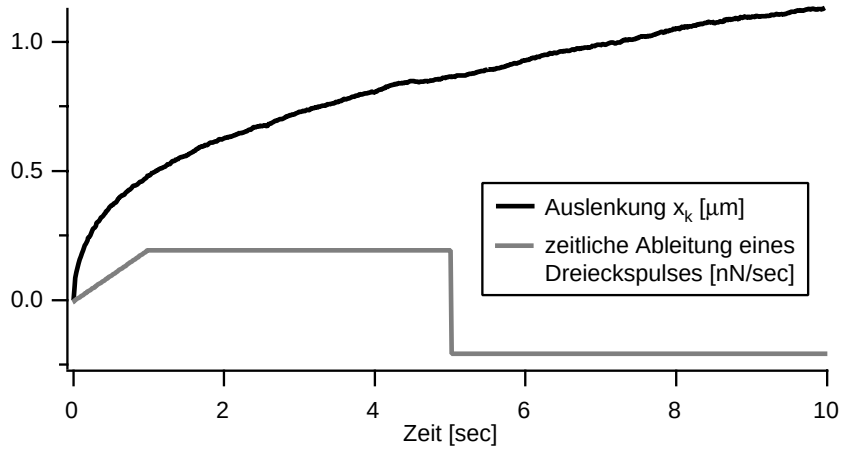
$$\frac{\dot{I}_d(t)}{I_k} = \frac{I_{\max}}{I_k \cdot T_d/2} = \begin{cases} 0{,}2\,\mathrm{sec}^{-1} & \text{für} \quad 0 < t < 5\,\mathrm{sec} \\ -0{,}2\,\mathrm{sec}^{-1} & \phantom{\text{für}} \quad 5\,\mathrm{sec} < t < 10\,\mathrm{sec} \end{cases} \tag{7.1}$$

Mit x_k und der Scherrate in Gleichung (7.1) kann Gleichung (5.15) endgültig numerisch gelöst werden.

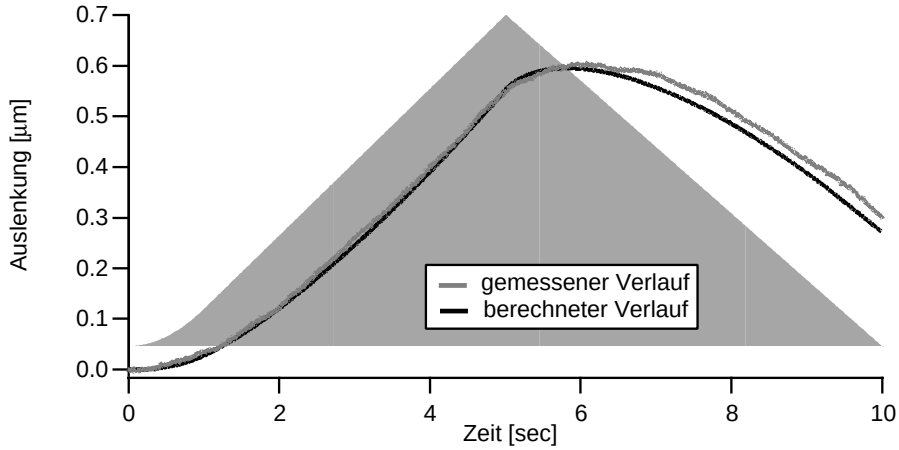
Das Ergebnis der numerischen Rechnung ist in Abbildung 7.4B zusammen mit der experimentell bestimmten Auslenkung x_d dargestellt. Die qualitative Übereinstimmung der beiden Kurven ist offensichtlich, sogar Details wie die zunehmende Auslenkung zu Beginn der zweiten Pulshälfte bei wieder abnehmender Kraft werden gut wiedergegeben. Quantitativ stimmen die beiden Kurven jedoch nicht völlig überein, die berechnete Kurve überschätzt die Daten des Experiments um ca. 12%. Unterschiede im Verlauf der beiden Auslenkungen treten vor allem zu Beginn der Kurven auf, wo die berechnete Kurve schneller ansteigt, als die Auslenkung im Experiment.

Diese Abweichung zwischen Rechnung und Experiment stellt aber keine Limitierung der Beschreibung des Zellkortex als linearen viskoelastischen Körper dar, sie kann vielmehr durch apparative Ungenauigkeiten des Magnetspulenaufbaus erklärt und in der Rechnung berücksichtigt werden. Wie in den Abschnitten 3.1 und 3.4 erläutert, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Strom in der Spule und der Kraft auf die Magnetkugel nur bei genügend hohen Magnetfeldern, bei denen das Dipolmoment der Kugeln bereits gesättigt ist und nicht mehr vom äußeren Feld abhängt. Dieser lineare Bereich des Aufbaus beginnt bei einer Stromstärke von etwas über 250 mA (vgl. Gleichung (3.4), Uhde (2003)). Wird auf die Kugel ein Dreieckpuls ausgeübt, durchläuft die Kraft-Strom-Relation zwangsläufig den Bereich, in dem der lineare Zusammenhang zwischen Spulenstrom und Magnetkraft noch nicht gilt, sondern ein quadratischer Zusammenhang gegeben ist (vgl. Gleichung (3.3)).

Um diesem quadratischen Bereich der Kraft-Strom-Relation in der numerischen Faltung Rechnung zu tragen, wird die vorher konstante Kraftrate am Beginn des Pulses durch eine linear von 0 auf 0,2 ansteigende Rate ersetzt, die in Abbildung 7.5A wieder als graue Linie gezeigt ist. Führt man die numerische



A Graphische Darstellung der korrigierten Faltungsfunktionen. In Schwarz ist die Auslenkung durch einen Rechteckpuls gezeigt, in Grau die zeitliche Ableitung der anliegenden Kraft.



B Vergleich der korrigierten numerischen Faltung und des Experiments. In Schwarz ist die gemessene Auslenkung einer Kugel durch Anlegen eines Dreieckpulses gezeigt, in Grau die aus der Faltung errechnete Auslenkung. Hinterlegt ist der Verlauf der anliegenden Kraft (willkürliche Einheiten).

Abbildung 7.5: Vergleich der Auslenkung eines Dreieckpulses, dessen Beginn durch eine Parabel genähert wurde, da dies dem realen Verlauf der Kraft-Strom-Kurve der Spule bis ca. $I = 250\,\mathrm{mA}$ entspricht. Die Näherung durch die Parabel führt zu einem linearen Anstieg der Scherrate am Beginn des Pulses. Die mit dieser modifizierten Scherrate berechnete Auslenkung zeigt fast keine Abweichung mehr von der gemessenen Auslenkung.

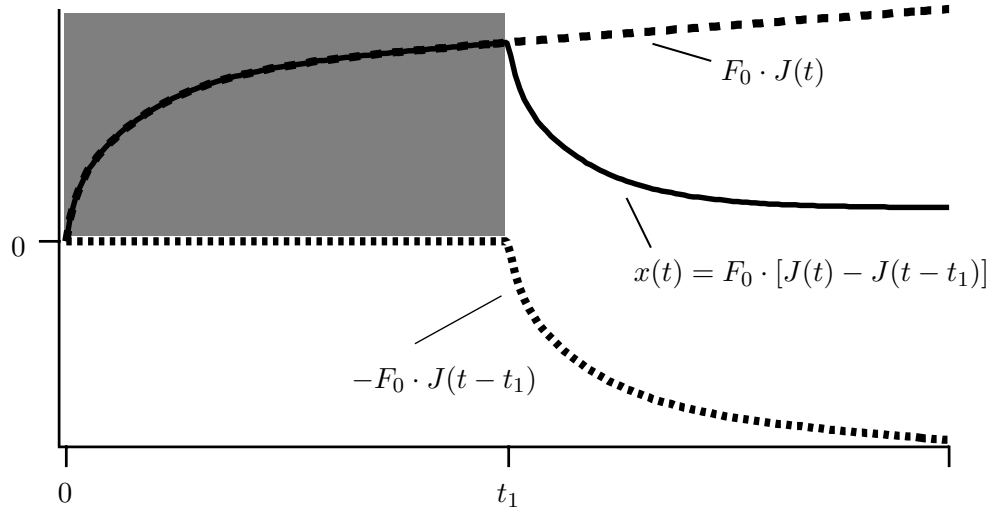


Abbildung 7.6: Theoretische Skizze zur Kriecherholung nach einer Auslenkung durch einen Rechteckpuls. Während des Pulses (graue Fläche) folgt die Auslenkung $x(t)$ (schwarze Linie) dem Verlauf der Kriechkomplianz $J(t)$ (gestrichelte Linie). Nach dem Puls folgt die Auslenkung der Summe der Kriechkomplianz $J(t)$ und der verschobenen negativen Kriechkomplianz $-J(t - t_1)$.

Faltung mit dieser leicht veränderten Funktion aus, erhält man als Ergebnis eine theoretische Auslenkung, die in Abbildung 7.5B erneut mit dem Experiment verglichen wird. Die numerische Berechnung stimmt nun auch quantitativ hervorragend mit den Daten des Experiments überein. Die Diskrepanz in Abbildung 7.4B kann also völlig durch die apparativen Eigenschaften erklärt werden.

7.2 Kriecherholung nach einer Auslenkung

Eine weitere Möglichkeit, die Richtigkeit der Beschreibung des Zellkortex als linearen viskoelastischen Körper zu testen, ist die Untersuchung der Kriecherholung (engl. *creep recovery*) nach einer konstanten Spannung. Bereits bei der generellen Beschreibung der Kugelauslenkung durch einen Rechteckpuls in Abschnitt 6.1 wurde angedeutet, dass sich eine Kugel, nachdem sie durch eine konstante Scherkraft ausgelenkt wurde, wieder zurück zu ihrer Ausgangsposition bewegt, wenn die konstante Kraft auf Null abfällt. Die Ausgangsposition wird meistens nicht völlig, aber annähernd erreicht (vgl. Abbildung 6.1), wobei aber der Anstieg der Auslenkung bei Kraftbeginn einem anderen Funktionsverlauf folgt als die Relaxation nach Kraftende. In der Literatur wird diese Rückdeformation nach einer Auslenkung als Kriecherholung bezeichnet (Ferry 1980). Die Differenz zwischen Ausgangsposition und Endlage nach der Kriecherholung ist dabei ein Maß, wie sehr die Deformationsarbeit gespeichert bzw. dissipiert wurde.

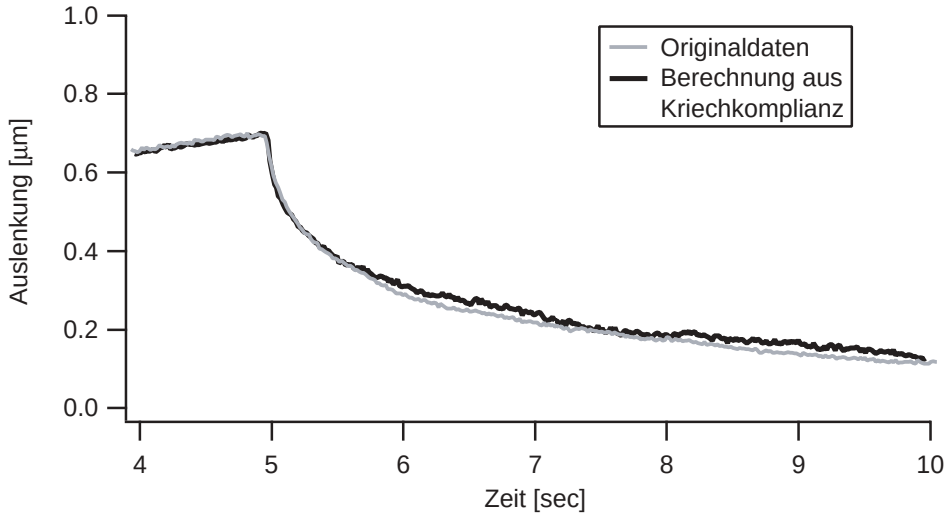


Abbildung 7.7: Kriecherholung nach einer Auslenkung. Die gemessene Kurve (grau) stimmt sehr gut mit der modellierten Kurve (schwarz) überein, die nach Gleichung (7.2) aus der Kriechkomplianz einer anderen Messung doppelter Länge berechnet wurde.

Für einen Rechteckpuls, der zur Zeit t_0 beginnt und zur Zeit $t = t_1$ endet, vereinfacht sich die Grundgleichung (5.1b), da nur bei den Zeiten t_0 und t_1 die zeitliche Änderung der Kraft von Null verschieden ist. Die Gleichung lautet dann (vgl. Abschnitt 5.1.2)

$$x(t) = F_0 \left[J(t - t_0) - J(t - t_1) \right] \tag{7.2}$$

mit $J(t) = 0$ für $t < t_0$. In Abbildung 7.6 ist diese Gleichung graphisch dargestellt, wobei zur Vereinfachung $t_0 = 0$ gesetzt wurde. Nach dem Ende der Kraft stellt sich die beobachtete Auslenkung als Summe der Auslenkungen zweier konstanter Kräfte $F_1 = F_0$ und $F_2 = -F_0$ dar, die jedoch nicht zur gleichen Zeit begonnen haben. Die Kriecherholung hat also a priori nicht den gleichen Verlauf in negative Richtung wie die positive Auslenkung durch die angelegte Kraft bei $t = 0$. Ein solches symmetrisches Verhalten tritt nur auf, wenn die Kriechkomplianz für lange Zeiten einen konstanten Gleichgewichtswert J_{GG} annimmt, wie es z.B. näherungsweise bei Experimenten mit der Magnetischen Pinzette an Fibroblasten der Fall ist (Ziemann 1997, Bausch et al. 1998).

Experimentelle Umsetzung

Um die Kriecherholung im Experiment mit der theoretischen Erwartung zu vergleichen, ist es notwendig, bei einer Kugel zwei Pulse gleicher Kraft, aber unterschiedlicher Länge t_1 und t_2 ($t_1 < t_2$) zu beobachten. Der längere Puls P_2 dient dabei zur Modellierung des Relaxationsprozesses beim kürzeren Puls P_1 nach dem Abschalten der Kraft. Dazu wird aus P_2 der um das Zeitintervall t_1

(Ende von P_1) verschobene Puls $P_2' = P_2(t - t_1)$ gebildet. Subtrahiert man von P_2 den verschobenen Puls P_2', die beide in Abbildung 7.6 als gestrichelte Linien skizziert sind, so sollte man den Verlauf des Pulses P_1 nach der mathematischen Vorschrift der Gleichung (7.2) simulieren können. Tatsächlich lässt sich dies auch im Experiment zeigen: Der Vergleich einer gemessenen mit einer modellierten Kriecherholung ist in Abbildung 7.7 dargestellt. Die Daten des Experiments (graue Linie) werden durch die berechnete Kurve (schwarze Linie) sehr gut wiedergegeben. Die Kriecherholung bei Endothelzellen lässt sich also auf die lineare Grundgleichung (5.1b) zurückführen, auch wenn der Anstieg der Auslenkung bei Kraftbeginn eine andere Form besitzt als die Relaxation der Kriecherholung.

Da die Kriecherholung offensichtlich durch die Gleichung (5.1b) und (7.2) sehr gut beschrieben wird, ist es auch möglich, aus der experimentellen Bestimmung eines Pulses der Länge t_1 die Kriechkomplianz für ein Zeitintervall der Länge $2t_1$ zu bestimmen, da sich Gleichung (7.2) für Zeiten $t > t_1$ auflösen lässt zu

$$J(t) = \frac{x(t) + F_0 J(t - t_1)}{F_0}. \tag{7.3}$$

Dies ist gerade das umgekehrte Vorgehen wie bei dem oben beschriebenen Modellierung eines kurzen Pulses P_1 durch einen zweiten längeren Puls P_2. Eine solche Rechnung war in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nötig, da die Kriechkomplianz auch für lange Zeiten direkt durch eine Kraft bestimmt werden konnte. Theoretisch könnte auf diese Weise auch für noch größere Zeiten die Kriechkomplianz bestimmt werden. Allerdings addieren sich dabei auch die Messfehler, so dass dieses Verfahren relativ ungenaue Werte liefert.

7.3 Viskoelastische Antwort auf Treppenpulse

Eine Erweiterung der Experimente zur Kriecherholung stellt ein Kraftprofil mit mehr als zwei aufeinanderfolgende Kraftänderungen dar, wie sie z.B. bei einem Treppenpuls auftreten. Dabei bedeutet Treppenpuls die wiederholte Änderung der anliegenden Kraft um einen Betrag ΔF (oder $-\Delta F$) nach einem Zeitintervall Δt. Ein Beispiel eines solchen Treppenpulses ist in Abbildung 7.8 dargestellt. Die Treppenfunktionen, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, bestehen immer aus 6 äquidistanten Stufen gleicher Länge, die die Kraft schrittweise bis zum Maximalwert $6 \cdot \Delta F$ steigern und anschließend wieder schrittweise auf null absenken. Die Auslenkung der Kugel durch so ein treppenförmiges Kraftprofil ist der Antwort auf einen Dreieckpuls nicht unähnlich (vgl. Abb. 7.1B), was nicht verwundert, da das Dreieck als Treppenfunktion mit infinitesimal kleinen Stufen genähert werden kann. Auch bei den Treppenpulsen beginnt die Auslenkung langsam und steigt dann mit zunehmender Kraft stark an. Besonders erwähnt werden sollen die Reaktionen der Kugel bei wieder kleiner werdenden Kräften.

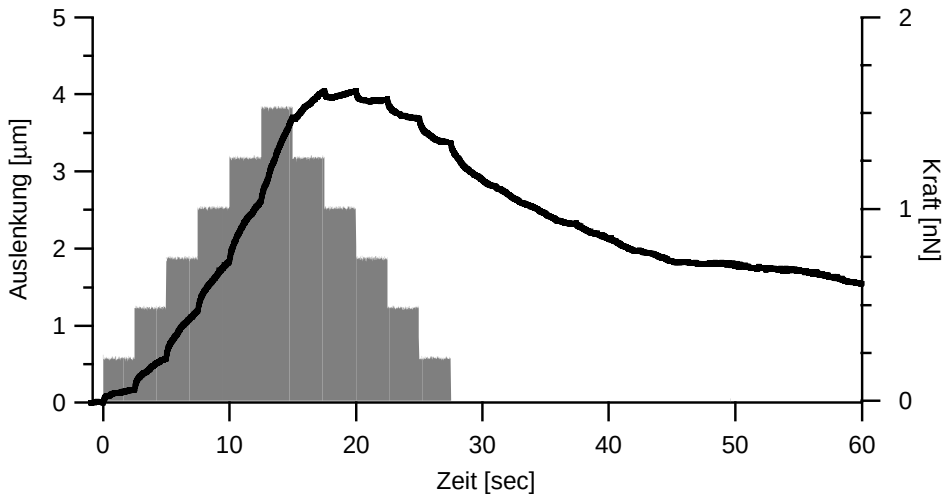


Abbildung 7.8: Beispiel der Auslenkung durch einen Treppenpulses. Die Auslenkung der Kugel ist schwarz dargestellt, die Kraftinformation ist grau hinterlegt. Die Länge einer Stufe ist 2,5 sec.

Bei einer Abnahme der Stufe reagiert die Kugel zunächst elastisch, die Auslenkung nimmt kurzzeitig etwas ab. Anschließend zeigen sich wieder viskose Beiträge des Zellkortex, die Auslenkung vergrößert sich erneut, da immer noch eine Kraft anliegt. Auch hier zeigt sich, ähnlich den Experimenten mit Dreieckpulsen, die viskoelastische Natur der untersuchten Zellmembranen.

Analog zum Beispiel der Kriecherholung lässt sich die Auslenkung einer Kugel durch einen Treppenpuls als Summe von zeitlich zueinander verschobenen Kriechkomplianzen beschreiben, wie es im Abschnitt 5.1.3 beschrieben ist. Für den ansteigenden Teil eines Treppenpulses ist diese Summe in Abbildung 7.9 skizziert. Die angelegte Kraft kann als Summe von 6 Kraftpulsen konstanter Stärke (verschieden graue Flächen) verstanden werden, die zeitlich zueinander um Δt_i verschoben sind. Die experimentelle Auslenkung der Kugel (schwarze Linie) aufgrund der resultierenden Treppenkraft setzt sich zusammen aus den 6 Einzelpulsen (gestrichelte Linien), die die 6 einzelnen Kraftpulse hervorrufen. Gilt die Theorie der linearen Viskoelastizität, so ist es nach Gleichung (5.11) möglich, aus der Auslenkung einer Kugel durch einen Treppenpuls rekursiv die zugrunde liegende Kriechkomplianz des Systems zu bestimmen, die der Auslenkung einer konstanten Scherkraft $F = 1 \cdot \Delta F$ entspricht. Wie in den vorhergehenden Abschnitten kann durch den Vergleich der so rekursiv berechneten mit einer gemessenen Kriechkomplianz die Gültigkeit der Linearität getestet werden.

Ist die lineare Theorie nicht mehr anwendbar, so kann sich das bei der Rekursionsberechnung auf zwei verschiedene Arten zeigen: Reagiert der Aktinkortex auf die stärker werdende äußere Belastung ab einem Punkt t weicher als zu Beginn des Treppenpulses, steigt die berechnete Kriechkomplianz bei diesem Zeitpunkt

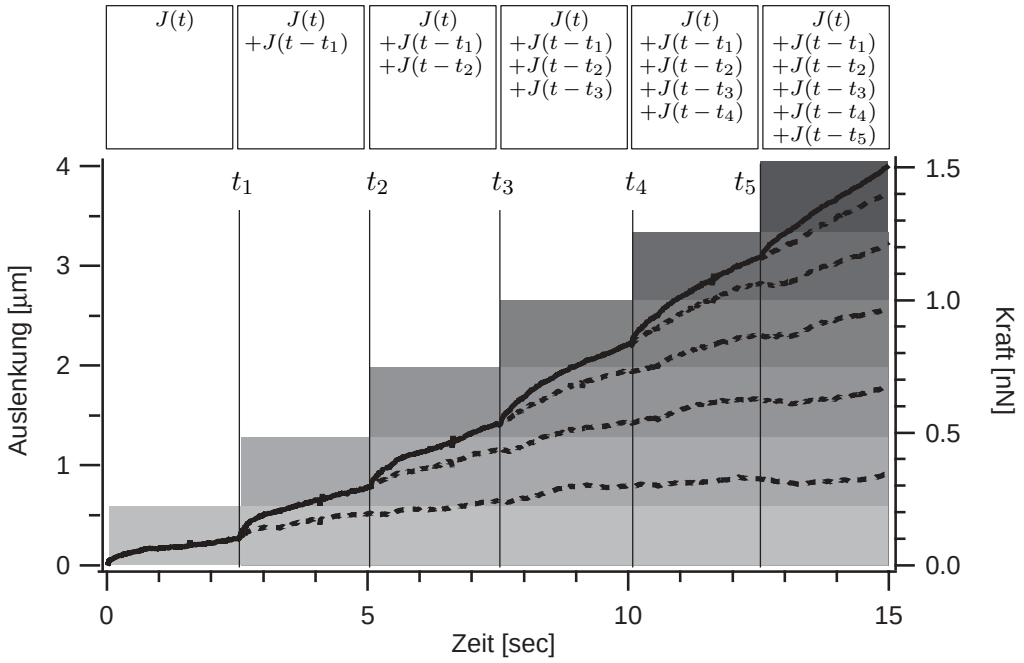
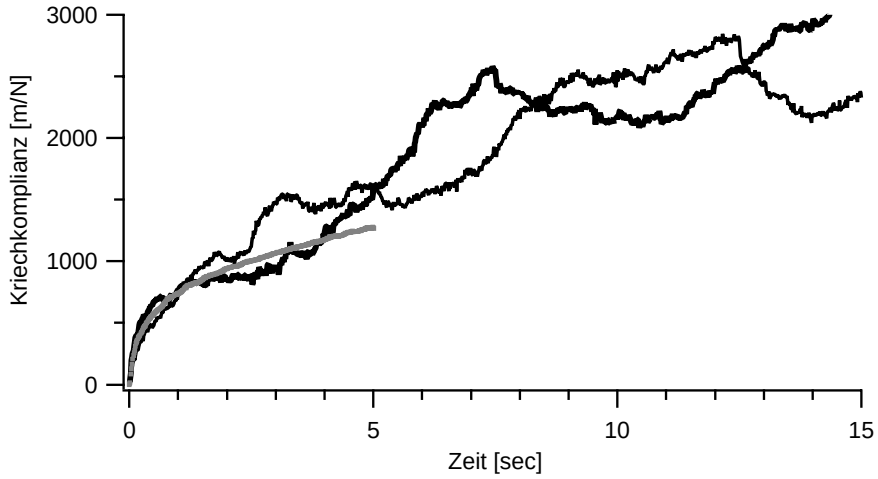


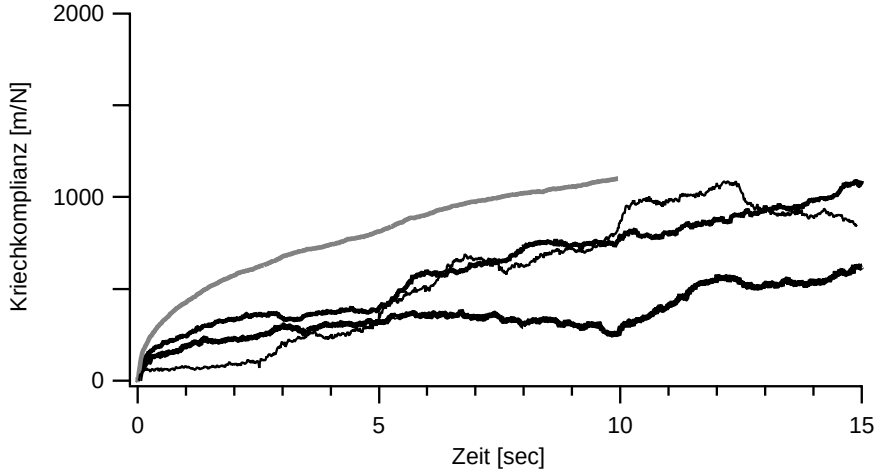
Abbildung 7.9: Die Auslenkung einer Magnetkugel durch einen Treppenpuls lässt sich zerlegen in Einzelbeiträge, die bei jeder Kraftänderung (t_i) beginnen. Die Kraft (graue Fläche) kann als Überlagerung von gegeneinander verschobenen Kraftpulsen mit konstanter Amplitude verstanden werden (unterschiedliche Grautöne). Die Auslenkungen durch jeden einzelnen dieser Pulse (gestrichelte Linien) addieren sich zur Gesamtauslenkung (schwarze Linie).

stark an. Das Gegenteil ist der Fall, wenn die Zelle im Verlauf der Messung steifer auf die ansteigende Kraft reagiert: die Kriechkomplianz würde scheinbar wieder kleiner werden, die berechnete Kriechkomplianz würde eine negative Steigung besitzen. Eine solche negative Steigung bedeutet physikalisch, dass eine Deformation bei fortdauernder Kraft wieder abnehmen würde. Da das physikalisch nicht sinnvoll ist, muss in diesem Fall der lineare Zusammenhang, der zur Berechnung der Komplianz verwendet wurde, ungültig sein.

Die Genauigkeit der durch Gleichung 5.11 berechneten Kriechkomplianz muss allerdings mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden. Die Auslenkungen der Kugeln vor allem zu Beginn des Treppenpulses sind vergleichsweise klein und können weniger als 50 nm betragen. Die relative Genauigkeit der Ortsbestimmung der Kugeln ist damit deutlich kleiner im Vergleich zu den typischen Auslenkungen von z.T. weit mehr als 100 nm, die im Kapitel 6 verwendet wurden (vgl. auch das Rauschen der normierten Auslenkungen verschiedener Kräfte in Abbildung 6.3B). Da diese erste, geringe Auslenkung bei der Rekursionsberechnung aber in alle Daten zu späteren Zeiten eingeht, überträgt sich diese Ungenauigkeit durch die Gaußsche Fehlerfortpflanzung ebenfalls auf die Werte zu größeren Zei-



A Lineare Viskoelastizität gültig



B Komplianz von Rechteckpuls verschieden

Abbildung 7.10: Die aus dem Anstieg von Treppenpulsen nach Gleichung 5.11 berechneten Kriechkomplianzen (schwarze Linien) verglichen mit direkten Messungen aus Experimenten mit konstanter Kraft (graue Linien). Im oberen Beispiel weicht die berechnete Kriechkomplianz im Rahmen der Messgenauigkeit nicht von der gemessenen ab. Im Gegensatz dazu treten im unteren Beispiel systematische Abweichungen auf.

ten und steigt sogar noch geringfügig an. Schätzt man die relative Unsicherheit der ersten Stufe mit 25nm/100nm= 25% ab (vgl. Abschnitt 4.2), so erhält man im weiteren Verlauf der Rechnung eine Ungenauigkeit von 30%. Dieser Messfehler ist deutlich größer als die Unsicherheit von maximal 10%, mit der die Auslenkungen im Kapitel 6 behaftet waren.

In Abbildung 7.10 sind einzelne Beispiele von Komplianzen dargestellt, die durch die Rekursion bestimmt wurden, und die mit experimentellen Kriechkomplianzen aus Messungen mit konstanter Kraft verglichen werden. Diese gemesse-

nen Kriechkomplianzen sind meist nicht über den vollen Zeitraum der Messung des Treppenpulses verfügbar, sie sind in der Abbildung deshalb kürzer dargestellt als die berechneten Kurven. Allerdings ist ein Vergleich zwischen diesen Kurven immer noch gut möglich. Generell sind die Ergebnisse der rekursiven Berechnungen sehr verschieden und wegen des schlechten Verhältnisses von Ortsauflösung zu Auslenkung stark verrauscht. Trotzdem können in den Experimenten grob einige charakteristische Fälle unterschieden werden.

Auch bei Treppenpulsen können Beispiele linearen Verhaltens gefunden werden. Ein solches zeigt Abbildung 7.10A: Die beiden Komplianzen, die aus den Treppenpulsen berechnet wurden, sind im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbar und stimmen zu Beginn auch mit der Kriechkomplianz überein, die durch eine konstante Kraft bestimmt worden ist. Ob die im Verlauf der berechneten Kriechkomplianz auftretenden starken Fluktuationen in der Ungenauigkeit der Kurve begründet sind oder durch nicht-lineares Verhalten der Probe, ist nicht zu unterscheiden. Die Stufenlänge in diesem Beispiel beträgt 2,5 sec, es handelt sich dabei um das Experiment, das in Abbildung 7.8 dargestellt ist.

Eine andere, große Gruppe der Experimente mit Treppenpulse bilden solche, deren berechnete Komplianzen deutlich von der gemessenen abweicht, die aber im Rahmen der Messgenauigkeit trotzdem reproduzierbare Ergebnisse liefern. Ein Beispiel einer solchen Kurve ist in Abbildung 7.10B gezeigt. Die berechneten Komplianzen sind zwar monoton steigende Funktionen, steigen aber deutlich langsamer an als die direkt gemessene Komplianz. Ein solches Verhalten kann vor allem, aber nicht ausschließlich, bei Stufenlängen von mehr als 5 sec Dauer beobachtet werden. Auffällig ist auch, dass oft der erster Puls einer Serie den typischen schnellen Anstieg beim Einsetzen der Kraft zeigt, wie man ihn aus den Experimenten mit konstanter Kraft erwarten würde, spätere Pulse der Serie an derselben Kugel hingegen eine deutlich langsamere Reaktion aufweisen, wie es in Abbildung 7.10B zu sehen ist.

Konsistent mit den Erwartungen aus der linearen Viskoelastizität ist bei den Treppenpulsen das Verhalten der Deformation, wenn die Kräfte wieder abnehmen. Ein Beispiel ist in Abbildung 7.11 gezeigt. Kurz vor dem Ende einer Treppenstufe nimmt die Deformation eine annähernd lineare Steigung an, wie es bei einer Auslenkung durch eine lange, konstante Kraft zu erwarten ist. Die Steigung dieses viskosen Fließens ist ein Maß für die Viskosität η_0, die das Verhalten bei langen Zeiten wiedergibt, und sollte bei unterschiedlichen Kräften verschieden groß sein, wenn sich η_0 nicht ändert. Tatsächlich ist eine solche Änderung der Steigung am Ende eines jeden Treppenpulses in Abbildung 7.11 zu beobachten, wie die Linien zeigen, die der Endsteigung bei jeder Kraftstufe angenähert sind. Im Verlauf der Kraftabnahme tritt keine positive Endsteigung mehr auf (z.B. letzte Stufe in Abbildung 7.11), da die äußere Kraft so klein geworden ist, dass die elastischen Eigenschaften die Kugelauslenkung dominieren.

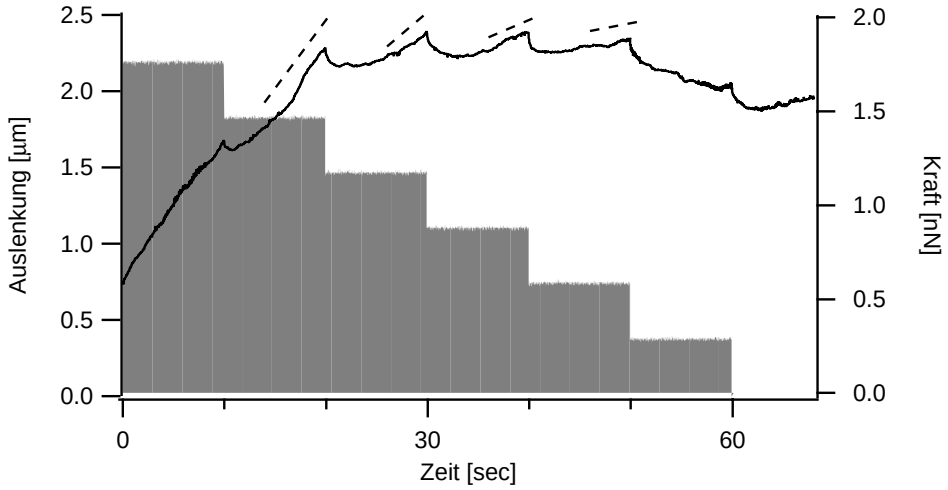


Abbildung 7.11: Bei abnehmender äußerer Kraft nimmt die lineare Steigung der Auslenkung am Ende einer jeden Treppenstufe ab.

7.4 Diskussion

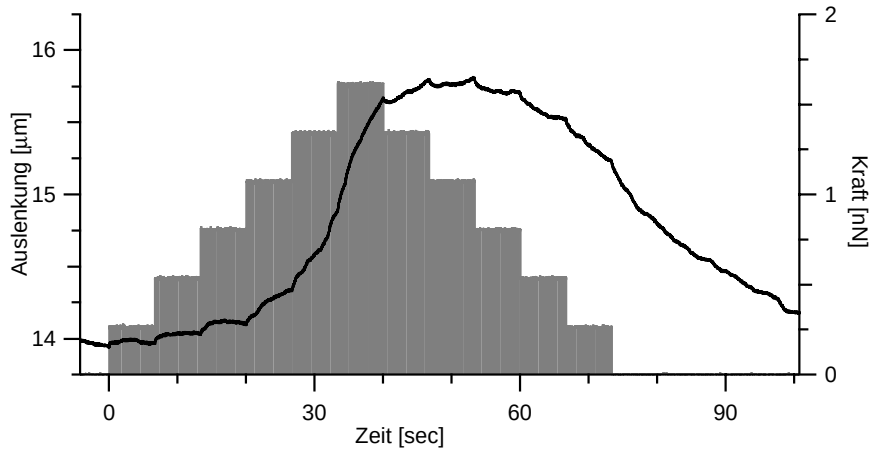
In diesem Kapitel wurde erstmals untersucht, ob die Beschreibung einer Zellhülle als linearer viskoelastischer Körper auf die Anwendung von Scherkräften mit beliebigen Profilen ausgedehnt werden kann. Der Verlauf der Scherkräfte wurde dabei entweder langsam und kontinuierlich variiert (Dreieckpuls), oder kurzzeitig zweimal (Rechteckpuls) bzw. öfter (Treppenpuls) verändert, um so das Verhalten der Zellen auf unterschiedliche Belastungen zu testen. Für Zeiten unterhalb einer Beobachtungszeit von 30 sec kann die Gültigkeit des linearen Verhaltens bestätigt werden, die im Kapitel 6 formuliert wurde. Die hier neu entwickelten Methoden sind dabei nicht auf die Untersuchungen von Zellen beschränkt, sondern lassen sich auch auf Experimente mit anderen viskoelastischen Substanzen (z.B. Aktin) anwenden.

Am eindrucksvollsten gelingt die Anwendung der Theorie der linearen Viskoelastizität in der Beschreibung der Deformation durch Dreieckpulse. Die Auslenkungen lassen sich durch Gleichung (5.1b) hervorragend wiedergeben. Die zunächst auftretende Diskrepanz zwischen Experiment und Theorie kann durch den experimentelle Gegebenheiten der verwendeten Magnetspule erklärt werden. Wenn diese in der theoretischen Rechnung korrekt berücksichtigt werden, zeigt die experimentell bestimmte und die berechnete Auslenkung den gleichen Verlauf, wie in Abbildung 7.5B zu sehen ist. In der Deformation des Aktinkortex der Endothelzellen durch eine langsam steigende Kraft entfaltet sich deutlich die viskoelastische Natur des Systems: dessen Verhalten wird zu Beginn der Auslenkung viskos dominiert, wenn die Deformation langsam, quadratisch ansteigt; im späteren Verlauf des Pulses werden aber deutlich elastische Beiträge sichtbar,

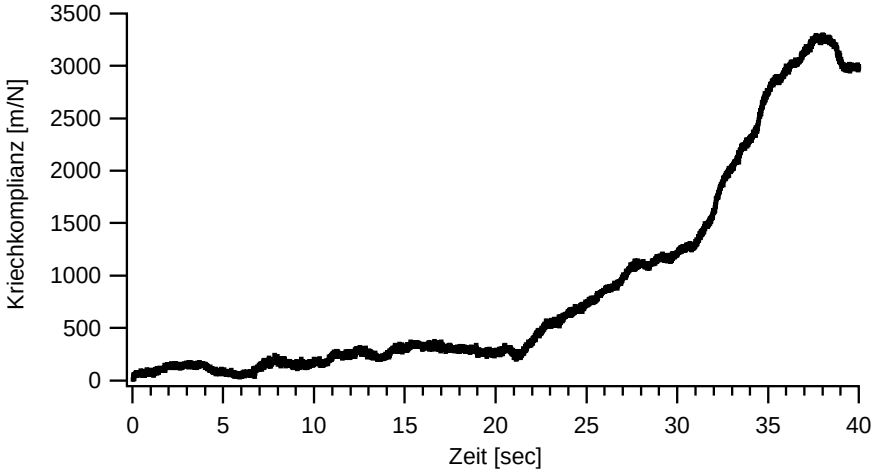
wenn die Deformation fast linear mit der Kraft zunimmt. Nach aktuellem Kenntnisstand wurden Experimente mit Dreiecksprofilen hier erstmalig durchgeführt, ein Vergleich mit anderen Arbeiten kann nicht durchgeführt werden.

Auch die Kriecherholung, die bereits in früheren Arbeiten bei verschiedenen Zelltypen untersucht worden ist (Bausch et al. 1998, Bausch et al. 2001), kann durch Gleichung (5.1b) hervorragend verstanden werden. Zwar gleichen sich bei den hier vorgestellten Experimenten an Endothelzellen die Auslenkung bei Kraftbeginn und die Kriecherholung nach dem Kraftende nicht; es ist jedoch zur Beschreibung der Kriecherholung nicht nötig, ein vergleichsweise kompliziertes mechanisches Modell zu verwenden, das sich bei Auslenkung und Kriecherholung in zwei verschiedenen Zuständen befindet, wie es Bausch et al. (2001) bei der Kriecherholung von Endothelzellen vorgeschlagen haben, um diese veränderte Form zu erklären. Zur korrekten Beschreibung der Kriecherholung bei Endothelzellen muss, wie in Abschnitt 5.1.2 erläutert, das Pulsende als neue Spannungsänderung $\dot{\sigma} = -\sigma/\tau$ angenommen werden, deren Antwort zur ersten Spannungsänderung bei Kraftbeginn addiert wird. Durch diese zeitlich gegeneinander verschobene Summe kann die Kriecherholung befriedigend modelliert werden, wie es in Abbildung 7.6 demonstriert wurde. Diese Addition ist zur Modellierung von Experimenten mit Fibroblasten nicht nötig. Bei diesem Zelltyp kann die Kriecherholung einfach als Spiegelung der Auslenkung an der x-Achse beschrieben werden (Bausch et al. 1998). Tatsächlich nimmt die Kriechkomplianz der Zellhülle von Fibroblasten für lange Zeiten in erster Näherung einen konstanten Wert an (Ziemann 1997), die Kriecherholung erhält dann eine einfachere Form (vgl. Ferry 1980). Im Gegensatz dazu besitzt die Kriechkomplianz von Endothelzellen auch für lange Zeiten einen deutliche, von null verschiedene Steigung, weshalb die Kriecherholung nur durch Gleichung 7.2 wiedergegeben werden kann.

Durch wiederholtes Anwenden dieser zeitlich verschobenen Addition sollte es prinzipiell auch möglich sein, die Auslenkung aufgrund von Treppenpulsen durch die Theorie der linearen Viskoelastizität wiederzugeben. Problematisch ist im Fall der Treppenpulse die relative Ungenauigkeit von bis zu 30%, mit der die Kriechkomplianz bestimmt werden kann. Trotzdem ist es in einigen Fällen möglich, lineares viskoelastisches Verhalten zu identifizieren. Allerdings treten bei den Deformationen des Aktinkortex durch die Treppenpulse sehr oft Abweichungen von den theoretischen Erwartungen auf. Zwar kann es dafür verschiedene Gründe geben: sehr wahrscheinlich ist, dass die Anwendung lang andauernder Kräfte wie es Treppenpulsen sind (die kürzesten Treppenpulse mit einer Stufendauer von 2,5 sec haben eine Gesamtlänge von 27,5 sec), zu einer mechanischen Stimulation der Zellen führt. Diese können aktiv durch Umorganisation des Zytoskeletts oder Aktivierung von Motorproteinen auf eine externe Störung reagieren, wie es schon von anderen Autoren berichtet wurde (vgl. Abschnitt 10.3). Bei einer solchen aktiven Reaktion wäre eine lineare Beschreibung nicht mehr möglich, da sich der betrachtete Körper im Laufe der Messung verändert. Ein Indiz für eine Reaktion ist die Tatsache, dass es in einigen Fällen möglich ist, ein lineares Verhalten beim



A Treppenpuls mit ungewöhnlich starker Auslenkung



B Berechnete Komplianz für dieses Beispiel

Abbildung 7.12: Dieses Beispiel zeigt ein ungewöhnliches Verhalten der Auslenkung durch einen Treppenpuls. Die Kriechkomplianz, die nach Gleichung 5.11 berechnet wurde und im unteren Teil der Abbildung gezeigt ist, zeigt nach 20sec einen starken Anstieg als ob plötzlich ein viskoser Fluss einsetzen würde. Allerdings ist diese Auslenkung reversibel wie im oberen Teil der Abbildung zu erkennen ist.

ersten Puls einer Pulsserie zu messen, alle weiteren Pulse dann jedoch ein nichtlineares Verhalten aufweisen. Um aktives Antwortverhalten direkt zu messen, wäre eine Kombination der Magnetischen Pinzette mit Fluoreszenzmikroskopie denkbar.

Ein spezielles Beispiel einer Auslenkung durch einen Treppenpuls soll hier noch erwähnt werden, das in keine der beiden oben definierten Gruppen passt. In Abbildung 7.12 ist sowohl die Auslenkung durch den Treppenpuls dargestellt, als auch die daraus berechnete Kriechkomplianz. Die Komplianz steigt in die-

sem Beispiel zunächst kaum an, nach ungefähr 20 Sekunden setzt jedoch eine deutliche Änderung im Verhalten ein, die Kugelauslenkung nimmt plötzlich rapide zu und der Verlauf ähnelt fast einem Fließen. Allerdings handelt es sich bei der schnellen Zunahme der Kugelauslenkung nicht um ein irreversibles, viskoses Verhalten. Schon die kleinen Relaxationen bei der stufenweisen Abnahme der Kraft zeigen, dass im System auch elastische Elemente vorhanden sind und wie in Abbildung 7.12A zu erkennen, ist der vermeintliche Fluss beinahe völlig reversibel. Die Kugel kehrt fast vollständig in ihre Ausgangslage zurück. Ein solches Verhalten, das bisher allerdings nur einmal beobachtet werden konnte, zeigt die komplexen mechanischen Eigenschaften einer Zelle.

Vergleicht man die hier präsentierten Experimente der Treppenpulse an Endothelzellen mit ähnlichen Experimenten, die an Makrophagen durchgeführt wurden (Vonna et al. 2003), so treten bei den beiden Zellarten einige Parallelen, aber auch charakteristische Unterschiede im viskoelastischen Verhalten auf. In den Experimenten mit Makrophagen wurde eine anfänglich konstante Kraft schrittweise erniedrigt. Nach der ersten Verringerung der Kraft nimmt die Kugelauslenkung zunächst elastisch ab, nach 30 bzw. 15 Sekunden (erste und zweite Stufe) beginnt aber wieder eine Zunahme der Auslenkung. Ein ähnliches Verhalten ist in den Experimenten mit Endothelzellen ebenfalls zu erkennen (Abbildung 7.11). Im Gegensatz zu den Makrophagen tritt der erneute Anstieg der Auslenkung allerdings bereits nach wenigen Sekunden auf, wofür es eine einfach Erklärung geben könnte: Im Fall der Endothelzellen nimmt die Kraft jeweils nur um 1/6 der Gesamtkraft ab, Vonna et al. (2003) verringern die Kraft bei jeder Stufe um die Hälfte, was die unterschiedlichen Zeiten der neuerlichen Auslenkung begründen kann. Ein fundamentaler Unterschied zu den Messungen an Makrophagen besteht jedoch in der Geschwindigkeit, mit der die Auslenkung wieder zunimmt, nachdem die Kraft erniedrigt wurde. Bei Makrophagen wird, unabhängig von der anliegenden Kraft, die gleiche Endgeschwindigkeit erreicht, bei den Endothelzellen nimmt diese proportional zur anliegenden Kraft ab, wie in Abbildung 7.11 zu erkennen ist. Dort skaliert die finale Steigung kurz vor der erneuten Spannungsänderung mit der angelegten Kraft, wie es aus der linearen Viskoelastiziät zu erwarten ist. Bei dem Vergleich der beiden Zellarten muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei dem beobachteten Verhalten um völlig unterschiedliche Prozesse handelt: bei den Endothelzellen wird die Zellschale durch eine externe Kraft deformiert, hingegen induziert bei den Makrophagen die anliegende Kraft das Wachstum von langen, konusförmigen Ausstülpungen (sog. Philopodien), die sich aus den Makrophagen herausbilden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Beschreibung der Deformation einer Zellhülle durch beliebige Kraftprofile kurzer Dauer (< 30 sec) mit Hilfe der linearen Viskoelastizität sehr gut möglich ist. Überschreitet die Belastung diesen zeitlichen Rahmen, müssen aktive Reaktionen und damit nichtlineares Verhalten erwartet werden.

Kapitel 8

Die Eigenschaften des Deformationsfeldes des Aktinkortex

Wird ein Festkörper durch eine Punktkraft deformiert, wirkt sich diese lokale Störung auch auf deren Umgebung aus. Man kann eine mit zunehmendem Abstand kleiner werdende Ausbreitung der lokalen Störung auch in einiger Entfernung des Punktes beobachten, an dem die Kraft angreift (der ohne Einschränkung als Ursprung des Koordinatensystems angenommen werden kann). Ein solches kooperatives Verhalten erwartet man auch bei viskoelastischen Körpern, da diese zumindest teilweise Festkörpereigenschaften besitzen. Ein Deformationsfeld (engl. *strain field*) kann z.B. in leicht vernetzten F-Aktinlösungen (Schmidt et al. 1996) und bei Fibroblasten mit Hilfe kolloidaler Partikel (Sonden) beobachtet werden (Ziemann 1997, Bausch et al. 1998). Bei Endothelzellen ist jedoch eine Messung des Deformationsfeldes bisher nicht gelungen (Bausch 2000). Die Kenntnis des Deformationsfeldes ist aus verschiedenen Gründen von Interesse: Anhand des Abfalls, mit dem die induzierte Auslenkung mit zunehmender Entfernung vom Ursprung abnimmt, lassen sich theoretische Modelle für die Deformation des Aktinkortex überprüfen (Boulbitch 1999). Solche Modelle ermöglichen die Bestimmung von Absolutwerten der viskoelastischen Module des Zellkortex, da sie entscheidend von geometrischen Faktoren abhängen, die so gemessen werden können (vgl. Abschnitt 5.3.1).

Um die Ausbreitung einer lokalen Störung als Deformationsfeld sichtbar zu machen, können bei der Magnetischen Pinzette neben den Magnetkugeln auch unmagnetische Sondenpartikel mit Integrin-bindenden Molekülen beschichtet und auf den Zellen adhäriert werden. Als Beschichtung können dabei verschieden Proteine verwendet werden, in den im folgenden beschriebenen Experimenten waren dies außer Fibronektin, mit dem die Magnetkugeln an die Zellen gebunden sind, das Protein Invasin 497 und Antikörper gegen bestimmte Integrin-Ketten (α_2-Integrin und α_3-Integrin). Eine kurze Beschreibung der Proteine ist

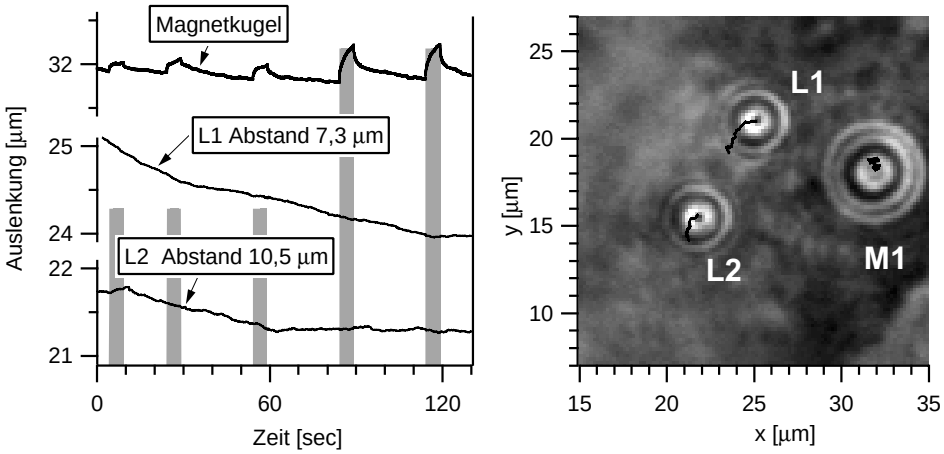


Abbildung 8.1: Rechts: Phasenkontrastaufnahme einer Zelle mit einer magnetischen (M1) und zwei unmagnetischen Kugeln (L1, L2). Links: x-Koordinate der Kugeln während Rechteckpulsen einer Stärke von 0,6 nN und 1,2 nN. Die unmagnetischen Kugeln im Abstand von 7,3 μm und 10,5 μm sind mit Fibronektin an die Kugel gebunden und zeigen keine induzierte Auslenkung.

im Abschnitt 1.3 zu finden, die Rezepturen der unterschiedlichen Kopplungen der Proteine an die Oberflächen der unmagnetischen Kugeln im Abschnitt 2.3. Die Magnetkugeln waren, wenn nicht anders angemerkt, in allen Experimenten über Fibronektin an die Magnetkugeln gekoppelt.

8.1 Messung des Deformationsfeldes

Die Experimente zur Visualisierung des Deformationsfeldes werden ähnlich durchgeführt wie die Experimente zur Bestimmung der Viskoelastizitätseigenschaften (vgl. Kapitel 6): die Magnetkugeln werden Kräften unterschiedlicher Stärke und Dauer ausgesetzt, gleichzeitig die Positionsänderungen von magnetischen und unmagnetischen Kugeln gemessen. Während in den Messungen zur Viskoelastizität nur die Auslenkung der Magnetkugel selbst von Interesse war, liegt nun die wesentliche Aufmerksamkeit darauf, ob unmagnetischen Kugeln, die zusammen mit den Magnetkugeln auf der Zelloberfläche adhäriert sind, ebenfalls eine Auslenkung erfahren, und wenn dies der Fall ist, wie diese Auslenkung von der Entfernung zur Magnetkugel und von der Bindungsart der unmagnetischen Kugel abhängt.

Vergleich der Beschichtungen der unmagnetischen Kugeln

Die unterschiedlich beschichteten Kugeln zeigen verschiedenes Bindungsverhalten an der Zelloberfläche. So lagern sich die mit Fibronektin beschichteten Kugeln oft

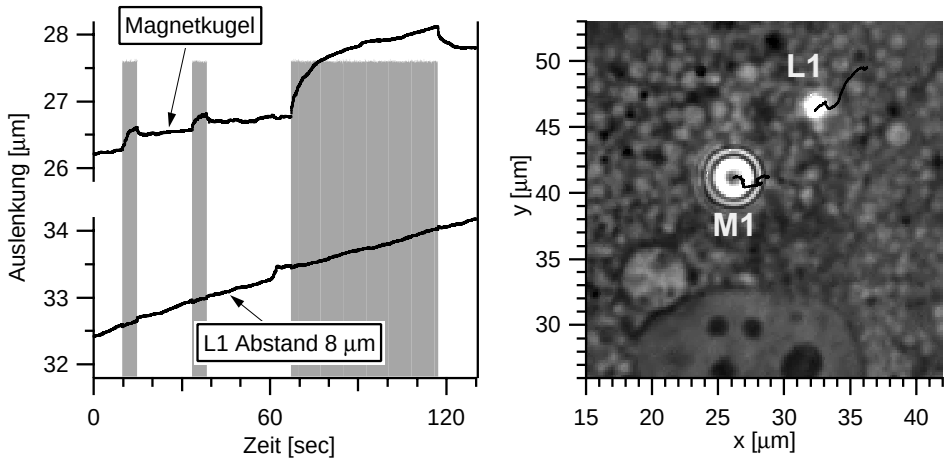


Abbildung 8.2: Rechts: Phasenkontrastaufnahme einer Zelle mit einer magnetischen (M1) und einer unmagnetische Kugel (L1), die mit α_2-Antikörper an die Zelle gebunden ist. Links: x-Koordinaten der Kugeln während Rechteckspulsen. Die unmagnetische Kugel zeigt keine Auslenkung, obwohl die Magnetkugel im Abstand von nur 5 μm ausgelenkt wird. Die Kraft beträgt 1,8 nN.

in Trauben aus mehreren Kugeln zusammen, und dies häufig in der direkten Umgebung der Magnetkugeln. Ein daraus resultierendes Problem ist, Bewegungen der nicht-magnetischen Partikel, die durch die Deformation der Zelle zustande kommen, von Bewegungen zu unterscheiden, die durch die sterische Verdrängung der sich berührenden Partikel vermittelt werden. Dieser Schwierigkeit kann nur begegnet werden, indem ausschließlich Experimente berücksichtigt werden, bei denen die Kugeln nicht direkt aneinander liegen, sondern immer ein gewisser (sichtbarer) Raum zwischen den Kugeln vorhanden ist. Ein Beispiel zeigt die Abbildung 8.1. Hier befinden sich die unmagnetischen Kugeln in Abständen von 7μm und 10,5 μm von der Magnetkugel auf der Zelloberfläche. Die hier geschilderten Probleme treten bei Invasin- und bei Antikörper-beschichteten Kugeln nicht auf. Im Gegensatz zu den Fibronektin-beschichteten Kugeln, liegen diese Kugeln immer in einer Entfernung von mindestens einem Kugeldurchmesser ($\varnothing = 4{,}5\,\mu$m), direkter Kontakt mit den Magnetkugeln wurde nie beobachetet.

In den Abbildungen 8.2 und 8.3 sind Beispiele von Experimenten dargestellt, bei denen die unmagnetischen Kugeln mittels Antikörper gegen Integrin mit α_2-Ketten (Abb. 8.2) und Invasin (Abb. 8.3) an die Zellen gebunden sind. Die Kugeln liegen in beiden Beispielen in vergleichbaren Entfernungen von der Magnetkugel (zwischen 5 und 10 μm), wie es auch in Abbildung 8.1 mit Fibronektin-beschichteten Kugeln der Fall ist. Das überraschende Ergebnis der Experimente ist, dass das Auftreten eines Deformationsfeldes davon abhängt, wie die unmagnetischen Partikel an die Zellen gebunden sind. Eine Ausbreitung der Deformation kann nur bei einer Kopplung der unmagnetischen Kugeln über Invasin beobachtet werden.

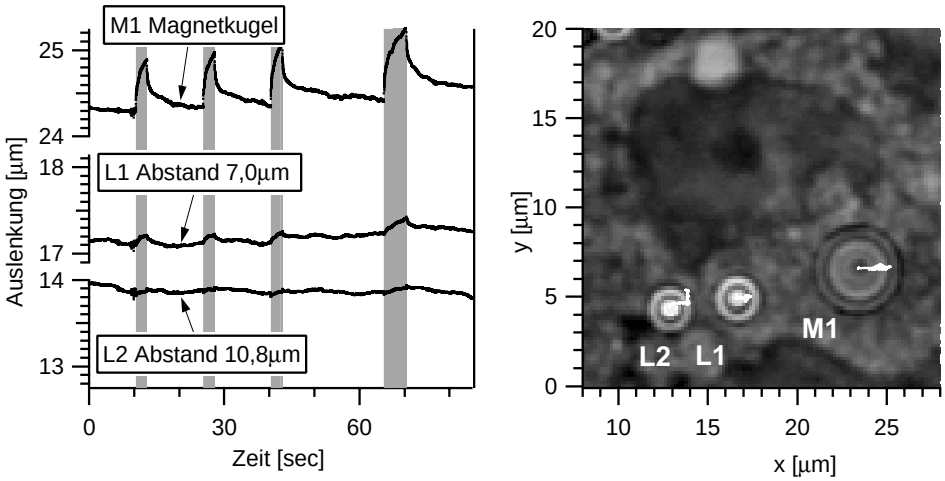


Abbildung 8.3: Rechts: Phasenkontrastaufnahme einer Zelle mit einer magnetischen (M1) und zwei unmagnetischen Kugeln (L1, L2), die mit Invasin an die Zelle gebunden sind. Rechts: x-Koordinaten der Kugeln. Im Gegensatz zu den beiden vorhergehenden Beispielen zeigt die eine der beiden unmagnetischen Kugeln eine Auslenkung. Die Distanz zur Magnetkugel beträgt 7 μm. Die zweite Kugel im Abstand von 10,8 μm zeigt dagegen keine Auslenkung. Die angreifende Kraft beträgt 2,7 nN.

Im Beispiel in Abbildung 8.3 zeigt die Kugel L1 im Abstand von 7 μm eine kleine, aber deutlich messbare Auslenkung, die durch die lokale Deformation der Magnetkugel induzierte wurde. Die zweite unmagnetische Kugel L2 im Abstand von 10,8 μm dagegen zeigt keine Reaktion auf das angelegte Magnetfeld. Bei einer Kopplung über Fibronektin oder Integrin-Antikörper kann dagegen keine Ausbreitung der lokalen Deformation beobachtet werden, auch nicht in unmittelbarer Umgebung (Entfernung von ca. 5 μm) der Magnetkugeln. Statt dessen zeigen die Trajektorien von Fibronektin und Antikörper-beschichteten Kugeln, dass sich diese Kugeln unabhängig von der äußeren Kraft auf der Zellmembran bewegen.

Abfall des Deformationsfeldes

Wie das Beispiel in Abbildung 8.3 bereits andeutet, kann ein Deformationsfeld auch bei der Beschichtung mit Invasin nicht in allen Fällen beobachtet werden. Es gibt eine Distanz, ab der auch bei dieser Kopplung keine Auslenkung der unmagnetischen Kugeln mehr beobachtet werden kann. In Abbildung 8.4 sind mehrere unmagnetische Kugeln auf einer Zelle gezeigt, die Auslenkungen der Kugeln sind als Pfeile in 10facher Vergrößerung dargestellt. Die unmagnetischen Kugeln in großem Abstand werden durch die Deformation der beiden Magnetkugeln nicht merklich ausgelenkt.

Um die Reichweite des Deformationsfeldes aus Experimenten an unterschied-

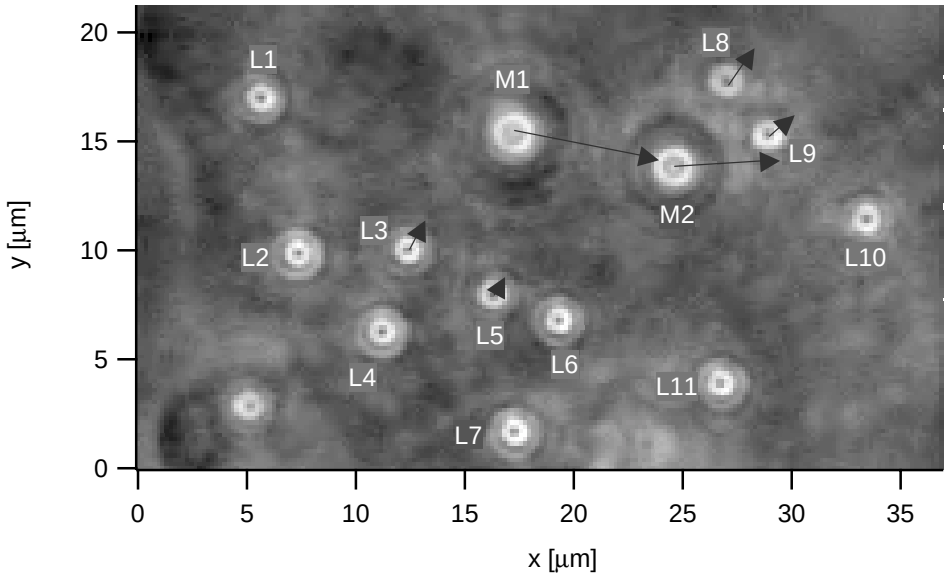


Abbildung 8.4: M1, M2: Fibronektin-beschichtete Magnetkugeln. L1 ... L11: unmagnetische mit Invasin-beschichtete Kugeln. Die Pfeile geben die Auslenkung durch die angreifende Kraft in 10facher Vergrößerung wieder. Die Kraft kann nicht angegeben werden, da die Magnetkugeln zu nahe beieinander liegen und sich deshalb beeinflussen. Eine Auslenkung der unmagnetischen Kugel L5 ist kaum noch messbar, bei L6 ist keine Auslenkung mehr zu detektieren.

lichen Zellen zu bestimmen, ist es nötig, das Deformationsfeld der einzelnen Experimente zu normieren, da durch die unterschiedliche Entfernung der Zellen zur Magnetkante verschiedene Kräfte auf die Magnetkugeln wirken und diese darum unterschiedliche Auslenkungen erfahren. Es wird deshalb die Auslenkung der Invasin-Kugeln durch die Auslenkung der jeweiligen Magnetkugel geteilt, um so das Deformationsfeld auf die Amplitude der lokale Scherung zu vereinheitlichen. Durch diese Normierung werden die Unterschiede der Auslenkungsamplituden korrigiert und es ist nun möglich, die verschiedenen Experimente miteinander zu vergleichen.

Trägt man diese normierte, *relative Auslenkung* der unmagnetischen Kugeln gegen den Abstand der Kugeln zur Magnetkugel auf, wie es in Abbildung 8.5 dargestellt ist, erkennt man deutlich, dass das Deformationsfeld relativ linear abfällt und ab einer Grenze von ca. 11 μm verschwindet. Passt man an die Daten eine Gerade an, erhält man eine Abschirmlänge von $r_c = 10{,}6 \pm 1{,}2\ \mu$m, ab der bei den unmagnetischen Kugeln keine Auslenkungen mehr zu beobachten sind. Im Vergleich dazu ist der Durchmesser einer Zelle ungefähr 50 μm. Allerdings zeigt Abbildung 8.5 auch einige Datenpunkte innerhalb dieser Abschirmlänge von 11 μm, bei der die unmagnetischen Kugeln keine Auslenkung zeigen. Bei genauer Betrachtung handelt es sich dabei jedoch nicht unbedingt um einen Widerspruch:

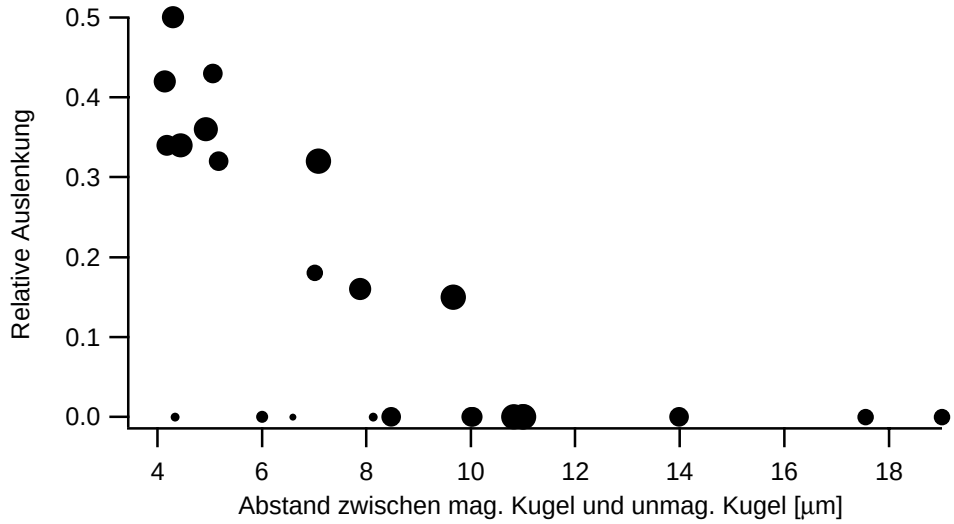


Abbildung 8.5: Abhängigkeit des Deformationsfeldes vom Abstand zur ausgelenkten Magnetkugel. Die Abbildung zeigt die Auslenkung von verschiedenen unmagnetischen Kugeln aus 8 Experimenten aufgetragen gegen den Abstand zur Magnetkugel. Die Auslenkungen der unmagnetischen Kugeln wurden jeweils auf die Auslenkung der Magnetkugel normiert. Die Größe der Punkte gibt die Auslenkung der Magnetkugeln wieder (von 0,1 μm bis 1,1 μm).

Bei allen diesen Experimenten ist die absolute Auslenkung der Magnetkugeln sehr klein ($< 0{,}3\,\mu$m), während sie sonst mindestens 0,6 μm betragen hat.

Wie in Abbildung 8.5 zu erkennen, beträgt die Auslenkung der unmagnetischen Kugel im Abstand von 5 μm von der Magnetkugel nur noch 30% der Auslenkung der Magnetkugel. Wird diese nur um 0,1 μm verschoben (das entspricht den kleinsten Punkten in der Abbildung 8.5) so ist eine mögliche Auslenkung der unmagnetischen Kugel mit 30 nm unterhalb der Ortsauflösung des *particle-tracking*-Algorithmus. Es ist also möglich, dass eine Auslenkung der unmagnetischen Kugeln nicht mehr detektiert werden kann, da die absolute Größe des Deformationsfeldes zu gering ist. Da also die Auslenkung der Magnetkugel auch einen gewissen Einfluss auf den Abfall der lokalen Deformation besitzt, ist sie in Abbildung 8.5 als Durchmesser der Datenpunkte dargestellt.

8.2 Vergleich von Invasin- und Fibronektin-beschichteten Magnetkugeln

Da die verschiedenen Bindungsproteine, mit denen die Kugeloberflächen beschichtet sind, an unterschiedliche Integrine in der Zellmembran koppeln können, könnte man intuitiv erwarten, dass eine Änderung der Beschichtungen auf der Ober-

fläche der Magnetkugeln auch veränderte Antwortkurven unter Krafteinwirkung zur Folge hat. Bestärkt wird diese Vermutung durch die Abhängigkeit des Deformationsfeldes von der Beschichtung der unmagnetischen Kugeln. Um den Sachverhalt genauer zu testen, wurden mehrere Beschichtungen zur Bindung der Magnetkugeln an die Zelloberfläche verwendet. Als spezifische Bindungspartner für Integrine wurden Fibronektin, Invasin und ein synthetisch hergestelltes Collagen IV[1] an die Tosylgruppe der Magnetkugeln gebunden. Eine unspezifische Bindung der Kugeln an die Zellmembran wurden mit NH^{3+} und Polylysin versucht.

Dabei entpuppen sich die HUVECs als recht wählerische Zellart. Nur durch eine Beschichtung mit Fibronektin und Invasin können die Kugeln an die Zellen gebunden werden, Kugeln mit einer anderen Beschichtung werden nicht gebunden[2], sondern diffundieren oberhalb der Zellen im Medium[3].

Der direkte Vergleich zwischen einer Bindung der Magnetkugeln durch Fibronektin und Invasin führt zu keinem signifikanten Unterschied in der Auslenkung der Kugel durch eine externe Kraft. Beide zeigen ein sehr ähnliches Verhalten, im Rahmen der generell auftretenden Unterschiede zwischen einzelnen Zellen können keine Einflüsse der Kugelbeschichtungen festgestellt werden.

8.3 Diskussion

Erstmals ist es in dieser Arbeit gelungen, die Reichweite des Deformationsfeldes einer Punktkraft bei Endothelzellen zu beobachten. Dabei fällt als erste Besonderheit auf, dass eine Beobachtung des Deformationsfeldes vom Kopplungsprotein abhängt, mit dem die unmagnetischen Sondenpartikel an die Zelloberfläche gebunden werden: Bei einer Bindung mit Fibronektin oder mit Integrin-Antikörpern sind keine Auslenkungen der Sondenpartikel zu beobachten, unabhängig von ihrer Nähe zur ausgelenkten Magnetkugel. Nur bei einer Bindung der unmagnetischen Kugeln durch Invasin ist eine Auslenkung sichtbar. Dies ist unabhängig von der Beschichtung der Magnetkugel, die in allen Fällen mit Fibronektin funktionalisiert ist. Zwei Möglichkeiten sind vorstellbar, warum mit Invasin ein Deformationsfeld detektierbar ist, mit anderen Kopplungen jedoch nicht:

Da das Auftreten eines Deformationsfeldes von den Eigenschaften des Aktinnetzwerkes abhängt (vgl. Kapitel 9), ist als erste Möglichkeit denkbar, dass der Kortex normalerweise aus kleinen, nur lose miteinander verknüpften Teilen (engl. *patches*) besteht. In diesem Fall würde die Amplitude des induzierten Deformationsfeldes sehr schnell abfallen. Ein Deformationsfeld wäre nicht mehr zu

[1] Das Collagen IV wurde von Barbara Sacca (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) synthetisiert und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

[2] Ungebundene Kugeln sind leicht durch ihre Brownsche Bewegung zu erkennen und von gebundenen zu unterscheiden.

[3] Dass dies tatsächlich eine Eigenheit der Endothelzellen ist, zeigen parallele Versuche von V. Laurent an Makrophagen. NH^{3+}-Kugeln binden problemlos an die Oberfläche dieser Zellen (Vonna 2002).

beobachten, wie es im Experiment bei der Kopplung der Sondenpartikel über Fibronektin und Antikörpern der Fall ist, weil keine Verbindung zwischen der Magnetkugel und den Sondenpartikeln besteht. Dagegen bewirkt das Protein Invasin, über das das Bakterium *Yersinia pseudotuberculosis* in eukariontische Wirtszellen eindringt, bei der Bindung an Integrine vermutlich eine Umorganisation des Aktinnetzwerks (Hamburger et al. 1999) bzw. eine verstärkte Polymerisation von Aktin (Wiedemann et al. 2001). Diese Umorganisation könnte den Aktinkortex so verändern, dass langreichweitige Verbindungen im Kortex auftreten, durch die sich eine lokale Störung ausbreiten kann. Deshalb ist ein Deformationsfeld durch Invasin-gebundene Kugeln sichtbar, während es mit Fibronektin-gebundenen Kugeln nicht existiert.

Es wäre als alternativer Mechanismus auch denkbar, dass ein Deformationsfeld grundsätzlich existiert, aber nur durch Invasin-beschichtete Kugeln beobachtet werden kann. Die Verknüpfung von Integrinen mit dem Aktinkortex ist ein komplexer Mechanismus. Die Bindung eines Integrins an einen extrazellulären, makromolekularen Bindungspartner führt nicht automatisch zu einer intrazellulären Reaktion des Integrins mit dem Aktinkortex (Miyamoto et al. 1995a, Miyamoto et al. 1995b). Es besteht dadurch die Möglichkeit, dass die mit Fibronektin oder Antikörpern beschichteten Kugeln zwar an die Integrine in der Zellmembran binden, diese jedoch keine Kopplung mit dem Aktinnetzwerk eingehen. Da Invasin eine höhere Affinität zu Integrin aufweist als Fibronektin (Hamburger et al. 1999), könnte die Bindung der Invasin-beschichteten Kugeln die Kopplung von Integrin an Aktin iniziieren, während dieser Effekt bei Fibronektin-beschichteten Kugeln ausbleibt. Das würde die Hypotese erklären, warum ein Deformationsfeld durch die lokale Störung immer auftritt, aber nur durch die Verwendung von Invasin-beschichteten Sondenpartikeln beobachtet werden kann.

Zusätzlich ist die Bildung von fokalen Adhäsionspunkten, bei denen eine Kopplung von Integrinen an den Kortex stattfindet, abhängig von der Größe der Adhäsionsfläche (Arnold et al. 2003). Es ist also möglich, dass die Fibronektin-beschichteten, unmagnetischen Sondenpartikel wegen ihrer geringen Bindungsaffinität zu klein sind, um durch ihre Bindung an Integrin die Bildung eines Fokaladhäsionspunkts zu verursachen, während dies durch die großen Magnetkugeln möglich ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung, dass die Fibronektin- und Antikörper-beschichteten Kugeln auf der Zelloberfläche unabhängig von äußeren Einflüssen transportiert werden, wie die Trajektorien der Kugeln in den Abbildungen 8.1 und 8.2 zeigen. Dieser Transport, der bei den Magnetkugeln nicht sichtbar ist, könnte bei einer Bindung an Integrine, die nicht an den Aktinkortex gekoppelt sind, durch Diffusion in der Zellmembran erklärt werden. Dass die Kugelgröße und damit die Adhäsionsfläche der Kugeln einen wesentlichen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat, zeigt das unveränderte Verhalten der großen Magnetkugeln, unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung durch Fibronektin oder Invasin. Durch beide Kugelbeschichtungen kann im Fall der Magnetkugeln eine Bindung an den Aktinkortex hergestellt werden, der

für die charakteristische Auslenkung der Kugeln verantwortlich ist, was bei den kleineren unmagnetischen Kugeln nicht unbedingt der Fall ist.

Welches der beiden oben skizzierten Szenarien die Situation in der Zelle besser wiedergibt, ist aus den Ergebnissen der hier vorgestellten Experimente nicht eindeutig festzustellen. Allerdings widerspricht die allgemeine Vorstellung vom Aktinkortex als formgebende, feste äußere Schale der ersten der beiden Möglichkeiten. Vermutlich ist es also die fehlende Kopplung der unmagnetischen Kugeln an den Aktinkortex, die das Deformationsfeld bei einer Bindung durch Antikörper und Fibronektin nicht sichtbar werden lässt.

Sind die unmagnetischen Kugeln durch eine Kopplung mit Invasin an die Zellen gebunden und dadurch das Deformationsfeld sichtbar, kann ein eindeutiges Verhalten beobachtet werden, wie in Abbildung 8.5 zu sehen ist. Die relative Auslenkung der unmagnetischen Kugeln nimmt mit zunehmendem Abstand zur Magnetkugel linear ab, bis sie bei einer Entfernung von $r_c = 10{,}6\ \mu$m ganz verschwindet. Die Größe r_c wird dabei als Abschirmradius (engl. *cut-off-radius*) bezeichnet. Dies ist ein völlig anderes Verhalten, als aus bisherigen Theorien und Modellen erwartet wurde:

In der theoretischen Behandlung einer dünnen elastischen Platte, auf die am Ursprung eine Punktkraft wirkt, fällt das Deformationsfeld dieser Störung logarithmisch ab, ist also auch in großer Entfernung von der lokalen Deformation nicht zu vernachlässigen (Landau und Lifschitz 1970). Diese Theorie wurde für Zellen erweitert ausgehend von der Annahme, dass der Zellkortex als homogene, zweidimensionale Schicht mit einer zweiten, darunterliegenden Schicht (der Zellunterseite) verbunden ist (Bausch et al. 1998, Boulbitch 1999). Durch diese Verbindung entsteht ein Deformationsfeld, das tatsächlich eine Abschirmlänge r_c aufweist, ab der keine Auslenkung der unmagnetischen Partikel mehr beobachtet werden sollte. Die genaue Ableitung und Begründung dieses Radius findet sich bei Boulbitch (1999). Hier sei nur als Ergebnis die Gleichung angegeben, nach der r_c bestimmt wird. Dazu betrachtet man die radiale Komponente des Deformationsvektors $\boldsymbol{u}$, der die Verschiebung vom Ort $\boldsymbol{r}$ an den Ort $\boldsymbol{r}' = \boldsymbol{r} + \boldsymbol{u}$ beschreibt. Teilt man diese Komponente durch $\cos\vartheta$, wobei ϑ den Winkel von $\boldsymbol{r}$ in Zylinderkoordinaten angibt, so erhält man einen Ausdruck, der unabhängig vom Winkel ist.

$$\frac{u_r(r)}{\cos\vartheta} = \frac{F_0}{2\pi\mu^*}\left\{\frac{1-\sigma}{2}K_0(r/r_c') - \frac{K_1(r/r_c)}{r/r_c} + \sqrt{\frac{1-\sigma}{2}}\frac{K_1(r/r_c')}{r/r_c}\right\} \tag{8.1}$$

Dabei sind K_n die modifizierten Besselfunktionen zweiter Art, σ ist das Poissonverhältnis, das für biologische Materialien üblicherweise mit 0,5 genähert werden kann, μ^* ist der Oberflächenschermodul des Aktinkortex, r_c ist die gesuchte Abschirmlänge, und $r_c' = \sqrt{(1-\sigma)/2}\cdot r_c$. Durch die Anpassung dieser Gleichung an die Messdaten der ausgelenkten unmagnetischen Kugeln können numerische

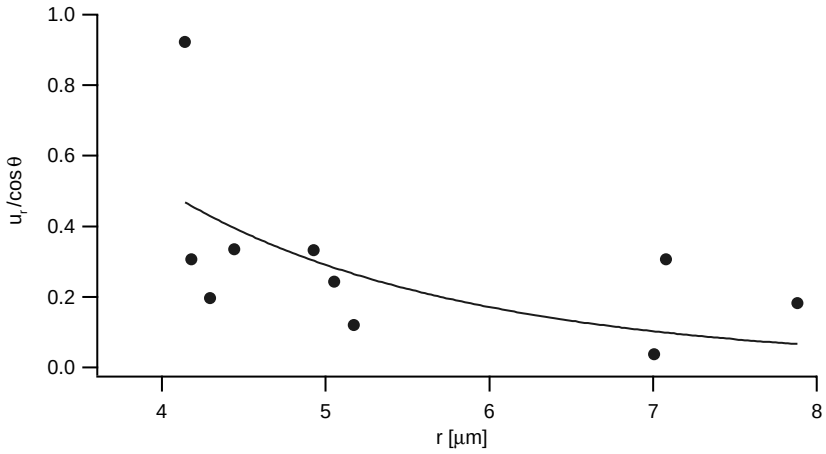


Abbildung 8.6: Anpassung des Deformationsfeldes an die Theorie in Gleichung (8.1). Die Kugelauslenkungen (•), notiert in Zylinderkoordinaten, wurden auf $\cos\vartheta$ normiert und dann an Gleichung (8.1) angepasst (Linie).

Werte für r_c gefunden werden.[4]

Dieses Verfahren konnte bei Fibroblasten erfolgreich angewandt werden (Ziemann 1997, Bausch et al. 1998, Bausch 2000) und r_c bei dieser Zellart zu $7\,\mu$m und der Oberflächenschermodul μ^* zu $4 \cdot 10^{-3}$ Pa m abgeschätzt werden, was mit dem Wert des Plateaus im Kapitel 6 sehr gut übereinstimmt. Der Versuch, auch das Deformationsfeld bei Endothelzellen durch dieses theoretische Modell zu beschreiben, ist in Abbildung 8.6 gezeigt. Dort sind die reduzierten Koordinaten der Messdaten zusammen mit einer Anpassung durch Gleichung (8.1) dargestellt. Man kann erkennen, dass das Modell im Fall der Endothelzellen nicht befriedigend ist. Der numerische Wert von $r_c = 1{,}3 \pm 1{,}2\,\mu$m, der sich aus der Anpassung von Gleichung (8.1) an die experimentellen Daten ergibt, steht im Widerspruch zum Experiment, in dem Auslenkungen bis zu einer Distanz von $11\,\mu$m beobachtet werden können. Der Wert des Oberflächenschermoduls $\mu^* = 23,48$ Pa m in Gleichung (8.1) wird ungewöhnlich groß im Vergleich zum Ergebnis bei Fibroblasten und widerspricht den Werten, die im Kapitel 6 gefunden wurden.

Offensichtlich entsprechen die Annahmen des theoretischen Modells im Fall der Endothelzellen nicht dem Experiment: Kawakami et al. (2001) fanden, dass β_1-Integrine (potentielle Bindungspartner für Invasin, Fibronektin) in Fokaladhäsionspunkten mit Aktinstressfasern verbunden ist. Bei den Aktinstressfasern handelt es sich jedoch um hochgradig inhomogene Gebilde, die vor allem parallel zur Plasmamembran verlaufen. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Fibroblasten befinden sich die beobachteten Kugeln auf den Endothelzellen im Zentrum der Zellen, wo diese eine Dicke von einigen Mikrometern besitzen. Eine Kopplung von Ober- und Unterseite des Zellkortex erscheint auch aus diesem Grund unwahrscheinlich.

[4]Bei Bausch et al. (1998) ist Gleichung (8.1) fehlerhaft (Boulbitch 2003).

Kapitel 9

Experimente mit zytoskelettstimulierenden Substanzen

In früheren Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass Thrombin auf den Aktinkortex eine plötzliche, stark versteifende Wirkung hat (Hellerer 1999, Bausch et al. 2001). Diese Versteifung ist so stark, dass es im Experiment unmöglich ist, die Magnetkugel nach der Zugabe von Thrombin mittels der Magnetischen Pinzette auch bei Anlegen der größten, möglichen Kräfte auszulenken. Diese spontane Versteifung war vorher noch nie beobachtet worden, bekannt war nur die Kontraktion von Endothelzellen durch die Wirkung von Thrombin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Thrombin weitere Zytoskelettstimulierende Substanzen (LPA, Histamin) eingesetzt, um die biochemischen Signalwege, die zu der Versteifung führen, zu identifiziert. Weiter wurden durch Zytoskelett-zerstörende Substanzen der Bereich der Zelle präzisiert, der bei Messungen mit der Magnetischen Pinzette untersucht wird.

9.1 Durchführung der Experimente

Die Experimente zur Wirkung von zytoskelettstimulierenden Stoffen auf die viskoelastischen Eigenschaften von Endothelzellen ähneln den Versuchen zur systematischen Untersuchung der Viskoelastizität im Kapitel 6. Um die Wirkung von Reagenzien auf Endothelzellen zu testen, werden Fibronektin-beschichtete Magnetkugeln zu den Zellen gegeben, die an die Integrin-Proteine der Endothelzellen binden. Durch diese Bindung werden die Kugeln also direkt an den Aktinkortex der Zellen gekoppelt. Zunächst werden auf die ungestörten Zellen rechtecksförmige Kraftpulse ausgeübt, um die Antwort der Zellen vor der Stimulation des Zytoskeletts aufzunehmen. Nach der Beobachtung der ungestörten Zellen, wird der stimulierende Wirkstoff in der gewünschten Konzentration direkt

in die Probenkammer pipettiert. Über einen längeren Zeitraum (bis zu 45 Minuten) werden anschließend erneut Kraftpulse auf die Zellen ausgeübt, um durch den Vergleich der Antwort vor und nach der Einwirkung des Stoffes die Wirkung auf die Zelle zu bestimmen.

Einige der Stoffe, nämlich Thrombin, Histamin und LPA, wirken dabei über Rezeptoren in der Zellmembran, da sie als körpereigene Botenstoffe und Wachstumsfaktoren fungieren und darum von der Zelle erkannt werden. Diese Stoffe stimulieren das Zytoskelett, zerstören es jedoch nicht. Thrombin, Histamin und LPA werden für Experimente in physiologischem Puffer (Phosphatpuffer (PBS), 150 mM Salzkonzentration) gelöst; die verwendeten Konzentrationen sind bei Thrombin (La Roche, Mannheim) 0,5 bis 1 u/ml[1], bei Histamin und LPA (beide Sigma-Aldrich, Schnelldorf) jeweils 10 μM.

Latrunculin A und Nocodazol dagegen sind Gifte, die jeweils sehr spezifisch einen Teil des Zytoskeletts angreifen und zerstören (vgl. Abschn. 2.2). Zu diesem Zweck müssen die Gifte jedoch direkt im Inneren der Zelle, im Zytoplasma, wirken können. Um dies zu ermöglichen, werden diese Stoffe in Puffer zusammen mit 0,1% DMSO gelöst. DMSO hat die Eigenschaft, die Plasmamembran der Zelle, die normalerweise einen sehr guten Schutz vor äußeren Einflüssen darstellt, zu perforieren und so permeabel zu machen. Auch die Wirkung von DMSO allein auf die Zellen wird als Kontrolle in einem Experiment getrennt betrachtet, um den Einfluss von DMSO von den Einflüssen von Latrunculin A und Nocodazol zu trennen.

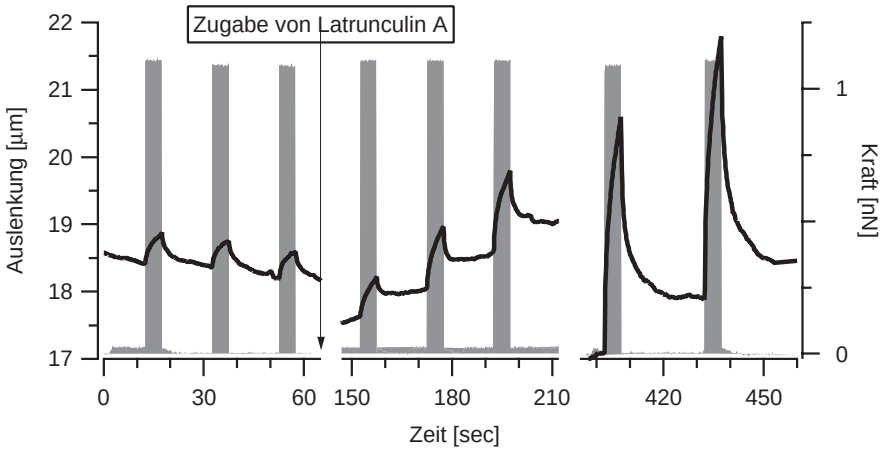
Durch den Vergleich der Kugelauslenkungen vor und nach der Zugabe der stimulierenden Substanzen ist es möglich, die ungestörte Zelle vom Beginn der Messung mit der Reaktion der stimulierten Zelle zu vergleichen und so die Wirkung der Stoffe zu beschreiben.

9.2 Auflösung von Zytoskelettkomponenten durch Latrunculin A und Nocodazol

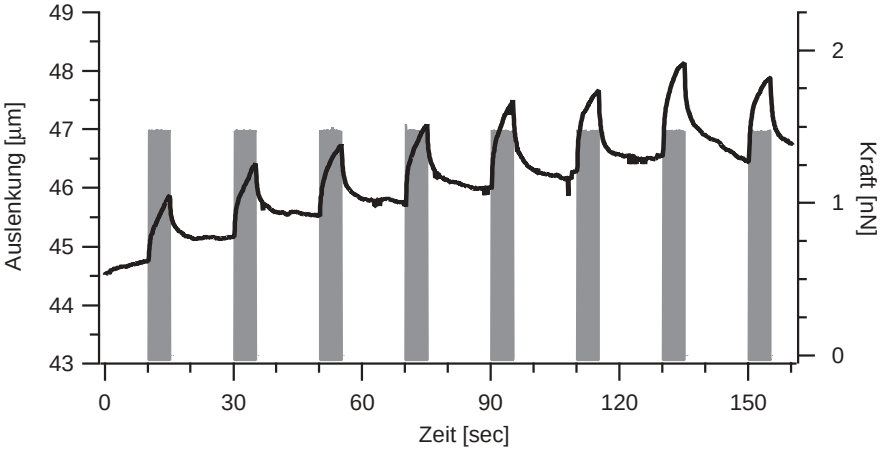
Durch die Experimente mit Latrunculin A und Nocodazol sollte geklärt werden, welche Teile des Zytoskeletts für die charakteristischen Auslenkungen der Kugeln verantwortlich sind. Wie im Abschnitt 2.2 beschrieben, zerstört Latrunculin A in Zellen langfristig die Aktinfilamente, während Nocodazol die Mikrotubuli auflöst. In Abbildung 9.1 sind beide Messungen gezeigt. Die Zugabe von Latrunculin A ist in der Abbildung markiert, Nocodazol wurde direkt vor der Messung zugegeben.

Die Änderung der Messkurve kann in Abbildung 9.1A sehr gut verfolgt werden: sie zeigt zunächst eine sehr schnell auftretende, kleine Versteifung (diese

[1]Enzymmengen werden in Einheiten u (*units*) angegeben. Dabei ist 1 unit Thrombin definiert als die Menge des Enzyms, die gebraucht wird, um 1 mg Fusionsproteine in 16 Stunden bei 20° C zu spalten.



A Zerstörung der Aktinfilamente durch 1 μM Latrunculin A. Die Zunahme der Auslenkung im Verlauf der Messung ist deutlich zu erkennen. Bereits 2 Minute nach der Zugabe des Stoffes vergrößert sich die Auslenkung merklich, nach 10 Minuten ist sie auf das 10fache angewachsen.



B Zerstörung der Mikrotubuli durch Nocodazol. Nocodazol wurde in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt und ca. 1 Minute vor Beginn der Messung in die Probe gegeben. Im Verlauf von knapp 3 Minuten sind keine signifikanten Änderungen in der Auslenkung zu erkennen.

Abbildung 9.1: Wirkung der Zytoskelett-zerstörenden Substanzen Latrunculin A und Nocodazol auf die Kugelauslenkung. Beide Substanzen wurden in Puffer mit jeweils in 0,1% DMSO zugegeben.

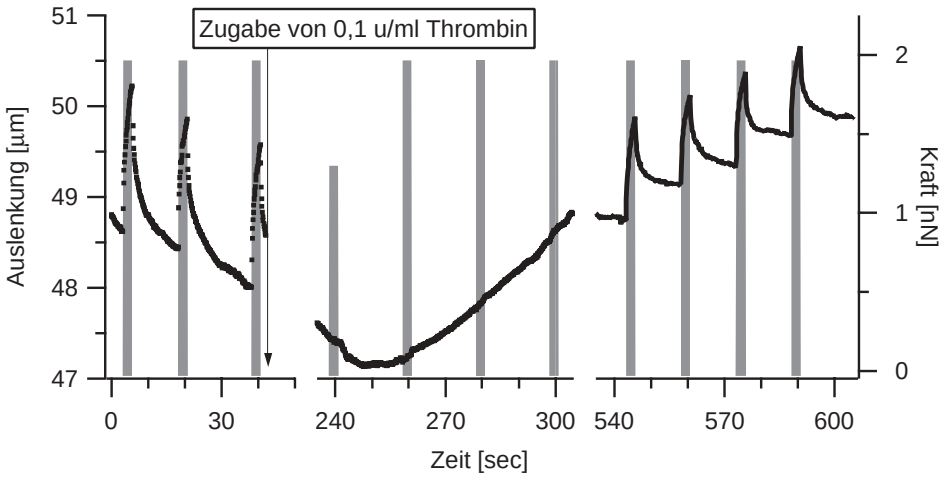


Abbildung 9.2: Stimulation der Zellen durch Thrombin. Kurz nach der Zugabe zieht sich die Zelle zusammen und versteift sich. Nach wenigen Minuten ist keine Auslenkung mehr messbar, die Versteifung löst sich nach einiger Zeit wieder.

Versteifung wird durch DMSO ausgelöst, das mit dem Latrunculin A zugegeben wird, vgl. Abschnitt 9.4). Anschließend wird die Auslenkung der Kugel immer größer, nach 2 Minuten ist sie bereits doppelt so groß wie vor der Zugabe von Latrunculin A, nach 6 Minuten ist die Auslenkung um einen Faktor 10 angewachsen. Die Zellen lösen sich in weiteren Verlauf des Experiments von der Oberfläche ab.

Anders stellt sich die Situation bei Nocodazol dar, bei dem keine starke Veränderung der Kugelauslenkung zu erkennen ist. Zwar verändert sich auch hier die Auslenkung geringfügig, aber nicht so drastisch wie im Falle von Latrunculin A. Die Zelle ist zu Beginn etwas steifer als am Ende der Messung.

9.3 Stimulation des Zytoskeletts durch Thrombin, Histamin und LPA

Von weiterem Interesse ist der Einfluss von Wirkstoffen, die das Zytoskelett nicht zerstören, jedoch größere Umorganisationen vor allem des Aktin bewirken. Wie bereits von Bausch et al. (2001) gezeigt, löst Thrombin in Endothelzellen eine schnell auftretende Versteifung der Zelle aus, die sich nach einigen Minuten wieder löst. Diese Versteifung konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden, sie ist in Abbildung 9.2 dargestellt. Charakteristisch für diese Versteifung ist ihr Auftreten innerhalb kurzer Zeit, typischer Weise zwischen 20 Sekunden und 1 Minute. Auch die Erholung der Zellen nach 5 bis 10 Minuten ist dort gut zu erkennen, die beobachtet werden kann, sofern diese sich nicht durch den Einfluss

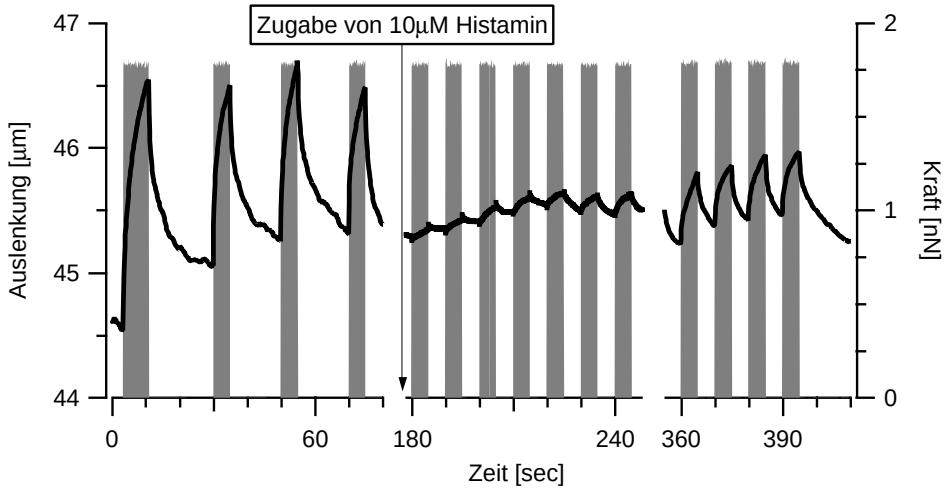


Abbildung 9.3: Stimulation der Zellen durch Histamin. Durch die Zugabe von Histamin versteifen sich die Zellen ähnlich wie es bei der Zugabe von Thrombin beobachtet wird. Auch hier löst sich die Versteifung nach einiger Zeit wieder.

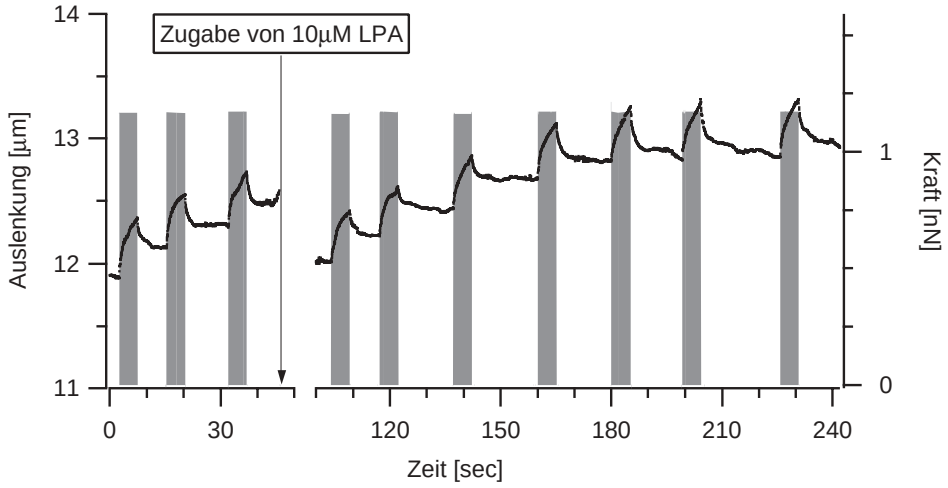


Abbildung 9.4: Stimulation der Zellen durch LPA. Hier ist im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikante Änderung der Kugelauslenkung durch die Wirkung des Stoffes messbar.

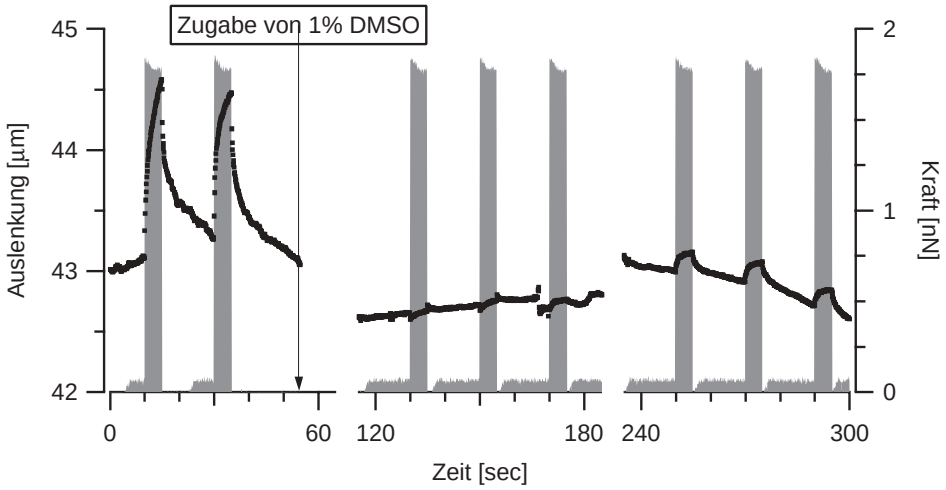


Abbildung 9.5: Die Wirkung von DMSO auf Endothelzellen. Im Gegensatz zu Thrombin und Histamin hat DMSO keine Zytoskelett-stimulierende Wirkung, es macht jedoch die Zellmembran permeabel für Stoffe im Medium. Auch die Zugabe von DMSO ruft eine schnelle Versteifung der Zellen hervor, ähnlich wie Thrombin und Histamin.

des Thrombins vom Substrat abgelöst hatten. Einen ähnlichen Effekt wie Thrombin bewirkt die Zugabe von Histamin in die Probenkammer. In Abbildung 9.3 ist das Beispiel eines solchen Experiments gezeigt. Auch die Versteifung durch Histamin tritt innerhalb kurzer Zeit (weniger als einer Minute) auf und ist reversibel. Im Gegensatz zu Thrombin und Histamin zeigt die Zugabe von LPA kaum Einfluss auf die gemessenen Kugelauslenkungen, wie früher schon berichtet wurde (Hellerer 1999). Ein Beispiel der Wirkung von LPA ist in Abbildung 9.4 gezeigt. Die Auslenkung der Kugel ändert sich nur minimal.

9.4 Versteifung des Kortex durch DMSO

Den Lösungen von Latrunculin A und Nocodazol war jeweils zwischen 1% und 0,1% DMSO beigemischt, um die Zellmembran für diese Stoffe permeabel zu machen. Als Kontrolle zu diesen Messungen ist es deshalb notwendig, auch die Wirkung von DMSO allein auf die Zellen zu testen. Wie in Abbildung 9.5 gezeigt, tritt durch den Einfluss von 1% DMSO eine Versteifung der Endothelzellen auf. Diese Versteifung ist schnell (im Beispiel weniger als 30 Sekunden) zu beobachten und ist wenigstens teilweise reversibel: Nach einigen Minuten kann wieder eine Kugelauslenkung beobachtet werden. Dieses Verhalten ist ähnlich der Wirkung von Enzymen wie Thrombin und Histamin, jedoch handelt es sich bei DMSO nicht um einen Botenstoff, sondern einzig um ein unpolares Molekül, das die Zellmembran durchlässig macht für Stoffe und Ionen, die im umgebenden Puffer gelöst sind.

9.5 Diskussion

Mit Hilfe der Magnetischen Pinzette können nicht nur physikalische Fragen zur viskoelastischen Natur von Zellen untersucht werden, sondern auch biologisch relevante Experimente vorgenommen werden, z.B. durch Versuche mit Substanzen, die direkt in die molekular-biologische Natur des Zytoskeletts eingreifen. So zeigen die Untersuchungen mit Latrunculin A, einem Stoff, der die Konzentration an F-Aktin stark vermindert, dass die durch die Magnetische Pinzette untersuchten Eigenschaften der Zellhülle tatsächlich durch das Aktinzytoskelett dominiert werden. Dieses Ergebnis steht in hervorragender Übereinstimmung mit früheren Experimenten unterschiedlichster Techniken: Bei Experimenten mit dem *Magnetic-Tweezers*-Setup an Fibroblasten vermutete auch Bausch (2000), dass die rapide Vergrößerung der Kugelauslenkung durch die Zugabe von Cytochalasin D auf die Zerstörung des Aktinkortex zurückzuführen ist. Da Latrunculin A noch spezifischer auf die Auflösung von F-Aktin wirkt wie Cytochalasin D, steht diese Vermutung im Einklang mit dem hier beobachteten Effekt in Abbildung 9.1A. An Fibroblasten wurden bei Untersuchungen mit dem AFM ähnliche Ergebnisse durch Latrunculin A beobachtet (Rotsch und Radmacher 2000). Auch hier wurden die Zellen unter Anwendung von 0,1 μM Latrunculin A weicher, allerdings verringert sich der Young-Modulus, der ein Maß für die Steifigkeit eines Körpers ist, nur um etwa das 2,5fache, während in den hier vorgestellten Experimenten der Ausschlag der Kugeln unter dem Einfluss von Latrunculin A um einen Faktor 10 größer wird. Die Ursache dieses Unterschieds könnte sowohl in der unterschiedlichen Art der untersuchten Zellen liegen, als auch an der geringeren Konzentration von Latrunculin A (im Beispiel in Abbildung 9.1A wurde eine Konzentration von 1 μM zugegeben).

Erstaunlich sind jedoch die unterschiedlichen Zeiten, in denen die Änderungen in der Elastizität von Zellen beobachtet werden: während bei Endothelzellen die erste Wirkung des Latrunculin A innerhalb von 2 Minuten sichtbar wird und nach 10 Minuten die 10fache Auslenkung erreicht ist, wird bei den Fibroblasten von einem Zeitraum von ungefähr 40 Minuten berichtet (Rotsch und Radmacher 2000). Bei der Untersuchung von Epithelzellen der Leber wurden Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften des Zytoplasmas durch Latrunculin A innerhalb von 15 Minuten beobachtet (Yamada et al. 2000). Da Bausch (2000) bei Fibroblasten ebenfalls eine sehr schnelle Reaktion (innerhalb von 5 Minuten) durch die Auflösung des Aktin durch Cytochalasin D beobachtete, liegt dieses unterschiedliche zeitliche Verhalten entweder an der Technik der Magnetischen Pinzette, die die Veränderungen sensitiver detektiert, oder an den verschiedenen Arten von Aktin, die durch die unterschiedlichen Techniken getestet werden: während die Magnetische Pinzette Eigenschaften des Aktinkortex wiedergibt, der als erstes der Wirkung des von außen eindringenden Latrunculin A ausgesetzt ist, stellen AFM (Rotsch und Radmacher 2000) und Laser-Verfolgungs-Rheologie (Yamada et al. 2000) die viskoelastischen Eigenschaften im Inneren der Zelle dar.

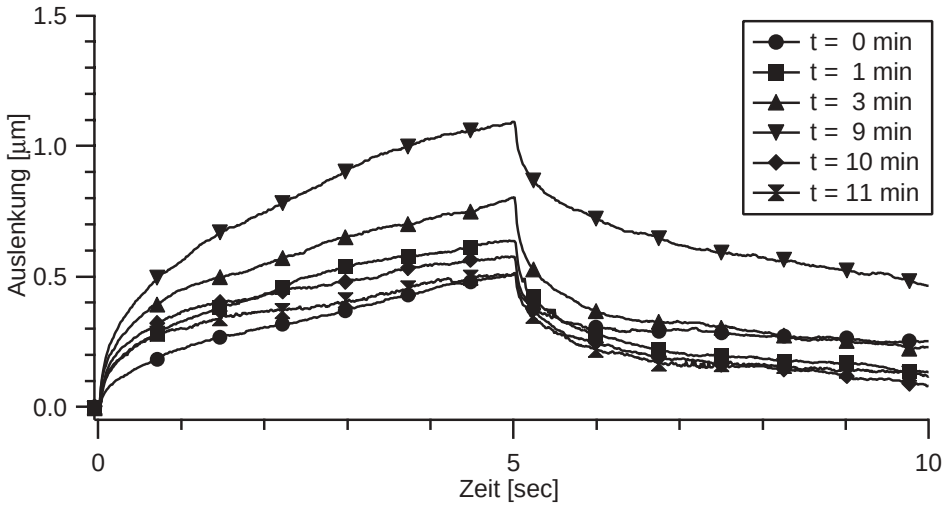


Abbildung 9.6: Die Wirkung einer niedrigen Konzentration (0,01 μM) von Latrunculin A auf Endothelzellen. Zu erkennen ist zunächst eine Vergrößerung der lokalen Deformation durch den Einfluss des Latrunculin A, die Zelle wird also weicher. Jedoch ist die Konzentration in diesem Beispiel so klein, dass das filamentöse Aktin nicht völlig aufgelöst wird und die Zelle reagieren kann. Nach ca. 10 min ist die ursprüngliche Auslenkung wieder erreicht.

Wie sensitiv der *Magnetic-Tweezers*-Aufbau arbeitet, zeigt ein weiteres Experiment mit Latrunculin A: reduziert man die Konzentration des eingesetzten Latrunculin A weiter auf 0,01 μM, kann sowohl das Aufweichen, als auch später wieder eine Stabilisierung des Aktinkortex beobachtet werden. Dies ist in Abbildung 9.6 gezeigt, in der die Auslenkung einer Kugel über einen Zeitraum von mehr als 10 Minuten dargestellt ist. Diese niedrige Konzentration von Latrunculin A bewirkt also eine Auflösung des Aktinkortex, dem aber von der Zelle entgegengesteuert werden kann.

Die Zerstörung der Mikrotubuli hatte kaum Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften der Zelle. Auch dieses wird durch die Arbeit an Fibroblasten (Rotsch und Radmacher 2000) bestätigt. Nach 60 Minuten konnte dort keine Veränderung des Young-Modulus beobachtet werden. Die Eigenschaften der Zellen bezüglich äußerer mechanischer Untersuchungen werden also maßgeblich durch das Aktinzytoskelett bestimmt. Völlig unabhängig scheinen Mikrotubuli und Aktinkortex aber nicht voneinander zu sein. So beobachteten Maniotis et al. (1997) eine Kopplung von Aktinzytoskelett und Mikrotubuli bei Endothelzellen. Auch bei Zellen der Gattung *Dictyostelium discoideum* wurde berichtet, dass die Mikrotubuli an den Aktinkortex binden (Neujahr et al. 1998). Eine solche Kopplung der Mikrotubuli an den Aktinkortex ist wohl auch dafür verantwortlich, dass bei Endothelzellen in einigen Fällen durch eine lang andauernde Auslenkung der Magnetkugel eine Verschiebung des Zellkerns in Richtung der Auslenkung beob-

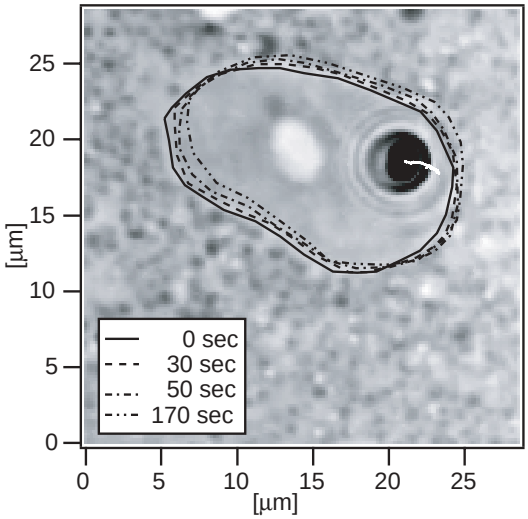


Abbildung 9.7: Während der lang andauernden Deformation (Trajektorie der Kugel ist im Bild weiß wiedergegeben und dauert 50 Sekunden) folgt der Zellkern der Auslenkung der Kugel nach. Die Umrisse des Zellkerns sind zu verschiedenen Zeiten des Pulses durch die Linien wiedergegeben.

achtet werden kann. Ein Beispiel eines solchen Nachlaufens des Zellkerns ist in Abbildung 9.7 gezeigt.

Durch die Zugabe von LPA in die Probenkammer kann der die viskoelastischen Eigenschaften bestimmende Teil der Zelle noch weiter eingeschränkt werden. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, regt LPA das Aktinnetzwerk im Innern der Zelle zur Bildung von Stressfasern an. In den Experimenten dieser Arbeit sind die Einflüsse von LPA auf die Antwort der Magnetkugel relativ klein, vor allem verglichen mit den deutlichen Veränderungen auf die Zugabe von Latrunculin A und Thrombin. Es liegt also die Vermutung nahe, dass mit dem *Magnetic-Tweezers*-Aufbau vor allem das kortikale Aktin untersucht wird. Dies ist insofern interessant, als mit dem AFM vor allem das intrazelluläre Aktinnetzwerk bzw. Aktinstressfasern untersucht werden, was die oben erwähnten unterschiedlichen Zeiten bei der Wirkung von Latrunculin A zwischen Endothelzellen und den Fibroblasten bei Rotsch und Radmacher (2000) erklären kann.

Aufgrund des Vergleichs der Wirkungen, die Thrombin, Histamin und LPA in den Experimenten auf den Kortex ausüben, kann der Signalweg, der die Versteifung des Aktinkortex bei Thrombin und Histamin auslöst, mit großer Sicherheit auf die Ausschüttung von Ca^{2+} zurückgeführt werden. Zwar haben frühere Arbeiten (Hellerer 1999, Bausch 2000) bereits versucht, diesen Signalweg zu testen und keinen Einfluss des Ca^{2+} auf die Versteifung feststellen können. Jedoch sprechen die folgenden beiden Beobachtungen sehr stark für Ca^{2+} als Ursache der Versteifung:

	Versteifung	wirkt über
Thrombin	+	Ca^{2+}/Rho
Histamin	+	Ca^{2+}
LPA	−	Rho

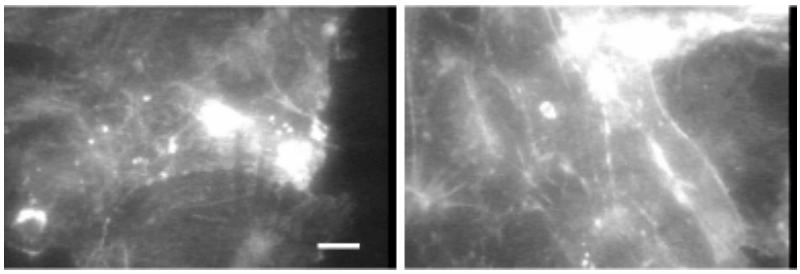
Tabelle 9.1: Vergleich der Wirkung einer Stimulation des Zytoskeletts und des biochemischen Signalwegs, über den die Stimulation auf das Zytoskelett wirkt. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Versteifung durch die Aktivierung des Ca^{2+}/Calmodulin-Weges vermittelt wird.

1. Die verwendeten Enzyme (Thrombin, Histamin, LPA) wirken jeweils auf unterschiedliche Art auf das Aktinnetzwerk der Endothelzellen (vgl. Abschnitt 2.2 und Tabelle 9.1). Während Thrombin sowohl über das Rho-Protein als auch durch die Ausschüttung von Ca^{2+} das Aktomyosin-System aktiviert (Wysolmerski und Lagunoff 1990, Aepfelbacher und Essler 2001), wirkt LPA nur über das Rho-Protein (Moolenar et al. 1997) und Histamin nur über Ca^{2+} (Rotrosen und Gallin 1986). Da sowohl Thrombin als auch Histamin die Versteifung des Aktinkortex bewirken, liegt ein erstes Indiz für einen Signalweg durch Ca^{2+} vor.

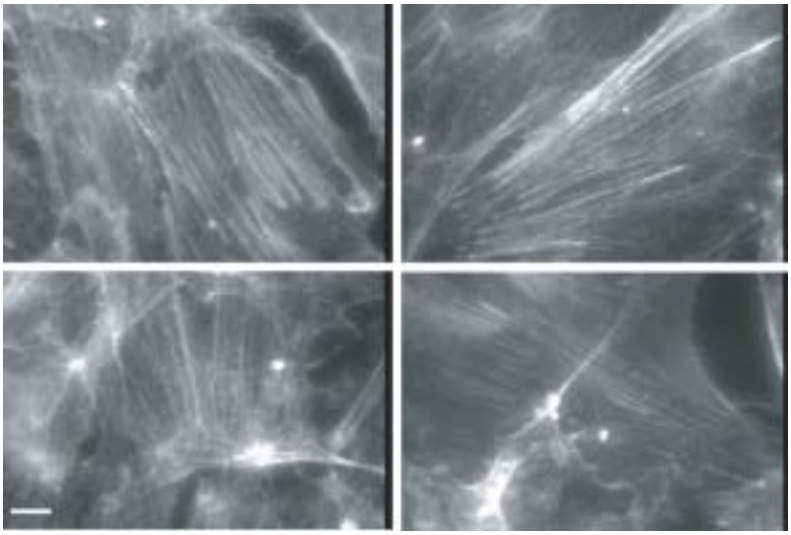
2. Einen entscheidenden Nachweis für diese These liefert die Beobachtung der Kortexversteifung ausgelöst durch DMSO. DMSO hat im Gegensatz zu Thrombin, Histamin und LPA keine stimulierende Wirkung auf das Zytoskelett. Die Wirkung von DMSO besteht in der Bildung kleiner Löcher in der zellulären Plasmamembran, um diese permeabel für im Medium gelöste Stoffe (z.B. Latrunculin A) zu machen. Nun zeigt auch der Einsatz von DMSO eine versteifende Wirkung auf die Zellen, wie in Abbildung 9.5 zu erkennen ist.

   Auch diese Versteifung kann schlüssig durch die Wirkung von Ca^{2+} erklärt werden: Die Zellen befinden sich während der Experimente in einem Zellkulturmedium, das nach Angaben des Herstellers (PromoCell, Heidelberg) eine Konzentration von $[Ca^{2+}]$= 1,6 mM enthält. Im Inneren der Zelle liegt der Kalziumspiegel dagegen bei Konzentrationen von 0,1 μM (Ca^{2+} inaktiv) bis 10 μM (Ca^{2+} aktiviert) (Rotrosen und Gallin 1986), er ist also 2 bis 4 Größenordnungen kleiner. Durch die Perforierung der Zellmembran durch DMSO können nun extrazelluläre Ca^{2+}-Ionen in das Zytoplasma eindringen und dort über den bekannten Ca^{2+}/Calmodulin-Signalweg (Wysolmerski und Lagunoff 1990) die Versteifung des Aktinkortex auslösen.

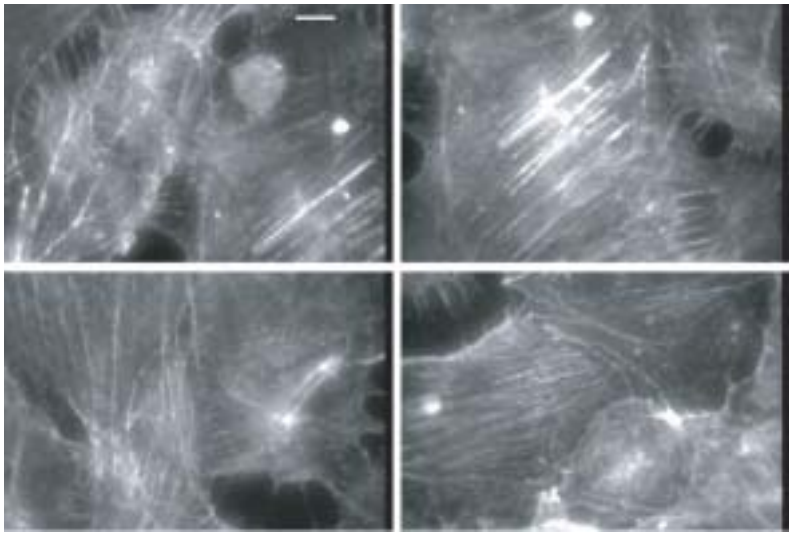
Obwohl nun also die Ursache der Versteifung auf die Wirkung von Ca^{2+} zurückzuführen ist, bleibt doch der genaue Mechanismus der Versteifung weiterhin fraglich. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die Versteifung



A Nullprobe



B Thrombin



C Histamin

Abbildung 9.8: Anfärbungen des Aktinzytoskeletts. Die Endothelzellen wurden fixiert, ihre Plasmamembran permeabilisiert und das F-Aktin mit Alexa-Rhodamin angefärbt. Der weiße Balken hat eine Länge von 10 μm.

ähnlich schnell auftritt, wie sich Stressfasern durch eine Anfärbung des Aktinzytoskeletts mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin nachweisen lassen. Bilder solcher Färbungen sind in Abbildung 9.8 zu sehen. Jedoch ist die Magnetische Pinzette vor allem sensitiv für den Kortex der Zelle, nicht für das Aktinnetzwerk im Inneren derselben.

Kapitel 10

Ausblick auf weiterführende Fragen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnten einige Fragen zur Viskoelastizität von Endothelzellen nicht geklärt werden, bzw. haben sich neue Fragen ergeben. Im folgenden sollen einige theoretische und experimentelle Aspekte angesprochen werden, die sich an die bisherige Arbeit anschließen könnten.

10.1 Mikroskopischer Ansatz zur Modellierung der Kugelauslenkung

Im Kapitel 6 wurden die Auslenkungen der Magnetkugeln durch mechanische Schaltkreise modelliert, was einem makroskopischen Ansatz entspricht, der die Kugelauslenkung phänomenologisch beschreibt. Ein völlig anderer theoretischer Ansatz zur Beschreibung der longitudinalen Deformation der Zellhülle wurde in jüngster Zeit von Boulbitch und Ter-Oganessian (Ter-Oganessian et al. 2003) vorgeschlagen, der die Kugelauslenkung durch mikroskopische Annahmen beschreibt. Obwohl diese Theorie noch nicht abgeschlossen vorliegt, soll die zugrunde liegende Idee kurz skizziert werden.

Ausgangspunkt der Theorie ist die Idee, dass die Magnetkugel im (zweidimensionalen) Aktinkortex fest mit einer Adhäsionsscheibe verknüpft ist. Diese Adhäsionsscheibe mit dem Radius R befindet sich in einer Umgebung aus F-Aktin der Konzentration c_0, deren Bestandteile, die Aktinfilamente, durch thermische Diffusion bewegt werden. Wird die Magnetkugel durch eine äußere Magnetkraft ausgelenkt, verschiebt sich die Adhäsionsscheibe in dieser Umgebung aus Aktinfilamenten. Durch die Bewegung der Scheibe in der zweidimensionalen Schicht erhöht sich vor der Scheibe die Konzentration der Aktinfilamente, hinter ihr wird sie erniedrigt. Während der Kugelbewegung können die Aktinfilamente selbst allerdings auch diffundieren und so unabhängig von der Kugel ihre Position verändern. Bezeichnet man die Diffusionskonstante der Aktinfilamente mit

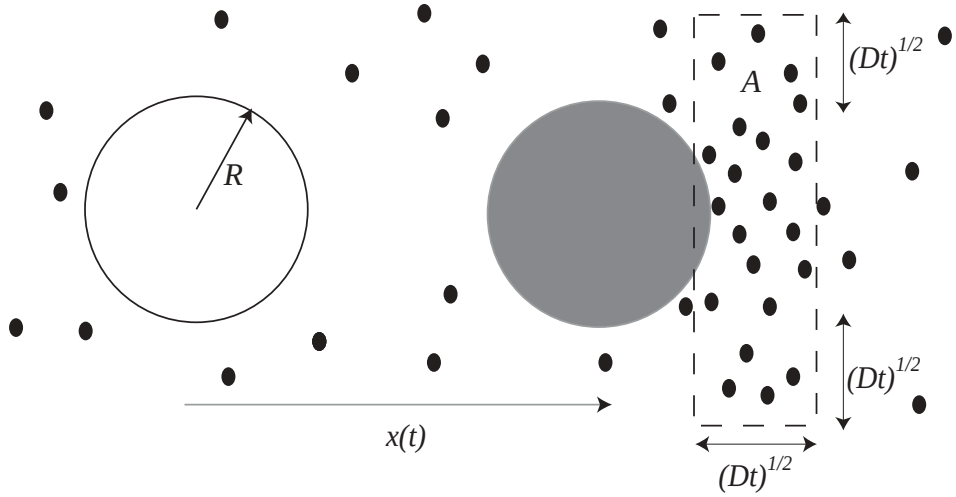


Abbildung 10.1: Skizze zur osmotischen Natur der Reibungskraft. Die Adhäsionsscheibe der Kugel mit Radius R wird um die Strecke $x(t)$ bewegt und sammelt dabei Moleküle (z.B. Aktin) vor sich auf. Diese können während dessen die Strecke $\sqrt{D_f t}$ diffundieren (D_f Diffusionskonstante der Moleküle).

D_f, dann bestimmt sich die Strecke, die die Filamente innerhalb einer Zeit t zurücklegen können, zu $d \sim \sqrt{D_f t}$.

Wird die Adhäsionsscheibe in der Zeit t um die Strecke $x(t)$ bewegt, so wird durch diese Bewegung die Anzahl $N(t) \sim 2R\, c_0 \cdot x(t)$ Filamente vor der Kugel angesammelt, die innerhalb dieser Zeit die Strecke d diffundieren können. Die Filamente befinden sich also innerhalb einer Fläche $A(t) \sim 2\sqrt{D_f t}\left(R + \sqrt{D_f t}\right)$, in der nun die Konzentration der Filamente $c_+(t) \sim N/A$ beträgt, falls gilt $x(t)/\sqrt{D_f t} > 1$. Die Fläche A ist in Abbildung 10.1 gestrichelt umrahmt.

$$c_+(t) \sim \frac{N(t)}{A(t)} = \frac{c_0 x(t)}{\sqrt{D_f t}\left(1 + \sqrt{D_f t}/R\right)} \tag{10.1}$$

Durch diese erhöhte Konzentration vor der Kugel wirkt auf die vordere Kugeloberfläche ein osmotischer Druck $\Pi = (c_+ - c_0)k_B T$, der eine osmotische Kraft $F_{\text{osm}} \sim 2R\,\Pi$ hervorruft.

Wenn die Bewegung der Adhäsionsscheibe durch eine äußere, konstante Kraft F_{ext} hervorgerufen wird, so muss diese Kraft gerade entgegengesetzt gleich zur osmotischen Kraft F_{osm} sein. Es gilt dann also

$$x(t) \sim F_{\text{osm}}\sqrt{t/\tau_D} \quad \sim t^{1/2}, \tag{10.2}$$

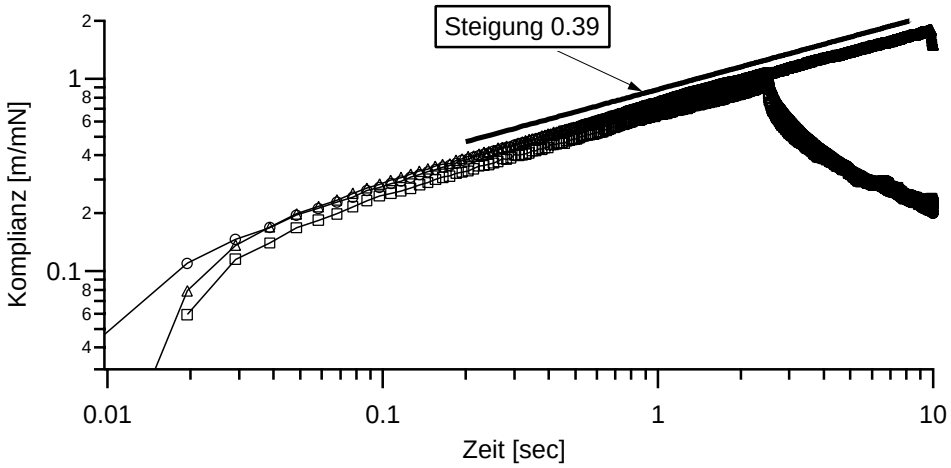


Abbildung 10.2: Doppeltlogarithmische Auftragung der Kugelauslenkung. Die Skalierung der Auslenkung hat eine Steigung von 0,39.

wobei $\tau_D = \sqrt{R^2/D}$ die Zeit ist, die für eine Diffusion um die Kugel benötigt wird. Die Kugelauslenkung gehorcht einem Skalengesetz mit der Steigung 0,5.

Tatsächlich kann ein vergleichbares Verhalten bei der Kugelauslenkung beobachtet werden, wenn diese doppeltlogarithmisch aufgetragen wird. Ein solches Beispiel ist in Abbildung 10.2 gezeigt. Das Skalengesetz beträgt hier 0,39 und liegt somit durchaus in der Nähe der theoretischen Vorhersage. Analysiert man verschiedene Kugelauslenkungen, so erhält man im Mittel Exponenten zwischen 0,35 und 0,45. Die Abweichungen von der Theorie sind also gering, jedoch scheinen sie systematischer Natur zu sein, was eine Modifikation des Ansatzes nötig machen würde.

Problematisch sind auch einige Voraussetzungen des Modells. So besitzen Aktinfilamente keine eindeutige Diffusionskonstante, vielmehr ist es üblich, die thermische Bewegung von F-Aktin durch Reptation zu beschreiben (Dichtl und Sackmann 1999, Dichtl 2001). Diese sollte konzentrationsabhängig sein, was eine mögliche Erklärung für die Abweichung des Exponenten sein könnte.

10.2 Weitere Untersuchungen am Zytoskelett von Endothelzellen

Aufbauend auf den Experimenten dieser Arbeit bieten sich verschiedene Möglichkeiten, die Dynamik des Zytoskeletts von Endothelzellen weiter zu untersuchen. Mit zwei Messmethoden, dem Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskop (RIKM) und dem Raster-Kraft-Mikroskop (AFM), wurden bereits einige Vorexperimente durchgeführt, um prinzipiell zu klären, ob Effekte mit diesen Techniken zu beobachten sind.

Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie an Endothelzellen

Eine optische Methode, mit der es sogar möglich sein sollte, die Bildung einzelner Stressfasern in Endothelzellen zu beobachten, ist das RIKM. Durch Interferenz des einfallenden, monochromatischen Lichtes lässt sich sehr präzise die Höhenposition eines Objekts (z.B. Vesikel, Zelle) über einem Substrat (Deckglas) messen. Mit dieser Technik, die an anderer Stelle ausführlich beschrieben ist (Lorz 1999), wurden bereits mehrfach Zellen untersucht (Schindl 1995, Simson 1998) und sie ist auch bei Endothelzellen einsetzbar.

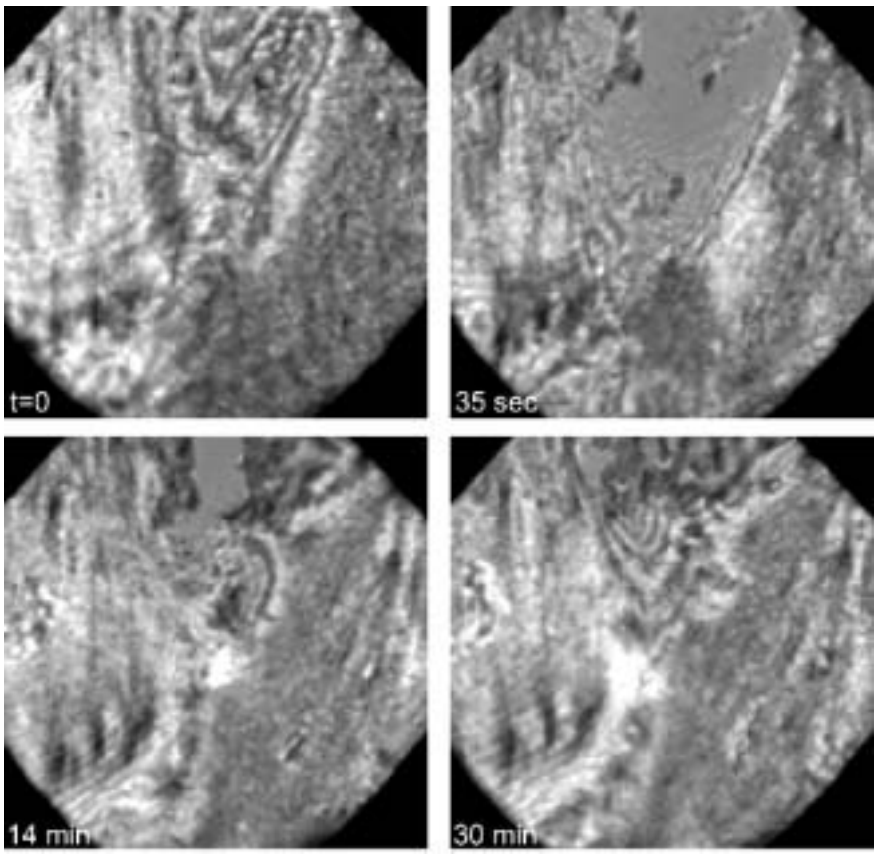
In Abbildung 10.3 sind zwei Beispiele von Experimenten mit Endothelzellen im RIKM dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung wird das Verhalten der Zellen auf die Zugabe von 0,1 u/ml Thrombin gezeigt. Die zunächst geschlossene Schicht der Zellen reisst auf, es bleiben aber einzelne Fokalkontakte erhalten. Die Zellen beginnen kurz nach der Zugabe des Thrombins wieder, die entstandene Lücke zu schließen. Durch Bildung von Philopodien breiten sie sich wieder aus, nach 30 Minuten ist die ursprüngliche geschlossene Schicht wieder hergestellt.

Die Zugabe von Catherin-Antikörper hat einen etwas anderen Effekt auf die Zellen. Catherine sind Proteine, über die Kontakte zwischen zwei Zellen hergestellt werden. Die Bindung kommt dabei durch eine Catherin-Catherin-Wechselwirkung zustande. Diese Proteine besitzen eine ähnlich wichtige Funktion wie die Integrine, mit denen Zellen auf Substrat verankert sind. Wird Anti-Catherin in die Probe gegeben, so konkurriert die Antikörper-Catherin-Bindung mit der Catherin-Catherin-Bindung zwischen Zellen, der Saum zwischen zwei Zellen sollte Defekte entwickeln. Solche Defekte sind in Abbildung 10.3B in einer RIKM-Aufnahme zu sehen (weiße Pfeile).

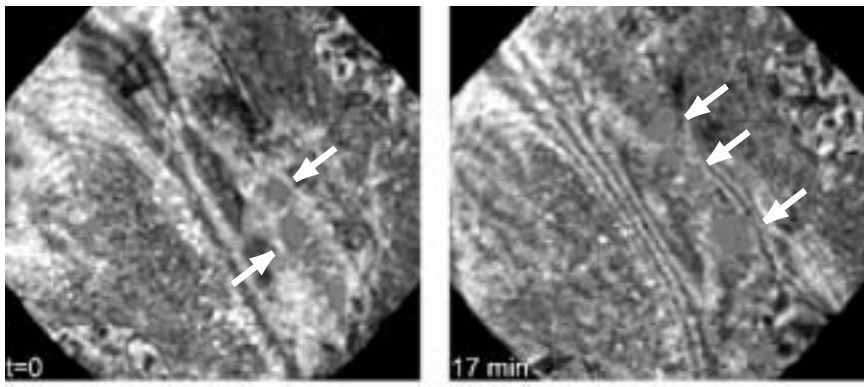
Raster-Kraft-Mikroskopie an Endothelzellen

Eine verbreitete Methode zur Messung mechanischer Eigenschaften von Zellen ist das AFM. Beim AFM wird die Zelloberfläche mit einer Feder bekannter Steifigkeit abgerastert. Durch die Auslenkung der Feder in Abhängigkeit der Höhenposition können sowohl die absolute Höhe der Zelle als auch die Steifigkeit der Zelle gemessen werden. Da die Deformation der Zelle in diesem Fall keine Scherung sonder eine Kompression darstellt, detektiert man mit dem AFM nicht unbedingt den Aktinkortex, sondern die Steifigkeit des Zytoskeletts im darunterliegenden Zytoplasma (engl. *bulk cytoskeleton*).

Experimente zur Wirkung von zytoskelettzerstörenden Substanzen wie Cytochalasin D oder Nocodazol wurden an Fibroblasten mit dem AFM bereits durchgeführt (Rotsch und Radmacher 2000). Interessant wäre eine systematische Untersuchung, ob die Versteifung der Endothelzellen durch die Wirkung von Thrombin oder Histamin, wie sie im Kapitel 9 beschrieben ist, auch durch das AFM gemessen werden kann. Erste Experimente zu dieser Fragestellung sind nicht völlig eindeutig, zeigen aber vielversprechende Resultate, wie in Abbil-



A Veränderungen von Endothelzellen im RIKM durch Zugabe von Thrombin. Die zunächst geschlossene Schicht aus Zellen reisst bei der Zugabe von Thrombin auf, innerhalb von 30 min schließt sich die Zellschicht jedoch wieder.



B Veränderungen von Endothelzellen im RIKM durch Zugabe von Anti-Catherin. Catherin ist ein Protein, das Zell-Zell-Kontakte ermöglicht. Anti-Catherin löst Kontakte zwischen zwei Zellen.

Abbildung 10.3: Das RIKM ermöglicht detaillierte Beobachtungen der Zellunterseite und liefert sehr genaue Höheninformationen über dem Substrat.

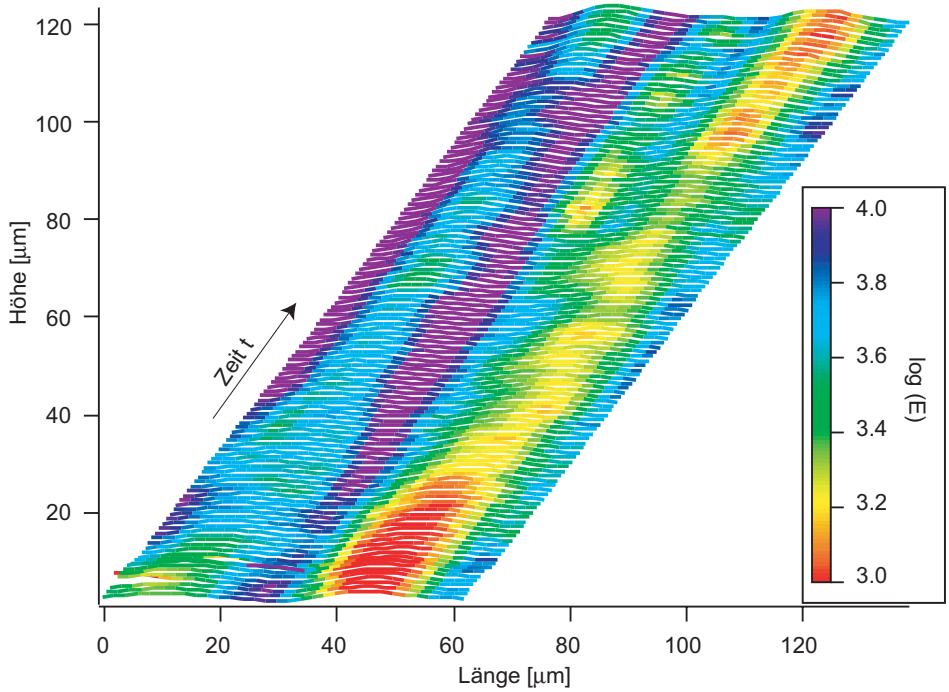


Abbildung 10.4: Zeitliche Entwicklung des Young-Moduls unter dem Einfluss von Thrombin gemessen mit dem AFM. Es wurde eine Linie auf der Zelle abgerastert, die an der x-Koordinate aufgetragen ist. Die y-Koordinate zeigt die Höhe über dem Substrat, nach hinten ist die zeitliche Entwicklung aufgetragen. Die Steifigkeit der Zelle ist als Grauwert dargestellt, wobei die Zelle steifer wird, je dunkler die Graufärbung ist. Die gesamte Messdauer war ungefähr 10 Minuten. Es zeigt sich, dass auch mit dem AFM eine Versteifung der Zelle aufgrund der Zugabe von Thrombin zu beobachten ist.

dung 10.4 gezeigt. Die einzelnen Linien stellen die zeitliche Entwicklung einer linearen Kontur auf der Zelle dar. Die Zugabe von Thrombin erhöht den Wert des Young-Moduls (die Zelle wird steifer), was sich in einer Verdunkelung der Grautöne nach der Zugabe von Thrombin äußert. Nach einigen Minuten nimmt die Steifigkeit wieder ab, gegen Ende der Messung kehren die ursprünglichen hellen Grauwerte wieder zurück. Allerdings ist die Versteifung deutlich später zu beobachten, als bei den Experimenten mit der Magnetischen Pinzette (die ganze Messung in der Abbildung dauert ungefähr 30 Minuten).

10.3 Mechanische Stimulation durch die Magnetische Pinzette

Wie beschrieben ist der Ansatzpunkt der Magnetischen Pinzette im Zytoskelett der Aktinkortex, also jene relativ dünne Schicht, die direkt unter der Plasma-

membran liegt. Diese Schicht ist nicht nur verantwortlich für die äußere Form der Zelle, sie dient auch zur Signalübertragung vor allem mechanischer Reize ins Innere des Zytoplasmas.

In verschiedenen Arbeiten wurden bereits Reaktionen von Zellen auf mechanische Reize beschrieben. So berichten Gu et al. (2001) von der mechanischen Aktivierung und Deaktivierung von Ionen-Kanälen in der Plasmamembran durch Einsaugen in eine Mikropipette. Verschiedene Ionenkanäle, die durch Dehnungen aktiviert werden, sind auch in Herzmuskelzellen bekannt (Hu und Sachs 1997). Durch Fluoreszenzmikroskopie mit einem Ca^{2+}-abhängigen Farbstoff konnten Glogauer et al. (1997) zeigen, dass mechanische Reize bei Fibroblasten schon nach kürzester Zeit (< 1 sec) zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führen. Die mechanische Stimulation mit einem magnetischen Torsionsrheometer ruft bei Endothelzellen von Rindern bereits biochemische Reaktionen (Meyer et al. 2000) hervor.

Da durch die Magnetische Pinzette ein Experimentalaufbau zu Verfügung steht, der sehr spezifisch und lokal Kräfte an der Zelloberfläche ausüben kann, ist hier ein guter Ansatzpunkt, das hochinteressante Feld der mechanischen Signalübertragung zu untersuchen.

Anhang

Anhang A

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope*)
ATP	Adenosin-Triphosphat
DMSO	Dimethyl sulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FN	Fibronektin
G-Aktin	globuläres Aktin
GDP	Guanin-Diphosphat
GTP	Guanin-Triphosphat
IATR	Iodoacetamidotetramethylrhodamin
Inv	Invasin
LPA	Lysophosphatidsäure (engl. *lysophosphatidic acid*)
MLC	Myosin-Light-Chain
P_n	Puls einer Dauer von n sec
PBS	Phosphatpuffer (engl. *phosphat buffer saline*)
Pixel	Bildpunkt (engl. *picture element*)
RIKM	Reflexions-Interferrenz-Kontrast-Mikroskop (engl. *RICM*)
UZ	Ultrazentrifuge

Anhang B

Präparation des Tetramethylrhodamin-Konjugats von Aktin

Die Färbung von Aktin mit Tetramethylrhodamin erfolgt nach der von Michael Bärmann leicht veränderten Vorschrift von Simon et al. (1988). Die Angabe von Puffer C zur Mikroinjektion stammt von McGrath et al. (1998).

Zur Färbung wird lyophilisiertes Aktin verwendet, das noch nicht über Gelfiltration gereinigt ist („Spudich & Watt – Aktin“), da die S-300-Säule erst nach der Markierung durchgeführt wird. Generell muss Aktin immer auf Eis gelagert sein, soweit nicht anders vermerkt. Die Dialyse findet im Kühlraum statt (4°C) statt.

1. 20mg (40mg) lyophilisiertes Aktin in 2ml (6ml) kaltem H_2O lösen und über Nacht gegen 2l Puffer A dialysieren. Dazu Dialyseschlauch vor dem Gebrauch kochen und mit Wasser spülen (um die Beschichtung des Schlauchs zu lösen). Schlauch zuknoten, Aktinlösung einfüllen, oben ebenfalls zuknoten und in den Puffer hängen (Rührfisch nicht vergessen!). 3 mal mindestens für eine Stunde in frischem Puffer A (einmal am besten über Nacht zum 2. Tag).

2. 2h bei 100 000g und 4°C zentrifugieren. Dazu die Ultrazentrifuge (UZ) vorkühlen. Das verwendete Gegengewicht für die UZ muss auf 0,01 g mit Wasser gegen die Probe aufgewogen werden, um die UZ nicht zu beschädigen.

   Evt. beim Überstand eine Konzentrationsbestimmung machen, um festzustellen, wieviel Aktin vorhanden ist.

   Überstand durch Zugabe von 100mM KCl und 2 mM $MgCl_2$ polymerisieren. 1h stehen lassen bei Raumtemperatur (RT) oder auf Eis über Nacht.

3. Iodoacetamidotetramethylrhodamin (IATR, 0,68mg/10mg Aktin) in 100μl DMF lösen (ergibt 5fachen molaren Überschuss), anschließend tropfenweise unter Rühren auf Eis zu Puffer B geben (gleiches Volumen wie die Aktin-Lösung).

   Aktinlösung mit der ITAR-Lösung vermischen, triturieren und 2h auf Eis reagieren lassen.

   Säule äquilibrieren.

   Aktin depolymerisieren

   (a) Zentrifugieren (100 000 g, 1,5h, 4°C)

   (b) Überstand abgießen, 2-4ml Puffer A zugeben, im Potter homogenisieren und über Nacht gegen 2l Puffer A dialysieren (Schlauch abkochen!, Puffer dreimal wechseln).

   (c) Zentrifugieren (100 000 g, 2h, 4°C)

4. Überstand gelfiltrieren. Sephacryl S-300, 1,5 X 100cm. Puffer vorher filtern!

5. Konzentrationsbestimmung an der UV/VIS

   Zwei weitere Polymerisations-/Depolymerisationszyklen mit jeweils 48h Dialyse folgen.

6. Vor Ende der letzten Dialyse Puffer A durch Injektionspuffer C ersetzen

   Konzentrationsbestimmung an der UV/VIS.

   Proteinbestimmung: Falling Ball etc.

Puffer A: 2mM Tris (HCl pH 8,0), 0,2mM $CaCl_2$, 0,5mM ATP, 0,02% NaN_3, 0,2mM DTT (nach pH!)

Puffer A: 100mM Borat, 100mM KCl, 2mM $MgCl_2$, pH 8,5

Puffer A: 1mM Hepes, 0,2mM $MgCl_2$, 0,2mM ATP, pH 7,5

Anhang C

Skizzen zur Magnetischen Pinzette

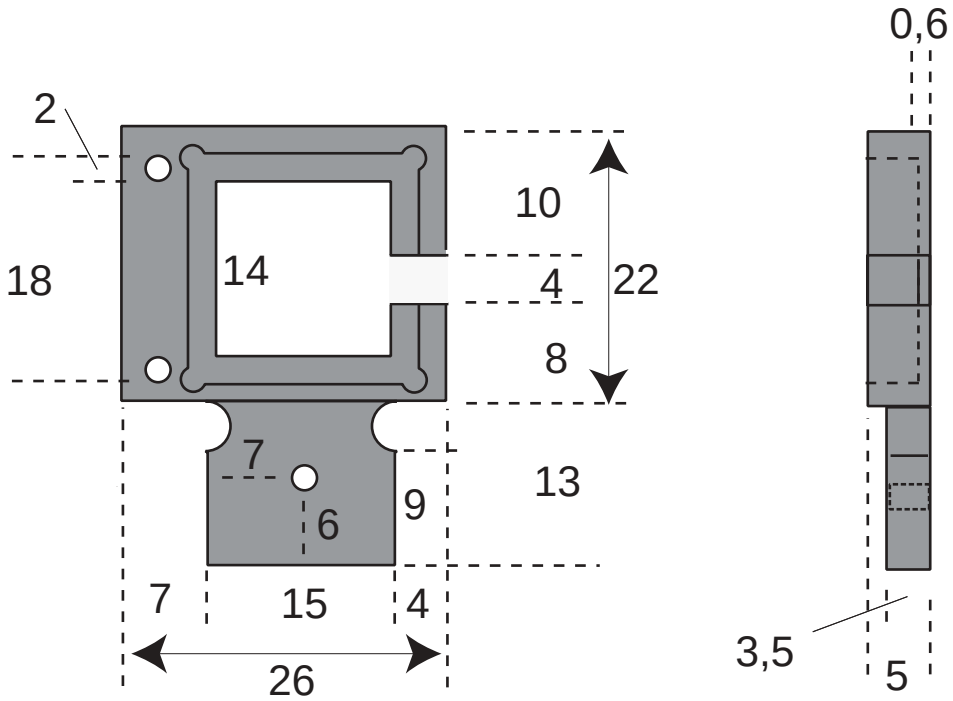
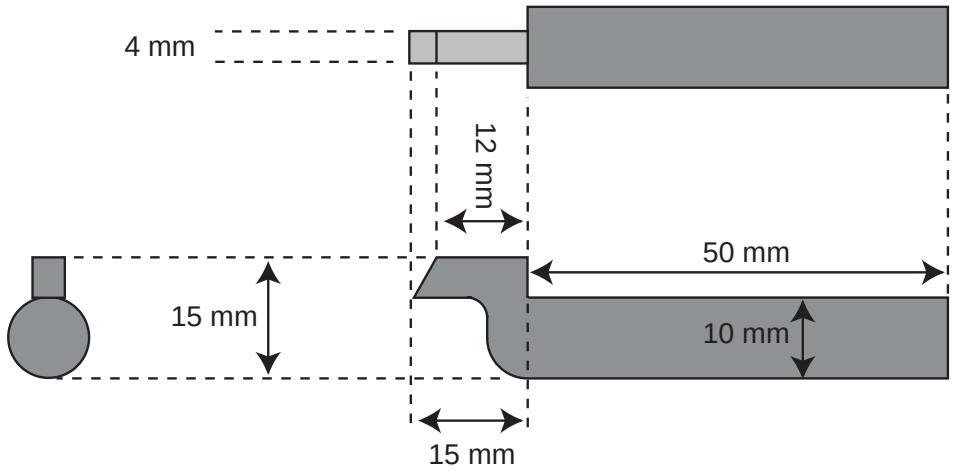
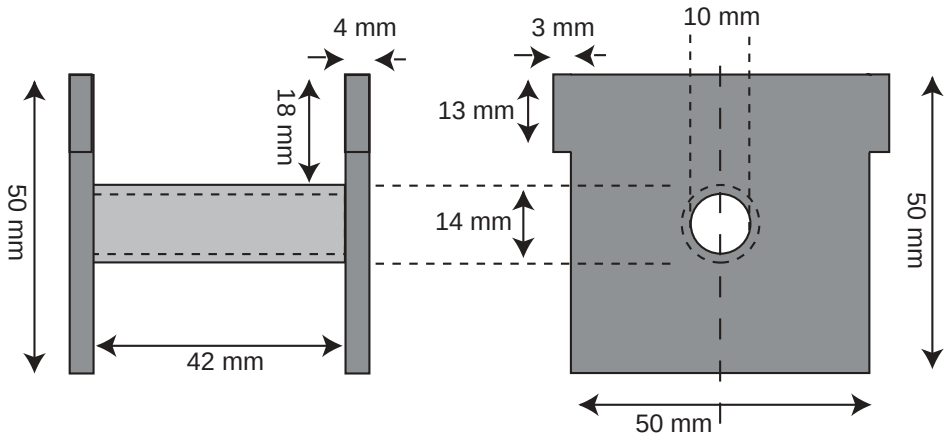


Abbildung C.1: Technische Zeichnung für die Probenkammer. Die Probenkammer ist aus Aluminium gefertigt. Die Größenangaben sind in Millimetern.



A Spulenkern



B Spulenrahmen

Abbildung C.2: Technische Zeichnung für den Kern der Magnetspule und den Rahmen, der als Wickelfläche für den Kupferdraht dient. Der Kern ist aus Weicheisen, der Rahmen aus PVC. Die Größenangaben sind in Millimetern.

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

1.1 Anfärbung von Aktinfilamenten 15
1.2 Anfärbung der Mikrotubuli 16
1.3 Integrin 17

2.1 Vergleich Hellfeld – Phasenkontrast 20
2.2 Chemische Formel von Latrunculin und Nocodazol 22
2.3 Schematische Darstellung der Myosin II Aktivierung 23
2.4 Kopplung der Kugel an die Zellhülle 26

3.1 Der experimentelle Aufbau 29
3.2 Simulation des Magnetfeldes der Spule 30
3.3 Das magnetische Moment der paramagnetischen Kugeln 34
3.4 Magnetfeld an der Kante 34
3.5 Koordinaten einer Eichkurve aufgetragen gegen die Zeit 36
3.6 Eichkurve mit Interpolation 38
3.7 Vergleich zwischen numerischer und analytischer Differentiation . 39
3.8 Kalibrationskurven der Magnetischen Pinzette 40
3.9 Kalibrationskurven für alle möglichen Ströme 41

4.1 Intensitätsprofil einer Kugel 44
4.2 Korrelation einer Helligkeitsverteilung 46
4.3 Nachverfolgung einer Kugeltrajektorie 47

5.1 Feder und Dämpfung 54
5.2 Das Maxwell-Element 55
5.3 Das Voigt-Element 56
5.4 Schematische Darstellung der Adhäsionsscheibe 57

6.1 Beispiel einer Auslenkung durch einen Rechteckpuls 64
6.2 Beispiel eines Experiments 66
6.3 Lineare Skalierung der Kugelauslenkung 67
6.4 Pulse unterschiedlicher Länge 68
6.5 Auslenkung mit Puls von 50 sec Dauer 70
6.6 Auslenkung mit Puls von 50 sec Dauer 70

6.7 Relaxationsmodul 71
6.8 Kartierung der viskoelastischen Eigenschaften einer Zelle 73
6.9 Mechanisches Modell aus drei Voigt-Elementen 74
6.10 Fit mittels mehrerer Voigt-Modelle 75
6.11 Ergebnisse aus einem Modell aus drei Voigtelementen 77

7.1 Beispiel von Dreieckpulsen 83
7.2 Theoretische Auslenkungen durch einen Dreieckpuls 84
7.3 Skalierung der Kugelauslenkung bei Dreieckpulsen 86
7.4 Auslenkung eines Dreieckpulses in Rechnung und Experiment . . 87
7.5 Auslenkung eines korrigierten Dreieckpulses in Rechnung und Experiment 89
7.6 Skizze zur Kriecherholung 90
7.7 Kriecherholung nach einer Auslenkung 91
7.8 Beispiel eines Experiments mit Treppenpulsen 93
7.9 Treppenpuls dargestellt als Summe der Einzelbeiträge 94
7.10 Kriechkomplianzen berechnet aus Treppenpuls 95
7.11 Abnahme der Auslenkungssteigung 97
7.12 Ungewöhnlich starke Auslenkung durch Treppenpuls 99

8.1 Deformationsfeld mit Fibronektin 102
8.2 Deformationsfeld mit α_2-Antikörpern 103
8.3 Deformationsfeld mit Invasin 104
8.4 Sichtbares Deformationsfeld mit Invasin 105
8.5 Abfall des Deformationsfeldes 106
8.6 Fit des Cut-Off-Radius 110

9.1 Wirkung von Zytoskelett-zerstörenden Substanzen 113
9.2 Effekt von Thrombin 114
9.3 Effekt von Histamin 115
9.4 Effekt von LPA. 115
9.5 Effekt von DMSO. 116
9.6 Effekt einer geringen Konzentration von Latrunculin A. 118
9.7 Der Zellkern folgt der Deformation 119
9.8 Zytoskelettfärbung 121

10.1 Osmotisches Modell der Reibungskraft 124
10.2 Doppeltlogarithmische Auftragung der Kugelauslenkung 125
10.3 Endothelzellen im RIKM 127
10.4 Thrombineffekt im AFM 128

C.1 Probenkammer 136
C.2 Spulenkern und -rahmen 137

Tabellenverzeichnis

1.1 Eigenschaften der Zytoskelettproteine und -filamente 14
1.2 Integrine und ihre Bindungspartner 18

6.1 Numerische Werte zur Beschreibung der Kriechkomplianz 76
6.2 Einige Messwerte von Endothelzellen 79
6.3 Vergleich von Endothelzellen und Fibroblasten 80

9.1 Vergleich von Signalweg und Reaktion einer Stimulation 120

Literaturverzeichnis

Abraham, V. C., Krishnamurthi, V., Taylor, D. L. und Lanni, F. (1999). The Actin-Based Nanomachine at the Leading Edge of Migrating Cells, *Biophysical Journal* **77**: 17211732.

Adelstein, R. S., Pato, M. D., de Sellers, J. R., Lanerolle, P. und Conti, M. A. (1982). Regulation of actin-myosin interaction by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **46**: 921.

Aepfelbacher, M. (2002). Persönliche Mitteilung.

Aepfelbacher, M. und Essler, M. (2001). Disturbance of endothelial barrier function by bacterial toxins and atherogenic mediators: a role for Rho/Rho kinase, *Cellular Microbiology* **3**: 649–658.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002). *The Cell*, 4. Aufl., Garland Publishing, Inc., New York.

Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., Blümmel, J., Eck, W., Kantlehner, M., Kessler, H. und Spatz, J. P. (2003). Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces, *ChemPhysChem* **submitted**.

Bärmann, M. (2002). Persönliche Mitteilung.

Bausch, A. R. (2000). *Mikromechanische Untersuchung des Zytoplasmas, der Zellmembran und der Adhäsion mittels Magnetischer Pinzetten*, Dissertation, Technische Universität München.

Bausch, A. R., Hellerer, U., Essler, M., Aepfelbacher, M. und Sackmann, E. (2001). Rapid stiffening of integrin receptor-actin linkages in endothelial cells stimulated with thrombin: a magnetic bead microrheology study, *Biophysical Journal* **80**: 2649–2657.

Bausch, A. R., Ziemann, F., Boulbitch, A., Jacobson, K. und Sackmann, E. (1998). Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell membranes by magnetic bead microrheometry, *Biophysical Journal* **75**: 2038 – 2049.

Boulbitch, A. (2003). Persönliche Mitteilung.

Boulbitch, A. A. (1999). Strain of a biomembrane caused by a local trangential force: Application to magnetic tweezer measurements, *Physical Review E* **59**: 3402–3407.

Braet, F., Rotsch, C., Wisse, E. und Radmacher, M. (1998). Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy, *Applied Physics A* **66**: S575–S578.

Caille, N., Tardy, Y. und Meister, J. J. (1998). Assessment of strain field in endothelial cells subjected to uniaxial deformation of their substrate, *Annals of Biomedical Engineering* **26**: 409416.

Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. und Ingber, D. E. (1997). Geometric control of cell life and death, *Science* **276**: 1425–1428.

Dichtl, M. (2001). *Moleküldynamik und Mikrorheologie von Biopolymernetzwerken: Eine Untersuchung mit kolloidalen Sonden.*, Dissertation, Technische Universität München.

Dichtl, M. A. und Sackmann, E. (1999). Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks, *New Journal of Physics* **1**: 18.1–18.11.

Dichtl, M. und Sackmann, E. (2002). Microrheometry of semiflexible actin networks through enforced single-filament reptation: Frictional coupling and heterogeneities in entangled networks, *Proceedings of National American Science* **99**: 6533–6538.

Door, R., Frösch, D. und Martin, R. (1991). Estimation of Section Thickness and Quantification of Iron Standards with EELS, *Journal of Microskopy* **162**: 17.

Essler, M., Amano, M., Kruse, H. J., Kaibuchi, K., Weber, P. C. und Aepfelbacher, M. (1998). Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and Ist target Rho kinase in human endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry* **273**: 21867–21874.

Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J. M., Aepfelbacher, M. und Siess, W. (1999). Mildly oxidized LDL induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho-kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase, *Journal of Biological Chemistry* **274**: 3036130364.

Fabry, B., Maksym, G. N., Shore, S. A., E.Moore, P., Reynold A. Panettieri, J., Butler, J. P. und Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells, *Physical Review Letters* **87**: 148102–148105.

Feneberg, W., Westphal, M. und Sackmann, E. (2001). Dictyostelium Cells' Cytoplasm as Active Viscoplasitc Body., *European Biophysics Journal* **30**: 284–294.

Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*, 3. Aufl., John Wiley & Sons, New York.

Furst, E. M. (2000). *Optical Trapping and Scattering Studies of Filed-Induced Micromechanics Interactions and Dynamics in a Colloidal Suspension*, Dissertation, Stanford University.

Garcia, J. G., Verin, A. D. und Schaphorst, K. L. (1996). Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability, *Semin Thromb Hemost* **22**: 309.

Glogauer, M., Arora, P., Yao, G., Sokholov, I., Ferrier, J. und McCulloch, C. A. G. (1997). Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching, *Journal of Cell Science* **110**: 11–21.

Gönnenwein, S. (2003). *Generic and Specific Cell Adhesion: Investigations of a Model System by Micro-Interferometry*, Dissertation, Technische Universität München.

Grand, R. J., Turnell, A. S. und Grabham, P. W. (1996). Cellular consequences of thrombin-receptor activation, *Biochemical Journal* **313**: 353–368.

Gu, C. X., Juranka, P. F. und Morris, C. E. (2001). Stretch-activation and stretch-inactivation of *Shaker*-IR, a voltage-gated K^+ channel, *Biophysical Journal* **80**: 2678–2693.

Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R. und Bjorkman, P. J. (1999). Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein, *Science* **286**: 291–295.

Heidemann, S. R. und Buxbaum, R. E. (1998). Cell crawling: first the motor, now the transmission, *The Journal of Cell Biology* **141**: 14.

Hellerer, U. N. B. (1999). *Wirkung von Thrombin auf die lokale Viskoelastizität von Endothelzellen: Untersuchungen mit* Magnetic Tweezers., Diplomarbeit, Technische Universität München.

Hinner, B., Tempel, M., Sackmann, E., Kroy, K. und Frey, E. (1998). Entanglement, elasticity, and viscous relaxation of actin solutions, *Physical Review Letter* **81**: 2614–2617.

Hiramoto, Y. (1969). Mechanical properties of the protoplasm of the sea urchin egg., *Experimental Cell Research* **56**: 201–218.

Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, 1. Aufl., Sinauer Associates, Inc., Sundereland, MA.

Hu, H. und Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart, *Journal of Molecular Cell Cardiology* **29**: 1511–1523.

Janmey, P. A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling, *Physiological Reviews* **78**: 763–781.

Juliano, R. L. und Haskill, S. (1993). Signal Transduction from the extracellular matrix, *Journal of Cell Biology* **120**: 577–585.

Kawakami, K., Tatsumi, H. und Sokabe, M. (2001). Dynamics of integrin clustering at focal contacts of endothelial cells studied by multimode imaging microscopy, *Journal of Cell Science* **114**: 3125–3135.

Keller, M. (2003). *Aktive und Passive Aktin-Myosin-Netzwerke*, Dissertation, Technische Universität München.

Keller, M., Schilling, J. und Sackmann, E. (2001). Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry, *Review of Scientific Instruments* **72**: 3626–3634.

Kornberg, L. J., Earp, H., Turner, C. E., Prockop, C. und Juliano, R. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of β_1 integrins, *Proceedings of National Academy of Science* **88**: 83928396.

Landau, L. D. und Lifschitz, E. M. (1970). *Lehrbuch der theoretischen Physik, Band VII (Elastizitätstheorie)*, Akademie–Verlag, Berlin.

Lorz, B. (1999). *Aufbau und Charakterisierung eines Modellsystems zur Untersuchung der physikalischen Grundlagen der Zell-Gewebe-Wechselwirkung*, Diplomarbeit, Universität Leipzig.

Mahaffy, R. E., Shih, C. K., MacKintosh, F. C. und Käs, J. (2000). Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells, *Physical Review Letters* **85**: 880–883.

Maier, B. (2001). *Conformation, elasticity and replication of DNA studied on a single molecule level*, Dissertation, Technische Universität München.

Maniotis, A. J., Chen, C. S. und Ingber, D. E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure, *PNAS* **94**: 849854.

Mathur, A. B., Truskey, G. A. und Reichert, W. M. (2000). Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells, *Biophysical Journal* **78**: 1725–1735.

Mayerhofer, C. (1996). *Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen des Thrombin-induzierten Kalziumstroms und der Desensibilisierung des Thrombinrezeptors Humaner Endothelzellen*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität.

McGrath, J. L., Tardy, Y., C. F. Dewey, J., Meister, J. J. und Hartwig, J. H. (1998). Simultaneous measurements of actin filament turnover, filament fraction, and monomer diffusion in endothelial cells, *Biophysical Journal* **75**: 20702078.

Meyer, C. J., Alenghat, F. J., Rim, P., Fong, J. H.-J., Fabry, B. und Ingber, D. E. (2000). Mechanical control of cyclic AMP signalling and gene transcription through integrins, *Nature Cell Biology* **2**: 666–668.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K. und Yamada, K. M. (1995a). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function, *Science* **267**: 883–885.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K. und Yamada, K. M. (1995b). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules, *Journal of Cell Biology* **131**: 791–805.

Moolenar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R. und Zondag, G. C. M. (1997). Lysophsophatidic acid: G-protein signalling and cellular responses, *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 168–173.

Morton, W. M., Ayscough, K. R. und McLaughlin, P. J. (2000). Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization, *Nature Cell Biology* **2**: 376–378.

Moy, A. B., Engelenhoven, J. V., Bodmer, J., Kamath, J., Keese, C., Giaever, I., Shasby, S. und Shasby, D. M. (1996). Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces, *The Journal of Clinical Investigation* **97**: 10201027.

Nèeman, I., Fishelson, L. und Kashman, Y. (1975). *Marine Biology* **30**: 293–296.

Neujahr, R., Albrecht, R., Köhler, J., Matzner, M., Schwartz, J.-M., Westphal, M. und Gerisch, G. (1998). Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells, *Journal of Cell Science* **111**: 1227–1240.

Nguyen-Duong, M. (2002). *Chemische Kinetik einzelner spezifischer Bindungen unter Einfluß einer mechanischer Kraft*, Dissertation, Technische Universität München.

Normal, R. E. (1993). Strange Spatio-Temporal Patterns, Self-Organized Universal Crises and Politico-Dynamics via Symmetric Chaos, Neural Networks and the Fractal Wavelet Transform, of the Magic of Names, *Nonlinear Science Today* **1993**: 8–9.

Ohashi, T., Ishii, Y., Ishikawa, Y., Matsumoto, T. und Sato, M. (2002). Experimental and numerical analyses of local mechanical measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells., *Bio-Medical Materials and Engineering* **12**: 319–327.

Reicheicher, M. (1999). *Dynamische Kraftspektroskope an einzelnen spezifischen Bindungen zwischen Integrin $\alpha_3\beta_1$ und Invasin 497.*, Diplomarbeit, Technische Universität München.

Rotrosen, D. und Gallin, J. D. (1986). Histamine type I receptoroccupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers, *Journal of Cell Biology* **103**: 2379–2387.

Rotsch, C. und Radmacher, M. (2000). Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atmoic force microscopy strudy, *Biophysical Journal* **78**: 520–535.

Sackmann, E., Bausch, A. R. und Vonna, L. (2002). Physics of composite cell membrane and actin based cytoskeleton, *in* H. Flyvbjerg, F. Jülicher und P. O. F. David (eds), *Physics of bio-molecules and cells*, Les Houches Session LXXV, Springer-Verlag, p. 237.

Sato, M., Wheeler, D. P. T. L. T., Ohshima, N. und Nerem, R. M. (1990). Application of the micropipette technique to the measurement of cultured procine aortic endothelial cell viscoelastic properties, *Journal of Biomechanical Engineering* **112**: 263–268.

Schilling, J. (1999). *Entwicklung einer Echtzeit-Bildverarbeitungssoftware und digitaler Videoaufnahmetechnik zur quantitativen Mikorrheometrie von Aktin-Netzwerken*, Diplomarbeit, Technische Universität München.

Schindl, M. (1995). *Über den Einfluß von Adhäsion und Mutationen des Zytoskeletts auf die amöboide Zellbewegung*, Dissertation, Technische Universität München.

Schmidt, C., Pommerenke, H., Dürr, F., Nebe, B. und Rychly, J. (1998). Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins, *Journal of Biological Chemistry* **273**: 50815085.

Schmidt, F. G. (1999). *Mikrorheologie von Netzwerken semiflexibler Biopolymere*, Dissertation, Technische Universität München.

Schmidt, F. G., Hinner, B. und Sackmann, E. (2000). Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on F-actin solutions compared to macrorheometry, *Physical Review E* **61**: 5646–5653.

Schmidt, F. G., Ziemann, F. und Sackmann, E. (1996). Shear field mapping in actin networks by using magnetic tweezers, *European Biophysical Journal* **24**: 348–353.

Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. und Aepfelbacher, M. (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions, *PNAS* **96**: 69316936.

Simon, J. R., Gough, A., Urbanik, E., Wang, F., Lanni, F., Ware, B. und Taylor, D. (1988). Analysis of rhodamine and fluorescein-labeled F-actin diffusion in vitro by fluorescence photobleaching recovery, *Biophysical Journal* **54**: 801–815.

Simson, R. (1998). *Untersuchung der elastischen und plastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mittels mikro-optischer und mikromechanischer Methoden*, Dissertation, Technische Universität München.

Spector, I., Shochet, N., Blasberger, D. und Kashman, Y. (1989). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D, *Cell Motility & The Cytoskeleton* **13**: 127–144.

Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y. und Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells, *Science* **219**: 493–495.

Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells, *Science* **260**: 1086–1094.

Stossel, T. P. (1994). The machinery of cell crawling motion, *Scientific American* **271(3)**: 54–63.

Strigl, M., Simson, D. A., Kacher, C. M. und Merkel, R. (1999). Force-induced dissociation of single protein A-IgG bonds, *Langmuir* **15**: 7316–7324.

Tempel, M. (1996). *Aktinbindende Proteine als Membran/Zytoskelett-Koppler und als Modulatoren der Viskoelastizität von Aktinnetzwerken*, Dissertation, Technische Universität München.

Ter Haar, D. (1950a). A phenomenological theory of visco-elastic behaviour I, *Physika* **16**: 719–737.

Ter Haar, D. (1950b). A phenomenological theory of visco-elastic behaviour II, *Physika* **16**: 738–752.

Ter-Oganessian, N., Feneberg, W., Keller, M., Sackmann, E. und Boulbitch, A. (2003). Osmotic resistive force in bead micro-rheology. in preparation.

Trevithick, C. C., Chartrand, M. M., Wahlman, J., Rahman, F., Hirst, M. und Trevithick, J. R. (1999). Shaken, not stirred: bioanalytical study of the antioxidant activites of martinis, *British Medical Journal* **319**: 1600–1062.

Tschoegl, N. W. (1989). *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior*, Springer-Verlag, Heidelberg.

Tseng, Y., Kole, T. P. und Wirtz, D. (2002). Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology, *Biophysical Journal* **83**: 3162–3176.

Uhde, J. (2003). Persönliche Mitteilung.

Vonna, L. (2002). Persönliche Mitteilung.

Vonna, L., Wiedemann, A., Aepfelbacher, M. und Sackmann, E. (2003). Local force induced conical protrusions of phagocytic cells, *submitted* **submitted**: submitted.

Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I. und Aepfelbacher, M. (2001). *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via β_1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages, *Cellular Microbiology* **3**: 693–702.

Wysolmerski, R. B. und Lagunoff, D. (1990). Involvment of myosin light chain kinase in endothelial cell retraction, *Proceedings of National Academy of Science* **87**: 16–20.

Yamada, K. M. und Geiger, B. (1997). Molecular interactions in celladhesion complexes, *Current Opinions in Cell Biology* **9**: 7685.

Yamada, K. M. und Miyamoto, S. (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control, *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 681–689.

Yamada, S., Wirtz, D. und Kuo, S. C. (2000). Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology, *Biophysical Journal* **78**: 17361747.

Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I. und Bubb, M. R. (2000). Actin-Latrunculin A structure and function: differential modulation of actin-binding protein function by Latrunculin A, *Journal of Biological Chemistry* **275**: 2812028127.

Ziemann, F. (1997). *Untersuchungen der lokalen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer („Magnetic Tweezer“)*, Dissertation, Technische Universität München.

Ziemann, F., Rädler, J. und Sackmann, E. (1994). Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead rheometer, *Biophysical Journal* **66**: 2210–2216.