

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am: 31.08.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. D. B. Jones
Korreferent: PD Dr. M. Schnabel
2. Korreferent: Prof. Dr. B. Steiniger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenaufbau	2
1.2	Mechanotransduktion	5
1.3	Elektrische Felder	7
1.3.1	Wirkungen elektrischer Felder auf Osteoblasten	7
1.3.2	Zelluläre Orientierung im elektrischen Feld	8
1.3.3	Osteoblasten im elektrischen Feld	9
1.3.4	Calciummessungen von Osteoblasten im elektrischen Feld	11
1.4	Welche Kräfte wirken in Zellen?	13
1.5	Verschiedene Methoden zur Messung zellulärer Kräfte	14
1.5.1	Eine geeignete Methode für die Zielsetzung	15
1.5.2	Anpassung der Substrate an die Rahmenbedingungen	16
1.5.3	Verarbeitung der Daten	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Polyacrylamid Substrate für die Zugkraftmessung	18
2.1.1	Vorbereiten der Deckgläser als Substratunterlage	19
2.1.2	Gießen der flexiblen Substrate aus Polyacrylamid	20
2.1.3	Beschichten der flexiblen Substrate mit Collagen	21
2.1.4	Sterilisieren der Substrate	22
2.2	Zellkultur	22
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen	22
2.2.2	Passagieren	24
2.2.3	Gewinnung primärer boviner Osteoblasten	24
2.2.4	Kryokonservierung	26
2.2.5	Phänotypisierung der Osteoblasten	26
2.2.6	Aussäen der Zellen auf die Substrate	27

2.3	Bestimmung physikalischer Eigenschaften der Substrate	27
2.3.1	Die Münzmethode	28
2.3.2	Die Mikrobalkmethode	28
2.3.3	Die Rasterkraftmikroskopmethode (AFM)	29
2.4	Calciumionenmessungen	33
2.5	Durchführung der Experimente zu den Zugkraftmessungen	33
2.5.1	Messungen zum Vergleich verschiedener Zelltypen	34
2.5.2	Cytochalasin D Experimente	34
2.5.3	Messungen an GFP-Aktin transfizierten Zellen	35
2.5.4	Applikation elektrischer Felder auf Zellen in Kultur	35
2.6	Die Analyse der Zugkraft	38
2.6.1	Bestimmung des Zellumrisses	38
2.6.2	Determinieren der Ursprungsknoten für die Kraftvektoren	39
2.6.3	Erstellen der Deformationsmatrix	39
2.6.4	Zur Darstellung der Bilder	42
2.6.5	Berechnen der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt	44
3	Ergebnisse	48
3.1	Elastizitätseigenschaften der Substrate	48
3.2	Phänotypisierung der Osteoblasten	49
3.3	Qualität der Kraftvektorberechnung	50
3.4	Muster der Kraftverteilung von POB und Mg63 Zellen	52
3.5	Statistik zu den Gesamtkräften	54
3.6	GFP-Aktin transfizierte Zellen	55
3.7	Zellen unter dem Einfluss elektrischer Felder	57
3.7.1	Orientierung auch auf flexiblen Substraten?	57
3.7.2	Ändert sich die Gesamtzugkraft?	57
3.7.3	Differenzvektorbilder	59
3.7.4	Änderungen nach 30 Sekunden	60

3.7.5	Kontrollversuche	63
3.7.6	Der Orientierungsprozess	64
3.7.7	Kraftmuster während der Orientierung	67
4	Diskussion	69
4.1	Bestimmung des Elastizitätsmoduls mit dem AFM	69
4.2	Unterschiedliches Kraftniveau	70
4.3	Motilität von Osteoblasten	70
4.4	Orientierung im elektrischen Feld	72
4.4.1	Fokale Kontakte	73
4.4.2	Verzögerte Calciumantwort	73
4.4.3	Durotaxis	76
4.4.4	Galvanotaxis	77
4.4.5	Converse Flexoelektrizität	77
4.4.6	Technische Hürden	79
5	Zusammenfassung	80
	Literatur	82
A	Anhang	I
A.1	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	I
A.2	Danksagung	II
A.3	Ehrenwörtliche Erklärung	III

1 Einleitung

Einen wichtigen Ausgangspunkt für die Forschung im Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg (EOBM) stellt die Osteoporoseforschung dar. Den Stand der Forschung und noch offene Fragen gilt es hier zunächst kurz aufzuzeigen. Der Knochen reagiert auf mechanische Stimulation mit Umbauvorgängen. D.h. die Knochenzellen sind in der Lage diese mechanischen Stimuli als Reiz aufzunehmen und darauf zu reagieren. Es ist aber noch nicht endgültig geklärt, welche der Zellen im Knochen diesen Stimulus wahrnehmen. Dass aber Osteoblasten auf bestimmte mechanische Stimuli reagieren, konnte schon vielfach gezeigt werden. Geklärt ist aber noch nicht, wie die Information über eine mechanische Stimulation anschließend in der Zelle weiterverarbeitet wird. Das EOBM Labor bemüht sich, wie auch viele andere Arbeitsgruppen, um die Aufklärung der Signalkaskade von Osteoblasten bei mechanischer Aktivierung. Ein naheliegender Ansatz zur Erforschung dieser ungeklärten Phänomene ist das einfache Beobachten der lebenden Zellen. Ziel dabei ist es Erkenntnisse zu sammeln, die bei einer gezielten und ökonomischen Forschungsplanung zur weiteren Aufklärung der Mechanismen essentiell sind. Jede Zelle übt bei der Interaktion mit ihrer direkten Umgebung auf diese Kräfte aus. Ob sich diese Kräfte auf einen Stimulus hin ändern und wann sie es tun, würde viel über die zugrundeliegenden Antwortmechanismen der Zelle verraten. Eine Technik zur Messung solcher Interaktionskräfte ist erst in den letzten Jahren entwickelt worden, vor allem deshalb, weil der nötige Rechenaufwand für eine akzeptable örtliche Auflösung der Kräfte nicht unerheblich ist. Da aber inzwischen auch sehr leistungsfähige Personalcomputer erhältlich sind, ist diese Technik auch ohne Supercomputer in einem durchschnittlich ausgerüsteten Labor durchführbar.

Des Weiteren beschäftigt man sich in der EOBM mit der Wirkung von elektrischen Feldern auf Osteoblasten. Elektrischer Strom und elektrische Felder werden in der Therapie bestimmter Erkrankungen klinisch eingesetzt. Erfolge konnten in klinischen Studien teilweise auch nachgewiesen werden. Auch auf Zellen in Kultur haben elektrische Felder einen Effekt. Aber wie die verschiedenen Reaktionen auf elektrische Felder zustande kommen, ist noch nicht geklärt. Im Kapitel 1.3.2 auf Seite 8 wird beschrieben werden, dass Osteoblasten sich im elektrischen Feld aktiv senkrecht zu den Feldlinien ausrichten. Diese Ausrichtung ist physikalisch nur vorstellbar, wenn sich dabei auch die Interaktionskräfte der Zelle mit der Umgebung ändern. Erkenntnisse über die Richtung, die Größenordnung sowie den zeitlichen Verlauf dieser Kräfte wären für die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanis-

men extrem wichtig. Ein Ziel dieser Arbeit soll unter anderem sein, diese Fragen zu beantworten. Um die Zielsetzung der Arbeit verständlich darzustellen, ist es angebracht zunächst die verschiedenen Teilgebiete genauer zu erörtern.

1.1 Knochenaufbau

Das menschliche Skelett besteht zum größten Teil aus Knochen. Dabei kommen den Knochen verschiedene Aufgaben zu. Während der Schutz des Gehirns eine der wichtigsten Aufgaben der Schädelkalotte ist, kommt es bei den Wirbelkörpern besonders auf deren stützende Funktionen an. Bei den Extremitäten spielt vor allem die Hebelfunktion der Röhrenknochen, neben der axialen Stützfunktion, eine wichtige Rolle. Von allen Knochen des Körpers gleichermaßen wird die metabolische Funktion des Knochens als Calciumspeicher wahrgenommen. Um den Blutcalciumgehalt konstant zu halten, dient das Skelettsystem als Puffer, der normalerweise ca. 99% des Körpercalsiums und damit etwa 1 kg speichert. Lebender Knochen besteht aus den Knochenzellen und der Interzellulärsubstanz. Die Interzellulärsubstanz besteht zu 50% aus Mineralien und zu jeweils 25% aus Hydratationswasser und organischen Verbindungen. Bei den Mineralien überwiegen nadelförmige Kristalle aus Hydroxylapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Diese sind von einem Hydratmantel umgeben. Die organischen Verbindungen der Matrix spielen insofern hier noch eine besondere Rolle, als man anhand einiger spezifischer Proteine die Zellen phänotypisieren kann. Somit kann man auch bei Zellen in Kultur nachweisen, dass es sich um Osteoblasten handelt. Über 90% des organischen Materials der Interzellulärsubstanz besteht aus Kollagenfasern. Kollagenfibrillen bilden sich aus einer rechtsgängigen Tripelhelix aus Polypeptidsträngen, die aus repetitiven Sequenzen von 3 Aminosäuren gebildet werden. Dabei ist typischerweise jede dritte Aminosäure Glycin. Die beiden anderen Aminosäuren werden häufig von Prolin und Hydroxyprolin besetzt. Die für die Funktion wichtige Hydroxylierung geschieht durch Dioxygenasen, welche Vitamin C abhängig sind (Koolman and Röhm, 1997). Darum ist auch die Zugabe von Vitamin C zu Osteoblasten in Zellkulturen sinnvoll. Kollagen wird als Prokollagen in den Extrazellulärraum abgegeben. Erst dort bilden sich weitere intra- und intermolekulare Vernetzungen aus, wodurch dann die extrem zugfesten, nicht wasserlöslichen Kollagenfibrillen zustande kommen. Im Knochen findet sich zu 94% Typ I Kollagen, der Rest entfällt auf Typ III und Typ V Kollagen (Whitson et al., 1984). Das von Osteoblasten gebildete Osteocalcin ist das zweit häufigste Matrixprotein. Es lässt sich durch $1,25 - (OH)_2D_3$ stimulieren und ihm wird eine wichtige Funktion in der Calciummobilisation aus den Knochen

zugeschrieben (Lian et al., 1985). Das von Osteoblasten synthetisierte Osteopontin spielt eine Rolle in der Adhäsion der Osteoblasten an die extrazelluläre Matrix (Oldberg et al., 1986). Osteopontin wird auch von Osteosarkomzellen synthetisiert (Prince and Butler, 1987). Des Weiteren kommen z.B. Osteonektin und Glykosaminoglykane in der Knochengrundsubstanz vor. An zellulären Bestandteilen kann man die Knochenzellen in vier Typen einteilen: Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Aufgabe der vielkernigen Osteoklasten ist der Knochenabbau, während Osteoblasten für die Synthese der Knochenmatrixproteine verantwortlich sind. Osteoblasten entwickeln sich aus den Vorläuferzellen, welche mesenchymaler Herkunft sind und der Knochenoberfläche aufliegen. Vor allem während des Knochenwachstums und der Knochenheilung sind sie aktiv. Die Osteoblasten wiederum bekleiden als einschichtiges Epithel die Oberfläche von Knochenbälkchen. Die Höhe dieses Epithels korreliert mit der Syntheseaktivität der Osteoblasten. Erhöhte Osteoblastenaktivität schlägt sich auch in erhöhten Serumspiegeln von alkalischer Phosphatase nieder. Osteoblasten geben die produzierten Proteine nicht an allen Zellseiten in die Umgebung ab. Sie sind somit polarisiert und, wie auch immer, räumlich orientiert. Der Zellkern liegt üblicherweise auf der Seite die keine Knochenmatrix sezerniert. Wenn sich Osteoblasten komplett mit Knochenmatrix eingemauert haben, bezeichnet man sie als Osteozyten. Diese sind in Schichten angeordnet, liegen in ca. 30 μm langen Knochenhöhlen und stehen durch feine Zytoplasmaausläufer über Gap junctions untereinander in Verbindung (siehe Abbildung 1). Diese ca. 1 μm dicken Ausläufer verlaufen in knöchernen Kanälchen, füllen diese aber nicht komplett aus. Diese Kanälchen erhalten Zugang zu den blutgefäßführenden Zentralkanälen und dienen somit auch der Ernährung.

Bei der Neubildung von Knochen und bei der Knochenbruchheilung entsteht zunächst der so genannte Geflechtknochen. Bei dem Geflechtknochen haben die Kollagenfasern keine einheitliche Orientierungsrichtung und auch die Osteozyten liegen unregelmäßig verteilt im Knochen. Um aber den oben genannten verschiedenen mechanischen Anforderungen gerecht zu werden, hat die Evolution unterschiedliche Knochenarchitekturen hervorgebracht. Man geht davon aus, dass die Architektur des Knochens bei der Knochenbildung nicht genetisch determiniert ist, sondern dynamisch auf mechanische Stimuli reagiert und sich daran anpasst. Dadurch wird höchste mechanische Stabilität mit geringem Gesamtvolumen erreicht. Nur ca. 10% der Gesamtgewichtskraft eines Menschen werden durch das Skelett verursacht. Vereinfacht ausgedrückt wird dies erreicht, indem mechanisch nicht beanspruchte Knochen substanz abgebaut wird und neue Spongiosabälkchen entlang der Hauptspannungslinien angeordnet werden. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass es

möglich ist, gleichartige Knochenarchitektur mit relativ einfachen mathematischen Regeln von einem Computer zu erhalten, wenn dieser die in vivo Belastung der entsprechenden Knochen simuliert (Huiskes et al., 2000). Durch diese aktive Reaktion und Ausrichtung der Knochenhartschubstanz an der mechanischen Hauptbelastung entsteht der Lamellenknochen, der sich durch Lamellen und Knochenkanälchen auszeichnet (siehe Abbildung 1). Diese 3-7 μm dicken Lamellen enthalten größtenteils gleichsinnig schraubenförmig angeordnete Kollagenfasern. In der Regel ist die Laufrichtung der Kollagenfaser in benachbarten Lamellen um 90° verschieden, es gibt aber auch immer einige Fasern, die nicht der Hauptverlaufsrichtung der Lamelle folgen. An den Grenzschichten zu den benachbarten Lamellen reihen sich die Osteozyten auf. 3-20 dieser Lamellenschichten legen sich um einen Zentralkanal und bilden so eine typische Baueinheit der Diaphysen: ein so genanntes Osteon. Diese Baueinheiten der Diaphysen sind zylindrisch, teilweise mehrere Zentimeter lang und parallel zur Knochenlängsachse angeordnet. Beim Knochenumbau werden diese Osteone nicht immer komplett abgebaut, dadurch liegen zwischen den neuen Osteonen häufig so genannte Schaltlamellen, die aus Teilen alter Lamellen bestehen.

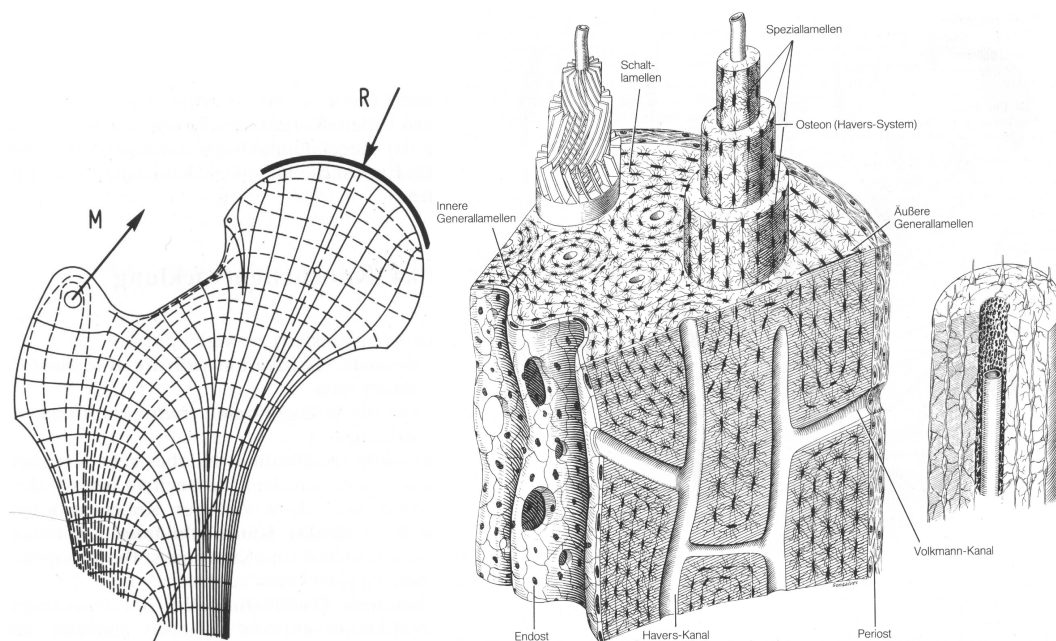


Abbildung 1: Links: Die Hauptspannungslinien (Trajektorien) in proximalen Femuren, an die sich die Anordnung der Spongiosabälkchen orientiert. R ist die resultierende Druckkraft, M symbolisiert die Zugrichtung durch Muskeln. Übernommen aus Pauwels (1965). Mitte: Schemazeichnung der Substantia compacta einer Röhrenknochendiaphyse. Übernommen aus Schiebler et al. (1996). Rechts: Osteon mit einem Blutgefäß im Zentralkanal (Schiebler et al., 1996).

Periost nennt man die Schicht, die den Knochen umgibt. Das Periost enthält Kolla-

genfasern, Fibroblasten, Knochenvorläuferzellen und Nerven. Das Vorkommen von Nerven erklärt die Schmerzempfindlichkeit des Periosts. Die Knochenvorläuferzellen wandern bei Bedarf aus und bilden neue Osteoblasten, was für die Gewinnung von Osteoblasten für die Zellkultur ausgenutzt wird (siehe 2.2.3).

Neben der bereits erwähnten Bildung und Umwandlung von Knochen durch mechanische Stimulierung, spielen auch Hormone beim Knochenaufbau eine entscheidende Rolle. Einen Einfluss auf die Knochenbildung haben Hormone wie Parathormon, Calcitonin, somatotropes Hormon und die Geschlechtshormone. Der relative Mangel an Geschlechtshormonen äußert sich besonders bei Frauen nach dem Klimakterium als Osteoporose, bei welcher der Knochenabbau größer ist als der Knochenaufbau. Dabei kommt es zu einer Verminderung der Knochenmasse je Volumeneinheit, die das alters- und geschlechtsspezifische Maß der natürlichen Atrophie überschreitet. Grundsätzlich werden eine primäre und eine sekundäre Form der Atrophie unterschieden. Bei der sekundären tritt die Knochenstoffwechselstörung aufgrund einer anderen Krankheit auf. Die physikalische Therapie nimmt bei der Osteoporose und deren Prophylaxe einen großen Stellenwert ein. Es ist seit langer Zeit bekannt, dass sich der Aufbau von Knochenmasse durch Bewegung und Belastung der Knochen stimulieren lässt. Gebken et al. (1999) konnte eine Zunahme der Kollagenproduktion von Osteoblasten nachweisen, wenn sie erhöhter Gravitation ausgesetzt sind. Bei vermehrter Bettruhe (Zerwekh et al., 1998) und in der Schwerelosigkeit bei Raumfahrtexperimenten (Morey and Baylink, 1978) konnte eine Verminderung der Knochenneubildung nachgewiesen werden.

1.2 Mechanotransduktion

Viele Zelltypen sind darauf spezialisiert, mechanische Reize der Umwelt wahrzunehmen und darauf zu reagieren, wie z.B. das menschliche Hörorgan oder das Tastorgan. Den Übertragungsmechanismus vom mechanischen Reiz zur zellulären Antwort nennt man Mechanotransduktion. Für Osteoblasten ist der Mechanotransduktionsweg noch nicht aufgeklärt, aber sie reagieren mit erhöhter Zellteilungsrate auf mechanische Belastung (Jones et al., 1991). Duncan and Turner (1995) teilen die Mechanotransduktion in vier Schritte ein. Den ersten Schritt stellt die mechanische Kopplung des Reizes an die Zelle dar und er beschreibt somit, wie die mechanische Kraft auf die Zelle wirkt. Der zweite Schritt besteht aus der biochemischen Kopplung. Er beinhaltet damit die biochemischen Reaktionen, die der erste Schritt in der Zelle auslöst. Die Übermittlung des Signals kann man als nächsten Schritt abgrenzen. Als vierter Schritt wird die Antwort der Zelle auf den mechanischen

Reiz definiert. Schon über den ersten Schritt dieser Mechanotransduktion bei Osteoblasten gibt es divergierende Aussagen in der Literatur. Chiquet (1999) hält für Bindegewebe eine direkte Kopplung der Kraft von extrazellulärer Matrix über Integrine auf das Zytoskelett für wahrscheinlich. Pommerenke et al. (2002) konnte die Aktivierbarkeit der Signalkaskade durch direktes Ziehen an Integrinen nachweisen, was auch eher dafür spricht, dass Osteoblasten die mechanischen Deformationen der extrazellulären Matrix verarbeiten. Auf der anderen Seite halten Owan et al. (1997) eher den Flüssigkeitsfluss in den Knochenkanälchen, der durch mechanische Deformation der Knochen entsteht, für den auslösenden Stimulus der Knochenproliferation durch Belastung. Wie dadurch aber die Trajektorienbauweise zustande kommen soll, vermag diese Theorie nicht zu erklären. Denn ein durch Knochen deformation erzeugter Überdruck in den flüssigkeitsgefüllten Knochenkanälchen transportiert nicht die Information über die Belastungsrichtung des Knochens, vielmehr wird die Flussrichtung nur durch die Architektur der Knochenkanälchen bestimmt. Nicht nur für die Aufklärung der Mechanotransduktionsvorgänge, sondern auch für die therapeutische Behandlung von Knochenbrüchen oder Osteoporose ist es wichtig zu wissen, welche Form der mechanischen Belastung für die Knochenneubildung am effektivsten ist. Frost (1987) hat mit seiner "Mechanostat" Theorie versucht die Grenzwerte zu finden, die an Längenänderung notwendig sind, um eine entsprechende Reaktion auf diese mechanische Deformierung zu erhalten. "Minimum effective strain" (MES) beschreibt die geringste Dehnung, die nötig ist, um eine Reaktion der Knochenzellen auf einen Dehnungsreiz zu erhalten. Der Übersichtlichkeit halber wird die relative Längenänderung der Knochen in $\mu m/m$ gemessen. Frost (1987) teilt die Belastung in vier Bereiche ein. Der Bereich für physiologische Belastung wurde von ihm für Längenänderungen zwischen $50 - 200 \mu m/m$ und $1500 - 2500 \mu m/m$ angegeben. Geringere Belastungen führten dann zu einem vermehrten Knochenabbau, der durch den Knochenaufbau nicht kompensiert wird, bis die verbleibende Knochensubstanz bei gleichbleibenden Kräften eine stärkere Deformation erfährt und somit wieder ein Gleichgewicht besteht. Ab dem MES Wert von mehr als $1500 - 2500 \mu m/m$ sei die Knochenbilanz positiv. Aber ab Werten von $4000 - 5000 \mu m/m$ sei die Belastung als pathologisch anzusehen und fördere nicht mehr den geordneten Aufbau von Knochen. Diese Grenzen seien aber nicht als steif anzusehen sondern unterlägen der Regulation von biochemischen Botenstoffen.

Die Aufklärung der Mechanotransduktionskaskade wird auch in der EOBM Abteilung versucht. Zu diesem Zweck wurden für diese Arbeit hauptsächlich primäre bovine Osteoblasten (POB) und osteoblastenähnliche Osteosarkomzellen (MG63) verwendet. Die Osteosarkomzelllinie MG63 ist ebenso mechanosensibel wie POBs

(Jones et al., 1991), hat aber den Vorteil viel leichter transfizierbar zu sein.

1.3 Elektrische Felder

Die Wirkung von elektrischen Feldern auf Organismen, Organe und einzelne Zellen sowie auf Zellbestandteile ist bereits in vielen Arbeiten untersucht worden, die genauen Mechanismen der festgestellten Reaktionen sind aber noch nicht geklärt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Reaktionen der Zellen von der Feldstärke und der Zellart abhängig sind. Auch gleichen sich Verhalten bei Gleichstrom und Wechselstrom nicht.

Brighton et al. (1976) konnten zeigen, dass Chondrozyten durch elektrische Felder proliferieren. Obwohl der Mechanismus auch heute noch nicht bekannt ist, wird elektrischer Strom mit Erfolg in der Therapie von Knorpelbeschwerden oder Pseudarthrosen eingesetzt.

1.3.1 Wirkungen elektrischer Felder auf Osteoblasten

Elektrische Felder führen zu einer beschleunigten Zellkulturentwicklung von primären Osteoblasten (Hartig et al., 2000). In einer klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von elektrischem Gleichstrom sich positiv auf den Heilungsprozess von Pseudarthrosen auswirkt (Brighton et al., 1975). Osteoblastenähnliche Zellen lassen durch Elektrostimulation auch eine Steigerung der Mineralisation erkennen (Wiesmann et al., 2001).

Das elektrische Felder nicht nur zu einer Vermehrung von DNA führen, sondern diese Vermehrung sich auch durch Calciumkanalblocker wie Verapamil blockieren lässt, zeigt, dass Calcium für die Proliferation durch elektrische Felder als Botenstoff gebraucht wird (Brighton et al., 2001; Ozawa et al., 1989). Werden Osteoblasten in Kultur für eine bestimmte Zeit einem elektrischen Feld ausgesetzt, reagieren sie nach einem zeitlichen Intervall mit einem Anstieg an intrazellulärem Calcium Cooper and Schliwa (1985); Onuma and Hui (1988). Auch die osteoblastenähnliche Osteosarkomzelllinie MG63 produziert mehr Collagen und Osteocalcin als Kontrollgruppen, wenn sie unter dem Einfluss von elektrischen Feldern steht, wobei aber die DNA Produktion und die Zellproliferationsrate zurückgeht (Lohmann et al., 2000).

1.3.2 Zelluläre Orientierung im elektrischen Feld

Auf Zellen in Kultur hat das elektrische Feld aber auch noch andere Effekte. Zellen richten sich im elektrischen Feld aus (Cooper and Keller, 1984). In diesem Ausrichtungsprozess ziehen die Zellen zunächst die Zellausläufer zurück, die in Richtung der elektrischen Feldlinien orientiert sind. Es wachsen darauf neue Zellausläufer im rechten Winkel zu den Feldlinien aus. Es bleibt dabei aber die Frage offen, ob elektrische Felder von einer Gleichstromquelle eine direkte mechanische Wirkung in der Zelle haben, oder ob das elektrische Feld einen Parameter der Zelle so ändert, dass die Zelle einen aktiven Orientierungsprozess durchführt. Bemerkenswerterweise ist die Reaktion auf das elektrische Feld abhängig vom Zelltyp. Als Beispiel wandern Epidermale Keratozyten vom Fisch auf die Kathode zu (Cooper and Schliwa, 1985), Spinalneuriten eines *Xenopus Laevis* Embryos wachsen auf Kathode und Anode zu (Stewart et al., 1995) und Fibroblasten eines Hühnerembryos dehnen sich rechtwinklig zu den Feldlinien aus (Harris et al., 1990). Diese Beobachtungen lassen eine passive Reaktion der Zelle auf das elektrische Feld unwahrscheinlich erscheinen. Wie aber die Signaltransduktion von elektrischem Feld zu Prozessen wie Reorganisation des Zytoskelettes und Änderung der Zellmorphologie vor sich geht ist noch nicht geklärt. Es ist vorgeschlagen worden, dass die initiale Retraktion der Zellbegrenzungen die den elektrischen Polen gegenüber liegen, eine Reaktion auf die Störung des Transmembranpotentials ist. Wobei auf der hyperpolarisierten Seite der erhöhte elektrische Spannungsunterschied die treibende Kraft darstellt und auf der depolarisierten Seite spannungsgesteuerte Calciumkanäle in ihrer normalen Funktion gestört werden (Cooper and Keller, 1984; Cooper and Schliwa, 1985). Harris et al. (1990) präsentierte, dass Fibroblasten von Hühnerembryos, die auf Silikonsubstraten kultiviert wurden, mit einem Rückgang an kontraktile Kräfte der den Elektroden gegenüberliegenden Seiten reagieren, wenn sie elektrischen Feldern ausgesetzt werden und das innerhalb von 5 Minuten und damit noch bevor größere Änderungen des Zytoskeletts zu beobachten waren. Auf der anderen Seite legen Untersuchungen durch "Scanning Acoustic Microscopy" (SAM) nahe, dass Zellen unter dem Einfluss von elektrischen Feldern ihre Zellausläufer in Zonen geringer zellulärer Steifigkeit ausbilden und ihre Seiten mit hoher zellulärer Steifigkeit zurückziehen (Bereiter-Hahn and Luers, 1998). Und mithilfe von SAM konnte für Zellen gezeigt werden, die einen Orientierungsprozess unter dem Einfluss elektrischer Felder zeigten, dass die retrahierenden Zellseiten eine hohe zelluläre Steifigkeit und die elongierenden Seiten eine niedrige Steifigkeit aufweisen. Schaut man sich die beiden eben erwähnten Ergebnisse genauer an, scheinen sie kontrovers zu sein. Denn eine erhöhte zelluläre Steifigkeit kommt in einer Zelle

durch einen erhöhten Kontraktionszustand des Zytoskeletts, z.B. durch Interaktionen zwischen Aktin und Myosin, zustande. Wenn solche Filamente unter höherer Spannung stehen, ist es wahrscheinlich, dass dadurch auch ein Teil der Kraft über fokale Kontakte auf das unterliegende Substrat übertragen wird. Das sollte in den Zellkraftmessungen mithilfe eines Silikonsubstrates auch als Anstieg der Kraft zu registrieren sein. An dieser Stelle sollte aber erwähnt werden, dass die beiden Experimente eventuell nicht vergleichbar sind, weil zum einen verschiedene Zelltypen dafür benutzt wurden und zum anderen die schnellen Änderungen der SAM Messungen dem präsentierten Status quo der Zellkraft nach 5 Minuten gegenübersteht. Um die ersten Minuten der Zellorientierung verfolgen zu können, ist eine Methode mit hoher zeitlicher Auflösung nötig, die auch sehr kleine Änderungen der Zellkräfte detektieren kann. Um genau diese Frage anzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Zugkraftmessung nach Dembo et al. (1996) mit leichten Veränderungen (Munevar et al., 2001) an primären bovinen Osteoblasten und der Osteosarkomzelllinie MG63 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf kollagenbeschichteten Polyacrylamidsubstraten in einer dafür vorgesehene Zellkammer elektrischen Feldern ausgesetzt und untersucht. Die Kammer ist in der Abteilung für Experimentelle Orthopädie nach einem Modell von Harris et al. (1990) für solche Experimente entwickelt worden.

1.3.3 Osteoblasten im elektrischen Feld

Der Orientierungsprozess von Osteoblasten ist in der Abteilung für Experimentelle Orthopädie von Herrn M. Miron untersucht worden. Die Ergebnisse sind für das Verständnis der Intention und die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit wichtig, daher wird der Orientierungsprozess von Osteoblasten hier zusammenfassend erläutert.

Die Osteoblasten wurden dazu auf Polyacrylamidgelen kultiviert und einem elektrischen Gleichstromfeld ausgesetzt, wie im Kapitel 2.5.4 auf Seite 35 beschrieben. Osteoblasten richten sich in einem 10 V/cm Feld von einem Gleichstromgenerator rechtwinklig zu den elektrischen Feldlinien aus. Dieser Ausrichtung findet in zwei Stadien statt. In der ersten Phase ist eine Retraktion der Zellseiten zu sehen, die den Elektroden gegenüber liegen. In der zweiten Phase werden neue Zellausläufer an den Seiten sichtbar, die die gleiche Orientierung wie die Feldlinien haben. Dieser Prozess führt dazu, dass die Osteoblasten nach einer gewissen Zeit rechtwinklig zu den Feldlinien ausgerichtet und elongiert sind.

Die Orientierung wird durchschnittlich nach 60 (+/- 10) Minuten deutlich. Nach

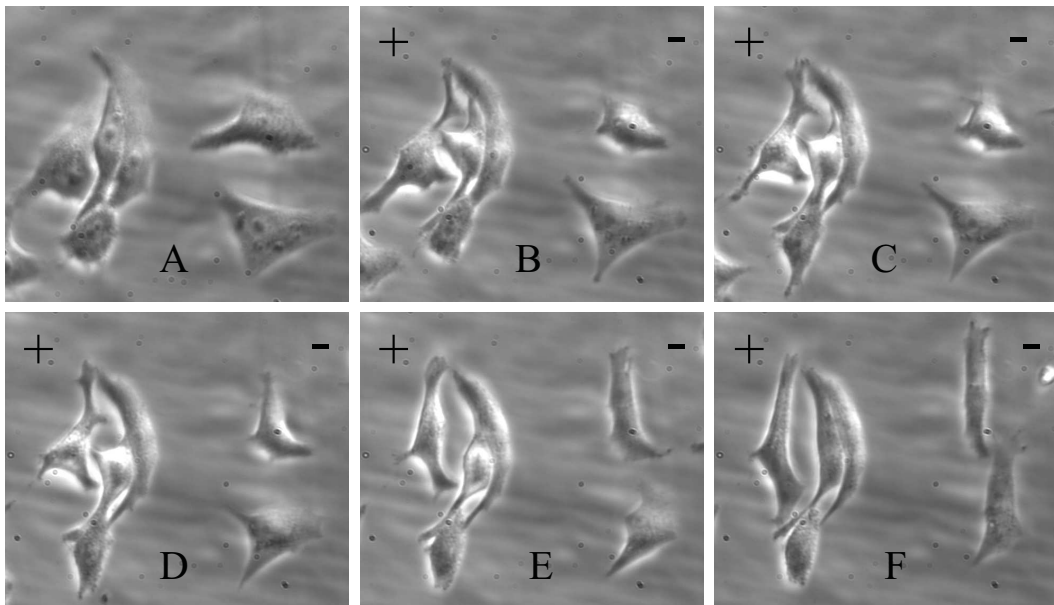


Abbildung 2: Orientierungsprozess von Osteoblasten unter dem Einfluss eines 10 V/cm elektrischen Feldes. Zu Beginn (A), nach 30 (B), 60 (C), 100 (D), 150 (E) und 150 (F) Minuten des Versuches.

120 (+/- 15) Minuten ist der Beginn der Orientierung üblicherweise bei allen Zellen zu erkennen. Nach 180 (+/- 15) Minuten ist die rechtwinklige Ausrichtung zu den Feldlinien normalerweise schon deutlich zu erkennen.

Dabei ist diese Ausrichtung in starkem Maße von der Stärke des elektrischen Feldes abhängig. Die benötigte Zeit für den Orientierungsprozess scheint negativ mit der elektrischen Feldstärke zu korrelieren, was aus Abbildung 3 deutlich wird. Schwächere elektrische Felder führen zu einer langsameren Ausrichtung. Wenn das Feld vor dem Abschluss der Ausrichtung ausgeschaltet wird, bricht auch der Orientierungsprozess ab, und die Zellen beginnen wieder ihre normalen Formen anzunehmen. Erwartungsgemäß müssen die Zellen kontinuierlich einem elektrischen Feld ausgesetzt sein, um die orientierte und elongierte Morphologie anzunehmen und beizubehalten.

Die Retraktion ist nicht unmittelbar nach Einschalten des Feldes zu erkennen, sondern erst nach ein paar Minuten. Der Zeitpunkt ist auch von der Feldstärke abhängig, wie Abbildung 3 verdeutlicht. Bei Feldstärken über 15 V/cm kommt es nach der Retraktion zu keiner Elongation mehr. Abhängig von der Feldstärke gibt es aber noch eine Grenze, die eine Zelle auch nach Retraktion bei einem starken elektrischen Feld überleben kann. Diese Grenze ist als maximal tolerierbare Expositionszeit in Abbildung 3 eingezeichnet. Bei Feldern mit weniger als 7 V/cm ist die Retraktionsphase so langsam, dass sie von der Elongationsphase überdeckt wird.

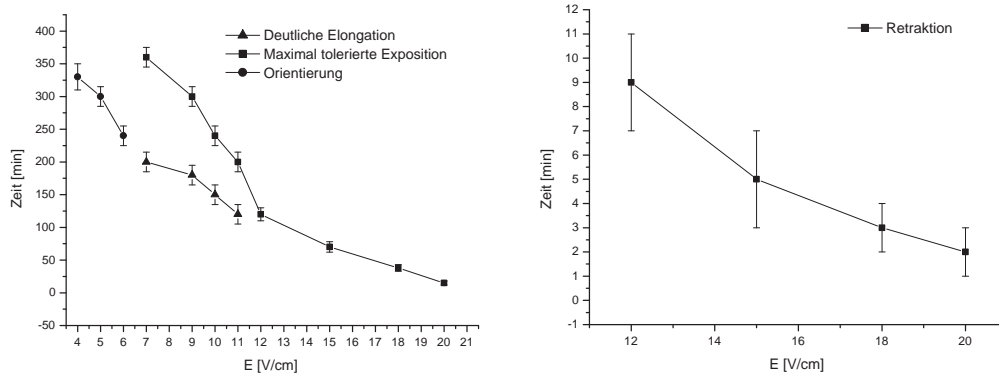


Abbildung 3: Linkes Bild: Osteoblasten wurden elektrischen Feldern verschiedener Stärke ausgesetzt. Die Zeiten für eine deutliche Elongation, für eine deutliche Orientierung und für die maximale tolerable Exposition. (Näheres im Text) Rechtes Bild: Zeitpunkt erster deutlicher Retraktionszeichen in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke.

So ist in einer Zeitrafferaufnahme nur ein Orientierungsprozess ohne differenzierbare Phasen zu erkennen. Einer der Gründe für die relativ aufwendige Konstruktion der Zellokammer für die Durchführung der Versuche mit elektrischen Feldern (siehe 2.5.4) ist eine Erwärmung der Zellen durch den elektrischen Strom. Das rasche Sterben der Zellen bei Feldstärken über 20 V/cm ist wahrscheinlich auf thermische Effekte zurückzuführen. Für Felder unter 15 V/cm konnte mit Infrarotmessungen keine lokale Erwärmung festgestellt werden.

1.3.4 Calciummessungen von Osteoblasten im elektrischen Feld

Miron konnte auch mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2 einen Calciumanstieg als Antwort auf elektrische Felder feststellen. Auch diese Ergebnisse werden für die vorliegende Arbeit wichtig sein, daher wird die Methode im Kapitel 2.4 auf Seite 33 genauer beschrieben. Nach Anschalten des elektrischen Feldes reagierten die Zellen mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären freien Calciums von 31% (s.d. 19). Ein solcher Anstieg freien Calciums war in Kontrollexperimenten nicht zu beobachten. Zu diesem Anstieg kam es allerdings nicht sofort nach dem Anschalten des Feldes, sondern mit einer Verzögerung von 85 Sekunden (n=22, s.d. 62). Die erste Zelle reagierte nach 17 Sekunden. Die Abbildung 4 zeigt ein Beispiel einer Calciumauswertung von einem Experiment mit 6 Zellen bei 10 V/cm. Hier reagierte die erste Zelle nach 34 Sekunden, der Durchschnitt liegt aber bei 78 Sekunden.

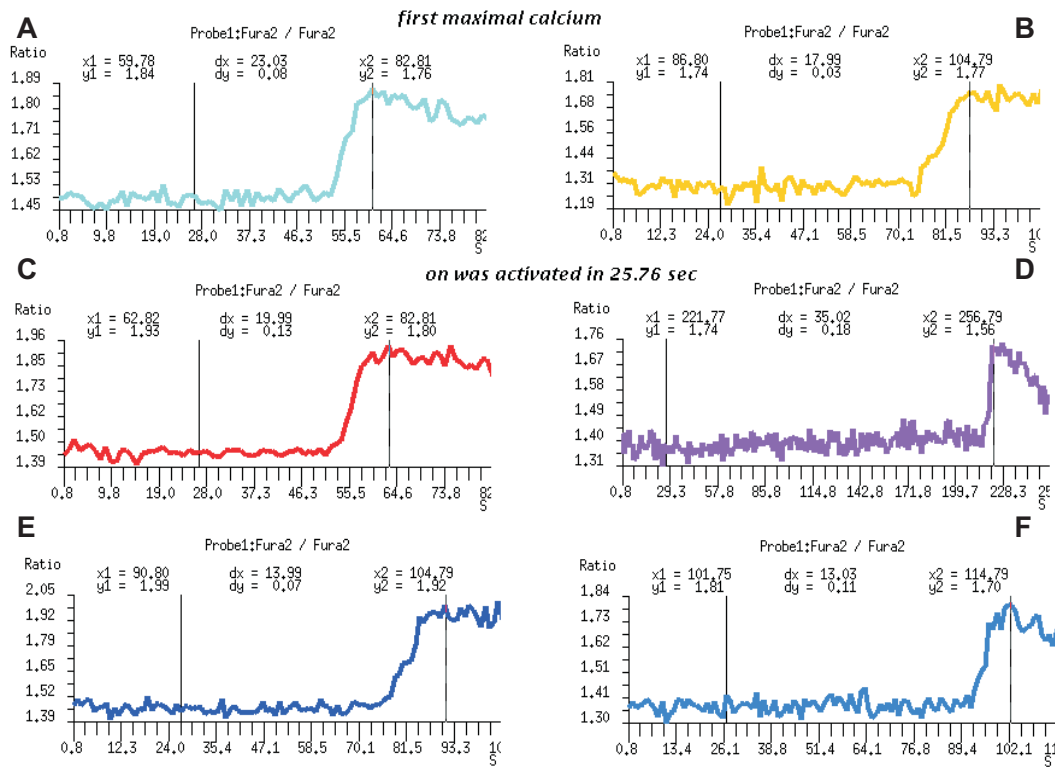


Abbildung 4: Calciumantwort von 6 Zellen unter dem Einfluss eines 10 V/cm Feldes. Das Feld wurde nach 25,76 Sekunden angeschaltet, wie mit dem ersten Balken in den Diagrammen angedeutet. Zelle A reagierte nach 34 Sekunden, Zelle B nach 61 Sekunden, C nach 37, D nach 196, E nach 65 und F nach 76 Sekunden.

1.4 Welche Kräfte wirken in Zellen?

Besonders Muskelzellen sind darauf spezialisiert Kräfte zu erzeugen, aber auch andere Zellen üben auf ihre Umgebung Kräfte aus. Eine wichtige Funktion von Zellen als Bestandteile von Membranen und Organen ist der Verschluss von Wunden und Defekten. Dabei sind oft Zugkräfte nötig, um klaffende Wundränder wieder zusammenzuziehen. Wird dies nicht künstlich bewerkstelligt, so ist es die Aufgabe der Zellen diese Kräfte aufzubringen. In der Interaktion sowohl mit anderen Zellen als auch mit der extrazellulären Matrix treten Kräfte auf. Der genaue Grund für das Auftreten dieser Kräfte ist etwas komplexer als bei den Muskelzellen und größtenteils noch Spekulation. Aber als sehr wahrscheinlich ist die Notwendigkeit dieser Kräfte für die Organmorphogenese, die Wundheilung, für Zellinteraktionen sowie für die Zelllokomotion anzusehen.

Aber auch in der Differenzierung von Zellen spielen mechanische Interaktionen eine Rolle. Zum Beispiel führt mechanischer Druck auf das Myokard zu einer Proliferation von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten (Wang et al., 2003). Das legt die Vermutung nahe, dass auch bei der Differenzierung hin zu Osteoblasten die mechanische Belastung des Knochens eine entscheidende Rolle spielt.

Lokomotion von Zellen in Kultur ist ein vielbeforschtes Gebiet. Dass es bei der Lokomotion einer Zelle zu Kräften zwischen der Zelle und dem Substrat kommen muss, ist nach Newtons drittem Axiom "actio = reactio" auch nachzuvollziehen. Aber jeder, der mit Zellkulturen arbeitet und Erfahrung mit dem Ablösen von Zellen von dem Zellkulturgefäß z.B. durch Trypsin hat, kann bestätigen, dass diese Haftkräfte bedeutend größer sind als die nötigen Lokomotionskräfte und die Schwerkraft der Zellen. Daher ist es auch verständlich, dass schon seit geraumer Zeit versucht wurde diese Kräfte zu messen oder wenigstens abzuschätzen. Im Kapitel 1.5 werden die erfolgreichsten Messmethoden und deren Geschichte kurz behandelt werden, doch zunächst sollen einige Zahlen genannt werden, um die zu messenden Kräfte einschätzen und einordnen zu können.

Ein durchschnittlicher Osteoblast in Zellkultur hat ein Volumen von ca. $4000 \mu\text{m}^3$ und somit hat er eine Masse von ca. 4 ng, wenn man annähernd die Dichte von Wasser annimmt. Dies entspricht auf der Erde einer Gewichtskraft von ungefähr 40 nN.

1.5 Verschiedene Methoden zur Messung zellulärer Kräfte

Versuche, die Kräfte bei der Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung zu messen, werden und wurden auch in der Vergangenheit vor allem an Zellen in Kultur durchgeführt. Zellen in Kultur stellen insofern, von biochemischen Faktoren abgesehen, eine unphysiologische Situation dar, als sie nur auf einer Seite Kontakt zu einem Substrat haben. Es gibt eine ganze Menge verschiedener Versuche die Interaktionskräfte zwischen Zelle und unterliegendem Substrat zu messen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden Versuche, die Kräfte auf das Zellsubstrat zu bestimmen und lokal aufzulösen, mithilfe von flexiblen Substraten durchgeführt. In der Regel wurden dazu Gele aus flexiblen und zellverträglichen Materialien hergestellt. Um eine Ausnahme zu erwähnen: Galbraith and Sheetz (1997) präsentierten ein feinmechanisches Substrat aus tausenden kleinsten Mikrohebeln. Diese Mikrohebel haben kalibrierte Federkonstanten. So ist die Reaktion auf eine Kraft linear und durch Multiplizieren der Federkonstante mit der Verschiebung der Hebelspitze ist die Kraft an der Stelle leicht zu berechnen. Neben dem sehr hohen Aufwand zur Herstellung des Mikrogerätes, ist die Kraft momentan auch nur in einer Dimension darstellbar und somit auch die Zugrichtung vorgegeben. Hinzu kommt, dass die Zelle in ihren Motilitäts- und Adhärenzeigenschaften durch die Vorgabe nur weniger Hebel pro Fläche als Adhäsionspunkte beeinflusst wird. Die Wichtigkeit einer ausreichenden Dichte von Adhäsionspunkten wurde von Gaudet et al. (2003) nochmals genauer untersucht. Um diese Problempunkte der Mikrohebelsubstrate zu vermeiden, wurden flexible Substrate aus Collagen hergestellt, was die extrazelluläre Matrix der Zellen nachahmen soll (Roy et al., 1997). Der limitierende Faktor dabei sind die physikalischen Eigenschaften der Collagengele. Die Deformationsantwort auf eine Kraft ist weder linear, noch an allen Punkten eines Geles vergleichbar. Somit sind die Zugkräfte der Zellen zwar nachweisbar und eventuell ist auch deren Richtung annähernd zu bestimmen, die Kräfte lassen sich aber nur sehr grob bestimmen und selbst Vektoren, die auf dem gleichen Substrat gemessen werden, sind nicht miteinander vergleichbar. Zu den verbreitetsten Techniken gehörte die von Harris et al. (1980) entwickelte Methode mit Silikonsubstraten. Die Methode wird auch heute noch, allerdings mit einigen Verbesserungen, verwendet (Oliver et al., 1999; Burton et al., 1999). Zur Herstellung wurden an der Oberfläche einer Silikonflüssigkeit mithilfe einer Flamme dünne Filme des Silikons polymerisiert. Zellen, die auf solchen Filmen kultiviert werden, führen durch die ausgeübten Zugkräfte zu Falten auf dem Silikonfilm. Durch Ausmessen der Faltenlinien wurde versucht auf die Kraft zu schließen. Allerdings ist das Entstehen von Falten ein eher chaotischer Vorgang, d.h. mit mathematischen Formeln kaum vorhersagbar und nur schwer nachzuvollziehen.

Trotzdem existiert dafür gute Software wie z.B. MacWrinkle für Apple Computer, mit dem Ziel den Ursprung der Falten zu analysieren. Zur Verbesserung der Substratqualität wurde die Polymerisation mit der Flamme zugunsten von UV Licht aufgegeben (Burton and Taylor, 1997). Dadurch wird die Kraftauflösung der Gele besser, weil die Substrate weicher und die entstehenden Falten feiner werden. Trotz hohem technischen Aufwand und aufwendiger mathematischer Analyse der Daten können dabei nur Schätzungen der Kraft entstehen. Doch diese Technik erlaubt das qualitative Vergleichen von Kraftverteilungsmustern. Es ist möglich diese Silikonsubstrate so vorzuspannen, dass sie nicht mehr knittern. Da dann aber keine Falten mehr analysiert werden können, wurden Mikrokugeln als Marker im Substrat verteilt (Lee et al., 1994). Diese Weiterentwicklung der Technik erlaubt es mathematische Modelle zur Schätzung der Kraft einzusetzen (Oliver et al., 1995). Balaban et al. (2001) haben diese Methode so verändert, dass sie Silikonsubstrate aus soliden Elastomeren fertigen, wodurch das Knittern der Filme auch wegfällt. Dieses Silikon ist trotzdem noch weich genug, um von Zellen merklich deformiert zu werden. Um dies zu visualisieren, haben sie lithographisch regelmäßige Vertiefungen als mikroskopisch erkennbare Muster in die Oberfläche der Gele eingearbeitet. Kräfte sind so als Verzerrungen der Muster direkt zu sehen. Es entsteht aber das gleiche Problem, wie bei dem Mikrohebelsubstrat, da die Vertiefungen in einer Dichte von 1 pro $4 \mu\text{m}^2$ liegen und so die Zellbewegung und Adhäsion verändert werden könnte. Für die Berechnung der Kräfte werden bei dieser Methode die Ursprungsorte der Kräfte durch Visualisieren der fokalen Kontakte mit GFP festgelegt. Zellen üben aber nicht nur an den großen, durch das GFP erkennbaren, fokalen Kontakten Kräfte aus. Es werden kleine fokale Kontakte leicht übersehen, die aber laut Beningo et al. (2001) besonders große Kräfte zu übertragen scheinen. Außerdem ist eine Transfektion der Zellen mit GFP oder eine ähnliche Prozedur zur Visualisierung der Kontaktstellen nötig.

1.5.1 Eine geeignete Methode für die Zielsetzung

Wang and Pelham (1998); Pelham and Wang (1997, 1998, 1999) beschrieben eine Methode zur Herstellung von flexiblen Substraten aus Polyacrylamid. Bis heute wurden, mit nur geringen Veränderungen dieser Methode, weitere Arbeiten publiziert, in denen die Bedeutung für die Messung von Zugkräften bei Zellen in Kultur deutlich wird. Die relative Ungiftigkeit macht die Gele für die Verwendung in der Zellkultur geeignet. Und die Eigenschaft durch Änderung der Verhältnisse der einzelnen Komponenten zueinander die flexiblen Eigenschaften gezielt verändern zu

können, macht es möglich die Substrate für verschiedene Zelltypen an in vivo Gegebenheiten anzupassen und auch zelluläre Reaktionen auf die Elastizität der Unterlage zu untersuchen. Im Gegensatz zu Silikonsubstraten entstehen bei Polyacrylamid keine Falten und die Deformation ist im verwendeten Bereich sogar linear zur verwendeten Kraft. Dadurch ist eine mathematische Interpretation der Deformationsmuster möglich. Um die Verschiebung eines Punktes auf dem Substrat beobachten zu können, werden Marker benutzt. Man kann auch lithographische Muster auf die Oberfläche bringen, aber die einfachste und am häufigsten benutzte Methode ist das Einmischen von kleinen Fluoreszenzpartikeln in das Polyacrylamidsubstrat. Durch Vergleichen der Verteilung der Fluoreszenzpartikel auf einem durch die Zelle deformierten Bild mit einem zellfreien Fluoreszenzbild ist es dann möglich die Kraft, die diese Verschiebung der Partikel bewirkt haben muss, zu berechnen. Zellen zeigen keine Affinität zu Polyacrylamid, daher ist es nötig chemisch eine dünne Schicht Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. Collagen oder Fibronectin, an die Oberfläche zu binden. Welchen Einfluss die Dichte diese Proteine auf dem Substrat auf die Zelle hat wurde von Gaudet et al. (2003) seit 1995 untersucht, aber erst kürzlich publiziert.

1.5.2 Anpassung der Substrate an die Rahmenbedingungen

Bevor man mit dem Herstellen der Polyacrylamidsubstrate beginnt, sollte man sich über die Zielgröße für die Flexibilität der Substrate im Klaren sein. Was ist der beste Flexibilitätsmodul nach Young für diese Zellen und die Experimente? Übliche Zellkulturgefäße aus Glas oder Plastik entsprechen physikalisch gesehen nicht den in vivo Bedingungen von Zellen. Wobei gerade die hier verwenden Osteoblasten sich zuweilen in sehr hartem Knochen befinden. Andererseits sollen die Gele für die Zugkraftmessungen aber auch so weich sein, dass die durch die Zellen verursachten Substratdeformierungen auch zuverlässig zu erfassen sind. Das Ziel ist es also, die Gele nur so weich zu machen, dass gerade eine deutliche Verformung des Substrates festzustellen ist. Auch die Konzentration an Fluoreszenzpartikeln muss sinnvoll gewählt werden. Denn eine zu hohe Konzentration an Partikeln würde nicht nur die mechanischen Eigenschaften des Geles verändern und eventuell auch uneinheitlich machen, sondern es führt auch dazu, dass das Gel trüb wird und man daher die Zellen im Phasenkontrastbild nicht mehr erkennen kann.

1.5.3 Verarbeitung der Daten

Die Analyse der gesammelten Daten ist ein Prozess mit vielen Schritten, der im Abschnitt 2.6 auf Seite 38 im Detail beschrieben wird. Die grundlegenden Routinen für die Zugkraftanalysen wurden mir von Prof. Dembo aus Boston freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Um die aquirierten Daten auswerten zu können, mussten diese noch prozessiert werden. Dafür war es nötig, geeignete Software zu finden und die im Labor vorhandene Software teilweise anzupassen.

Für die Experimente dieser Arbeit wurden im Wesentlichen zwei verschiedene Versionen der Libtrc-Codes von Dembo et al. verwendet. Die alte Version beinhaltete noch nicht den Optical-Flow Algorithmus, was im Prinzip bedeutet, dass die Deformation des Substrates mehr oder weniger manuell eingegeben werden mussten. Dies kostet sehr viel Zeit und wurde zum Glück durch den Optical-Flow Algorithmus überflüssig. Da aber ein kleiner Teil der hier präsentierten Daten so gewonnen wurden, wird auch diese Methode im Abschnitt 2.6.3 erklärt. Auch für die Konzentration der Fluoreszenzpartikel macht der Optical Flow Algorithmus einen Unterschied. Ohne ihn war es nötig, dass der Analysierende die Partikel auf dem Bild erkennen und deren Zentrum ausmachen kann. Da die Größe eines Bildelementes bei der verwendeten Kombination aus Kamera und Mikroskop zwischen $0,253$ und $0,276 \mu\text{m}$ beträgt, wurden für diese Art der Auswertung Partikel mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ und von $0,5 \mu\text{m}$ verwendet. Aber hier kam es auch darauf an möglichst viele Partikel im Bereich der Zelle zu haben, da dadurch die Anzahl der zu bestimmenden Deformationsvektoren steigt. Womit natürlich auch die Datendichte steigt. Bei dem Optical-Flow Algorithmus ist es hingegen besser eine Mischung aus $0,5 \mu\text{m}$ Partikeln und $0,2 \mu\text{m}$ Partikeln zu benutzen. Denn hier ist es nur wichtig, dass in einer definierten Region, z.B. 10×10 Pixel ein einmaliges Muster aus Intensitäten entsteht. Dies geschieht hier hauptsächlich durch die kleinen $0,2 \mu\text{m}$ Partikel, während die in geringerer Konzentration vorkommenden $0,5 \mu\text{m}$ Partikel als Fokussierhilfe am Mikroskop dienen. Diese Sachverhalte werden nach dem Lesen von Kapitel 2.6 besser verständlich sein.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

1. Die Technik der Zugkraftmessung nach Dembo and Wang (1999) soll im Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg etabliert werden und für die Messung an Osteoblasten angepasst werden. Neben der Anpassung der experimentellen Ausrüstung ist es auch

wichtig eine passende Substratflexibilität für Osteoblasten zu finden. Des Weiteren ist es für eine möglichst genaue Bestimmung der Kräfte notwendig, auch die Flexibilität der tatsächlich verwendeten Proben zuverlässig zu messen. Es ist also auch nötig dafür eine geeignete Methode zu finden.

2. Die durchschnittliche Gesamtkraft von primären bovinen Osteoblasten soll quantitativ bestimmt werden und mit der Gesamtkraft von Osteosarkomzelllinien verglichen werden.
3. Die Zugkraftmuster von Osteoblasten sollen deskriptiv mit denen aus anderen Veröffentlichungen bekannten Zugkraftmustern anderer Zelltypen verglichen werden.
4. Die Reaktion von Osteoblasten und osteoblastenähnlichen Zellen auf die Applikation elektrischer Gleichstromfelder soll genauer untersucht werden. Es interessieren vor allem die ersten Minuten unter dem Einfluss elektrischer Felder, während noch keine morphologische Reaktion unter dem Mikroskop feststellbar ist.

2 Material und Methoden

Anmerkung: Geräte, Material und Substanzen, die zur Standardausstattung eines Labors zählen, werden bei den betreffenden Abschnitten nicht zusätzlich aufgezählt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Materialien zu jedem Unterpunkt direkt nach dem betreffenden Abschnitt aufgeführt. Allerdings werden Materialien, die schon bei einem anderen Abschnitt in der gleichen Form aufgezählt wurden nicht ein weiteres mal angegeben.

Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen: Biolabs, BioRad, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Clontech, Falcon, Larry Fisher, Fluka, Gibco BRL, Invitrogen, Molecular Probes, PAA Laboratories, Santa Cruz Biotechnologies, Serva, Sigma Chemicals.

2.1 Polyacrylamid Substrate für die Zugkraftmessung

Die flexiblen Substrate aus Polyacrylamid wurden im Prinzip nach der Methode von Pelham and Wang (1997); Wang and Pelham (1998) hergestellt. Um den Zellen eine Verformung der Unterlage auf der sie sich befinden zu ermöglichen, müssen die Polyacrylamidsubstrate, verglichen mit Glas, relativ weich sein. Würde man

eine Zellkulturkammer aus Polyacrylamid herstellen, wäre die Beobachtung unter einem Mikroskop relativ schwierig. Leichter ist, es eine dünne Schicht aus Polyacrylamid auf Glas zu gießen. Um keine Schwierigkeiten mit dem Arbeitsabstand von gängigen Mikroskopobjektiven zu bekommen, verwendet man als Träger für das Polyacrylamidgel dünne Deckgläser.

2.1.1 Vorbereiten der Deckgläser als Substratunterlage

Da Polyacrylamid auf Glas nicht besonders gut haftet, müssen die Deckgläser zunächst etwas vorbehandelt werden. Den Abmessungen der Versuchszellkammer entsprechend wurden 24 x 60 mm große Deckgläser als Unterlage für die Gele gewählt. Zu Reinigungszwecken wurden die Deckgläser zwei bis drei Mal durch die Flamme eines Bunsenbrenners geführt und anschließend ein Tropfen 0.1 N NaOH auf der Oberfläche verteilt. Nachdem die Oberfläche wieder trocken war, wurde wiederum ein Tropfen 3-Aminopropyltrimethoxysilane auf der Oberfläche verteilt, worauf nach 5 Minuten eine 3 x 5 minütige Waschprozedur mit destilliertem Wasser folgte. Als Nächstes wurden die Deckgläser bei Raumtemperatur für 30 Minuten in PBS mit 0.5% Glutardialdehyd eingelegt. Anschließend wurden durch 3 x 10 minütiges Einlegen in destilliertes Wasser überflüssige Glutardialdehydreste ausgewaschen.

Material

- Deckgläser: Marienfeld No. 1; 24 x 60 mm
- 3-Aminopropyltrimethoxysilane 97%; $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$; Sigma-Aldrich; Nr. 28,177-8, Charge #21323-080
- PBS Lösung pH 7,4
 - 136 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 8 mM Na_2HPO_4
 - 1,1 mM KH_2PO_4
- Glutardialdehyde 0,5% in PBS

2.1.2 Gießen der flexiblen Substrate aus Polyacrylamid

Die Elastizität von Polyacrylamid lässt sich durch die Konzentrationen der Zuta-ten bzw. dem Verhältnis von Acrylamid zu BIS-Acrylamid modifizieren. Über die mechanischen Eigenschaften der Gele und wie deren Elastizität gemessen wurde, wird in Kapitel 2.3 berichtet. Vereinfacht kann man sagen, dass die Steifheit mit steigender BIS-Acrylamidkonzentration ansteigt. Für diese Arbeit wurden Gele mit 8% Acrylamid und je nach gewünschter Elastizität zwischen 0,03% und 0,10% BIS-Acrylamid verwendet. Später in Kapitel 3.1 wird beschrieben werden, dass Gele mit 0,04% BIS-Acrylamid für Mg63 Zellen und Gele mit 0,06% BIS-Acrylamid für POB Zellen am besten geeignet sind. Zu 2 ml einer 8%igen Acrylamid- und 0,06%igen BIS-Acrylamidlösung wurde die gewünschte Menge, z.B. 16 μl der 0,5 μm und 30 μl der 0,2 μm durchmessenden Partikel, pipettiert. Um eventuelle Luftblasen zu entfernen, wurde das Gemisch für 10 Minuten in ein Unterdruckgefäß gestellt, welches mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert wurde. Um der Polymerisationsvorgang in Gang zu setzen, wurden 10 μl einer frisch angesetzten 10%igen APS Lösung sowie 1 μl TEMED hinzugegeben. 14 μl dieser Lösung wurden dann auf die zuvor vorbereiteten Deckgläser gegeben und durch ein \varnothing 16 mm Deckglas bedeckt. Das Volumen von 14 mm^3 breitet sich gleichmäßig zwischen den beiden Deckgläsern aus und nimmt daher die gesamte Fläche des \varnothing 16 mm Deckglases und damit eine Höhe von ca. 70 μm ($14 \text{ mm}^3 / (\pi * [8 \text{ mm}]^2) = 70 \mu\text{m}$) ein. Um dafür zu sorgen, dass die Fluoreszenzpartikel sich bevorzugt in der Nähe der Oberfläche aufhalten, an der später die Zellen sein würden, wurden die Deckgläser zum Polymerisieren bei 4°C im Kühlschrank gelagert sowie so aufgehängt, dass das kleinere Deckglas nach unten hing und somit die physikalisch dichteren Fluoreszenzpartikel der Schwerkraft nach in Richtung Oberfläche sinken konnten. Sobald die Gele auspolymerisiert waren, wurden die kleinen Deckgläser entfernt und die großen Deckgläser mit den Gelen 2 x 15 Minuten in 50 mM HEPES (pH 8.5) bei Raumtemperatur gewaschen.

Material

- Deckgläser:
 - Marienfeld No. 1; (rund) \varnothing 16 mm
- Acrylamide; $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$; Carl Roth GmbH, Charge #38941799

- BIS-Acrylamide: N,N'-Methylene-bis-Acrylamide 98%; C₇H₁₀N₂O₂; Sigma; Nr. M-7279, Charge #12H01451

Fluoreszenzpartikel: Fluosphere Carboxylate-modified 2% Solids; Molecular Probes (Leiden, Netherlands)

Durchmesser	Katalognr.	Excitation	Emission	Farbe
0,2 μm	F-8811	505	515	Gelb-grün
0,5 μm	F-8813	505	515	Gelb-grün
2,0 μm	F-8823	505	515	Gelb-grün
2,0 μm	F-8826	580	605	Rot

- Ammonium Persulfat (APS); (NH₄)₂S₂O₈; Serva Feinbiochemica Nr. 13375:
 - 10% w/v 0.1 g in 1 ml ddH₂O
- TEMED p.a. 99% C₆H₁₆N₂; Carl Roth GmbH
- 50 mM HEPES, pH 8.5
 - 11,9 g N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); Sigma H-3375 Charge #118H5413
 - 1 l ddH₂O
 - KOH Mit Kaliumhydroxid Pellets wird der pH auf 8.5 titriert.

2.1.3 Beschichten der flexiblen Substrate mit Collagen

Polyacrylamid zeichnet sich durch eine sehr glatte und einheitliche Oberfläche aus, die Zellen keine Möglichkeit zum Haften bietet. Um den Zellen das Leben auf dem Polyacrylamid trotzdem schmackhaft zu machen, wurden die Gele mit einer monomeren Schicht Typ 1 Collagen versehen. Dazu wurden 200 μl einer frisch angesetzten Sulfo-SANPAH Lösung auf die Gele gegeben und dann für 10 Minuten in einen Abstand von 10 cm zu einer 60 Watt UV Lampe gebracht. Durch diese Photoaktivierung bindet das Sulfo-SANPAH an das Polyacrylamid. Diese Photoaktivierung wurde ein zweites Mal durchgeführt, bevor die Substrate mit HEPES Lösung abgespült wurden. Eine andere Bindungsstelle des Sulfo-SANPAH ermöglicht eine chemische Verbindung mit dem Collagen. Mit Collagenlösung in HEPES (pH 8.5) bedeckt, wurden die Gele dann für 6 Stunden bei 4°C inkubiert. Um überflüssiges Sulfo-SANPAH und Collagen zu entfernen, wurden die Substrate als nächstes 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Material

- Sulfo-SANPAH: Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-phenylamino)hexanoate, Pierce Perbio BL 45555, 22589
 - 1 mM in 50 mM HEPES, pH 8.5
- Collagen: Collagen Lösung Type 1 (Calf Skin); 0.1%ige Collagelösung in 0.1 N acetic acid; Sigma-Aldrich Nr. C-8919, Charge #50K2368

2.1.4 Sterilisieren der Substrate

Bis zu diesem Punkt fand der Herstellungsprozess nicht unter sterilen Bedingungen statt. Um die Gele für die Zellkultur Keimfrei zu bekommen, wurden diese in sterile Zellkulturgefäße überführt, mit einer dünnen Schicht sterilem PBS bedeckt, damit sie nicht austrocknen und dann für eine Stunde dicht an die UV Lampe einer Sterilwerkbank für die Zellkultur gestellt. Anschließend wurden sie entweder sofort mit Zellen für Experimente beladen oder in sterilem PBS bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Beim Umgang mit Zellkulturen wurde im Wesentlichen nach Lindl & Bauer (1994) und Spector et al. (1998) verfahren und es wurde stets versucht sterile Bedingungen für die Zellkultur zu gewährleisten. Die Experimente dieser Arbeit wurden mit primären bovinen Osteoblasten (POB) (Jones and Bingmann, 1991) und der Osteosarkomzelllinie Mg63 (Billiau et al., 1977) sowie der Osteosarkomzelllinie U2OS (Heldin et al., 1986) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen fand mit einer mittleren Dichte von 60000 Zellen/cm² in einer Einzelschicht (Monolayer) in speziell dafür vorgesehenen Kulturflaschen und Petri-Schalen statt. Die Zellkulturmedien enthielten einen Anteil von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie je nach Medium Antibiotika, Antimykotika Glutamin und Vitamin C-Phosphat. Die Osteosarkomzelllinien wurden mit RPMI 1640 Medium und primäre bovine Osteoblasten mit HiGEM bzw. Ham's F10 kultiviert. Um den Zellen eine lebensfreundliche Umgebung zu bieten, fand die Züchtung bei 37°C und passender Luftfeuchtigkeit in CO₂ Begasungsbrutschränken statt. Um einen optimalen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 bei 5%

CO₂ zu erreichen, reicht als Puffer ein NaHCO₃ Gehalt von 1,97 g/l Medium aus. Bei Versuchen in geschlossenen Systemen kam Medium mit Zusatz von 10 mM HEPES zur Erhöhung der Pufferkapazität zum Einsatz.

Kulturmedien

- Fetales Kälberserum (FCS) der Firma Seromed (Chargennummer S0112/511S)
- Hams F10 + FCS
 - 10 ml/l einer 200 mM L- Glutamin Stammlösung (Sigma; Nr. G-7513)
 - 10 mg/l das sind 2 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - 110 ml/l FCS (=10% FCS)
- RPMI 1640 Medium (Sigma Cat. No. R-0883):
 - 110 ml/l FCS (= 10% FCS)
 - 10 ml/l einer 200 mM L- Glutamin Stammlösung (Sigma; Nr. G-7513)
 - 10 mg/l das sind 2 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - 50000 IE Penicillin / Streptomycin - Stammlösung (Boehringer Mannheim; Nr. 1074440)
- Vitamin C Stammlösung:
 - 5 g Vitamin C - Phosphat (WAKO Chemical Ind., Japan)
 - 1 l ddH₂O

Geräte für die Zellkultur

Begasungsbrutschrank für die Zellkultur	Heraeus Instruments
Autoklav	Guwina Berlin
Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Zellzähler CASY 1	Schärfe System
Sterilfilter 0,22 µM Porengröße	Schleicher & Schuell
Sterilwerkbank	Gelaire BSB

Zentrifuge	Eppendorf 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge	Christ Biofuge A	Heraeus
Zentrifuge	Beckman J2-21 M/E	Beckmann
Phasenkontrastmikroskop	Olympus CK2(BH2-RFCA)	Olympus
Gewebekulturschalen	für die Zellkultur Ø 5,7 cm	Nalge Nunc International
Gewebekulturschalen	für die Zellkultur Ø 14 cm	Nalge Nunc International
Gewebekulturflasche	50 ml	Greiner Labortechnik
Gewebekulturflaschen	250 ml	Greiner Labortechnik

2.2.2 Passagieren

Wenn die Mg63 Zellen beim Kultivieren Konfluenz in dem Zellkulturgefäß erreichten, wurden sie passagiert und ausgedünnt. Dazu wurde das Medium entfernt und anschließend die Zellkultur zweimal mit auf 37° C vorgewärmten PBS gespült, anschließend für ca. 2 Minuten in Trypsin-Lösung (ca. 2 ml/83 cm² Kulturflasche) inkubiert. Durch leichtes Beklopfen des Kulturgefäßes wurden dann die Zellen von ihrer Unterlage abgelöst und durch Zugeben der dreifachen Menge des Trypsins an Medium (ca. 6 ml/83 cm²) die Enzymaktivität des Trypsins gehemmt. Es folgte Zentrifugieren bei langsamer Geschwindigkeit und Absaugen des Mediums, um die Zellen im Pellet dann in einer entsprechenden Verdünnung, in der Regel 1:5, in einem neuen sterilen Kulturgefäß auszusähen.

Material

- Trypsin / EDTA-Lösung
 - 100 ml Stammlösung der Fa. Sigma (Bestellnummer: T4174)
 - 900 ml PBS Lösung

2.2.3 Gewinnung primärer boviner Osteoblasten

Die primären bovinen Osteoblasten wurden aus dem Periost von Metakarpalen boviner Knochen nach dem Auswuchsverfahren nach Jones and Bingmann (1991) gewonnen. Die Knochen von frisch geschlachteten Jungbullen stammten von einem

lokalen Schlachthof. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen freipräpariert und mit PBS gespült, das Periost in Streifen vom Knochen entfernt und dann in Earles Puffer 3 mal für 10 min. bei 37°C gewaschen, danach noch ein viertes Mal unter Zugabe von 250 U/ml Penicillin und 375 U/ml Streptomycin für 20 min. 5 X 5 mm große Stückchen wurden folgend in einem Verhältnis von 1 cm² zu 15 cm² Kulturfläche auf Petri-Schalen ausgesetzt und dann in High Growth Enhancement Medium kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein erster Mediumwechsel, danach wöchentlich. Wenn die Kultur dann nach 4-5 Wochen konfluent war, wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren oder direkt für Experimente verwendet.

Medien

- Earles 1x
 - 100 ml Earles 10x (Biochrom KG, No. L 1925)
 - 894 ml ddH₂O
 - 6 ml 7,5% NaHCO₃ Lösung

- Earles + Antibioticum (Pro 1 l Earles-Lösung):
 - 375000 IE Streptomycin
 - 500000 IE Penicillin
 - 4000 g Amphotericin B

- High Growth Enhancement Medium (Biowhittaker; Nr. BESP055):
 - 110 ml/l FCS (= 10% FCS)
 - 10 ml/l einer 200 mM L- Glutamin Lösung (Sigma; Nr. G-7513)
 - 10 mg/l das sind 2 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - 50000 IE Penicillin / Streptomycin - Stammlösung (Boehringer Mannheim; Nr. 1074440)

2.2.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst passagiert und deren Konzentration im Medium bestimmt. Kurz vor dem Einfriervorgang wurde 1:1 Einfriermedium zur Suspension gegeben, die Zellen in Kryoröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Es wurden ca. 2×10^6 Zellen pro ml Medium eingefroren. In einem Styroporbehälter sollten die Zellen dann langsam auf die Temperatur von -80°C abkühlen. Die Überführung in die Flüssigstickstoffbehälter (-196°C) folgte nach 12 Stunden. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Sofort nach dem Auftauen wurde vorgewärmtes Ham's-F10 Medium hinzugegeben und folgend bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in frisches Medium überführt und die Zellen in Kulturgefäße ausgesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erster Mediumwechsel.

Medium

- Einfriermedium
 - Hams F10
 - 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfosid)

2.2.5 Phänotypisierung der Osteoblasten

Zur Phänotypisierung der Osteoblasten wurden die osteoblastenspezifischen Proteine Osteocalcin und Prokollagen Typ-I immunocytochemisch nachgewiesen. Dazu wurden 60.000 Zellen/ cm^2 auf Deckgläsern für zwei Tage in Vollmedium kultiviert. Zur Fixierung wurden die Zellkulturen nach dreimaligem Spülen mit PBS für 10 Minuten bei -20°C in ein 1:1 Methanol/Aceton Gemisch gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur 0,3 % H_2O_2 zugegeben. Jetzt, und auch zwischen allen folgenden Arbeitsschritten, wurde wieder drei Mal mit PBS gespült, und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem jeweils für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper in TBS/1% BSA inkubiert, dann genauso mit einem Biotin konjugierten Antikörper und zuletzt mit peroxidase-konjugiertem Streptavidin. Mit einer Färbelösung wurde danach für 10 Minuten inkubiert und nach Stoppen der Reaktion luftgetrocknet und mit Glycerin und Gelatine konserviert. Die Positivkontrolle erfolgte mit anti-Vimentin und die Negativkontrolle mit Mausserum anstatt des 1. Antikörpers.

Material

- | ● Antikörper | Verdünnung |
|---|------------|
| – anti-Vimentin (mouse) Boehringer Mannheim; Clone V9 #814318 | 1:4 |
| – anti-Osteocalcin (mouse) Larry Fisher (NIH) | 1:50 |
| – anti-Osteocalcin (goat) Fitzgerald | 1:50 |
| – anti-Pro-Collagen I (rabbit) Larry Fisher LF41 | 1:30 |
| ● Biotin-konjugierte AK | |
| – anti-Mouse Boehringer #1089285 | 1:50 |
| – anti-Rabbit Boehringer #1214659 | 1:50 |
| – anti-Goat Sigma B6523 | 1:50 |
| ● Peroxidase-konjugiertes Streptavidin | |
| – Streptavidin Boehringer #1089153 | 1:30 |
| ● Färbelösung | |

2.2.6 Aussäen der Zellen auf die Substrate

Für die Zugkraftmessung wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 3500/cm² ausgesät und vor dem Experiment für mindestens 24 Stunden in den Inkubator gestellt, um den Zellen das Anwachsen auf den Substraten zu ermöglichen. Allerdings ist zu erwähnen, dass sich die Zellen in der Regel auch schon nach 6 Stunden auf dem Gel ausgebreitet hatten.

2.3 Bestimmung physikalischer Eigenschaften der Substrate

Die statistische Richtigkeit der zu berechnenden Kraftvektoren hängt natürlich in starkem Maße von der richtigen Bestimmung der elastischen Eigenschaften der Gele ab. Dazu haben Pelham and Wang (1997); Wang and Pelham (1998) sowohl Messungen an größeren Gelen und auch an Gelen für die zelluläre Zugkraftmessungen mit jeweils der gleichen chemischen Zusammensetzung gemacht. Dabei ergaben sich gleiche Elastizitätsmoduli (Youngs Modul) für kleine als auch für große Gele. Die Antwort auf Kompression sowie Zug ist linear und auch nach 24 Stunden einer

30%igen Dehnung nahmen die Gele ihre ursprüngliche Form wieder ein. Li et al. (1993) fanden für die Poissonzahl [$\mu = (-dD/dL)(L/D)$] dieser Gele einen Wert von 0,3. Für die meisten Polymere liegt die Poissonzahl zwischen 0,3 und 0,4. Der Elastizitätsmodul hängt von den Konzentrationen des Acrylamid und des BIS-Acrylamids in der Lösung vor dem Polymerisieren ab. Da schon sehr geringe Unterschiede in der BIS-Acrylamid Konzentration die Elastizität der Substrate erheblich verändern, wurde für jede Charge der Elastizitätsmodul bestimmt. Dazu wurden für diese Arbeit drei verschiedene Methoden angewandt, wobei die Münzmethode und die Mikrobalkmethode nur am Anfang durchgeführt wurden, um die Ergebnisse der AFM Methode mit den "etablierten Methoden" vergleichen zu können. Da die AFM Methode aber im Vergleich zu den anderen Methoden mit Abstand die besten Ergebnisse lieferte, wurde später nur noch die AFM Methode benutzt.

2.3.1 Die Münzmethode

Diese Methode ist für die hier verwendeten Substrate nicht sehr präzise. Sie wurde wie von Dembo and Wang (1999) beschrieben durchgeführt. Dazu deckt man das Gel mit einem Deckglas vollständig ab und schichtet münzförmige Metallringe auf das Gel. Der Durchmesser der Ringe entsprach dem Gelddurchmesser. Als nächstes fokussiert man mit dem Mikroskop eine Gruppe von Fluoreszenzpartikeln an der Oberfläche des Geles. Das Licht dazu kommt entweder durch das Loch in der Metallmünze, alternativ kann man auch normale Geldmünzen zusammen mit Fluoreszenzlicht benutzen. Dann wurde eine Münze nach der anderen vorsichtig vom Stapel genommen und dazwischen die Partikel wieder fokussiert. Der Abstand zwischen allen Schritten wurde mit der Mikrometerskala des Fokussiermechanismus des Mikroskops ausgemessen. Nun konnte man durch Wiegen den Youngs Modul nach der Formel $E = (F/A)(L/\Delta L)$ berechnen. Dabei ist F die Gewichtskraft der Münzen, A die Fläche des Gels, L die normale Dicke des Gels und ΔL die Änderung der Dicke durch die Kraft F .

2.3.2 Die Mikrobalkmethode

Um den Youngs Modul etwas einfacher und präziser bestimmen zu können, wurden Stahlkugeln mit einem Durchmesser von 0,63 mm benutzt, wie von Lo et al. (2000) beschrieben. Diese wurden auf das Gel gelegt und dann die Fluoreszenzpartikel direkt unter dem Zentrum der Kugel fokussiert. Die gleiche Stelle wurde, nach Entfernen der Stahlkugel mithilfe eines Stabmagneten, refokussiert. Wieder-

um wurde der Abstand mit der Mikrometerschraube des Fokussiermechanismus gemessen. Die Berechnung des Youngs Moduls E erfolgt dann basierend auf der Hertz Theorie, wie von Radmacher et al. (1992) vorgeschlagen.

$$E = \frac{3(1 - \nu^2)f}{4d^{\frac{3}{2}}r^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

f = Kraft

ν = Poisson Ratio

d = Eindringtiefe in das Gel

r = Radius der Stahlkugel

Dabei wird davon ausgegangen, dass die Deformation der Stahlkugel im Vergleich zur Verformung des Substrates zu vernachlässigen ist, was in Anbetracht der empirischen Elastizität der Substrate im Gegensatz zu den Stahlkugeln durchaus legitim ist.

Da auch diese Methode auf das menschliche Auge beim fokussieren angewiesen ist, kann man keine sehr hohe Präzision erwarten. Es ist daher nötig, genau wie auch bei der Münzmethode, viele Messungen durchzuführen, um einen reliablen Durchschnitt zu bekommen.

Material

- Stahlkugel, Ø 0,63 mm, Dichte 7,2 g/cm³ Microball Company,
Peterborough, USA

2.3.3 Die Rasterkraftmikroskopmethode (AFM)

Die für diese Arbeit gewonnenen Werte für den Elastizitätsmodul der Polyacrylamid-substrate wurden zum größten Teil mit der hier beschriebenen Rasterkraftmikroskopmethode gewonnen. Die Berechnung basiert auf der gleichen mathematischen Grundlage, wie die im Abschnitt 2.3.2 auf der vorherigen Seite beschriebene Mikrobalkmethode. Messungen elastischer Eigenschaften sehr weicher Substrate mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM) wurde von Radmacher et al. (1992) in ähnlicher Weise durchgeführt. Im Folgenden wird der Aufbau des verwendeten Rasterkraftmikroskopes kurz umrissen, eine genaue Beschreibung des Gerätes wurde von Struckmeier et al. (2001) gegeben. Die Kraft der Apparatur wird von einer kleinen Kugel, hier 5 und 10 μm im Durchmesser, auf die Unterlage übertragen. Diese Kugel ist an einem Cantilever befestigt, der eine geringe Federkonstante besitzt die

es ermöglicht sehr kleine Kräfte aufzuzeigen, indem man einen Laserspot in flachem Winkel auf den Cantilever richtet. Geringe Auslenkungen führen dann zu tatsächlich messbaren Spannungsänderungen an einem PSD-Detektor. Um mit dem Cantilever auch sehr präzise geringe Kräfte ausüben zu können, ist es nötig genaue Kontrolle über geringste Positionsänderungen seiner Basis, an der er am Gerät befestigt ist, zu haben. Diese Feineinstellung geschieht über die Kopplung an eine Piezoeinheit. Für grobe Annäherungen an Objekte ist das AFM zusätzlich mit einem Schrittmotor ausgestattet, der wie auch der Piezo der Kontrolle der vertikalen Richtung (z-Dimension) dient. Eine Änderung der Spannung am Piezo um 1 V bewirkt eine Längenänderung des Piezo und damit eine Höhenänderung der Cantileverbasis um 3800 nm. Ein Computer registriert nun die Spannung des Piezos und die Spannung des PSD-Detektors. Solange die Spitze des Cantilevers auf keinen Widerstand stößt, bleibt der Winkel zwischen Laserstrahl und Cantilever konstant, somit auch das Signal des PSD. Ein harte Unterlage führt zu einer Flexion des Cantilevers und damit, über eine Änderung des Reflexionswinkel des Lasers, zu einer Änderung der PSD-Spannung.

$$E = \frac{3(1 - \nu^2)f}{4d^{\frac{3}{2}}r^{\frac{1}{2}}} \quad (2)$$

f = Kraft
 ν = Poisson Ratio
 d = Eindringtiefe in das Gel
 r = Radius der Cantileverspitze

Glaskalibrierung und Auswertung der AFM Kraftkurven

Für jede Messreihe musste das Signal des PSD-Detektors durch Drücken mit dem Cantilever auf eine harte Unterlage, in dem Fall das Glas der Zellkulturkammern, kalibriert werden.

Eine Regression der gemessenen Daten, wie z.B. als blaue Kurve in Abbildung 5 mit dem Programm Origin 6.0 der Firma Microcal, ergab stets Geradengleichungen mit sehr geringer Standardabweichung. D.h. der Zusammenhang zwischen dem PSD Signal und der angelegten Spannung am Piezokristall ist streng linear und gehorcht im verwendeten Bereich einer normalen Geradengleichung:

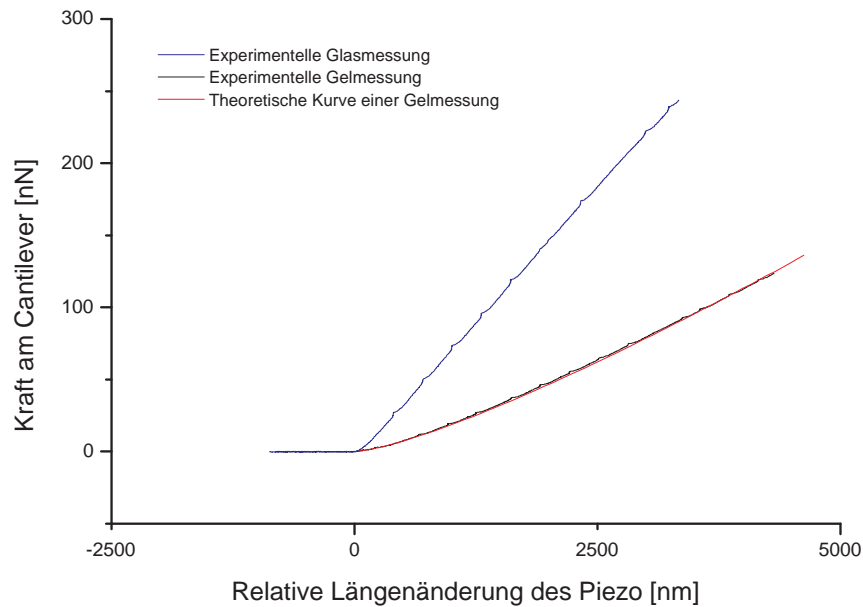


Abbildung 5: AFM Messung eines Polyacrylamidgeles

$$\begin{aligned}
 V_{psd} &= \text{Spannung am PSD in Volt} \\
 V_{psd} &= A + BV_{piezo} & B &= \text{Steigung der Geraden} \\
 (3) \quad & & A &= \text{Grundspannung am PSD ohne Kraft} \\
 V_{piezo} &= \text{Spannung am Piezo in Volt}
 \end{aligned}$$

Um aus dem Signal des PSD auf die wirkende Kraft an der Cantileverspitze schließen zu können, braucht man noch die Federkonstante des Cantilevers. Deren Messung wird noch weiter unten beschrieben. Mit der Konstante c lassen sich schon die PSD Signale zusammen mit der Piezospaltung die Flexion s , also Verschiebung der Cantileverspitze in z -Richtung auf den Piezo zu, berechnen. Anders ausgedrückt ist s die Entfernung der Cantileverspitze zu dem Punkt an dem die Spitze des Cantilevers wäre, wenn sie nicht durch das Auftreffen auf das Deckglas am Tieferreten gehindert würde.

$$\begin{aligned}
 \frac{s}{V_{psd}} &= \frac{cV_{piezo}}{B} & (4) \quad c &= 3800nm/V_{piezo} \\
 & & B &= \text{Steigung der Geradengleichung}
 \end{aligned}$$

Durch Lösen dieser Gleichung ist es möglich die Spannung am PSD in eine Flexion

des Cantilevers umzurechnen. Ist dann noch die Federkonstante des Cantilevers bekannt, d.h. welche Kraft nötig ist um den Cantilever um eine definierte Strecke s zu flektieren, kann man direkt die Kraft angeben, mit der die Spitze auf die Unterlage drückt, wie in Abbildung 5 geschehen. Subtrahiert man nun diese Flexionsstrecke s des Cantilevers von der Strecke die durch die Verlängerung des Piezos resultiert (cV_{piezo}), erhält man die Eindringtiefe d in das weiche Substrat.

$$cV_{piezo} = s + d \quad (5)$$

Nun lässt sich aus einer Kraftkurve für eine Substrat aus Polyacrylamid wie in Abbildung 5 der Elastizitätsmodul E mit der oben angegebenen Formel berechnen. Dabei ist lediglich noch zu beachten, dass man einen Punkt der Kraftkurve nimmt, an dem die Eindringtiefe kleiner als der halbe Radius der eindringenden Kugel ist, weil die Formel streng genommen nur für diesen Fall gilt. Um den resultierenden Wert zu überprüfen kann man z.B. wie die rote Linie in Abbildung 5 zeigt, einen Graphen der Lösung für die zur Berechnung benutzte Gleichung mit dem erhaltenen Wert E für der Youngs Modul über die experimentellen Werte legen. Daraus wird ersichtlich, dass der Messfehler bei dieser Methode sehr gering ist und vor allem von der Bestimmung der Federkonstante des Cantilevers abhängig ist.

Bestimmung der Federkonstante der Cantilever

Mithilfe der Methode von Cleveland et al. (1993) wurden die Federkonstanten weniger Referenzcantilever bestimmt. Dabei wird durch Anhängen von unterschiedlichen definierten effektiven Massen an den Cantilever dessen Resonanzfrequenz ν verschoben. Kleine Kugeln aus Wolfram mit einem Durchmesser von 1 bis 30 μm (Dichte 19,3 g/cm^3) wurden über Adhäsion angeheftet. Die Resonanzfrequenz wurde dann bestimmt, indem das PSD Signal eines vom Cantilever reflektierten Laserstrahles analysiert wird. Dies wird in der Doktorarbeit von Struckmeier (2001) genauer beschrieben. Der von dieser Methode zu erwartete Fehler liegt nur bei 4-6%, ist aber mit einem relativ großen Aufwand verbunden. Mithilfe dieser Referenzcantilever wurden nun die restlichen Cantilever mittels eines von Tortonese and Kirk (1997) beschriebenen Verfahrens kalibriert. Dabei drückt man mit der Spitze des zu bestimmenden Cantilevers auf die Spitze eines Referenzcantilevers. Nachdem man durch das Aufzeichnen einer Kraftkurve einer harten Unterlage (Glas) die Steigung der Kraftkurve berechnet hat, kann man dann die unbekannte Federkonstante berechnen. Der Fehler dieser Methode liegt unter 10%. Die genaue Methode wird von Struckmeier (2001) in seiner Doktorarbeit beschrieben.

2.4 Calciumionenmessungen

Intrazelluläre Calciumionenkonzentrationen wurden mithilfe der Fura 2-ratio Bildauswertungsmethode bestimmt, wie von Grynkiewicz et al. (1985) beschrieben. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläsern mit 3 μM fura-2/acetoxymethylester für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und mit 10 mM HEPES Medium versorgt. Während der Experimente wurde jede Sekunde ein 512 x 512 Pixel großes 8 Bit Bild mit einer intensivierten CCD Kamera aufgenommen. Die Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm wurden mithilfe eines Monochromators erzeugt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mithilfe der Qanticell 700 Software. Pro Experiment wurden jeweils 3 bis 5 Zellen untersucht. Die Anregungswellenlänge wurde alternierend zwischen 340 und 380 nm umgeschaltet und die Emission bei 505 nm registriert. Die Calciumionenkonzentration wurde als das F340/380 Verhältnis ermittelt.

- Fura 2 AM (Molecular Probes; Nr. F-1201)
- Extended ISIS CCD Camera (Photonic Science, UK)
- Monochromator (Visitech, Sunderland, UK)
- Qanticell 700 (Applied Imaging-Visitech, Sunderland, UK)

2.5 Durchführung der Experimente zu den Zugkraftmessungen

Vor allen Experimenten wurden die Deckgläser mit den Zellen, die zuvor für 24 bis 72 Stunden auf den flexiblen Substraten kultiviert worden waren, in die Versuchskammer eingebaut und auf den Mikroskoptisch gebracht. Nach dem Einbauen verging durchschnittlich noch eine Stunde bis zum Beginn des eigentlichen Versuches. Die Zellkammer ist im Prinzip ein geschlossenes System, zwei kleine Öffnungen erlauben aber den Austausch des Nährmediums und die Zugabe von Versuchsstoffen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelle in der Kammer nicht von toxischen Substanzen umgeben ist, die sich eventuell aus der Kammer herauslösen könnten. Die Innenauskleidung der Kammer besteht, bis auf das schon beschriebene Polyacrylamidsubstrat, nur aus Glas und Silikon. Der Freiraum für das Nährmedium über dem Gel beträgt bei der verwendeten Kammer 2 mm bei einem Fassungsvermögen von insgesamt 3 ml. Bei allen Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen für die Kraftmessungen wurde eine 8 Bit CCD Kamera Xillix microImager MI1400 mit 1306 x 1032 Pixeln benutzt. Die Bilder wurden direkt über ein Interface auf

einen PC übertragen und dort im verlustfreien TIFF-Format auf einer Festplatte gespeichert. Die Pixelgröße p_z der verwendeten Kamera wurde für jeden Mikroskopaufbau und jedes Objektiv bestimmt. Die Versuche für die Kraftmessungen wurden mithilfe folgender Mikroskope und Objektive durchgeführt:

Mikroskoptyp	Objektiv	NA	p_z [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]
Nikon Diaphoth IM	Nikon Fluor 40x	0.85	0.276
Nikon TE2000-U IM	Ni. Plan Fl. 40x ELWD	0.60	0.258
Leica_UM	PL Fluortar 40x	0.70	0.253

2.5.1 Messungen zum Vergleich verschiedener Zelltypen

Um die Methode der Zugkraftmessung hier im Labor und die hier verwendeten Zelltypen zu etablieren, wurden zunächst vergleichende Messungen mit “Primären Bovinen Osteoblasten” (POB) und mit der Zelllinie Mg63 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen entweder auf fibronektin- oder auf kollagen beschichteten Substraten kultiviert. Es wurden Substrate mit 8% Acrylamid und 0,02% - 0,12% BIS-Acrylamid verwendet, um die beste Zusammensetzung für die Zellen zu finden und auch einen eventuellen Einfluss der Substratsteifigkeit auf das Kraftniveau der Zellen zu untersuchen. Denn wie Wang et al. (2000); Pelham and Wang (1998); Lo et al. (2000) zeigen, konnten wird das Zellverhalten, wozu auch Wachstum, Bewegung und Adhäsion zählen, durch die Beschaffenheit des Substrates in verschiedener Form beeinflussen.

Zellen wurden hierfür ca 24 bis 76 Stunden auf den Gelen kultiviert und dann für 60 bis 120 Minuten beobachtet. Alle 5 Minuten wurde je ein Phasenkontrastbild und ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Am Ende der Experiments wurde die Zelle durch Austausch des Nährmediums gegen Trypsinlösung vom Substrat abgelöst, um das Referenzbild der Fluoreszenzmarkerpartikel machen zu können.

2.5.2 Cytochalasin D Experimente

Pelham and Wang (1999) haben gezeigt, dass durch Depolymerisation von Aktinfilamenten mithilfe von Cytochalasin D die messbare Zugkraft in Zellen nachlässt bzw. ganz verschwindet. Um dies für POB und Mg63 Zellen zu überprüfen, wurde Cytochalasin D in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ (effektive Konzentration laut Wakatsuki et al. (2001)) dem Medium hinzugefügt, nachdem die Zelle für 20 Minuten unter normalen Versuchsbedingungen beobachtet worden war. Danach wurden

die Zellen für weitere 60 bis 120 Minuten beobachtet. Bilder wurden auch hier alle 5 Minuten aufgenommen und für das Referenzbild die Zellen mit Trypsin abgelöst.

Material

- Cytochalasin D: Sigma; Nr. C-8273

2.5.3 Messungen an GFP-Aktin transfizierten Zellen

An der Generierung der Zugkräfte, die auf das Substrat übertragen werden, ist das Zytoskelett beteiligt. Eine wichtige Funktion wird dabei dem Aktin zugeschrieben. Um während der Aufnahme der Zugkraftbilder auch die Aktinfilamente der Zellen beobachten zu können, wurden U2OS Zellen mit dem GFP-Aktin Plasmid transfiziert. Zellen, die das GFP-Aktin Plasmid aufnehmen und transkribieren, produzieren dann ein grün fluoreszierendes Aktin-Protein, welches in die von der Zelle produzierten Aktinfilamente integriert wird. Diese Technik ermöglicht die Visualisierung spezifischer Zellbestandteile der lebenden Zelle, ohne eventuell toxische Farbstoffe benutzen zu müssen. Das GFP-Aktin Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Beraiter-Hahn aus Frankfurt zu Verfügung gestellt. Die Zellen wurden vor den Experimenten für 48 Stunden mit dem Plasmid inkubiert. Vor dem Einbau in die Versuchskammer wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Für die Versuche befand sich normales 10 mM HEPES Ham's F 10 Medium in der Zellkammer. Während eines Versuches wurden die Zellen wie schon unter Abschnitt 2.5.1 beschrieben beobachtet. Nach 60 Minuten wurde bei einigen Versuchen Cytochalasin D hinzugegeben, um das Depolymerisieren der Aktinfilamente zu beobachten. Cytochalasin D depolymerisiert Aktinfilamente, ohne dabei andere Zellfunktionen in größerem Maße zu stören.

2.5.4 Applikation elektrischer Felder auf Zellen in Kultur

In der Arbeitsgruppe Experimentelle Orthopädie der Philippsuniversität in Marburg wurde eine Elektrokammer für Zellen entwickelt, um die Reaktionen von Osteoblasten auf elektrische Felder studieren zu können. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es, den Einfluss von elektrischen Feldern auf die Zugkraftmuster von Osteoblasten zu untersuchen. Daher wird der Aufbau der Kammer hier kurz erläutert. Die Elektrokammer basiert auf dem Modell von Harris et al. (1990). Der für die Zellen vorgesehene Teil hat die gleichen Abmessungen wie die unter 2.5 beschriebene

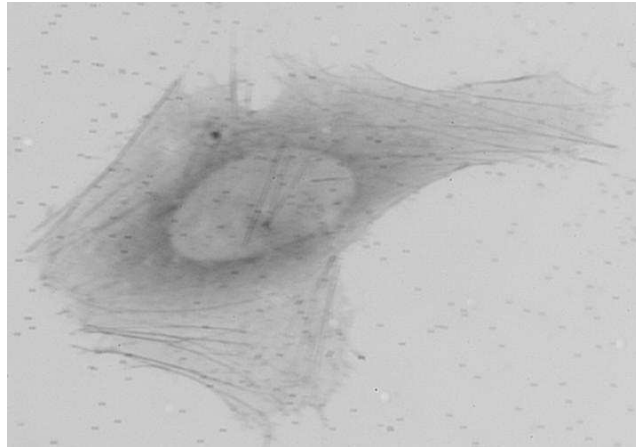


Abbildung 6: Beispiel einer mit dem GFP-Aktin Plasmid Transfizierten U2OS Zelle auf einem Fluoreszenzpartikel enthaltenden Polyacrylamidsubstrat. Es ist das Negativ eines Fluoreszenzbildes.

Zellkammer, sie ist aber nach oben hin offen. Auf den beiden kurzen Seiten dieser Kammer befindet sich jeweils ein räumlich getrennter Vorratsbehälter, der mit 0.9 %iger Kochsalzlösung gefüllt ist. In der Kochsalzlösung befinden sich Platinelektroden, die mit einem Gleichstromgenerator verbunden sind (Bio-rad 200/2.0 Power Supply, Life Science), um so das elektrische Feld anzulegen. Agarstreifen, die für jeden Versuchstag neu gegossen werden, verbinden die Vorratsbehälter mit der Zellkammer. So erreicht man eine Spannung im Nährmedium, ohne die negativen Effekte wie Elektrolyse und Elektroosmose (Steckel et al., 1984) oder das Herauslösen von toxischen Substanzen aus den Elektroden (Jorgensen, 1972) in Kauf nehmen zu müssen. An der Stelle der Kammer, an der sich während eines Versuches das Polyacrylamidgel mit den zu beobachtenden Zellen befindet, trennt ein Polycarbonatblock bis auf einen schmalen Korridor von $100\ \mu\text{m}$ die linke von der rechten Zellkammerseite. Wie die ganze aus Polycarbonat gefertigte Kammer, hat auch diese Brücke einen hohen Widerstand für elektrischen Strom und isoliert dadurch Anode und Kathode voneinander. Das elektrische Feld wird dadurch auf den schmalen Streifen unter dieser 1 cm langen Brücke konzentriert, wo sich die Zellen befinden. Dort wird auch die Spannung durch zwei Elektroden und einem digitalen Spannungsmessgerät (Fluke 75, Fotronic Corporation) kontrolliert.

Die Versuche wurden im Grunde wie die schon vorher erläuterten Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden in die Elektrokammer eingebaut und dann unter dem Mikroskop beobachtet. Bei einigen Versuchen wurden die Bilder nur alle 5 Minuten gemacht, dafür aber der gesamte Orientierungsprozess der Zelle dokumentiert. Vor dem Anschalten wurde die Zelle 20 bis 60 Minuten ohne elektrisches Feld beobachtet. Um eine hohe zeitliche Auflösung der ersten Orientierungsphase zu bekom-

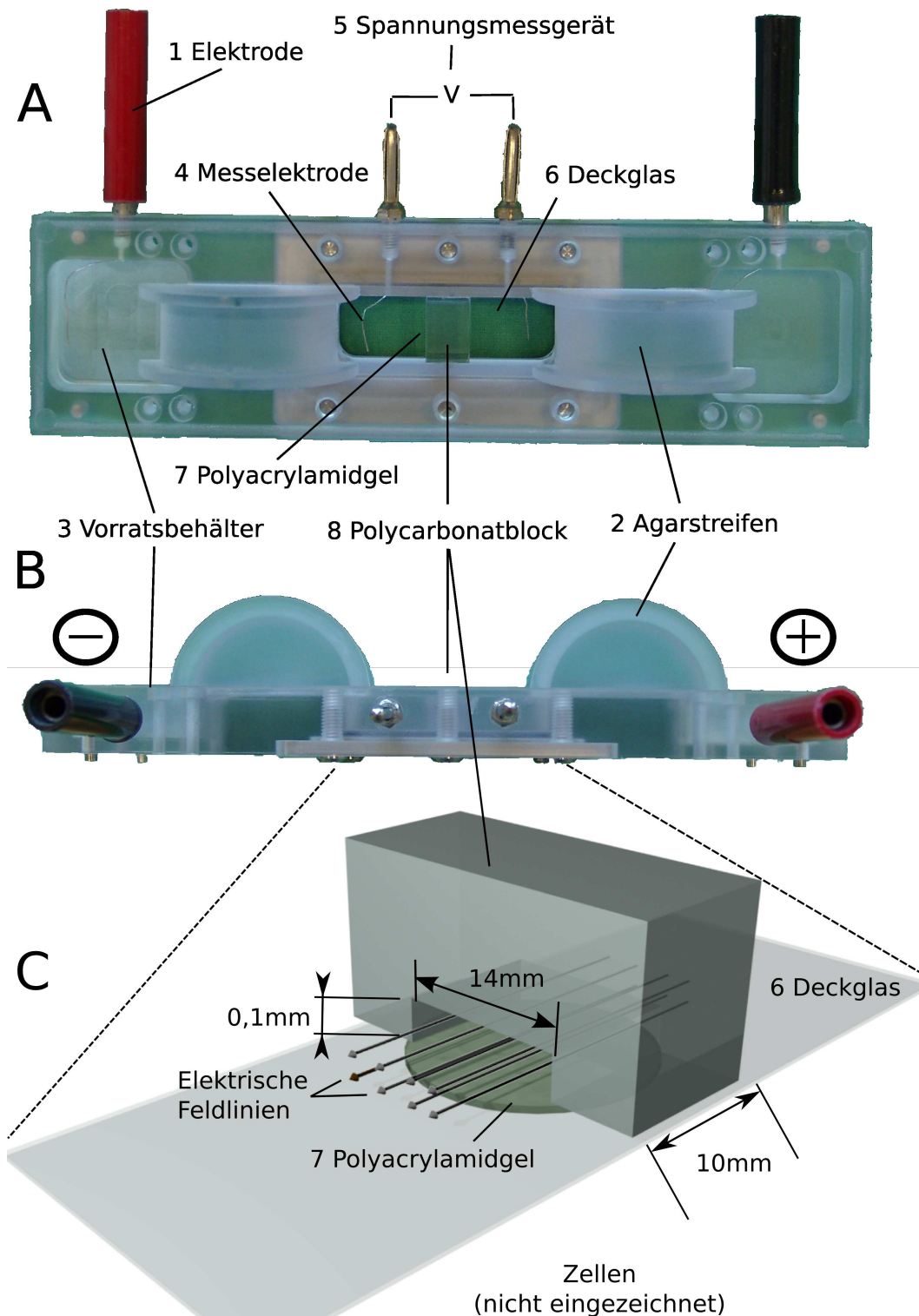


Abbildung 7: Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) der verwendeten Elektrokammer aus Polycarbonat. Die Spannung wird über die Elektroden (1) angelegt. Über die Agarbrücke (2) wird die Spannung aus den mit 0.9 %iger Kochsalzlösung gefüllten Vorratsbehältern (3) auf die eigentliche Zellkulturkammer in der Mitte übertragen. Die Spannung wird über Platinelektroden (4) in der Zellkammer gemessen (5). Die Zellkammer wird nach unten durch ein Deckglas (6) begrenzt. Die Zellen befinden sich auf dem Polyacrylamidgel (7). Die zu beobachtenden Zellen befinden sich unter dem elektrisch isolierenden Polycarbonatblock (8), welcher das elektrische Feld auf einen schmalen Korridor von 100 μm Höhe, 14 mm Breite und 10 mm Länge begrenzt (C).

men, wurden die Experimente mit 30 Sekunden zwischen den Bildern durchgeführt. Als erkennbar wurde, dass es Zellen gibt, die ihre Kraftmuster schon in den ersten 30 Sekunden signifikant verändert hatten, wurden die folgenden Experimente mit 10 Sekunden Abstand zwischen den Bildern gemacht. Dadurch entsteht aber eine sehr große Menge an auszuwertenden Daten. Ein zweites Problem stellt dabei die Aufnahme der Phasenkontrastbilder dar. Denn das Umschalten von Phasenkontrastbeleuchtung auf Fluoreszenzbeleuchtung kann unter Zeitdruck zu Erschütterungen des Mikroskoptisches führen, die ein Refokussieren der Fluoreszenzpartikelebene nötig macht. Vorsichtiges und akkurates Fokussieren ist aber in weniger als 10 Sekunden nicht möglich. Daher wurden für diese Versuche die Zellen nach 2 bis 5 Minuten wie üblich im 30 Sekunden Takt weiter beobachtet. Eine Minute vor Einschalten des elektrischen Feldes wurde noch ein Phasenkontrastbild aufgenommen, dann auf eine Bildaufnahme Frequenz von 1/10s für 5 Minuten umgeschaltet. So entstehen noch 5 Bilder vor dem Einschalten des Feldes und 25 mit elektrischem Feld. Während dieser Zeit wurde der gesamte Mikroskopaufbau nicht berührt, um Registrationsartefakte (siehe Abschnitt 2.6.3 auf der nächsten Seite) zu vermeiden. Drastische Änderungen der Zellprojektionsfläche im Phasenkontrastbild sind in diesen 5 Minuten bei 10 V/cm nicht zu erwarten und auch nicht beobachtet worden.

2.6 Die Analyse der Zugkraft

Inzwischen wurde ausgiebig erläutert, wie in Experimenten die Daten für die Berechnung von Kräften auf zellulärer Ebene gesammelt wurden. In dem folgendem Abschnitt werde ich erläutern, welche Schritte zum Auswerten dieser Daten nötig waren. Die eigentliche Berechnung der Kraftvektoren und die automatische Generierung der Deformationsmatrix (siehe Abschnitt 2.6.3) erfolgte mithilfe der Libtrc Computerprogramme, die mir freundlicherweise von Professor M. Dembo aus Boston zur Verfügung gestellt wurden. Als Rechner diente ein handelsüblicher i786 Dualprozessor PC mit Redhat Linux 7.1, 7.2, und 7.3 als Betriebssystem.

2.6.1 Bestimmung des Zellumrisses

Zu einem Fluoreszenzbild des durch die Zelle deformierten Substrates wurde auch ein zugehöriges Phasenkontrastbild aufgenommen, um die Projektion der Zellfläche auf das Fluoreszenzbild festzuhalten. Mit selbstgeschriebenen Makros für das Bildanalyseprogramm Image-Pro Plus 4.0 der Firma Media Cybernetics wurden Koordinaten festgehalten, die die Fläche der Zelle auf dem Bild möglichst genau

eingrenzten. Zur Orientierung und besseren Detektion von Zellbewegungen wurde auch stets die Projektion des Zellkerns bestimmt.

2.6.2 Determinieren der Ursprungsknoten für die Kraftvektoren

Der so erhaltene Zellumriss wird dann für die weiteren Berechnungen in 100 bis 1000 Unterregionen eingeteilt. Der Zellgeometrie entsprechend wird ein Netz eingepasst. Dies geschieht, indem zunächst ein Rechteck um die Zelle gezeichnet wird und dann dieses in vier gleich große Rechtecke geteilt wird. Nun wird wiederum jedes Feld weiter unterteilt. Dies macht man einige Male. Zwischendurch werden alle Vierecke, die außerhalb des Zellumrisses liegen, entfernt. Vierecke, die in der Nähe der Zellgrenzen liegen, werden dann so verformt, dass sie sich der Zellgrenze von beiden Seiten annähern. Spitze und stumpfe Winkel, die durch das Entfernen von Vierecken entstehen, werden geglättet. Am Schluss werden noch die restlichen Außenseiten der Vierecke auf die Zellgrenze verlegt, wenn noch nicht automatisch geschehen. Jeder Knotenpunkt dieses Netzes wird später als potentieller Ursprung einer wirkenden Kraft bei den späteren Berechnungen betrachtet.

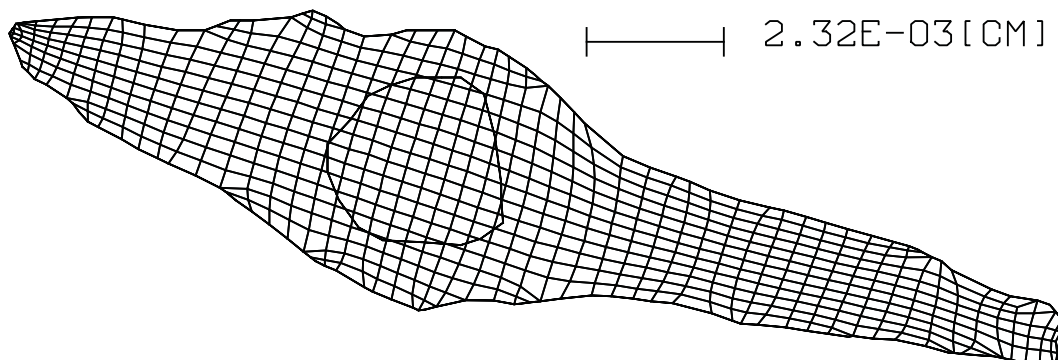


Abbildung 8: Ein Beispiel für das Produkt des "Paving" Algorithmus, mit dem auf der Projektionsfläche der Zelle Knotenpunkte als Ursprung für die Kraftvektoren definiert werden.

2.6.3 Erstellen der Deformationsmatrix

Da zu Beginn dieser Arbeit noch kein Programm zur Verfügung stand, um die Deformationsmatrix zu erstellen, musste diese für einige Versuche manuell erstellt werden, was allerdings einen sehr großen Zeitaufwand bedeutet und zusätzlich auch viel unpräziser ist. Aber zur Abschätzung der Gesamtkraft einer Zelle sowie zur Bestimmung der Richtung der Kraft war diese Methode ausreichend. In allen Fällen der Kraftmessungen an GFP transfizierten Zellen wurden die Substratdeformationsvektoren manuell erstellt, da es zu starker Überlagerung der Fluoreszenz des GFPs

und der Markerpartikel im Substrat kam. Da sich die Zelle und damit das Aktinergüst zum einen bewegen können und zum anderen das fluoreszierende Aktin auf dem Vergleichsbild nach Entfernen der Zelle nicht mehr vorhanden ist, konnte ein automatisches Bestimmen der Vektoren nicht zuverlässig durchgeführt werden. Dieses Problem würde sich aber, durch Verwendung von deutlich unterschiedlichen Emissionswellenlängen und scharf trennenden Filterblöcken, vermeiden lassen. Um tatsächlich Bewegungen mit dem Auge sicher feststellen zu können, mussten die Substrate für diese Form der Auswertung weicher sein, als für die später beschriebene automatische Auswertung.

Manuelle Vektorbestimmung Die Analyse erfolgte mithilfe selbstgeschriebener Makros für das Bildanalyseprogramm Image-Pro Plus 4.0 der Firma Media Cybernetics. Dazu wurde zunächst das Programm Corel Draw 9.0 der Firma Corel benutzt, um das zellfreie Fluoreszenzbild mit dem zu analysierenden verformten Bild zur Deckung zu bringen (fortan "registrieren" genannt). Dies geschieht, um eine eventuelles Bewegen des Mikroskopisches auszugleichen. Die so registrierten Bilder wurden nun, zusammen mit dem zugehörigen Phasenkontrastbild der Zelle zum Zeitpunkt der zu analysierenden Substratdeformation, in einen Film aus drei Rahmen umgewandelt. Jedem der Bilder wurde eine Funktionstaste der Computertastatur zugewiesen. Durch rasches Hin- und Herschalten entsteht dann ein Eindruck einer plastischen Zeitrafferanimation der Substratdeformation. Durch das Registrieren der Bilder, findet eine Bewegung der im Substrat befindlichen Markerpartikel nur in der näheren Umgebung einer Zelle statt. Jede Zeile der zu erstellenden Deformationsmatrix enthält die Koordinaten eines mit dem Mauszeiger ausgewählten Punktes auf dem zellfreien Bild und den entsprechenden Referenzpunkt auf dem durch die Zelle verformten Bild. Dadurch ist bei dieser Methode eine Deformationsvektor mit der Genauigkeit von einem Pixel der Kamera in Länge, Richtung und Position determiniert. Je nach Qualität der Bilder wurden so in der Region der Zelle 100 bis 300 Vektoren bestimmt und dann für die Berechnung der Kräfte eingesetzt.

Der Optische Fluss Algorithmus (Optical flow) Deutlich vereinfacht und präzisiert wurde die Technik der Zugkraftmessung durch das Xcorrflow Programm als Teil der neueren Libtrc Pakete. Dieses bedient sich eines korrelationsbasierten optischen Fluss-Ansatzes, um die Verformung des Substrates zu berechnen. Die Grundidee dabei ist, Intensitätsmuster auf beiden Bildern zur Deckung zu bringen. Im Folgenden werden die Koordinaten eines Pixels auf dem zellfreien, also entspann-

ten Bild, mit (x, y) und die des Bildes mit der substratdeformierenden Zelle mit (u, v) gekennzeichnet. Es soll jetzt die Wahrscheinlichkeit getestet werden, dass die Bewegung des Substrates die Koordinate (x, y) an die Stelle (u, v) transportiert hat. Ein einzelnes Pixel kann aber allein an seiner Helligkeit nicht eindeutig identifiziert werden, daher wird zur Identifikation die Umgebung der Koordinate untersucht. Dazu werden zwei Korrelationsfenster mit der Dimension $[2*cb+1]*[2*cb+1]$ und dem Zentrum am Punkt (x, y) bzw. (u, v) erstellt. Die Größe des Fensters um den Punkt wird dabei von cb bestimmt, welches so gewählt werden sollte, dass sich in dem Fenster ein möglichst einmaliges Intensitätsmuster des Fluoreszenzlichtes im Sinne eines "Fingerabdruckes" befindet. Als erster Bearbeitungsschritt des korrelationsbasierten Suchalgorithmus werden die Intensitäten der Bilder angeglichen, indem von jedem Intensitätswert der Bildmatrix eine Konstante abgezogen wird. Diese Konstante wird zuvor so bestimmt, dass danach die durchschnittliche Intensität eines jeden Bildes gleich Null ist. Die Übereinstimmung, oder besser die Ähnlichkeit, der beiden Korrelationsfenster wird mithilfe des Kreuzkorrelationskoeffizienten R berechnet. Der Kreuzkorrelationskoeffizient nimmt Werte von -1 bis $+1$ an. Für den eher unwahrscheinlichen Fall, dass das eine Bild genau das Negativbild des anderen ist, nimmt R den Wert -1 an. Liegt keinerlei Korrelation vor, ergibt sich für R der Wert 0 . Liegen identische Bilder in den Korrelationsfenstern, liefert die Berechnung $R = +1$. Um die räumliche Auflösung mit der die Substratdeformation angegeben wird festzulegen, legt man auch hier ein Gitter aus Knotenpunkten fest. Für jeden Knoten des Gitters $nbx * nby$, dessen Koordinaten durch (xj, yk) beschrieben werden, wird dann der korrespondierende Punkt gesucht. Hier ist $j = 1, 2, \dots, nbx$ und $k = 1, 2, \dots, nby$. Das bedeutet, man legt um jeden Punkt (xj, yk) des unverformten Substrates das Korrelationsfenster und sucht dazu die korrespondierenden Pixel (ujk', vjk') auf dem verformten Substrat. Für die größte Übereinstimmung hat R ein Maximum. Um dieses maximale R zu finden, wird ein "Lokaler Suchalgorithmus" benutzt. In diesem Ansatz wird die initiale Annahme gemacht, dass (ujk', vjk') an der Stelle (xj, yk) ist, d.h nicht verschoben wurde. Nun werden Werte für R aller Pixel innerhalb eines Suchabstandes, der vorher festgelegt wurde, bestimmt. Das Pixel mit dem höchsten Wert für R wird dann wiederum als neue Annahme für (ujk', vjk') übernommen. Bleibt die neue Annahme die gleiche wie die alte Annahme, wird die Suche abgebrochen, ansonsten geht die Suche weiter. Wenn alle korrelierenden Punkte (ujk', vjk') für alle Knoten des Gitters $nbx * nby$ gefunden sind, wird interpoliert, um die Annahme für das Maximum von R noch weiter zu verbessern. Die verwendete "5-punkt Quadrat" Methode erlaubt eine theoretische Genauigkeit von bis zu 0.1 Pixeln durch Interpolation und

damit von 25 nm im Idealfall (Marganski et al., 2003). Zu falschen Annahmen für Deformationsvektoren kann es bei dieser Methode kommen, wenn die tatsächlichen Deformationen sehr groß sind, wenn zu wenig Markerpunkte im Substrat vorhanden sind, die Korrelationsfenster zu klein gewählt werden und somit dort keine einmaliger “Fingerabdruck” vorhanden ist oder auch, wenn auf dem einen Bild Marker zu finden sind, die auf dem anderen Bild nicht vorhanden waren. Der letztgenannte Fall kann z.B. durch Autofluoreszenz von Zellbestandteilen oder selten durch Auswaschen von Markerpartikeln entstehen. Sind die Bilder schlecht ausgeleuchtet, oder zu wenige Markerpartikel vorhanden, kann es auch zu Fehlern kommen, weshalb Markerpunkte auch nicht beachtet werden, an denen das Verhältnis von Signal zum Hintergrundrauschen einen festgelegten Wert unterschreitet. Ebenfalls werden Markerpunkte entfernt, deren Kreuzkorrelationskoeffizient einen vorher festgelegten Wert unterschreiten. Ebenfalls zur Fehlervermeidung ist es sinnvoll, die physikalischen Eigenschaften der flexiblen Substrate zu beachten. Markerknötchen, an denen die Verschieberichtung stark von der Richtung der näheren Umgebung abweichen, werden auch als suspekt markiert und neu berechnet. Auch wenn der Betrag des Deformationstensors an einer Stelle einen limitierenden Wert übersteigt, gilt der zugehörige Knötchen als suspekt. Suspekte Knötchen werden neu berechnet, indem das Korrelationsfenster vergrößert wird und der Wert für $(u_{jk'}, v_{jk'})$ des am nächsten gelegenen unsuspekten Knötchens als Anfangsannahme übernommen wird. Es werden natürlich auch Registrationsartefakte ausgeglichen, die etwa durch Bewegungen des Mikroskoptisches im Zeitraum zwischen beiden Aufnahmen entstanden sein können. Für die eigentliche Berechnung wird dann der Korrektionsvektor zunächst zu jeder Koordinate addiert, der durch einen ähnlichen, etwas einfacheren Algorithmus bestimmt wird. Die hier erläuterte Methode wird im Detail von den Autoren des Programms beschrieben Marganski et al. (2003). Pro Bild wurden zwischen 2500 und 25000 Deformationsvektoren in der näheren Umgebung einer Zelle berechnet. Die nähere Umgebung bedeutet, dass die Maximalausdehnung der Zelle in x und y Richtung bestimmt, und ein Rechteck um die Zelle mit 30% größerer Ausdehnung auf der x - und der y -Achse definiert wurde.

2.6.4 Zur Darstellung der Bilder

Da in dieser Arbeit einige Vektorgrafiken präsentiert werden, gehe ich kurz auf die daraus zu entnehmende Information ein. Das hier einmal generell Erklärte gilt für alle dieser Vektorgrafiken und wird daher später nicht mehr in den einzelnen Bildunterschriften wiederholt.

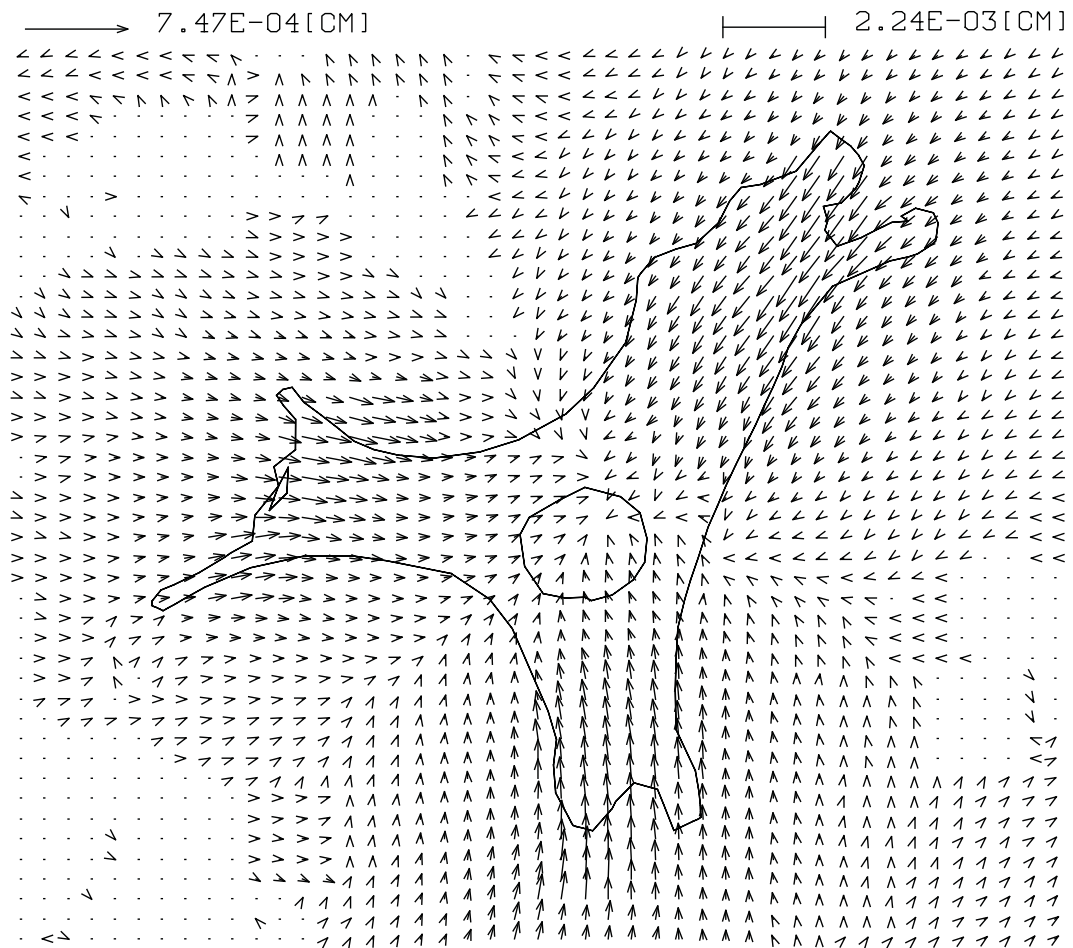


Abbildung 9: Beispiel einer Deformationsmatrix, die mit dem “Optical flow” Algorithmus erstellt wurde. Dabei hatte das Korrelationsfenster eine Größe von 61×61 Pixeln, der Suchabstand war auf 5 Pixel festgesetzt. Jeder signifikante Vektor ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet, auch wenn die Länge des Vektors aufgrund der Bildauflösung nicht zu erkennen ist.

Im allgemeinen ist auf den Vektorbildern nicht der gesamte Bildausschnitt zu sehen, der mit der Kamera aufgenommen wurde, sondern nur eine Bildregion um die Zelle, welche die x - und y -Ausdehnung der Zelle um ca. 30% überschreitet. Die tatsächliche Größe ist durch eine Maßstabangabe in Form einer Eichmarkierung im Zentimeter auf den Bildern angegeben. Ebenso wird die Referenzlänge der zu sehenden Vektoren durch einen Eichvektor angegeben. Für die Vektoren der Deformationsmatrix sind das ebenfalls Zentimeter, es ist aber zu beachten, dass nicht beides im gleichen Maßstab angegeben sein muss. Dies ist z.B. sinnvoll, wenn nur sehr kleine Deformationsvektoren auf einem verhältnismäßig großen Bildausschnitt visualisiert werden sollen. Die Eichmarken für Kraftvektoren wird in dyn/cm^2 oder N/m^2 angegeben, was eigentlich die Dimension eines Druckes und nicht einer Kraft ist. Da sich die Kräfte aber von Punkt zu Punkt unterscheiden, wäre es nötig viele Punkte zu kennen oder zu definieren, an denen die Kräfte wirken. Will man es nicht zur Voraussetzung machen, dass eine Kraft nur an den festgelegten Punkten wirkt, muss man die Kraft im Prinzip pro Flächeneinheit, also als Druck angeben. Dies wird später noch deutlich werden.

Die Vektoren der Deformationsmatrix werden nur angezeigt, wenn sie in der gewählten Vergrößerung mindestens einem Bildelement der Kamera entsprechen. Werden also der Bildausschnitt und die Deformationsvektoren 1:1 geplottet, sind Deformationen, die weniger als ein Bildelement betragen, nicht zu sehen. Diese Vektoren werden aber dennoch in der Berechnung beachtet. Für jeden Vektor, der aber eine oder mehr Bildelemente lang ist, wird auch ein Pfeilkopf gezeichnet, der aber unabhängig von der Vektorlänge die gleiche Größe hat. Dadurch wird die Richtung der Deformation besser zu erkennen, aber dafür die Verschiebestrecke bei hoher Datendichte unübersichtlich.

Bei den Versuchen mit elektrischen Feldern ist die Richtung der Feldlinien auch durch einen Richtungsvektor sowie die Stärke des Feldes in V/cm angegeben.

2.6.5 Berechnen der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt

Aus den experimentellen Deformationsvektoren ist der Computer nun in der Lage, durch das Lösen einiger Gleichungen, die wahrscheinlichsten Kraftvektoren für die Zelle zu errechnen. Dabei handelt es sich dann um die Projektion der Raumvektoren auf die Bildebene. Denn auch die Deformationsmatrix spiegelt ja nur die Bildebenenprojektion der Deformation des dreidimensionalen Raumes wieder. Aus den folgenden Erläuterungen wird aber deutlich, dass sich die Gleichungen trotzdem lösen lassen, wenn man nur die Bildebenenprojektion der Kraftvekto-

ren berechnen will. Aus der Geometrie einer Zelle auf einer glatten Oberfläche wird zudem verständlich, dass die Komponenten der Kraftvektoren in Richtung des Normalenvektors der Bildebene wahrscheinlich nicht sehr groß sind. Der verwendete Mikroskopaufbau bzw. die Objektiv haben eine Schichtdicke in der z -Richtung von $5 \mu\text{m}$. Fokussiert man nun genau die oberste Schicht der Fluoreszenzpartikel, so sieht man in $2,5 \mu\text{m}$ Schichtdicke die Ventralseite der Zelle und in $2,5 \mu\text{m}$ die Fluoreszenzpartikel. Jeder definierte Knotenpunkt des Substrates ist durch Koordinaten $m_p = (m_{p1}, m_{p2}, \varepsilon_p)$, mit $p = 1, 2, \dots, N_p$ im dreidimensionalen Raum determiniert. Dabei gibt ε_p die Position auf dem Normalenvektor an und ist dort gleichmäßig von 0 bis $-2,5 \mu\text{m}$ verteilt. Da die Zelle das flexible Substrat nicht infiltriert, sondern nur über fokale Kontakte angeheftet ist, werden Kräfte von der Zelle nur an der Oberfläche des Substrates übertragen. Nur auf der Oberfläche unter der Zelle definiert man daher Ursprungsknoten $r = (r_1, r_2, 0)$, wie in Abschnitt 2.6.2 schon erläutert. Die Ortsveränderung eines jeden definierten Knotenpunktes p im Substrat ist über ein Integral mit dem ursächlichen Kraftfeld verknüpft:

$$d_{p\alpha} = \int \int g_{\beta\alpha}(m_p - r) T_\beta(r) dr_1 dr_2 \quad (6)$$

Hierbei nehmen α und β die Werte 1, 2 und 3 ein. Die neun Funktionen $g_{\beta\alpha}(m - r)$, welche Koeffizienten des Greenschen Tensors sind, geben die Verschiebung bzw. Deformation des Substrates in der Richtung α am Punkt m verursacht durch eine Kraft in der Richtung β die am Punkt r wirkt an.

Die Dicke des Substrates von etwas $70 \mu\text{m}$ kann im Vergleich zu der maximalen Markerverschiebung von ca. $1 \mu\text{m}$ als unendlich betrachtet werden. Deshalb kann eine präzise Annäherung für $g_{\beta\alpha}$ der Gleichung 6 mithilfe der Theorie von J. Boussinesq (1895) gemacht werden:

$$\begin{aligned} g_{11} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{(2(1-v)r - x_3)}{r(r-x_3)} + \frac{(2r(v-x_3) + x_3^2)x_1^2}{r^3(r-x_3)^2} \right) \\ g_{21} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{(2r(vr - x_3) + x_3^2)x_1x_2}{r^3(r-x_3)^2} \right) \\ g_{31} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{x_1x_3}{r^3} + \frac{(1-2v)x_1}{r(r-x_3)} \right) \\ g_{12} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{(2r(vr - x_3) + x_3^2)x_1x_2}{r^3(r-x_3)^2} \right) \\ g_{22} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{(2(1-v)r - x_3)}{r(r-x_3)} + \frac{(2r(v-x_3) + x_3^2)x_2^2}{r^3(r-x_3)^2} \right) \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned}
g_{32} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{x_2 x_3}{r^3} + \frac{(1-2v)x_2}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{13} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{x_1 x_3}{r^3} + \frac{(1-2v)x_1}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{23} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{x_2 x_3}{r^3} + \frac{(1-2v)x_2}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{33} &= \frac{1+v}{2\pi E} \left(\frac{2(1-v)}{r} + \frac{x_3^2}{r^3} \right)
\end{aligned}$$

Hier ist $x = (x_1, x_2, x_3)$ ein kartesischer Vektor und damit der Abstand vom Ursprung $r \equiv (x_1^2 + x_2^2 + x_3^2)^{1/2}$, E ist der Elastizitätsmodul nach Young und ν steht für die Poissonzahl. Jedes Element $g_{\beta\alpha}$ des Tensors hat die Einheit Abstand pro Kraft. Die Herleitung der Gleichungen 7 würde hier den Rahmen sprengen, es sei deshalb auf Landau and Lifshitz (1986) verwiesen.

Innerhalb des Zellumrisses werden für die Knoten $k = 1, 2, \dots, N_n$ dann die Kraftvektorkomponenten in der Bildebene geschätzt:

$$T_\beta(r) \approx T_{k\beta} H_k(r) \quad (8)$$

Hier ist $H_k(r)$ eine standard-bilineare Umrissfunktion und $T_{k\beta}$ stellt die Komponenten der Zugkraftvektoren an den Knoten k mit den Richtungskomponenten β dar. Jede beliebige Berechnung für $T_{k\beta}$ bei gegebenem Knotennetz erlaubt das Erstellen eines Kraftvektorprojektionsbildes. Durch Einsetzen der Gleichung 8 in die Gleichung 6 wird deutlich, dass jedes Kraftvektorbild Vorhersagen für die Deformationsmatrix macht:

$$d_{p\alpha} = d_\alpha(m_p) = T_{k\beta} \int \int g_{\alpha\beta}(m_p - r) H_k(r) dr_1 dr_2 = A_{k\beta p\alpha} T_{k\beta} \quad (9)$$

Dabei ist $A_{k\beta p\alpha}$ nur abhängig von der Geometrie der Netzknoten, der Deformationsmatrix und den Materialeigenschaften des Substrates. Die Punkte der Deformationsmatrix sind durch $p = 1, 2, \dots, N_p$ gegeben. Es wird im Prinzip wieder zurückgerechnet, welche Deformationsmatrix man im Experiment hätte haben müssen, wenn dem diese errechnete Verteilung der Zugkraftvektoren zugrunde gelegt wird. Um die Qualität der Berechnungen zu überprüfen, kann man rein optisch das errechnete Bild der Deformationsvektoren mit dem experimentell gewonnenen vergleichen. Um das Ganze aber mathematisch zu überprüfen und zu objektivieren, wurde der implementierte Chi-Quadratstest (χ^2) eingesetzt:

$$\chi^2 \equiv (\hat{d}_{p\alpha} - d_{p\alpha})^2 \sigma_{p\alpha}^{-2} = (\hat{d}_{p\alpha} - A_{k\beta p\alpha} T_{k\beta})^2 \sigma_{p\alpha}^{-2} \quad (10)$$

Die experimentellen Verschiebevektoren werden hier durch $\hat{d}_{p\alpha}$ angegeben, wobei α die Koordinatenachse angibt und p die Punkte der Deformationsmatrix sind. Der Fehler von $\hat{d}_{p\alpha}$ wird durch $\sigma_{p\alpha}$ angegeben. Es wird also jedes Element der experimentellen Deformationsmatrix mit dem zugehörigen Element der zum errechneten Zugkraftbild gehörenden Deformationsmatrix verglichen.

Die intrinsische Komplexität eines solchen Kraftvektorbildes wird bestimmt durch:

$$\varphi^2 \equiv \int_{\Omega} (\delta_{\alpha} T_{\beta} + \delta_{\beta} T_{\alpha}) (\delta_{\alpha} T_{\beta} + \delta_{\beta} T_{\alpha}) dr_1 dr_2 \quad (11)$$

Durch Ersetzen aus Gleichung 8 und Integration erhält man:

$$\varphi^2 = C_{i\alpha j\beta} T_{i\alpha} T_{j\beta} \quad (12)$$

$C_{i\alpha j\beta}$ ist dabei nur von der Geometrie des Knotennetzes abhängig.

Man kann nun die Gleichungen 10 und 12 zusammenfassen und nach der Gleichung von Bayes die Wahrscheinlichkeit für $T_{k\beta}$ bestimmen:

$$L_b(T_{k\beta} | \hat{d}_{p\alpha}) = \exp[-(\chi^2 + \lambda\varphi^2)] \quad (13)$$

Hier ist λ eine positive reelle Zahl, die nach dem Kriterium der maximalen Entropie bestimmt werden muss. Die Zugkräfte können dann für vorgegebene λ Werte berechnet werden, indem man das Minimum des Ausdruckes $\chi^2 + \lambda\varphi^2$ sucht. Die Werte für χ^2 und φ^2 , die man durch Einsetzen solcher Kraftvektoren maximaler Wahrscheinlichkeit in die Gleichungen 10 und 12 erhält, benennt man dann um in $\bar{\chi}^2$ und $\bar{\varphi}^2$. Für ansteigende Werte für λ steigt auch der $\bar{\chi}^2$ Wert, hingegen fällt der Wert von $\bar{\varphi}^2$. Beginnt man mit $\lambda = 0$ und steigert es auf $\lambda = 1$, $\lambda = 2$ und so weiter, erreicht man möglicherweise einen Punkt an dem $\bar{\chi}^2$ nicht mehr akzeptierbar ist. Gewöhnlich nennt man einen Wert für einen Chi-Quadrat Test nicht mehr akzeptierbar, wenn $\bar{\chi}^2 \geq N_p + \sqrt{N_p}$ ist. Das Vektorbild für $\bar{\chi}^2 \approx N_p + \sqrt{N_p}$ ist dann das einfachste Kraftvektorverteilungsbild, das mit den experimentellen Daten vereinbar ist.

Zum Abschluss werden nochmal alle Vektoren des besten Datensatzes auf statistische Signifikanz überprüft. Dazu wird die Bootstrap Methode von Efron and Tibishirani (1986) benutzt. Der Grundgedanke dieser Methode ist es, dem Bild mit der

größten Wahrscheinlichkeit ein Grundrauschen zuzufügen, es dann neu zu berechnen, wieder Rauschen hinzuzufügen und berechnen, usw. Die verwendete Bootstrap Methode wird im einzelnen beschrieben von Dembo et al. (1996).

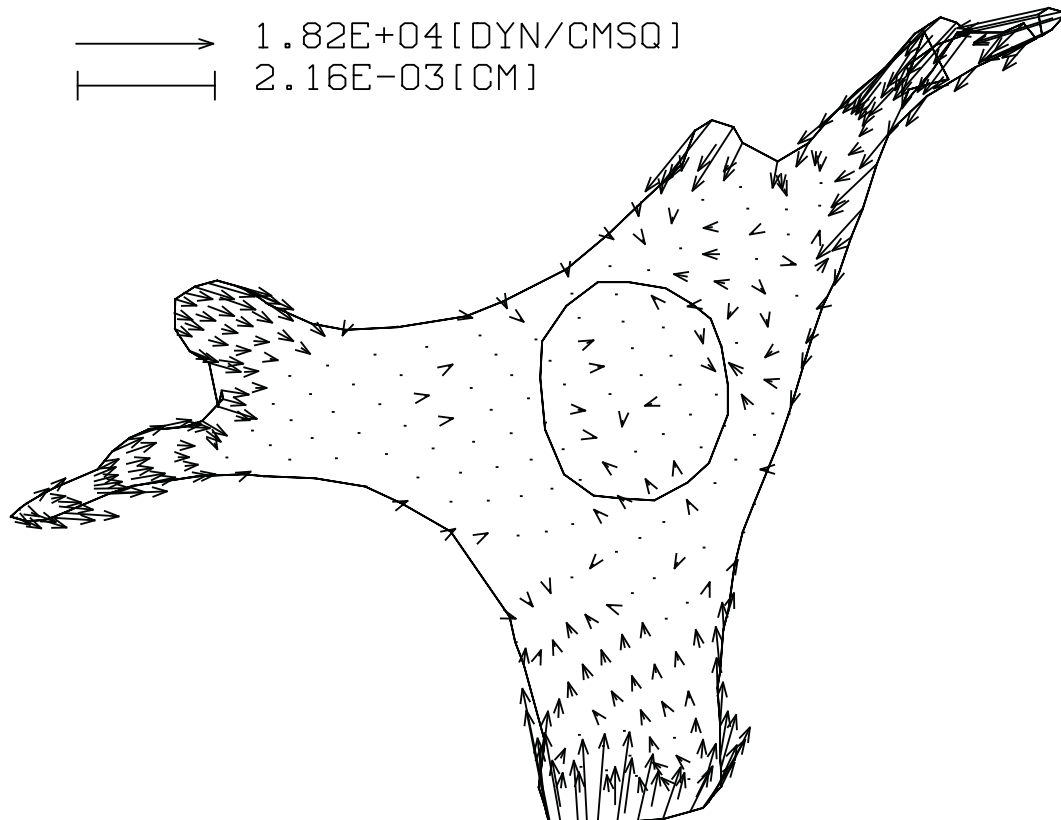


Abbildung 10: Beispiel für ein Zugkraftvektorbild. Es sind nur Vektoren geplottet, die nach der Bootstrap Methode als signifikant gelten. Die zugehörige Deformationsmatrix ist in der Abb. 9 zu sehen.

3 Ergebnisse

Bevor die Ergebnisse zu den unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Experimenten präsentiert werden, sind noch ein paar Erkenntnisse zur Methode zu besprechen.

3.1 Elastizitätseigenschaften der Substrate

Die Messung der Elastizitätseigenschaften der Substrate mit dem Rasterkraftmikroskop (siehe 2.3.3 auf Seite 29) ergab reproduzierbare Werte, deren Standardabweichung unter 1% liegt. Messungen aus verschiedenen Chargen führten z.B. für eine Zusammensetzung aus 0,03% BIS-Acrylamid und 8% Acrylamid zu einem Elastizitätsmodul von 2977 N/m^2 mit einer Standardabweichung von 0,4%.

Substrate mit 0,04% BIS-Acrylamid und 8% Acrylamid lagen z.B. bei 4400 N/m^2 ($SD = 0,48\%$). Der Zusammenhang der BIS-Acrylamidkonzentration mit der Elastizität wird aus Abbildung 11 ersichtlich, wo einige Substrate mit 8% Acrylamid und variabler BIS-Acrylamid Konzentration grafisch dargestellt sind.

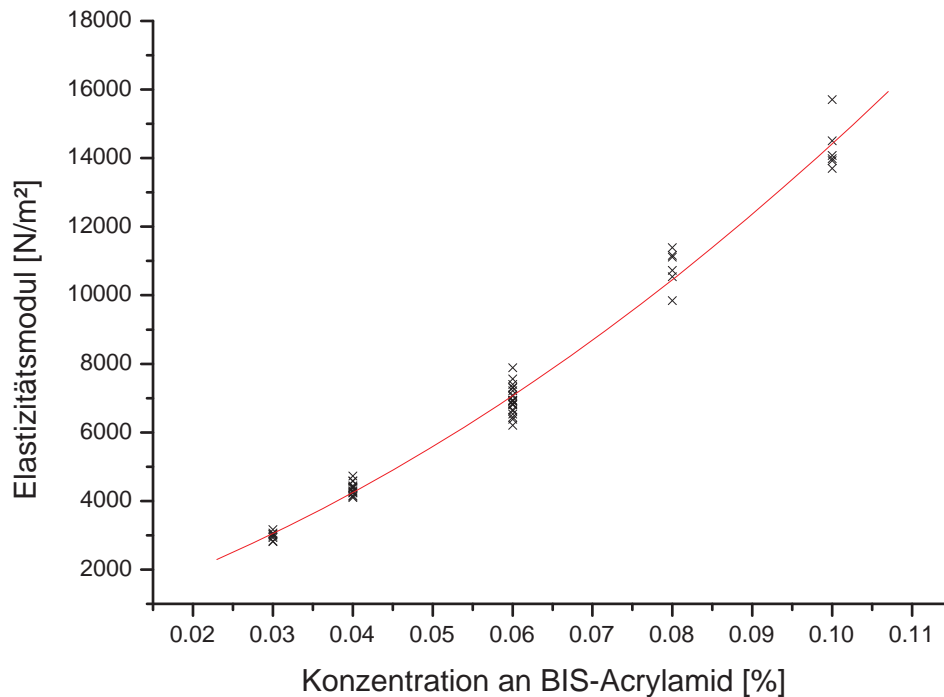


Abbildung 11: Es wurde der Elastizitätsmodul von Polyacrylamidsubstraten mit dem Rasterkraftmikroskop gemessen, die sich nur in der Konzentration von BIS-Acrylamid unterschieden. Die Regressionskurve zweiter Ordnung wurde mit der "Fit Polynomial" Funktion des Programms Microcal Origin erstellt.

Mit ca. 4000 N/m^2 haben die für diese Experimente verwandten Zellsubstrate einen Elastizitätsmodul in der gleichen Größenordnung wie Zellen selber, die mit 300 N/m^2 bis 5000 N/m^2 angegeben werden. Um die Größenordnung etwas anschaulicher zu machen, sei erwähnt, dass ein 4000 Pa Gel einen auf beiden Beinen stehenden 75 kg schweren Menschen um ca. 25 cm einsinken lassen würde, dabei wird die Annahme gemacht, dass das Gel eine unendliche Dicke hat. Der Elastizitätsmodul für Stahl liegt bei 100 GPa .

3.2 Phänotypisierung der Osteoblasten

Die für diese Arbeit verwendeten primären bovinen Osteoblasten wurden nach der in Kapitel 2.2.3 auf Seite 24 beschriebenen Methode gewonnen. Immunocytoche-

misch wurden die Proteine Osteocalcin und Prokollagen Typ-I in einem Großteil der Zellen nachgewiesen. Differenzierte Osteoblasten produzieren fast ausschließlich Kollagen Typ-I. Das Protein Osteocalcin wird nur von Knochenzellen synthetisiert und ist in ausdifferenzierten Osteoblasten zu finden. Daher kann darauf geschlossen werden, dass sich in den verwendeten Zellkulturen Osteoblasten befanden.

3.3 Qualität der Kraftvektorberechnung

In der Abbildung 12 ist eine experimentelle Deformationsmatrix der theoretischen Deformationsmatrix des wahrscheinlichsten Kraftvektorfeldes gegenübergestellt. Es wurde mithilfe des optischen Fluss-Algorithmus die experimentelle Deformationsmatrix aus zwei Bildern bestimmt, die nicht exakt aus der gleichen Fokusebene stammen. Dadurch wirkt das geplottete Vektorbild etwas "verrauscht". Wird aus diesem Bild dann im nächsten Schritt das wahrscheinlichste Kraftvektorbild nach der unter 2.6.5 beschriebenen Methode bestimmt, dann repräsentiert das untere Bild der Abbildung 12 die theoretische Deformationsmatrix, die aus den berechneten Kraftvektoren resultieren würde. Es fällt auf, dass das theoretische Bild die größeren Verschiebevektoren in gleicher Weise darstellt, aber auch, dass das "Grundrauschen" im theoretischen Bild nicht mehr auftaucht.

Abbildung 13 zeigt eine experimentelle Deformationsmatrix, der eine bessere Bildqualität als in der Abbildung 12 zugrunde liegt. Das untere Bild repräsentiert wieder die theoretischen Deformationen, die aus den berechneten Kräften resultieren würden. Es ist zu erkennen, dass die Bilder sich im Wesentlichen nicht unterscheiden. Allerdings ist im oberen Bild der linke untere Bereich durch Deformationen gekennzeichnet, die im unteren Bild nicht auftauchen. Dies ist auf eine andere Zelle zurückzuführen, die sich im Anschluss an den Bildausschnitt nach unten links befindet. Wie man aber erkennen kann, war der Abstand der zweiten Zelle zur untersuchten Zelle ausreichend, da die Vektoren zu keinem Kraftvektor der untersuchten Zelle geführt haben, der einer zentrifugalen Kraft entsprechen würde. Daher gibt es keinen wahrscheinlichen Vektor auf dem Zellgebiet der eine Deformation in dem linken unteren Bildausschnitt des unteren Bildes der Abbildung 13 hätte bewirken können. Aber es ist möglich, dass die zweite Zelle das eigentlich von der untersuchten Zelle deformierte Substrat an dieser Stelle wieder ein kleines Stück von der Zelle wegzieht und sich damit die Kräfte der Zellen an dieser Stelle teilweise neutralisieren. Dadurch würden die Kraftvektoren an benachbarten Zellbereichen mit einem kleineren Betrag und eventuell falschen Richtungskomponenten berechnet. Daraus wird deutlich, dass es mit dieser Technik nur möglich ist, Aussagen über die

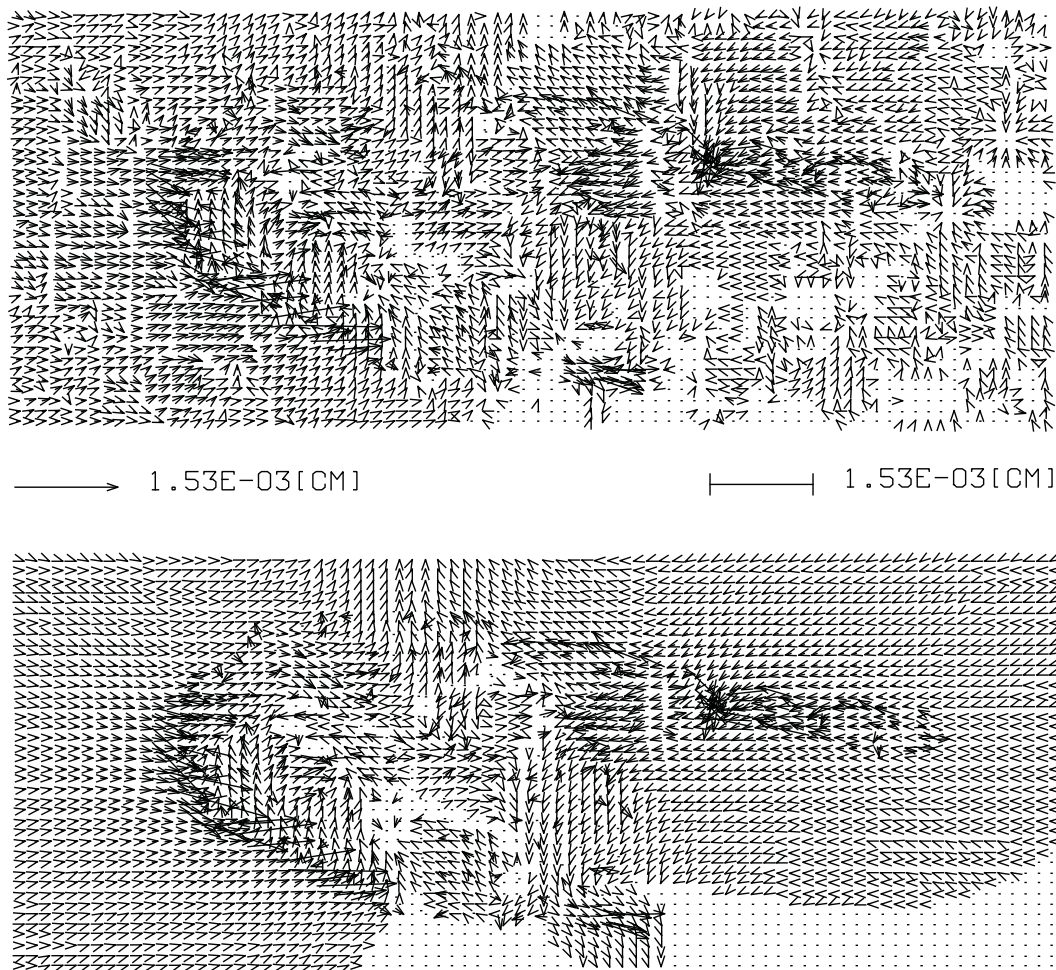


Abbildung 12: Auf dem oberen Bild ist eine vom "Optical Flow" Algorithmus erstellte experimentelle Deformationsmatrix. Das untere Bild repräsentiert die theoretische Deformationsmatrix gleicher Markerdichte, die das nach der beschriebenen Methode gewonnene wahrscheinlichste Kraftvektorfeld der experimentellen Daten wiedergeben. (Näheres im Text)

Gesamtkraft einer Zelle zu machen, wenn es sich um eine einzelne Zelle handelt. Der Sicherheitsabstand zu benachbarten Zellen sollte daher je nach Substratelastizität 15 bis 40 μm betragen.

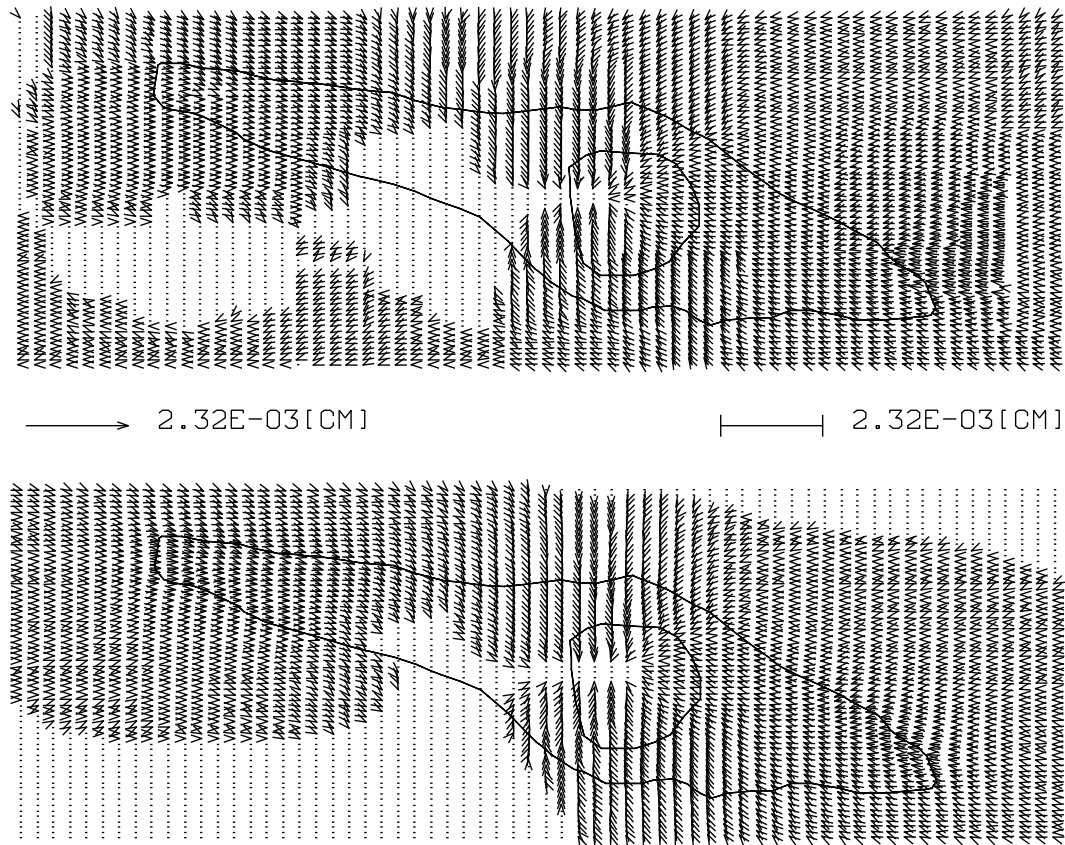


Abbildung 13: Auf dem oberen Bild ist eine vom "Optical Flow" Algorithmus erstellte experimentelle Deformationsmatrix. Das untere Bild repräsentiert die theoretische Deformationsmatrix gleicher Markerdichte, die das nach der beschriebenen Methode gewonnene wahrscheinlichste Kraftvektorfeld der experimentellen Daten wiedergeben. (Näheres im Text)

3.4 Muster der Kraftverteilung von POB und Mg63 Zellen

Sowohl Fibroblasten als auch Keratozyten üben die größten Kräfte auf ihre Unterlage entlang ihrer Longitudinalachse aus (Galbraith and Sheetz, 1997; Oliver et al., 1999), wobei sich die Bewegungsrichtung um 90° unterscheidet. Fibroblasten wandern entlang ihrer Longitudinalachse und Keratozyten senkrecht zu dieser Achse. Mit verschiedenen Techniken konnte in unabhängigen Arbeiten gezeigt werden, dass Fibroblasten besonders in der Schwanzregion sehr hohe Kräfte ausüben (Galbraith and Sheetz, 1997; Oliver et al., 1999; Lo et al., 2000). Osteoblasten zeigen ein ähnliches Motilitätsverhalten wie auch Fibroblasten, aber im Vergleich zu

den MG63 Osteosarkomzellen ist deren Fortbewegungsgeschwindigkeit deutlich geringer.

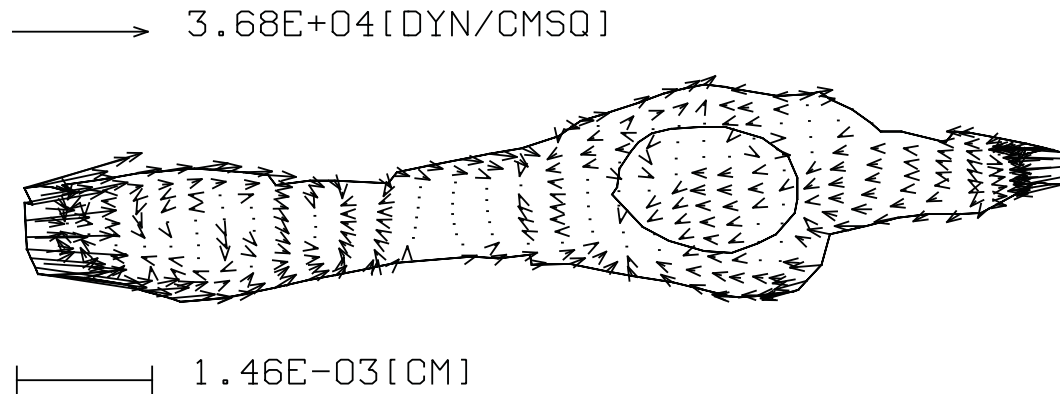


Abbildung 14: Zugkraftmuster eines primären bovinen Osteoblasten auf einem Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 4200 N/m^2 . Die Zelle bewegte sich von rechts nach links.

Abbildung 14 zeigt ein typisches Kraftmuster eines primären bovinen Osteoblasten. Die höchsten Zugkräfte sind am vorderen Zellpol lokalisiert. Die Zugrichtung der Kräfte ist der Bewegungsrichtung der motilen Zelle entgegen gerichtet. Ein großer Teil der Kraft wird durch entgegengesetzte Zugrichtungen am hinteren Zellpol antagonisiert. Kurz hinter der Kraftfront am vorderen Pol befindet sich üblicherweise eine Zone mit niedrigen Zugkräften. Typisch sind auch die relativ kleinen Kräfte unter dem Zellkern und in dessen Umgebung. Die gleichen typischen Merkmale sind nochmal in Abbildung 15 dargestellt.

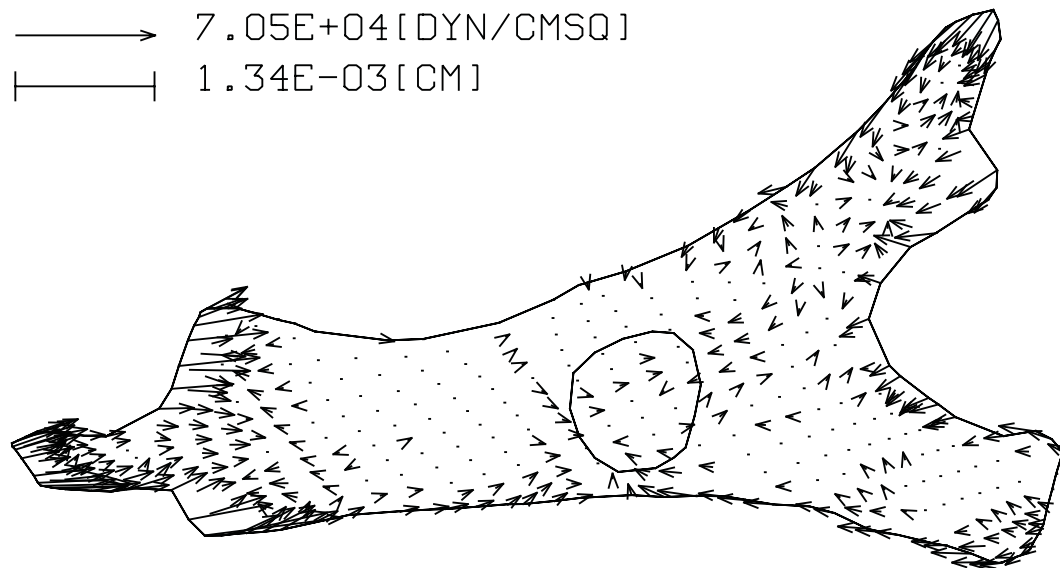


Abbildung 15: Zugkraftmuster eines primären bovinen Osteoblasten auf einem Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 4200 N/m^2 .

Ein repräsentatives Kraftverteilungsmuster einer MG63 Osteosarkomzelle ist in Abbildung 16 zu sehen. Zunächst fällt die für motilere Zellen typische Morphologie auf. Der sehr breite vordere Zellpol weist auch hier die größten Kraftvektoren auf. Dem gegenüber liegen auch wieder entgegengesetzte Vektoren am hinteren Zellpol. Aber auch am Zellkörper weisen kleinere Kraftkomponenten in Richtung Zellkern. Die Zone um den Zellkern ist auch hier relativ frei von größeren Kräften. Im Unterschied zu den Osteoblasten ist hier aber die Größe bzw. der Maßstab der Vektoren zu beachten. Die dargestellten Kräfte der Osteoblasten sind um ein Vielfaches größer als die der MG63 Zellen (siehe 3.5). Es ist daher nicht der Fall, dass Osteoblasten nur am vorderen und am hinteren Zellpol Kräfte auf die Unterlage ausüben. Auch dazwischen sind zellkernwärts gerichtete Kräfte zu finden.

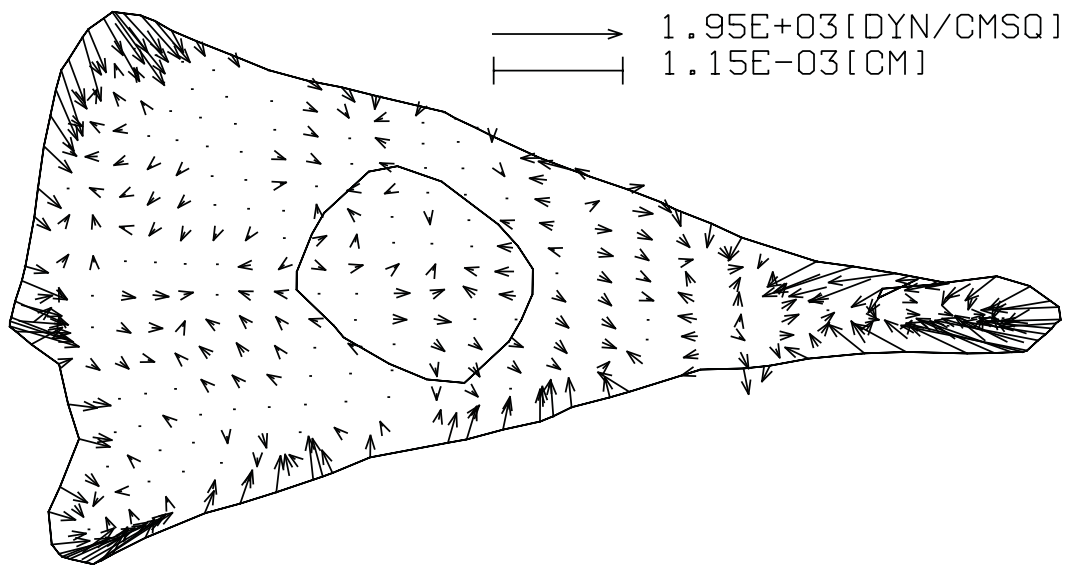


Abbildung 16: Zugkraftmuster einer MG63 Osteosarkomzelle auf einem Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 4200 N/m^2 .

3.5 Statistik zu den Gesamtkräften

Zum Vergleich der durchschnittlichen Gesamtzugkraft der verschiedenen Zelltypen wurden 21 primäre bovine Osteoblasten und 26 MG63 Zellen auf Substraten aus 8% Acrylamid und 0.03% BIS-Acrylamid untersucht. Die durchschnittliche Kraft pro Fläche wurde für Osteoblasten an 161 Einzelmessungen und für MG63 Zellen an 181 Einzelmessungen durchgeführt. Der Zeitraum zwischen den Einzelaufnahmen lag bei mindestens 5 Minuten.

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen primären Osteoblasten und MG63 Zellen festgestellt werden. Der Mittelwert der Durchschnittskraft pro Zelle betrug

für Osteoblasten 660 nN und für MG63 Zellen nur 47 nN. Mithilfe des t-Testes und einem Ein-Weg Anova Test kann man den statistisch signifikanten Unterschied bestätigen. Dabei erhält man bei dem t-Test für $p = 2,50033E-61$ ($\alpha = 0.05$). Da es möglich ist, dass ein Teil der Kraftunterschiede durch deutliche Unterschiede in der Zellgröße zustande kommen, war es auch nötig, diese Werte durch die Zellfläche zu teilen. So kommt man für Osteoblasten auf 228 N/m^2 und für MG63 Zellen auf 15 N/m^2 . Auch hier ist der t-Test mit $p = 8,3729E-54$ ($\alpha = 0.05$) und auch der Ein-Weg Anova Test in höchstem Maße signifikant. In der Abbildung 17 ist die Verteilung der Durchschnittswerte nochmal in einem Diagramm zusammengefasst.

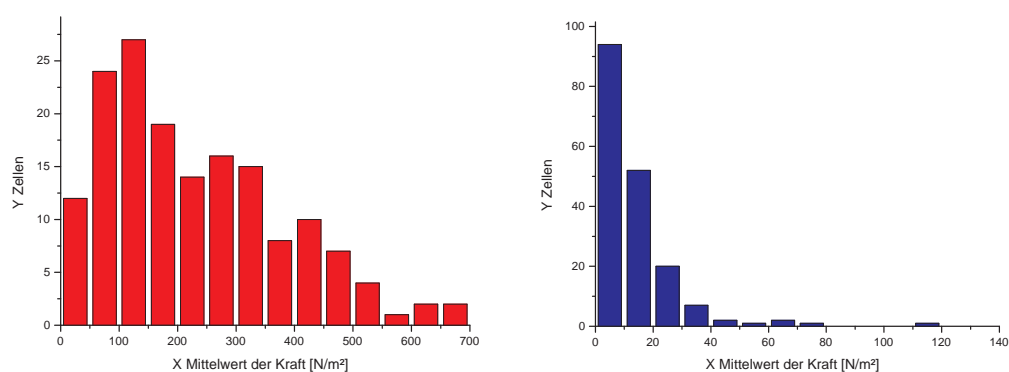


Abbildung 17: Verteilung der durchschnittlichen Zugkraft auf Substraten mit einem Elastizitätsmodul von 3000 N/m^2 . Links: 161 Messungen an 21 primären bovinen Osteoblasten. Rechts: 181 Messungen an 26 MG63 Zellen.

3.6 GFP-Aktin transfizierte Zellen

Bei den Experimenten mit den GFP-Aktin transfizierten Zellen wurde deutlich, dass die Hauptrichtungen der Zugkraft mit der Längsachse der GFP-Aktinbündel übereinstimmt. Dies ist am besten an einer Bildersequenz oder einer Computeranimation der Fluoreszenzbilder zu erkennen. Um es hier darzustellen, sind in der Abbildung 18 einige Aktinfaserbündel und in einem anderen Bild die größten Zugkraftvektoren farblich markiert. Es ist aber auch zu erkennen, dass nicht alle sichtbaren Aktinfilamentbündel auch eine signifikante Kraft auf die Unterlage ausüben.

Nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Cytochalasin D konnte das Depolymerisieren der Aktinfilamente beobachtet werden. Die Zugkräfte der Zelle sanken innerhalb von 10 bis 15 Minuten auf nicht mehr messbare Werte ab. Dabei änderte sich die Ausbreitungsfläche der Zellen zunächst nicht. Erst als die Kraft nicht mehr nachweisbar war, konnte man den Retraktionsprozess der Zelle beobachten. Wurde das Cytochalasin wieder

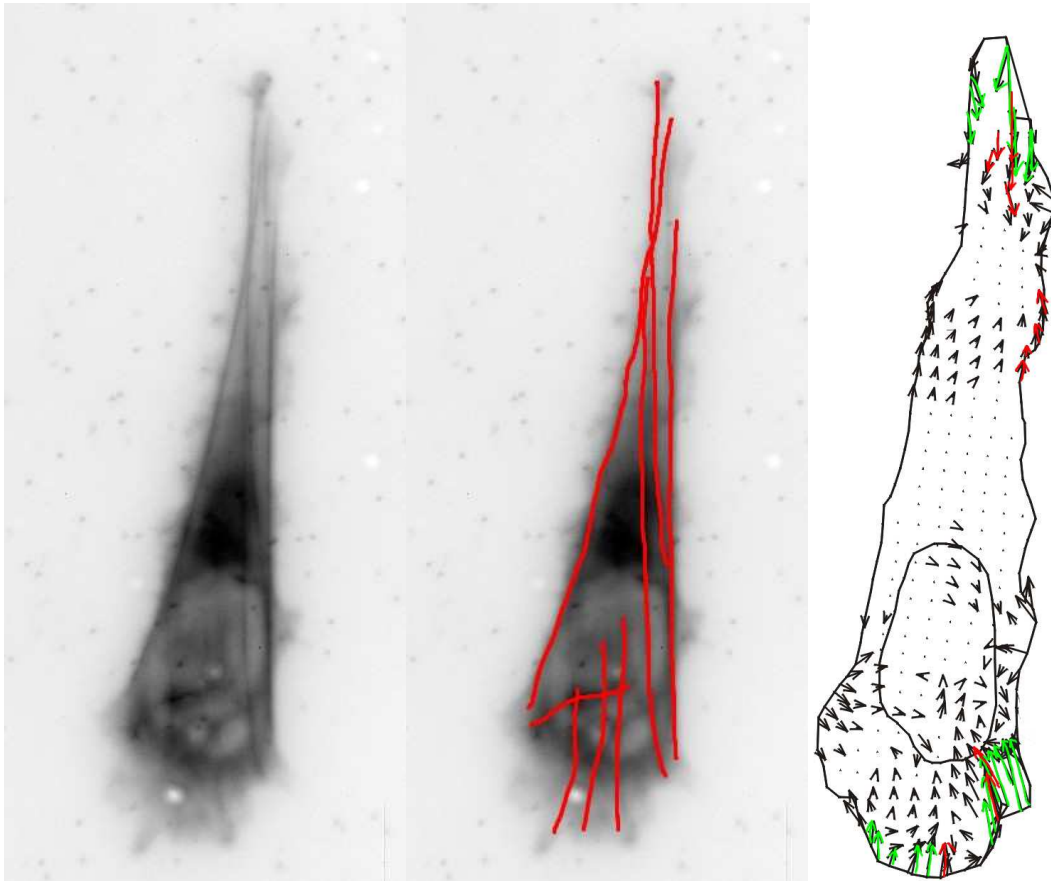


Abbildung 18: GFP-Aktin transfizierte Zelle. Links sind die Aktinfilamente auf dem Negativ des Fluoreszenzbildes zu sehen. In der Mitte sind die einige dicke Filamente nachgezeichnet. Auf dem rechten Bild (etwas anderer Maßstab) sind die zugehörigen Zugkraftvektoren teilweise nachgezeichnet.

gegen normales Nährmedium ausgetauscht, bevor die Zelle sich von der Unterlage abgelöst hatte, breitete sie sich wieder aus.

3.7 Zellen unter dem Einfluss elektrischer Felder

3.7.1 Orientierung auch auf flexiblen Substraten?

Zunächst wurde überprüft, ob der im Abschnitt 1.3.3 beschriebene Orientierungsprozess von Osteoblasten auf Polyacrylamidsubstraten auch stattfindet, wenn sie elektrischen Feldern ausgesetzt werden. Es war kein Unterschied im Orientierungsprozess zwischen Zellen auf Polyacrylamidsubstraten und Deckgläsern zu erkennen, mit der Einschränkung, dass der Orientierungsprozess auf Polyacrylamidsubstraten etwas länger zu dauern scheint. Ein solcher Orientierungsprozess auf einem Polyacrylamidsubstrat ist in Abbildung 19 dargestellt.

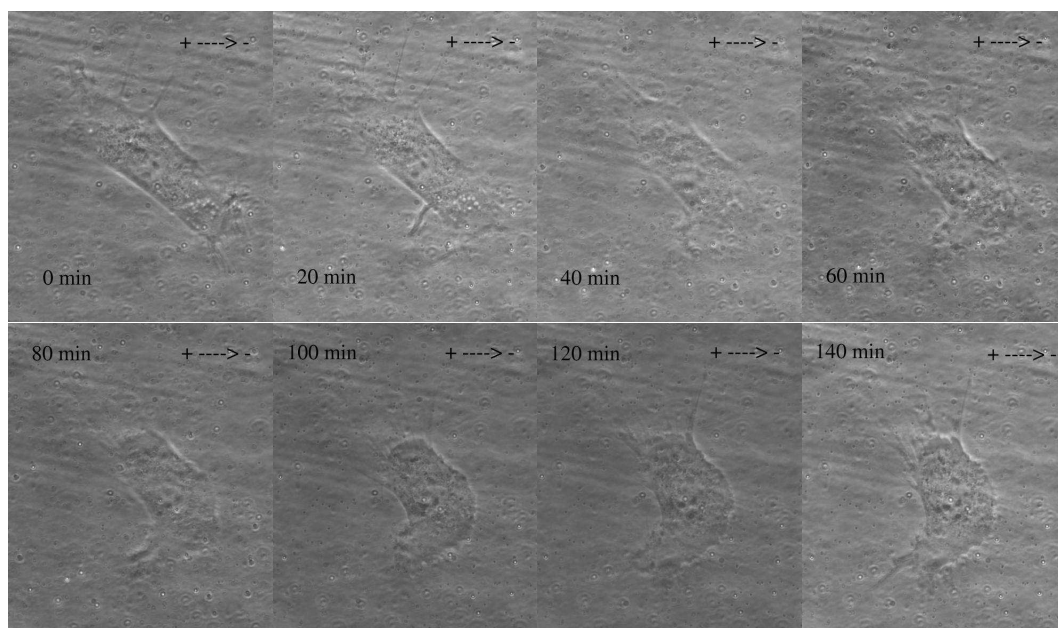


Abbildung 19: Orientierungsprozess eines primären Osteoblasten auf einem Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 3000 N/m^2 .

3.7.2 Ändert sich die Gesamtzugkraft?

Um zu überprüfen, ob das elektrische Feld die Gesamtzugkraft von Zellen signifikant verändert, wurden durch Integrieren der Kraftspannungen auf der gesamten Zellfläche die Gesamtkräfte der Zellen untersucht. Die Gesamtzugkraft der MG63 Zellen hat sich z.B. nach 5 Minuten unter dem Einfluss von 10 V/cm um durchschnittlich 10% erhöht, das Ganze aber mit einer Standardabweichung von 23%.

Versuche mit elektrischen Feldern führten zu auswertbaren Bildern bei 14 primären bovinen Osteoblasten und bei 21 MG63 Zellen. Je nach Typ des Experimentes (siehe 2.5.4) entstanden dabei zwischen 2 und 30 Bildern in den ersten 5 Minuten. Nicht auswertbare Bilder wurden nicht mitgezählt, weil diese nur dann nicht auswertbar waren, wenn sich die Fokusebene zwischen den Fluoreszenzbildern so stark verändert hat, dass ein zuverlässiges Erstellen der Deformationsmatrix nicht möglich war. Legitimiert wird dieses Vorgehen durch die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3, defokussierte Bilder können demnach als nicht gemacht angesehen werden. Wenn man sich die Kraftbilder der ersten 5 Minuten ansieht, stellt man fest, dass diese großen Unterschiede in der Kraftzunahme nicht durch Überlagerung von Zellbewegungen entstehen. Es hat den Anschein, dass die prozentuale Kraftzunahme stark von der Zellform und der Orientierung im elektrischen Feld bestimmt wird. Daher ist es aussagekräftiger, die Kraftverteilungsmuster der Zellen zu untersuchen, als Tabellen der Kraftzunahme zu präsentieren.

Die Abbildung 20 zeigt die nach der "Bootstrap" Methode signifikanten Kraftvektoren einer MG63 Zelle in Ruhe und dann nochmal 30 Sekunden später. Nach dem ersten Bild war sofort das elektrische Feld mit 10 V/cm angeschaltet worden.

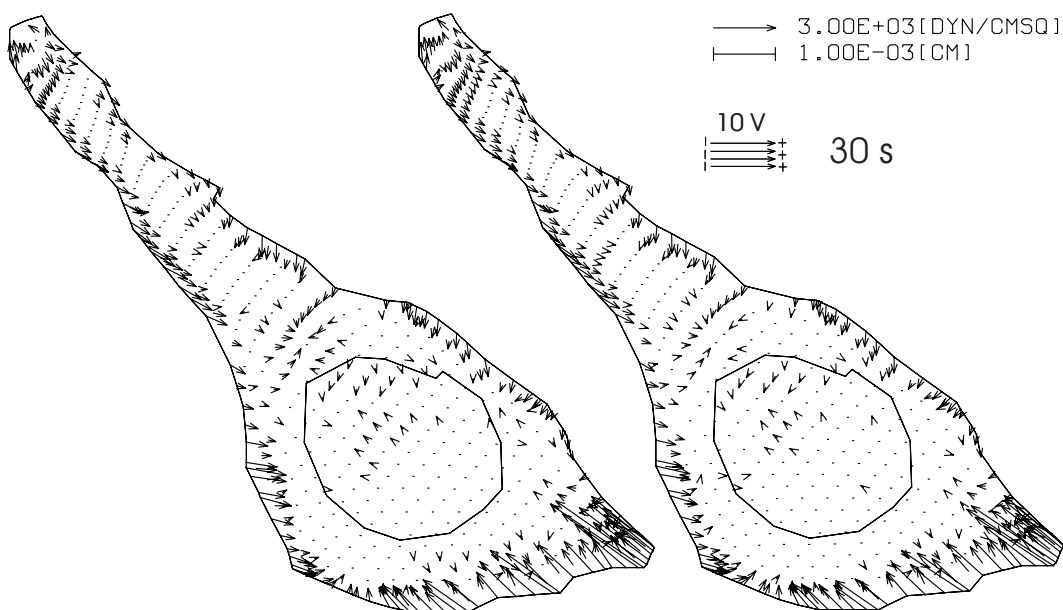


Abbildung 20: Die Kraftvektoren einer MG63 Zelle auf einem Polyacrylamidsubstrat ($E = 4317 \text{ N/m}^2$, 8% Acrylamid, 0.04% BIS-Acrylamid). Das linke Bild stellt die Kraftverteilung der ruhenden Zelle dar. Unmittelbar nach dem Bild wurde ein elektrisches Feld mit 10 V/cm mit der angegebenen Ausrichtung angeschaltet. Das rechte Bild ist die gleiche Zelle 30 s später.

Intuitiv wird man nicht sagen können, dass diese 30 Sekunden unter dem Einfluss des elektrischen Feldes die Kraftvektoren der Zelle deutlich verändert haben. Genau

wie aus diesen Bildern, wird aus allen meinen Messungen deutlich, dass sich in den ersten Minuten unter dem Einfluss elektrischer Felder von 10 V/cm die Verteilungsmuster der Gesamtkraft nicht deutlich erkennbar verändern. Eine signifikante Erhöhung der Gesamtkraft der Zellen nach Einschalten des elektrischen Feldes war aber zu erkennen. Daher ist zur anschaulichen Visualisierung eine andere Darstellungsmethode der Kraftvektoren nötig. Es sei daran erinnert, dass jeder Kraftvektor für sich eine Informationseinheit darstellt. Daher ist es theoretisch möglich, jeden Vektor auf Änderungen durch das elektrische Feld zu untersuchen.

3.7.3 Differenzvektorbilder

Zu diesem Zweck ist es sinnvoll, nur die Änderung zwischen den Bildern vor und nach Einschalten des elektrischen Feldes zu betrachten. Angenommen f_{30} sei ein Kraftvektor der Gesamtkraft nach 30 Sekunden, dann kann man diesen Vektor auch ausdrücken als $f_0 + f_{\Delta 0 \Delta 30}$, wobei f_0 die Gesamtkraft zum Zeitpunkt 0 ist und $f_{\Delta 0 \Delta 30} = f_{30} - f_0$, also der Differenzvektor zwischen den beiden Bildern. Um diese Information aus den Bildern der Abbildung 20 besser zu visualisieren, muss man nur jeden Vektor auf dem Bild nach 30 Sekunden von dem entsprechenden Vektor zum Zeitpunkt 0 abziehen. Man erhält nur die Änderungen der Kräfte zwischen den beiden Bildern. In dieser Weise ist in Abbildung 21 das resultierende Bild aus Abbildung 20, sowie das entsprechende Bild der gleichen Zelle nach 60 Sekunden dargestellt. Der Maßstab der Kraftvektoren ist zur Verdeutlichung des Ergebnisses geändert. Bei diesen Differenzvektorbildern ist unbedingt zu beachten, dass vom Zellzentrum wegdeutende Vektoren dabei nicht bedeuten, dass die Zelle an der Stelle das Substrat nach außen schiebt, sondern nur, dass die ursprüngliche Kraft an der Stelle größer war als zum dargestellten Zeitpunkt. Finden sich aber nur zentripetal gerichtete Vektoren, so kann man schon visuell feststellen, dass es zu einer Zunahme der Gesamtkraft gekommen ist.

Da die Kraft einer Zelle sich genauso dynamisch ändert wie das Zytoskelett, entstehen mit dieser Darstellung auch Kraftvektoren, ohne dass das elektrische Feld dafür verantwortlich sein muss. Durch Vergleichen der Daten mit Kontrollexperimenten können dann aber natürlich auftretende Zellbewegungen beim Deuten der Bilder in Betracht gezogen werden. Um eine signifikante Änderung des Kraftniveaus der Zellen durch das elektrische Feld statistisch zu untermauern, wurden Zellen sowohl mit als auch ohne elektrisches Feld beobachtet und für verschiedene Zeitpunkte zwischen 10 und 600 Sekunden nach dem Referenzzeitpunkt die Differenzvektorbilder berechnet. Die Zellen hatten eine signifikant höhere Kraftdifferenz, wenn sie unter

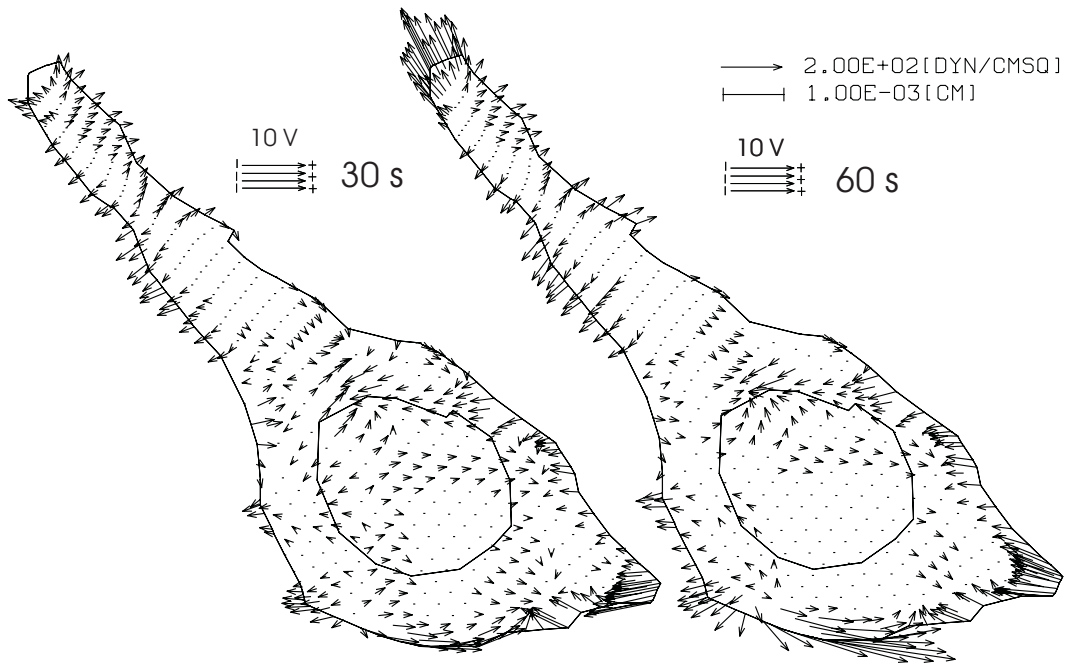


Abbildung 21: Links: Die Kraftänderung zwischen dem Bild 1 und dem Bild 2 aus Abbildung 20, also nach 30 Sekunden in einem 10 V/cm elektrischen Feld. Rechts: Das entsprechende Bild nach 60 Sekunden.

dem Einfluss des elektrischen Feldes waren. Die Abbildung 22 zeigt diesen Unterschied exemplarisch für 300 Sekunden nach dem Referenzzeitpunkt.

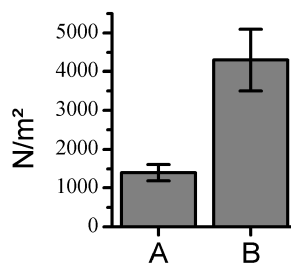


Abbildung 22: Die Änderung der durchschnittlichen Zugkraft von 15 Zellen innerhalb der ersten 300 Sekunden (A). B zeigt das Selbe für 15 Zellen, die 300 Sekunden einem elektrischen Feld von 10 V/cm ausgesetzt waren. Die Kräfte sind in N/m^2 eingezeichnet und mit Fehlerbalken für den Standardfehler versehen.

3.7.4 Änderungen nach 30 Sekunden

Die Abbildung 23 zeigt eine typische Änderung des Kraftverteilungsmusters 30 Sekunden nach Anschalten des elektrischen Feldes im Vergleich zum Zeitpunkt 0 ohne elektrisches Feld. Zusätzlich ist die Kraftverteilung in Falschfarben dargestellt. Durch Interpolieren ist für die Fläche eines jeden Bildelementes der Kraftbetrag (N/m^2) dargestellt.

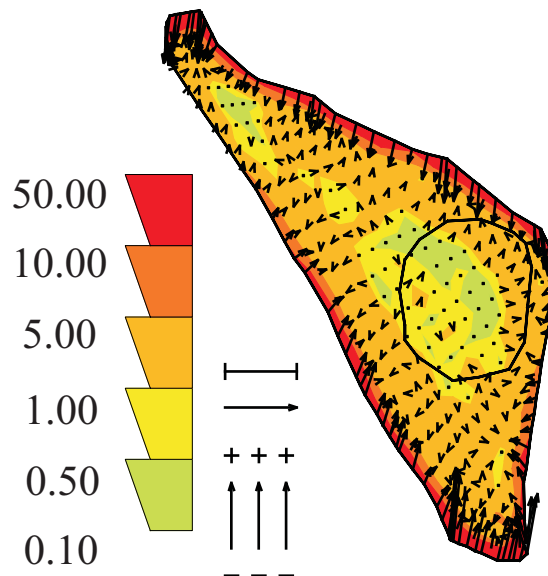


Abbildung 23: Zelluläre Zugkräfte eines Osteoblasten auf einem flexiblen Polyacrylamidsubstrat ($E=4317 \text{ N/m}^2$) nach 30 sekundiger Applikation eines 10 V/cm elektrischen Feldes. Kraftvektoren repräsentieren den Unterschied in der Kraftverteilung in Bezug auf den Referenzzeitpunkt 0 (Ohne E-Feld). In Falschfarben ist die Kraftverteilung in Farbstufen (N/m^2) gezeigt. Der mit "+" und "-" gekennzeichnete Vektor zeigt die Richtung des elektrischen Feldes an, die Längensmarkierung repräsentiert $10 \mu\text{m}$ und der Eichvektor entspricht 50 N/m^2 .

Die größten Unterschiede in der Zugkraft entstehen in der Nähe der Zellmembran und die geringsten Unterschiede finden sich in der Mitte der Zelle. Somit ähnelt der Unterschied der Kraftverteilung einem Bild der Gesamtkraft. Aber der Anstieg der Kraft taucht nicht an allen Stellen auf, die in der Gesamtkraftdarstellung signifikante Vektoren aufweisen. Auffällig ist, dass das Lamellipodium, wo normalerweise der größte Teil der zellulären Zugkräfte konzentriert ist, nicht unbedingt auch einen signifikanten Kraftanstieg aufweist. Die Zonen des Kraftanstieges scheinen eher von der Orientierung im elektrischen Feld abzuhängen. Schon nach 30 Sekunden sind in den meisten Fällen Kraftänderungsvektoren zu erkennen, die parallel zu den elektrischen Feldlinien orientiert sind. Sie zeigen dabei nach innen, was einen Kraftanstieg anzeigt und befinden sich im Bereich der Zellmembran. Signifikante Vektoren dieser Art konnten im Durchschnitt 30 Sekunden nach Einschalten des elektrischen Feldes beobachtet werden, wobei die Standardabweichung bei 18 Sekunden lag. Es wurden dazu 24 Zellen bei 10 V/cm untersucht. Zwei Zellen zeigten keine signifikante Änderung der Kraftvektoren. In 10 Fällen wurden die Bilder alle 30 Sekunden, in 14 Fällen alle 10 Sekunden registriert. In den 22 Fällen, in denen sich die Vektoren signifikant geändert hatte, waren ähnliche Muster wie in Abbildung 23 zu erkennen. Charakterisiert sind diese ersten Änderungen vor allem durch ein Ansteigen der zentripetalen Zugkräfte in der Nähe der Membran. Die Richtung

der Zugkraftänderungen war auffallend häufig im Einklang mit der Orientierung der elektrischen Feldlinien. Um zunächst die Signifikanz der Beeinflussung der Zellen durch das elektrische Feld zu überprüfen, kann man z.B. die Änderung der Zellausdehnung parallel und senkrecht zu den Feldlinien untersuchen. Zur Veranschaulichung der Maximalausdehnungen kann man sich ein Rechteck vorstellen, welches zum einen parallel zu den Feldlinien ist und zum andern die Projektion des Zellumrisses genau einschließt. Dabei sei dann die x -Richtung parallel zu den Feldlinien und die y -Dimension senkrecht dazu. Abbildung 24 zeigt dies für ein Experiment mit 17 Zellen bei 10 V/cm. Diese Zellen verloren in der Zeit 12 von 26 μm (46%) ihrer Ausdehnung entlang der Feldlinien. Senkrecht zu den Feldlinien kann man innerhalb der ersten 20 Minuten zunächst einen Verlust der Ausdehnung von 16% (4 von 24 μm) feststellen, dann aber ein Wachstum von 35% (von 20 auf 27 μm) in 100 Minuten. Die Reaktion auf das elektrische Feld äußert sich somit auf die y -Dimension in zwei Phasen: erst Retraktion, dann Elongation.

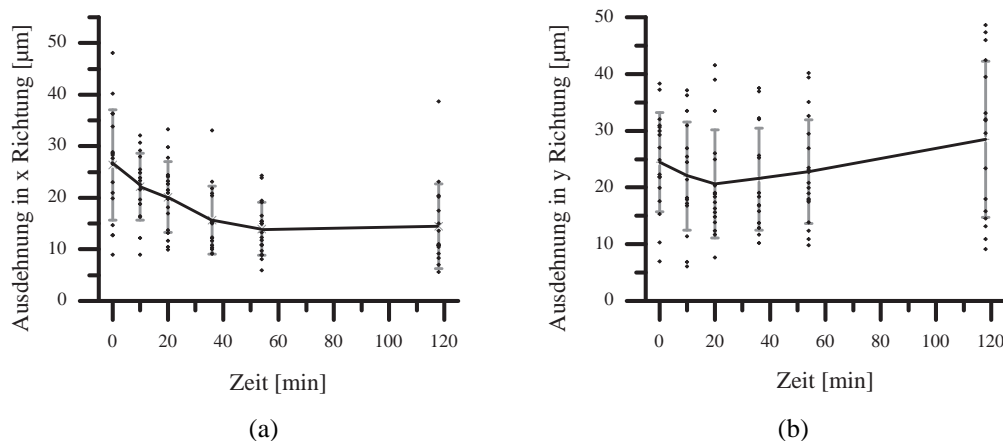


Abbildung 24: Die durchschnittliche Ausdehnung in die x -Dimension (a) und in die y -Dimension (b) im zeitlichen Verlauf während die Zellen einem 10 V/cm elektrischen Feld ausgesetzt sind.

Das Verhältnis von x zu y Dimension lässt eine Aussage über die Orientierung der Zelle zu, für dieses Experiment in Abbildung 25a dargestellt. Die große Standardabweichung zu Beginn des Experimentes bedeutet, dass die Zellen zwar elongiert waren, aber keine bevorzugte Orientierung hatten. Am Ende des Experimentes ist das Verhältnis kleiner als Eins und die Standardabweichung klein, was bedeutet, dass die Zellen wieder elongiert sind und eine bevorzugte Orientierung haben.

Das Gleiche kann man in Abbildung 25b erkennen, welche das Seitenverhältnis von Zellen aus 12 unabhängigen Experimenten vereint. Hier hat die durchschnittliche Zelle in der y -Dimension die doppelte Ausdehnung der x -Dimension am Ende des

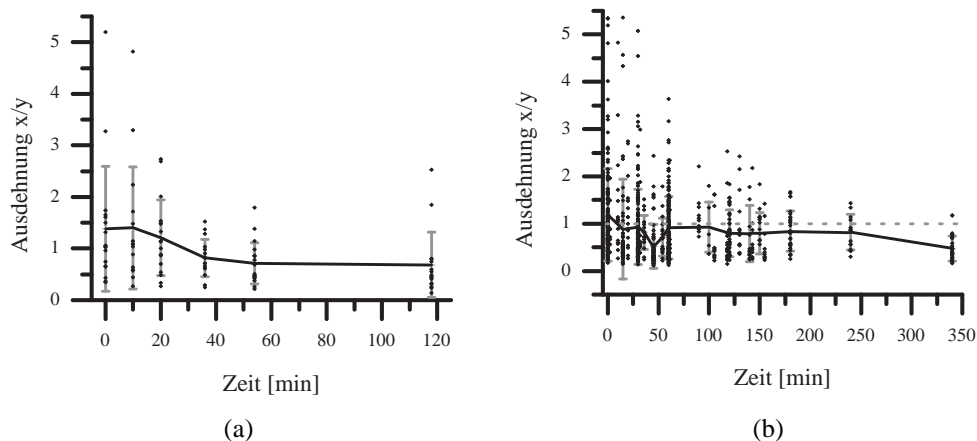


Abbildung 25: Das Verhältnis der x -Dimension zur y -Dimension für das Experiment aus Abbildung 24 (a) und für alle Zellen aus 12 unabhängigen Experimenten bei 10 V/cm (b).

dargestellten Zeitraumes. Die Hauptachse der Zellen ist senkrecht zu den Feldlinien, während sie vor dem Experiment zufällig verteilt war.

3.7.5 Kontrollversuche

Da es auch denkbar ist, dass das Anlegen eines elektrischen Feldes nicht die Zellen, sondern direkt das Polyacrylamidsubstrat oder die Fluoreszenzpartikel beeinflusst, wurden auch Berechnungen der gleichen Versuche durchgeführt dabei aber die Position der Zellumrisse an eine Stelle des Bildausschnitts verschoben, an dem im Phasenkontrastbild keine Zelle zu erkennen war. Die in diesem Fall zu beobachtenden Kräfte sollten im Falle einer direkten Verformung des Substrates durch das elektrische Feld, die Homogenität des Substrates vorausgesetzt, auch gleichmäßig oder in irgendeiner Beziehung zu den elektrischen Feldlinien stehen. Auch sollten sie sich dann über längere Zeit bei konstantem elektrischen Feld nicht verändern.

In den meisten Fällen waren keine signifikanten Kraft- sowie Deformationsvektoren zu erkennen. In einigen Fällen waren Vektoren mit diffuser Richtung zu erkennen, die sich am besten durch mangelhafte Bildqualität erklären lassen. In den Fällen, wo der Abstand der simulierten Zellen zu tatsächlichen Zellen nicht ausreichend war, konnte man signifikante Vektoren erkennen, die sich aber durch die elastische Verformung nicht nur unter den Zellen, sondern auch in deren näherer Umgebung erklären lassen. Daher ist davon auszugehen, dass die messbaren Deformierungen der Polyacrylamidsubstrate durch Änderungen der zellulären Zugspannungen verursacht sind.

3.7.6 Der Orientierungsprozess

Die Tatsache, dass Osteoblasten im elektrischen Feld einen Orientierungsprozess durchmachen, der zu einer rechtwinkligen Ausrichtung gegenüber den Feldlinien führt, ist im Abschnitt 1.3.3 schon erläutert worden. Die Zugkraftmessung mit flexiblen Substraten ermöglicht auch die Darstellung der mechanischen Substratinteraktionen einer Zelle während des Orientierungsprozesses. Ein solcher Orientierungsprozess eines Osteoblasten in einem 10 V/cm Feld ist in Abbildung 26 zu sehen.

Im Abschnitt 1.3.3 auf Seite 9 wurde der Orientierungsvorgang in verschiedene Phasen eingeteilt. Die Zugkraftänderungen sind genauso in Phasen einteilbar. Aber diese Phasen beginnen schon, bevor im Phasenkontrastbild eine Änderung der Zellmorphologie zu entdecken ist. Wie schon erläutert, besteht die erste Phase aus einem Anstieg der gesamten Kraft, die auf das Substrat übertragen wird. Dieser Anstieg beträgt ca. 5-30% der gesamten Kraft. Diese Phase wird in den Kraftunterschiedbildern durch in Richtung Nucleus weisende Kraftvektoren gekennzeichnet. Wie bereits erwähnt, beginnt diese Phase schon nach 30 Sekunden. Die ersten Änderungen im Phasenkontrastbild treten erst nach mehreren Minuten auf.

In der zweiten Phase der Ausrichtung weisen die Zellseiten, die rechtwinklig zu den Feldlinien stehen immer noch die einwärts gerichteten Kraftunterschiedvektoren auf. Aber die Seiten, die mehr parallel zu den Feldlinien verlaufen, fallen in ihrem Kraftniveau unter die Werte des Referenzbildes, welches üblicherweise direkt vor dem Anschalten des elektrischen Feldes aufgenommen wurde. Dadurch sind sie in den Kraftänderungsbildern durch nach außen weisende Vektoren gekennzeichnet. In Abbildung 26 sind die Merkmale der zweiten Phase nach 5 Minuten zu erkennen. An den Seiten, die in der zweiten Phase ein erniedrigtes Kraftniveau aufwiesen, wuchsen später, in der Elongationsphase der Phasenkontrastbeobachtung, die neuen Zellprotrusionen aus.

Das Abfallen der Kräfte unter die Werte der Referenzbilder konnte 90 Sekunden bis 10 Minuten nach Stimulationsbeginn an vereinzelten Punkten beobachtet werden. Die zweite Phase, in der die Seiten, die die gleiche Orientierung hatten wie das elektrische Feld, deutlich erniedrigte Kräfte aufwiesen, begann im Durchschnitt nach 10 Minuten, allerdings mit sehr großer Streuung. Erste Zellen zeigten das typische Kraftmuster nach 120 Sekunden, eine Zelle erst nach 15 Minuten.

Die Abbildung 27 zeigt ein zweites Beispiel für den Orientierungsprozess, bei dem auch deutlich wird, dass auch nach 30 Sekunden die Kräfte in einigen Zellregionen

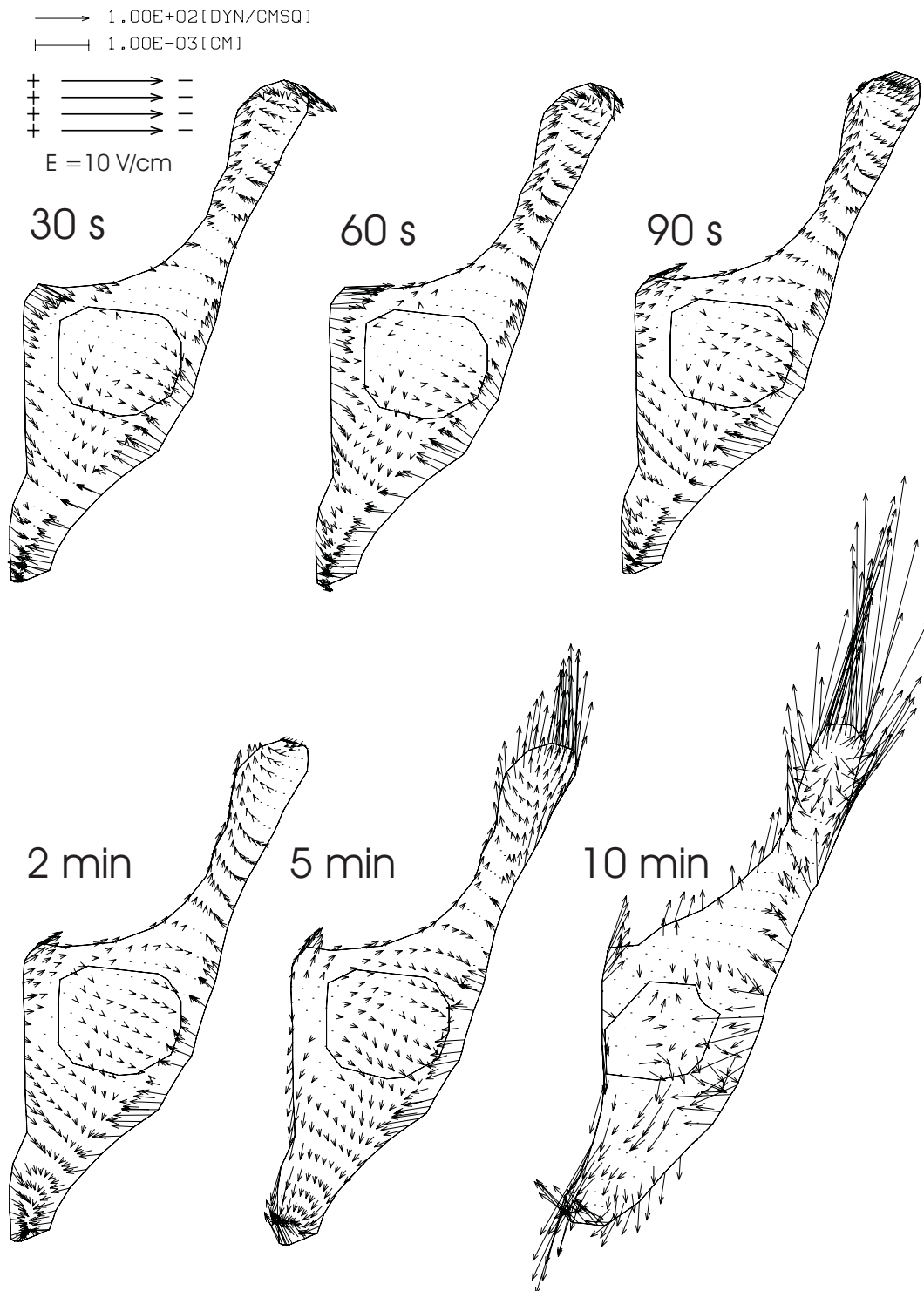


Abbildung 26: Änderungen der Zugkräfte während eines Orientierungsprozesses als Reaktion auf ein 10 V/cm elektrisches Feld. Der Osteoblast wurde auf einem kollagenbeschichteten Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 6000 N/m^2 kultiviert. Auf den ersten Bildern steigt die Kraft an. Nach 5 Minuten fallen die Kräfte an einigen Stellen unter das Niveau des Referenzbildes. An diesen Stellen wuchsen später neue Zellausläufer aus.

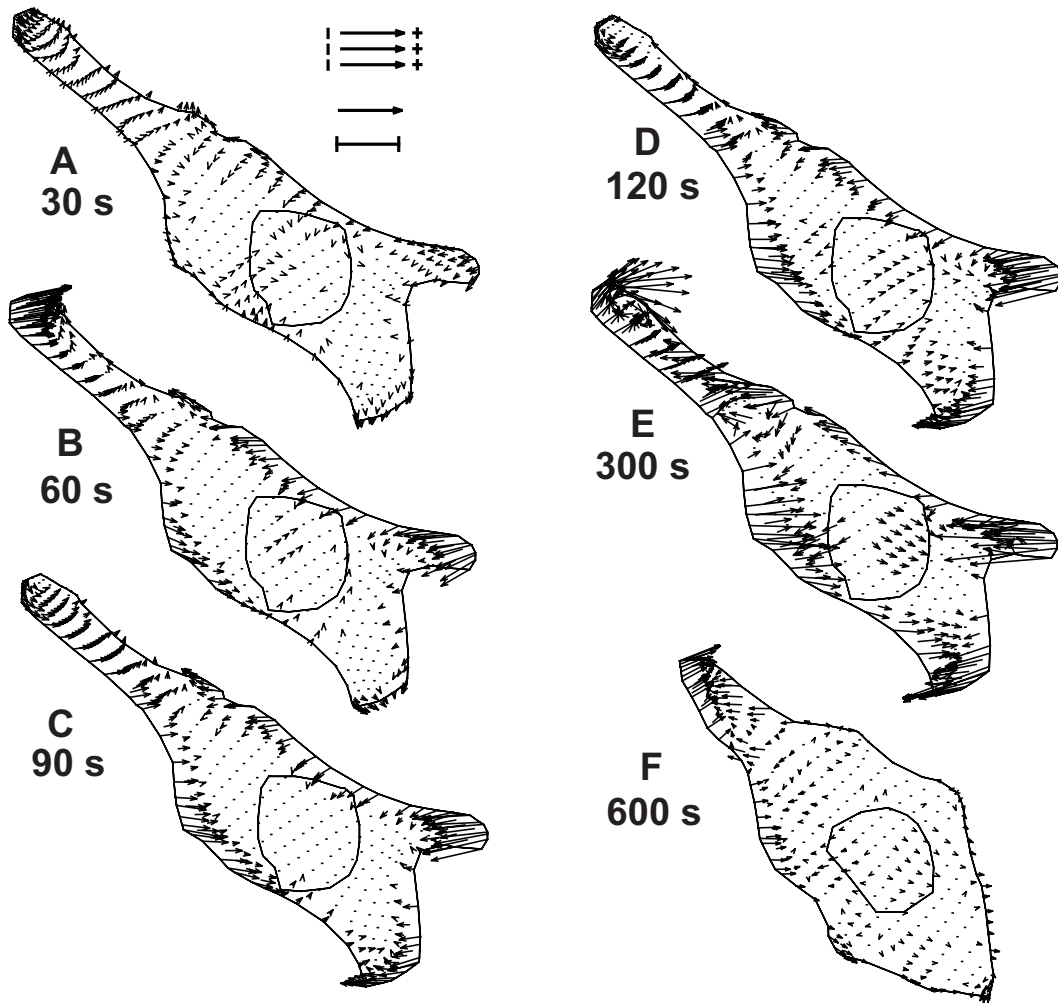


Abbildung 27: Differenzvektorbild der Interaktionskräfte zwischen Zelle und Substrat während eines Orientierungsprozesses als Reaktion auf ein 10 V/cm elektrisches Feld. Die MG63-Zelle wurde auf einem kollagenbeschichteten Polyacrylamidsubstrat mit einem Elastizitätsmodul von 4000 N/m^2 kultiviert. Die mit “+” und “-” versehenen Vektoren zeigen die Richtung der Feldlinien an. Die Eichmarke repräsentiert $10 \mu\text{m}$. Der Kräfteichvektor repräsentiert 10 N/m^2 für A bis E und 50 N/m^2 für F.

noch zunehmen, während in andere Regionen schon eine Abnahme der Kräfte zu beobachten ist.

3.7.7 Kraftmuster während der Orientierung

Im Folgenden werden die Gesamtzugkräfte während eines Orientierungsprozesses am Beispiel der Zelle aus Abbildung 19 auf Seite 57 etwas genauer beschrieben. Es wird diesmal die Gesamtkraft, also durch Vergleichen mit einem zellfreien Substrat entstandene Kraftvektoren, analysiert. Da diese Vektoren üblicherweise in Richtung des Nucleus der Zelle weisen, ist in Abbildung 28 nur der Betrag der Vektoren, kodiert als Falschfarben, dargestellt. Die eingezeichneten Markierungen befinden sich dabei im Vergleich zu dem unterliegenden Deckglas unter dem Polyacrylamidsubstrat immer an der gleichen Stelle, um so Zellbewegungen verdeutlichen zu können.

Vor dem Einschalten des elektrischen Feldes war die Zelle auch schon motil und bewegte sich gerade im 45° Winkel zur Bildhorizontalen von links oben nach rechts unten. Zum Zeitpunkt 0 min befindet sich die Markierung (*A*) auf der rechten Seite einer Region mit relativ hohen Zugkräften. Nach 20 und 40 Minuten und andeutungsweise nach 60 Minuten waren die Spannungen unter dieser Marke (*A*) immer noch höher als der Durchschnitt der Zelle. Während dieser 60 Minuten änderte sich aber nicht nur der äußere Umriss der Zelle. Zu Beginn befand sich oberhalb der Marke (*A*) noch ein Pseudopodium, welches an der Basis auch noch ein hohes Zugkraftniveau aufwies. Nach 20 Minuten war die Kraft aus dem noch vorhandenen Pseudopodium stark abgesunken und nach weiteren 20 Minuten hatte sich der Zellausläufer zurückgebildet, womit die Kraft unter der Marke (*A*) an den Zellrand gelangt war. Inzwischen hatte sich die Kraftzone unter der Marke auch nach weiter unten etwas ausgedehnt, dadurch entstand wiederum eine Zone erhöhter Kraft etwas abseits von der Membran unter dem Lamellipodium. Bis zur 80. Minute hatte sich das kraftlos gewordenen Lamellipodium relativ weit zurückgezogen und bildete eine neue bogenförmige Kraftzone direkt an der äußersten Zellgrenze. Ein dort markierter Punkt (*C*) blieb wie zuvor (*A*) bis zur 140. Minute bestehen. Am vorderen Pol der Zelle war zum Zeitpunkt 0 der größte Teil der Kraft in einem Lamellipodium und einem daraus hervorgehenden Pseudopodium konzentriert. Nach 20 Minuten bildete sich ein kleiner Kraftpunkt (*D*), der auf einer gedachten, senkrecht zu den Feldlinien verlaufenden Linie durch das ursprüngliche Pseudopodium an der Zellspitze etwas weiter oben zu liegen kam. Nach 40 Minuten hatte sich das Lamellipodium rechts von dieser gedachten Linie zurückgezogen. Entlang dieser

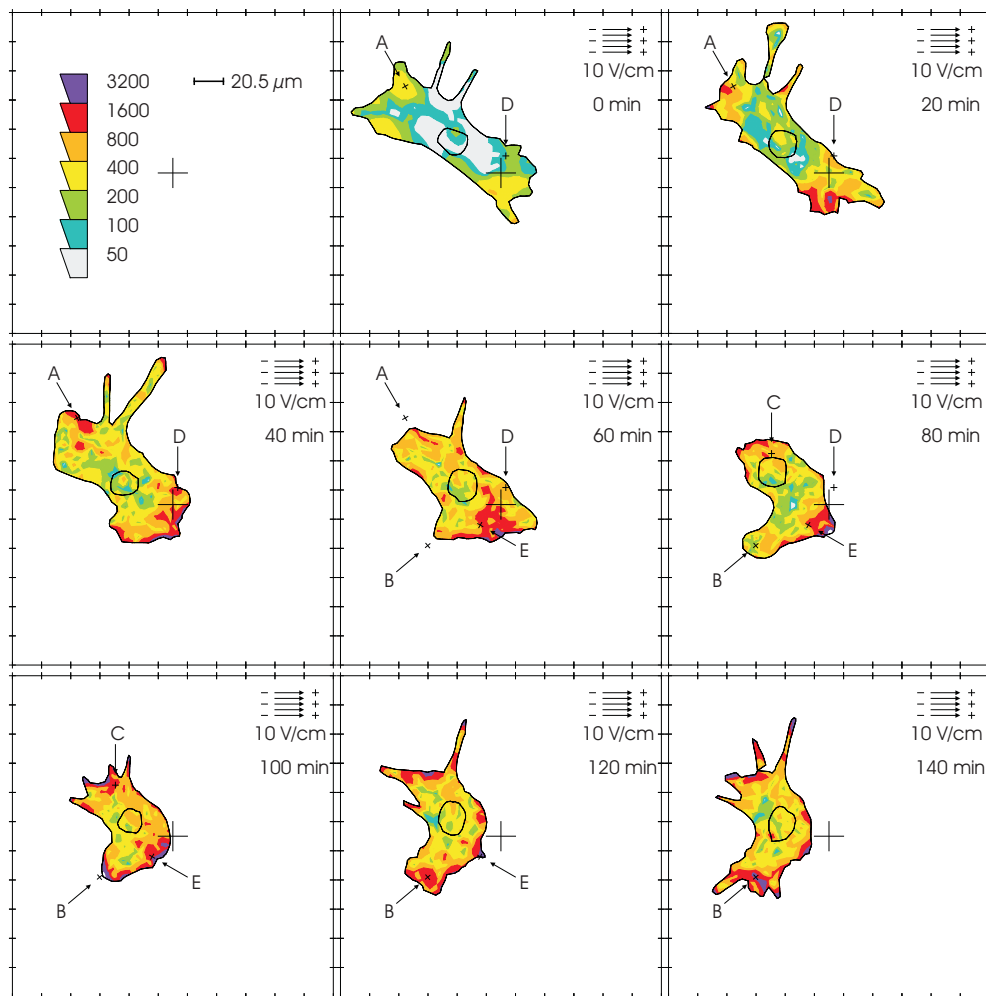


Abbildung 28: Orientierungsprozess der Zelle aus Abbildung 19 auf Seite 57. Es ist die gesamte Ebenenprojektion der Zugkraft jeweils als interpolierter Vektorbetrag für jedes Bildelement in Falschfarben kodiert. Die Marken A bis E werden im Text erläutert.

Linie abwärts, und dann einen Bogen auf die linke Bildhälfte herüber beschreibend, befand sich dann eine neumondsichelförmige Kraftzone, die auch wieder gleichzeitig den vorderen Zellrand beschrieb. Aber es hatte sich schon wieder nucleuswärts neben dem Punkt (*D*) ein neuer Kraftpunkt entwickelt, wie in der Abbildung 28 auf dem Bild zur 40. Minute zu sehen ist. Schon in der 60. Minute verlief die neumondsichelförmige Kraftzone etwa vom Punkt (*B*) über (*E*) zu diesem neuen Kraftpunkt. Das nach 60 Minuten Stimulation rechts unten auf dem Bild befindliche Lamellipodium war nun im Vergleich zu der Kraftzone um den Punkt (*E*) relativ schwach und hatte sich weitere 20 Minuten später zurückgebildet. Der Punkt (*B*) markiert eine Stelle, an der sich zwischen der 60. und der 80. Minute ein neues, bis dahin aber kraftloses, Lamellipodium ausbildete. Auf den folgenden drei Bildern ist zu sehen, wie dieser Zellausläufer (*B*) eine neue Kraftzone entwickelte und damit zum neuen Vorderpol der Zelle wurde. Von der ersten bis zur 80. Minute war der Vorderpol an der mit (*E*) markierten Stelle zu finden, der aber auf den letzten drei Bildern deutlich an Kraft verliert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelle nach Anschalten des elektrischen Feldes die Bewegungsrichtung ändert und sich senkrecht zu den elektrischen Feldlinien ausrichtet.

4 Diskussion

Bei der Beschäftigung mit der hier geschilderten Technik der Zugkraftmessung wird deutlich, bei welcher Fülle von wissenschaftlichen Fragen sie zur Forschung eingesetzt werden kann. Zudem ist zu sagen, dass es sich um eine relativ preiswerte Technik handelt, die ohne größere Anschaffungen in einem Bildanalyse- und Zellkulturlabor durchgeführt werden kann.

4.1 Bestimmung des Elastizitätsmoduls mit dem AFM

Im Rahmen dieser Arbeit wird deutlich, dass ein Rasterkraftmikroskop in dem hier verwendeten Aufbau sehr gut zur der Bestimmung von Elastizitätseigenschaften weicher Substrate geeignet ist. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist sehr gut. Die größte Fehlerquelle bei dieser Methode scheint die Kalibrierung der Federkonstante der verwendeten Cantilever zu sein. Besonders für die Zugkraftmessungen ist diese Methode von Nutzen, da die bis jetzt benutzten Methoden (siehe 2.3.1 und 2.3.2) mit deutlich größeren Unsicherheiten behaftet sind. Dies ist vor allem für die Verlässlichkeit der absoluten Messwerte der Zugkraftmesstechnik von großer Bedeutung.

4.2 Unterschiedliches Kraftniveau

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gemachten vergleichenden Messungen zwischen Osteoblasten und Osteosarkomzellen ist deutlich geworden, dass es nicht gerechtfertigt ist, MG63 Zellen als "Osteoblast Like Cells" zu bezeichnen, wenn es um die Zugkräfte der Zellen geht. Denn das Kraftniveau von MG63 Zellen ist deutlich geringer als das von Osteoblasten. Es muss daher auch überlegt werden, von welchem Nutzen die Verwendung von MG63 Zellen bei der Erforschung mechanischer Interaktionen von Osteoblasten oder bei der Untersuchung von Mechano-transduktionsmechanismen sein kann.

Weiterhin kann man die Frage stellen, ob das, im Vergleich zu den Osteoblasten, erstaunlich niedrige Kraftniveau der verwendeten Osteosarkomzellen eine Rolle in der Tumormetastasierung spielt. Es ist durchaus denkbar, dass es dadurch zu geringeren Zugkräften zwischen den Zellen in einem Gewebe kommt und sich eine einzelne Zelle leichter vom Gewebeverband lösen kann. Daraus ließe sich eine interessante Fragestellung für eine Kohortenstudie von Tumorpatienten formulieren, indem man untersucht, ob im Vergleich zu gesunden Zellen eine Änderung des durchschnittlichen Kraftniveaus mit der Metastasierungshäufigkeit korreliert.

Bemerkenswert ist auch die Dimension der hier gemessenen Zugkräfte. Wenn man sich vergegenwärtigt, dass eine Zelle in Erdatmosphäre eine Gewichtskraft von nur $0,05 \text{ N/m}^2$ hat, selbst aber Kräfte von 15 bis 228 N/m^2 aufbaut. (Angenommen wurde eine Zelle die durchschnittlich $5 \mu\text{m}$ hoch ist und eine mittlere Dichte von Wasser hat).

Typischerweise hat eine Zelle ca. 100000 Integrinrezeptoren Ward and Hammer (1994); Bell et al. (1984). Bei durchschnittlicher Fläche der Zelle kommt man auf 100 Rezeptoren pro μm^2 . Damit würde mit den Zahlen aus Kapitel 3.5 auf Seite 54 bei einer durchschnittlichen Gesamtkraft für Osteoblasten von 228 N/m^2 dann ca. $2,28 \text{ pN}$ auf jedes einzelne Integrin kommen. Eine Bindung zwischen einem Integrin und einem extrazellulären Peptid wird laut Gaudet et al. (2003) mit Kräften bis zu 100 pN belastet.

4.3 Motilität von Osteoblasten

Der Mechanismus der Zellmotilität ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Möglicherweise gibt es verschiedene Formen der Zellmotilität, da man auch anhand des Zugkraftmusters die Bewegungsrichtung nicht ohne weiteres voraussagen kann. Wie schon im Abschnitt

3.4 erwähnt wurde, haben Keratozyten und Fibroblasten um 90° verschiedene Fortbewegungsrichtungen. Osteoblasten zeigen eher Übereinstimmungen mit den Fibroblasten.

Wie aus den Versuchen mit GFP-Aktin transfizierten Zellen deutlich wird, ist das Zytoskelett an den zellulären Zugkräften beteiligt. Da die Orientierung der Aktinfilamente mit der Zugrichtung übereinstimmt, liegt die Vermutung nahe, dass diese Filamente einen bedeutenden Anteil der Kräfte auf das Substrat übertragen. Allerdings wird aus den Ergebnissen auch deutlich, dass dicke Aktinfilamente nicht notwendigerweise eine Kraft ausüben. D.h. nicht alle Aktinfilamente stehen unter Spannung. Die Cytochalasinexperimente machen aber deutlich, dass das Zerstören der Aktinfilamente dazu führt, dass die Zelle keine Kräfte mehr ausüben kann. Für Keratozyten konnte gezeigt werden, dass die Zugkräfte durch Aktin-Myosin Interaktionen zustande kommen Oliver et al. (1999).

Zusammenfassend sind aber die Versuche mit GFP transfizierten Zellen als Vorversuche zu betrachten. Um die Korrelation der dicken Aktinfaserbündel mit der Richtung und Größe der zellulären Zugkräfte genau zu untersuchen, ist eine größere Anzahl an Versuchen notwendig. Um den automatischen optischen Fluss-Algorithmus anwenden zu können, wäre es nötig, die Frequenzen der eingebetteten Fluoreszenzpartikel von den GFP Proteinen abzuschirmen.

Das Beispiel über den Orientierungsprozess eines Osteoblasten in einem elektrischen Feld aus Abschnitt 3.7.7 deckt Vieles über das Motilitätsverhalten der Osteoblasten auf. Im Folgenden werden ich versuchen die gewonnenen Daten mit dem schon bekannten Wissen aus der Forschung zu einem stark vereinfachten Modell für die Motilität von Osteoblasten kurz zusammenzufassen:

Um ein neues Lamellipodium oder ein Pseudopodium zu bilden, scheinen sich zwei ähnliche Wege gegeneinander abgrenzen zu lassen. Zum einen scheint es zu einer Auflockerung des Zytoskeletts zu kommen, wodurch die übertragende Kraft auf die Unterlage zunächst etwas abnimmt. Dadurch entsteht eine weichere Stelle im Gefüge, durch die das Zytosol durch Kontraktionen in anderen zellulären Regionen passiv hindurchgequetscht wird. Wie bei einer Herniation oder bei dem Ausquetschen einer Salbentube. Der so entstandene Zellausläufer bildet nun kleine fokale Kontakte, auf die dann nach und nach mehr Zug ausgeübt wird, indem Kontakte zum Zytoskelett gebildet werden. Dies führt dann auch wieder zu einer Zunahme der Steifigkeit des Zytosols. Die andere Möglichkeit ist, dass die Zelle die Kraft auf die vorderen fokalen Kontakte beibehält und sich nur oberhalb das Zytoskelett aufweicht und das Zytosol über diese Grenze hinüberfließt. Als anschauliches Beispiel

sei ein weicher wassergefüllter Gummiluftballon genannt, der über den Fußboden gleitet. Die Hülle des Ballons läuft endlos, wie die Kette eines Kettenfahrzeuges, über den Boden. Es entsteht eine harmonische Gleitbewegung, ohne dass der Körper rund sein muss, um zu rollen. Die beiden Mechanismen schließen sich keineswegs aus, da es im Prinzip der gleiche Mechanismus ist. In vivo bewegen sich Osteoblasten nicht auf freien Flächen, wie sie das in der Zellkultur tun, deshalb ist es fraglich, ob sie in vivo überhaupt einen der beiden Mechanismen zur Fortbewegung benutzen, oder ob es dort auch eine Mischung verschiedener Fortbewegungsarten ist. Nun eine Hypothese zum Rückzug eines Zellausläufers. Durch einen Anstieg der Kontraktilität des Zytoskelettes wird die Zugkraft auf die fokalen Kontakte so lange erhöht, bis diese abreißen (siehe Kapitel 4.4.1 auf der nächsten Seite), möglicherweise spielen Enzyme bei dem Abkoppeln der fokalen Kontakte eine zusätzliche Rolle. Dadurch geht die Kraft in dieser Zellregion verloren, aber der Kontakt zur Unterlage ist gelöst und die Zelle kann den Zellteil weiter in die Richtung des Zellkörpers ziehen. Die fokalen Kontakte der zweiten Reihe übernehmen schon während der Abreißphase die Aufgabe der Verankerung am Substrat.

4.4 Orientierung im elektrischen Feld

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten zeigen, dass sich primäre bovine Osteoblasten und Mg63 Zellen im elektrischen Feld zwischen 7 und 12 V/cm in grundsätzlich gleicher Weise verhalten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erste feststellbare Reaktion auf ein elektrisches Feld ein Anstieg der zentripetalen Zugkräfte um 5% bis 30% innerhalb der ersten 30 Sekunden ist. Der durchschnittliche Hauptvektor dieser ersten Reaktion ist parallel zu den elektrischen Feldlinien. Noch bevor erste morphologische Zellveränderungen feststellbar sind, kommt es nach 2 bis 15 Minuten zu einem Abfall der Zugkräfte an den Zellseiten, die parallel zu den elektrischen Feldlinien orientiert sind. Erst nach 5 bis 10 Minuten sind erste Veränderungen der Zellmorphie zu erkennen und mit Absenken der Stimulationsspannung steigt diese Zeit noch an. Sind die Zellen durch Zufall schon vor dem Experiment rechtwinklig zu dem Feld orientiert, findet bei 10 V/cm keine Retraktion mehr statt, sondern sie beginnen gleich mit der Elongation. Bei einer Feldstärke von weniger als 7 V/cm ist die Retraktion so langsam, dass die Elongation schon während der Retraktion sichtbar wird, wodurch das ganze als ein Orientierungsprozess erscheint.

4.4.1 Fokale Kontakte

Zunächst mag es etwas unwahrscheinlich klingen, dass eine Zelle die Zugkräfte und damit die Anspannung des Zytoskeletts an Stellen erhöht, wo es kurz darauf zu einer zellulären Retraktion kommt. Genau dies war aber in bei der Applikation von elektrischen Feldern zu erkennen. Dieses Phänomen ist aber auch durch Zugkraftmessungen auf knitternden Silikonsubstraten für sich bewegende Keratozyten beschrieben worden (Burton et al., 1999). Zellen sind über fokale Kontakte mit dem Substrat verbunden. Es ist auch heute noch nicht genau geklärt, ob diese fokalen Kontakte über Enzyme wieder gelöst werden. Jay et al. (1995) beschrieben, dass Zellen über Myosin II die Zugkräfte auf fokale Kontakte so lange erhöhen, bis diese abreißen und die Zelle so erst den betreffenden Zellausläufer zurückziehen kann. Ein Anstieg von Calcium und ATP beim aktiven Abreißen von fokalen Kontakten, und die Tatsache, dass die Zugabe von ATP zu einem Abreißen von fokalen Kontakten führt, bestätigt diese Theorie (Crowley and Horwitz, 1995). Es könnte durch Applikation elektrischer Felder also auch über diesen Mechanismus zu der beobachteten Retraktion der Zellachse kommen. Wie schon im Abschnitt 3.4 erwähnt, treten sowohl bei Fibroblasten als auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Osteoblasten sehr hohe Zugkräfte in der Schwanzregion der Zelle auf. Das ist bei motilen Zellen auch die Region, in der die fokalen Kontakte zum Substrat abgebrochen werden müssen, um ein länger werden der Zelle zu verhindern (Lee et al., 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass der Gehalt an intrazellulärem Calcium kurz vor dem Abreißen der fokalen Kontakte besonders hoch ist, und eine künstliche Erhöhung des Calciumspiegels durch Ionophor A23187 oder Inositol 1,4,5-triphosphat auch zu einem schnelleren Zurückziehen des hinteren Zellteiles führt (Lee et al., 1999).

4.4.2 Verzögerte Calciumantwort

Djamgoz et al. (2001) konnten erste morphologische Veränderungen schon nach 30 Sekunden in Prostatacarcinomzellen von Ratten nachweisen, wenn man diese elektrischen Feldern aussetzte, wohingegen die Osteoblasten bei 10 V/cm in dieser Arbeit erst nach 5 bis 10 Minuten reagierten. Aber der erste Anstieg der zytoskelettalen Kontraktilität konnte schon in den ersten 10 Sekunden gemessen werden und eine Calciumanstieg war nach 85 Sekunden zu beobachten (siehe 1.3.4 auf Seite 11). Da kein Zusammenhang zwischen dem ersten Zugkraftanstieg und intrazellulärem freiem Calcium feststellbar war, könnte man vermuten, dass diese erste Reaktion auf das elektrische Feld calciumunabhängig ist. Es gibt auch andere Hinweise, dass z.B. gerichtete Lokomotion von Fibroblasten in elektrischen Feldern

oder auch Galvanotropismus bei Spinalneuriten von *Xenopus* calciumunabhängig sind (Brown and Loew, 1994; Palmer et al., 2000).

Abhängig vom Zelltyp beeinflusst mechanische Dehnung die Polymerisation von Aktin, und laut Pender and McCulloch (1991) schon innerhalb der ersten 30 Sekunden nach Stimulation. Aber die Signalkaskade von der Stimulation zur zellulären Reaktion, also die Mechanotransduktion, ist noch nicht aufgeklärt. Verschiedene Modelle sind für diesen Prozess publiziert worden. Glogauer et al. (1997) vertreten ein Modell von dehnungsaktivierten Calciumkanälen in der Membran. Mit kleinen magnetischen Kugeln, die an der Membran befestigt wurden, übten sie geringe Kräfte auf die Membran aus. Dabei beobachteten sie eine Zunahme der Steifigkeit, einen Anstieg der lokalen Aktinkonzentration und einen transienten Calciumanstieg. Somit soll die lokale Deformation der Membran die benachbarten Calciumkanäle öffnen, was dann eine lokale Verstärkung des Zytoskeletts, hauptsächlich durch Aktin, bewirkt. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Steifigkeit an derjenigen Stelle, wodurch die Calciumkanäle wieder geschlossen werden. Sheetz et al. (1998) postulierten einen mit dem Zytoskelett assoziierten Mechanosensor. Ein Mechanosensor an dieser Stelle kann auf externe Stimuli reagieren, die über Integrine auf den Sensor übertragen werden und gleichzeitig können an dieser Stelle vom Zytoskelett generierte Kräfte "gemessen" werden. "Fokal Adhesion Kinase" (FAK) ist ein Protein, welches sich am Übergang von Integrinen zum Zytoskelett befindet. Auch dies wäre als Ort für einen Mechanosensor geeignet. Z.B. verlieren Zellen ohne FAK ihre Fähigkeiten, auf die Steifigkeit des Substrates, sowie mechanische Stimuli die über das Substrat weitergegeben werden, zu reagieren. Zusätzlich weisen sie auch ein ungeordnetes Bewegungsmuster ohne klare Richtung auf (Wang et al., 2001). Für Osteoblasten konnte auch gezeigt werden, dass es zu einer Zunahme der FAK Aktivität kommt, wenn Knochen *in vivo* mechanisch stimuliert werden (Moalli et al., 2001). Und eine Studie konnte die fokalen Kontakte als einen Mechanosensor identifizieren (Rivelino et al., 2001). Dabei wurde auch deutlich, dass fokale Kontakte kleiner werden, wenn die Zellkontraktilität ausgeschaltet wird. Eine Erhöhung der Kontraktilität führt zu einem Wachsen lokaler fokaler Kontakte. Erhöht man die Kraft nur auf einen einzelnen fokalen Kontakt, konnte auch ein Wachstum des Kontaktes beobachtet werden (Balaban et al., 2001). Dadurch ist die Beteiligung von Calciumkanälen an der Mechanotransduktion noch nicht widerlegt. Denn direktes Ziehen an einzelnen Membranrezeptoren über Rezeptorantikörper, die an magnetischen Kugeln hängen, führt auch zu einem Anstieg von intrazellulärem Calcium (Pommerenke et al., 1996). Hingegen fiel diese Reaktion beim Ziehen an dem Transferrin Rezeptor deutlich geringer aus. Wenn mechanisch aktivierba-

re Calciumkanäle gleichmäßig in der Membran verteilt sind, dürfte so ein Effekt nicht zu beobachten sein. Es bleibt also noch zu klären, ob die Calciumkanäle wirklich über mechanische Reize aktiviert werden und somit ein zweiter Mechanosensor vorliegt, oder ob Calciumkanäle im Zuge der Signalkaskade der Mechanotransduktion ausgelöst werden. Denn elektrische Felder führen zu einem Anstieg von intrazellulärem Calcium (Onuma and Hui, 1988; Cooper and Schliwa, 1985). Auch in unserem Labor konnten ein Anstieg von Calcium nach dem Einschalten eines elektrischen Feldes beobachtet werden, aber erstaunlicherweise war der Anstieg erst nach 85 Sekunden zu messen und nicht sofort. Lee et al. (1999) beschreiben für mechanisch aktivierte Calciumkanäle einen sofortigen Calciumanstieg. D.h., wenn mechanisch aktivierte Calciumkanäle durch einen Stimulus sofort geöffnet werden ist eher unwahrscheinlich, dass der gleiche Mechanismus wie in unseren Versuchen vorliegt. Mechanische Stimulation von Osteoblasten führt zu solchen verzögerten Calciumantworten. Tenbosch (1999) konnte zeigen, dass Osteoblasten, die mit 50 Zyklen bei 1 Hz mit 4000 μ Strain belastet werden, mit einer Calciumerhöhung 150 Sekunden nach Belastung reagieren.

Unter anderem wird Calcium auch für die Produktion von Aktin-Myosin basierenden Zytoskelett Kontraktionen benötigt (Rees et al., 1989). Daher ist es auch möglich, dass die beobachteten Änderungen des Calciumspiegels eine Folge einer Signalkaskade sind, die über Stimulationen an Integrinen verursacht wurden wie z.B. vorgeschlagen von Sjaastad and Nelson (1997). Denn erhöhte Calciumspiegel führen zu strukturellen Umbauvorgängen am Zytoskelett, wie z. B. von Forscher (1989) durch Stimulation mit Wachstumshormonen gezeigt werden konnte.

Um 4% zyklisch mechanisch gestreckte Osteoblasten richten sich rechtwinklig zur Zugrichtung aus (Neidlinger-Wilke et al., 2001), dies erinnert an die Orientierung im elektrischen Feld. Der Grund dafür ist möglicherweise in der geringeren mechanischen Belastung zu sehen, der sich die Zelle bei zyklischer Dehnung aussetzt, wenn sie die Ausdehnung in Zugrichtung minimiert. Bei konstanter Dehnung hingegen konnte für Skelettmuskelzellen eine Ausrichtung entlang der Zugrichtung beobachtet werden (Collinsworth et al., 2000). Auch für XTH-2 Zellen und für 3T3 konnte gezeigt werden, dass sie Protrusionen in Richtung eines konstanten Dehnungsreizes ausbilden und sich dorthin bewegen wenn sie auf flexiblen Silikonunterlagen kultiviert werden (Lo et al., 2000; Karl and Bereiter-Hahn, 1999).

4.4.3 Durotaxis

Zu einem anderen interessanten Ansatz kommt man, wenn man bedenkt, dass Zellen auf einem flexiblen Substrat, welches auf der einen Seite weicher ist als auf der andern Seite, die Zellen bevorzugt auf der steiferen Seite bleiben Lo et al. (2000). Zellen wandern also nicht nur, wie schon lange bekannt ist, entlang chemischer Gradienten, sondern auch durch physikalische Interaktionen zwischen Zelle und dem Substrat. D.h. sie müssen in der Lage sein, die Steifigkeit des Substrates irgendwie zu testen. Und das nicht nur an einer Stelle, sondern an unterschiedlichen Punkten in der Zelle. Denn es ist eher unwahrscheinlich, dass Zellen eine Art Gehirn besitzen, welches sich merken kann, an welcher Stelle ihr das Substrat besser gefallen hat. Eine ähnliche Orientierung von Zellen wie in den hier gemachten Zugkraftmessungen bei einer Applikation eines elektrischen Feldes konnten Lo et al. (2000) beobachten, wenn sich eine Zelle auf einem Gradientengel von der steifen Seite her der weichen Seite näherte. Die Zellen stoppten dabei die Wanderung und das Ausstrecken von Lamellipodien in Richtung des weicheren Geles. Die Retraktion wurde aber am hinteren Ende der Zelle fortgeführt und die Zellen breiteten sich auf der steifen Seite des Substrates entlang der Grenzlinie aus. Wenn nun durch die Applikation eines elektrischen Feldes dieser Spannungssensor aktiviert würde, die Zelle so einen falschen Messwert an bestimmten Seiten der Zelle für die Substratsteifigkeit annimmt, könnte das den Orientierungsprozess der Zelle erklären. Histologische Schnitte zeigen, dass nicht nur Fibroblasten in vivo eine Raumlage einnehmen, bei der die lange Achse der Zelle der mechanischen Hauptbelastungsrichtung im Gewebe entspricht. Möglicherweise steckt phylogenetisch in dem Orientierungsprozess diese Anforderung an die Zelle dem Gewebe Stabilität zu geben. Wenn nämlich in einem Gewebe die Zelle zusammen mit der extrazellulären Matrix in eine Richtung x gedehnt würde, hätte das zur Folge, dass der Dehnungsmesser in der Zelle aktiviert würde und die Zelle eine Orientierung entlang der Zugrichtung x der Kraft durchführen würde. Demnach würde auch eine Zelle, die sich auf der Grenze zwischen einer steifen und einer weichen Unterlage befindet, auf der weichen Seite weniger Spannung oder Gegenkraft des Substrates feststellen und sich somit in die Richtung ausbreiten, die dem Dehnungsmesser mehr Widerstand entgegenzusetzen hat. Auch von Banes et al. (1995) wurde so ein mechanischer Belastungssensor postuliert, der eine Spannung im Zytoskelett aufbaut, um besser kleine mechanische Stimuli messen zu können. Dadurch kann die Zelle adäquat reagieren, diese Reaktion kann aber je nach Zelltyp unterschiedlich ausfallen. Das Auftauchen von Zugkraftvektoren im Vergleich zu einer ruhenden Zelle parallel zum Gradienten des elektrischen Feldes, welche zunächst Zentripetal gerichtet sind, könnten also als eine Reaktion auf den

gestörten Dehnungssensor der Zelle sein. Ein Zunehmen der Kräfte des Zytoskeletts führt zu einer Zunahme der subzellulären Steifigkeit der Zelle in diesen Regionen und zu einer Zunahme des hydrostatischen Druckes des Zytoplasmas. An Stellen geringerer subzellulärer Steifigkeit können dann Zellausläufer wie aus einer Salbentube herausgedrückt werden. Der dort von innen auf die Zellmembran wirkende Druck würde auch erklären, warum die Zugkraft an den Seiten an denen neue Ausläufer entstehen zunächst absinkt. Gestützt wird diese Theorie unter anderem durch die Beobachtungen die Bereiter-Hahn and Luers (1998) mithilfe der "Scanning Accoustik Microscope" (SAM) Technik gemacht haben. Sie stellten geringere subzelluläre Steifigkeit an Zellregionen fest, wo sich neue Protrusionen bildeten, wohingegen Regionen die eine Retraktion vollzogen, eine hohe Steifigkeit aufwiesen.

4.4.4 Galvanotaxis

Galvanotaxis nennt man das Phänomen, dass bestimmte Zellsorten sich im elektrischen Feld auf eine der Elektroden zubewegen. Jaffe (1977) schlug als Grundlage für Galvanotaxis die Separation von geladenen Partikeln in der Zytoplasmamembran durch Elektrophorese vor. Tatsächlich konnte auch die Akkumulation von Rezeptoren auf der kathodennahen Seite in diversen Experimenten nachgewiesen werden (Poo et al., 1979; Fang et al., 1999). Diese Theorie würde die rechtwinkelige Elongation zu den Feldlinien erklären, wozu die Zellen eine selbstinduzierte Kraft entlang der Elongationsrichtung aufbringen müssen. Wenn alle freien Integrine die Tendenz hätten auf einen Pol des elektrischen Feldes zuzudriften und somit auf dieser Zellseite zu akkumulieren, dann wäre die Zelle auf Dauer nur in der Lage Integrine auf einer Seite der Zelle miteinander zu verbinden und zwischen ihnen eine Kraft aufzubauen. Bei dynamischen Zellvorgängen ist es dann nur eine Frage der Zeit, bis alte Kontakte abbrechen und dann die Integrine wieder dem Drift unterliegen. Damit ist dann auch nur eine Elongationsrichtung möglich. Obwohl diese Theorie auf viele der Beobachtungen dieser Arbeit eine Antwort gibt, liefert sie keine Erklärung für den schnellen Kraftanstieg nach dem Anschalten des Feldes.

4.4.5 Converse Flexoelektrizität

Wie Zellen schwache elektrische Felder detektieren, bleibt eine schwierige Frage. Die einfachste Theorie wäre, wie schon erwähnt, eine direkte Induktion einer Kraft in der Zelle. Aber die Vektorbilder zeigen zu Beginn nur einwärtsweisende Vekto-

ren. Also wirken die Kräfte auf gegenüberliegenden Zellseiten in entgegengesetzte Richtung.

Ein Effekt, der eine Kraft induzieren kann, wenn das elektrische Feld die Membran polarisiert, ist die converse Flexoelektrizität (Petrov et al., 1993). Die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran enthält geladene Proteine, die sich gegenseitig abstoßen. Dadurch wird die Spannung der Membran wesentlich beeinflusst. Wird nun die Ladung auf einer Seite der Membran verändert, ändert sich auch die Spannung der Membran. Es wirkt dann eine aktive Kraft, die das Gleichgewicht der Oberflächenspannungen wieder herstellt und somit die Krümmung der Membran verändert. Solche flexoelektrischen Effekte konnten mithilfe der Patch-Clamp Technik an HEK293 Zellen über ein Rasterkraftmikroskop gemessen werden (Zhang et al., 2001). Aber obwohl diese Kräfte nicht nur theoretisch existieren, sondern auch gemessen werden konnten, sind sie sicher nicht stark genug, um die in dieser Arbeit gemessenen Kräfte zu bewirken.

Aber die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die intrazellulären Kräfte vor Zellbewegungen ändern. Die Kraftänderungsmuster sind abhängig von der Orientierung des elektrischen Feldes und stehen in Beziehung zu zukünftigen Zellbewegungen. Es hat den Anschein, dass dies noch geschieht, bevor sich intrazelluläre Calciumspiegel ändern. Möglicherweise liegt den Beobachtungen nicht nur ein Prozess zugrunde. So könnte das elektrische Feld nur die Retraktion verursachen und die Elongation zum Ausgleich der verloren gegangenen Zellausbreitungsfläche dienen (Chen, 1979; Dunn and Zicha, 1995), während nun ein weiterer Mechanismus die Elongationsrichtung diktiert. Elektrophoretischer Drift und auch das Durotaxi-Phänomen sind potentielle Kandidaten für diese gerichtete Elongation.

Es bleibt die Frage zu diskutieren, ob elektrische Felder eine direkte mechanische Wirkung auf die Zellen ausüben, oder ob sie bestimmte Umgebungsvariablen ändern, oder Zellbestandteile beeinflussen und dadurch einen aktiven Orientierungsprozess bewirken können. Angenommen, das elektrische Feld zwingt die Zelle zur Retraktion, dann ist aber noch nicht geklärt, welcher Mechanismus zur Verlängerung der rechtwinklig zum elektrischen Feld gerichteten Zellausläufer führt. Eine Möglichkeit wäre ein durch die Retraktion induziertes Ausbreiten, wie von Chen (1979) für wandernde Zellen beobachtete. In diesem Fall käme es zu einem übermäßigen Ausbreiten der Zellausläufer in nur eine Richtung, um den Verlust an Ausbreitungsfläche in der anderen Richtung auf der Unterlage auszugleichen. Es könnte aber auch der Fall sein, dass das elektrische Feld eine Kraft, welcher Art auch immer, von beiden Polen des elektrischen Feldes aus auf die Zelle ausübt, wodurch ein Druck im Inneren der Zelle aufgebaut wird und dadurch das Zytoplasma an den

Seiten an den geringe Kräfte wirken, herausgequetscht wird. Mit den Ergebnissen der Zugkraftmessung ist auch diese Theorie zu vereinbaren. Offen bleibt immer noch, wie dann diese Kraft auf die Zelle ausgeübt werden sollte. Wenn es eine rein physikalische Kraft auf die Zelle wäre, müsste sie in jedem Versuch in gleicher Weise auftreten und dürfte sich auch nach Ausschalten verschiedener Motoren des Zytoskelettes nicht ausschalten lassen. Wie aber bisher nichtveröffentlichte Daten aus dem EOBM Labor zeigen, findet die Retraktion nicht statt, wenn die Zellen calciumkanalblockierenden Substanzen wie Nifedipin, Cadmium oder Lanthanum ausgesetzt sind. Auch 20 Minuten nach Zugabe von Thapsigargin findet keine Retraktion statt, was zeigt, dass intrazelluläres freies Calcium aus IP_3 sensitiven intrazellulären Calciumspeichern und auch membranständige Calciumkanäle dafür benötigt werden. Wie bereits erwähnt, wird für das Lösen von fokalen Kontakten Calcium benötigt.

4.4.6 Technische Hürden

Die Messungen dieser Arbeit wurden mit einer hochauflösenden integrierenden Kamera gemacht, die die Bilder leider nicht in weniger als 10 Sekunden aquirieren konnte. Um den dynamischen Ablauf des Orientierungsprozesses genau zu erfassen, ist eine hochauflösende intensivierete Kamera nötig, die erst jetzt verfügbar werden. Doyle and Lee (2002) habe kürzlich eine Methode vorgestellt, um Calciumänderungen und Zugkraftmessungen zur gleichen Zeit durchzuführen. Diese Methode ist allerdings weit davon entfernt, eine für diese Arbeit ausreichende Auflösung der Zugkraftmessungen zu bieten. Dafür werden größere Modifikationen an der experimentellen Ausrüstung nötig sein.

Als Ausblick für die zukünftige Forschung bleibt weiterhin die Untersuchung von Zugkräften in einem dreidimensionalen und somit physiologischeren Beobachtungsraum. Dazu könnte man z.B. die Zellen in ein Gel mit eingießen und mit einem automatisierten Mikroskop Schichtaufnahmen des Substrates machen. Die Referenzbilder können auf gleiche Weise nach dem Abtöten der Zelle aquiriert werden.

5 Zusammenfassung

Knochenzellen sind in der Lage, mechanische Stimuli als Reiz aufzunehmen und darauf zu reagieren. Dieses zeigt sich in Umbauvorgängen der Knochenstruktur bei Änderung der mechanischen Belastung. Wie es allerdings vom adäquaten Dehnungsreiz bis zur zellulären Antwort von Osteoblasten kommt, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Diese sogenannte Mechanotransduktionskaskade ist ein wichtiger Ausgangspunkt für die Erforschung der Pathophysiologie der Osteoporose. Auch Teilergebnisse auf diesem Gebiet sind in der Therapie wichtig, wie z. B. die Kenntnis der optimalen Amplitude und Frequenz einer mechanischen Belastung für eine möglichst effektive Knochenbildung in der Frakturheilung.

Ziel dieser Arbeit war es, als Beitrag zur Aufklärung der Mechanotransduktionskaskade, auf zellulärer und subzellulärer Ebene die Interaktionskräfte von Osteoblasten mit ihrer Umgebung zu messen und Kraftverteilungsmuster zu beschreiben. Zudem sollte der Einfluss von einem elektrischen Feld auf die Kraftverteilungsmuster von Osteoblasten untersucht werden, um das Phänomen zu untersuchen, dass Osteoblasten sich in Zellkultur aktiv rechtwinklig zu den elektrischen Feldlinien ausrichten, wohingegen sich z.B. Neuronen parallel dazu ausrichten. Es stellte sich heraus, dass für diese Zielsetzung die Technik der Zugkraftmikroskopie (übersetzt aus dem Englischen von "Traction Force Microscopy") am besten geeignet sein würde. Die Zugkraftmikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit an die Gegebenheiten des hiesigen Labors und die zu beantwortenden Fragen angepasst. Es wurden Zellen auf flexiblen Polyacrylamidsubstraten kultiviert, so dass die zu messenden Interaktionskräfte zu detektierbaren Deformationen der Substrate führten. Durch das Analysieren der zellverursachten Substratdeformationen ließen sich die Ebenenprojektionen der verursachenden zellulären Kräfte sowohl zeitlich als auch quantitativ bestimmen. Die Deformationen wurden durch das Vergleichen eines Substratbildes zum jeweiligen Messzeitpunkt mit einem undeformierten Referenzbild ohne Zelle gemessen. Daraus konnte eine Matrix der Deformationsvektoren erstellt werden. Aus dieser wurden die Kraftvektoren berechnet.

Die Änderungen der zellulären Kräfte, die als Reaktion auf das elektrische Feld auftreten, wurden mithilfe einer leichten Modifikation der Zugkraftmikroskopie-Methode analysiert. Dazu wurden Differenzvektorbilder berechnet, welche lediglich die Änderungen der Interaktionskräfte veranschaulichen, die durch das Anschalten des elektrischen Feldes entstehen. Dadurch ließen sich auch kleine Kraftänderungen visualisieren.

Bei der Bestimmung der gesamten auf das Substrat übertragenen Kraft konnte ein signifikanter Unterschied zwischen primären bovinen Osteoblasten und Osteosarkomzellen festgestellt werden. Als Mittelwert der Gesamtkraft pro Zelle wurden für Osteoblasten 660 nN und für MG63 Zellen nur 47 nN bestimmt. Die Elastizität der Polyacrylamidgele konnte mithilfe eines Rasterkraftmikroskopes sehr genau gemessen werden. Für Substrate aus 8% Acrylamid und 0.03% BIS-Acrylamid ergab sich z.B. ein Elastizitätsmodul von 3000 N/m².

Primäre bovine Osteoblasten und humane Osteosarkomzellen, die dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes ausgesetzt waren, durchliefen einen Prozess von Retraktion und Elongation. Dieser endete in einer rechtwinkligen Ausrichtung der zellulären Längsachse zu den elektrischen Feldlinien. Die für diese Reorientierung benötigte Zeit war in einem bestimmten Bereich negativ zur Feldstärke korreliert. Erstaunlicherweise reagierten die Osteoblasten auf ein elektrisches Feld mit einem Anstieg des intrazellulären freien Calciums nach durchschnittlich 85 Sekunden, aber schon nach durchschnittlich 30 Sekunden war eine Zunahme der Interaktionskräfte mit der Zellumgebung zu beobachten. Erste morphologisch feststellbare Änderungen traten erst nach fünf Minuten auf. In den folgenden Minuten nach dem Anschalten des elektrischen Feldes sanken die Kraftkomponenten tangential zu den elektrischen Feldlinien unter die Ausgangswerte ab.

Mithilfe der Zugkraftmikroskopie war es möglich, die Kräfte von Osteoblasten genau zu messen und deren Kraftverteilungsmuster zu beschreiben. Die durch die Applikation eines elektrischen Gleichstromfeldes verursachten dynamischen Änderungen der Interaktionskräfte wurden qualitativ und quantitativ analysiert. Es wurde eine Technik in unserem Labor etabliert, die als Grundlage für viele aktuelle Forschungsprojekte dient. Anhand verschiedener Tumorzelllinien oder durch das Verwenden von Blocker- oder Aktivatorsubstanzen wird es relativ einfach sein, die entscheidenden Moleküle zu identifizieren, welche die untersuchten Interaktionskräfte beeinflussen. Davon würde nicht nur die Osteoporoseforschung und Frakturheilungsforschung, sondern auch die Tumorforschung profitieren. Die hier verwendete Technik zur Messung solcher Interaktionskräfte ist erst in den letzten Jahren entwickelt worden, vor allem deshalb, weil der nötige Rechenaufwand für eine akzeptable örtliche Auflösung der Kräfte nicht unerheblich ist. Da immer leistungsfähigere Mikroprozessoren auf den Markt kommen und auch sehr große Datenmengen bewältigbar sind, wird es besonders durch Steigerung der zeitlichen Auflösung viele neue Erkenntnisse geben.

Literatur

- Balaban, N., Schwarz, U., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5):466–72. 15, 74
- Banes, A., Tszuzaki, M., Yamamoto, J., Fischer, T., Brigman, B., Brown, T., and Miller, L. (1995). Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol*, 73(7-8):349–65. 76
- Bell, G., Dembo, M., and Bongrand, P. (1984). Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J*, 45(6):1051–64. 70
- Beningo, K., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J., and Wang, Y. (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol*, 153(4):881–8. 15
- Bereiter-Hahn, J. and Luers, H. (1998). Subcellular tension fields and mechanical resistance of the lamella front related to the direction of locomotion. *Cell Biochem Biophys*, 29(3):243–62. 8, 77
- Billiau, A., Edy, V., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J., and De Somer, P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*, 12(1):11–5. 22
- Brighton, C., Cronkey, J., and Osterman, A. (1976). In vitro epiphyseal-plate growth in various constant electrical fields. *J Bone Joint Surg Am*, 58(7):971–8. 7
- Brighton, C., Friedenber, Z., Zemsy, L., and Pollis, P. (1975). Direct-current stimulation of non-union and congenital pseudarthrosis. Exploration of its clinical application. *J Bone Joint Surg Am*, 57(3):368–77. 7
- Brighton, C., Wang, W., Seldes, R., Zhang, G., and Pollack, S. (2001). Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A(10):1514–23. 7
- Brown, M. and Loew, L. (1994). Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol*, 127(1):117–28. 74

- Burton, K., Park, J., and Taylor, D. (1999). Keratocytes generate traction forces in two phases. *Mol Biol Cell*, 10(11):3745–69. 14, 73
- Burton, K. and Taylor, D. (1997). Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature*, 385(6615):450–4. 15
- Chen, W. (1979). Induction of spreading during fibroblast movement. *J Cell Biol*, 81(3):684–91. 78
- Chiquet, M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol*, 18(5):417–26. 6
- Cleveland, J., Manne, S., Bocek, D., and Hansma, P. (1993). A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. 32
- Collinsworth, A., Torgan, C., Nagda, S., Rajalingam, R., Kraus, W., and Truskey, G. (2000). Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch. *Cell Tissue Res*, 302(2):243–51. 75
- Cooper, M. and Keller, R. (1984). Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(1):160–4. 8
- Cooper, M. and Schliwa, M. (1985). Electrical and ionic controls of tissue cell locomotion in DC electric fields. *J Neurosci Res*, 13(1-2):223–44. 7, 8, 75
- Crowley, E. and Horwitz, A. (1995). Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J Cell Biol*, 131(2):525–37. 73
- Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. (1996). Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophys J*, 70(4):2008–22. 9, 48
- Dembo, M. and Wang, Y. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 76(4):2307–16. 17, 28
- Djamgoz, M., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S., and Korohoda, W. (2001). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci*, 114(Pt 14):2697–705. 73

- Doyle, A. and Lee, J. (2002). Simultaneous, real-time imaging of intracellular calcium and cellular traction force production. *Biotechniques*, 33(2):358–64. 79
- Duncan, R. and Turner, C. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 57(5):344–58. 5
- Dunn, G. and Zicha, D. (1995). Dynamics of fibroblast spreading. *J Cell Sci*, 108 (Pt 3):1239–49. 78
- Efron, B. and Tibishirani, R. (1986). Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statistical Science*, 1:54–77. 47
- Fang, K., Ionides, E., Oster, G., Nuccitelli, R., and Isseroff, R. (1999). Epidermal growth factor receptor relocalization and kinase activity are necessary for directional migration of keratinocytes in DC electric fields. *J Cell Sci*, 112 (Pt 12):1967–78. 77
- Forscher, P. (1989). Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *Trends Neurosci*, 12(11):468–74. 75
- Frost, H. (1987). Bone mass and the mechanostat": a proposal. *Anat Rec*, 219(1):1–9. 6
- Galbraith, C. and Sheetz, M. (1997). A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17):9114–8. 14, 52
- Gaudet, C., Marganski, W., Kim, S., Brown, C., Gunderia, V., Dembo, M., and Wong, J. (2003). Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophys J*, 85(5):3329–35. 14, 16, 70
- Gebken, J., Luders, B., Notbohm, H., Klein, H., Brinckmann, J., Muller, P., and Batge, B. (1999). Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2). *J Biochem (Tokyo)*, 126(4):676–82. 5
- Glogauer, M., Arora, P., Yao, G., Sokholov, I., Ferrier, J., and McCulloch, C. (1997). Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci*, 110 (Pt 1):11–21. 74
- Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440–50. 33

- Harris, A., Pryer, N., and Paydarfar, D. (1990). Effects of electric fields on fibroblast contractility and cytoskeleton. *J Exp Zool*, 253(2):163–76. 8, 9, 35
- Harris, A., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440):177–9. 14
- Hartig, M., Joos, U., and Wiesmann, H. (2000). Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *Eur Biophys J*, 29(7):499–506. 7
- Heldin, C., Johnsson, A., Wennergren, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C., and Westermark, B. (1986). A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature*, 319(6053):511–4. 22
- Huiskes, R., Ruimerman, R., van Lenthe, G., and Janssen, J. (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, 405(6787):704–6. 4
- Jaffe, L. (1977). Electrophoresis along cell membranes. *Nature*, 265(5595):600–2. 77
- Jay, P., Pham, P., Wong, S., and Elson, E. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci*, 108 (Pt 1):387–93. 73
- Jones, D. and Bingmann, D. (1991). How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? 22, 24
- Jones, D., Nolte, H., Scholubbers, J., Turner, E., and Veltel, D. (1991). Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 12(2):101–10. 5, 7
- Jorgensen, T. (1972). The effect of electric current on the healing time of crural fractures. *Acta Orthop Scand*, 43(5):421–37. 36
- Karl, I. and Bereiter-Hahn, J. (1999). Tension modulates cell surface motility: A scanning acoustic microscopy study. *Cell Motil Cytoskeleton*, 43(4):349–59. 75
- Koolman, J. and Röhm, K. (1997). *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2 edition. 2
- Landau, L. and Lifshitz, E. (1986). *Theory of Elasticity*, volume 7. Pergamon Press, Oxford, UK. 46

- Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., and Jacobson, K. (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, 400(6742):382–6. 73, 75
- Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. (1994). Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*, 127(6 Pt 2):1957–64. 15
- Li, Y., Hu, Z., and Li, C. (1993). New Method for Measuring Poisson's Ratio in Polymer Gels. *Journal Of Applied Polymer Science*, 50(6):1107–1111. 28
- Lian, J., Coutts, M., and Canalis, E. (1985). Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J Biol Chem*, 260(15):8706–10. 3
- Lindl, T. and Bauer, J. (1994). *Zell- und Gewebekultur*. 22
- Lo, C., Wang, H., Dembo, M., and Wang, Y. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144–52. 28, 34, 52, 75, 76
- Lohmann, C., Schwartz, Z., Liu, Y., Guerkov, H., Dean, D., Simon, B., and Boyan, B. (2000). Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res*, 18(4):637–46. 7
- Marganski, W., Dembo, M., and Wang, Y. (2003). Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow. *Methods Enzymol*, 361:197–211. 42
- Moalli, M., Wang, S., Caldwell, N., Patil, P., and Maynard, C. (2001). Mechanical stimulation induces pp125(FAK) and pp60(src) activity in an in vivo model of trabecular bone formation. *J Appl Physiol*, 91(2):912–8. 74
- Morey, E. and Baylink, D. (1978). Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, 201(4361):1138–41. 5
- Munavar, S., Wang, Y., and Dembo, M. (2001). Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J*, 80(4):1744–57. 9
- Neidlinger-Wilke, C., Grood, E., Wang, J.-C., Brand, R., and Claes, L. (2001). Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res*, 19(2):286–93. 75

- Oldberg, A., Franzen, A., and Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(23):8819–23. 3
- Oliver, T., Dembo, M., and Jacobson, K. (1995). Traction forces in locomoting cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 31(3):225–40. 15
- Oliver, T., Dembo, M., and Jacobson, K. (1999). Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes. *J Cell Biol*, 145(3):589–604. 14, 52, 71
- Onuma, E. and Hui, S. (1988). Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol*, 106(6):2067–75. 7, 75
- Owan, I., Burr, D., Turner, C., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J., and Duncan, R. (1997). Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*, 273(3 Pt 1):C810–5. 6
- Ozawa, H., Abe, E., Shibasaki, Y., Fukuhara, T., and Suda, T. (1989). Electric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) by a mechanism involving calcium ions. *J Cell Physiol*, 138(3):477–83. 7
- Palmer, A., Messerli, M., and Robinson, K. (2000). Neuronal galvanotropism is independent of external Ca(2+) entry or internal Ca(2+) gradients. *J Neurobiol*, 45(1):30–8. 74
- Pauwels, F. (1965). *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 4
- Pelham, Jr, R. and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):13661–5. 15, 18, 27
- Pelham, Jr, R. and Wang, Y. (1998). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol Bull*, 194(3):348–9; discussion 349–50. 15, 34
- Pelham, Jr, R. and Wang, Y. (1999). High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell*, 10(4):935–45. 15, 34

- Pender, N. and McCulloch, C. (1991). Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast sub-types responding to mechanical stretching. *J Cell Sci*, 100 (Pt 1):187–93. 74
- Petrov, A., Miller, B., Hristova, K., and Usherwood, P. (1993). Flexoelectric effects in model and native membranes containing ion channels. *Eur Biophys J*, 22(4):289–300. 78
- Pommerenke, H., Schmidt, C., Durr, F., Nebe, B., Luthen, F., Muller, P., and Rychly, J. (2002). The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 17(4):603–11. 6
- Pommerenke, H., Schreiber, E., Durr, F., Nebe, B., Hahnel, C., Moller, W., and Rychly, J. (1996). Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur J Cell Biol*, 70(2):157–64. 74
- Poo, M., Lam, J., Orida, N., and Chao, A. (1979). Electrophoresis and diffusion in the plane of the cell membrane. *Biophys J*, 26(1):1–21. 77
- Prince, C. and Butler, W. (1987). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll Relat Res*, 7(4):305–13. 3
- Radmacher, M., Tillmann, R., Fritz, M., and Gaub, H. (1992). From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 257(5078):1900–5. 29
- Rees, D., Charlton, J., Ataliotis, P., Woods, A., Stones, A., and Bayley, S. (1989). Myosin regulation and calcium transients in fibroblast shape change, attachment, and patching. *Cell Motil Cytoskeleton*, 13(2):112–22. 75
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N., Schwarz, U., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153(6):1175–86. 74
- Roy, P., Petroll, W., Cavanagh, H., Chuong, C., and Jester, J. (1997). An in vitro force measurement assay to study the early mechanical interaction between corneal fibroblasts and collagen matrix. *Exp Cell Res*, 232(1):106–17. 14

- Schiebler, T., Junqueira, L., and Carneiro, J. (1996). *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 4 edition. 4
- Sheetz, M., Felsenfeld, D., and Galbraith, C. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol*, 8(2):51–4. 74
- Sjaastad, M. and Nelson, W. (1997). Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays*, 19(1):47–55. 75
- Spector, D., Goldman, R., and Leinwand, L. (1998). *Cells : a laboratory manual*, volume v. 1. Culture and biochemical analysis of cells. Cold Spring Harbor Laboratory. 22
- Steckel, R., Page, E., Geddes, L., and Van Vleet, J. (1984). Electrical stimulation on skin wound healing in the horse: preliminary studies. *Am J Vet Res*, 45(4):800–3. 36
- Stewart, R., Erskine, L., and McCaig, C. (1995). Calcium channel subtypes and intracellular calcium stores modulate electric field-stimulated and -oriented nerve growth. *Dev Biol*, 171(2):340–51. 8
- Struckmeier, J. (2001). *Spektroskopische Untersuchung Intrazellulärer Signaltransduktion in Mechanisch Stimulieren Osteoblasten*. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg, Germany. 32
- Struckmeier, J., Klopp, E., Born, M., Hofmann, M., Rink, D., Jones, D., and Butt, H. (2001). Real-time atomic force fluorescence microscopy on living cells. *Proceedings- SPIE the International Society for optical engineering*, (4434):142–149. 29
- Tenbosch, J. (1999). *Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformationen auf Osteoblasten*. PhD thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Deutschland. 75
- Tortonese, M. and Kirk, M. (1997). Characterization of application specific probes for SPMs. 32
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N., and Elson, E. (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci*, 114(Pt 5):1025–36. 34

- Wang, H., Dembo, M., Hanks, S., and Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11295–300. 74
- Wang, H., Dembo, M., and Wang, Y. (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(5):C1345–50. 34
- Wang, J., Chen, H., Seth, A., and McCulloch, C. (2003). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 13
- Wang, Y. and Pelham, Jr, R. (1998). Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol*, 298:489–96. 15, 18, 27
- Ward, M. and Hammer, D. (1994). Focal contact assembly through cytoskeletal polymerization: steady state analysis. *J Math Biol*, 32(7):677–704. 70
- Whitson, S., Harrison, W., Dunlap, M., Bowers, Jr, D., Fisher, L., Robey, P., and Termine, J. (1984). Fetal bovine bone cells synthesize bone-specific matrix proteins. *J Cell Biol*, 99(2):607–14. 2
- Wiesmann, H., Hartig, M., Stratmann, U., Meyer, U., and Joos, U. (2001). Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1538(1):28–37. 7
- Zerwekh, J., Ruml, L., Gottschalk, F., and Pak, C. (1998). The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *J Bone Miner Res*, 13(10):1594–601. 5
- Zhang, P., Keleshian, A., and Sachs, F. (2001). Voltage-induced membrane movement. *Nature*, 413(6854):428–32. 78

A Anhang

A.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Back, Barth, Basler, Bauer, Baum, Behr, Berger, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Eilers, Engel, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fruhstorfer, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Göke, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Herzum, Hesse, Hofmann, Jones, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Kälble, Karlson, Katschinski, Kern, Kienapfel, Kleine, Klenk, Klose, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lammel, Lang, Lange, Lengsfeld, Lennarz, Lill, Lippert, Löffler, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nies, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schepelmann, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schüffel, Schulz, Schwarz, Schwella, Seifart, Seitz, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stiletto, Sturm, Sundermeyer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, von Wichert, Weihe, Weiler, Werner, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

A.2 Danksagung

Danken möchte ich allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit in irgend einer Weise beigetragen haben, die hier aber nicht alle mit Namen erwähnt werden können. Dazu gehören alle Personen aus den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. David B. Jones, Prof. Dr. Micah X. Dembo und Prof. Maria Lonnett Burgess, meine gesamte Familie und alle “Open Source Programmierer” deren Software ich benutzt habe. Gedankt sei im Besonderen:

- Prof. Dr. David B. Jones für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Ermöglichung dieser Arbeit, die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen sowie dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat eigenständig wissenschaftlich zu Arbeiten.
- Prof. Dr. Micah X. Dembo nicht nur für die Möglichkeit die Technik der Tractionforce-Mikroskopie zu erlernen, sondern auch für die äußerst freundliche Aufnahme in sein Appartement und die gute Verpflegung während der Zeit in Boston. Natürlich auch für die vermittelten Computerkenntnisse, die Übernahme der Flugkosten und für etliche Stunden sehr interessanter wissenschaftlicher Diskussionen.
- Prof. Maria Lonnett Burgess für die freundschaftliche Aufnahme in ihr Labor für 3 Wochen zum Erlernen der Tractionforce-Mikroskopie und die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen.
- Marita Kratz und Weng Tan für die Vermittlung ihres Wissens über die Zellkultur sowie die freundschaftliche Unterstützung im Labor.
- Erk Klopp und Jens Struckmeier für die Unterstützung bei den rasterkraftmikroskopischen Messungen und auch für wissenschaftliche Diskussionen.
- William Marganski für die Bereitschaft bei Problemen mit der Libtrc Software per e-Mail zu helfen.
- Thorsten Pohl für das Anfertigen der Elektro- und Zellversuchskammern.

Des Weiteren möchte ich natürlich für die private Unterstützung meiner Mutter Marketta Curtze, meinem Vater Dr. Gerhard Curtze sowie Janina Wüst meinen Dank aussprechen.

A.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Teile aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Curtze, S., M. Dembo, M. Miron and D.B. Jones. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J Cell Sci*, 117(Pt 13):2721-9, 2004.
- Klopp, E., D. Graff, J. Struckmeier, M. Born, S. Curtze, M. Hofmann and D. Jones. The osteoblast mechano-receptor, microgravity perception and thermodynamics. *J Gravit Physiol*, 9(1):P269-70, 2002.